

Thèse de Doctorat

Ines BRAHMI

Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes et l'Université de Tunis El Manar
sous le label de L'Université de Nantes Angers Le Mans et L'Université de Tunis El Manar

Écoles doctorales : Végétal, Environnement, Nutrition, Agroalimentaire, Mer (VENAM)

Discipline : Sciences du Végétal

Spécialité : Physiologie cellulaire et moléculaire du végétal

Unité de recherche : Laboratoire de Biologie et Pathologie Végétales ; UFR Sciences et Techniques de Nantes

Soutenue le 24/07/2015

Thèse N° : (10)

Obtention et Caractérisation de nouveaux génotypes de pois chiche, par radio-mutagenèse, résistants à *Orobanche foetida*

JURY

Président :	Benoit ST PIERRE , Professeur, Université François Rabelais de Tours
Rapporteurs :	Haythem MHADHBI , Maitre de conférences, Centre de Biotechnologie de Borj Cédria Christian MAGNE , Professeur, Université de Bretagne Occidentale
Examineur :	Hela BEN AHMED , Maitre de conférences, Université de Tunis El Manar
Directeur de Thèse :	Omrane BELHADJ , Professeur, Université de Tunis El Manar Philippe SIMIER , Professeur, Université de Nantes
Co-encadrant de thèse :	Yassin MABROUK , Maitre-assistant, Centre National des Sciences et Technologies Nucléaires de Tunis



UNIVERSITE DE TUNIS EL MANAR
FACULTE DES SCIENCES DE TUNIS
DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES



UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES NANTES
ECOLE DOCTORALE VEGETAL, ENVIRONNEMENT,
NUTRITION, AGROALIMENTAIRE, MER

THÈSE EN CO-TUTELLE

Présentée pour l'obtention du

DOCTORAT EN BIOLOGIE

Par

Mlle Ines BRAHMI

Le 24 Juillet 2015

Obtention et Caractérisation de nouveaux génotypes de pois chiche, par radio-mutagenèse, résistants à *Orobanche foetida*

Jury

Présidente: **Hela BEN AHMED**, Maitre de conférences, Faculté des Sciences de Tunis

Rapporteurs: **Haythem MHADHBI**, Maitre de conférences, Centre de Biotechnologie de Borj Cédria
Christian MAGNE, Professeur, Université de Bretagne Occidentale

Examineur : **Benoit ST PIERRE**, Professeur, Université François Rebalais de Tours

Directeurs de Thèse : **Omrane BELHADJ**, Professeur, Faculté des Sciences de Tunis

Philippe SIMIER, Professeur, Université de Nantes

Co-encadrant de thèse : **Yassin MABROUK**, Maitre-assistant, Centre National des Sciences et Technologies Nucléaires de Tunis

Cette thèse représente l'aboutissement du soutien et des encouragements que mes parents m'ont prodigués tout au long de ma scolarité. Ces quelques lignes ne sont pas suffisantes pour les remercier de leur soutien permanent et sans faille, leur patience ainsi que leur compréhension. Je profite de cette occasion pour m'excuser auprès de ma mère et mon père pour mon côté un peu déplaisant pendant les derniers mois avant la fin de ma thèse. Je tiens à vous remercier pour avoir toujours fait preuve d'un dévouement sans limites. Vous êtes mon rayon de soleil.

Je tiens également à remercier mes frères et à ma grande famille.

Ines

Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été faits dans le cadre d'une thèse en co-tutelle entre l'Université Tunis El Manar et l'Université de Nantes. Les travaux de recherche ont été faits dans le laboratoire de Biochimie et de Technobiologie à la Faculté des Sciences de Tunis et le Laboratoire de Biologie et Pathologie Végétales à la Facultés des Sciences et des Technique de Nantes. Ce travail a été financé dans le cadre d'un projet bilatéral franco-tunisien «CMCU 10G0921».

Je remercie respectueusement Madame **Héla BEN AHMED**, Maitre de conférences à la Faculté des Sciences de Tunis, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de cette Thèse. Je tiens à lui exprimer ma gratitude et mon grand respect. Je tiens aussi à exprimer mes remerciements à Monsieur **Christian MAGNE**, Professeur à Université de Bretagne occidentale, et Monsieur **Haythem MHADHBI**, Maitre de conférences au centre de Biotechnologie de Borj Cedria, qui m'ont accordé un immense privilège en acceptant d'être rapporteurs de ma thèse. Je tiens également à remercier sincèrement Monsieur le Professeur **Benoit ST PIERRE**, Université François Rabelais de Tours, qui a accepté d'être examinateur de ce travail. Je n'oublie pas non plus les membres du comité de suivi de thèse, Madame **Neila TRIFI** et Monsieur **Aly Raies**, Professeurs à la Faculté des Sciences de Tunis, qui ont suivi l'évolution de ces travaux et permis de nous concentrer sur les objectifs principaux.

Cette thèse n'aurait pas vu le jour sans la confiance, la patience et la compréhensibilité de mon directeur de thèse, **Philippe SIMIER**, directeur du Laboratoire de Biologie et Pathologie Végétales (LBPV) à l'UFR Sciences et Techniques de Nantes, que je veux particulièrement remercier. Je voudrais aussi lui adresser mes sincères remerciements pour le temps et la patience qu'il m'a accordé tout au long de ces années, d'avoir cru en mes capacités et de m'avoir fourni d'excellentes conditions de travail au sein de son équipe. De plus, les conseils qu'il m'a procuré tout au long de la rédaction, ont toujours été clairs et enrichissants, me facilitant grandement la tâche et me permettant la finalisation de cette thèse. Sans tes corrections, ce manuscrit n'aurait pas été le même.

J'adresse mes plus sincères remerciements au professeur **Omrane BELHADJ**, mon directeur de thèse et le directeur du laboratoire de Biochimie et de Technobiologie à la Faculté des Sciences de Tunis, qui m'a fortement aidé à l'aboutissement de cette thèse. Ses conseils et ses commentaires m'ont été fort utiles.

Je souhaite remercier **Yassine MABROUK** pour son co-encadrement et pour la confiance qui m'a toujours accordé. Je lui exprime mes remerciements pour tous les efforts qu'il a mis en oeuvre pour la réalisation de cette thèse.

Je remercie **Philippe DELAVault** aussi bien pour les discussions que j'ai eu la chance d'avoir avec lui, et ses suggestions pour mes travaux.

J'adresse mes remerciements à **Séverine THOIRON, Jean Bernard POUVREAU, Christophe VERONESI, Houssin BEN HARRATH, Grégory MONTIEL** et **Christian BOULET**, pour la sympathie qu'ils m'ont témoigné.

Passons maintenant à tous les jeunes qui sont passés par le bureau **120**. Il faut bien le dire, la thèse n'est pas une expérience facile mais elle devient beaucoup plus agréable en étant bien entouré. Aux anciens, **Thomas PERON** pour cette image du chercheur passionné ; **Mathieu GAUTHIER**, pour ta bonne humeur permanente initiatrice de l'ambiance de ce bureau ; **Marie VOISIN** qui m'a beaucoup aidé au début de mon expérience au LBPV ; **Zachary** pour ton calme et tes conseils qui ont été bien entendus ; **Marc-Marie**, pour ta rapidité d'action et ta disponibilité pour réparer mon pc ; **Antoine**, notre mannequin pâtissier, merci pour ton amitié et pour tout les bons moments qu'on a partagé ensemble ; **Julien** pour ta gentillesse permanente, les petites discussions du matin surtout lorsque je ne suis pas en bonne humeur ainsi que pour mon initiation en Bio-informatique ; **Vincent** pour ta bonne humeur et ton sourire lorsque l'on se croise dans le long couloir de LBPV ; **Guillaume** 'Michou' pour ta gentillesse et ton aide polyvalent.

Je file maintenant au bureau des filles là où j'ai passé cette dernière année de thèse. Ce bureau est certainement l'endroit le plus convivial du labo. Vous savez redonner le sourire dans les moments pas très drôles d'une vie de thésard et ça c'est super. **Sabine** je garderai des souvenirs de franche rigolade (pas tous avouables sur une page de remerciement de thèse...). Merci beaucoup pour ton soutien permanent, pour tes petits textos de 'maman'. C'était un plaisir de travailler avec toi.

Aude merci pour tous les moments passés ensemble, pour ton pouvoir à supporter ma mauvaise humeur et surtout à écouter ma fameuse phrase 'je veux finir ma thèse'. Merci pour ta gentillesse et ton affection. Merci pour tout.

A **Natacha** 'Chatana' tu as quitté le LBPV mais je me souviendrai toujours de ton rire mythique fusant à travers tout le LBPV. Des bons moments qu'on a partagé ensemble en dehors de LBPV en tant qu'amie plus que collègue de labo.

Je ne peux pas passer sans remercier **Dominique BOZEC**, pour tout ce qu'il a fait pour m'aider à me débrouiller comme une grande à Nantes, à m'initier à travailler avec les orobanches et plein d'autres choses. MERCI.

Je souhaite également adresser tous mes remerciements à **Bojana, Mykhaylo et Johannes**.

Je remercie également **Lucile MORIN** pour sa gentillesse et sa bonne humeur permanente.

Bien sur un grand merci à tous les collègues du Laboratoire de Biochimie et de Technobiologie. Dans le désordre : **Amel ; Hélé ; Mouna ; Youssra M.; Youssra; Moez ; Khouloud ; Ghazi ; Wajdi et Nihed**. Sans Oublier Madame **Alia**, Merci pour ton aide et ta bonne humeur. Un grand merci à **Sonia ; Imen H. ; Sihem ; Najwa et Mouna** au CNSTN pour leur aide.

J'adresse mes sincères remerciements aux amis que j'ai eu la chance de connaître depuis la maternelle pour certains, ou depuis le lycée ou l'université pour les autres : **Chaymouma, Youssra, Raja, Feten R., Feten A., Intidhar et Samsoumti**. Qui auraient parié il y a quelques années qu'ils allaient faire de moi un docteur !! Vous avez été une véritable bouffée d'oxygène lors de chaque moment passé ensemble depuis le début même si ces derniers sont devenus trop rares.

A la fin Je souhaite remercier les familles **LEFRANC** et **OUISSSE** pour tout ce qu'ils font pour moi lors de mes séjours en France.

Voilà, j'espère n'avoir oublié personne.

Merci, Ines

SOMMAIRE

Dédicace.....	1
Remerciements.....	2
Liste des figures, tableaux et annexes.....	8
Liste des abréviations.....	11
Introduction générale	12
Etude Bibliographique	14
1- Les légumineuses en Tunisie	14
1-1- Situation des légumineuses cultivées en Tunisie	14
1-2- Culture de pois chiche en Tunisie	16
1-2-1- Importance économique	17
1-2-2- Importance alimentaire	17
1-2-3- Importance agronomique	17
1-2-4- Impact des stress biotiques et abiotiques.....	19
2- Les plantes adventices parasites.....	26
2-1- Généralités.....	26
2-2- Les orobanches.....	29
2-2-1- Développement des orobanches.....	31
a- Conditionnement.....	31
b- Germination et stimulants de germination.....	32
c- Fixation sur l'hôte.....	34
d- Développement post-fixation.....	35
2-2-2- Moyen de lutte.....	36
a-Mesures préventives.....	36
b-Lutte physique.....	37
c-Lutte agronomique.....	37
d-Lutte biologique.....	40
e-Lutte chimique.....	40
f-Lutte génétique.....	41
g-Lutte intégrée.....	42

**Chapitre 1 : Mutagenèse induite par radiation gamma chez le pois chiche :
variabilité moléculaire, changements développementaux et amélioration de la
résistance à *Orobanche foetida***

1- Introduction : contexte et objectifs.....	44
2- Matériel et méthodes.....	47
2-1- Matériel végétal.....	47
2-2- Méthodes.....	47
2-2-1- Optimisation des conditions de radio-traitement.....	47
a-Emballage et conditionnement sous vide des graines.....	47

	b-Détermination de la dose d'irradiation.....	47
2-2-2	Irradiation des graines.....	47
2-2-3	Test de germination des graines en boîtes de Petri.....	48
	a- Stérilisation des graines.....	48
	b- Mise en germination des graines.....	48
2-2-4-	Développement des plantes en serre.....	48
2-2-5-	Phénotypage aux champs.....	50
2-2-6-	Analyse de la variabilité génétique des mutants par la technique ISSR-PCR	50
	a-Extraction de l'ADN.....	50
	b-Optimisation et sélection des amorces ISSR.....	52
	c-Analyse des données moléculaires.....	52
2-2-7-	Analyse statistique des données.....	53
3-	Résultats.....	55
3-1-	Effet de doses croissantes sur le taux de germination en boîtes de Petri.....	55
3-2-	Effet de doses croissantes sur le taux de survie des plantes en serre.....	55
3-3-	Effet de doses croissantes sur le développement post-germination.....	57
3-4-	Phénotypage au champs : sensibilité à l'orobanche et rendement grainier...	59
3-5-	Analyse ISSR de la diversité génétique des lignées sauvage et mutantes de pois chiche.....	63
4-	Discussion.....	64
Chapitre 2 : Etude de la stabilité de la résistance induite par mutagenèse dans les descendances M2 et M3 et des mécanismes de résistance sous-jacents		
1-	Introduction.....	67
2-	Matériel et méthodes.....	69
2-1-	Matériel végétal.....	69
2-2-	Méthodes.....	69
2-2-1-	Germination des graines de pois chiche.....	69
2-2-2-	Stérilisation des graines d'orobanche.....	69
2-2-3-	Conditionnement des graines d'orobanche in vitro et distribution en plaques.....	69
2-2-4-	Culture sur billes de verre, récolte des exsudats racinaires et test de germination.....	71
2-2-5-	Culture en mini-rhizotron.....	71
2-2-6-	Co-culture en pots.....	73
2-2-7-	Activités enzymatique de défense chez les mutants (M3) de pois chiche.....	74
	a-Extraction des protéines solubles.....	74
	b-Dosage des protéines solubles.....	74
	c-Dosage de l'activité Peroxydase (POX).....	74
	d-Dosage de l'activité Phénylalanine ammonia lyase (PAL).....	74
	e-Dosage de l'activitéPolyPhénol-Oxydase.....	75
2-2-8-	Analyse biochimique : teneur en composés phénoliques chez les mutants (M3).....	75
3-	Résultats.....	77
3-1-	Etude de la génération M2.....	77
3-1-1-	Pouvoir stimulant des exsudats racinaires des mutants M2 de pois chiche...	79
3-1-2-	Co-culture en système mini-rhizotron.....	79
	a-Cinétique de germination des graines d'orobanche.....	79
	b-Cinétique de développement des tubercules d'orobanche.....	83

3-1-3-	Culture de l'interaction orobanche- pois chiche (témoin et sauvage) en pots	85
3-2-	Etude de la génération M3.....	85
3-2-1-	Test du pouvoir des exsudats racinaires.....	85
3-2-2-	Co-culture en mini-rhizotron.....	85
	a- Pouvoir stimulant de la germination des graines d'orobanche.....	85
	b- Cinétique de développement des orobanches.....	85
3-2-3-	Culture en pot de l'intéraction orobanche-pois chiche (témoin et mutants M3).....	87
3-2-4-	Analyse biochimique de la résistance.....	90
	a- Marqueurs de la voie phénylpropanoïdes.....	90
	b-Marqueurs enzymatiques du système antioxydant.....	92
4-	Discussion.....	95
	Conclusions et perspectives.....	101
	Annexes.....	105
	Références Bibliographiques.....	117

Listes des figures

Figure 1: Les types de pois chiche (<i>Cicer arietinum</i>) Kabuli et Dési.....	16
Figure 2: Principaux facteurs affectant la culture de pois chiche	18
Figure 3: Symptômes de l'ascochytose.....	18
Figure 4: Symptômes de fusariose vasculaire.....	20
Figure 5: La diversité du parasitisme chez les angiospermes.....	25
Figure 3: Illustration des différents types de plantes parasites.....	25
Figure 7: Cycle de développement d' <i>Orobanche foetida</i>	28
Figure 8: Interactions hormonales au cours de la levée de la dormance et la germination des graines et de leurs effets sur la rupture des téguments et de l'endosperme.....	30
Figure 9: Représentation schématique de la structure de graine d'orobanche.....	33
Figure 10: Dialogue chimique entre le parasite et les racines de la Plante hôte et initiation de la formation de l'haustorium chez <i>Triphysaria</i> et <i>Striga</i>	33
Figure 11: Disposition des échantillons sur la source de Co60.....	46
Figure 12: Représentation schématique de la technique ISSR-PCR.....	49
Figure 13: Effet des rayons gamma sur la germination des graines de pois chiche (cv. Amdoun).....	54
Figure 14: Effet des rayons gamma sur la survie des plantes de pois chiche (cv. Amdoun).....	54
Figure 15: Phénotype des jeunes plantes suite à une pré-exposition des graines de pois chiche au Co60.....	56
Figure 16: Effet des rayons gamma sur les teneurs en chlorophylles.....	59
Figure 17: Niveau de sensibilité des plantes de pois chiche non irradiées (contrôle) et des mutants M1 sélectionnés au champ à <i>Orobanche foetida</i>	58
Figure 18: Rendement grainier de la lignée contrôle non irradiée et des mutants M2 sélectionnés.....	61
Figure 19: Dendrogramme des mutants M2 et du contrôle non irradié du pois chiche (cv. Amdoun), montrant la similarité génétique basée sur des données ISSR.....	62
Figure 20: Système double pot de culture sur billes de verre pour la collecte des exsudats racinaires de pois chiche.....	70
Figure 21: Test de germination des graines d'orobanche par la réduction du MTT.....	71
Figure 22: Co-culture de l'association Pois chiche - <i>Orobanche foetida</i> en mini-rhizotron.....	72
Figure 23: Capacité stimulante maximale des exsudats racinaires de la variété contrôle (non irradiée) et des mutants M2 vis-à-vis de la germination des graines d' <i>O. foetida</i>	76
Figure 24: Capacité stimulante maximale des exsudats racinaires de la variété témoin (non irradiée) et des mutants M2 vis-à-vis de la germination des graines d' <i>O. foetida</i> (système mini-rhizotron).....	78
Figure 25: Nombre total d'orobanches fixées / g de matière sèche racinaire de Pois chiche (viables et nécrosées) (à 56 JAI, système mini-rhizotron).....	80
Figure 26: Corrélation entre la capacité maximale de germination des génotypes de Pois chiche (témoin non irradié et mutants) et le nombre maximum d'orobanches fixées (système mini-rhizotron).....	80

Figure 27: Nombre total d'orobanches fixées / g MS racinaire en pots	82
Figure 28 : Phénotypes des orobanches parasitant la variété témoin non irradiée et les mutants résistants d'intérêt non irradié (a) et les mutants résistants de la M2 d'intérêt	82
Figure 29: Capacité stimulante maximale des exsudats racinaires de la variété témoin non irradiée et des mutants M3 vis-à-vis de la germination des graines d' <i>O. foetida</i>	84
Figure 30: Nombre maximum d'orobanches fixées/ g MS racinaire de la variété témoin non irradiée et des mutants M3 d'intérêt.....	86
Figure 31: Phénotypes des orobanches (<i>O. foetida</i>) parasitants la variété témoin non irradiée (a) et les mtants M3 résistants au 56 ^{ième} JAI en système mini-rhizotron.....	86
Figure 32: Nombre total des orobanches fixées/ g MS racinaire de la variété témoin non irradiée (a) et les mtants M3 d'intérêt de pois chiche (plante hôte âgée de 90 jours, culture en pots.....	88
Figure 33: Phénotypes des orobanches parasitants la variété témoin non irradiée et les mutants M3 résistants (9,10, 62, 63 et 92) en fin de culture en pots.....	88
Figure 34: Evolution de la capacité enzymatique Phénylalanine Ammonia Lyase (PAL) des racines de la variété témoin non irradiée et des mutants M3 sensibles et résistants de pois chiche, en conditions de non infestation (1) et d'infestation par <i>O. foetida</i> (2) (système mini-rhizotron.....	89
Figure 35: Evolution de la teneur des composés phénoliques solubles des racines de la variété témoin non irradiée et des mutants M3 sensibles et résistants de pois chiche, en conditions de non infestation (1) et d'infestation par <i>O. foetida</i> (2) (système mini-rhizotron).....	91
Figure 36: Evolution de la capacité enzymatique Peroxydase (POX) des racines de la variété témoin non irradiée et des mutants M3 sensibles et résistants de pois chiche, en conditions de non infestation (1) et d'infestation par <i>O. foetida</i> (2) (système mini-rhizotron).....	91
Figure 37: Evolution de la capacité enzymatique PolyPhénol-Oxydase (PPO) des racines de la variété témoin non irradiée et des mutants M3 sensibles et résistants de pois chiche, en conditions de non infestation (1) et d'infestation par <i>O. foetida</i> (2) (système mini-rhizotron).....	95
Figure 38: Composantes de la résistance induite par radiomutagenèse chez le pois chiche (génération M3) vis-à-vis d' <i>Orobanche foetida</i>	102

Liste des tableaux

Tableau 1: Surface occupée par les légumineuses alimentaires en Tunisie	16
Tableau 2: Composition de milieu de culture Coic.....	46
Tableau 3: Liste des amorces ISSR testées pour étudier le polymorphisme des mutants M2 d'intérêt.....	51
Tableau 4: Effets des rayons gamma sur le phénotype des plantes de pois chiche à 90 jours post-semis.....	56
Tableau 5: Le polymorphisme détecté par l'utilisation de 5 amorces ISSR sur 30 lignées mutantes et lignée parentale (non irradié) de pois chiche (cv. Amdoun).....	61
Tableau 6 : Taux de germination maximal des graines d' <i>Orobanche foetida</i> à proximité des racines de la variété témoin et des mutants d'intérêt M3 de pois chiche (système mini-rhizotron).....	85

Liste des annexes

Annexe 1 : Effets des rayons gamma sur la morphologie des feuilles	106
Annexe 2 : de pétioles dans certains étages foliaires.	106
Annexe 3 : Cinétique d'exsudation du pouvoir stimulant de la variété témoin non irradiée et des mutants M2 de pois chiche vis-à-vis de la germination des graines d' <i>O. foetida</i>	107
Annexe 4 : Cinétique de germination des graines d' <i>Orobanche foetida</i> à proximité des racines de la variété témoin (non irradiée) et des mutants M2 de pois chiche (système mini-rhizotron).....	108
Annexe 5 : Cinétique de développement des orobanches fixées sur les racines des plantes de pois chiche (mutants et variété mère (système mini-rhizotron).....	109
Annexe 6 : Développement d' <i>O. foetida</i> sur le système racinaire du pois chiche (mini-rhizotron)	114
Annexe 7 : Phénotypes des orobanches (<i>O. foetida</i>) parasitant la variété témoin non irradiée et les mutants résistants de la M2 (système mini-rhizotron)	114
Annexe 8 : Cinétique d'exsudation du pouvoir stimulant de la variété témoin non irradiée et des mutants M3 de pois chiche vis-à-vis de la germination des graines d' <i>O. foetida</i>	115
Annexe 9 : Cinétique de développement des orobanches fixées sur la variété témoin contrôle et les mutants M3 d'intérêt de pois chiche (système mini-rhizotron).....	116

Liste des abréviations

A	:	Adénosine
ABA	:	Acide abscissique
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
AIA	:	Acide indole-3-acétique
BET	:	Bromure d'éthyldium
BO ₃ H ₃	:	Acide borique
C	:	Cytosine
Ca(NO ₃) ₂	:	Dinitrate de calcium
CKs	:	Cytokinines
Co ₆₀	:	Cobalt 60
CuSO ₄	:	Sulfate de cuivre
DL50	:	Dose Léthale 50
EDTA	:	acide éthylène diamine tétraacétique
EMS	:	Ethyl méthyl sulfonate
FeCl ₃	:	Chlorure ferrique
G	:	Guanine
GA	:	Acide gibbérellique
Gy	:	Gray
HIFs	:	Hautorium-Inducing Factors
Hr	:	Humidité
ISSR	:	Inter simple sequence repeat
JAI	:	Jours après inoculation
K ₂ HPO ₄	:	Phosphate de Potassium dibasique
Kg	:	Kilogrammes
KNO ₃	:	Nitrate de potassium
MF	:	Matière fraîche
MgSO ₄	:	Sulfate de magnésium
MnSO ₄	:	Sulfate de manganèse
MTT	:	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide
Na ₂ MoO ₄	:	Molybdate de sodium
NaCl	:	Chlorure de sodium
NaNO ₃	:	Nitrate de sodium
NH ₄ NO ₃	:	Nitrate d'ammonium
PA	:	partie aérienne
PAL	:	Phénylalanine ammonia-lyase
PMG	:	Poids de mille graines
POX	:	Peroxydases
PPO	:	Poly Phénol-oxydase
PR	:	Partie racinaire
ROS	:	Espèce réactive de l'oxygène
SLs	:	Strigolactones
TAE	:	Tris-acétate-EDTA
UV	:	Ultraviolet
ZnSO ₄	:	Sulfate de zinc

Introduction générale

Introduction générale

Dans le monde du vivant, une distinction évidente peut s'observer entre animaux et végétaux. Les premiers sont mobiles, hétérotrophes et se déplacent pour accéder à leur alimentation. En revanche, les plantes supérieures vivent fixées et sont pour la plupart autotrophes. En effet, grâce au processus de photosynthèse, les plantes subviennent elles-mêmes à une grande partie de leurs besoins nutritionnels. Cependant, ce mode de vie présente de nombreux désavantages, les plantes subissant sans cesse des agressions extérieures comme des stress abiotiques (stress hydrique ou salin...) ou biotiques (virus, bactéries et autres phytopathogènes...). Sous de telles contraintes, les plantes mettent en place des moyens pour lutter et résister à ces différents stress. L'autotrophie pourrait sembler être une condition sine qua non pour que les plantes aient une vie fixée. En réalité, le règne végétal comporte une catégorie un peu à part et relativement méconnue : les plantes parasites. Ces curiosités botaniques ont certes un mode de vie fixé, mais comme leur nom l'indique, elles vivent aux dépens d'une plante hôte. Certaines de ces plantes sont par ailleurs dépourvues de chlorophylle et donc totalement hétérotrophes. Elles puisent directement leurs ressources nutritives (nutriments et eau) dans les tissus conducteurs de leur plante hôte autotrophe. Cette spoliation trophique a des conséquences dommageables pour cette dernière. Si la plante hôte considérée est une plante cultivée d'intérêt agronomique, une forte infestation par une plante adventice parasite peut avoir un impact significatif sur le rendement de la culture, par conséquent des enjeux agro-économiques évidents apparaissent.

La famille des Orobanchacées n'est composée que d'espèces à mode de vie parasitaire obligatoire. La plupart de ces espèces se développent dans des écosystèmes naturels, sans impact marqué sur leurs hôtes. Quelques espèces ont adopté par contre un mode de vie adventice dans des agrosystèmes majeurs, notamment dans les pays Méditerranéens. Ainsi en Tunisie, deux espèces d'orobanche constituent des adventices majeures et nuisibles des cultures de légumineuses, *Orobanche crenata* et *Orobanche foetida*. *Orobanche crenata* est un pathogène agronomique traditionnel sur l'ensemble du territoire alors que les infestations par *O. foetida* sont plus récentes (Kharrat et al. 1992) et localisées dans le Nord de la Tunisie. Des stratégies de contrôle intégré des orobanches sont proposées, incluant des pratiques culturales et une lutte génétique et chimique. Leur succès s'avère très rare. Difficiles à mettre en place, leur rentabilité et efficacité demeurent insuffisantes. La sélection de variétés résistantes est encore la méthode la plus économique, faisable et respectueuse de

l'environnement. Néanmoins, la résistance à l'orobanche est un caractère rare dans les collections de génotypes des sélectionneurs, notamment pour les légumineuses (Cubero and Hernández 1991; Román et al. 2002; Rubiales et al. 2009a). L'amélioration de la résistance à l'orobanche est ainsi un objectif majeur de la plupart des programmes de sélection génétique (Rubiales 2014). Les mutations constituent la base de variabilité génétique exploitée par tous les sélectionneurs. Dans la nature, le matériel génétique des êtres vivants est sans cesse l'objet de modification. L'ADN des génomes mute d'une part spontanément et d'autre part sous l'effet d'agents naturels, physiques, chimiques et biologiques présents dans l'environnement. Dans ce cadre, la radio-mutagenèse peut être utilisée pour élargir la variabilité génétique. Bien que cette stratégie soit intégrée dans de nombreux schémas de sélection et création variétale, elle demeure encore très rare pour la sélection d'une résistance à l'orobanche.

Ce travail de thèse a pour objectif de préciser l'impact de doses croissantes de rayons gamma sur le développement du pois chiche et l'intérêt d'un tel traitement pour le développement de nouvelles variétés résistantes à *O. foetida*. Après une sélection aux champs des plantes d'intérêt (génération M1), ce travail vise aussi à évaluer la stabilité de la résistance et de caractériser ses composantes dans les descendance M2 et M3. Sur le plan agronomique, l'objectif à court terme est ainsi d'obtenir des lignées stabilisées et résistantes à *O. foetida*.

Etude Bibliographique

1- Les légumineuses cultivées en Tunisie

Les légumineuses à graines constituent toujours une part importante de l'alimentation du monde, particulièrement dans les pays en développement où elles sont la principale source de protéines pour l'homme. Citons le haricot (*Phaseolus vulgaris*) en Amérique Latine, le pois chiche (*Cicer arietinum*), la lentille (*Lens culinaris*) et la fève (*Vicia faba*) dans le bassin méditerranéen, le soja (*Glycine max*) en Asie, sans oublier l'arachide (*Arachis hypogea*) et le pois (*Pisum sativum*) dans le monde entier.

La flore végétale tunisienne est extrêmement riche en diverses espèces spontanées et cultivées (Zoghlami and Hassen 1999). La grande variation des conditions du milieu fait que pour chaque espèce, il existe un grand nombre d'écotypes dont la variabilité génétique constitue un matériel de choix pour la sélection et la création de variétés adaptées aux conditions diverses.

En Tunisie, les légumineuses alimentaires constituent une composante de base dans les systèmes agronomiques traditionnels. Elles interviennent directement dans la ration alimentaire humaine ou indirectement dans la nourriture du cheptel. En plus de leur importance dans le régime alimentaire des êtres humains, elles ont un intérêt particulier dans le concept de l'agriculture durable dans la mesure où leur introduction dans l'assolement instaure la rotation des cultures, la diversification des productions et la protection de l'environnement contre la pollution par les engrais azotés les pesticides et les désherbants chimiques.

1-1- Situation des légumineuses cultivées en Tunisie

Les légumineuses alimentaires, notamment, la fève, la féverole, le pois, la lentille, le haricot vert et le pois chiche constituent une source très importante en protéines végétales qui peut corriger le déficit en protéines animales. En Tunisie, les superficies occupées par les légumineuses à graines restent insignifiantes. Elles sont de l'ordre de 78000 ha et représentent 0.002% de la superficie agricole totale et 4% des superficies emblavées en grandes cultures, notamment en céréales et légumineuses. La production annuelle moyenne des légumineuses à graines fut d'environ 67000 tonnes entre 1990 et 2010 (DGPA 2011).

Les légumineuses occupent moins de 4,5% de terres arables dans le Nord tunisien et moins de 9% de la surface des terres cultivées (Kharrat et al. 1991). La sole des légumineuses a diminué de 30% entre 1990 et 2000 et leur proportion par rapport aux céréales est passée de 7 à 3% (FAOSTA 2011). La production annuelle des légumineuses à graines a ainsi diminué significativement au cours de ces dernières décennies (DGPA 2011).

Tableau 1 : Surface occupée par les légumineuses alimentaires en Tunisie (moyenne de 4 années 1984-1987) (Kharrat et *al.* 1991)

	Surface moyenne (1000 ha)	%
Fève (<i>Vicia faba</i>)	57510	47,8
Pois chiche (<i>Cicer arietinum</i>)	42260	35,1
Autres	20550	17,1



Figure 1: Les types de pois chiche (*Cicer arietinum* L.) Kabuli et Dési (<http://www.agriculture.gov.sk.ca/>)

1-2- Culture du pois chiche

Le pois chiche (*Cicer arietinum*), est une plante annuelle de la famille des Fabacées, à petites gousses velues contenant habituellement deux graines. Cette espèce est classée troisième parmi les légumineuses à graines les plus cultivées au monde et occupe 10,4 millions d'hectares de superficie, avec une production annuelle totale estimée de 8,6 millions de tonnes (FAO 2004). Le pois chiche est également l'une des plus importantes légumineuses à graines cultivées en Tunisie, occupant la seconde position après la fève (**Tableau 1**). La majeure partie des superficies cultivées de pois chiche est concentrée dans le nord du pays, caractérisé par un climat humide à subhumide, et particulièrement dans les régions de Béja, Jendouba, Nabeul, Mateur et Bizerte (DGPA 2006).

Il existe deux grands types de pois chiche (**Figure 1**) qui se distinguent par la taille des semences, la forme de graines et la couleur (Moreno and Cubero 1978) : le type Desi (Origine indienne: Nizakat et *al.* 2007) et le type Kabuli (origine Méditerranéenne et du Moyen-Orient). Les graines de type desi sont de forme angulaire, à tégument foncé avec des teneurs élevées en fibres (Segev et *al.* 2010). Celles de type Kabuli sont grandes, en forme de tête de bélier, de couleur beige et avec un faible pourcentage de fibres.

Les variétés d'hiver et de printemps de pois chiche cultivées en Tunisie sont de type Kabuli (Wery 1990). Les variétés les plus utilisées sont :

- En culture d'hiver : Chétoui (ILC 3279), Kasseb (FLIP 83-46C), Bochra (INRAT 87), Béja 1(INRAT 93-1) et Nayer (INRAT 88).
- En culture de printemps : Amdoun, Amdoun 1, Marrouki.

Les géotypes Chétoui (ILC3279), Amdoun 1 et Kassab, Béja 1(INRAT 93-1), Nayer (INRAT 88) et Bochra (INRAT 87) se caractérisent par un port pluviale. D'après l'ICARDA (1999), les géotypes de pois chiche les plus adaptés en Tunisie sont Chétoui, Kasseb, Amdoun, Bochra et Nayer.

1-2-1-Importance économique

Apparu au Moyen Orient il y a 7450 années, le pois chiche est l'un des premiers légumes cultivés (Maiti and Wesche-Ebeling 2001). Il occupe la troisième position parmi les légumineuses à graines (Yust et *al.* 2003). Dans le bassin méditerranéen, le pois chiche est conduit en culture pluviale.

En Tunisie, les légumineuses occupent moins de 9% de la surface totale des terres cultivées et moins de 4,5% de terres arables de la région Nord (Kharrat et *al.* 1991). La culture du pois

chiche y occupe la seconde position après celle de la fève (DGPA 2011), avec une superficie d'environ 35% de la sole totale des légumineuses (Kharrat et *al.* 1991). La production nationale, de l'ordre 14000 t/an (DGPA 2011), est insuffisante pour couvrir les besoins internes du pays. Les importations sont ainsi de l'ordre de 19 000 t/an. Le rendement en graines, estimé à 890 Kg/ha, est faible et variable selon la zone de culture (DGPA 2011). D'après Sifi et *al.* (2006), un rendement moyen de 1,5 à 3t/ ha est facilement réalisable en Tunisie à condition d'appliquer les techniques culturales préconisées et de respecter la rotation des cultures dans les systèmes de production.

1-2-2-Importance alimentaire

La demande de production et d'exportation de pois chiches est importante dans le monde entier, en raison de sa très haute valeur nutritionnelle (Pacucci et *al.* 2006 ; Roy et *al.* 2010). Le pois chiche est destiné, en sa majeure partie, à la consommation humaine, le reste étant utilisé pour le bétail comme fourrage (Upadhyaya et *al.* 2001).

Le pois chiche est dépourvu de tout facteur anti nutritionnel et a une composition très riche en protéines et faible en gras et en sodium. C'est aussi une excellente source de fibres solubles et insolubles, de glucides complexes, de vitamines, et de minéraux (calcium, phosphore, fer et magnésium) (Tosh and Yada 2010; Boye et *al.* 2010). Le pois chiche est une excellente source des protéines alimentaires en raison de leur biodisponibilité et leur composition bien équilibrée en acides aminés (Wang et *al.* 2010). Il a été ainsi associé à la prévention de maladies cardiovasculaires, à la gestion du diabète de type 2 et à l'abaissement des taux de cholestérol (O'Neil et *al.* 2014)

Les fibres alimentaires insolubles des graines de pois chiche ont été associées à la réduction de l'incidence du cancer du colon, alors que les fibres solubles ont un effet bénéfique sur la perte de poids (Agriculture and Agri-Food Canada 2006). Les bienfaits nutritionnels du pois chiche ont conduit à son utilisation dans diverses applications culinaires, telles que de l'humus. En outre, le pois chiche est utilisé dans les soupes et les salades de ragoûts, et peut être transformés en farine.

1-2-3-Importance agronomique

Avec les conditions climatiques méditerranéennes, le pois chiche est une plante traditionnellement cultivée en Tunisie, dont le manque d'eau est un facteur limitant majeur (**Figure 2**). Les agriculteurs se rendent compte de plus en plus du rôle appréciable que jouent

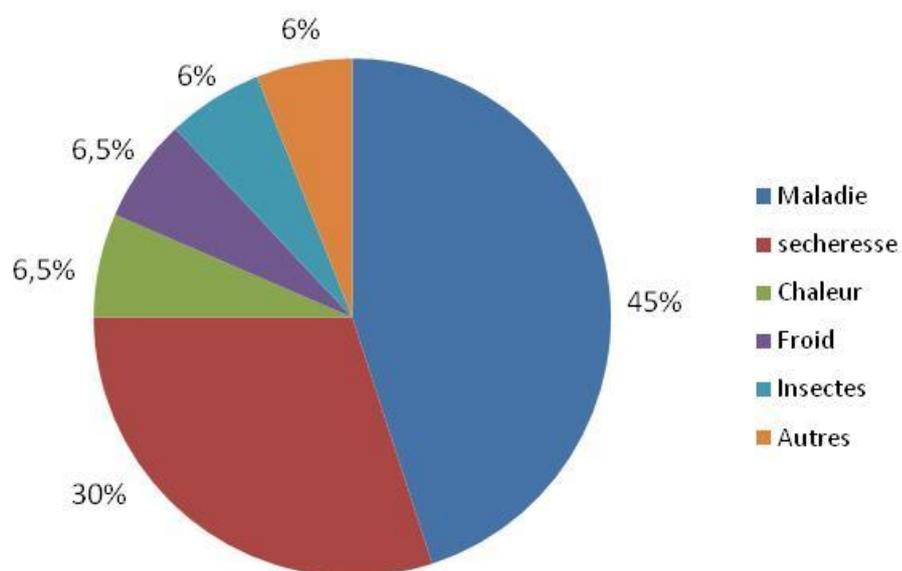


Figure 2: Principaux facteurs affectant la culture de pois chiche (*Cicer arietinum L.*) (Singh et al. 1994)

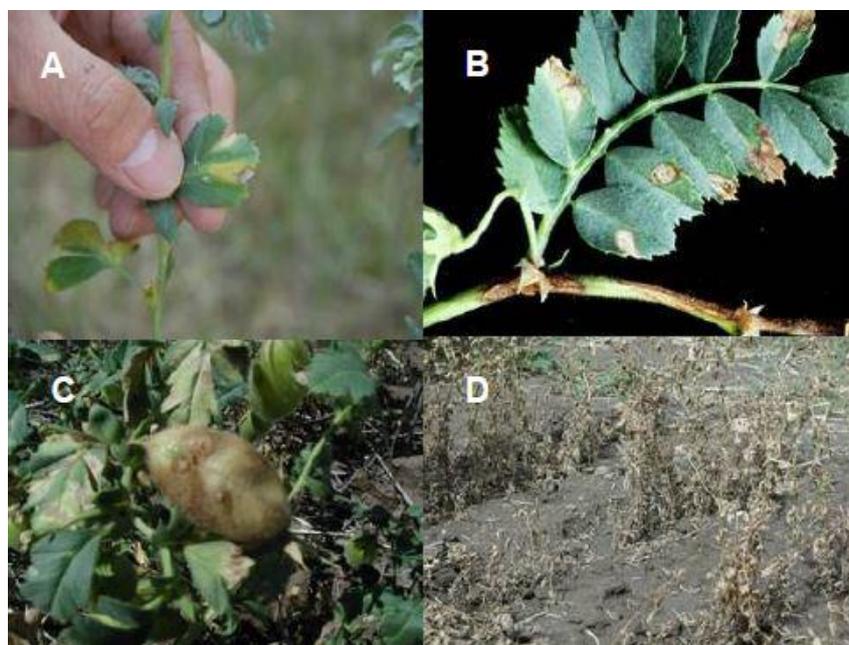


Figure 3: Symptômes de l'ascochytose sur (A) les feuilles, (B) les tiges et (C) les gousses des plants de pois chiches, et (D) récolte à 100 % déficitaire attribuable à une grave attaque d'ascochytose (<http://www.agr.gc.ca/>)

les légumineuses à graines dans la fertilisation organique des sols dans le contexte d'un système de culture durable (Pacucci et al. 2006), Dans des conditions optimales de symbiose avec *Rhizobium*, le pois chiche peut conduire à une fixation de l'azote naturel jusqu'à 140 kg N / ha (Gaur et al. 2008). Ainsi, en raison des importantes quantités d'azote incorporées dans le sol et délaissées dans les résidus, la culture du pois chiche maintient, pour une longue durée, la fertilité du sol (Islam et al. 2013).

1-2-4- Impact des stress biotiques et abiotiques

Le pois chiche fait face à diverses contraintes biotiques et abiotiques au cours de son cycle de vie (Millan et al. 2006).

a- Stress biotique

- **Les maladies:** En 2012, Nene et al. dénombrèrent environ 170 agents pathogènes infectant le pois chiche dans les différentes régions du monde. Parmi eux néanmoins, seuls quelques-uns ont un réel potentiel dévastateur. Ainsi, certaines maladies sont considérées comme des problèmes persistants pour la production de pois chiche dans de larges zones géographiques. On peut citer :

-L'ascochytose (Figure 3): est l'une des principales maladies du pois chiche dans les climats froids et humides du monde (ICRISAT 2012; Khan et al. 1999 ; Chongo et al. 2003). C'est une maladie fongique causée par *Didymella rabiei*. En Tunisie, *D. rabiei* a été détecté pour la première fois au cours de la saison 2001-2002 sur les débris de pois chiche hivernant. Plusieurs chercheurs ont décrit les symptômes de la maladie (Pande et al. 2005; Gloria et al. 2012). L'ensemble des parties aériennes est attaquée. Les lésions sont rondes ou allongées portant irrégulièrement des points bruns et sont entourés par une marge rouge brunâtre. Si la tige principale est couronnée par ces lésions à la région de collet, la plante entière meurt.

-La pourriture grise: est une maladie foliaire, causée par *Botrytis cinerea*, dans certains pays tempérés et subtropicaux (Davidson et al. 2004). Elle est la deuxième maladie foliaire la plus importante après l'ascochytose. C'est la principale cause de l'instabilité des rendements et de la réduction de la sole de pois chiche

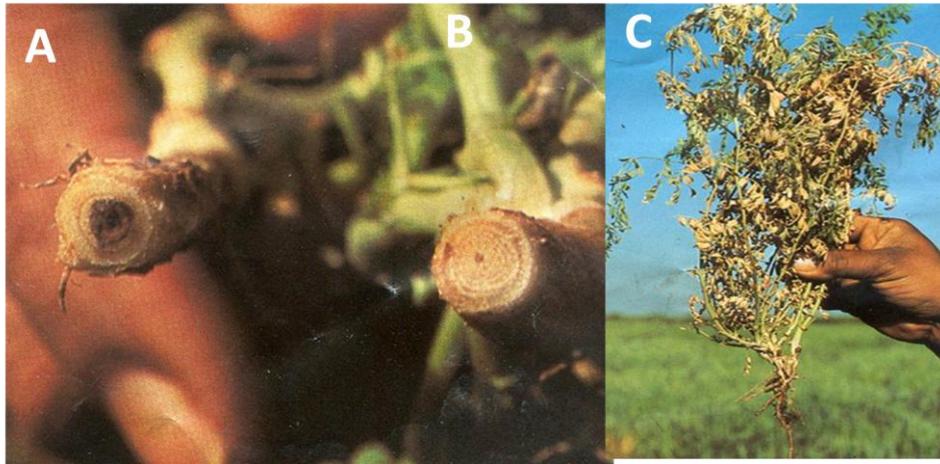


Figure 4: Symptômes de fusariose vasculaire sur coupe longitudinale de la tige (A) plante infectée, (B) plante saine et (C) sur plante entière (Cunninton et *al.* 2009°

(Rahman et al. 2000). Bien que le pois chiche soit sensible à la pourriture grise durant toutes les phases de croissance, les stades floraison et formation des gousses sont les plus vulnérables à l'infection. En cas d'infection précoce on peut observer les symptômes dès les premières feuilles. La partie aérienne jaunit à partir de la base, souvent accompagné par une forte réduction de la croissance et de la mort de la plante. Le nombre des gousses et de graines par gousse sont réduits (Rahman et al. 2000).

-La fusariose vasculaire (Figure 3): est aussi un des facteurs limitants majeurs de la productivité du pois chiche (Haware et al. 1996). La fusariose du pois chiche est surtout présente dans les sols lourds et les sols mal drainés des terres de basse altitude. Elle est causée par le champignon *Fusarium oxysporum* f. sp. Ciceris (FOC). Le flétrissement causé par le FOC peut être observé à des stades précoces et tardifs du développement de la plante. Le flétrissement précoce cause plus de perte que le flétrissement tardif. Les jeunes plantules infectées par le flétrissement vasculaire s'enroulent, s'aplatissent et s'allongent sur terre et gardent leur couleur verte sombre (Pande et al. 2007). Cependant les plantes adultes montrent des symptômes de flétrissement typique par conséquent la plante entière montre un abaissement soudain des feuilles (Shah et al. 2009 ; Raju et al. 2008), une couleur pâle par rapport aux plantes saines (Shah et al. 2009) et une décoloration du xylème de la tige (Raju et al. 2008), ensuite la plante meurt. Les plantes de pois chiche attaquées par la FOC ne montrent pas une pourriture externe et apparaissent saines, lorsqu'on coupe verticalement la partie inférieure de la région du collet, cette région montre une coloration marron des tissus internes (Shah et al. 2009 ; Dubey et Singh 2004). Les gousses des plantes de pois chiche malades apparaissent normales, mais les graines sont généralement plus petites, froissées (pliées) et décolorées (Pande et al. 2007). La FOC peut survivre dans le sol et sur les résidus de culture sous forme de chlamydospores jusqu'à six ans en absence d'hôte sensible, et se propager par le biais du sol et les semences infectées (Haware et al. 1978). La fusariose est répandue presque dans toutes les régions de culture du pois chiche, et provoque des pertes de rendement jusqu'à 100% (Landa et al. 2004).

- Les plantes parasites Orobanche: En Tunisie, le pois chiche est une plante hôte de 3 espèces d'orobanche, *Orobanche crenata* Forsk, *Orobanche foetida* Poir. et *Phelipanche aegyptiaca* Pers. Peu importante en cultures de printemps, les attaques

d'orobanche se sont accrues par l'exploitation des variétés d'hiver (Rubiales et al. 2003a). L'orobanche est ainsi considérée comme un important parasite agricole de la féverole et du pois chiche dans la région de Beja (Kharrat et al. 1992). De manière générale, cette espèce est commune dans d'autres pays d'Afrique du Nord et en Espagne, mais essentiellement comme parasite de fabacées sauvages (Rubiales et al. 2003a).

- Les insectes : Le pois chiche est attaqué par un grand nombre d'espèces d'insectes, à la fois au champ et en stockage (Clement et al. 2000) :

-Helicoverpa armigera : La pyrale des gousses des légumineuses est un important facteur limitant du rendement des légumineuses alimentaires. Sa nocuité a été principalement attribuée à sa forte fécondité, sa vaste polyphagie, sa forte capacité de dispersion, et une diapause facultative. Les larves de début de saison se nourrissent des feuilles. A la fin de la saison les larves se nourrissent brièvement des feuilles, puis s'enfoncent dans la nervure principale et migrent dans la tige de la plante. Parfois, les larves se nourrissent directement des grains en formation.

-Ravageurs suceurs de la sève : Ces ravageurs sont classés comme des organismes nuisibles, principalement, en raison du fait qu'ils agissent comme des vecteurs viraux. Les pucerons, particulièrement *Aphis craccivora*, sont des transmetteurs de grand nombre de maladies virales chez le pois chiche (Makkouk et al. 2003; Kumari et al. 2007). Le plus important est le groupe des luteovirus qui cause l'enroulement des feuilles et le rabougrissement des plantes, et qui est transmis d'une manière persistante par *A. craccivora* (Brunt et al. 1996). Une autre maladie est causée par le virus responsable du nanisme et de la chlorose du pois chiche, un mastervirus (Fauquet and Stanley 2003). Ce virus est transmis de manière persistante par la cicadelle *Orosius orientalis* (Matsumura) (Hemiptera: Cicadellidae) (Brunt et al. 1996).

-Les bruches : Les membres de la famille des *Bruchidae* sont connus depuis longtemps par leur pouvoir destructeur des graines des légumineuses cultivées. Ils se nourrissent également de graines et des fleurs de plantes appartenant à de nombreuses autres familles (Compositae, Malvaceae, Convolvulaceae, Anacardiaceae, Rosaceae, Apisaceae, Papavaraceae et Palmaceae : Delobel and Delobel 2005 ; Jermy and Szentesi 2003).

- Les nématodes : L'infection des racines par *Meloidogyne spp.* réduit la croissance et le rendement des plantes (Castillo et al. 2003). Le parasitisme par les nématodes à galles est caractérisé par la mise en place de sites d'alimentation permanentes composées de cellules multi nucléés géantes dans le cortex de la racine, l'endoderme, le péricycle, et le parenchyme vasculaire des plantes hôtes. Les sites d'alimentation des nématodes agissent comme des puits d'épuisement des photoassimilats des plantes, ce qui cause une diminution de la croissance et du développement des plantes malades. La déformation et le blocage des tissus vasculaires sur les sites d'alimentation des nématodes limite la translocation de l'eau et des nutriments dans la plante, ce qui influence négativement la croissance et le rendement des cultures. Les tissus entourant les sites d'alimentation des nématodes à galles gonflent généralement, donnant lieu à de grandes galles caractéristiques sur les racines des plantes infectées (Volvas et al. 2005). Cependant, l'infection des racines de pois chiche par *M. artiellia* ne donne lieu qu'à de très petites galles entourant les sites d'alimentation (Volvas et al. 2005).

b- Stress abiotiques

- Stress hydrique – sécheresse :
 - Le stress hydrique, dans le sol et/ ou dans l'atmosphère, est le plus important stress abiotique affectant la culture de pois chiche (**Figure 1**; Singh et al. 1994). Sous les conditions méditerranéennes, il est habituellement fréquent à la fin du cycle des cultures. Singh et al. (1997) ont ainsi montré une corrélation positive entre les précipitations saisonnières et le rendement en graines chez le pois chiche. Le manque d'eau printanière réduit la taille finale de la plante, la durée de la période de remplissage des graines (Davies et al. 1999) et accélère la maturité (Rajin Anwar et al. 2003). Selon les génotypes, le stress hydrique inhibe plus au moins fortement la croissance des tiges et des feuilles (Ben Mbarek et al. 2009). Le pois chiche est une espèce à croissance indéterminée. Tant que l'eau est disponible dans le sol et les températures ni trop basses ni trop élevées, les parties aériennes ramifiées continuent à se développer (Croser et al. 2003 ; Leport et al. 2006).
 - La sécheresse est un facteur limitant majeur de la productivité des légumineuses à graines dans le monde (**Figure 1**). Le pois chiche est parmi les cultures les plus sensibles à cette contrainte abiotique, car la plupart des zones de production sont

localisées dans des régions arides et semi arides. Par ailleurs, 90% de ces cultures sont cultivées dans des conditions pluviales (Kumar and Abbo 2001). Wery et al. (1994) ont décrit 2 types de sécheresse. La première, dite intermittente, est imprévue et engendrée par la rupture des précipitations. Elle dépend de la distribution saisonnière de la pluie. La seconde, dite terminale, survient à la fin du cycle de croissance des cultures suite à un épuisement des réserves du sol en eau. Les pertes de rendement du pois chiche sont attribuées essentiellement à la sécheresse terminale, qui coïncide avec la période de remplissage des gousses, d'où une importante réduction de rendement grainier (Serraj et al. 2004 ; Gaur et al. 2008). Cette dernière occasionne, seule, une réduction de 40 à 50% du rendement (Canci and Toker 2009). En absence de maladie, elle engendre des diminutions de 30 à 40% du nombre de gousses et de 42 à 53% du rendement en graines d'une culture en sec du pois chiche par rapport à une culture conduite en irrigué (Kashiwagi et al. 2006).

- Stress thermique : il se présente sous 2 formes :

-Le froid : La culture de pois chiche est sensible au froid et aux températures basses (<8°C) (Nayyar et al. 2005 ; Bakht et al. 2006). L'abscission florale est le dommage le plus commun causé par le froid (<10°C) (Nayyar et al. 2005 ; Berger 2007). Des conditions de température faible induisent une diminution significative du poids total des plantes, de la quantité et de la qualité des graines de pois chiche (Kaur et al. 2008; Nayyar et al. 2007). Sous l'action des basses températures (<17°C), les dates de floraison et de maturité du pois chiche sont retardées (Berger et al. 2004). Les basses températures affectent également les aspects structurels et fonctionnels des composants mâle et femelle des fleurs du pois chiche (Croser et al. 2003). Les températures inférieures à 20°C induisent de faibles taux de germination du pollen et un allongement ralenti du tube pollinique (Nayyar et al. 2005). Berger et al. (2004) ont mentionné que lorsque les températures chutent entre 14-17°C pendant le stade floraison, la formation des gousses est ralentie et le pois chiche continue son cycle avec des épisodes cycliques de floraison et d'avortement jusqu'à l'augmentation des températures. Ce retard expose le pois chiche à la sécheresse terminale durant le stade critique de remplissage des graines (Berger 2007).

-Les hautes températures: sont aussi néfastes pour le pois chiche et réduisent le rendement en graines, par la déhiscence des anthères, la réduction de la viabilité du pollen, de sa germination et la croissance du tube pollinique, et de la faible production de gousses (Sakata and Higashitani 2008; Kumar et al. 2013). D'après les

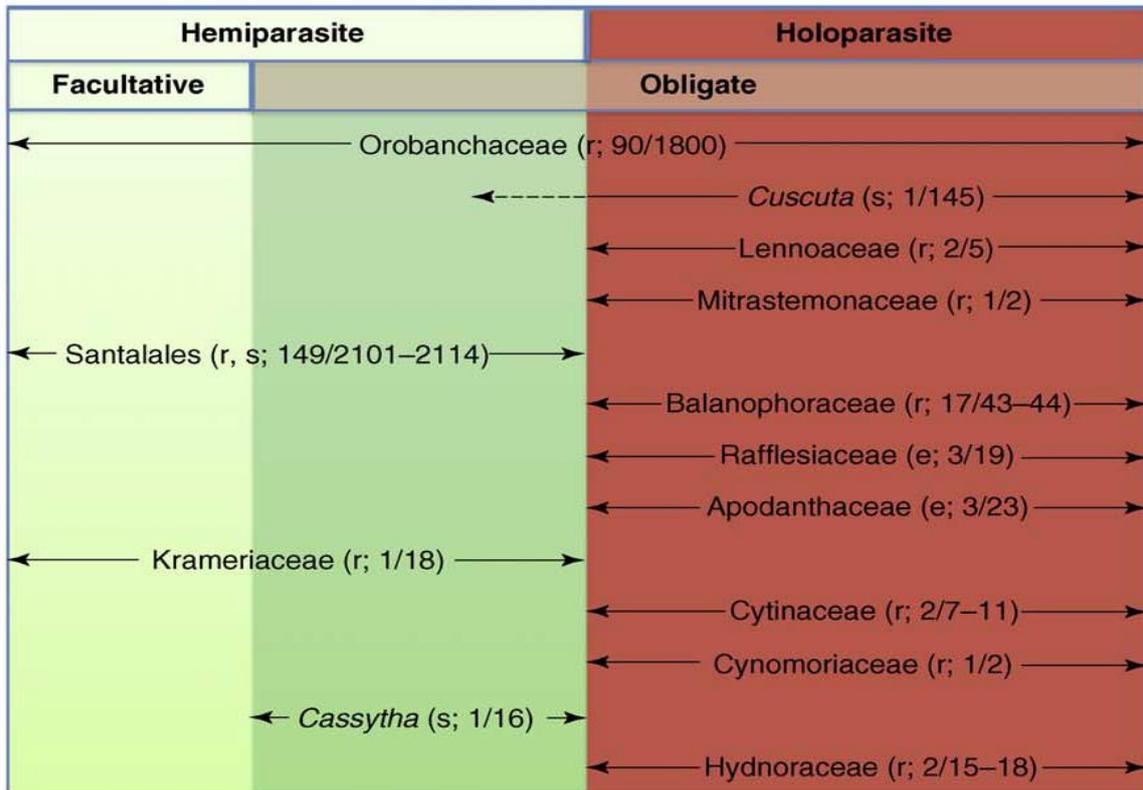


Figure 5: La diversité du parasitisme chez les angiospermes (Irving and Cameron 2009)

Mode de fixation : r, épiphize ; s, épiphyte ; e, principalement endophytes internes x/y : nombre de genres et d'espèces estimés

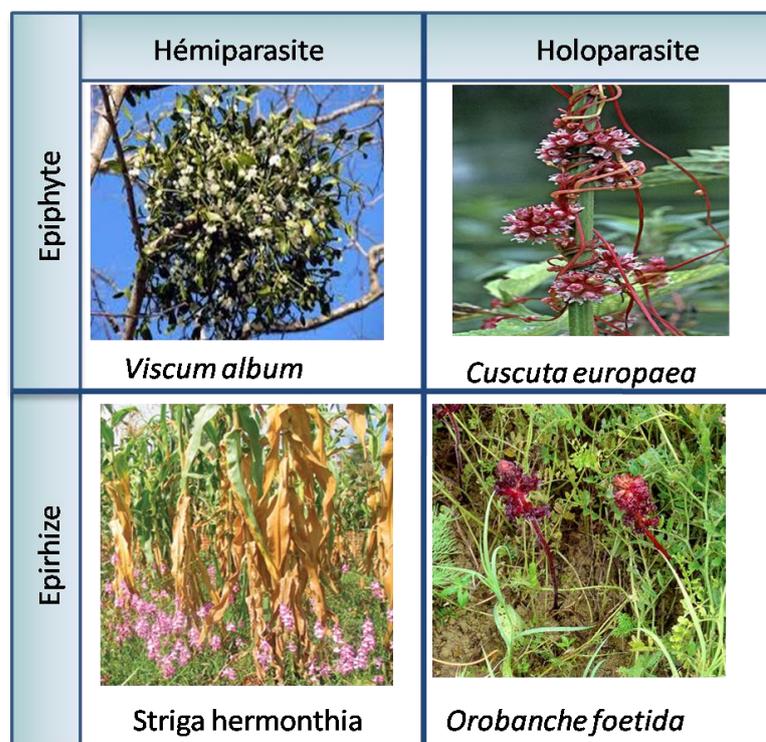


Figure 6 : Illustration classique des différents types de plantes parasites

observations d'Ellis et *al.* (1994), des températures journalières maximales supérieures à 38°C retardent la floraison. Un stress thermique, occasionné pendant la phase de floraison n'affecte pas le nombre de graines par gousse. Cependant, s'il s'exprime pendant la phase de développement des graines, il réduit le nombre de graines par gousse de 26% et le rendement en graines de 50% environ (Wang et *al.* 2006). Ainsi, est-il nécessaire de limiter, au minimum, la durée d'exposition de la culture au stress thermique durant la phase de remplissage des graines et de maturité (Wang et *al.* 2006).

2-Les plantes adventices parasites

2-1-Généralités

Le parasitisme est une stratégie de vie très réussie dans les divers règnes de vie (Poulin and Morand 2000). Il se définit comme l'état d'un organisme vivant aux dépens d'un organisme d'une autre espèce, que l'on appelle l'hôte. Chez les végétaux, il existe une catégorie de plantes, souvent méconnues, ayant un mode de vie parasitaire. Elles ont donc, dans la plupart des cas, besoin d'une plante hôte pour vivre. Les plantes parasites se caractérisent par leur capacité de se nourrir directement d'autres plantes, envahissant soit les racines soit les tiges de leurs hôtes grâce à des structures appelées haustoria (Kuijt 1969). Elles représentent un groupe taxonomiquement et bio géographiquement très divers.

Les phanérogames parasites représentent moins de 2% des angiospermes, chez qui le parasitisme a évolué (de 12 ou 13 fois (**Figure 5**)) (Irving and Cameron 2009). Leur distribution s'étend de l'Arctique jusqu'aux régions tropicales (Watling et *al.* 2001).

Généralement, les plantes parasites sont subdivisées en fonction de leur site de fixation sur l'hôte (**Figure 6**). En effet, on distingue les parasites de tige ou épiphytes (*Viscaceae*, *Convolvulaceae*, *Lauraceae*, *Loranthaceae*...), et les parasites de racine ou épirhizes (*Orobanchaceae*, *Hydnoraceae*, *Balanophoraceae*, *Rafflesiaceae*...). Un second type de classification des plantes parasites s'effectue en fonction de leur niveau de dépendance trophique vis-à-vis de leur hôte. Certaines plantes parasites peuvent vivre en absence d'hôte, elles sont dites facultatives, c'est notamment le cas des genres *Triphysaria* et *Rhinantus* (Seel and Jeschke 1999). Celles dont la présence d'une hôte est nécessaire sont des parasites obligatoires. Au sein de cette catégorie, une nouvelle distinction peut être faite entre les hémiparasites (exemple du genre *Striga*) et les holoparasites (exemple des genres *Orobanche* et *Phelipanche*) (Irving and Cameron 2009). Cette distinction permet de regrouper les plantes

parasites selon leur dépendance trophique vis-à-vis de l'hôte: les hémiparasites sont encore capables de réaliser la photosynthèse et s'alimentent essentiellement à partir de la sève xylémienne de l'hôte, tandis que les holoparasites ont perdu leur capacité photosynthétique et s'alimentent essentiellement de la sève phloémienne de l'hôte. Les plantes parasites obligatoires sont donc de type "xylem feeders" ou "phloem feeders" en fonction du degré de leur hétérotrophie (Westwood 2013).

Le parasitisme végétal peut avoir des conséquences économiques désastreuses lorsque ce sont des plantes cultivées d'intérêt agronomique qui en sont la cible (Parker 2009). Les Orobanchacées, en particulier *Striga* et *Orobanche*, sont parmi les plantes parasites les plus nuisibles à l'échelle agronomique mondiale.

Les strigas (*S. hermonthica*, *S. asiatica* et *S. gesnerioides*) se rencontrent principalement en Afrique sub-saharienne, en Inde et dans le sud-est de l'Asie. A l'heure actuelle, plus de 50 millions d'hectares de terres arables sont infestés, avec des pertes annuelles de rendement estimées à plus de 10 milliards de dollars US dans les cultures de céréales et légumineuses (Scholes and Press 2008).

Les orobanches sont aussi de véritables fléaux agronomiques dans les pays méditerranéens et dans l'Ouest de l'Asie (Rubiales et al. 2006; Joel et al. 2007; Parker 2009). Sept espèces d'orobanche sont ainsi des adventices parasites dévastatrices de diverses cultures : légumineuses alimentaires (fève, pois, pois chiche..), solanacées (tomate, tabac, pomme de terre), Apiacées (carotte), Asteracées (tournesol), Brassicacées (colza, choux) (Joel et al. 2007; Parker 2009 ; Brault et al. 2007; Gibot-Leclerc et al. 2003, 2012, 2013). L'impact du parasitisme sur les rendements est extrêmement variable et dépend du degré de résistance ou de tolérance des variétés cultivées, de l'agressivité de la population d'orobanche en présence de son hôte et des conditions climatiques.

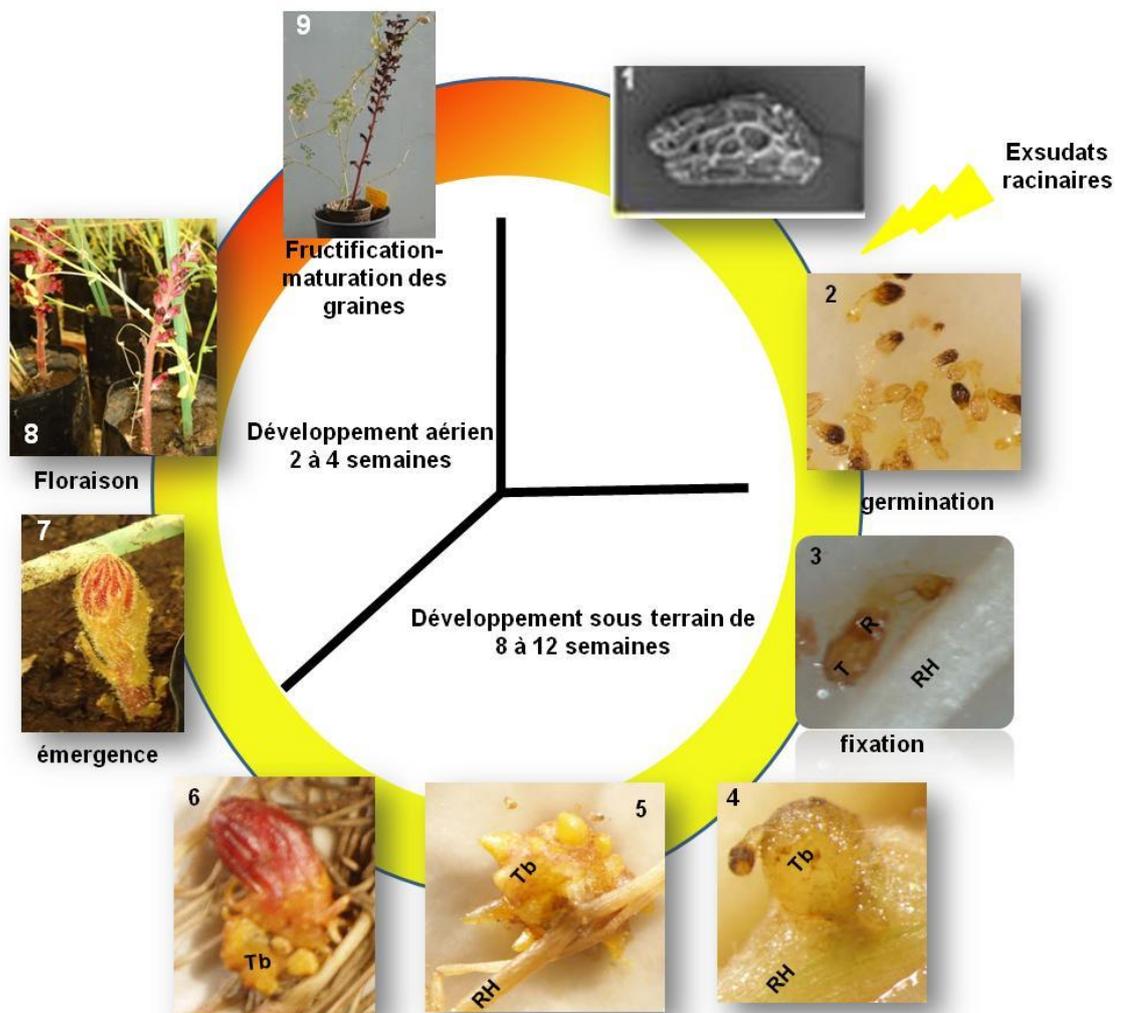


Figure 7 : Cycle de développement d'*Orobanche foetida*

1-graine d'orobanche. **2**-germination de la graine après stimulation par les exsudats racinaires de l'hôte. **3**-fixation du procaulôme de la graine d'orobanche sur une racine hôte. **4**-accumulation de réserves, développement d'un tubercule. **5**-formation de racines adventives non fonctionnelles. **6**-formation d'une tige écailleuse. **7**-émergence de l'orobanche. **8**-floraison. **9**-fructification, maturation et dissémination des graines d'orobanche.

RH: racine de la plante hôte; T: tégument; R: radicule ou procaulôme; Tb: tubercule. (Photos de Brahmi I. 2013)

2-2- Les orobanches

Les orobanches (genres *Orobanche* et *Phelipanche*) sont toutes des plantes holoparasites, c'est-à-dire non chlorophylliennes et ainsi totalement dépendantes de leur hôte pour se développer. Elles appartiennent à la famille des Orobanchaceae issue de quelques Scrophulariacées hémiparasites (Olmstead et al. 2001) et composée d'environ 130 espèces divisées en quatre sections : *Trionychon* Wallr., *Myzorrhiza* (Philippi), *Gymnocaulis* Nutt. et *Osproleon* Wallr. (= *Orobanche sensu stricto*) (Schneeweiss et al. 2003). Plusieurs autres auteurs ont classé différemment les orobanches en se basant sur des critères morphologiques (Beck 1930 ; Holub 1990 ; Plaza et al. 2004). Le genre *Orobanche* est le plus important, tant par le nombre que par l'impact économique des espèces qui le composent (Pieterse 1979). La plupart des orobanches vivent dans les régions chaudes et tempérées du Nord de l'hémisphère, en particulier le bassin Méditerranéen (Parker 2009). Certaines espèces sévissent aussi au Moyen Orient et en Europe méridionale et orientale (Joel et al. 2007 ; Paker 2009 ; Rubiales and Heide-Jørgensen 2011). Cette localisation géographique spécifique s'explique par des pratiques culturales bénéfiques au parasitisme (rotations courtes, monocultures) et des caractéristiques pédoclimatiques correspondant à la physiologie des orobanches.

A la différence des autres espèces d'orobanches, *O. foetida* est considérée comme un fléau agronomique émergeant du fait d'un passage récent de son parasitisme de plantes herbacées aux légumineuses cultivées (Rubiales et al. 2005). *O. foetida* est présente spécifiquement dans les pays de la Méditerranée occidentale (Maroc, Algérie, Tunisie, Portugal et Espagne ; Pujadas-Salva et al. 2003). Elle parasite plusieurs légumineuses herbacées de genre *Anthyllis*, *Ebenus*, *Lotus*, *Medicago*, *Ononis*, *Scorpiurus* et *Trifolium*. Le parasitisme des légumineuses cultivées par *O. foetida* a été observé pour la première fois dans le Nord Ouest de la Tunisie (Région de Béja) (Kharrat et al. 1992) et au Maroc, plus récemment (Rubiales et al. 2005). Bien que les infestations des légumineuses par *O. crenata* soient beaucoup plus fréquentes, les infestations croissantes par *O. foetida* sont à surveiller très sérieusement dans le Nord de l'Afrique. En Tunisie, cette espèce entraîne effectivement des pertes de rendement de 66 à 90% sur les légumineuses (Kharrat et al. 1992 ; Abbes et al. 2007).

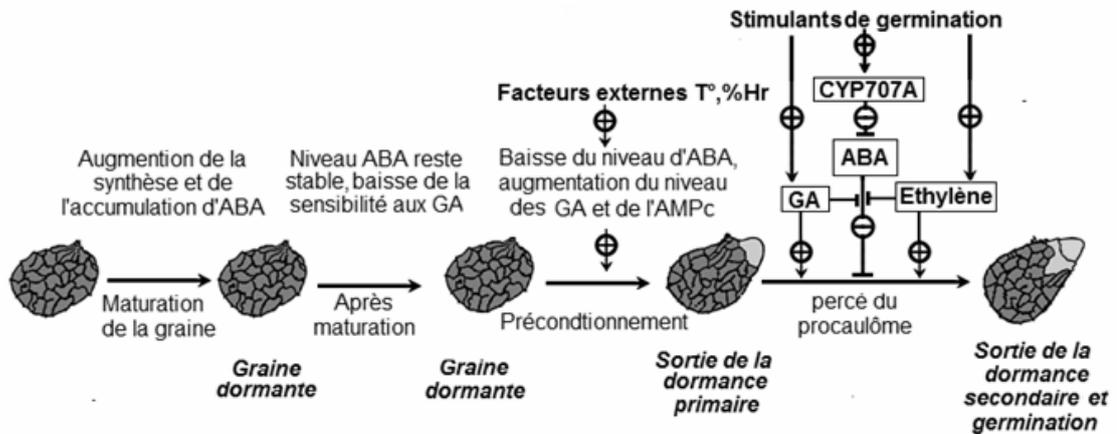


Figure 8: Interactions hormonales au cours de la levée de la dormance et la germination des graines et de leurs effets sur la rupture des téguments et de l'endosperme (Kucera et al. 2005)

2-2-1- Développement des orobanches

Le cycle de développement des orobanches (**Figure 8**) est hautement spécifique et repose sur de nombreuses étapes clés en interaction avec la plante hôte (Bouwmeester *et al.* 2003 ; Plakhine *et al.* 2012). La perception d'un stimulus de germination exsudé par une plante voisine (pas obligatoirement hôte) déclenche la germination des graines d'orobanche (Yoneyama *et al.* 2013). Celle-ci conduit au développement d'une radicule dont la fixation à une racine d'une plante hôte initie la phase parasitaire de l'Orobanche. L'existence d'un large spectre d'hôtes (hormis pour *O. cumana*, spécifique du tournesol) et d'un très fort taux de reproduction, avec plusieurs dizaines de milliers de graines par pied d'Orobanche, minimisent les conséquences sur la reproduction du parasite d'une germination suicide (en absence d'une plante hôte) ou d'échec de fixation de la radicule.

Du fait de leur petite taille, les graines d'orobanche sont facilement dispersées par le vent, l'eau, les machines agricoles, les animaux (exo et endozoochorie) et leurs litières (Henning and-Jørgensen 2013).

a- Conditionnement

Une fois enfouies dans le sol, les graines d'Orobanche entrent en dormance. Cette phase peut être de très longue durée (une dizaine d'années) en absence d'hôte (en cas d'abandon de la culture sensible), sans que les graines perdent leur pouvoir germinatif. L'exposition des graines d'orobanche à un environnement humide 1 à 2 semaines sous des températures comprises entre 18 et 23°C, définit une période indispensable à la levée de dormance par les stimulants de germination, dite période de conditionnement (Song *et al.* 2005). L'imbibition des graines s'accompagne d'un pic de respiration et d'une reprise de la synthèse protéique (Bar-Nun and Mayer 1993). Plusieurs travaux ont reporté la synthèse de gibbérellines (GA) lors du conditionnement et de la germination des graines d'Orobanche (**Figure 8**) (Kucera *et al.* 2005). Une forte baisse du taux d'acide abscissique (ABA) des graines est également observée pendant le conditionnement, en raison d'une « fuite » qui accompagne l'imbibition des graines (Plakhine *et al.* 2009 ; Lechat *et al.* 2012). Cette fuite d'ABA n'est pas suffisante pour lever la dormance (Lechat *et al.* 2012).

Une graine conditionnée est ainsi apte à percevoir les stimulants de germination secrétés dans la rhizosphère par une plante hôte, et d'y répondre en germant. Si la graine ne perçoit pas de tels signaux, elle entre dans une phase de dormance

secondaire (**Figure 8**) (Song et al. 2005). La dormance secondaire intervient lorsque les conditions nécessaires à la perte de la dormance primaire ou à l'induction de la germination ne sont pas remplies. La graine ne retrouve son pouvoir germinatif qu'après une phase de déshydratation prolongée suivie d'une nouvelle phase de conditionnement (Kebreab and Murdoch 1999).

b- Germination et stimulants de germination

Lorsque les conditions environnementales sont favorables, les graines d'orobanche ne germent qu'à proximité des racines d'une plante productrice de stimulants de germination (Yoneyama et al. 2008). La majorité des stimulants de germination naturels sont de la famille des strigolactones (SLs) (Xie et al. 2010), définie comme une nouvelle classe d'hormones végétales dérivant de la voie de biosynthèse des caroténoïdes (Matusova et al. 2005).

Les SLs agissent comme messagers secondaires des auxines (AIA) et des cytokinines (CKs) et se révèlent ainsi impliquées, chez les plantes, dans des processus majeurs tels que le contrôle de la ramification aérienne et racinaire, le contrôle des interactions avec les plantes parasites et les microorganismes symbiotiques de la rhizosphère (champignons mycorhiziens à arbuscules et bactéries) (Akiyama et al. 2005), ainsi que dans la réponse aux contraintes nutritionnelles (Brewera et al. 2013 ; Dun et al. 2012 ; Marzec et al. 2013). Des analogues des SLs ont été synthétisés, tels que le Nijmegen et le GR24. Le GR24 est universellement utilisé dans les travaux de recherches *in vitro* sur la germination des plantes parasites. Il est ainsi souvent utilisé en tant que stimulant de référence. L'effet stimulant du GR24 est généralement admis pour toutes les espèces d'orobanche (Johnson et al. 1976), exceptée *O. foetida* qui ne montre aucune réponse à ce stimulant (Fernandez-Aparicio et al. 2009). Plus d'une dizaine de SLs naturelles ont été identifiées à ce jour, ainsi que d'autres stimulants différents des SLs (dihydrocostuslactone pour *O. cumana* ; composés phénoliques pour *O. foetida* (Evidente et al. 2010). Les graines d'*O. foetida* seraient tout de même sensibles à certaines SLs (Fernández-Aparicio et al. 2014). Les mécanismes de perception des stimulants de germination ont longtemps été considérés comme une boîte noire.

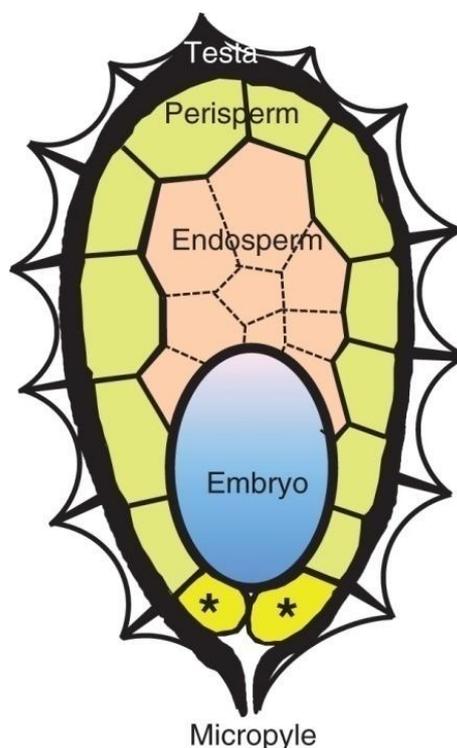


Figure 9: Représentation schématique de la structure de graine d'orobanche

* : Les récepteurs des stimulants de germination sont localisés au niveau des cellules du péricarpe proche du micropyle (Plakhine et *al.* 2012)

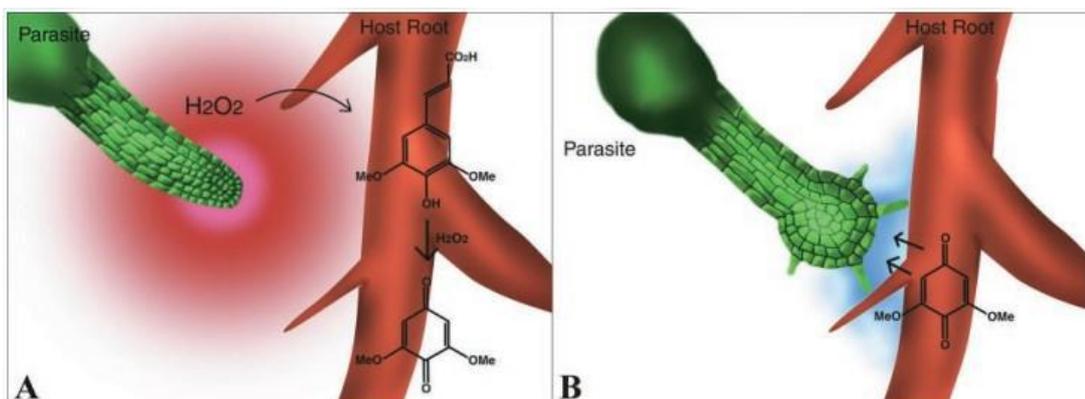


Figure 10: Dialogue chimique entre le parasite et les racines de la Plante hôte et initiation de la formation de l'haustorium chez *Triphysaria* et *Striga* (Keyes et *al.* 2001)

Une étude récente sur le contrôle de la germination dans les graines de *P. aegyptiaca* suggère que les récepteurs de stimulants de germination sont situés dans les cellules de périsperme vivant sous le micropyle (**Figure 9**) (Plakhine *et al.* 2012).

Lechat *et al.* (2012) ont mis en évidence le rôle primordial du gène CYP707A, codant pour l'ABA 8'-hydroxylase, dans la germination des graines de *P. ramosa* en réponse au GR24. En effet, suite à une première baisse du niveau d'ABA durant l'étape de conditionnement (fuite d'ABA), la perception du GR24 induit très rapidement une forte surexpression du gène CYP707A1 (18 h après stimulation), provoquant ainsi une seconde chute du niveau d'ABA dans les graines. Les étapes de perception et transduction du signal en amont du gène CYP707A restent encore méconnues.

Une fois stimulée, la graine d'orobanche émet un tube germinatif (appelé procaulôme) au niveau du pôle micropylaire (**Figure 10**). Il croît et s'allonge en direction des racines de la plante hôte, guidé probablement par un chimiotropisme positif vis-à-vis des stimulants de germination (Bouwmeester *et al.* 2003).

c- Fixation sur l'hôte

Le contact mécanique annonce le début de la phase de fixation. Celle-ci est précédée par une étape de préparation de la radicule du parasite à l'attachement et la pénétration dans la racine hôte, qui n'est pas encore bien étudiée chez l'orobanche. Cette étape est par contre bien décrite chez deux hémiparasites de racines, *Striga* et *Triphysaria* : lors du rapprochement de la radicule vers la racine de la plante hôte, l'apex de la radicule s'épaissit, gonfle et différencie des poils haustoriaux (Yoder 2001). Des signaux chimiques dérivés de la racine hôte (Hautorium-Inducing Factors = HIFs) induisent la différenciation de l'apex de la radicule en haustorium (haustoriogénèse). Mor *et al.* (2008) ont détecté une forte production de peroxyde d'hydrogène (une forme réactive d'oxygène, ROS) à l'apex de la radicule (**Figure 10**). Ces ROS induisent la dégradation de la paroi de la racine hôte, libérant des composés quinoniques éliciteurs de l'haustoriogénèse (HIFs). L'ensemble de ce processus établit un gradient de concentration d'HIFs entre les cellules rhizodermiques de l'hôte et du parasite. Si l'accumulation de ces molécules signal est insuffisante, le méristème radiculaire est capable de revenir à un état végétatif nécessaire pour la reprise de l'allongement de la radicule (Keyes *et al.* 2001 ;

Matvienko *et al.* 2001 ; Palmer *et al.* 2004 ; Joel *et al.* 2007).

Concernant l'haustoriogénèse de l'Orobanche, des poils haustoriaux (papilles) sont également observés après contact de la radicule avec une racine hôte. Par contre, la nature des HIFs impliqués demeure inconnue. Les papilles haustoriales sécrètent une substance glucidique mucilagineuse qui favorise l'adhésion du parasite à la racine de l'hôte (Joel and Losner-Goshen 1994). La zone du contact intime, formée de cellules intrusives (appressorium), pénètre dans le cortex racinaire de la plante hôte. La pénétration est facilitée par la sécrétion d'enzymes à activité pectine-méthylestérase et polygalacturonase (Ben-Hod *et al.* 1991 ; Losner-Goshen *et al.* 1998 ; Véronési *et al.* 2007). L'endoderme constitue la dernière barrière physique que l'appressorium doit traverser avant d'atteindre le cylindre central contenant les faisceaux cribro-vasculaires. L'excrétion d'enzymes à activité cutinase facilite cette étape (Joel *et al.* 1998).

Pendant la phase de connexion vasculaire, un hémiparasite "xylem-feeder" met en place des connexions directes avec le xylème de l'hôte à l'aide d'un organe spécifique nommé oscula (Rogers and Nelson 1962 ; Dörr 1996, 1997). L'orobanche est un holoparasite du type "phloem-feeder" et développe majoritairement des connexions phloémiennes. Des plasmodesmes phloémiens interspécifiques ont été observés à l'interface hôte-parasite, définissant un transfert direct de nutriments des tissus phloémiens de la plante hôte vers ceux de l'orobanche (Dörr 1996).

d- Développement de l'orobanche en post-fixation

Une fois les connexions vasculaires établies entre l'orobanche et son hôte, l'haustorium se développe et s'étend en masse dans la racine et prend la forme d'une « verrue » qui se transforme rapidement en un tubercule (**Figure 7**). Le tubercule se développe hors de la racine de la plante hôte, et émet des racines adventives pourvues d'une coiffe rudimentaire mais sans zones pilifères. Chacune de ces racines est un organe de croissance connecté à l'hôte par voie phloémienne. Le tubercule constitue un organe de réserve d'amidon, d'hexoses, de polyols (mannitol, inositol...) et d'acides aminés (Abbes *et al.* 2009 ; Draie *et al.* 2011). Après quelques semaines, un bourgeon axillaire se développe sur le tubercule, produisant une tige écaillée achlorophyllienne. Après émergence hors du sol, la tige se développe en une hampe florale portant plusieurs dizaines de fleurs.

Chaque fleur, après fécondation, donne une capsule contenant quelques dizaines des milliers de graines (Joel et *al.* 2007).

2-2-2- Moyens de lutte

Les pratiques humaines sont responsables, dans une large mesure, de l'infestation des champs par les adventices parasites. A cause de leur taille microscopique, les graines d'orobanche sont transportées vers d'autres champs par le sol et l'eau contaminé (par ruissellement). Elles adhèrent à la fourrure des animaux de pâturage, des outils agricoles comme les charrues ou des bottes et des vêtements. Le transport des graines est aussi facilité par le commerce national et international. L'échange de semences contaminées d'une ferme à l'autre facilite le transport et l'extension de la contamination des sols par l'orobanche.

Une série de mesures de lutte est suivie pour limiter ou réduire l'étendue de la présence du parasite dans les champs infestés. Ces dispositions sont décrites plus en détail ci-dessous :

a-Mesures préventives

Le danger de l'orobanche réside dans son aptitude à former un stock de graines renouvelable dans le sol. Le plus important principe de contrôle de l'orobanche se focalise sur la réduction du stock semencier dans le sol, en empêchant la formation de graines et la propagation d'infestations vers les zones non contaminées. Un programme de gestion ou d'éradication doit viser à réduire cette banque de semences tout en minimisant la production de nouvelles semences et leur dispersion dans de nouveaux sites. La mise en quarantaine est donc un élément essentiel dans les programmes de lutte ou d'éradication d'orobanche (Habimana et *al.* 2013).

Le matériel agricole et les machines doivent être nettoyés avant leur utilisation dans des champs non infestés. Une attention particulière doit être appliquée à la désinfestation et le nettoyage des machines, et aussi à éviter le passage des camions des champs infestés aux non infestés. Le confinement est une nécessité pour éviter la propagation d'infestation et des programmes d'éradication doit être envisagé. Les pousses d'orobanche doivent être retirées avant l'ouverture de la fleur ; les hampes recueillies doivent être brûlées ou éliminées correctement. Entre autres, les animaux au pâturage doivent être interdits d'entrer dans les champs non infestés après avoir brouté les zones infestées (Habimana et *al.* 2013). De plus, les agriculteurs doivent

utiliser des semences certifiées pour s'assurer que les semences ne sont pas contaminées (FAO 2008).

b-Lutte physique

La solarisation du sol se fait par le chauffage du sol sous un paillis noir, ou plus généralement film clair (polyéthylène), par le soleil. Le sol doit être humide au moment du traitement. Des températures de 48 à 57°C sont nécessaires pour tuer les graines d'orobanche. Cette technique est utilisée avec succès dans de nombreux pays à travers le monde. La solarisation des sols est en effet la méthode la plus efficace dans le contrôle de l'orobanche dans les cultures aux champs ouverts (Haidar and Sidahmad 2000). L'épandage de fumier augmente l'effet destructeur de la solarisation (Haidar and Sidahmed 2000).

Bien qu'efficace, la solarisation est difficile à appliquer en dehors des périmètres irrigués et la rareté des machines appropriées et des jours ensoleillés peuvent plus ou moins limiter l'utilisation de cette méthode.

c-Lutte agronomique

- Date de semis : La germination et le développement souterrain des orobanches sont extrêmement réduits à basse température (<8°C). Ainsi, retarder la date de la plantation affecte l'orobanche plus que son hôte. Un semis tardif est ainsi préconisé pour réduire les attaques d'orobanche. Les essais ont montré qu'un semis tardif de fève du mois d'Octobre à Novembre-Décembre, voire Janvier, réduit le nombre et la biomasse sèche des orobanches (Grenz et al. 2005a ; Habimana et al. 2013).
- Gestion des sols : La gestion du sol pourrait affecter fortement le stock semencier des graines dans le sol. Il a été démontré qu'un labour à 45-50 cm de profondeur réduisait de 80-90% les attaques par *O. ramosa* dans les champs de tabac, en raison de l'enfouissement des graines d'orobanche à des profondeurs où la germination est peu probable (Habimana et al. 2013).
- Arrachage : Le désherbage manuel, après émergence du parasite, est la méthode de contrôle la plus évidente et la plus courante dans les pays en voie

de développement. Cette technique est assez coûteuse et n'est conseillée qu'en cas d'une infestation faible ou comme méthode complémentaire aux autres stratégies de contrôle (Parker and Riches 1993 ; Rodenburg *et al.* 2006). D'après Kharrat et Halila (1996), cette technique ne permet pas d'augmenter significativement le rendement de la culture de fève dans une parcelle fortement infestée par *O. foetida*. En effet, le parasite cause d'importants dégâts sur le rendement de la plante durant sa phase de développement souterrain.

- Cultures associées: L'association de cultures est une pratique extrêmement intéressante qui renforce la production agricole et maintient la fertilité des sols. Les cultures associées (intercropping) sont utilisées dans plusieurs régions en Afrique pour contrôler l'orobanche (Oswald *et al.* 2002). Récemment, Fernandez-Aparicio *et al.* (2010, 2013) ont démontré que l'association de la féverole ou du pois, hôtes d'*O. crenata*, avec d'autres légumineuses (fenugrec ou trèfle d'Alexandrie) ou avec une céréale (avoine) réduit les infestations par l'orobanche. Cet impact de l'association repose sur l'activité allélopathique négative de l'espèce associée. Le trigoxazonane, présent dans les exsudats racinaires du fenugrec, inhibe la germination des graines d'*O. crenata* (Evidente *et al.* 2007). Fernández-Aparicio *et al.* (2007) ont suggéré que l'allélopathie est la composante majeure dans la réduction de l'infection par *O. crenata* des cultures de féverole et de pois en association avec des céréales. La constatation que la germination de graines d'orobanche exposées au stimulant synthétique, GR24, est inhibée en présence de racines de céréales (avoine, orge ou triticale) suggère que les racines des céréales peuvent exsuder des substances qui inhibent la germination des graines d'*O. crenata*. En Allemagne, le constat que des zones très enherbées de parcelles de tabac fortement infesté par *P. ramosa* soient indemnes d'orobanches adultes a conduit à la recherche d'effets allélopathiques. En effet, ces adventices exsudent de l'acide benzoïque, un inhibiteur de la germination de l'orobanche (Fernandez-Aparicio *et al.* 2013). Au même titre, dans certaines régions tropicales, l'association de céréales avec la Fabacée pérenne *Desmodium ssp* est communément utilisée pour la production de fourrages (Muir *et al.* 2011). Cette association avec *Desmodium* réduit considérablement les infestations de la céréale hôte (maïs, sorgho ou millet)

par l'adventice parasite *Striga hermonthica*, et permet un accroissement des rendements d'un facteur de 3 à 4 dans les zones infestées (Pickett et al. 2010). La protection des céréales vis-à-vis de *Striga hermonthica* par une association avec *Desmodium ssp* repose sur des activités allélopathiques exsudées des racines de *Desmodium* qui induisent la germination suicide des graines du striga. En effet, les racines de *Desmodium* produisent un panel de molécules qui stimulent la germination des graines du striga et inhibent la croissance de sa radicule, qui ne peut ainsi se fixer aux racines de la céréale hôte (Khan et al. 2002). Quatre isoflavones ont été isolées des racines de la Fabacée (uncinanone A, B & C, et génistéine) (Tsanuo et al. 2003 ; Guchu et al. 2007). L'uncinanone B induit la germination du striga alors que l'uncinanone C inhibe la croissance de sa radicule. Ces composés (C-glycosylflavones) sont communs chez les Fabacées et les céréales. La caractérisation des gènes et des protéines contrôlant ce métabolisme est en cours, avec l'enjeu de transférer ces mécanismes de protection dans d'autres plantes d'intérêt agronomique (Hooper et al. 2009).

- Rotation des cultures: La rotation avec des cultures fausses hôtes est habituellement suggérée pour réduire les stocks de graines d'orobanche dans les sols. Une plante faux hôte produit des stimulants de germination mais n'est pas parasitée par l'orobanche ; elle induit ainsi la germination suicide des graines d'orobanche. Ainsi, d'après Gawahir (2006), une succession de culture oignon-oignon et oignon-tomate permet une réduction de 37% de l'attaque de la culture de tomate par l'orobanche (Soudan) et un accroissement significatif du rendement (~40%). En Tunisie, le haricot, le pois, le lin et le fenugrec entrent dans la rotation dans le cadre de la lutte contre *O. foetida*. Fernández-Aparicio et al. (2011) ont démontré que le pois stimule la germination des graines *O. foetida* et est résistant à cette espèce d'orobanche.
- Fertilisation : L'orobanche a tendance à être associée à des sols peu fertiles. Des niveaux élevés d'engrais azotés ou de fumier de poulet a montré un effet suppressif sur la germination et la croissance d'*O. crenata* (Hassan et al. 2012). Ces effets doivent être probablement associés à des taux d'ammonium élevés dans ces sols enrichis. Pour le colza, les travaux de Gaudin et al. (2014) montrent à l'inverse que l'enrichissement du milieu en nitrates n'a pas

d'effet sur la germination des graines de *P. ramosa* et accentue la sensibilité du colza à cette orobanche.

d-Lutte biologique

Comme toutes les autres plantes, les orobanches ont des ennemis naturels pouvant affecter leur croissance et ainsi être potentiellement utilisés comme agents de lutte pour les contrôler. Contrairement aux composés chimiques, les agents de lutte biologique ont l'avantage d'être spécifique à la plante parasite, et ne contribuent pas, directement, à la pollution de l'environnement. Cette technique utilise des organismes vivants (insectes, champignons, virus, bactéries, etc) pour réduire et limiter l'infestation par l'orobanche.

La mouche *Phytomyza orobanchia* (Diptera: Agromyzidae) s'attaque à une seule hôte, l'Orobanche. Cet insecte perturbe la production des graines à travers le développement de ses larves à l'intérieur des capsules. Ces larves réduisent ainsi la capacité de reproduction et de propagation de l'orobanche (Klein and Kroschel 2002). L'efficacité de *Phytomyza orobanchia* dans des conditions naturelles est cependant limitée par les basses températures et les ennemis naturels.

Six espèces de *Fusarium* (*F. arthrosporioide* ; *F. nygamai*, *F. oxysporum* ; *F. oxysporum* f.sp. orthoceras ; *F. semitectum* var. majus ; *F. solani*) sont associées aux maladies d'orobanche en culture en pots (Shabana et al. 2003). Le contrôle de l'orobanche par *Fusarium* demeure cependant trop faible en plein champ. Par contre, la stratégie de combinaison de deux ou plusieurs agents pathogènes s'est révélée très efficace pour la gestion de l'espèce *O. cumana* dans les parcelles de tournesol (Boari and Vurro 2004 ; Müller-Stöver et al. 2005), avec une inhibition totale de l'émergence de l'adventice parasite.

De même, des souches de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Atrophaeus Bacillus*, *Bacillus subtilis* réduisent la croissance des racicules d'*O. aegyptiaca* et *O. cernua*, (Barghouthi and Salman 2010). L'inoculation du pois avec des souches symbiotiques de *Rhizobium leguminosarum* réduit la germination des graines d'*O. crenata* (Mabrouk et al. 2007; Fernández-Aparicio et al. 2009).

e-Lutte chimique

La lutte chimique contre l'orobanche a été largement explorée depuis les années 1970. Néanmoins, cette forme de contrôle est influencée par un certain nombre de

facteurs dont : (i) le traitement est appliqué en préventif, ne connaissant pas, dans la plupart des cas, le niveau d'infestation, (ii) la systémie de l'herbicide, l'orobanche étant connectée directement au tissu phloémien des plantes traitées ; (iii) la sélectivité de l'herbicide (iiii) le nombre d'applications, l'orobanche pouvant tout au long de la saison (Perez-de-Luque et *al.* 2010).

Le contrôle chimique est très rarement satisfaisant. De bons résultats sont obtenus avec le glyphosate pour contrôler l'orobanche dans les champs de fève, et avec les imidazolinones et les sulfonyles pour réduire les infestations de *P. aegyptiaca* dans les parcelles de tomate irriguées (Colquhoun et *al.* 2006 ; Eizenberg et *al.* 2006).

Pour les grandes cultures, trois méthodes d'application de l'herbicide peuvent être utilisées : application foliaire, application en sol et traitement des semences. Avec l'application foliaire, les étapes de développement souterrain de l'orobanche doivent être surveillées car le contrôle est inefficace si l'infestation est importante. D'autre part, si l'herbicide est appliqué aussi trop tôt, le nombre d'orobanches ciblées est insuffisant (Dinesha et *al.* 2012).

L'application des sulfonyles dans le sol a efficacement contrôlé l'orobanche sur la tomate et la pomme de terre (Eizenberg et *al.* 2006b), en tuant les graines conditionnées et les jeunes tubercules d'orobanche.

Le traitement des semences avec des imidazolinones s'est avéré efficace pour lutter contre *O. crenata* chez la féverole. Le grand avantage de cette méthode est son faible coût. L'herbicide est incorporé comme un revêtement sur les graines et distribués ainsi avec elles au moment de la plantation. L'utilisation de l'enrobage des semences nécessite une spécificité élevée entre l'hôte et le parasite ; par conséquent, il n'est pas très répandu. Les semences traitées remplacent un traitement de pré-levée et réduit les coûts de l'application mécanique.

f-Lutte génétique

La sélection des variétés résistantes reste toujours la méthode de contrôle la plus économique et respectueuse de l'environnement (Sackston 1992; Ruso et *al.* 1996; Sukno et *al.* 1998).

Des sources de résistance à *O. cumana*, présentes dans les germplams de tournesols cultivés et sauvages, ont été utilisées avec succès dans les programmes d'amélioration du tournesol vis-à-vis de ce fleau agronomique (Fernández-Martínez

et *al.* 2008). Ces résistances, basées sur un ou quelques gènes majeurs, se révèlent néanmoins contournées à ce jour par de nouvelles populations d'*O. cumana* plus agressives dans les pays autour de la Mer Noire.

La résistance à l'orobanche chez les autres espèces hôtes, notamment chez les fabacées, est à faible héritabilité et relativement rare (Cubero 1991 ; Rubiales et *al.* 2006). Par conséquent, des méthodes alternatives ont été recherchées pour améliorer les variétés existantes. La technique la plus utilisée, avec succès, pour l'amélioration des plantes est l'induction de mutations (Parry et *al.* 2009). La mutagenèse peut fournir un moyen d'expansion de la variabilité génétique, qui peut être utilisé dans les programmes de l'amélioration de résistance (Fernández-Martínez et *al.* 2012). Les rayonnements gamma sont l'agent le plus largement utilisé dans l'induction de mutation chez les plantes. Au cours des 70 dernières années, plus de 2252 variétés de végétaux traités, y compris les céréales, les graines oléagineuses, les légumes, les fruits et les plantes ornementales ont été officiellement publiés dans le monde entier (Bagher et *al.* 2014). Très peu de données sont disponibles sur l'intérêt de rayonnement gamma dans l'amélioration de la résistance contre l'orobanche. Cet intérêt a été signalé que chez le tournesol infestée par *Orobanche cumana* (Encheva et *al.* 2003, 2012).

La mutagenèse chimique a été également testée. En effet des graines de tomates traitées par l'éthane méthane sulfonate (EMS) a produit des lignées de tomate avec résistance partielle à *P. ramosa* (Kostov et *al.* 2007). La résistance observée se traduit par un nombre très réduit de fixation du parasite sur le système racinaires de 3 générations de mutants par rapport au contrôle non traité.

g-Lutte intégrée

La lutte intégrée est de combiner et d'intégrer différentes mesures de prévention et des instruments de contrôle dans le système agricole. Eisenberg et *al.* (2013) ont montré que l'application de Sulfosulfuron en raison de 40 g.ha⁻¹ 2 à 3 fois avec un intervalle de deux semaines à partir de deux semaines après la plantation suivie par l'irrigation par aspersion de 300 m³ ha⁻¹ retarde l'apparition des inflorescences de l'orobanche en dessus du sol 3-4 semaines. Un tel retard empêche les dommages causés à la production, mais pas la poursuite il y aura contamination du terrain par des graines de l'orobanche. L'application de l'herbicide imidazolinone comme imazapic ou imazamox 63-70 jours après la plantation empêche presque

complètement l'émergence des pousses d'orobanche et la formation des inflorescences. L'expérience menée par Hassan et *al.* (2012), pour évaluer l'effet de la combinaison des souches bactériennes et l'engrais de poulet sur la féverole infestée par l'orobanche, ne montre aucune émergence d'Orobanche.

Mokhtar et *al.* (2009) ont étudié l'effet de mycoherbicide combiné à un herbicide sur la tomate. Les résultats trouvés montrent un nombre réduit de fixation d'orobanche sur les tomates infestées.

Chapitre 1 : Mutagenèse induite par radiations gamma chez le pois chiche : variabilité moléculaire, changements développementaux et amélioration de la résistance à Orobanche foetida

1-Introduction : contexte et objectifs

Les légumineuses cultivées jouent un rôle important dans le régime alimentaire traditionnel de nombreuses régions dans le monde (FAOSTAT 2011). Le pois chiche occupe la troisième position parmi les légumineuses les plus consommées dans les régions méditerranéennes (Jukanti et al. 2012). Sa productivité reste limitée à cause de maladies fongiques et virales causant des pertes économiques importantes. Des rendements faibles et stagnants peuvent aussi s'expliquer par une sensibilité à différentes espèces d'orobanche notamment *Orobanche crenata*, *Orobanche foetida*, *Orobanche aegyptica*, et *Orobanche minor* (Rubiales and Fernandez-Aparicio 2012).

Les orobanches sont des plantes parasites obligatoires, dépourvues de chlorophylles et de système racinaire. Les graines d'orobanche germent suite à la perception des molécules stimulantes exsudées par les racines d'une plante hôte voisine. Après germination, la racine de l'orobanche adhère à la surface de la racine hôte (appressorium), progresse dans le cortex de la racine et se connecte aux tissus conducteurs par un organe spécialisé, l'haustorium. Ainsi, une fois la jonction vasculaire établie entre le parasite et l'hôte, l'orobanche se développe grâce à l'eau et aux nutriments prélevés essentiellement dans le phloème de la plante hôte. L'orobanche développe en premier lieu un tubercule, fortement accumulateur de substances minérales (potassium essentiellement) et organiques (acides aminés, hexoses et amidon essentiellement), puis une tige souterraine et une hampe florale après émergence à la surface du sol, capable de disséminer des milliers de graines (Musselman 1980).

Bien que *Orobanche foetida* parasite en premier lieu des Fabacées sauvages en régions Méditerranéennes, l'adaptation de cette espèce à des légumineuses cultivées a été recensée pour la première fois en Tunisie, essentiellement dans des parcelles de pois chiche dans la région de Béjà (Kharrat et al. 1992), puis plus récemment au Maroc parasitant la vesce commune (*Vicia sativa*, Rubiales et al. 2005). Plusieurs stratégies de lutte (méthodes culturales, phytosanitaire et lutte génétique) sont proposées aux agriculteurs pour réduire les infestations d'orobanche, sans pour autant améliorer significativement la situation, notamment pour la culture de pois chiche dans les régions les plus affectées (Yenish 2007). La lutte intégrée semble être le moyen le plus efficace pour stopper l'infestation croissante des sols agricoles (Rubiales and Fernández-Aparicio 2012 ; Golwasser and Rodenburg 2013). Le développement de nouvelles variétés résistantes à l'orobanche occupe néanmoins une place importante dans ce schéma (Pérez-Vich et al. 2013). En effet, la sélection des variétés résistantes reste toujours la méthode de contrôle la plus économique et respectueuse de

l'environnement. La résistance à l'orobanche est cependant rare chez les légumineuses (Fernandez-Aparicio et al. 2009, Rubiales 2014).

L'induction de mutation génétique pour l'acquisition d'un caractère recherché, inexistant dans les germplasm, est une méthode courante et efficace pour produire rapidement ce caractère (Parry et al. 2009). Dans ce contexte, la radiomutagenèse a été largement utilisée pour l'amélioration variétale (Maluszynski et al. 2009; Pushparajan et al. 2014; Ravichandran and Jayakumar 2014). Un certain nombre d'études démontre en effet les effets négatifs des fortes doses de radiation sur le métabolisme, la croissance et la capacité reproductrice, mais aussi les effets hormétiques des faibles radiations, tels qu'une augmentation du taux de germination, de la croissance, de l'assimilation photosynthétique et des rendements (Esnault et al. 2010; Marcu et al. 2013). Ainsi, plus de deux milles variétés (céréales, oléagineux, fabacées, fruits, plantes ornementales...) ont été officiellement publiées dans le monde entier durant ces dernières décennies. De façon surprenante, très peu de données sont disponibles quant à l'utilisation des rayonnements gamma pour améliorer la résistance des plantes à l'orobanche. Un intérêt a été uniquement démontré chez la fève et le tournesol vis-à-vis d'*O. crenata* et d'*O. cumana*, respectivement (Abdel-Hady et al. 2008; Encheva et al. 2003, 2012). Kostov et al. (2007) ont prouvé l'intérêt de la mutagenèse chimique pour améliorer la résistance de la tomate à *O. ramosa*.

Ce premier chapitre met en lumière le bénéfice d'une pré-exposition des graines de pois chiche à une gamme de rayonnements gamma pour élargir la variabilité génétique et développer de nouvelles variétés résistantes à *O. foetida*. Au préalable, les effets de doses croissantes ont été précisés sur la germination et la croissance du pois chiche (cv. Amdoun).

Trois axes définissent ainsi ces travaux :

- l'étude des effets des rayons gamma sur la germination et la croissance des plantes de pois chiche, avec la détermination de la Dose Léthale 50 (DL₅₀) de cobalt₆₀
- la sélection phénotypique des mutants résistants à *O. foetida* au champ parmi les mutants M1
- et l'analyse de la variabilité génétique au sein des mutants M1 d'intérêt (stratégie ISSR).

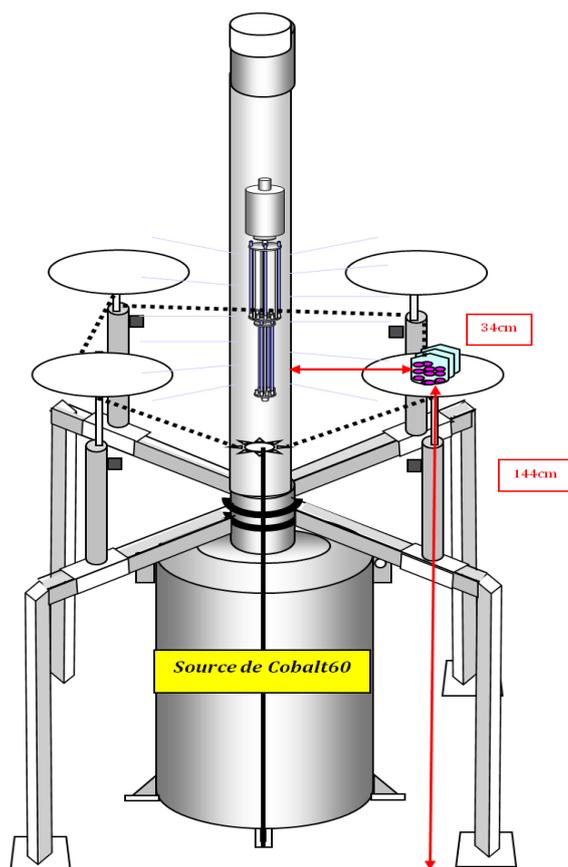


Figure 11 : Disposition des échantillons sur la source de Co₆₀

Tableau 2 : Composition de milieu de culture Coïc (Coïc and Lesaint 1975)

Macroéléments		Microéléments	
	mM		µM
KNO ₃	3,80	FeCl ₃	3,70
K ₂ HPO ₄	0,30	ZnSO ₄ + 7 H ₂ O	3,50
KH ₂ PO ₄	0,80	Bo ₃ H ₃	24,30
NaNO ₃	0,20	MnSO ₄ + H ₂ O	11,80
NH ₄ NO ₃	2,00	CuSO ₄ + 5 H ₂ O	1,00
Ca(NO ₃) ₂ + 4 H ₂ O	3,10	Na ₂ MoO ₄ + 2H ₂ O	0,04
MgSO ₄ + 7H ₂ O	0,75		
NaCl	0,20		

2-Matériel et méthodes

2-1-Matériel végétal

La variété de pois chiche utilisée pour cette étude est la variété Amdoun, une nouvelle obtention de l'Institut National de Recherche Agronomique de Tunis (INRAT) enregistrée au catalogue officiel en 2004. Cette variété, sensible à l'orobanche, a été fournie par la Coopérative Centrale de Semences à Manouba (Tunis, Tunisie). Des parcelles de pois chiche infestés par *Orobanche foetida* ont été exploitées pour faire la sélection phénotypique des mutants.

2-2- Méthodes

2-2-1-Optimisation des conditions de radio-traitement

Les traitements d'irradiation ont été réalisés au Centre National des Sciences et de Technologies Nucléaires de Sidi Thabet (Tunisie) en utilisant une source de cobalt 60 d'activité initiale de 100 000 curies, avec un débit de dose de l'ordre de $10,60 \text{ Gy min}^{-1}$ et à température ambiante (tout en appliquant les corrections nécessaires en se basant sur la loi de décroissance radioactive du Co_{60} pour les traitements ultérieurs). La source radioactive utilisée est télescopique (cylindre contenant 4 crayons de cobalt 60 de 45,20 cm de long, **Figure 11**).

a-Emballage et conditionnement sous vide des graines

L'emballage sous vide des graines a été réalisé dans des sacs plastiques thermorésistants (conditionnement durable).

b- Détermination de la dose d'irradiation

La dose reçue au cours du traitement a été déterminée avec des dosimètres chimiques de type Fricke. Les mesures ont été faites avec une précision de 5%. Ce test a été fait pour s'assurer de l'homogénéité de la dose reçue pour tous les échantillons.

2-2-2-Irradiation des graines

Après l'optimisation des conditions d'irradiation, les graines de pois chiche ont été placées dans 3 sacs en polyéthylène à raison de 20 graines minimum par sac. Les sacs ont été déposés sur les plateaux fixes du dispositif d'irradiation (**Figure 11**). La distance entre les échantillons et la source d'irradiation était de 34 cm. La hauteur par rapport à la source était

de 144 cm. Le temps d'exposition des graines aux rayons ionisants a été défini comme le rapport entre la dose et le débit d'irradiation.

La gamme de doses utilisées était de 0 à 750 Gy (palier de 50) pour des tests ultérieurs de germination en boîte de Petri, et de 0 à 200 Gy (palier de 20) pour des tests ultérieurs de développement en serre.

2-2-3-Tests de germination des graines en boîte de Petri

a-Stérilisation des graines

Une fois irradiées (0 à 750 Gy), les graines de pois chiche ont été stérilisées avec une solution d'hypochlorite de sodium (eau de javel 2,30% °Cl) pendant 5 min et rincées 3 fois 5 minutes puis trois fois une minute à l'eau distillée stérile.

b- Mise en germination des graines

Les graines (n=100 par dose) ont été déposées entre 2 feuilles de papier filtre dans des boîtes de Pétri de diamètre de 19 cm et scellées avec du parafilm. Les boîtes ont été placées pendant 7 jours à 23°C, sous une photopériode 16h/8h (lumière/obscurité ; intensité lumineuse de 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Le pourcentage de germination a été déterminé après 7 jours. Une graine est considérée germée lorsque la taille de la radicule est supérieure à 1,5 cm. Un contrôle de germination a été réalisé dans les mêmes conditions avec des graines non irradiées.

2-2-4-Développement des plantes en serre

Une fois irradiées (20 à 200 Gy), les graines furent semées dans des pots remplis d'un mélange terre/sable/argile (1/1/1). Les pots ont été transférés en serre (14h photopériode, 25°C/18°C température jour/nuit, 200 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$), et arrosés par une alternance de solution Coïc 50% (**Tableau 2**) et d'eau, deux fois par semaine.

Le développement des plantes a été évalué après 90 jours de culture par la mesure des paramètres suivants : taux de survie des plantes, hauteur de la partie aérienne, longueur de la racine principale, masse du système racinaire (PR) et des parties aériennes (PA), rapport de masse PA/PR, nombre d'axes caulinaires primaires et secondaires, contenu en chlorophylles des feuilles. La date du premier jour de floraison a été également notée (en jours post-semis). Un contrôle de développement a été réalisé dans les mêmes conditions avec des graines non irradiées.

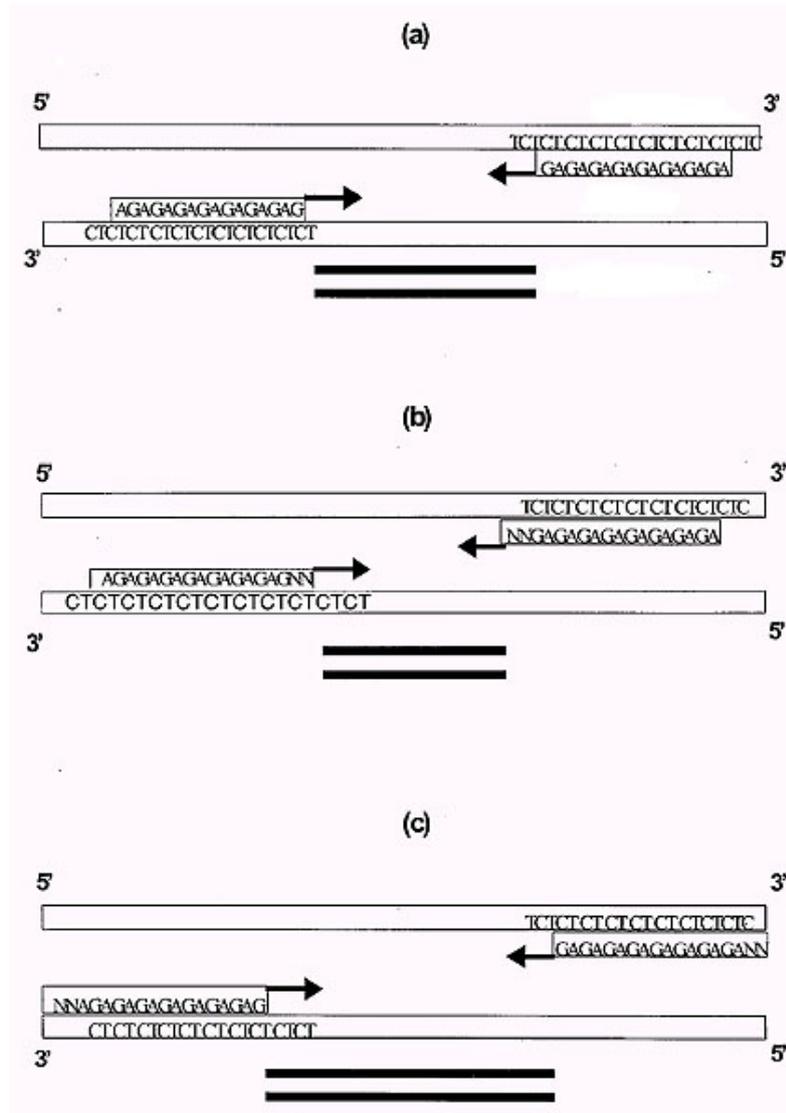


Figure 12 : Représentation schématique de la technique ISSR-PCR, utilisant une amorce (AG)₈ non-ancrée (a), ancrée en 3' (b) et ancrée en 5' (c), ciblant un microsatellite (TC)_n (Pradeep Reddy *et al.* 2002)

Les amorces sont utilisées pour amplifier la région flanquant deux microsatellites (TC)_n d'orientation inverse.

Le taux de survie des plantules, estimé à 90 jours, a ainsi permis une évaluation de la dose optimale (DL_{50}). La dose optimale se définit comme étant la dose qui induit le maximum de mutations avec un minimum d'atteinte pour la plante. C'est la dose qui induit 50% de létalité. Pour l'évaluation du taux de chlorophylles, l'ensemble des feuilles d'un plant a été récolté à 90 jours, congelé dans l'azote liquide puis broyé au mortier/pilon. L'extraction des pigments chlorophylliens fut réalisée dans 5 ml d'acétone à 80 % à partir de 500 mg MF de poudre de feuilles. Les teneurs en chlorophylles a (Chl a), b (Chl b) et totale (Chl T) ont été déterminées par spectrophotométrie (Mc Kinneyn1941, Arnon 1949) :

$$\text{ChlT} = 20,2 \times \text{DO}_{645} + 8,02 \times \text{DO}_{663}$$

$$\text{Chl a} = 12,7 \times \text{DO}_{663} - 2,69 \times \text{DO}_{645}$$

$$\text{Chl b} = 22,9 \times \text{DO}_{645} - 4,68 \times \text{DO}_{663}$$

2-2-5-Phénotypage au champ

L'étude (saison de production 2010-2011) a été réalisée dans 3 stations différentes (Béja nord, Béja sud et Amdoun) de la région de Béja (Nord-Ouest de la Tunisie). Les parcelles utilisées sont naturellement contaminées par *O. foetida*.

Pour cette étude, une nouvelle série d'irradiation de graines de pois chiche (var. Amdoun, n = 3 sacs de 1000 graines, M1) a été réalisée, à une dose équivalente à la DL_{50} préalablement évaluée par les tests de germination et de développement en serre. Mille graines irradiées et cent graines non irradiées ont été semées dans chaque station (le mois de Novembre). A la date de récolte (juin de l'année suivante), la sensibilité des plantes survivantes à l'orobanche a été déterminée par le dénombrement des orobanches émergées à leur pied. Le rendement grainier des plantes d'intérêt (potentiellement résistantes à l'orobanche) a été évalué par le dénombrement des gousses par plante, le nombre des graines par gousse (ou par plante) et le poids de milles grains (PMG). Ces graines constituent la descendance M2.

2-2-6-Analyse de la variabilité génétique des mutants par la technique ISSR-PCR

La variabilité génétique des mutants d'intérêt sélectionnés au champ a été évaluée par l'emploi de marqueurs inter-microsatellites (ISSR, Inter simple sequence repeat) (**Figure 12**).

a-Extraction d'ADN

L'ADN génomique des mutants M2 d'intérêt a été extrait à partir des jeunes feuilles, en utilisant la technique décrite par Doyle and Doyle (1987) : purification dans un mélange

Tableau 3 : Liste des amorces ISSR testées pour étudier le polymorphisme des mutants M2 d'intérêt

Amorce	Séquence (5'-3')	Température d'hybridation (°C)
ISSR 1	(AC) ₇ T	52
ISSR 2	(AC) ₈ C	50
ISSR 3	(GA) ₈ T	52
ISSR 4	(TG) ₈ GA	52
ISSR 5	(GAA) ₆	52
ISSR 6	(GA) ₈ A	52
ISSR 7	(CT) ₇ T	52
ISSR 8	(CA) ₈ A	50
ISSR 9	(TG) ₈ A	52
ISSR 10	(CT) ₈ C	52
ISSR 11	(CAC) ₅	52
ISSR 12	(GACA) ₄	50
ISSR 13	(ACTG) ₄	50
ISSR 14	(AG) ₈ YT	50
ISSR 15	(GT) ₈ YC	52

* Y = (C, T)

chloroforme / alcool isoamylique et précipitation par le propanol. Les concentrations d'ADN ont été déterminées par spectrophotométrie à 260 nm et la qualité vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% dans du tampon TAE (Tris-acétate-EDTA). Les extraits ont été conservés à -20 ° C.

b- Optimisation et sélection des amorces ISSR

Un nombre total de 15 amorces ISSR (**Tableau 3** ; Chowdhury *et al.* 2002; Rao *et al.* 2007 et Tahir and Karim 2011 ; Singh *et al.* 2014) a été utilisé pour les tests de variabilité et de reproductibilité. Deux individus de chaque mutant ont été testés pour évaluer l'efficacité des amorces. Les tests de réaction PCR ont été conduits selon le programme suivant :

- L'étape de dénaturation initiale a été réalisée à 94° C pendant 5 minutes
- 40x {
 - L'étape d'hybridation a été réalisée à 94° C pendant 1 minute
 - L'hybridation de l'amorce a été réalisée à 53° C pendant 1 minute
 - L'extension de l'amorce a été réalisée à 72°C pendant 2 minutes
- L'élongation finale a été réalisée à 72°C pendant 5 min.

Les amplifias ont été séparés sur gel d'agarose (1,5%), colorés dans le BET et visualisés sous UV. Les produits de PCR ont été conservés à -20°C. Les marqueurs révélant un polymorphisme entre les échantillons témoins et traités ont été sélectionnés pour l'analyse du polymorphisme moléculaire induit par l'irradiation des graines.

c-Analyse des données moléculaires

Selon leur mobilité électrophorétique, les fragments amplifiés par les amorces ISSR validées ont été marqués manuellement pour la présence (1) de la bande ou l'absence (0), afin de générer une matrice de données binaires. La saisie des données a été faite selon les trois principes suivants (Weising *et al.* 2005) :

- 1- Seules les bandes facilement identifiables ont été enregistrées.
- 2- Les bandes qui n'ont pas pu être identifiées précisément ont été exclues.
- 3- Les bandes avec la même mobilité, mais avec une intensité différente, n'ont pas été traitées comme de mêmes bandes.

En utilisant le programme Genedist (Felsenstein 1995), ces données ont permis de produire une matrice de distance génétique en utilisant la formule de Nei and Li (1979). La matrice a

été ensuite analysée avec le logiciel de PHYLIP pour produire un fichier d'arbre en utilisant la méthode et l'analyse bootstrap (1000 réplifications) neighbor-joining.

2-2-7-Analyse statistique des données

Les analyses de variance (ANOVA) ont été réalisées en utilisant un modèle linéaire généralisé à l'aide des logiciels Sigma Plot version 10.0 et Sigma Stat version 3.5 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA), suivi par une comparaison multiple de moyennes à l'aide du test de Bonferroni ($P < 0,05$) et Fisher LSD ($P < 0,05$).

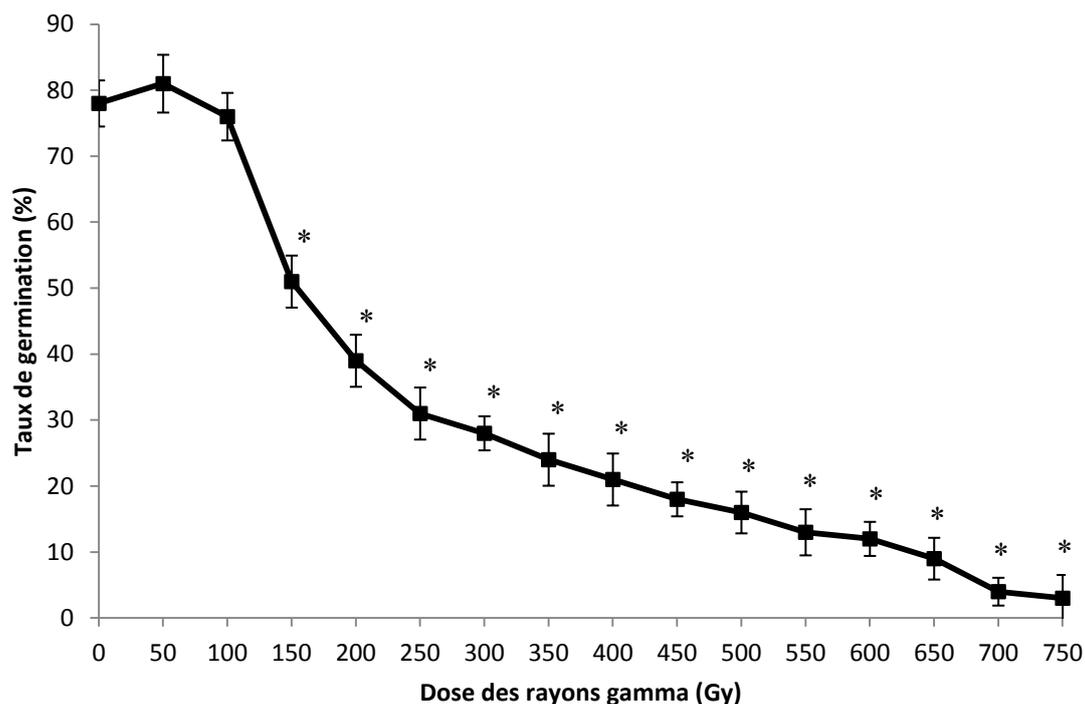


Figure 13 : Effet des rayons gamma sur la germination des graines de pois chiche (cv. Amdoun)

(n=100 ; moyennes \pm ET, * : différence significative / témoin ; $P \leq 0,05$, Bonferroni test).

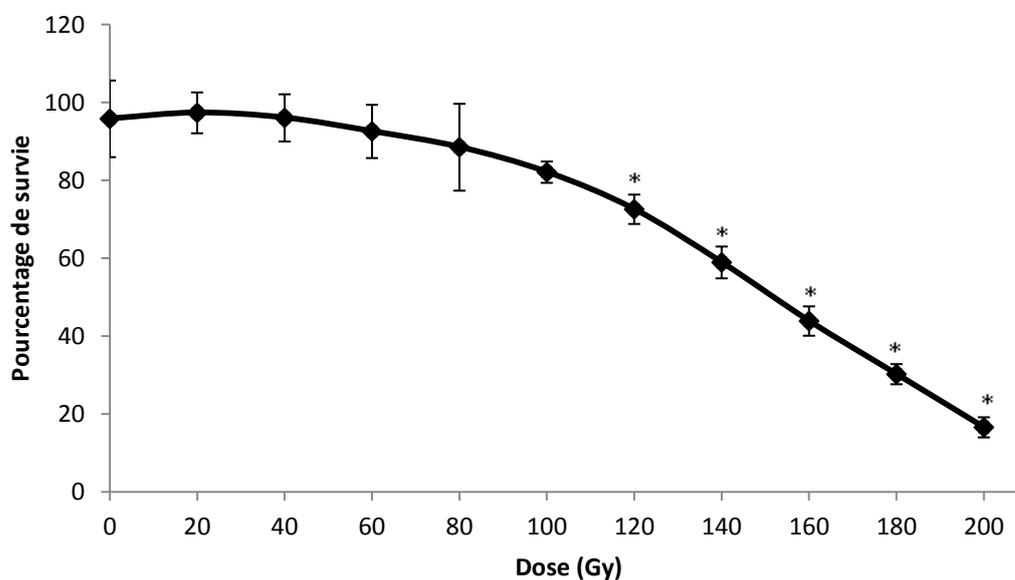


Figure 14: Effet des rayons gamma sur la survie des plantes de pois chiche (cv. Amdoun)

(n=20 ; moyennes \pm ET, * : différence significative / témoin : $P \leq 0,05$, Bonferroni test)

3-Résultats

3-1- Effet de doses croissantes sur le taux de germination en boîte de Pétri

Dans une installation de traitement par rayonnements ionisants, les conditions d'irradiation peuvent varier considérablement par rapport à celles où le produit a été validé, telles que le débit de dose, l'humidité et les conditions de stockage post-irradiation. Ces variations peuvent conduire à des erreurs systématiques non attendues dans l'estimation de l'effet de la dose d'irradiation sur le produit irradié. Pour limiter ces effets (différentes dates d'irradiation), les graines sèches ont toujours été conservées dans les mêmes conditions à température ambiante, dans des sacs scellés (sacs de 20 à 1000 graines selon les expérimentations).

Dans le but d'évaluer l'impact de doses croissantes de rayonnement gamma sur la germination et la dose optimale DL_{50} , les graines sèches de pois chiche (var. Amdoun), distribuées en 5 échantillons (sachets) de vingt graines, ont été irradiées à des doses allant de 50 à 750 Gy (paliers de 50 Gy, **Figure 13**). Comme attendu, le taux de germination des graines non traitées (7 jours après traitement) est élevé, de l'ordre de 80%. Un taux semblable est mesuré pour des graines irradiées à des doses de 50 et 100 Gy. Au-delà, pour les traitements de 150 à 250 Gy, le pourcentage de germination tend à décroître proportionnellement à la dose. Ainsi, une pré-exposition des graines à une dose de 150 Gy réduit à 50% le taux de germination et les graines irradiées à 250 Gy ne germent qu'à 30% environ. Au-delà de 250 Gy, l'effet de doses croissantes sur la germination est moins accentué (réduction plus lente). Le pourcentage de germination est très faible, sous le seuil de 10%, à partir d'une pré-exposition à 650 Gy. Il est uniquement de l'ordre de 3-4% après un traitement à la dose maximale de 750 Gy.

3-2- Effet de doses croissantes sur le taux de survie des plantes en serre

En tenant compte de l'effet de doses croissantes sur le pourcentage de germination, une seconde série d'irradiations a été réalisée sur un intervalle resserré de doses, de 20 à 200 Gy par palier de 20 Gy. Cette expérimentation a eu pour objectifs d'une part d'estimer la dose DL_{50} et d'autre part de préciser l'impact de telles doses croissantes de Co_{60} sur le développement du pois chiche. Le phénotypage a été réalisé après 90 jours de culture, en fin de développement (gousses matures) pour les plantes M1 survivantes.

La **Figure 14** illustre l'impact de ces doses croissantes sur le pourcentage de survie à 90 jours. Le taux de survie des plantes témoins (graines non irradiées) est élevé ($95,83 \pm 9,83$ %). Les faibles doses (20 et 40 Gy) n'induisent pas de réduction significative du taux de survie des



Figure 15 : Phénotype des jeunes plantes suite à une pré-exposition des graines de pois chiche au Co_{60} (7 jours de germination)

Tableau 4: Effets des rayons gamma sur le phénotype des plantes de pois chiche à 90 jours post-semis (var. Amdoun)
(n=20 moyennes \pm ET ; * : différence significative par rapport au témoin ; $P \leq 0,05$, Bonferroni test)

Paramètres	Longueur racines (cm)	Poids frais racines (g)	Hauteur partie aérienne (cm)	Poids frais partie aérienne (g)	Ratio PA/PR	Nombre rameaux primaires	Nombre rameaux secondaires	Date premier jour de floraison (No.)
0 Gy	23,20 \pm 0,76	14,72 \pm 0,53	37,00 \pm 1,63	18,00 \pm 1,06	1,23 \pm 0,10	1,16 \pm 0,21	2,50 \pm 0,26	65,16 \pm 0,60
50 Gy	25,20* \pm 1,16	16,21 \pm 0,67*	41,30 \pm 1,20*	18,90 \pm 1,57	1,17 \pm 0,09	1,83* \pm 0,15*	2,66 \pm 0,21	66,00 \pm 0,96
100 Gy	20,40 \pm 1,41*	13,80 \pm 0,86*	31,10 \pm 0,65*	16,00 \pm 0,78	1,17 \pm 0,10	1,83* \pm 0,32*	2,83 \pm 0,17	64,00 \pm 0,37
150 Gy	21,00 \pm 1,11	13,60 \pm 0,52	30,90 \pm 1,34*	15,52 \pm 1,01*	1,14 \pm 0,08	2,00 \pm 0,28*	2,84 \pm 0,16	67,30* \pm 0,47
200 Gy	16,2 \pm 1,42*	9,41 \pm 0,80*	14,80 \pm 1,45*	11,06 \pm 1,33*	1,25 \pm 0,18	3,33 \pm 0,21*	4,58 \pm 0,33*	68,00 \pm 0,61*

plantes. Des doses supérieures, de l'ordre de 60 et 80 Gy, tendent à réduire le taux de survie mais les variations observées ne sont pas significatives par rapport aux plantes témoins. Celles-ci deviennent significatives pour une pré-exposition des graines à des doses supérieures ou égales à 100 Gy. A partir de ce seuil d'irradiation, le taux de survie des plantes à 90 jours chute proportionnellement à la dose ($\approx -0,70\%$ par Gy), pour atteindre la valeur de $16,66 \pm 2,81\%$ suite à une pré-exposition des graines à 200 Gy. La dose DL_{50} , induisant une perte de survie de 50%, est estimée à 150 Gy environ.

3-3-Effet de doses croissantes sur le développement post-germinatif

Le phénotypage des plantes a été réalisé à la fois en boîte de Pétri (7 jours après germination, doses croissantes de 0 à 750 Gy) et en culture en pot (90 jours après semis, doses croissantes de 0 à 200 Gy). La **Figure 15** présente le développement des jeunes plantes 7 jours après germination suite à une pré-exposition des graines à une gamme des rayons gamma allant de 50 et 750 Gy. Les graines irradiées à 50 Gy germent et les jeunes plantes se développent plus rapidement que les graines non traitées. Ainsi, à 7 jours après germination, les jeunes plantes issues de graines irradiées à 50 Gy présentent un système racinaire et un axe caulinaire bien développés, à la différence des jeunes plantes issues de graines non irradiées dont la croissance des organes végétatifs est encore extrêmement limitée 7 jours après germination. Les jeunes plantes issues de graines irradiées à 150 Gy présentent un phénotype semblable à celui des jeunes plantes témoins (résultats non présentés). Par contre, la germination et le développement post-germinatif sont très affectés par les fortes doses de Co_{60} (700-750 Gy). Les racines, la tige ainsi que les feuilles ne se développent pas dans le cas où les graines traitées germent.

Un phénotypage plus précis de plantes cultivées en serre issues des graines pré-exposées à des doses croissantes (0 à 200 Gy) a été réalisé 90 jours après semis (**Tableau 4**). Le traitement des graines à 50 Gy stimule la croissance des plantes, comme démontré par l'augmentation significative de la longueur et du PF des racines (racine principale) et de la partie aérienne. De plus, le développement de la partie aérienne des plantes traitées par la dose 50 Gy est modifié par rapport aux plantes témoins, avec une augmentation du nombre d'axes caulinaires primaires. Par contre, le contenu en chlorophylles des feuilles n'est pas impacté par une pré-exposition à 50 Gy (**Figure 16**).

Les doses supérieures (100, 150 et 200 Gy) ont un impact négatif sur la croissance des plantes et le contenu foliaire en chlorophylles (**Tableau 4**, **Figure 16**). La longueur et la biomasse

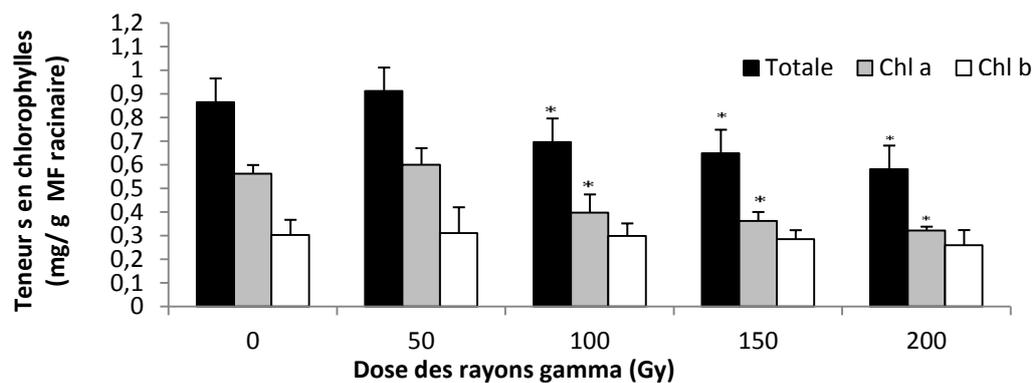


Figure 16: Effets des rayons gamma sur les teneurs en chlorophylles (a, b et totale) de jeunes feuilles de pois chiche (cv. Amdoun).
(n=20 ; moyenne ± ET, * : $P \leq 0,05$, Bonferroni test).

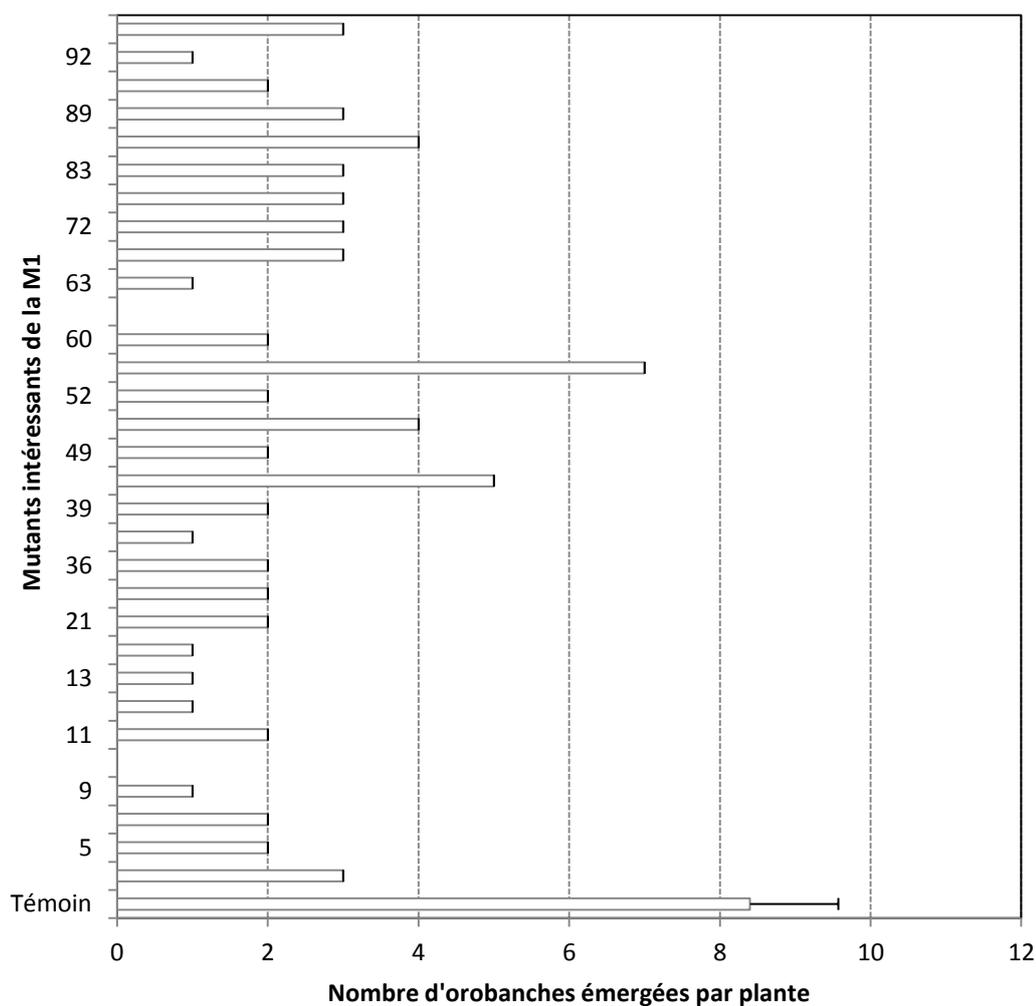


Figure 17: Niveau de sensibilité des plantes de pois chiche non irradiées (contrôle) et des mutants M1 sélectionnés aux champs à *Oryza sativa* (*Orobanche foetida*)

(PF) des racines (racine principale) et de la partie aérienne des plantes issues des graines traitées sont effectivement inférieures à celles des plantes témoins. Le ratio de biomasse de la partie aérienne par rapport aux racines (PA/PR) n'est cependant pas modifié. Le nanisme est évident pour les plantes qui survivent au prétraitement des graines à 200 Gy, qui présentent une partie aérienne 2,5 fois plus petite que celle des plantes témoins à 90 jours post-semis. Les taux réduits en chlorophylles totales résultent principalement d'une altération de l'accumulation en chlorophylle a (**Figure 16**). Cette gamme de radiations gamma impacte aussi le développement foliaire (**Annexes 1 et 2**), avec le plus souvent une réduction de la surface foliaire totale, et chez les plantes issues de la pré-exposition des graines à 200 Gy, un phénotype foliaire anormal avec l'absence de pétiole ou au contraire l'allongement des pétioles. Elle induit également une augmentation du nombre de rameaux primaires et secondaires. Ainsi, le degré de ramification de la partie aérienne est doublé chez les plantes issues d'une pré-exposition des graines à 200 Gy (**Tableau 4**). La date de première floraison est également influencée puisque les plantes issues des traitements 150 et 200 Gy fleurissent 2 ou 3 jours plus tard que les plantes témoins (**Tableau 4**).

3-4-Phénotypage aux champs : sensibilité à l'orobanche et rendement grainier

Des graines témoins (non irradiées, 1000 graines) et irradiées à 150 Gy (DL₅₀, 3000 graines) ont été semées équitablement dans trois stations naturellement infestées par *O. foetida* dans la région de Béja. La forte sensibilité à l'orobanche des plantes témoins est confirmée dans les 3 stations, avec en moyenne $8,40 \pm 1,20$ orobanches émergées à chaque pied à la date de récolte. Par contre, une variabilité importante est observée concernant le degré de sensibilité des plantes mutantes (150 Gy), avec une infestation variant de 0 à 7 orobanches émergées par pied.

Les données concernant 30 mutants M1 d'intérêt sont présentées dans les **Figures 17 et 18**. Ces mutants présentent en commun un nombre réduit d'orobanches émergées à leur pied par rapport aux plantes témoins et un nombre de graines par plante au moins égal à celui des plantes témoins. Ces mutants peuvent être classés en fonction de leur productivité grainière : individus avec un nombre de graines et un PMG (poids de 1000 grains) équivalents à ceux des témoins (14, 37, 63, 81, 83, et 92) ; individus avec un nombre de graines similaire à celui des témoins mais avec un PMG plus faible (4, 6, 9, 12, 39 et 52) ; et des individus avec un rendement grainier supérieur à celui des témoins puisque leur nombre de graines doublent

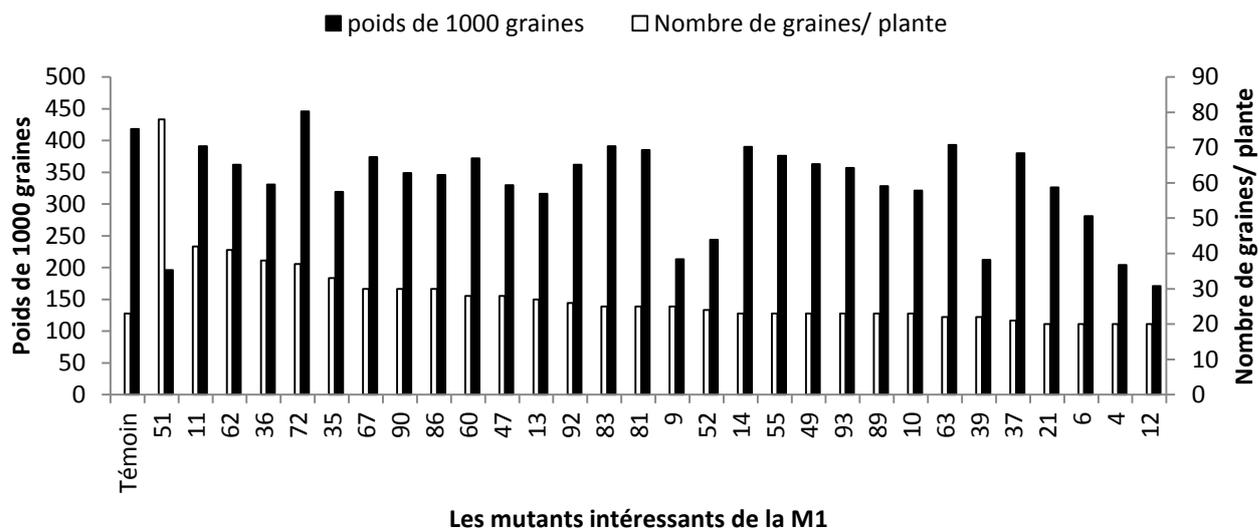


Figure 18: Rendement grainier de la lignée contrôle non irradiée et des mutants M1 sélectionnés.

Le contrôle non irradié et les mutants issus des graines irradiées par la dose 150 Gy ont été cultivés dans des champs naturellement infestés par *O. foetida*.

Tableau 5: Le polymorphisme détecté par l'utilisation de 5 amorces ISSR sur 30 lignées mutantes et lignée parentale (non irradié) de pois chiche (cv. Amdoun)

Amorces	Nombre total de bandes	Nombre de bandes polymorphes	% de polymorphisme
(AC) ₇ T	7	7	100
(AC) ₈ T	11	11	100
(GA) ₈ T	7	7	100
(TG) ₈ GA	6	6	100
(AC) ₈ GG	10	10	100
Totale	41	41	100
Moyenne	8,2	8,2	100

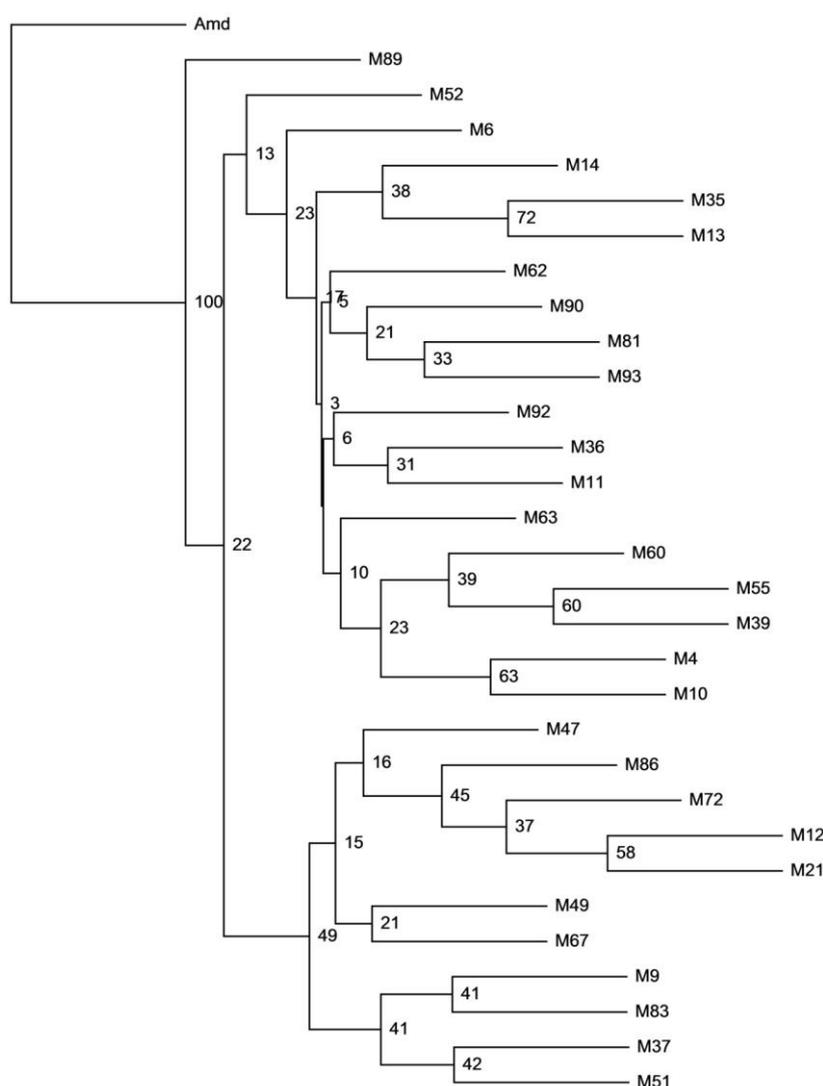


Figure 19: Dendrogramme des mutants M2 et du contrôle non irradié du pois chiche (cv. Amdoun), montrant la similarité génétique basée sur des données ISSR

sans que le PMG soit affecté (11, 36, 62, et 72). Le mutant 51 se distingue par un accroissement très important du nombre de graines par plante en défaveur du PMG.

Le nombre de graines par gousse des plantes témoins est de $1,00 \pm 0,31$ et n'est pas significativement différent chez les plantes mutantes d'intérêt (**Figure 19**).

3-5- Analyse ISSR de la diversité génétique des lignées sauvages et mutantes de pois chiche

Trente mutants présélectionnés aux champs (graines M2) et la lignée témoin non irradiée de pois chiche ont fait l'objet de cette étude de diversité génétique. Toutes les lignées M2 se sont bien développées en serre, à l'exception du mutant M13 (mort après 3 semaines). Sur les 15 amorces ISSR testées initialement, cinq (ISSR-4, ISSR-5, ISSR-7, ISSR-8, et ISSR-15) ont donné un motif de bandes relativement clair et ont donc été choisies pour cette étude.

Quatre des amorces ISSR choisies ont des motifs de répétition dinucléotide [(AC)₇T, (AC)₈G, (TG)₈GA, (AC)₈GG] et un trinucléotide [(GAA)₆] 3'ancré (**Tableau 5**). En utilisant ces amorces, la taille moléculaire des bandes amplifiées sont de l'ordre de 200 à 800 pb. Les 5 amorces ISSR génèrent 6 à 11 bandes, avec une moyenne de 8,20 bandes par amorce dans un total de 41 bandes (**Tableau 5**). Les mutants ont montré 100% de bandes polymorphes avec ces marqueurs ISSR. Sur ces cinq amorces ISSR polymorphes, ISSR-8 et ISSR-5 ont donné le minimum (6) et le maximum de bandes (11), respectivement.

La matrice de similarité génétique calculée en fonction de Nei and Li (1979) varie de 0,02 (entre M72 et M21) à 0,94 (entre M93 et M37). Pour la lignée témoin non irradiée, la valeur la plus élevée de la matrice de similitude est partagée avec le mutant M39 (0,76) alors que la plus petite valeur de matrice de similitude est partagée avec le mutant M83 (0,24). La méthode de neighbor-joining a généré un dendrogramme avec deux pôles principaux A et B, incluant 18 et 11 mutants de pois chiches, respectivement (**Figure19**).

4-Discussion

L'exploitation de la diversité génétique naturelle et/ou induite est la prescription fondamentale de l'amélioration variétale pour le développement de nouvelles variétés capables d'assurer une production alimentaire durable. Les sélectionneurs sont en effet confrontés à une trop faible disponibilité, voire à l'absence dans leurs collections, des caractères recherchés. Ainsi, l'objectif des mutations induites est d'accroître le taux de fréquence des mutations dans l'objectif de créer le caractère recherché. Dans ce contexte, les rayonnements gamma sont très mutagènes, par leur pouvoir de pénétration important. Les dommages observés résultent de modifications macromoléculaires directes (ADN, lipides et protéines) et sont aussi indirectement induits par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) issues de la radiolyse de l'eau (Kim *et al.* 2011; Donà *et al.* 2013; Macovei *et al.* 2014). De nombreuses études ont montré les effets néfastes des fortes doses sur le métabolisme, la croissance et la capacité de reproduction des plantes, mais aussi les effets hormétiques des faibles doses tels que l'augmentation du taux de germination, de l'assimilation et de la croissance (Daly and Thompson 1975; Miller 1987; Wi *et al.* 2007; Esnault *et al.* 2010; Marcu *et al.* 2013).

Bien que les plantes puissent s'adapter à des doses modérées de rayonnement par des mécanismes de compensation (réparation de l'ADN, système de défense antioxydant), elles présentent une forte variabilité de la sensibilité aux rayonnements gamma, en fonction de leur constitution génétique, leur quantité d'ADN et leur teneur en eau. La détermination de la dose de rayonnement adaptée pour une variété (DL_{50}) est ainsi la première étape des études de mutagenèse induite. Dans nos travaux, la DL_{50} a été évaluée à 150 Gy pour la variété Amdoun de pois chiche, cette dose réduisant à 50% la germination des graines et la survie des jeunes plants (**Figures 13 et 14**). La sensibilité de cette variété de pois chiche aux rayons gamma apparaît ainsi comme modérée par rapport à la forte sensibilité du pois (variété non précisée) pour qui de faibles doses de 25 à 100 Gy affectent la viabilité (Veselovskii *et al.* 2006), et la faible sensibilité des grains de riz dont la germination est simulée jusqu'à la dose 200 Gy (Macovei and Tuteja 2013).

Notre étude montrent que des doses inférieures à 100 Gy n'affectent ni la germination des graines de pois chiche ni la survie des jeunes plantes. Une étude précédente chez le pois chiche précisait l'innocuité de doses plus faibles (5 à 25

Gy), des doses supérieures n'ayant pas été testées (Melki and Salami 2008). D'autre part, nos travaux montrent que des doses supérieures à 100 Gy induisent des effets néfastes croissants, en particulier sur la survie et la croissance des plantes en post-germination (**Tableau 4**). Ainsi, un pré-traitement des graines à 200 Gy réduit la germination de 50% mais induit un taux de mortalité très élevé (90%) des plantes à 90 jours en post-germination (**Figure 16**). Des modifications mineures ont été observées chez les plantes survivantes issues de graines irradiées avec les doses de 100 à 200 Gy, telle qu'une croissance restreinte, une ramification accentuée de la partie aérienne et un retard de floraison. Une réduction de la croissance est communément observée chez les plantes irradiées et est généralement attribuée à des altérations du cycle cellulaire dans les tissus méristématiques, à la dégradation des pigments photosynthétiques et ainsi à une capacité photosynthétique diminuée (Sengupta et al. 2013 ; Macovei et al. 2014). La dégradation des pigments photosynthétiques s'explique par la forte sensibilité du mésophile et des chloroplastes aux rayons gamma par rapport à d'autres tissus et organites cellulaires (Kim et al. 2011). Dans notre étude, les mutants issus des graines irradiées par les doses 100, 150 et 200 Gy montrent en effet de faibles teneurs en chlorophylles par rapport aux plantes non irradiées (**Figure 16**). Il semble que les effets des rayonnements ionisants gamma sur les traits phénotypique et physiologique varient selon la variété de pois chiche. En effet, aucun changement n'a été observé pour le premier jour de floraison et la ramification de la partie aérienne (rameaux primaires) chez deux autres génotypes (Binasola-2 et CPM-834) de pois chiche irradiés par 200 Gy (Karim et al. 2008).

De très faibles doses de radiation gamma de 5 à 20 Gy améliorent la germination des graines de soja (Moussa 2011) et d'arachide (Ahuja et al. 2014). Bien que cette gamme de doses n'ait pas été testée dans notre étude, celle-ci démontre néanmoins l'effet bénéfique de doses modérées sur la croissance du pois chiche cv. Amdoun. En effet, la plupart des paramètres de croissance analysés à 90 jours après semis, tels que la longueur et le poids frais racinaire, la hauteur et le poids frais de la partie aérienne et le degré de ramification des parties aériennes (rameaux primaires), atteignent une valeur significativement plus élevée chez les plantes issues de graines irradiées par la dose 50 Gy par rapport aux plantes non irradiées (**Tableau 4**). Des observations similaires ont été rapportées chez le pois chiche irradié par 15 Gy

(Melki and Salami 2008). Comme discuté ci-dessus, plusieurs études ont déjà démontré les effets hormétiques des faibles doses de rayons gamma chez les plantes, assumant qu'une stimulation de la croissance des mutants pouvait résulter d'une modification de la signalisation hormonale, d'une augmentation du rendement quantique de la photochimie des photosystèmes, et/ou d'une capacité anti-oxydante accentuée permettant de surmonter plus facilement les stress quotidiens (Esnault et al. 2010 ; Marcu et al. 2013).

La résistance à l'orobanche a été décrite chez de nombreuses espèces hôtes et repose sur divers mécanismes ayant lieu avant ou après l'attachement aux racines de l'hôte (Pérez-de-Luque et al. 2007). Bien que la résistance à l'orobanche soit rare chez les légumineuses, elle existe chez le pois chiche contre l'espèce *O. crenata* et s'explique par la faible production des stimulants de germination et le blocage de la pénétration du parasite dans les racines de l'hôte (Rubiales et al. 2003b). Par contre, aucune information n'est disponible quant à la résistance du pois chiche à *O. foetida*. En tenant compte de la DL₅₀ du pois chiche cv. Amdoun et de la probable divergence génétique des populations d'*O. foetida* en Tunisie (Roman et al. 2007), la résistance à *O. foetida* a été recherchée dans cette étude parmi les mutants issus d'une irradiation des graines à 150 Gy, et sélectionnés dans 3 champs naturellement infestés par *O. foetida* dans la région de Béja en Tunisie. Le comportement de la descendance M1 au champ prouve que l'induction de mutation génétique par l'exposition des graines de pois chiche à la DL₅₀ est efficace pour réduire significativement la sensibilité du pois chiche à *O. foetida*, spécifiquement chez les mutants 10 et 62 pour lesquels aucune émergence du parasite n'est observée à la date de la récolte (**Figure 17**). Même si les mécanismes impliqués dans la résistance ne peuvent pas être déterminés à partir de ces essais au champ, la réduction de l'infestation en raison d'une faible biomasse racinaire est peu probable chez les mutants, au vu des études menées en parallèle en serre sur l'effet des radiations sur la croissance du pois chiche (**Tableau 4**). En effet, le traitement ionisant ne montre pas d'impact significatif sur le développement racinaire. Notons que l'effet bénéfique de mutations induites par des rayonnements gamma a été également reporté chez le tournesol, confronté à l'espèce *O. cumana*, suite au traitement d'embryons zygotiques immatures (Encheva et al. 2003). Globalement, en plus d'une réduction significative de la sensibilité à l'orobanche, les mutants d'intérêt sélectionnés aux

champs présentent un rendement en graines (PMG) équivalent ou amélioré par rapport à celui des plantes issues de graines non irradiées (**Figure 18**). Bien que l'amélioration du rendement résulte principalement de la résistance accrue à l'orobanche, connaissant les effets néfastes du parasitisme sur la productivité des cultures, ces travaux doivent être complétés par une analyse des rendements grainiers dans des champs non infestés par l'orobanche. Par ailleurs, les résultats sur la sensibilité des plantes de la génération M1 à l'orobanche dans les champs infestés doivent être utilisés avec précaution, étant donné la variabilité probable de la distribution de graines d'orobanche dans les sols. Néanmoins, les forts degrés d'infestation enregistrés pour toutes les plantes témoins (graines non irradiées) suggère des niveaux d'infestation élevés et homogènes dans les champs sélectionnés pour cette étude. Ainsi, l'étude de la descendance M1 aux champs nous a permis de faire un criblage rapide d'un grand nombre de mutants vis-à-vis de la sensibilité à l'orobanche et du rendement grainier.

L'analyse des données ISSR a également confirmé l'induction, par le traitement des graines à une dose DL₅₀, d'une forte variation génétique entre la lignée parentale et les lignées mutantes d'intérêt (**Figure 19**), le coefficient de similarité génétique entre les individus M2 et les plantes témoins non irradiées variant de 0,02 à 0,94. En cohérence avec des études antérieures (Kumar et al. 2011 ; Mejri et al. 2012), cette étude confirme l'intérêt des ISSR en tant que marqueurs adaptés pour explorer la variabilité génétique induite par un rayonnement gamma. Dans les expériences de mutagenèse, le matériel traité doit être étudié au travers de plusieurs générations de semences pour l'analyse de la stabilité et la sélection de plants traités récessifs dans la deuxième (M2) ou troisième (M3) génération après traitement. La résistance devra également être vérifiée dans des conditions d'infestation artificielle, en pots ou mini-rhizotrons où l'inoculum est aisément contrôlable et modifiable. La puissance du ou des mécanismes de résistance induits pourra ainsi être évaluée.

En conclusion de ce premier chapitre, ces travaux démontrent que l'induction de mutations par un traitement ionisant (rayonnement gamma) est un outil efficace pour développer une variabilité génétique utile dans la sélection de nouvelles lignées de pois chiche résistantes à *O. foetida*. La stabilité de la résistance induite doit néanmoins être démontrée (descendances M2, M3) et les mécanismes de résistance induits étudiés (**chapitre 2**).

*Chapitre 2: Etude de la stabilité de la
résistance induite par mutagenèse dans les
descendances M2 et M3 et des mécanismes de
résistance sous-jacents*

1-Introduction

Dans plusieurs régions du monde, les plantes parasites sont parmi les bioagresseurs les plus destructeurs en agriculture. Les orobanches (*Orobanche spp.*) sont des plantes parasites dépourvues de chlorophylle (holoparasites) et, en effet, certaines espèces sont de redoutables plantes adventices parasites dans des agrosystèmes majeurs. En raison de leur dépendance totale vis-à-vis de leur plante hôte pour leur nutrition hydrique, minérale et organique, ces espèces causent de sévères pertes de rendement dans les grandes cultures, essentiellement dans les régions méditerranéennes, en Asie et Europe du Sud (Abang *et al.* 2007). En Tunisie, les espèces d'orobanche les plus nuisibles sont *O. crenata* et *O. foetida*. *O. crenata* signalée depuis l'Antiquité comme un fléau agronomique (Boeuf *et al.* 1905), parasite essentiellement la féverole (*Vicia faba*), le pois (*Pisum sativum*) et le pois chiche (*Cicer arietinum*), infligeant des pertes de rendement dramatiques de l'ordre de 80% sous de fortes infestations (Kharrat *et al.* 1992). L'adaptation de l'espèce *O. foetida* à des légumineuses cultivées est plus récente : connue en premier lieu comme parasite des légumineuses herbacées sauvages, les premières infestations de champs de féverole, de vesce et de pois-chiche ont été rapportées par Kharrat *et al.* (1992) dans la région de Bêjâ (Nord Ouest de la Tunisie). Aujourd'hui, la variété locale cv. Amdoun est parmi les variétés de pois chiche les plus sensibles à *O. foetida*.

Plusieurs méthodes de lutte (culturales, physiques, chimiques et biologiques) sont actuellement proposées pour contrôler l'extension de ce fléau, mais les succès restent très limités (Rubiales *et al.* 2003a,b; Abbes *et al.* 2010). La voie génétique demeure la solution la plus fiable et la sélection de variétés résistantes contre l'orobanche est la solution la plus privilégiée. La résistance et la tolérance à l'orobanche sont néanmoins des caractères rares parmi les cultivars proposés aux agriculteurs. Seules des résistances partielles et à faible niveau d'hérédité ont été identifiées chez les légumineuses (Rubiales *et al.* 2006; Pérez-de-Luque *et al.* 2009; Sillero *et al.* 2010). La résistance à l'orobanche semble avoir plusieurs composants qui agissent seuls ou en combinaison et à différents stades du processus infectieux (Rubiales 2003c). Une faible capacité stimulante des exsudats racinaires vis-à-vis de la germination des orobanches a été décrite chez des variétés résistantes de pois chiche, de fève, de lentille, de pois, de vesces et chez *Medicago truncatula* Gaertn (Rubiales *et al.* 2003c, 2004; Rodríguez Conde *et al.* 2004; Pérez-de-Luque *et al.* 2005a; Rubiales *et al.* 2005; Sillero *et al.* 2005; Fernández-Aparicio *et al.* 2008a, b; Abbes *et al.* 2009). Une fois les graines d'orobanche germées, des mécanismes de résistance complémentaires,

préhaustoriaux, peuvent être observés, tels que le renforcement, par réticulation des protéines, des parois cellulaires du cortex racinaire de l'hôte (Pérez-de-Luque et al. 2005b), et l'accumulation de composés phénoliques toxiques (Sauerborn et al. 2002; Perez-de-Luque et al. 2004). Ces mécanismes physiques et chimiques s'opposent à la progression de l'orobanche dans la racine hôte et ainsi à la différenciation de l'haustorium. Ainsi, la défense vis-à-vis de l'orobanche se traduit par une augmentation de l'activité d'enzymes de la voie des phénylpropanoïdes (phénylalanine ammonia-lyase, peroxydases et polyphénol-oxydase), (Goldwasser et al. 1999; Castillejo et al. 2004 ; Perez-de-luque et al. 2006 a, b).

Pour améliorer la résistance et créer de nouvelles variétés résistantes, l'induction de mutations, avec les rayonnements ionisants comme agents mutagènes, est une stratégie efficace pour augmenter la variabilité génétique (Maluszynski et al. 2009 ; Pushparajan et al. 2014; Ravichandran and Jayakumar 2014). Dans ce contexte, l'effet de doses croissantes de radiations gamma sur le développement du pois chiche (cv. Amdoun) en conditions contrôlées, ainsi que sur le rendement grainier et la sensibilité à l'orobanche sous infestation naturelle, a été précisé pour la première génération de mutants de pois chiche (M1) (premier chapitre, Brahmi et al. 2014). Ces travaux ont mis en relief une trentaine de lignées de mutants potentiellement intéressantes par leur sensibilité réduite à l'orobanche. Dans ce chapitre, le comportement de leurs générations successives M2 et M3 vis-à-vis d'*O. foetida* est précisé sous infestation artificielle (mini-rhizotrons et pots), afin d'évaluer l'héritabilité de la résistance induite et décrire les mécanismes de résistance mis en jeu. De potentiels marqueurs biochimiques de résistance, tels que le taux de composés phénoliques solubles et les capacités enzymatiques (PAL, PPO et POX) des racines, ont été mesurés chez le témoin irradié et les mutants sensibles et résistants (M3), en conditions de non infestation et d'infestation par *O. foetida*.

2-Matériel et méthodes

2-1-Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé pour cette étude correspond aux graines :

- du cv. Amdoun non irradié (témoin) et des mutants de pois chiche M2 et M3 issus des descendance successives des mutants M1 sélectionnés au champ pour leur résistance à *O. foetida* (**chapitre 1**). Les cultures ont été réalisées en pot sous serre pour la collecte des graines.
- d'*O. foetida* collectées en juin 2010 dans un champ de pois chiche infesté (région de Béja).

2-2- Méthodes

2-2-1- Germination des graines de pois chiche

Les graines de pois chiche sont stérilisées par un traitement à l'eau de Javel (2,4% Cl) pendant 5 min, et rincées 3 fois pendant 1 min puis 3 fois pendant 5 min à l'eau distillée stérile. Une fois stérilisées, les graines sont déposées en ligne sur un filtre en fibre de verre (Macherey-Nagel 85/90, Ø 125 mm) imbibé d'eau distillée stérile, dans une boîte de Pétri (Ø 150 mm), et mises à germer à l'obscurité à 25°C.

2-2-2- Stérilisation des graines d'orobanche

La stérilisation est effectuée, sous agitation vigoureuse, par immersion des graines dans de l'eau de javel (4,80% Cl, 5 minutes), suivie de 3 rinçages d'une minute et de 3 rinçages de 5 minutes dans de l'eau distillée stérile.

2-2-3- Conditionnement des graines d'orobanche *in vitro* et distribution en plaques

Les graines stérilisées d'orobanche sont placées en conditionnement en milieu liquide pendant 7 jours à l'obscurité à 21 °C (Lechat et *al.* 2012). Pour cela, les graines (150 mg) sont tout d'abord mises en suspension dans 15 mL d'eau puis distribuées en plaques 96 puits (à fond plat) (50 µL ≈ 125 graines par puits), par la suite scellées au parafilm. Après 4 jours de conditionnement, ces plaques sont disponibles pour des tests de germination avec les exsudats racinaires des mutants de pois chiche. Le conditionnement peut s'effectuer également directement dans un tube de 50 mL (150 mg de graines dans 15 mL d'eau distillée) pour l'inoculation ultérieure des racines de pois chiche en systèmes mini-rhizotrons.



Figure 20 : Système double pot de culture sur billes de verre pour la collecte des exsudats racinaires de pois chiche

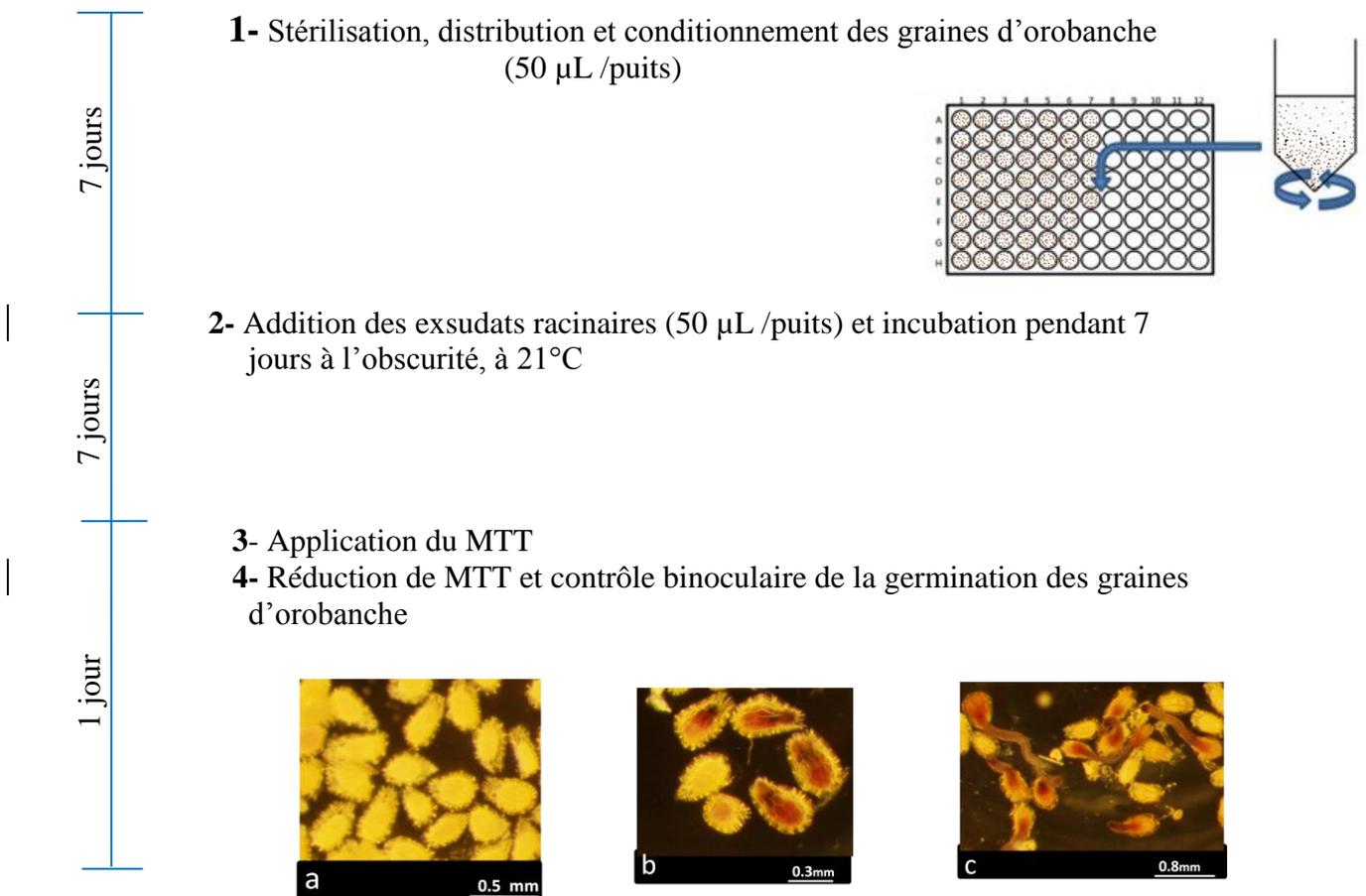


Figure 21: Test de germination des graines d'orobanche par la réduction du MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) (Pouvreau et al. 2013)

a : graines non germées d'*O. foetida*; **b, c** : graines germées d'*O. foetida* respectivement après 8 et 14 jours

2-2-4- Culture sur billes de verre, récolte des exsudats racinaires et tests de germination

Après germination en boîte de Pétri, les jeunes plantes âgées de 7 jours sont délicatement transférées dans des pots en plastique contenant chacun 1 kg de billes de verre (mélange de billes de diamètre 2 et 3 mm; 4 plantes/pot ; **Figure 20**), placées en chambre de culture (21°C - 15°C jour/nuit, héméroperiode de 16h, PAR 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), et reçoivent une solution nutritive Coïc 50% (v/v) une fois par semaine (**Tableau 2**). Les exsudats racinaires sont collectés chaque semaine pendant 8 semaines par percolation avec 50 mL d'eau distillée (système de double pot), et stérilisés par filtration sur membrane (Analytapore 0,2 μm).

L'activité stimulante des exsudats racinaires vis-à-vis de la germination d'*O. foetida* est évaluée en plaque 96 puits par comptage des graines germées/ non germées (Pouvreau *et al.* 2013, **Figure 18**).

Les résultats représentent une moyenne d'au moins 3 bouquets de 4 plantes par génotype témoin et mutant (n=3). Pour chaque échantillon, 3 répétitions techniques sont réalisées.

2-2-5- Co-culture en mini-rhizotron

Les jeunes plantes de pois chiche âgées de 7 jours sont transférées en boîte de Petri carrée (120 x 120 mm, Nunc Lab-Tek™), préalablement percée dans leur partie haute pour le développement de la partie aérienne des plants et l'alimentation hydrominérale hebdomadaire (**Figure 22**). Le système racinaire des jeunes plants est déposé délicatement sur un filtre en fibre de verre stérile (120 x 120 mm, Macherey- Nagel) recouvrant une couche de laine de roche préalablement imbibée avec du milieu de culture. Chaque mini-rhizotron comporte deux plantes réparties de façon homogène, et est recouvert de papier aluminium avant d'être disposé verticalement dans un bac en chambre de culture (21°C- 15°C jour/nuit, héméroperiode de 16h, 200 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$, HR 70%). L'inoculation des racines est réalisée 14 jours après le transfert des jeunes plants avec 20 mg de graines conditionnées d'*O. foetida*.

Le taux de germination des graines d'orobanche à proximité des racines est déterminé à 14, 21, 28, 35, 42 et 49 jours après inoculation (JAI). Le pourcentage de germination est déterminé par le dénombrement, sur la surface totale du mini-rhizotron, des graines germées et non germées à proximité des racines de pois chiche (grille de carrés de 1 cm^2 , microscope Olympus Optical, Tokyo, Japan).

Le processus infectieux est suivi pendant 8 semaines par le dénombrement hebdomadaire des différents stades de développement de l'orobanche, selon la classification décrite par

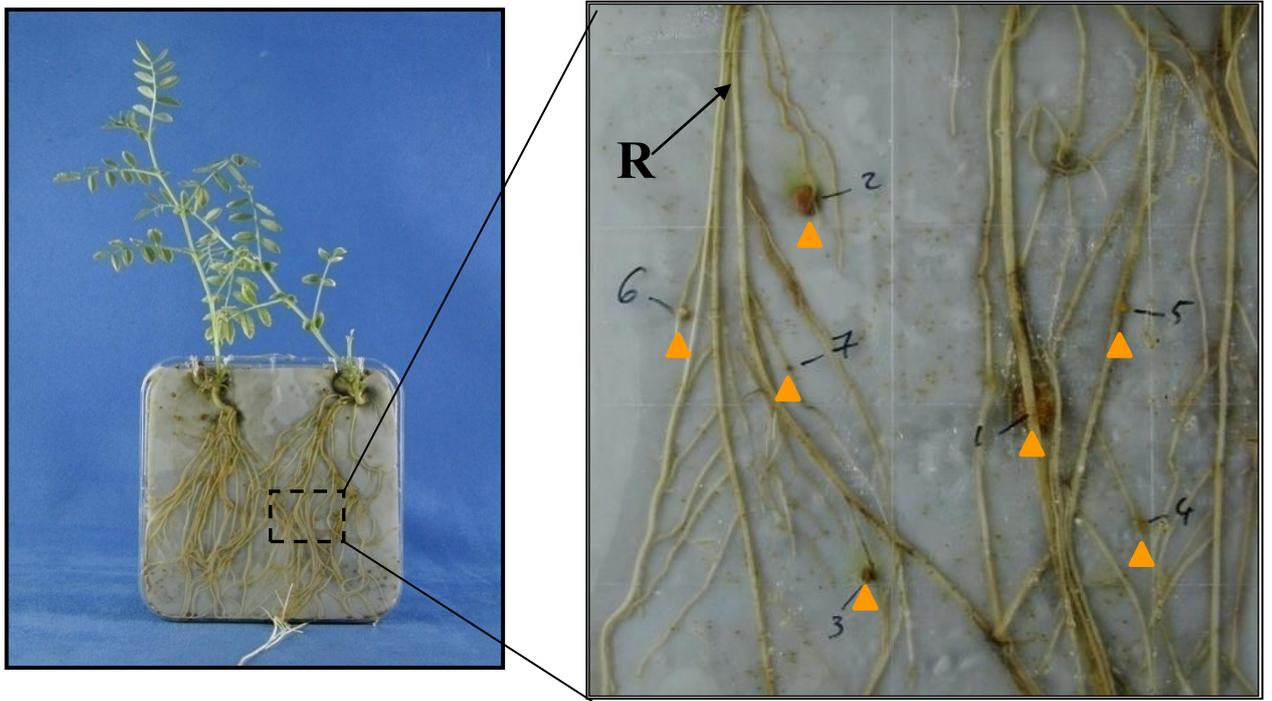


Figure 22 : Co-culture de l'association Pois chiche - *Orobanche. foetida* en mini-rhizotron

R : racine de pois chiche ; **▲**: Orobanches fixées (tubercules)

Labrousse *et al.* (2001) : **Stade 1** (pré-haustorial) : graine d'orobanche germée dont la radicule adhère à la surface de la racine hôte ; **stade 2** : orobanche fixée, formant un petit tubercule (stade « tête d'épingle ») ; **stade 3** (post-haustorial): formation de nombreuses racines adventives sur le tubercule (stade « araignée ») ; **stade 4** (post-haustorial): réveil du bourgeon apical et formation de la tige souterraine (pas de fleurs visibles); **stade 5** (post-haustorial): hampe florale développée (correspond au stade post-émergence pour des cultures en pots). Après 8 semaines de co-culture, les racines des plantes de pois chiche sont récoltées, « débarrassées » des orobanches, séchées 12h à 80°C puis pesées. Le nombre total d'orobanches fixées peut ainsi rapporté à la masse sèche des racines pour une comparaison entre les lignées sauvage et mutantes.

Les résultats représentent une moyenne de 3 mini-rhizotrons par mutant (n=3).

2-2-6- Co-culture en pots

L'interaction des mutants de pois chiche (générations M2 et M3) avec *O. foetida* est également étudiée en pot sous serre, pour se rapprocher des conditions de plein champ. Seuls les mutants d'intérêt, présentant une activité stimulante réduite par rapport au témoin non irradié (tests en plaques de l'activité des exsudats racinaires), sont sélectionnés pour ces co-cultures. Les graines d'orobanche (50 mg) sont mixées dans un mélange tourbe-sable-argile (1-1-1) dans un pot de 1,3L. Le conditionnement des graines d'orobanche est effectué par arrosage puis recouvrement des pots par une bâche opaque pendant une semaine à 23°C.

Les graines de pois chiche sont mises à germer dans des boîtes de Pétri (Ø 150 mm). Les jeunes plantes âgées de 7 jours sont ensuite repiquées délicatement dans les pots contenant le mélange de culture infesté de graines d'orobanche. Après 3 mois de culture en serre, les plantes sont dépotées et leur système racinaire nettoyé, « débarrassé » des orobanches, puis séché à 80°C. Les orobanches sont dénombrées et phénotypées (stades de développement, Labrousse *et al.* 2001). Le nombre total d'orobanches fixées est exprimé par rapport à la masse de matière sèche racinaire. Tout au long de la culture, la date des premières émergences de hampes florales et leur nombre sont annotés.

Les résultats représentent une moyenne d'au moins 10 pots par mutant.

2-2-7- Activités d'enzymes de défense chez les mutants (M3) de pois chiche

a-Extraction des protéines solubles

L'extraction des protéines est effectuée à partir de 500 mg de MF de racines broyées dans l'azote liquide. La poudre est suspendue dans 3 mL de tampon Tris HCl 25 mM (pH 8,8) (p/v ; 1/1). Le broyat est centrifugé à 13500 g pendant 20 min à 4 °C (Kar and Mishra 1976). Le surnageant (extrait brut) est utilisé pour le dosage des PAL.

D'autre part, 500 mg des racines sont broyées sur glace en présence de 2 mL de tampon Phosphate 10 mM (pH 6; p/v : 1/1). L'homogénat est centrifugé à 12000 g pendant 20 min à 4°C. Le surnageant (extrait brut) sert à la détermination des activités peroxydase et polyphénol-oxydase (POX et PPO ; Urbanek *et al.* 1991)

b- Dosages des protéines totales

Le dosage des protéines totales est réalisé selon la méthode de Bradford (1976), en utilisant une gamme étalon de BSA (Bovine Serum Albumin) allant de 2 µg/mL à 10 µg / mL. Dix µL d'extrait protéique sont ajoutés à 490 µL d'eau MilliQ et 500 µL de réactif de Bradford. Après 5 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 595 nm.

c- Dosage de l'activité peroxydase (POX)

L'activité POX (gaïacol peroxydase) est mesurée selon la technique décrite par Urbanek *et al.* (1991), en utilisant le gaïacol comme donneur d'hydrogène. Le mélange réactionnel est composé de 25 µL d'extrait brut suspendu dans 2 mL d'une solution de tampon phosphate (pH 5,2) et 20 mM de gaïacol. La réaction est initiée par l'addition de 0,03% d'eau oxygénée préparée extemporanément. Le mélange réactionnel est incubé pendant 5 min à 30°C. L'activité peroxydase est exprimée en U / mg de protéines.

d- Dosage de l'activité phénylalanine ammonia lyase (PAL)

Le dosage est réalisé selon la technique utilisée par Chen *et al.* (2000). Le milieu réactionnel contient l'extrait brut (100 µL), 900 µL de 6 µM de L – phénylalanine. Le mélange a été ensuite placé dans un bain marie à 37°C pendant 70 min. L'activité PAL est exprimée en µmoles d'acide cinnamique/ h/ mg de protéines.

e- Dosage de l'activité PolyPhénol-Oxydase (PPO)

L'activité PPO est mesurée selon la méthode décrite par Chen *et al.* (2000), avec des modifications mineures. Le mélange réactionnel contient 700 µL de tampon phosphate 0,1 M pH 7, 10 µL d'extrait brut et 200 µL de catéchol 0,20 M. La réaction, initiée par l'addition de l'extrait brut, est suivie spectrophotométriquement pendant trois minutes à 420 nm. Les résultats sont exprimés en DO / minute/ µg de protéines.

Les résultats, pour l'ensemble des essais enzymatiques, représentent une moyenne d'au moins trois extractions indépendantes.

2-2-8- Analyse biochimique : teneur en composés phénoliques chez les mutants (M3) de pois chiche

Le prélèvement des racines des mutants M3 d'intérêt est réalisée tous les 7 jours après inoculation par les graines conditionnées *O. foetida* (systèmes mini-rhizotrons). Les racines (0,5 g MF) sont broyées dans l'azote liquide et la poudre est suspendue dans 5 mL de méthanol 80% (v/v). Le broyat est centrifugé à 14000 g pendant 15 min. Le surnageant est récupéré pour l'estimation des teneurs en phénols solubles en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA). Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur (stabilisée par l'addition de carbonate de sodium) est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés. Ainsi, à 50 µL de l'extrait racinaire sont ajoutés 2,20 mL d'eau distillée et 250 µL de réactif de Folin. Après 3 min sous légère agitation, 500 µL de carbonate de sodium 20% sont ajoutés. Après agitation et incubation à 40°C pendant 30 min, la teneur en composés phénoliques est mesurée par spectrophotométrie à 760 nm. En utilisant une gamme étalon de catéchine (0 mg/ml ; 0,25 mg/ml ; 0,50 mg/ml ; 0,75 mg/ml et 1 mg/ml), les teneurs en phénols sont exprimées en milligrammes d'équivalents catéchine par g de matière fraîche. Les résultats représentent une moyenne d'au moins trois extractions indépendantes.

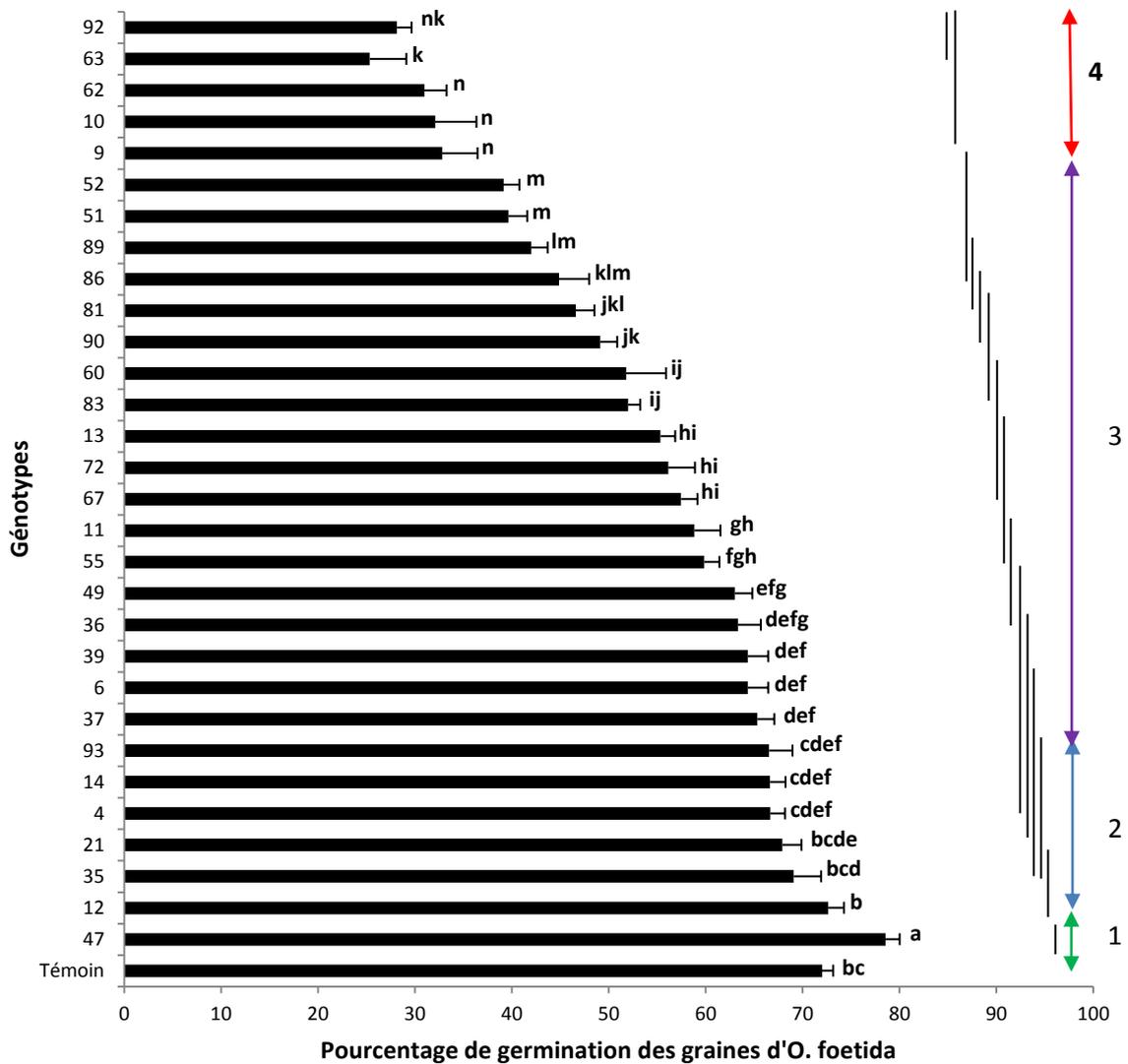


Figure 23: Capacité stimulante maximale des exsudats racinaires de la variété contrôle (non irradiée) et des mutants M2 vis-à-vis de la germination des graines d'*O. foetida* (culture sur billes de verre)

Les valeurs présentées sont les moyennes de 3 répétitions \pm Intervalles de Confiance. Les valeurs portant une lettre différente sont statistiquement différentes (ANOVA Fisher LSD test, $\alpha=0,05$).

3-Résultats

3-1-Etude de la génération M2

3-1-1-Pouvoir stimulant des exsudats racinaires des mutants M2 de pois chiche

Après une période de conditionnement, les graines d'orobanche germent en réponse à des signaux exsudés par les racines de la plante hôte. La capacité de la variété parentale cv. Amdoun (contrôle) et des 30 mutants M2 d'intérêt à stimuler la germination des graines d'*O. foetida* a été estimée suite à la collecte hebdomadaire de leurs exsudats racinaires sur une période de 7 semaines (cultures sur billes de verre).

La cinétique d'exsudation de l'activité stimulante (**Annexe 3**) montre qu'une activité élicitrice est détectable pour la lignée témoin et plusieurs mutants M2 dès 14 jours après transfert sur billes de verre. Pour la lignée témoin, la capacité stimulante des exsudats racinaires est maximale après 35 jours de transfert ($72,02 \pm 1,14\%$ de graines germées) puis diminue progressivement. Tous les mutants, à l'exception des lignées 11, 72, 13 et 89 présentent une cinétique d'exsudation semblable à celle du témoin, avec une capacité maximale de stimulation de la germination des graines d'orobanche 35 jours après transfert. Néanmoins, une forte variabilité de la capacité stimulante des exsudats racinaires est observée parmi les mutants M2, qui se répartissent en 4 groupes (**Figure 20**) : le premier groupe est constitué uniquement du mutant 47, qui a une capacité stimulante maximale (à 35 jours) significativement plus importante que celle de la lignée parentale témoin. Le second groupe est composé des mutants 12, 35, 21, 4, 14 et 93 qui présentent un pouvoir stimulant semblable à celui de la lignée témoin. Le troisième groupe comporte 18 mutants (37, 6, 39, 36, 49, 55, 11, 67, 72, 13, 83, 60, 90, 81, 86, 89, 51 et 52) dont la capacité élicitrice maximale (de 39% à 65% de graines germées) est significativement plus faible que celle de la variété témoin. Le quatrième et dernier groupe est constitué des 5 mutants (9, 10, 62, 63 et 92) les moins stimulants (de 25% à 33% de graines germées). Il est à signaler qu'en absence d'exsudats racinaires (eau distillée stérile en témoin négatif), les graines d'*O. foetida* ne germent pas (**Annexe 3**).

Ces premiers résultats montrent que les mutations induites par l'irradiation des graines M0 (DL_{50} , 150 Gy) se traduisent dans la génération M2 par une altération de la capacité à stimuler la germination des graines d'*O. foetida* chez un grand nombre de mutants. A ce stade des travaux, il est difficile de comprendre l'origine de cette altération, une réduction de la production et/ou de l'exsudation de molécules stimulantes, ou au contraire une augmentation

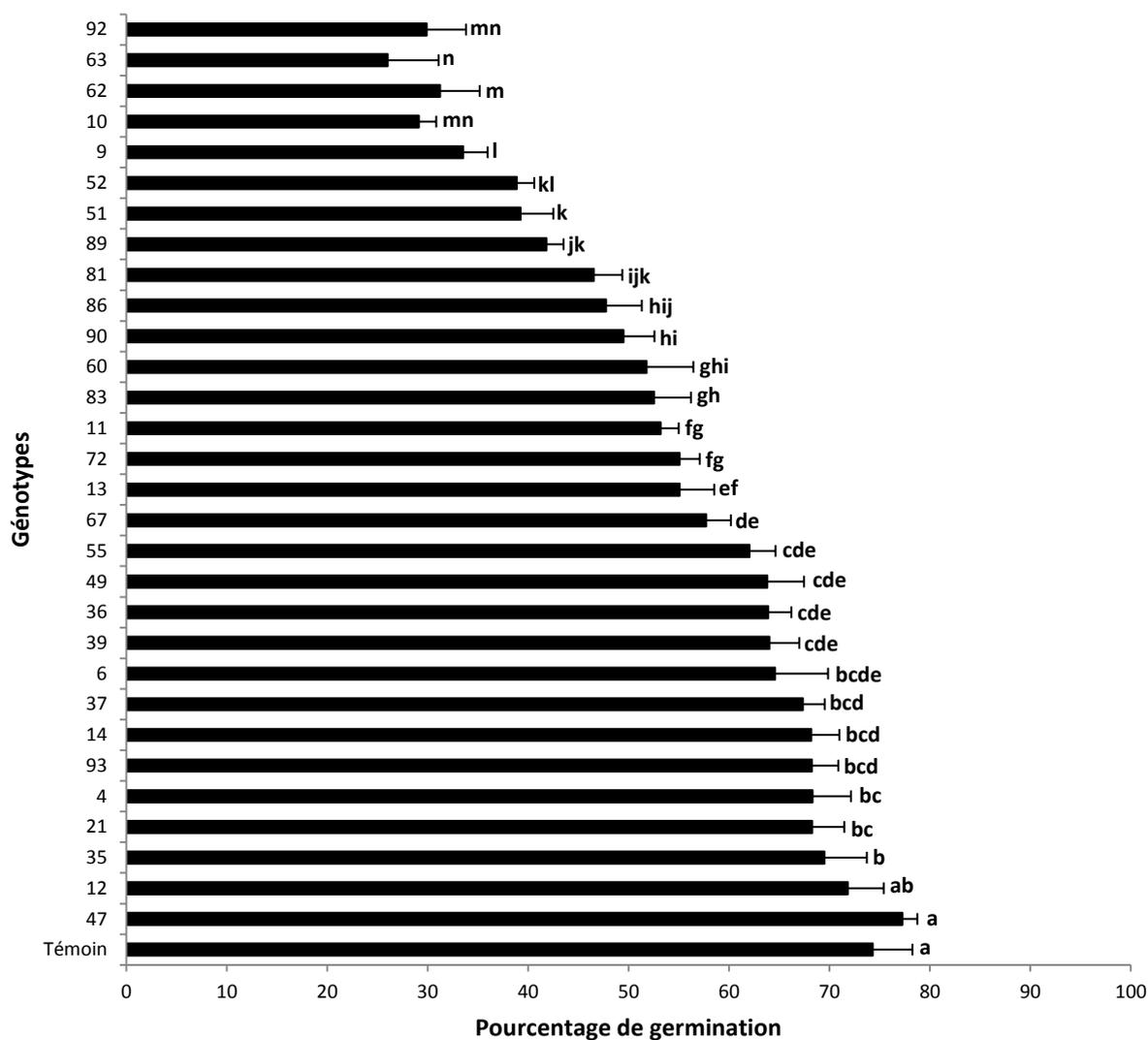


Figure 24 : Capacité stimulante maximale des exsudats racinaires de la variété témoin (non irradiée) et des mutants M2 vis-à-vis de la germination des graines d'*O. foetida* (système mini-rhizotron).

Les valeurs présentées sont les moyennes de 3 répétitions \pm Intervalles de Confiance. Les valeurs portant une lettre différente sont statistiquement différentes (ANOVA Fisher LSD test, $\alpha=0,05$).

de la production et/ou de l'exsudation de molécules inhibitrices pouvant être envisagée. L'activité des exsudats racinaires (volume récolté 50 mL) peut être aussi dépendante de la surface racinaire d'exsudation ou de la biomasse racinaire. L'évolution de celle-ci n'a pas été déterminée au cours de la cinétique d'exsudation du témoin et des mutants. Néanmoins, il est peu probable que la faible capacité élicitrice des mutants les plus affectés s'explique par une croissance racinaire réduite. En effet, une telle réduction n'a pas été observée dans cette étude (culture sur billes de verre), ni lors de travaux antérieurs (sur la génération M1, culture en pots, **chapitre 1**, Brahmi *et al.* 2014).

3-1-2-Co-cultures en système mini-rhizotron

L'utilisation du système mini-rhizotron a permis de décrire de manière plus précise l'interaction entre les différents mutants M2 et *O. foetida*, depuis l'induction de la germination des graines du parasite dans la rhizosphère jusqu'au développement des hampes florales, caractéristique d'une interaction compatible.

a- Cinétique de germination des graines d'orobanche

Les cinétiques de germination des graines d'*O. foetida* à proximité des racines (± 1 cm) montrent une induction de la germination aux alentours du 14^{ème} jour JAI (**Annexe 4**) pour le témoin et la majorité des mutants, et un taux maximum de graines germées à partir du 35^{ème} JAI. Comme observé lors des tests d'activités des exsudats racinaires, une forte variabilité est observée chez les mutants concernant la capacité à stimuler la germination des graines d'orobanche en système mini-rhizotron (**Figure 24**). L'étude statistique du pouvoir stimulant maximal des exsudats racinaires des mutants et du contrôle non-irradié a engendré une répartition des mutants en 3 groupes (Anova, $\alpha=0,05$): un premier groupe de mutants (2 mutants) dont la capacité stimulante est statistiquement équivalente à celle du témoin ; un second groupe comportant la majorité des mutants (23/30 mutants) avec un pouvoir stimulant plus faible que celui du contrôle (de 39% à 69,50% de graines germées) ; et un troisième et dernier groupe constitué de 5 mutants (9, 10, 62, 63 et 92) à activité stimulante extrêmement réduite (de 26% à 33% de graines germées).

b-Cinétique de développement des tubercules d'orobanche

Une variabilité est également observée parmi les mutants M2 concernant le nombre d'orobanches fixées sur les racines en fin de culture (**Figure 25**). Les mutants se répartissent en 3 groupes (Anova, $\alpha=0,05$) : un premier groupe constitué de 9 mutants, avec un nombre

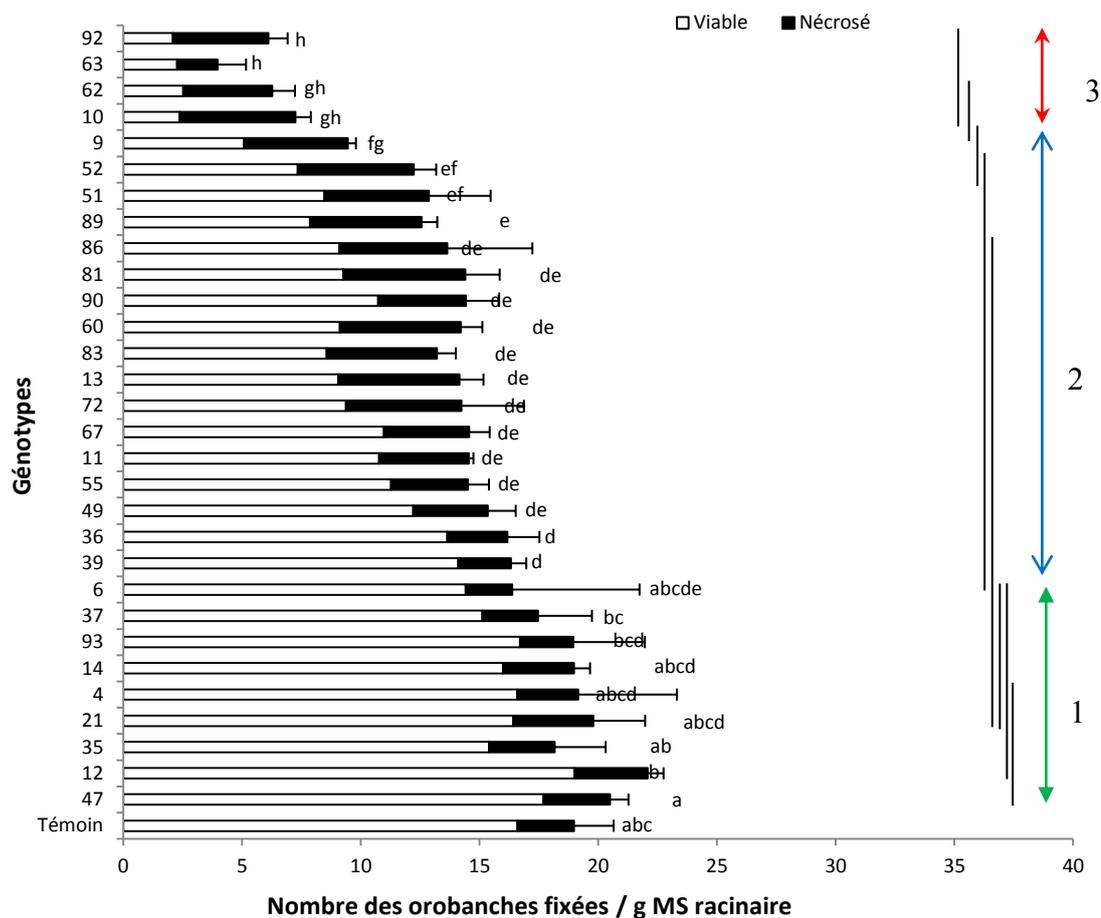


Figure 25: Nombre total d'orobanches fixées / g de matière sèche racinaire de Pois chiche (viables et nécrosées) (à 56 JAI, système mini-rhizotron).

Les valeurs présentées sont les moyennes de 3 répétitions ± Intervalles de Confiance (ANOVA Fisher LSD test, $\alpha=0,05$).

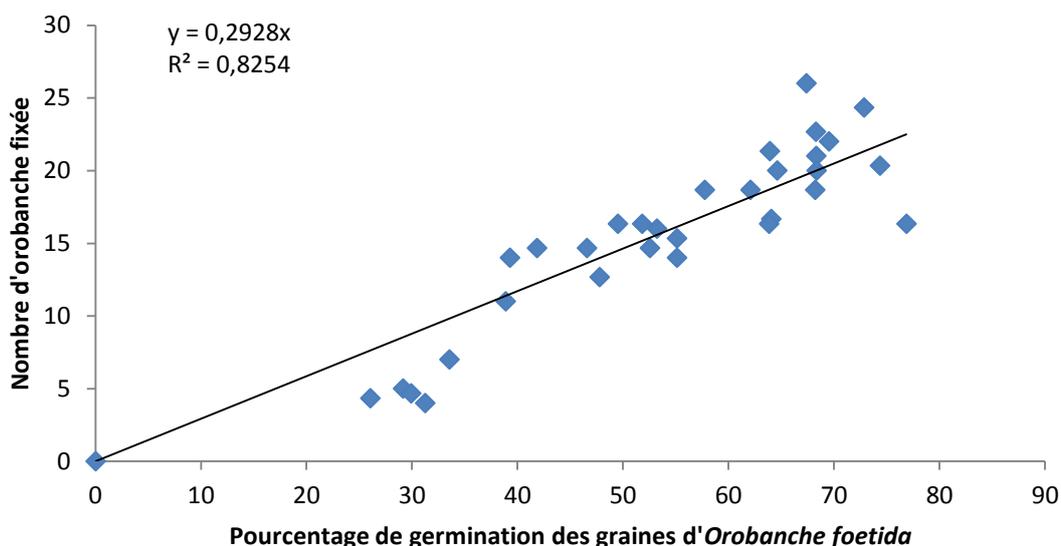


Figure 26 : Corrélation entre la stimulation maximale de germination par des génotypes de Pois chiche (témoin non irradié et mutants) et le nombre maximum d'orobanches fixées (système mini-rhizotron)

maximum d'orobanches fixées équivalent à celui du témoin ; un second groupe de 16 mutants avec un nombre maximum d'orobanches fixées significativement inférieur à celui du témoin ; et un troisième groupe renfermant les cinq mutants (9, 10, 62, 63 et 92) qui portent un nombre maximum d'orobanches très nettement inférieur au témoin. Il est intéressant de noter que cette variabilité résulte de celle observée pour la capacité à stimuler la germination des graines d'orobanche, comme l'atteste la corrélation positive observée entre ces deux paramètres ($R^2 = 0,82$; **Figure 26**).

Le nombre maximum d'orobanches fixées ne renseigne ni sur la cinétique de développement du parasite en post-fixation, ni sur la capacité de la plante hôte à induire la nécrose du parasite. La cinétique a été suivie pendant 56 JAI (**Annexe 5**). Sur le génotype témoin, les premières orobanches fixées sont visibles dès 14 JAI et le nombre maximum d'orobanches fixées est atteint 21 jours après (35 JAI, ≈ 24 orobanches). Dans ce système de culture, environ 50% et 71% des orobanches fixées sur le génotype témoin atteignent un stade de développement avancé (stades 4 et 5) au 49^{ième} et 56^{ième} JAI, respectivement. Une cinétique de développement semblable est observée pour la très grande majorité des mutants, avec néanmoins un léger retard de développement décelable temporairement entre le 21^{ième} et le 42^{ième} JAI. Des cinétiques de développement particulières caractérisent les cinq mutants 9, 10, 62, 63 et 92 (**Annexe 5**). Le nombre maximum d'orobanches fixées est atteint à un stade tardif (de 35 à 49 JAI selon le mutant). De plus, les orobanches fixées se développent très lentement, comme l'atteste le faible pourcentage d'orobanches ayant atteint un stade de développement avancé (stade 4) au 56^{ième} JAI (de 0% à 24% selon le mutant). Ces orobanches ont par ailleurs un phénotype anormal (développement altéré de la tige ; **Annexe 7**). Sur ces mutants, 50% des orobanches sont restées au stade 1 et ont péri (**Annexe 6 ; Figure 22 ; Annexe 5**). Des orobanches nécrosées sont également observées sur les autres génotypes, y compris sur le témoin, mais en proportions nettement inférieures. On distingue à ce sujet deux groupes distincts : Pour le premier groupe, le nombre d'orobanches nécrosées varie de 2 à 3 orobanches fixées / g MS racinaire et se compose de 11 génotypes (le contrôle non irradié et 10 mutants) ; le second groupe est composé de 20 mutants où le nombre varie de 3 à 5 orobanches nécrosées / g MS racinaire.

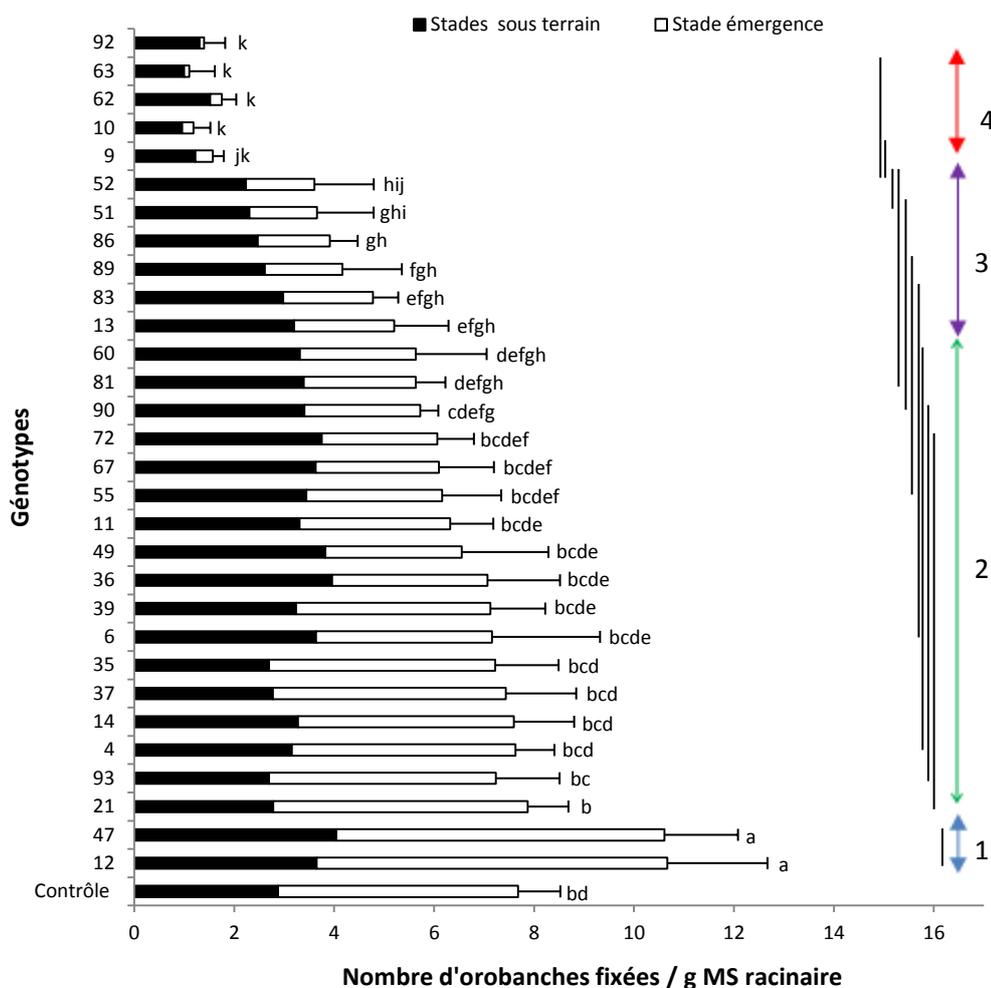


Figure 27 : Nombre total d’orobanches fixées / g MS racinaire en pots (cultures en pot, plantes hôtes âgées de 90 jours).

Les valeurs présentées sont les moyennes de 6 répétitions ± Intervalles de Confiance (ANOVA Fisher LSD test, $\alpha=0,05$).



Figure 28 : Phénotypes des orobanches parasitant la variété témoin non irradiée (a) et les mutants résistants de la M2 d’intérêt (groupes 3 et 4 ; b, c, d et e) en fin de culture en pots.

Les orobanches fixées (b, c, d et e) sont à un stade de développement souterrain.

Les cultures de l'interaction hôte-parasite en mini-rhizotron ont révélé l'expression de différentes composantes de résistance induites par radiomutagenèse dans la génération M2, telles qu'une capacité réduite à stimuler la germination des graines d'*O. foetida* dans la rhizosphère et une incompatibilité à assurer le développement en post-fixation (ralentissement, induction de nécrose). Il est difficile néanmoins en système mini-rhizotron d'étudier l'interaction sur de longues périodes (au-delà de 56 JAI). Ce système de culture ne permet donc pas de savoir si l'interaction hôte-parasite est compatible pour ces mutants, c'est-à-dire si les quelques orobanches qui se fixent et se développent lentement réussissent à produire des graines.

3-1-3-Culture de l'interaction Orobanche-pois chiche (mutants et témoin) en pots

Cette étude a été menée en pots, sous serre, pour l'ensemble des mutants M2. A l'instar des cultures en mini-rhizotrons, 4 groupes de génotypes se dessinent suivant le nombre d'orobanches fixées en fin de culture (**Figure 27**) : le premier groupe se compose de 2 mutants (12 et 47) qui présentent le nombre le plus élevé d'orobanches fixées / g de matière sèche racinaire après 90 jours de culture ; le second groupe est composé de 17 mutants dont le nombre maximum d'orobanches fixées est statistiquement équivalent à celui du témoin ; le troisième groupe est constitué de 6 mutants (13, 83, 89, 86, 51 et 52) dont le nombre maximum d'orobanches fixées est significativement inférieur à celui du témoin ; le dernier groupe est composé de 5 mutants (9, 10, 62, 63 et 92) très peu parasités par rapport au témoin (moins de 2 orobanches par g MS racinaire), avec une sensibilité à *O. foetida* réduite d'un facteur 4 à 7 selon le mutant.

La proportion d'orobanches émergées par g MS racinaire en fin de culture est importante pour la lignée parentale (contrôle) et 7 mutants (de 37% à 62%.) (**Figure 27**). Pour les autres mutants, cette proportion est significativement réduite, notamment pour les 5 mutants (9, 10, 62, 63 et 92), de 4% à 20% des orobanches fixées.

Par ailleurs, un phénotype anormal est observé pour les orobanches fixées sur les racines des mutants résistants d'intérêt (3^{ième} et 4^{ième} groupe), qui se manifeste par un blocage de développement de la tige et une floraison souterraine (**Figure 28**).

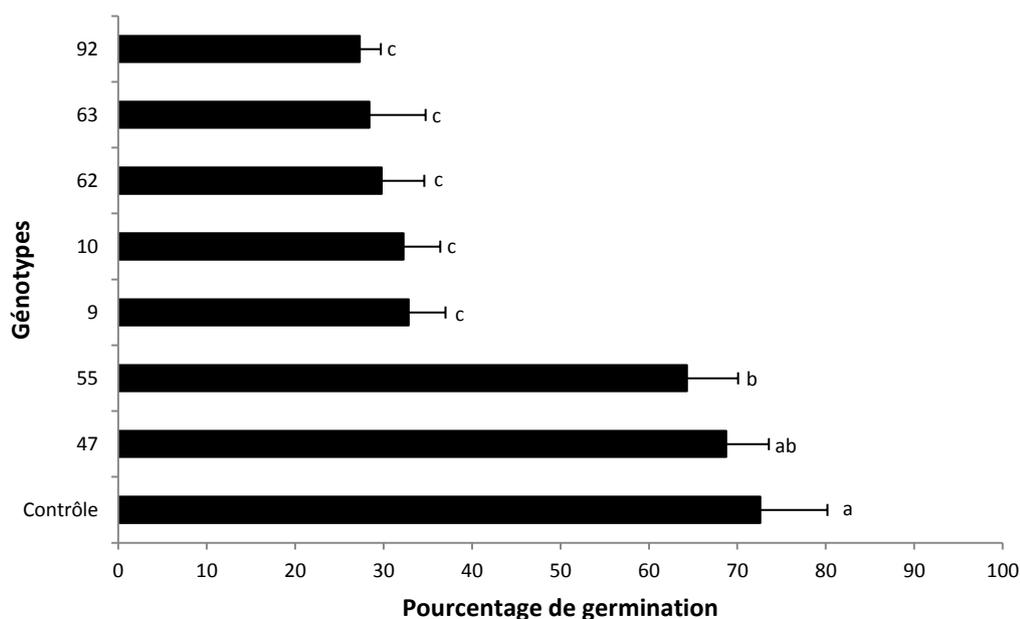


Figure 29 : Capacité stimulante maximale des exsudats racinaires de la variété témoin non irradiée et des mutants M3 vis-à-vis de la germination des graines d'*O. foetida*.

Les valeurs présentées sont les moyennes de 3 répétitions \pm Intervalles de Confiance. Les valeurs portant une lettre différente sont statistiquement différentes (ANOVA Fisher LSD test, $\alpha=0,05$).

Tableau 6: Taux de germination maximal des graines d'*Orobanche foetida* à proximité des racines de la variété témoin et des mutants d'intérêt M3 de pois chiche (système mini-rhizotron).

Les valeurs présentées sont les moyennes de 3 répétitions \pm Intervalle de confiance (ANOVA Fisher LSD test, $\alpha=0,05$)

Génotype	% de germination
Contrôle	67,46 \pm 5,97 ^a
47	64,73 \pm 2,60 ^a
55	63,4 \pm 6,79 ^a
9	32,57 \pm 4,02 ^b
10	33,00 \pm 4,14 ^b
62	27,33 \pm 3,25 ^{bc}
63	24,83 \pm 3,58 ^c
92	22,97 \pm 4,25 ^c

3-2-Etude de la M3

En se basant sur les résultats obtenus à partir de la génération M2, cinq lignées de mutants (9, 10, 62, 63 et 92) ont été sélectionnées pour ces analyses, en plus de la variété témoin non irradiée. Ces travaux ont pour objectif de confirmer ou d'infirmer l'héritabilité des composantes de résistance induites par radiomutagenèse des graines M0. Deux autres lignées de mutants ont été également étudiées en génération M3 : les lignées 47 et 55, aussi sensibles à *O. foetida* que le génotype témoin non irradié.

3-2-1-Test du pouvoir stimulant des exsudats racinaires

Les graines d'orobanche préalablement conditionnées sont mises en contact avec les exsudats racinaires des 7 mutants étudiés (récolte hebdomadaire). La germination des graines d'orobanche atteint son maximum en présence d'exsudats racinaires de plantes âgées de 35 jours après transfert (**Annexe 8**). Les résultats montrent une situation très contrastée, avec un groupe très stimulant (génotypes sensibles : témoin, mutants 47 et 55), et un deuxième groupe dont la capacité stimulante est nettement inférieure (de 27% à 33% de graines germées) et correspondant aux cinq mutants résistants d'intérêt (**Figure 29**).

3-2-2- Co-cultures en système mini-rhizotron

a- Pouvoir stimulant de la germination des graines d'orobanche

En système mini-rhizotron, les huit génotypes étudiés se rangent également en 2 groupes selon leur capacité à induire la germination des graines d'orobanche : un premier groupe avec la variété témoin non irradiée et les mutants 47 et 55 dont la capacité à stimuler la germination des graines d'orobanches est de l'ordre de 63% à 67% (**Tableau 6**), les 5 mutants résistants d'intérêt composent le second groupe avec un pouvoir stimulant sensiblement affecté.

b- Cinétique de développement des orobanches

La cinétique du développement des orobanches sur les racines de la lignée témoin et des mutants M3 a été suivie sur 56 jours de culture en mini-rhizotron (**Annexe 9**). Deux groupes se distinguent nettement. Le premier groupe est composé de la variété témoin non irradiée et des mutants sensibles 47 et 55. Ces génotypes sont parasités précocement (stade 1 dès 14 JAI). Leurs sensibilités respectives à l'orobanche sont équivalentes, avec un maximum de 20

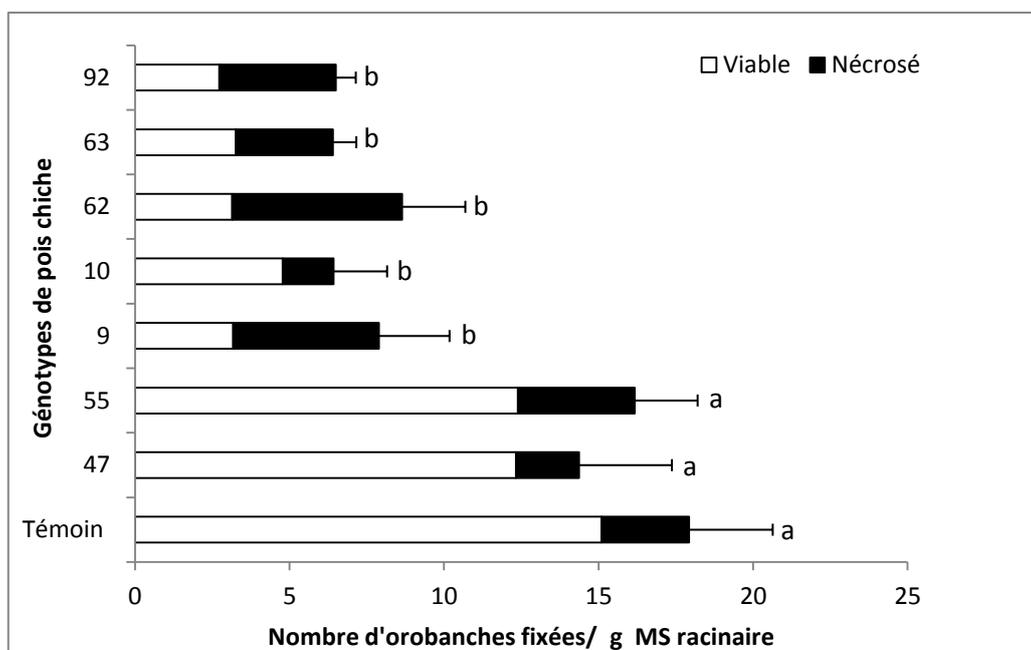


Figure 30: Nombre maximum d'orobanches fixées / gramme MS racinaire de la variété témoin non irradiée et des mutants M3 d'intérêt (à 56 JAI, système mini-rhizotron).

Les valeurs présentées sont les moyennes de 3 répétitions \pm Intervalles de Confiance (Anova Fisher LSD test, $\alpha=0,05$)

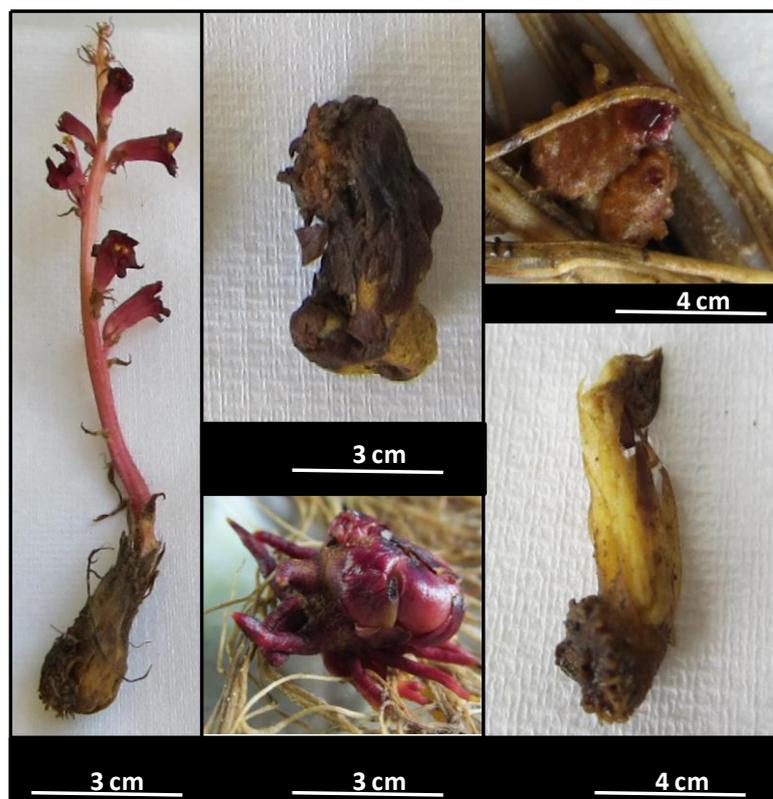


Figure 31 : Phénotypes des orobanches (*O. foetida*) parasitants la variété témoin non irradiée (a) et les mutants M3 résistants au 56^{ième} JAI en système mini-rhizotron.

à 22 orobanches fixées à 28-35 JAI, dont la majorité (environ 70%) atteint un stade de développement avancé à 56 JAI (stades 4 et 5, **Annexe 9**). Le nombre maximum d'orobanches sur les racines du second groupe de mutants (9, 10, 62, 63 et 92) est environ 3 fois plus faible et le développement des orobanches y est plus tardif : les premiers stades 1 sont observés à 21 JAI sur les mutants 9 et 92 et à 28 JAI sur les mutants 10, 62 et 63, soit de 7 à 14 jours plus tard que sur les génotypes sensibles du 1^{er} groupe. Aucun stade 5 (hampe florale) n'est observé à 56 JAI (**Annexe 9**). A cette date très tardive, les orobanches fixées aux racines des mutants 9 et 63 ne sont encore qu'à un jeune stade de développement (1-3). Bien que ralentie, la cinétique de développement des orobanches semble moins affectée sur les racines des mutants 10, 62 et 92. En effet, environ 10% des orobanches fixées ont atteint le stade 4 à 56 JAI.

De plus, le phénotype des orobanches parasitant les mutants résistants du second groupe est anormal, traduisant un développement perturbé de la tige (**Figure 31**).

3-2-3- Culture en pot de l'interaction orobanche-pois chiche (témoin et mutants M3)

Il est intéressant de noter que, comme pour le système mini-rhizotron, deux groupes de génotypes se distinguent sur l'index « nombre d'orobanches fixées » en fin de co-culture en pot. Ainsi, les sensibilités respectives à *O. foetida* de la variété témoin non irradiée et des mutants sensibles 55 et 47 sont équivalentes, avec 7 à 10 orobanches fixées par g MS de racines en fin de culture. Pour ces trois génotypes, les premières orobanches émergent hors du sol dès le 53^{ième} jour de culture. En fin de culture, les orobanches émergées représentent de 39 à 69% des orobanches fixées selon le génotype. Les 5 autres mutants M3 (second groupe, 9, 10, 62, 63 et 92) présentent un degré de sensibilité nettement plus faible, avec moins de 2 orobanches fixées par g MS racinaire en fin de culture. Par ailleurs, l'émergence des orobanches fixées sur les mutants résistants du second groupe est plus rare et plus tardive, soit après 73 jours et 81.5 jours de culture pour les mutants 10 et 92, respectivement. Aucune émergence n'est observée en fin de culture sur les mutants 9, 62 et 63. Sur ces mutants résistants (**Figure 32**), les orobanches fixées ont un phénotype anormal, avec un développement altéré de la tige et une floraison souterraine (**Figure 33**).

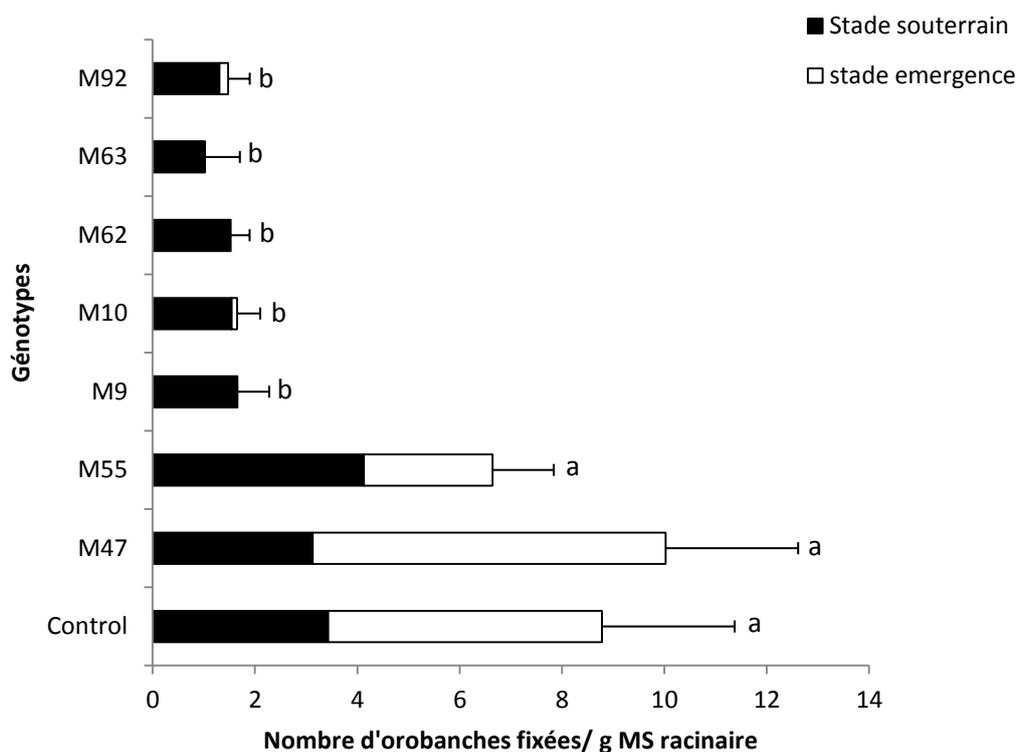


Figure 32 : Nombre total des orobanches fixées / g MS racinaire de la variété témoin non irradiée et des mutants M3 d'intérêt de pois chiche (plante hôte âgée de 90 jours, cultures en pot).

Les valeurs présentées sont les moyennes de 6 répétitions \pm Intervalles de Confiance (ANOVA Fisher LSD test; $\alpha=0,05$)



Figure 33 : Phénotypes des orobanches parasitant la variété témoin non irradiée (a) et les mutants M3 résistants (9, 10, 62, 63 et 92) (b, c et d) en fin de culture en pots.

Les orobanches (b, c et d) sont à un stade de développement souterrain.

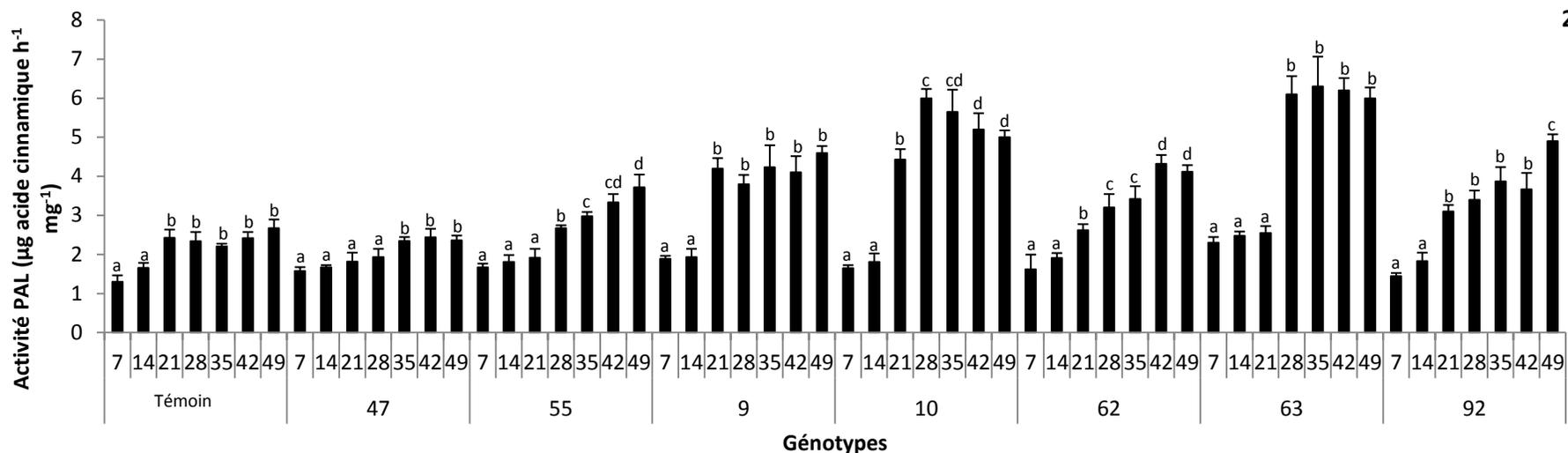
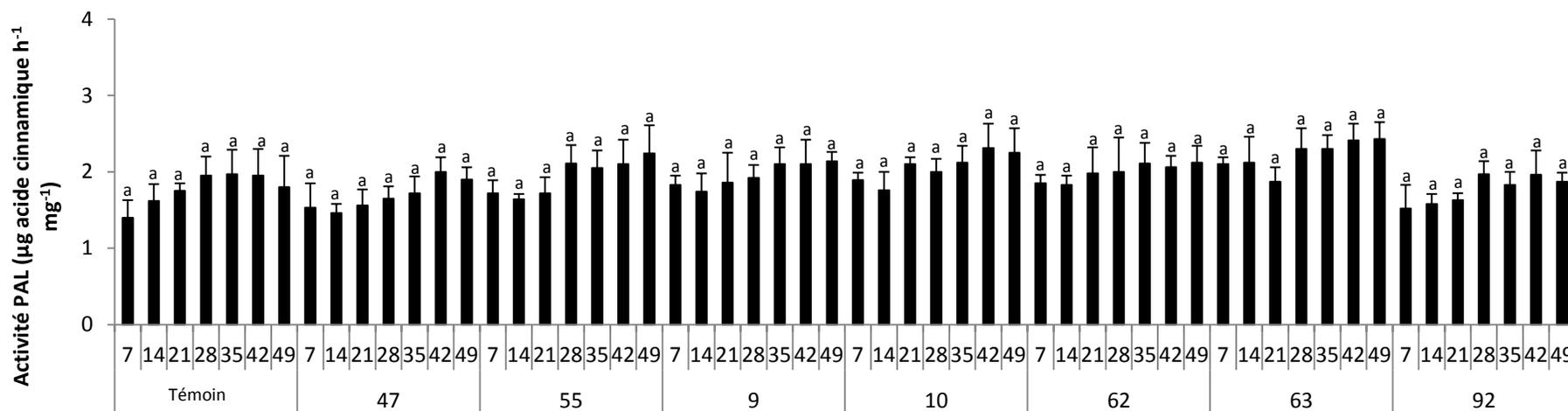


Figure 34 : Evolution de l'activité enzymatique Phénylalanine Ammonia Lyase (PAL) des racines de la variété témoin non irradiée et des mutants M3 sensibles et résistants de pois chiche, en conditions de non infestation (1) et d'infestation par *O. foetida* (2) (système mini-rhizotron).

Mutants sensibles à *O. foetida* : M47 et M55 ; Mutants résistants à *O. foetida* : 9, 10, 62, 63 et 92. Les moyennes avec la même lettre pour chaque mutants à différents temps de culture (JAI) donné ne sont pas significativement différentes (Anova Fisher LSD test, alpha=0,05)

3-2-4-Analyses biochimiques de la résistance induite

L'étude de l'activité des exsudats racinaires des génotypes mutants et de l'interaction hôte-parasite en système mini-rhizotron et en pot a montré la stabilité intergénérationnelle (M2/M3) des composantes de la résistance induite par radiomutagenèse. Dans cette dernière partie, nous nous proposons d'évaluer l'implication de la voie des phénylpropanoïdes (marqueurs : capacité biochimiques: capacité enzymatique PAL et teneurs en phénols) et des processus antioxydants (marqueurs biochimiques: capacités POX et PPO) dans la résistance des mutants M3 d'intérêt à *O. foetida*. Les plantes ont été cultivées en système mini-rhizotron, en conditions d'infestation ou non avec *O. foetida*.

a-Marqueurs biochimiques de la voie des phénylpropanoïdes

En absence d'*O. foetida*, la capacité PAL racinaire est constante au cours du développement quel que soit le génotype, et d'un niveau équivalent chez le témoin et les mutants (Anova, $\alpha=0,05$, **Figure 34**). Par contre, l'infestation s'accompagne, plus ou moins rapidement selon le génotype, d'un accroissement significatif de l'activité enzymatique PAL : dès 21 JAI chez la variété témoin non irradiée et les mutants 9, 10, 62 et 92, à partir de 28 JAI chez les mutants 55 et 63 et à partir de 35 JAI chez le mutant 47 (**Figure 34**). A ces dates, les racines sont parasitées et les quelques orobanches fixées ou en cours de fixation sont aux stades 1-2 (**Annexe 9**) L'augmentation de la capacité PAL racinaire en réponse à l'infestation est plus discrète chez le génotype témoin et le mutant sensible 47 que chez les mutants résistants. Par contre, l'augmentation est aussi importante chez le mutant sensible 55 que les mutants résistants.

En conditions de non infestation, la teneur en composés phénoliques solubles des racines du génotype témoin augmente significativement à partir de 21 JAI et atteint une valeur maximale à compter de 35 JAI, avec une augmentation d'un facteur 3 par rapport à 7 JAI (**Figure 35**). L'amplitude d'accroissement du pool racinaire des composés phénoliques est semblable au cours du développement chez les mutants 10, 62, 63 et 92. Elle est par contre plus élevée chez le mutant résistant 9 (x5) et les mutants sensibles 47 et 55 (x6).

Chez le témoin et les mutants sensibles 47 et 55, l'infestation n'impacte pas significativement les taux d'accroissement en composés phénoliques solubles au cours du développement et les teneurs optimales atteintes. Par contre, l'infestation induit une suraccumulation de composés phénoliques d'un facteur 2 dans les racines des 5 mutants résistants (à 42-49 JAI). La cinétique d'accumulation des composés phénoliques discrimine donc les mutants résistants des génotypes sensibles (témoin et mutants 47 et 55) bien que la teneur maximale des racines en composés phénoliques ne soit pas un paramètre discriminant.

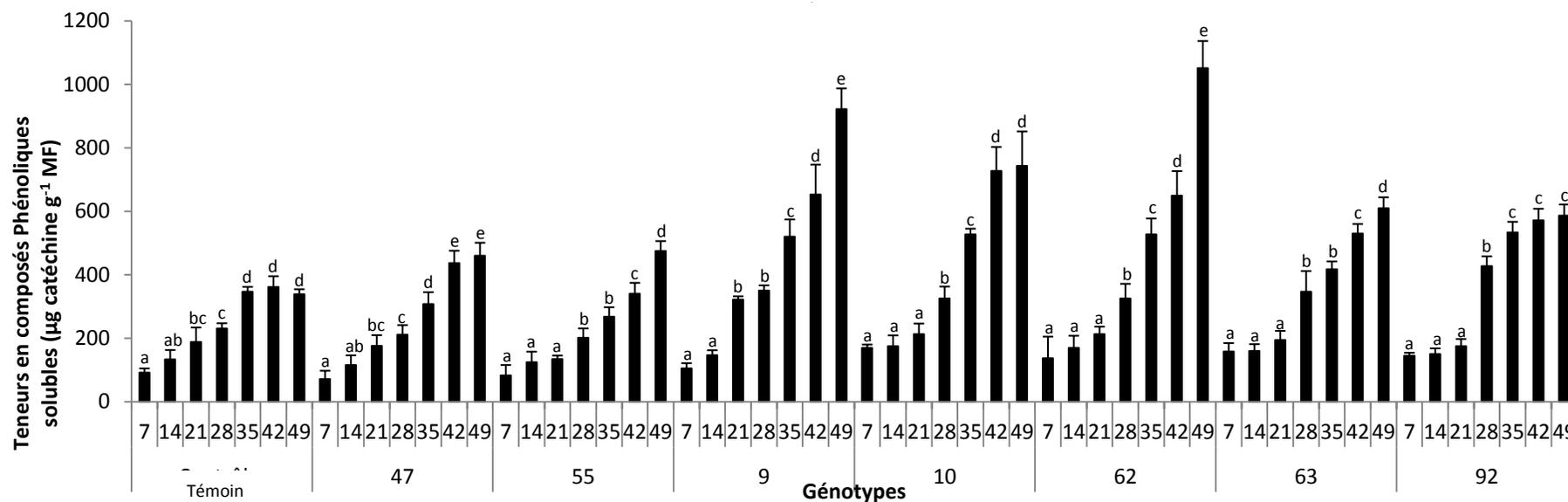
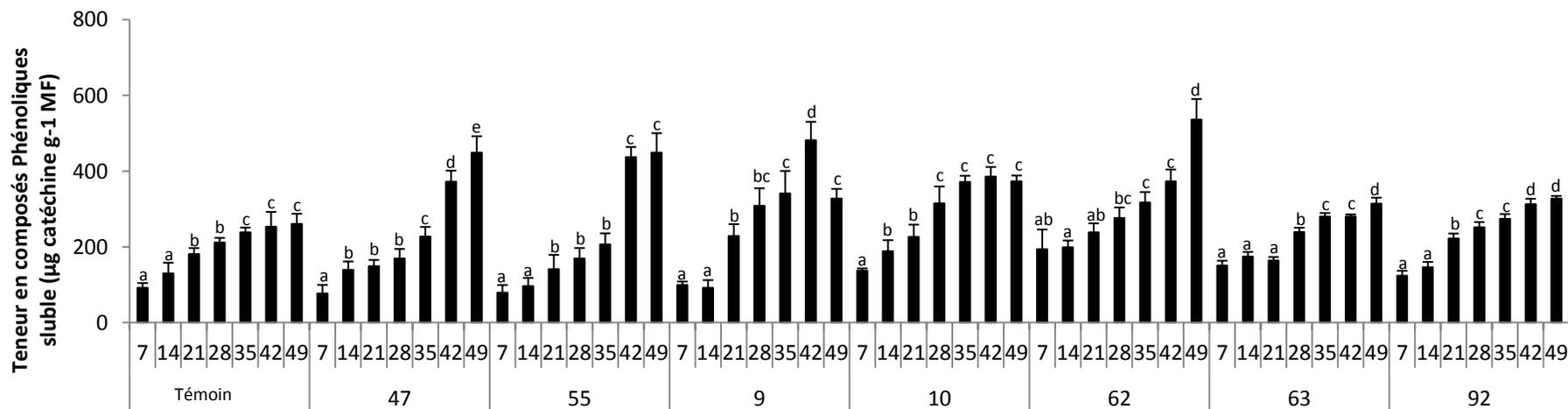


Figure 35 : Evolution de la teneur des composés phénoliques solubles des racines de la variété témoin non irradiée et des mutants M3 sensibles et résistants de pois chiche, en conditions de non infestation (1) et d'infestation par *O. foetida* (2) (système mini-rhizotron).

Mutants sensibles à *O. foetida* : 47 et 55 ; Mutants résistants à *O. foetida* : 9, 10, 62, 63 et 92. Les moyennes avec la même lettre pour chaque mutants à différents temps de culture (JAI) donné ne sont pas significativement différentes (Anova Fisher LSD test, alpha=0,05).

b- Marqueurs biochimiques du système antioxydant

En conditions de non infestation, les génotypes témoins et mutants M3 sensibles et résistants présentent une capacité POX racinaire équivalente, qui ne varie pas significativement au cours du développement (**Figure 36**). La capacité POX des racines des plantes témoins est également constante au cours du développement sous infestation par *O. foetida* et est semblable à celle mesurée en conditions de non infestation. Par contre, une augmentation significative de la capacité POX racinaire est détectable dès 21 ou 28 JAI chez tous les mutants M3. Cette augmentation est néanmoins plus marquée chez les mutants résistants (en moindre partie pour le mutant 62) que chez les mutants sensibles (47, 55). Les mutants résistants (à l'exception du mutant M62) sous infestation présentent ainsi les capacités maximales POX les plus élevées.

En conditions de non infestation, comme pour la capacité POX, aucune variation significative de la capacité PPO n'est observée au cours du développement, quel que soit le génotype, témoin ou mutant (**Figure 37**). De plus, les capacités PPO maximales sont semblables chez le témoin et les mutants sensibles et résistants. Sous infestation, la capacité PPO augmente légèrement mais significativement dans les racines du témoin à compter de 21 JAI pour demeurer ensuite constante au cours du développement (facteur d'accroissement de 1,7). La capacité PPO augmente également au cours du développement chez les mutants sensibles et résistants sous infestation mais les capacités PPO les plus élevées sont mesurées dans les racines des mutants résistants.

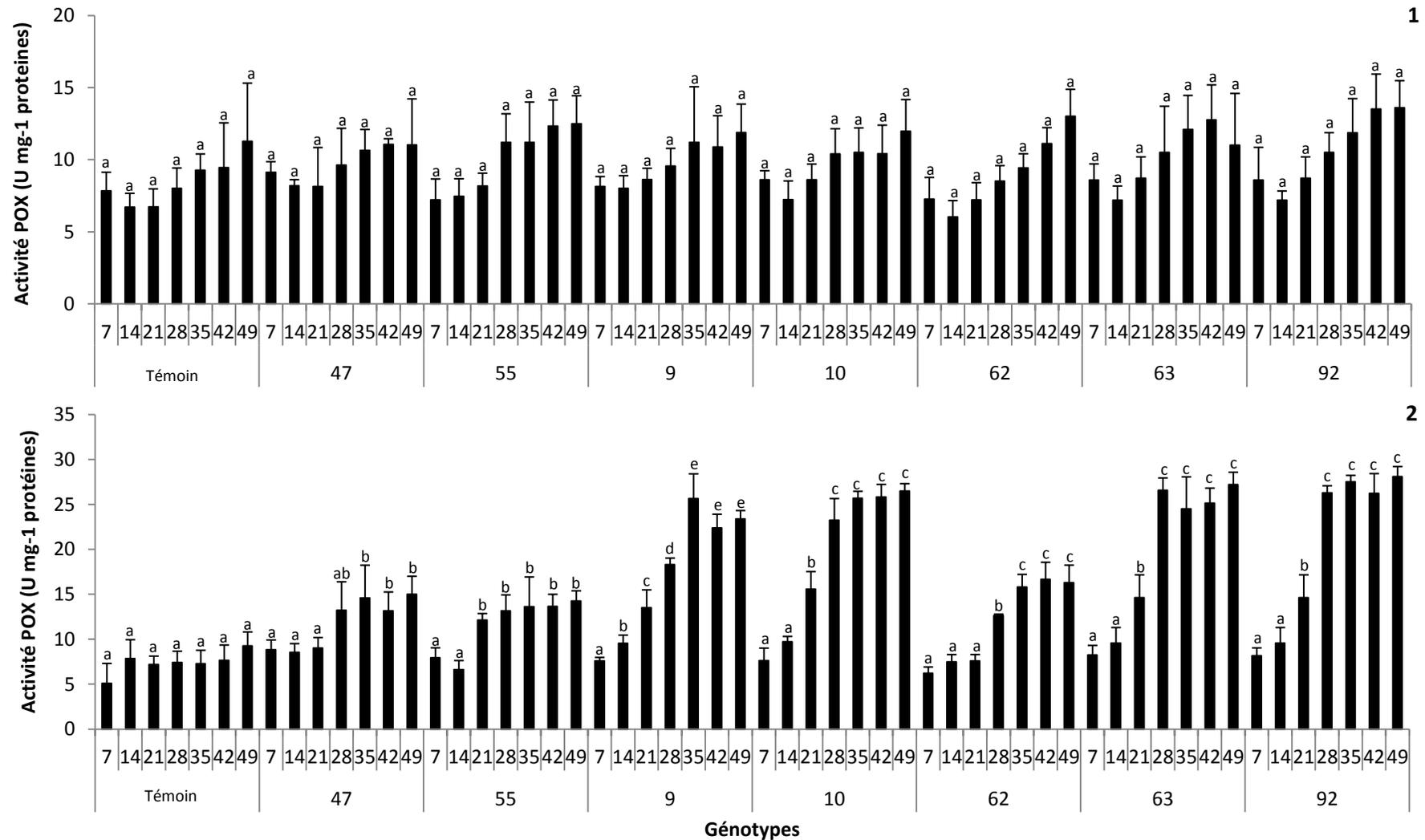


Figure 36 : Evolution de la capacité enzymatique Peroxydase (POX) des racines de la variété témoin non irradiée et des mutants M3 sensibles et résistants de pois chiche, en conditions de non infestation (1) et d'infestation par *O. foetida* (2) (système mini-rhizotron).

Mutants sensibles à *O. foetida* : 47 et 55 ; Mutants résistants à *O. foetida* : 9, 10, 62, 63 et 92. Les moyennes avec la même lettre pour chaque mutants à différents temps de culture (JAI) donné ne sont pas significativement différentes (Anova Fisher LSD test, $\alpha=0,05$)

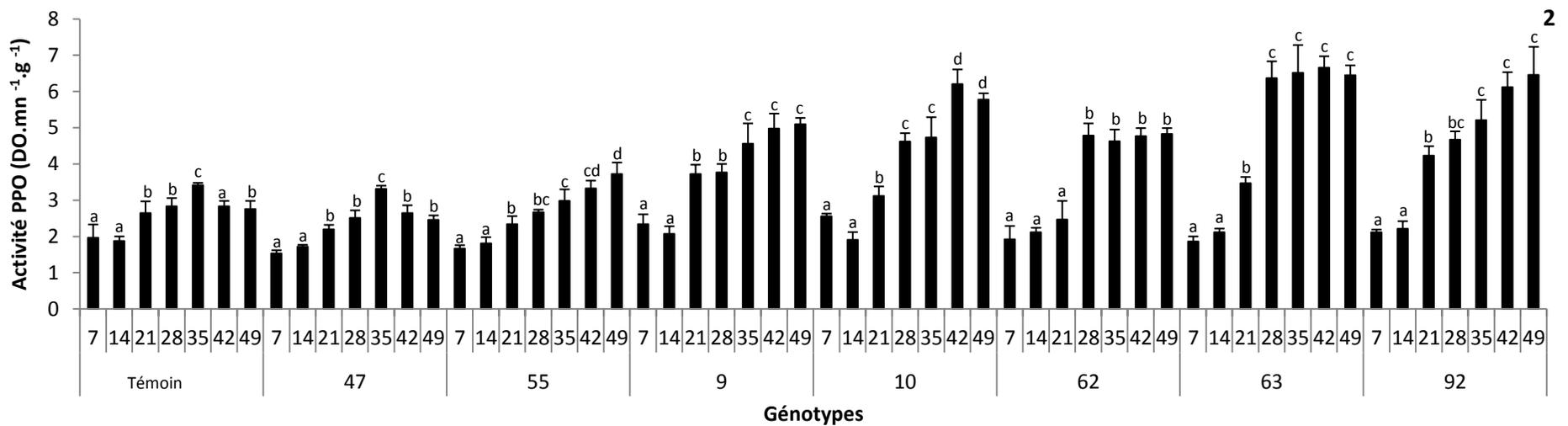
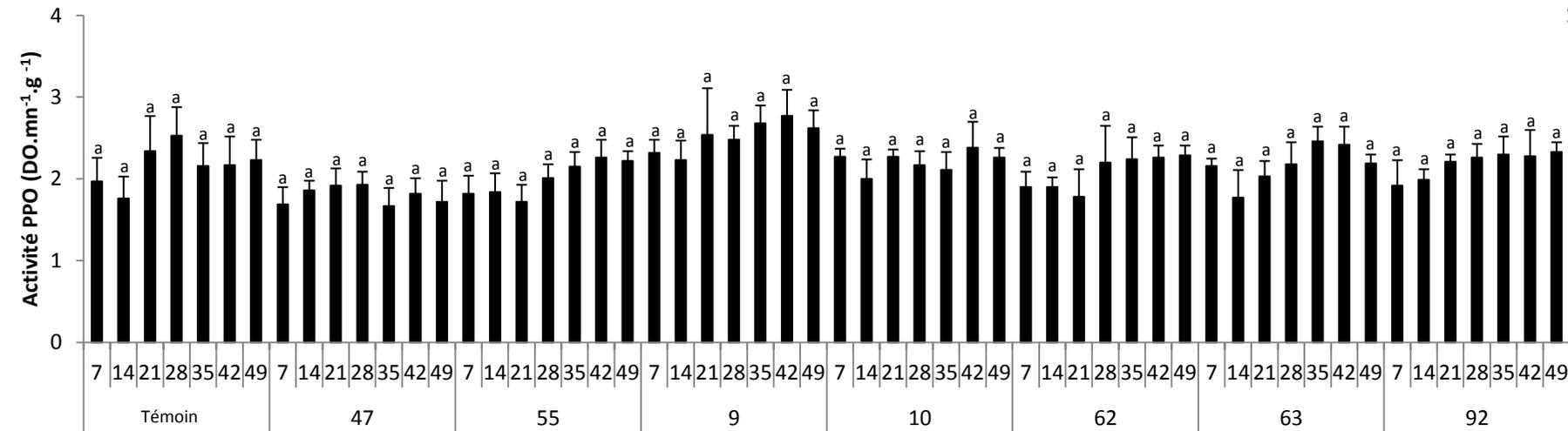


Figure 37 : Evolution de la capacité enzymatique PolyPhénol-Oxydase (PPO) des racines de la variété témoin non irradiée et des mutants M3 sensibles et résistants de pois chiche, en conditions de non infestation (1) et d'infestation par *O. foetida* (2) (système mini-rhizotron).

Mutants sensibles à *O. foetida* : 47 et 55 ; Mutants résistants à *O. foetida* : 9, 10, 62, 63 et 92. Les moyennes avec la même lettre pour chaque mutants à différents temps de culture (JAI) donné ne sont pas significativement différentes (Anova Fisher LSD test, alpha=0,05)

4-Discussion :

L'étude du comportement des mutants issus de la radiomutagenèse vis-à-vis *O. foetida* a été réalisée pour 2 générations successives (M2 et M3) et sous différentes conditions de culture. L'ensemble des résultats démontre l'héritabilité de la résistance induite qui repose au moins sur trois composantes :

- La première consiste en une altération du pouvoir stimulant des exsudats racinaires vis-à-vis de la germination des graines d'orobanche, démontrée à la fois par la mesure de cette activité à partir de cultures hydroponiques sur billes de verre et par le dénombrement des graines germées dans la rhizosphère des pois chiches en système mini-rhizotron. Cette composante de résistance est observée chez un grand nombre de mutants M2 issus de la présélection au champ des mutants M1 produits par radiomutagenèse (**chapitre I**). Le traitement aux rayons gamma des semences M0 n'a pas affecté la cinétique d'exsudation racinaire (activité stimulante) des générations M2 et M3 mais a induit une nette réduction de la capacité élicitrice des exsudats. Une faible capacité à induire la germination de l'orobanche est une composante majeure de résistance à *O. foetida* chez les fabacées (Rubiales *et al.* 2003 a,c ; Pérez-de-Luque *et al.* 2005 a,b; Abbes *et al.* 2007 ; Fernandèz-Aparicio *et al.* 2012). Ce constat est également fait ici par la corrélation positive entre l'activité stimulante des exsudats des mutants et le nombre d'orobanches en cours de fixation et fixées sur les racines (viables et nécrosées ; stades de développement 1 à 5). L'altération du pouvoir stimulant des exsudats racinaires peut provenir soit d'une production/exsudation accrue d'inhibiteurs de germination, soit d'une production/exsudation réduite de stimulants de germination. La production de strigolactones comme stimulants de germination a été fréquemment décrite chez les fabacées (dont le pois chiche : Xie *et al.* 2008 a,b ; Yoneyama *et al.* 2008 ; Fernandèz-Aparicio *et al.* 2014). A ce titre, Fernandèz-Aparicio *et al.* (2014) ont montré que la résistance de deux génotypes de fève à *O. foetida* et autres espèces d'orobanche (*O. crenata* et *P. aegyptiaca*) reposait sur la production réduite de strigolactones (Orobanchyl-acetate et Orobanchol) en comparaison à des génotypes sensibles. L'Orobanchyl-acétate et le 5 deoxystrigol ont été identifiés dans les exsudats racinaires du pois chiche comme stimulants de germination (Yoneyama *et al.* 2008). Il aurait été intéressant, dans le cadre de ces travaux de thèse, de pouvoir mener une étude comparative du contenu en strigolactones des exsudats racinaires des génotypes sensibles (témoin, mutants) et résistants (mutants) pour valider ou non

l'hypothèse d'une altération de la production/exsudation de ces stimulants de germination chez les mutants résistants. L'hypothèse d'une exsudation accrue d'inhibiteurs de germination chez les mutants résistants en réponse à l'infestation ne doit pas être néanmoins exclue. En effet, soulignons que l'activité inhibitrice des composés phénoliques sur la germination de l'orobanche a été démontrée (Serghini *et al.* 2001 ; Mabrouk *et al.* 2007) et qu'à ce titre une suraccumulation de composés phénoliques solubles a été constatée dans les racines infestées de trois des cinq mutants résistants (9, 10 et 62). La grande variété des composés phénoliques chez les plantes et de leur activité biologique doit cependant être considérée. Ainsi, les travaux d'Evidente *et al.* (2010) soulignent la présence de composés phénoliques dans les exsudats racinaires du pois, composés qui stimulent spécifiquement la germination d'*O. foetida* et pas celle d'autres espèces d'orobanche (Evidente *et al.* 2010). A l'inverse, plusieurs travaux soulignent la toxicité vis-à-vis de l'orobanche de composés phénoliques (phytoalexines) secrétées par les racines de plantes résistantes (Goldwasser *et al.* 1999 ; Serghini *et al.* 2001 ; Echevarría-Zomeño *et al.*, 2006). Au final, ces résultats soulignent l'intérêt d'une analyse métabolomique comparative des exsudats racinaires des génotypes sensibles et résistants de pois chiche, pour évaluer l'impact de la radiomutagenèse sur la production et l'exsudation de stimulants et d'inhibiteurs de la germination d'*O. foetida*, et de ce fait comprendre les bases métabolomiques de cette première composante de résistance.

- La seconde composante de résistance, observée également chez les 5 mutants résistants, s'exprime précocement durant le processus infectieux pour faire obstacle à la formation de l'haustorium. Il s'agit donc d'une résistance préhaustoriale, comme celle déjà largement décrite chez de nombreuses fabacées résistantes à l'Orobanche, chez qui la progression des cellules intrusives de l'orobanche est stoppée soit au niveau du cortex racinaire (pois chiche, fève, pois : Rubiales *et al.* 2003b ; Pérèz de Luque *et al.* 2005b), soit au niveau de l'endoderme (féverole, fève ; Pérèz de Luque *et al.* 2005b, 2007), ou soit dans le cylindre central à proximité des tissus conducteurs (*Medicago truncatula* : Lozano-Baena *et al.* 2007). Ces barrières à la progression du parasite peuvent être de nature physique, avec un renforcement pariétal par des protéines de réticulation, le dépôt de callose et de subérine dans le cortex racinaire (Echevarria-Zomeno *et al.* 2006 ; Pérèz de Luque *et al.* 2006a, 2007), ou par une lignification des parois dans l'endoderme et le péricycle (Pérèz de Luque *et al.* 2005b). Elles peuvent être aussi de nature chimique

(empoisonnement du parasite), avec l'accumulation importante de composés phénoliques toxiques dans le cylindre central (phytoalexines : medicarpin et maackiain), au niveau des tissus environnant des vaisseaux de xylème (Pérez de Luque *et al.* 2005b ; Lozano-Baena *et al.* 2007). Par ailleurs, ces composés phénoliques, potentiellement exsudés dans la rhizosphère, seraient aussi à l'origine d'une inhibition de la germination de l'orobanche, à l'instar d'autres phytoalexines impliquées dans la résistance préhaustoriale du tournesol à *O. cumana* (Serghini *et al.* 2001 ; Echevarría-Zomeño *et al.* 2006) et de la vesce à *P. aegyptiaca* (Goldwasser *et al.* 1999). Il est intéressant de noter que Wegmann *et al.* (1991) suggéraient déjà l'implication de phytoalexines (maackiain et medicarpin) dans la résistance de certains cultivars résistants de pois chiche. Parmi les cinq mutants résistants présentant un taux élevé de jeunes orobanches nécrosées (stade 1), trois se caractérisent par une suraccumulation de composés phénoliques solubles dans les racines infestées (mutants 9, 10 et 62) et dont la cinétique est concordante avec l'induction précoce d'une nécrose du parasite. Ce constat suggère soit l'induction d'autres types de barrière à la pénétration du parasite (renforcement pariétal, callose ...) chez les deux autres mutants 63 et 92, soit que la teneur globale en composés phénoliques solubles des racines n'est pas un bon marqueur de la résistance haustoriale des mutants résistants. Une étude histologique est donc essentielle pour savoir si l'accumulation localisée de composés phénoliques est une composante de la résistance haustoriale commune aux cinq mutants d'intérêt.

La nécrose des orobanches, à un très jeune stade de développement (stade 1), en parallèle du noircissement des racines des mutants résistants autour du point d'attachement et de pénétration du parasite, rappelle des observations discutées dans le cadre d'interactions plantes-plantes parasites suggérées comme incompatibles (Lane et Bailey 1992; Goldwasser *et al.* 1997; Perez-de-Luque *et al.* 2005b, 2007). Des auteurs ont effectivement associé le noircissement autour du point d'infestation à une réponse hypersensible (HR) (Dörr *et al.* 1994). Ces travaux ont fait débat dans la communauté scientifique en l'absence de preuve concluante de l'expression d'une HR dans ces interactions, telles que la présence de cellules hôtes mortes (Rubiales *et al.* 2003c ; Pérez de Luque *et al.* 2005b). Le noircissement est plutôt attribuable à l'oxydation de composés phénoliques.

- Une troisième et dernière composante de résistance a été identifiée chez un grand nombre de mutants M2 résistants, mais à un degré plus ou moins important selon le mutant M2, et chez les 5 mutants M3 d'intérêt. Elle traduit l'expression d'une résistance post-haustoriale supplémentaire qui impacte négativement le développement de la tige des orobanches fixées (stade tubercule). Cette altération est décelable à la fois en systèmes mini-rhizotrons et en pots. Un tel développement atypique de l'orobanche en post-fixation a déjà été observé chez des fabacées résistantes (Sillero *et al.* 2005 ; Fernández-Aparicio *et al.* 2009), et s'explique soit par l'obstruction des vaisseaux xylémiens de la racine hôte à proximité de l'haustorium par un dépôt de mucilage (Pérez de Luque *et al.* 2005a, b), soit par le transfert dans l'orobanche *via* l'haustorium de composés phénoliques toxiques (phytoalexines : medicarpin and maackiain ; Lozano-Baena *et al.* 2007). Une incompatibilité hormonale entre l'hôte et le parasite a été également évoquée pour expliquer le développement atypique de l'orobanche (Bar-Num *et al.* 2008 ; Harb *et al.* 2004 ; Péron *et al.* 2012). Une émergence retardée des orobanches (*O. crenata*) a été également observée par Rubiales *et al.* (2004) sur des génotypes résistants de pois chiche. Sur la base des anciens travaux de Wegmann (1991) sur des pois chiche résistants et producteurs de phytoalexines, ces auteurs ont émis l'hypothèse que cette résistance reposait sur la production de ces phytoalexines, maackiain et medicarpin. Bien que des études histologiques et métabolomiques complémentaires soient nécessaires chez l'hôte et le parasite pour comprendre les bases de cette résistance post-haustoriale, celle-ci s'avère très efficace pour limiter l'émergence du parasite hors du sol, qui a été extrêmement rare lors des cultures en pot. Le phénotype des orobanches qui échappent à la résistance pré-haustoriale est de ce fait très altéré. Néanmoins, une floraison souterraine des orobanches, se développant sur les mutants résistants, a été constatée. Cette floraison peut-elle être suivie d'une production de graines viables ? Comme le taux d'autogamie semble être très élevé chez *O. foetida* (Vaz Patto *et al.* 2008), la possibilité d'une reproduction de l'orobanche sur les génotypes résistants, certes limitée, n'est pas à exclure. A ce titre, une floraison souterraine de l'orobanche a été également reportée, en Russie, pour des populations d'*O. cumana* sur des génotypes résistants de tournesol, sans information à ce jour sur l'efficacité de ce phénomène dans le maintien de la pression parasitaire (collaborateurs Euralis Semences, communication personnelle).

La voie des phénylpropanoïdes, initiée par la désamination de la phénylalanine *via* la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), conduit à la formation de divers composés, dont les composés phénoliques, lignine, subérine, les flavonoïdes.... Comme cela a été décrit précédemment, ces composés sont communément impliqués dans la réponse des plantes aux stress biotiques, notamment à l'orobanche. Ainsi, la sur-expression de la PAL a été largement reportée que ce soient chez des plantes hôtes sensibles ou résistantes (Dos Santos *et al.* 2003 a,b ; Mabrouk *et al.* 2007 ; Al-Wakeel *et al.* 2012). De même, des teneurs élevées en composés phénolique ont été impliquées dans la résistance des plantes à l'orobanche (Yamunarani *et al.* 2004; Wang and Zhang 2010). Les POX et PPO contribuent au métabolisme des composés phénoliques. La PPO est une enzyme à large distribution dans les tissus végétaux et catalyse l'oxydation de composés O-diphénol en composés plus toxiques, O-quinone (Chranowski *et al.* 2003). Ainsi, de nombreux travaux ont démontré l'action des POX et PPO dans l'établissement de barrières physiques et/ou chimiques à la progression des cellules intrusives du parasite dans les racines hôtes (Goldwasser *et al.* 1999 ; Pérez-de-Luque *et al.* 2001, 2005 a,b ; Dos Santos *et al.* 2003 a,b ; Castiledjo *et al.* 2004 ; Al-Wakeel *et al.* 2012). A ce titre, Pérez-de-Luque *et al.* (2006a) ont démontré l'implication d'une peroxydase, localisée dans le cortex racinaire de pois résistants à proximité du point d'infection par *O. crenata*, dans le renforcement pariétal au travers d'interactions protéiques médiées par un stress oxydatif (accumulation localisée d'H₂O₂). Au vu de l'implication de ces composés et de ces protéines dans la résistance à l'orobanche, les profils d'accumulation des composés phénoliques et des activités PAL, POX et PPO ont été précisés chez les pois chiches mutants, sensibles et résistants. L'activité PAL racinaire augmente en réponse à l'attaque parasitaire, aussi bien chez des génotypes sensibles que résistants. La PAL n'est donc pas un marqueur de la résistance induite par radiomutagenèse mais plutôt un marqueur de réponse générale au parasitisme de l'orobanche. De même, la teneur globale des racines en composés phénoliques n'est pas un paramètre qui discrimine les mutants sensibles et résistants sous infestation. Par contre, à la différence des mutants sensibles, les mutants résistants voient leur teneur globale en composés phénoliques solubles augmenter d'un facteur 2 en réponse à l'infestation, ce qui suggère une réponse spécifique des génotypes mutants à l'infestation en termes d'accumulation de composés phénoliques. Comme déjà discuté précédemment, bien que la localisation de cette accumulation n'ait pu être précisée

dans cette étude, on peut supposer qu'une accumulation de composés phénoliques localisée à l'interface hôte-parasite soit impliquée dans la résistance induite par radiomutagenèse. En parallèle, les activités racinaires POX et PPO augmentent en réponse à l'infestation à la fois chez les mutants sensibles et résistants mais ces derniers présentent les activités les plus élevée.

A l'instar de travaux récents démontrant l'intérêt des radiations (ici faibles) pour accentuer la résistance d'*A. thaliana* aux stress salin et métallique en modulant l'expression des gènes impliqués dans la résistance à ces stress (Wencai *et al.* 2015), l'ensemble de ces résultats démontre l'intérêt de la radiomutagenèse pour réduire le stress exercé par l'orobanche en modulant l'expression d'acteurs impliqués dans la résistance à l'orobanche (composés phénoliques, POX, PPO notamment) chez le pois chiche. De plus, cette modulation semble présenter une forte héritabilité puisque les différentes composantes de résistance pré- et post-haustoriale ont été observées en générations M2 et M3. La disponibilité récente de données transcriptomiques conséquentes chez le pois chiche (Kudapa *et al.* 2014 ; Pradhan *et al.* 2014) laisse envisager désormais des travaux plus exhaustifs sur les modifications transcriptomiques impliqués dans la résistance à l'orobanche induite par mutagenèse chez cette espèce.

Conclusions et Perspectives

Conclusions et Perspectives

L'inquiétude des agriculteurs Tunisiens est grandissante face aux dégâts causés chez les légumineuses par l'orobanche (*O. crenata* et *O. foetida*) et l'absence de méthodes de lutte efficaces. La lutte doit être intégrée et l'exploitation de nouvelles variétés durablement résistantes en est une composante majeure. Face à l'orobanche, la sélection de variétés résistantes chez les légumineuses est néanmoins difficile compte tenu de la rareté, de la complexité et très souvent de la faible héritabilité de cette résistance (Cubero *et al.* 1994 ; Goldwasser *et al.* 1997 ; Khalil and Erskine 1999 ; Kharrat 2002 ; Rubiales *et al.* 2006). Fort de ce constat et de l'intérêt largement exploité de la radiomutagenèse (rayons gamma) dans le cadre de l'amélioration génétique des espèces cultivées, ce travail de thèse avait pour objectif d'évaluer l'efficacité des rayons gamma pour accroître la résistance du pois chiche à l'orobanche (*O. foetida*), de décrire les composantes de la résistance induite et d'étudier l'impact de la radiomutagenèse sur la modulation de l'expression d'acteurs majeurs de la résistance à l'orobanche que sont les composés phénoliques et les protéines impliquées dans leur métabolisme (ou de leurs précurseurs ; PAL, POX et PPO).

A l'image des travaux menés préalablement au CNSTN sur une autre légumineuse d'intérêt la fèverole (Mejri *et al.* 2012), l'étape d'évaluation de la dose de rayonnement adapté ($DL_{50}=150$ Gy) pour les graines du pois chiche (variété Amdoun) a permis de préciser, dans un premier temps, l'impact des radiations sur le développement de cette espèce (Brahmi *et al.*, 2014). Des effets hormétiques pour de faibles doses et négatifs pour des doses supérieures à 100 Gy ont été observés et décrits précisément sur la germination et le développement des plantes. Les mécanismes moléculaires sous jacents n'ont pas été recherchés puisque le projet était avant tout de cribler les mutants M1 (traitement DL_{50}) sur leur résistance à l'orobanche, et d'approfondir par la suite l'étude des mutants d'intérêt. Le criblage de la génération M1 a été réalisé avec succès au cours de la première année du projet dans trois zones différentes de la Région de Béjà où la pression parasitaire est forte. Sur les 3000 mutants de la génération M1 criblés, 1% environ (30 mutants) ont été sélectionnés en raison de leur faible sensibilité à *O. foetida* et leur bon rendement grainier sous infestation.

L'héritabilité de la résistance induite par radiomutagenèse a pu être évaluée dans le cadre de ce projet sur deux générations successives M2 et M3. Bien que des travaux complémentaires soient nécessaires avec davantage de générations (M4, voire M5), les résultats obtenus sur ces

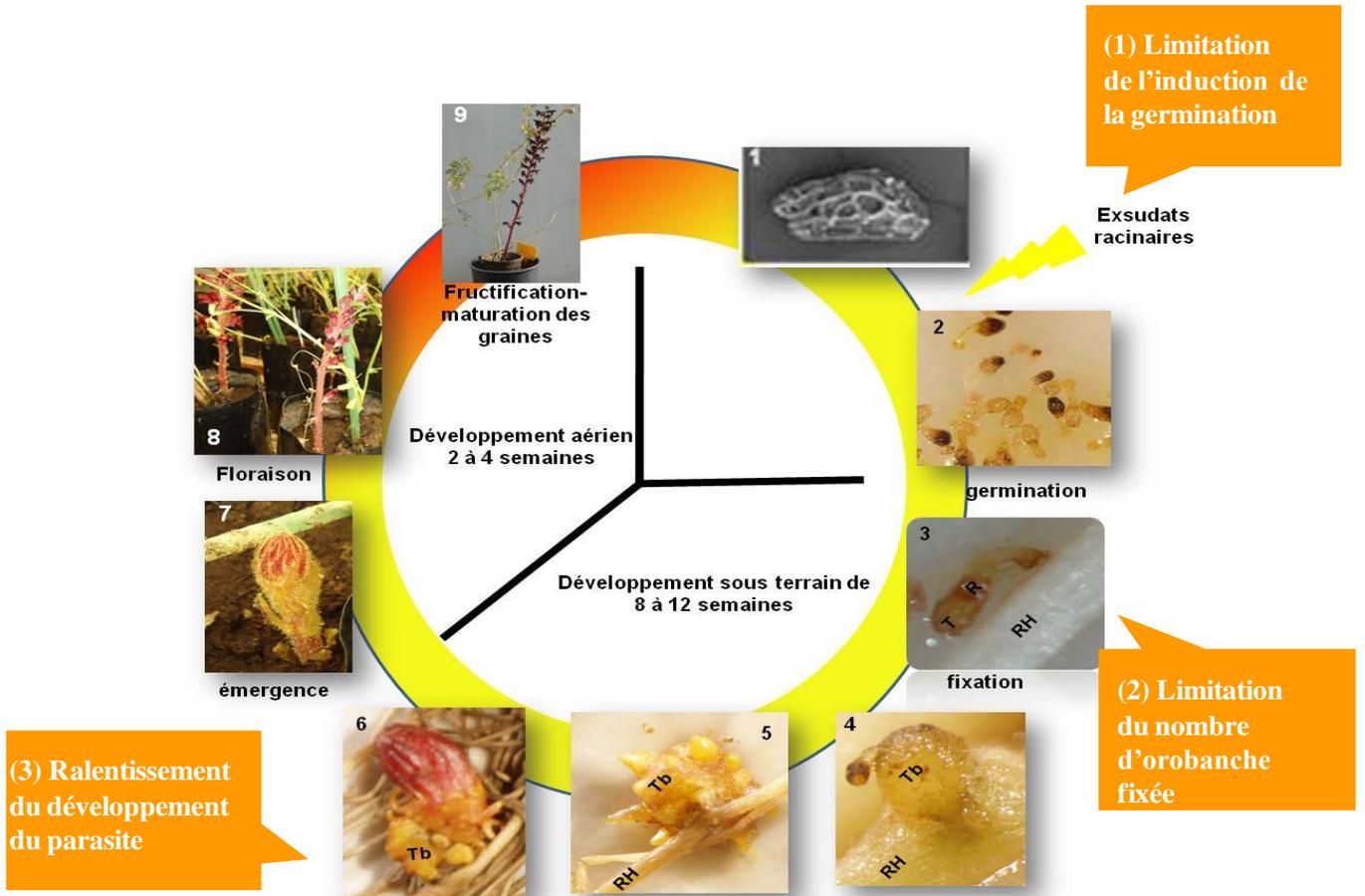


Figure 38 : Composantes de la résistance induite par radiomutagenèse chez le pois chiche (génération M3) vis-à-vis d'*Orobanche foetida*.

1 et 2 : résistance pré-haustoriale ; 3 : résistance post-haustoriale (post-fixation)

deux premières générations suggèrent une forte héritabilité de la résistance pour les 5 mutants d'intérêt. De plus, cette résistance s'exprime fortement à la fois au champ, en pot et en système mini-rhizotron, ce qui souligne la robustesse des mécanismes sous jacents. En effet, il n'est pas rare de constater un comportement différent d'un génotype vis-à-vis de l'orobanche dans ces différentes conditions de culture lorsque le niveau de résistance est modéré (Gauthier *et al.* 2012). La possibilité ou non d'une multiplication de l'orobanche sur les mutants M3 résistants reste néanmoins une question ouverte. Pour répondre à cette question, il conviendra de préciser le développement d'*O. foetida* au champ sur ces mutants M3 d'intérêt concernant l'émergence ou non du parasite dans la période de culture et la production ou non de graines viables par des hampes florales potentiellement souterraines.

Les travaux menés sur les 30 mutants M2 puis sur les 5 mutants M3 d'intérêt (les plus résistants sous infestation artificielle) ont permis de sélectionner une résistance qui s'exprime efficacement contre l'orobanche tout au long de son développement : de la germination jusqu'au développement de la hampe florale en post-fixation (**Figure 38**). La résistance repose sur des évènements non seulement pré-haustoriaux, tels que la réduction du pouvoir stimulant des exsudats racinaires vis-à-vis de la germination des graines d'orobanche et l'induction d'une nécrose précoce du parasite au cours de l'invasion du cortex racinaire, mais aussi post-haustoriaux (post-fixation) qui affectent le développement souterrain de la hampe florale et limitent ainsi son émergence hors du sol. L'étude ciblée des profils d'accumulation des composés phénoliques et d'expression de protéines liées à leur métabolisme (PAL, POX, PPO), chez les 5 mutants d'intérêt comparativement au génotype non irradié, souligne l'effet bénéfique de la radiomutagenèse sur la modulation, sous infestation, de l'expression d'acteurs communément impliqués dans la résistance à l'orobanche.

Des travaux complémentaires sont nécessaires pour une caractérisation approfondie de la résistance des mutants M3: (1) Etude histocytologique de l'interface hôte-parasite pour localiser et identifier la nature des barrières structurales et chimiques à la différenciation du suçoir ; (2) Analyse métabolomique comparative des exsudats racinaires et racines des mutants et du génotype témoin non irradié ; (3) Analyse exhaustive des modulations transcriptomiques engendrées par la radiomutagenèse chez les mutants résistants sous infestation, à différents stades de développement (préhaustoriaux et plus tardifs). (4) Analyses génétiques visant à préciser la nature mono ou polygénique des différentes composantes de résistance, et à identifier les QTL sous jacents et des gènes marqueurs de sélection.

- Au vu de la diversité génétique au sein d'*O. foetida* (Vaz Patto *et al.* 2008 ; Bouhadida *et al.* 2015) et de la nécessité de sélectionner une résistance que l'on espère durable, il est

nécessaire d'évaluer la robustesse de la résistance induite vis-à-vis de plusieurs autres populations d'*O. foetida*.

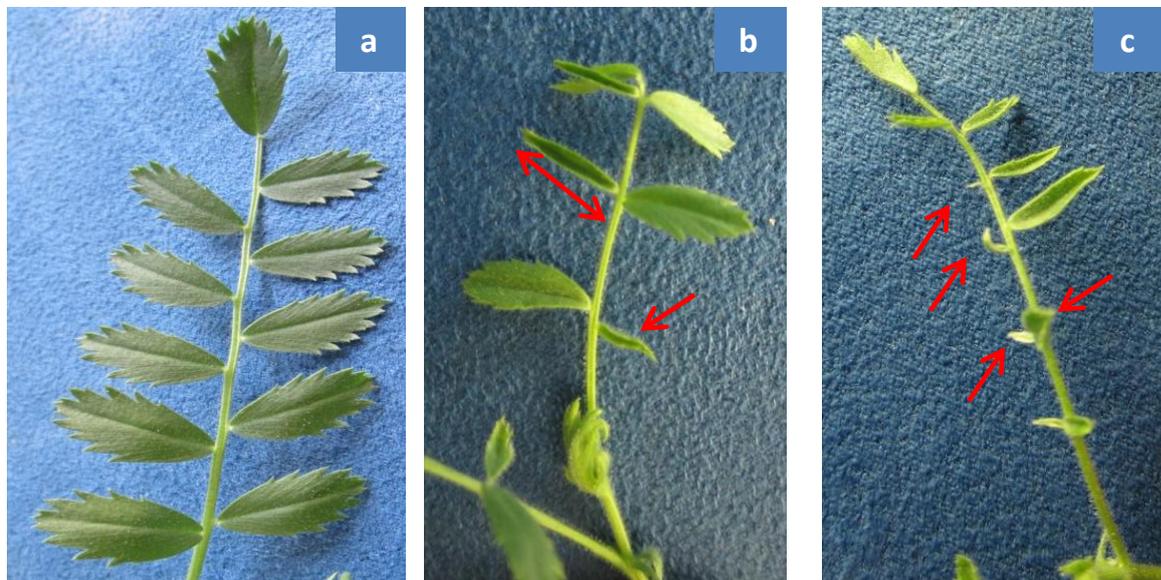
- Les mutations ont engendré un renforcement des défenses du pois chiche vis-à-vis de l'orobanche. La question de l'acclimatation de ces mutants à d'autres stress peut être posée. Il serait donc intéressant de préciser le comportement de ces mutants face à d'autres stress biotiques (fongiques, insectes et nématodes pour cette culture) et abiotiques (stress hydrique et thermique pour cette culture).

- Sachant que la radiomutagenèse génère une forte variabilité sur la capacité de nodulation (variabilité largement exploitée pour étudier cette fonction ; Exemple : Morandi *et al.* 2005), cette propriété doit être précisée pour les mutants résistants à *O. foetida*. Celle-ci n'a pas été vérifiée au cours de ce travail, que ce soit au champ (année 1 sur la génération M1) ou en pot (au laboratoire, générations M2 et M3). De même, les cultures en mini-rhizotron n'étaient pas favorables à la nodulation (fertilisation azotée et absence d'inoculum bactérien). Dans le contexte agroécologique actuel, une capacité limitée des mutants à noduler pourrait réduire considérablement leur intérêt en sélection.

Annexes

Annexe 1: Effets des rayons gamma sur la morphologie des feuilles

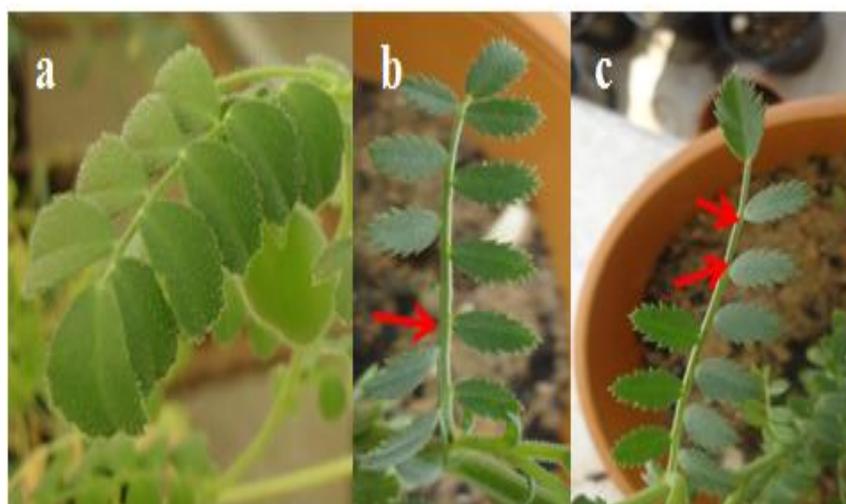
a : plante non irradiée; b,c : plantes irradiées par la dose 200 Gy



Annexe 2: Absence de pétioles dans certains étages foliaires des mutants.

a : plante non irradiée

b,c: plantes irradiées par la dose 150 Gy



Annexe 3 : Cinétique d'exsudation du pouvoir stimulant de la variété témoin non irradiée et des mutants M2 de pois chiche vis-à-vis de la germination des graines d'*O. foetida*.

Les données sont les moyennes de 3 répétitions \pm intervalle de confiance (Bonferroni test, $\alpha=0,05$). * : valeur significativement différente de celle de la lignée témoin (à la même date d'exsudation),

M2	7 j	14 j	21 j	28 j	35 j	42 j	49 j
Ctr	0	9,45 \pm 0,35	41,13 \pm 0,98	47,05 \pm 2,97	72,02 \pm 1,14	53,53 \pm 2,09	41,22 \pm 2,57
47	0	1,33 \pm 0,5*	28,27 \pm 1,10*	45,15 \pm 3,96	78,56 \pm 1,4*	59,97 \pm 2,31*	17,82 \pm 1,71*
12	0	0,03 \pm 0,01*	17,20 \pm 0,80*	29,46 \pm 3,01*	72,65 \pm 1,62	66,23 \pm 1,81*	26,22 \pm 1,41*
35	0	2,25 \pm 0,3*	14,31 \pm 0,60*	21,32 \pm 2,32*	69,10 \pm 2,81	54,09 \pm 1,55	49,37 \pm 1,52*
21	0	0,20 \pm 0,2*	20,83 \pm 0,81*	36,88 \pm 4,01*	67,91 \pm 1,91*	49,96 \pm 1,77	25,14 \pm 1,92*
4	0	7,59 \pm 0,2*	7,60 \pm 0,25*	35,51 \pm 1,63*	66,66 \pm 1,52*	39,09 \pm 1,51*	32,80 \pm 2,41*
14	0	1,59 \pm 0,2*	23,09 \pm 0,83*	19,97 \pm 3,21*	66,64 \pm 1,62*	51,22 \pm 2,04	12,98 \pm 1,63*
93	0	4,61 \pm 0,2*	10,92 \pm 1,22*	50,25 \pm 3,27	66,54 \pm 2,42*	57,10 \pm 1,62	20,02 \pm 1,43*
37	0	0*	27,93 \pm 1,81*	41,43 \pm 5,73	65,33 \pm 1,72*	50,68 \pm 1,42	8,73 \pm 1,61*
6	0	2,34 \pm 0,6*	13,62 \pm 0,73*	24,44 \pm 3,31*	64,33 \pm 2,13*	60,09 \pm 1,91*	40,56 \pm 1,96
39	0	0,14 \pm 0,1*	21,71 \pm 0,62*	18,10 \pm 2,71*	64,33 \pm 2,12*	53,80 \pm 2,22	44,37 \pm 1,92
36	0	0,11 \pm 0,01*	23,03 \pm 0,8*	16,11 \pm 2,91*	63,33 \pm 2,32*	59,12 \pm 1,31*	11,69 \pm 1,33*
49	0	0*	28,27 \pm 0,71*	41,19 \pm 2,92*	63,00 \pm 1,82*	43,63 \pm 2,22*	22,61 \pm 1,53*
55	0	11,47 \pm 0,02*	17,40 \pm 1,03*	46,08 \pm 4,12	59,62 \pm 1,51*	46,95 \pm 2,81*	24,01 \pm 2,43*
11	0	0,08 \pm 0,1*	12,01 \pm 0,81*	23,07 \pm 4,01*	39,60 \pm 1,82*	58,83 \pm 2,63*	16,46 \pm 1,43*
67	0	2,82 \pm 0,4*	15,08 \pm 0,83*	45,12 \pm 3,34*	57,46 \pm 1,62*	31,76 \pm 1,63*	13,76 \pm 1,47*
72	0	2,82 \pm 0,3*	9,21 \pm 1,13*	24,07 \pm 3,12*	48,46 \pm 1,23*	56,13 \pm 2,77	31,39 \pm 2,02*
13	0	0,17 \pm 0,5*	17,86 \pm 0,52*	32,56 \pm 2,71*	52,38 \pm 1,52*	55,34 \pm 1,52	34,18 \pm 1,66*
83	0	0,08 \pm 0,0*	0*	34,06 \pm 1,48	52,01 \pm 1,22*	21,12 \pm 1,51*	36,80 \pm 2,51*
60	0	2,16 \pm 0,5*	31,63 \pm 0,81*	23,42 \pm 3,01*	51,80 \pm 4,14*	36,27 \pm 2,71*	23,84 \pm 1,94*
90	0	4,75 \pm 0,4*	12,62 \pm 0,82*	19,48 \pm 2,41*	49,12 \pm 1,71*	31,06 \pm 1,72*	7,38 \pm 1,33*
81	0	0,01 \pm 0,0*	28,08 \pm 1,22*	39,35 \pm 3,82*	46,61 \pm 1,9*	33,03 \pm 1,6*	14,76 \pm 2,63*
86	0	5,30 \pm 0,5*	9,21 \pm 1,13*	30,9 \pm 2,64*	44,86 \pm 3,1*	27,26 \pm 1,7*	21,61 \pm 1,52*
89	0	7,03 \pm 0,4*	8,95 \pm 0,76*	27,58 \pm 1,8*	28,38 \pm 1,3*	41,99 \pm 1,7*	8,13 \pm 1,33*
51	0	1,57 \pm 0,2*	42,64 \pm 1,47	27,58 \pm 4,7*	39,65 \pm 1,9*	34,94 \pm 2,4*	18,54 \pm 1,62*
52	0	0*	25,08 \pm 1,2*	28,14 \pm 4,1*	39,16 \pm 1,6*	22,38 \pm 1,7*	30,04 \pm 1,96*
9	0	1,77 \pm 0,6*	13,07 \pm 1,0*	14,26 \pm 3,6*	32,80 \pm 3,6*	32,29 \pm 1,6*	19,85 \pm 1,21*
10	0	0*	0*	8,16 \pm 0,96*	32,08 \pm 4,2*	16,58 \pm 1,4*	6,40 \pm 0,88*
62	0	0,05 \pm 0,0*	6,06 \pm 0,39	17,10 \pm 3,2*	31,00 \pm 2,2*	18,44 \pm 1,4*	14,01 \pm 1,43*
63	0	0,01 \pm 0,2*	6,60 \pm 0,44*	9,87 \pm 2,22*	25,34 \pm 3,7*	14,64 \pm 1,6*	21,57 \pm 1,57*
92	0	0*	4,85 \pm 0,40*	14,4 \pm 1,76*	28,15 \pm 1,5*	17,46 \pm 1,4*	11,15 \pm 1,31*
Eau	0	0*	0*	0*	0*	0*	0*

Annexe 4 : Cinétique de germination des graines d'*Orobancha foetida* à proximité des racines de la variété témoin (non irradiée) et des mutants M2 de pois chiche (système mini-rhizotron)

Les valeurs représentées sont les moyennes de 3 répétitions \pm intervalle de confiance (Bonferroni test, $\alpha=0,05$),

	7 j	14 j	21 j	28 j	35 j	42 j	49 j
Contrôle	0	17,96 \pm 5,26	37,90 \pm 3,65	48,30 \pm 2,60	74,33 \pm 3,45	68,60 \pm 2,36	71,56 \pm 6,40
47	0	17,60 \pm 3,23	33,67 \pm 2,97	47,96 \pm 2,88	77,26 \pm 1,47	74,53 \pm 5,97	70,56 \pm 4,59
12	0	15,71 \pm 3,79	22,76* \pm 2,19	24,11 \pm 2,27*	71,83 \pm 3,55	72,13 \pm 2,09	72,93 \pm 3,43
35	0	14,30 \pm 1,96	18,38* \pm 0,81	24,82 \pm 4,56*	69,50 \pm 4,20	69,43 \pm 4,47	68,90 \pm 3,53
21	0	13,86 \pm 3,40	21,41* \pm 3,50	36,81 \pm 5,12*	68,30 \pm 3,16	69,13 \pm 5,10	67,10 \pm 4,45
4	0	13,53 \pm 2,91	18,56* \pm 5,18	35,66 \pm 4,74*	68,33 \pm 3,79	68,00 \pm 3,20	67,86 \pm 4,56
14	0	13,43 \pm 3,74	22,60* \pm 0,72	20,70 \pm 3,16*	68,20 \pm 2,77	68,03 \pm 2,26	68,06 \pm 3,55
93	0	13,16 \pm 3,98	12,70* \pm 3,13	60,67 \pm 4,63*	68,26 \pm 2,60	67,30 \pm 1,64	67,30 \pm 4,77
37	0	12,43 \pm 2,91	27,37* \pm 3,35	41,42 \pm 3,18	67,36 \pm 2,15	67,20 \pm 2,38	66,56 \pm 5,90
6	0	12,06 \pm 1,02	17,87* \pm 0,46	24,93 \pm 3,66*	64,60 \pm 5,24*	63,83 \pm 4,14	64,46 \pm 7,24
39	0	11,03 \pm 2,43*	21,00* \pm 1,56	23,99 \pm 5,04*	64,03 \pm 2,95*	63,96 \pm 3,51	64,53 \pm 4,79
36	0	9,70 \pm 2,33*	23,19* \pm 3,26	26,39 \pm 1,40*	63,90 \pm 2,28*	63,70 \pm 3,16	64,13 \pm 5,80
49	0	9,33 \pm 1,72*	24,12* \pm 5,06	41,75 \pm 1,87	63,83 \pm 3,61*	63,46 \pm 4,66	64,03 \pm 3,61
55	0	0*	18,95* \pm 3,36	46,57 \pm 1,62	62,06 \pm 2,54*	62,06 \pm 4,16	62,03 \pm 3,09
11	0	6,00 \pm 4,08*	11,76 \pm 2,75*	20,04 \pm 2,99*	39,56 \pm 1,67*	53,20 \pm 1,77*	38,36 \pm 4,70*
67	0	9,66 \pm 2,84*	18,97* \pm 3,21	44,82 \pm 2,66	57,73 \pm 2,43*	55,23 \pm 5,03*	54,96 \pm 4,46*
72	0	7,66 \pm 2,84*	11,09* \pm 1,97	23,75 \pm 3,14*	48,80 \pm 1,96*	55,10 \pm 1,77*	49,20 \pm 4,02*
13	0	9,33 \pm 3,63*	17,47* \pm 3,26	33,16 \pm 4,27*	54,46 \pm 4,53*	55,10 \pm 3,40*	54,06 \pm 4,05*
83	0	8,66* \pm 3,26*	7,38 \pm 0,57*	33,07 \pm 5,33*	52,53 \pm 3,65*	52,20 \pm 4,10*	53,30 \pm 4,35*
60	0	0*	43,89 \pm 4,46	48,13 \pm 3,76	51,80 \pm 4,63*	50,96 \pm 2,56*	50,86 \pm 1,61*
90	0	7,66 \pm 4,28*	12,71 \pm 1,84*	16,17 \pm 2,76*	47,16 \pm 1,99*	49,50 \pm 3,06*	47,93 \pm 4,09*
81	0	7,33 \pm 2,61*	29,98 \pm 4,29*	36,90 \pm 2,96*	46,56 \pm 2,79*	45,40 \pm 3,76*	45,93 \pm 2,29*
86	0	7,33 \pm 2,84*	9,86 \pm 1,76*	32,60 \pm 3,68*	47,76 \pm 3,53*	44,76 \pm 4,43*	45,03 \pm 4,44*
89	0	0*	13,81 \pm 2,27*	26,69 \pm 0,98*	41,83 \pm 5,04*	41,73 \pm 4,05*	41,63 \pm 3,42*
51	0	6,00 \pm 2,99*	42,55 \pm 1,16	23,82 \pm 4,29*	39,26 \pm 3,22*	38,46 \pm 3,84*	39,00 \pm 3,17*
52	0	0	21,94 \pm 1,45*	28,43 \pm 2,81*	38,86 \pm 1,72*	36,83 \pm 2,43*	38,53 \pm 2,35*
9	0	0,66 \pm 0,65*	13,75 \pm 0,84*	14,27 \pm 3,91*	33,35 \pm 2,41*	31,70 \pm 2,00*	30,40 \pm 3,86*
10	0	0,66 \pm 0,65*	0*	8,07 \pm 1,79*	29,13 \pm 1,69*	28,76 \pm 2,54*	31,00 \pm 3,11*
62	0	0*	6,26 \pm 0,77*	17,78 \pm 1,46*	31,23 \pm 3,92*	30,00 \pm 2,26*	25,56 \pm 4,53*
63	0	0*	6,61 \pm 0,57*	9,92 \pm 1,77*	26,03 \pm 5,03*	24,13 \pm 3,14*	21,88 \pm 4,80*
92	0	0*	4,02 \pm 0,90*	14,40 \pm 3,22*	29,90 \pm 3,89*	29,00 \pm 3,39*	28,93 \pm 1,65*

Annexe 5 : Cinétique de développement des orobanches fixées sur les racines des plantes de pois chiche (mutants et variété mère (système mini-rhizotron))

Les valeurs présentées sont les moyennes de 3 répétitions \pm Intervalle de confiance (Anova : Bonferroni test, $\alpha = 0,05$)

	Stade	14 JAI	21 JAI	28 JAI	35 JAI	42 JAI	49 JAI	56 JAI
Contrôle	1	4,00 \pm 0,80	22,66 \pm 3,20	7,00 \pm 1,13	8,00 \pm 1,13	6,66 \pm 1,30	3,66 \pm 0,65	3,66 \pm 0,65
	2	0	0	15,66 \pm 1,72	9,00 \pm 1,95	4,66 \pm 2,26	4,00 \pm 1,22	0
	3	0	0	0	7,00 \pm 0,80	4,33 \pm 1,72	4,33 \pm 0,92	3,33 \pm 0,65
	4	0	0	0	0	7,00 \pm 0,80	11,33 \pm 1,72	15,00 \pm 1,13
	5	0	0	0	0	0	0,66 \pm 0,46	2,00 \pm 1,13
	Total		4,0 \pm 0,61	22,6 \pm 2,17	22,66 \pm 2,20	24,00 \pm 1,13	24,00 \pm 2,31	24,00 \pm 1,75
47	1	8,66 \pm 0,92	18,00 \pm 4,93	15,33 \pm 2,35	10,33 \pm 2,61	8,33 \pm 2,35	3,33 \pm 1,72	3,33 \pm 1,72
	2	0	0	7,00 \pm 1,95	8,00 \pm 1,13	3,33 \pm 0,65	1,66 \pm 0,46	0,33 \pm 0,65
	3	0	0	2,00 \pm 1,13	6,00 \pm 1,13	6,00 \pm 1,13	10,00 \pm 2,17	3,33 \pm 0,65
	4	0	0	0	0	6,66 \pm 1,22	8,00 \pm 1,13	16,00 \pm 2,26
	5	0	0	0	0	0	1,33 \pm 0,46	1,33 \pm 0,65
	Total		8,66 \pm 0,71*	18,00 \pm 4,93	24,33 \pm 1,01	24,33 \pm 3,63	24,33 \pm 2,81	24,33 \pm 1,82
12	1	8,00 \pm 1,60	12,66 \pm 4,52	13,33 \pm 1,72	9,66 \pm 0,65	4,00 \pm 1,13	4,00 \pm 1,13	4,00 \pm 1,13
	2	0	4,33 \pm 1,72	7,33 \pm 1,72	5,00 \pm 1,95	2,66 \pm 0,65	2,66 \pm 0,46	0
	3	0	0	0	9,66 \pm 2,35	6,00 \pm 1,13	6,00 \pm 1,60	6,33 \pm 1,30
	4	0	0	0	0	11,66 \pm 2,01	11,66 \pm 2,84	16,33 \pm 1,30
	5	0	0	0	0	0	0	1,66 \pm 1,72
	Total		8,00 \pm 1,23*	17,00 \pm 2,99*	19,66 \pm 1,33	24,33 \pm 3,26	24,33 \pm 2,67	24,33 \pm 4,49
35	1	12,00 \pm 1,60	16,33 \pm 2,26	13,33 \pm 3,63	6,33 \pm 2,35	5,66 \pm 3,26	5,00 \pm 1,95	4,00 \pm 1,13
	2	0	0	9,00 \pm 2,99	4,66 \pm 1,3	2,0 \pm 1,13	1,33 \pm 1,84	0,33 \pm 0,65
	3	0	0	0	11,33 \pm 2,35	4,00 \pm 1,13	2,33 \pm 0,46	2,00 \pm 1,13
	4	0	0	0	0	10,66 \pm 2,81	13,00 \pm 1,13	14,33 \pm 0,65
	5	0	0	0	0	0	0,33 \pm 0,46	1,00 \pm 1,13
	Total		12,00 \pm 1,60*	16,33 \pm 2,26*	22,66 \pm 1,82	22,33 \pm 3,63	22,33 \pm 4,82	22,33 \pm 3,03
21	1	2,33 \pm 1,22	18,66 \pm 2,50	13,66 \pm 1,72	6,33 \pm 0,65	6,00 \pm 1,13	5,66 \pm 1,30	4,33 \pm 0,65
	2	0	0	10,66 \pm 1,72	6,00 \pm 1,13	5,00 \pm 1,13	2,33 \pm 1,84	0
	3	0	0	1,00 \pm 1,13	9,00 \pm 1,13	6,66 \pm 0,65	4,66 \pm 0,92	4,33 \pm 0,65
	4	0	0	0	4,00 \pm 1,13	7,66 \pm 0,92	12,00 \pm 2,26	15,66 \pm 2,35
	5	0	0	0	0	0	0,66 \pm 0,92	1,00 \pm 1,13
	Total		2,33 \pm 1,22*	18,66 \pm 2,99	25,33 \pm 3,31	25,33 \pm 1,30	25,33 \pm 0,50	25,33 \pm 5,35
4	1	3,66 \pm 1,30	14,00 \pm 1,60	10,33 \pm 1,30	7,33 \pm 1,72	4,00 \pm 1,13	3,33 \pm 0,65	3,33 \pm 0,65
	2	0	8,33 \pm 2,61	12,00 \pm 2,26	6,33 \pm 0,65	4,33 \pm 1,30	3,00 \pm 0,80	0,33 \pm 0,65
	3	0	0	2,00 \pm 1,13	13,66 \pm 1,72	5,33 \pm 0,65	6,00 \pm 0,92	3,66 \pm 0,65
	4	0	0	0	0	13,67 \pm 1,66	13,33 \pm 1,30	17,33 \pm 2,26
	5	0	0	0	0	0	1,33 \pm 0,46	2,66 \pm 0,65
	Total		3,66 \pm 1,30	22,33 \pm 2,50	24,33 \pm 1,82	27,33 \pm 2,61	27,33 \pm 2,10	27,33 \pm 2,20
14	1	3,00 \pm 1,60	16,00 \pm 3,39	15,00 \pm 2,99	4,00 \pm 2,26	4,66 \pm 0,57	3,00 \pm 1,13	3,00 \pm 1,13
	2	0	0	6,66 \pm 0,65	5,66 \pm 0,65	3,00 \pm 1,95	1,66 \pm 0,46	0,33 \pm 0,65
	3	0	0	0	12,00 \pm 3,39	7,33 \pm 1,72	1,66 \pm 0,46	2,00 \pm 1,13
	4	0	0	0	0	8,33 \pm 0,92	14,00 \pm 2,99	15,00 \pm 1,13
	5	0	0	0	0	0	1,33 \pm 0,92	1,33 \pm 1,72
	Total		3,00 \pm 1,60*	16,00 \pm 3,39*	21,66 \pm 2,81	21,66 \pm 5,10	21,66 \pm 0,50	21,66 \pm 2,81

	Stade	14 JAI	21 JAI	28 JAI	35 JAI	42 JAI	49 JAI	56 JAI
93	1	5,00± 1,60	18,00± 5,18	15,33± 2,35	10,00± 1,13	3,66± 0,65	3,00± 1,13	3,00± 1,13
	2	0	0	5,00± 1,13	7,66±1,30	3,66± 1,72	1,00± 0,80	0,33± 0,65
	3	0	0	0	5,00±0,80	4,66± 0,65	3,33± 0,46	3,33± 0,65
	4	0	0	0	0	10,67± 1,22	13,66± 2,26	17,00± 1,13
	5	0	0	0	0	0	1,66± 1,22	2,00± 1,13
	Total	5,00± 1,23	18,00± 5,18	20,33± 1,33	22,66±0,65	26,66±2,81	22,66± 1,33	22,66± 1,13
37	1	0	17,00± 2,40	15,00± 2,99	10,66± 2,84	4,00± 1,13	4,00± 1,13	4,00± 1,13
	2	0	0	9,33± 3,97	6,00± 1,95	6,00 ± 1,13	5,66 ± 0,92	0
	3	0	0	0	13,33± 0,65	14,33± 2,35	6,00 ± 0,80	5,33 ± 1,72
	4	0	0	0	0	5,66± 1,22	14,00± 1,95	19,66± 1,30
	5	0	0	0	0	0	0,33 ± 0,46	1,00 ± 1,13
	Total	0*	17,0± 1,85*	24,33± 1,33	30,00±2,26*	30,00± 2,31	30,00±1,51*	30,00±4,07*
6	1	5,33± 0,65	11,66± 2,84	8,66± 1,72	8,33± 0,65	4,66± 2,84	4,33 ± 2,84	3,00± 1,13
	2	0	0	12,66± 1,72	5,33± 1,30	5,33± 1,72	2,00 ± 0,80	0
	3	0	0	0	7,33± 0,65	10,00± 1,96	3,33 ± 0,46	4,33± 0,65
	4	0	0	0	0	3,00± 0,80	13,33± 1,72	14,33± 1,72
	5	0	0	0	0	0	0	1,33± 0,65
	Total	5,33± 0,65	11,60± 2,84*	21,00± 2,31	21,00± 1,13	23,00± 0,80	23,00± 2,31	23,00± 0,87
37	1	0	17,0± 3,39	15,00± 2,99	13,33± 2,35	4,00± 1,13	4,00± 1,13	4,00± 1,13
	2	0	0	9,33± 3,97	5,33± 0,65	6,00 ± 1,13	3,33± 0,46	0
	3	0	0	0	7,66± 0,65	14,33± 2,61	8,00± 0,80	5,33± 1,72
	4	0	0	0	0	5,66± 1,22	14,33± 2,35	19,66± 1,30
	5	0	0	0	0	0	0,33± 0,46	1,00± 1,13
	Total	0*	17,00± 3,39	24,33± 1,33	26,33± 1,30	30,00±2,31*	30,00±1,75*	30,00±4,07*
36	1	0	8,00± 2,99	16,66± 2,84	9,66± 2,84	5,66± 0,65	3,33± 1,30	2,33± 1,72
	2	0	0	4,00± 1,13	16,00± 3,39	4,00± 1,13	2,33± 0,46	1,33± 0,65
	3	0	0	0	0	3,66±1,30	2,66± 0,92	3,66± 1,30
	4	0	0	0	0	10,33± 0,92	15,33± 3,45	16,33± 3,45
	5	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0*	8,00± 2,99*	20,66± 1,82	20,66± 2,84	23,66±1,82	23,66±4,14	23,66±3,07
49	1	5,00± 0,80	10,00± 2,26	11,66± 2,61	6,33± 2,35	5,33± 1,30	4,66± 1,30	2,00± 1,13
	2	0	0	5,00± 1,95	12,00± 1,13	3,33± 2,35	1,66± 0,46	1,66± 0,46
	3	0	0	0	0	8,66±1,30	4,33± 0,46	2,66± 0,65
	4	0	0	0	0	1,00± 0,80	7,66± 0,65	12,00± 2,99
	5	0	0	0	0	0	0	0
	Total	5,0± 0,80	10,00± 2,26*	16,66± 3,07	18,33±1,72*	18,33±1,33*	18,33±0,50*	18,33± 2,61*
55	1	3,00± 1,38	11,00± 1,95	11,66± 3,45	3,33± 0,65	7,33± 0,65	4,00± 1,13	3,66± 1,30
	2	0	0	8,00± 1,95	18,00± 1,95	15,00± 2,26	2,00± 0,80	1,66± 0,65
	3	0	0	0	0	0	2,00± 0,80	1,00± 1,13
	4	0	0	0	0	0	14,33± 2,84	16,00± 1,13
	5	0	0	0	0	0	0	0
	Total	3,00± 1,38	11,00± 1,80*	19,66± 4,14	21,66± 2,35	22,33± 1,33	22,33± 2,67	22,33± 0,65*

	Stade	14 JAI	21 JAI	28 JAI	35 JAI	42 JAI	49 JAI	56 JAI
11	1	0	10,00± 2,99	2,00± 1,13	8,33± 3,45	4,66± 1,72	3,66± 1,30	3,33± 0,65
	2	0	0	10,00± 4,07	10,66± 2,35	5,33± 1,30	2,66±0,46	1,66± 0,65
	3	0	0	0	0	9,33± 2,84	3,33± 1,22	0,66± 0,65
	4	0	0	0	0	0	9,33± 1,30	12,33± 0,65
	5	0	0	0	0	0	0,33± 0,46	1,33± 1,72
	Total	0*	10,00± 2,99*	12,00± 3,03*	19,00± 1,13*	19,33± 1,33*	19,33± 2,50*	19,33±1,33*
67	1	0	18,00± 2,99	11,66± 1,72	7,33± 1,72	6,66± 1,30	5,66± 0,65	5,66± 0,65
	2	0	0	12,66± 2,35	5,00± 2,99	2,33± 1,30	0,66± 0,46	0,33± 0,65
	3	0	0	0	12,00± 3,66	15,33± 0,65	2,66± 1,22	1,33± 0,65
	4	0	0	0	0	0	15,33± 1,72	14,33± 0,65
	5	0	0	0	0	0	0	2,66± 0,65
	Total	0*	18,00± 2,99	24,33± 2,20	24,33± 2,35	24,33± 1,33	24,33± 1,01	24,33± 1,72
72	1	7,00± 0,80	4,66± 0,65	7,66± 1,13	7,66± 1,13	7,00± 1,13	6,66± 1,72	4,66±2,84
	2	0	11,33± 2,35	9,66± 2,84	10,66± 3,63	2,33± 2,84	1,66± 0,46	2,33± 0,65
	3	0	0	0	0	10,66± 1,72	1,00± 0,80	0,33± 0,65
	4	0	0	0	0	0	10,00± 1,95	11,00± 1,13
	5	0	0	0	0	0	0,66±0,46	1,66± 0,65
	Total	7,00± 0,80*	16,00± 1,75*	17,33± 5,10	18,33± 5,69	20,00± 3,82	20,00± 2,31	20,00± 1,95*
13	1	4,00±0,61	16,66± 2,26	7,00± 1,95	8,33± 0,65	6,33± 0,65	6,00± 1,13	7,33± 0,65
	2	0	0	11,00± 1,13	11,33± 2,35	3,00± 1,13	1,00± 0,80	0
	3	0	0	0	0	7,66± 0,65	2,66± 0,92	0
	4	0	0	0	0	4,33± 0,46	11,66± 1,72	13,00± 4,07
	5	0	0	0	0	0	0	1,00± 1,13
	Total	4,00± 0,61	16,66± 2,26*	18,00 ± 0,87	19,66± 2,61*	21,33± 1,33	21,33± 1,82	21,33± 3,80
83	1	12,00± 2,40	17,0± 3,39	8,66± 1,30	9,33± 1,72	7,33± 2,35	6,00± 1,13	8,00±1,13
	2	0	0	8,33± 2,61	12,33± 3,26	2,66± 1,72	1,00 ±0,80	0
	3	0	0	0	0	12,33± 2,84	2,33± 0,46	1,33± 1,30
	4	0	0	0	0	0,33±0,46	13,00± 4,07	11,66± 0,65
	5	0	0	0	0	0	0,33± 0,46	1,66± 0,65
	Total	12,00± 2,40*	17,0± 3,39	17,0± 1,75*	21,66± 1,30	22,6± 3,64	22,66± 4,98	22,66± 1,30
60	1	8,00± 0,80	5,00± 1,95	7,00± 2,99	8,33± 0,66	8,66± 1,72	6,33± 1,30	6,33± 0,65
	2	0	11,00±1,13	12,66± 2,35	14,33± 3,45	3,00± 1,13	2,33± 0,46	1,66± 0,65
	3	0	0	0	0	9,33±2,84	2,66± 0,92	1,00± 1,13
	4	0	0	0	0	1,66± 0,46	11,00± 1,13	13,00±4,07
	5	0	0	0	0	0	0,33± 0,46	0,66± 0,65
	Total	8,00± 0,80*	16,00± 2,9*	19,66± 3,64	22,66± 3,63	22,66± 3,31	22,66±1,33	22,66±3,63
90	1	6,00± 1,60	14,00± 2,99	7,66± 1,72	4,33± 1,30	5,33± 1,30	3,66± 0,65	3,66± 0,65
	2	0	0	7,33± 1,30	6,66± 1,30	3,00± 1,13	0,66± 0,46	0
	3	0	0	0	9,66± 2,01	1,66± 1,30	2,00± 0,80	2,00± 1,13
	4	0	0	0	0	12,00± 0,80	15,33± 2,35	15,00± 2,99
	5	0	0	0	0	0	0,33± 0,46	1,33± 0,65
	Total	6,00± 1,60	14,00± 2,99*	15,00± 2,31*	20,66± 1,72	22,00± 1,75	22,00± 3,50	22,00± 2,35

	Stade	14 JAI	21 JAI	28 JAI	35 JAI	42 JAI	49 JAI	56 JAI
81	1	0	17,00± 4,52	6,33± 2,84	5,00± 0,65	5,00± 1,13	4,66± 0,65	4,66± 0,65
	2	0	0	11,00± 3,39	1,66± 0,65	1,33± 1,72	0,33± 0,46	0
	3	0	0	0	13,33± 1,84	13,66± 1,72	4,66± 0,92	4,66± 1,30
	4	0	0	0	0	0	10,66± 2,61	10,33± 1,72
	5	0	0	0	0	0	0,33± 0,46	1,00± 1,13
	Total	0*	17,00± 4,52	17,33± 4,32	20,00± 1,95	20,00± 3,03	20,66± 3,64	20,66± 2,84*
86	1	0	12,00± 2,99	4,33± 1,72	8,66± 2,26	5,33± 0,65	5,33± 0,65	5,33± 1,72
	2	0	0	9,00± 2,64	9,33± 1,72	3,33± 0,65	0,66± 0,46	0,66± 1,30
	3	0	0	0	0	3,00± 1,13	1,33± 0,46	0,33± 0,65
	4	0	0	0	0	6,33± 0,46	10,66± 1,30	11,33± 3,63
	5	0	0	0	0	0	0	0,33± 0,65
	Total	0*	12,00± 2,99*	13,33± 3,64*	18,00± 2,99*	18,00± 1,51*	18,00± 2,31*	18,00± 4,07
89	1	3,00± 1,60	9,00± 2,26	1,33± 1,30	4,66± 0,65	3,00± 1,95	2,00± 1,13	5,00± 1,13
	2	0	0	8,00± 1,95	14,33± 1,72	2,66± 2,35	1,66± 0,46	0
	3	0	0	0	0	14,00± 2,99	5,33± 0,46	2,33± 0,65
	4	0	0	0	0	0	10,66± 1,72	10,33± 1,72
	5		0	0	0	0	0	2,00± 1,13
	Total	3,00± 1,60	14,0± 1,6*	9,33± 0,50*	19,00± 1,96*	19,33± 1,82*	19,66± 1,82*	19,66± 0,65*
51	1	2,00± 0,80	8,33± 1,72	5,66± 1,72	6,00± 1,13	5,33± 1,30	7,66± 1,30	4,00± 1,13
	2	0	0	11,00± 4,52	12,00± 2,99	5,66± 1,72	3,00± 0,80	2,00± 1,13
	3	0	0	0	0	7,33± 1,30	15,00± 2,26	11,67± 3,45
	4	0	0	0	0	0	0	0,33± 0,65
	5	0	0	0	0	0	0	0
	Total	2,00± 0,61*	8,33± 1,72*	16,66± 4,49	18,00± 2,99	18,33± 1,82*	18,33± 2,02	18,33± 3,39
52	1	0	6,33± 1,72	4,00± 2,26	3,00± 1,95	3,33± 1,30	3,33± 1,72	4,00± 1,13
	2	0	0	7,00± 1,95	11,33± 1,72	9,00± 1,95	3,00± 1,60	2,00± 1,13
	3	0	0	0	0	2,66± 0,65	8,66± 1,22	1,00± 1,13
	4	0	0	0	0	0	0	8,00± 1,13
	5	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0*	6,33± 1,72*	11,00± 2,31*	14,33± 2,35*	15,00± 1,75*	15,00± 0,87*	15,00± 1,95*
9	1	0	0	5,00± 1,13	3,33± 0,65	8,33± 4,28	6,00± 1,95	6,00± 1,13
	2	0	0	0	4,00± 1,13	4,00± 1,13	2,66± 0,46	0
	3	0	0	0	0	0,33± 0,65	3,66± 0,92	4,66± 1,30
	4	0	0	0	0	0	0,66± 1,30	2,33± 1,72
	5	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0*	0*	5,0± 1,13*	7,33± 1,72*	13,00± 1,75*	13,00± 1,75*	13,00± 0,87*
10	1	0	0	8,33± 1,72	4,00± 1,13	5,33± 0,65	6,66± 0,65	6,33± 1,30
	2	0	0	0	4,66± 3,45	3,66± 0,65	2,33± 1,22	1,66± 1,33
	3	0	0	0	0	0	2,33± 1,22	2,66± 1,30
	4	0	0	0	0	0	0	0,66± 1,30
	5	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0*	0*	8,00± 1,72	8,66± 2,35*	9,00± 0,87*	11,33± 2,81*	11,33± 0,50*

	Stade	14 JAI	21 JAI	28 JAI	35 JAI	42 JAI	49 JAI	56 JAI
62	1	0	0	3,00±1,12	7,66± 1,30	7,00± 1,13	6,66± 0,65	6,00± 1,13
	2	0	0	0	2,00± 1,13	3,00± 2,26	0,66± 0,46	0,33± 0,65
	3	0	0	0	0	0	3,00± 0,80	2,00± 1,13
	4	0	0	0	0	0	0	1,66± 1,72
	5	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0*	0*	3,00± 1,12*	9,66± 0,65*	10,00± 1,82*	10,00± 0,87*	10,00± 2,26*
63	1	0	1,00± 1,13	4,66± 1,30	4,66± 1,30	5,00± 1,13	3,66± 0,65	1,66± 0,65
	2	0	0	0	1,33± 1,72	1,00± 1,13	0,66± 0,46	2,33± 0,065
	3	0	0	0	0	0	1,66± 0,46	2,00 ± 1,13
	4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0*	1,00± 1,13*	4,66± 1,01*	6,00± 1,13*	6,00± 0,87*	6,00± 0,87*	6,00± 0,65*
92	1	0	1,00± 1,13	0,66± 0,65	5,00± 1,95	9,33± 3,26	8,00± 1,13	8,00± 1,95
	2	0	0	0,66± 0,65	1,66± 2,35	3,33± 1,03	0,33± 0,46	0
	3	0	0	0	0	0	4,33± 0,46	1,33± 1,30
	4	0	0	0	0	0	0	3,33± 0,65
	5	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0*	1,00± 1,13*	1,33± 0,50*	6,66± 1,72*	12,66± 3,54*	12,66± 1,01*	12,66± 1,72*

Annexe 6 : Développement d'*O. foetida* sur le système racinaire du pois chiche (mini-rhizotron)

a : germination, b : début de fixation, c : formation d'un tubercule, d : début de fixation nécrosée, e : tubercule nécrosé, f : début de nécrose d'orobanche fixée en stade 3)

**Annexe 7 : Phénotypes des orobanches (*O. foetida*) parasitant la variété témoin non irradiée (a) et les mutants résistants de la M2 (9, 10, 62, 63 et 92 (b, c, d) au 56^{ième} JAI (système mini-rhizotron).**

Annexe 8: Cinétique d'exsudation du pouvoir stimulant de la variété témoin non irradiée et des mutants M3 de pois chiche vis-à-vis de la germination des graines d'*O. foetida*.

Les données sont les moyennes de 3 répétitions \pm intervalle de confiance (Bonferroni test, $\alpha=0,05$).*: valeur significativement différente de celle de la lignée témoin (à la même date d'exsudation).

	7 j	14 j	21 j	28 j	35 j	42 j	49 j
T	0	15,53 \pm 3,65	31,23 \pm 2,54	46,56 \pm 3,00	72,59 \pm 7,57	68,94 \pm 1,80	60,81 \pm 5,26
47	0	15,11 \pm 2,41	30,78 \pm 4,23	41,10 \pm 3,22*	68,76 \pm 3,50	59,36 \pm 3,51*	52,26 \pm 4,59*
55	0	15,3 \pm 2,74	26,56 \pm 5,60	40,03 \pm 2,73*	64,30 \pm 4,78	56,30 \pm 3,96*	48,47 \pm 3,23*
9	0	7,03 \pm 1,35*	19,36 \pm 3,22*	28,83 \pm 1,76*	32,85 \pm 5,76*	27,90 \pm 3,40*	23,53 \pm 2,02*
10	0	0*	10,33 \pm 3,62*	24,10 \pm 2,26*	32,26 \pm 2,15*	24,06 \pm 2,15*	21,56 \pm 1,75*
62	0	7,31 \pm 1,81*	17,63 \pm 2,59*	23,73 \pm 2,49*	29,77 \pm 4,81*	24,26 \pm 2,93*	21,46 \pm 1,88*
63	0	5,30 \pm 1,00*	6,14 \pm 1,18*	19,31 \pm 1,07*	28,41 \pm 6,32*	19,69 \pm 0,83*	17,74 \pm 1,62*
92	0	1,99 \pm 0,33*	11,61 \pm 1,76*	17,17 \pm 1,62*	27,33 \pm 2,34*	24,79 \pm 1,44*	17,7 \pm 1,89*

T : témoin

Annexe 9 : Cinétique de développement des orobanches fixées sur la variété témoin contrôle et les mutants M3 d'intérêt de pois chiche (système mini-rhizotron),

Les valeurs présentées sont les moyennes de 3 répétitions \pm Intervalles de Confiance (Anova, Test de Bonferroni, $\alpha=0,05$),

	Stade	14 JAI	21 JAI	28 JAI	35 JAI	42 JAI	49 JAI	56 JAI
Contrôle	1	4,33 \pm 1,72	19,66 \pm 5,34	8,33 \pm 0,65	6,33 \pm 0,65	5,66 \pm 1,72	4,33 \pm 0,65	2,66 \pm 0,65
	2	0	0	12,00 \pm 3,39	7,33 \pm 0,65	4,66 \pm 0,65	1,33 \pm 0,65	0,33 \pm 0,65
	3	0	0	0	7,66 \pm 1,72	4,66 \pm 1,30	1,00 \pm 1,13	1,66 \pm 0,65
	4	0	0	0	0	6,00 \pm 1,13	13,66 \pm 2,84	15,00 \pm 1,95
	5	0	0	0	0	0,33 \pm 0,65	1,00 \pm 1,13	1,66 \pm 0,65
	Total	4,33 \pm 1,72	19,66 \pm 5,34	20,33 \pm 2,44	21,33 \pm 0,46	21,33 \pm 3,63	21,33 \pm 3,54	21,33 \pm 2,35
47	1	8,33 \pm 1,72	16,00 \pm 5,98	11,33 \pm 3,63	5,00 \pm 4,07	3,33 \pm 2,84	3,33 \pm 2,35	3,00 \pm 2,26
	2	0	0	7,66 \pm 2,35	3,66 \pm 1,72	2,66 \pm 0,65	0,66 \pm 0,65	0,33 \pm 0,65
	3	0	0	1,00 \pm 1,13	13,00 \pm 1,13	3,33 \pm 0,65	1,33 \pm 0,65	1,00 \pm 1,13
	4	0	0	0	0	9,33 \pm 1,72	13,66 \pm 1,72	14,66 \pm 0,65
	5	0	0	0	0	0,66 \pm 1,30	2,00 \pm 1,13	2,00 \pm 1,13
	Total	8,33 \pm 1,72*	16,00 \pm 5,98	20,00 \pm 3,48	21,00 \pm 4,28	21,00 \pm 1,51	21,00 \pm 2,99	21,00 \pm 1,72
55	1	4,33 \pm 2,84	15,00 \pm 2,99	8,00 \pm 2,99	5,00 \pm 1,13	4,00 \pm 2,26	3,00 \pm 1,13	3,00 \pm 1,13
	2	0	0	13,00 \pm 4,93	14,33 \pm 1,72	4,33 \pm 1,30	2,66 \pm 1,72	2,66 \pm 1,72
	3	0	0	0	2,33 \pm 0,65	2,33 \pm 0,65	1,00 \pm 1,95	0
	4	0	0	0	0	9,66 \pm 2,35	13,66 \pm 1,72	14,66 \pm 1,30
	5	0	0	0	0	1,33 \pm 1,72	1,33 \pm 1,72	1,33 \pm 1,72
	Total	4,33 \pm 2,84	15,00 \pm 2,99	21,00 \pm 3,39	21,66 \pm 2,35	21,66 \pm 4,28	21,66 \pm 3,97	21,66 \pm 1,72
9	1	0	1,00 \pm 1,13	5,66 \pm 1,30	3,66 \pm 0,65	4,33 \pm 1,30	4,33 \pm 1,30	4,00 \pm 1,13
	2	0	0	0	4,66 \pm 1,72	3,33 \pm 0,65	2,00 \pm 1,95	1,33 \pm 1,30
	3	0	0	0	0	0,66 \pm 0,65	2,00 \pm 1,95	3,00 \pm 1,13
	4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0*	1,00 \pm 1,13*	5,66 \pm 1,30*	8,33 \pm 2,35*	8,33 \pm 1,30*	8,33 \pm 1,30*	8,33 \pm 3,35
10	1	0	0	2,66 \pm 2,84	2,66 \pm 0,65	2,33 \pm 1,30	2,00 \pm 1,13	1,66 \pm 0,65
	2	0	0	0,66 \pm 0,65	3,66 \pm 0,65	3,00 \pm 1,13	2,66 \pm 0,65	0,33 \pm 0,65
	3	0	0	0	0	1,00 \pm 1,13	1,66 \pm 0,65	3,66 \pm 1,30
	4	0	0	0	0	0	0	0,66 \pm 0,65
	5	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0*	0*	3,33 \pm 2,84*	6,33 \pm 1,30*	6,33 \pm 1,35*	6,33 \pm 1,73*	6,33 \pm 1,30*

	Stade	14 JAI	21 JAI	28 JAI	35 JAI	42 JAI	49 JAI	56 JAI
62	1	0	0	3,00± 1,13	7,33± 0,65	6,00± 2,2	6,00± 1,13	6,00± 1,13
	2	0	0	2,00± 1,13	2,00± 1,13	2,00± 1,13	1,00± 1,13	0,33± 0,65
	3	0	0	0	0	1,33± 0,65	3,33± 1,72	2,33± 0,65
	4	0	0	0	0	0	0	0,66± 0,65
	5	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0*	0*	5,00± 1,13*	9,33± 1,72*	9,33± 2,61*	10,33± 1,72*	9,33± 1,30*
63	1	0	0	5,00± 1,95	5,00± 2,26	3,00± 1,13	3,00± 1,13	3,00± 1,13
	2	0	0	0	1,66± 0,65	2,66± 0,65	1,33± 0,65	0,66± 0,65
	3	0	0	0	0	1,00± 1,13	2,33± 0,65	3,00± 1,71
	4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0*	0*	5,00± 1,95*	6,66± 2,35*	6,66± 2,84*	6,66± 1,30*	6,66± 0,65*
92	1	0	3,00± 1,95	5,66± 1,30	5,33± 2,03	4,00± 1,13	3,66± 0,65	3,66± 0,65
	2	0	0	0	1,00± 1,13	2,00± 1,13	1,00± 1,13	0,33± 0,65
	3	0	0	0	0	0,33± 0,65	1,66± 0,65	1,66± 0,65
	4	0	0	0	0	0	0	0,66± 0,65
	5	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0*	3,00± 1,95*	5,66± 1,30*	6,33± 2,30*	6,33± 1,72*	6,33± 1,72*	6,33± 1,30*

Stades de développement identifiés en accord avec l'échelle de notation de Labrousse *et al.* (2001) –Stade 1= orobanche germée et fixation sur les racines de l'hôte

-Stade 2 : formation de tubercules

-Stade 3 : tubercule possédant de nombreuses racines adventives

-Stade 4 : tubercule possédant un bourgeon de croissance

-Stade 5 : tubercule avec hampe florale

Références Bibliographiques

-A-

- **Abang M.M., Bayaa B., Abu-Irmaileh B.E. and Yahyaoui A. 2007.** A participatory farming system approach for sustainable broomrape (*Orobanche* spp.) management in the Near East and North Africa. *Crop Protection*. **26**. 1723–1732.
- **Abbes Z., Kharrat M., Delavault P., Simier P. and Chaïbi W. 2007.** Field evaluation of the resistance of some faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes to the parasitic weed *Orobanche foetida* Poir. *Crop Protection*. **26(1)**. 777-784.
- **Abbes Z., Kharrat M., Delavault P., Chaïbi W. and Simier P. 2009.** Nitrogen and carbon relationships between the parasitic weed *Orobanche foetida* and susceptible and resistant faba bean lines. *Plant Physiology and Biochemistry*. **47**.153-159.
- **Abbes Z., Kharrat M., Shaaban K. and Bayaa B. 2010.** Comportement de différentes accessions améliorées de féverole (*Vicia faba* L.) vis-a-vis d'*Orobanche crenata* Forsk. et *Orobanche foetida* Poir. *Cahier Agricole*. **19**. 194-199.
- **Abdel-Hady M.S., Abo El-Kheir Z.A., Hassan E.A. and Abd El-Hamed A.R. 2008.** Biochemical markers to *Orobanche crenata* tolerance in irradiated *Vicia Faba* L. *Journal of Applied Science Research*. **4(12)**. 1906-1924.
- **Agriculture and Agri-Food Canada. 2006.** Chickpea: Situation and outlook. *Bi-weekly Bulletin*. **19(13)**.122.
- **Ahuja S., Singh B., Gupta V.K., Singhal R. K. and Babu P.V. 2014.** Very low dose gamma irradiation stimulates gaseous exchange and carboxylation efficiency, but inhibits vascular sap flow in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *International Journal of Radiation Biology*. **90**. 179–186.
- **Akiyama K., Matsuzaki K. and Hayashi H. 2005.** Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*. **435**. 824-827.
- **Al-Wakeel S., Moubasher H., Gabr M. and Madany M.M.Y. 2012.** Induction of systemic resistance in tomato plants against *Orobanche ramosa* L. using hormonal inducers. *Egyptian Journal of Botany*. **52 (2)**. 1-17.
- **Arnon D.I. 1949.** Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*. **24**. 1–15.

-B-

- **Bagher A.M., Askari N., Mohsen M. and Vahid M.B. 2014.** Nuclear techniques in agriculture and genetics. *American Journal of Bioscience*. **2(3)**. 102-105.

- **Bakht J., Bano A. and Dominy P. 2006.** The role of abscisic acid and low temperature in chickpea (*Cicer arietinum*) cold tolerance. II. Effects on plasmamembrane structure and function. *Journal of Experimental Botany*. **57**. 707–715.
- **Bar Nun N. and Mayer A.M. 1993.** Preconditioning and germination of Orobanche seeds: respiration and protein synthesis. *Phytochemistry*. **34**. 39–45.
- **Bar-Nunn N., Sachst T. and Mayer A.M. 2008.** A Role for IAA in the Infection of *Arabidopsis thaliana* by *Orobanche aegyptiaca*. *Annals of Botany*. **101**. 261–265.
- **Barghouthi S. and Salman M. 2010.** Bacterial inhibition of *Orobanche aegyptiaca* and *Orobanche cernua* radical elongation. *Biocontrol Science Technology*. **20(4)**. 423–435.
- **Beck van Mannagetta G. 1930.** Orobanchaceae. In: Engler A (ed). *Das Pflanzenreich*, vol IV. Verlag von Wilhelm Engelman, Leipzig. 341-348.
- **Ben Mbarek K., Boujelben A., Boubaker M. and Hanachi C. 2009.** Criblage et performances agronomiques de 45 géotypes de pois chiche (*Cicer arietinum* L.) soumis à un régime hydrique limité. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. **13(3)**. 381-393.
- **Ben-Hod G., Losner D., Joel D.M. and Mayer A.M. 1991.** In vitro culture of *Orobanche aegyptiaca*. *Annals of Botany*. **68**.413-416.
- **Berger J.D., Turner N.C., Siddique K. H. M., Knights E.J., Brinsmead R.B., Mock I., Edmondson C. and Khan T. N. 2004.** Genotype by environment studies across Australia reveals the importance of phenology for chickpea (*Cicer arietinum* L.) improvement. *Australian Journal of Agricultural Research*. **55**. 1-14.
- **Berger J.D. 2007.** Eco-geographic and evolutionary approaches to improving adaptation of autumn-sown chickpea (*Cicer arietinum* L.) to terminal drought: The search for reproductive chilling tolerance. *Field Crops Research*. **104**. 112–122.
- **Boari A. and Vurro M. 2004.** Evaluation of *Fusarium spp.* and other fungi as biological control agents of broomrape (*Orobanche ramosa*). *Biological Control*. **30**. 212–219.
- **Boeuf F. 1905.** Les Orobanches en Tunisie. *Journal d'Agriculture Pratique*. 69 ème année – 1er semestre. **9**. 11-14.
- **Bouhadida M., Ben Jannet R., Abbas Z., Amri M. and Kharrat M. 2015.** Analysis of Genetic Diversity of *Orobanche foetida* Population Parasitizing Crop Legume. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*. **8(3)**. 37-40.

- **Bouwmeester H.J., Matusova R., Zhongkui S. and Beale M.H. 2003.** Secondary metabolite signaling in host-parasitic plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology*. **6**. 358–364.
- **Boye J., Zare F. and Pletch A. 2010.** Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*. **43 (2)**. 414-431.
- **Bradford M.M. 1976.** A Rapid and Sensitive Method for Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. **72**. 248-254.
- **Brahmi I., Mabrouk Y., Charaabi K., Delavault .P., Simier P. and Belhadj O. 2014.** Induced mutagenesis through gamma radiation in chickpea (*Cicer arietinum L.*): developmental changes and improved resistance to the parasitic weed *Orobanche foetida* Poir. *International Journal of Advanced Research*. **2(11)**. 670-684.
- **Brault M., Betsou F., Jeune B., Tuquet C. and Sallé G. 2007.** Variability of *Orobanche ramosa* populations in France as revealed by cross infestations and molecular markers. *Environmental and Experimental Botany*. **67**. 271–280.
- **Brewera P. B., Koltaib H. and Beveridgea C.A. 2013.** Diverse Roles of Strigolactones in Plant Development. *Molecular Plant*. **6(1)**. 18–28.
- **Brunt A.A., Crabtree K., Dallwitz M.J., Gibbs A.J., Watson L. and Zurcher E.J. 1996.** Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996.

-C-

- **Canci H. and Toker C. 2009.** Evaluation of Yield Criteria for Drought and Heat Resistance in Chickpea (*Cicer arietinum L.*). *Journal of Agronomy and Crop Science*. **195**. 47–54.
- **Castillo P., Navas-Cortés J. A., Gomar-Tinoco D., Di Vito M. and Jiménez-Díaz R. M. 2003.** Interactions between *Meloidogyne artiellia*, the cereal and legume root-knot nematode, and *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris race 5 in chickpea. *Phytopathology*. **93**. 1513-1523.
- **Castillejo M.A., Amiour N., Dumas-Gaudot E., Rubiales D. and Jorriin J.V. 2004.** A proteome approach to studying plant response to crenate broomrape (*Orobanche crenata*) in pea (*Pisum sativum*). *Phytochemistry*. **65**. 1817–1828.

- **Chen L.M., Lin C.H. and Kao C.H. 2000.** Cooper toxicity in rice seedlings: Changes in antioxidative enzyme activities, H₂O₂ level, and cell wall peroxidase activity in roots. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. **41**. 99-103.
- **Chongo G., Buchwaldt L., Gossen B.D., Lafond G.P., May W.E., Johnson E.N. and Hogg T. 2003.** Foliar fungicides to manage *Ascochyta* blight (*Ascochyta rabiei*) of chickpea in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*. **25(2)**. 135–142.
- **Chowdhury M.A., Vandenberg B. and Warkentin T. 2002.** Cultivar identification and genetic relationship among selected breeding lines and cultivars in chickpea (*Cicer arietinum L.*). *Euphytica*. **127**. 317–325.
- **Chranowski G., Ciepiela A.P., Sprawka I., Sempruch C., Sytkiewicz H. and Czerniewicz P. 2003.** Activity of polyphenol oxidase in the ears of spring wheat and triticale infested by grain aphid (*Sitobion avenae*). *Electronic Journal of Polish Agriculture Universities*. **6**. 132-139.
- **Clement S.L., Wightman J.A., Hardie D.C., Bailey P., Baker G. and McDonald G. 2000.** Opportunities for integrated management of insect pests of grain legumes. In: *Linking research and marketing opportunities for pulses in the 21st century*, R. Knight, (ed.), 467–480. Kluwer Academic, ISBN0-7923-5565-2, Dordrecht, The Netherlands.
- **Coïc Y. and Lesaint C. 1975.** La nutrition minérale et en eau des plantes en horticulture avancée. In: *La documentation technique de la SCPA*. **23**. 1-22.
- **Colquhoun J.B., Eizenberg H. and Mallory Smith C.A. 2006.** Herbicide placement site affects small broomrape (*Orobanche minor*) control in red clover (*Trifolium pratense*). *Weed Technology*. **20**. 356-360.
- **Croser J.S., Clarke H.J., Siddique K.H.M. and Khan T.N. 2003.** Low temperature stress: implications for chickpea (*Cicer arietinum L.*) improvement. *Critical Reviews in Plant Sciences*. **22**. 185–219.
- **Cubero J.I. and Hernández L. 1991.** Breeding faba bean (*Vicia faba L.*) for resistance to *Orobanche crenata Forsk.* *Options Méditerranéennes*. **10**. 51–57.
- **Cubero J.I., Pieterse A.H., Khalil S.A. and Sauerborn J. 1994.** Screening techniques and sources of resistance to parasitic angiosperms. *Euphytica*. **73**. 51–58.
- **Cunnington J., Lindbeck K., Rodney H. and Jones J. 2009.** Diagnostic methods for Fusarium wilt of Chickpea (*Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*). *Plant Biosecurity Toolbox*. 1-

-D-

- **Daly K. and Thompson K.H. 1975.** Quantitative dose–response of gr development in *Arabidopsis thaliana* exposed to chronic gamma-radiation. *International journal of radiation biology and related studies in physics chemistry and medicine.* **28.** 61–66.
- **Davidson J.A., Pande S., Bretag T.W., Lindbeck K.D. and Kishore G.K. 2004.** Biology and management of *Botrytis* spp. in legume crops. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N (eds). *Botrytis: Biology, Pathology and Control.* Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 295-318.
- **Davies S.L., Turner N.C., Siddique K.H.M., Plummer J.A. and Leport L. 1999.** Seed growth of desi and kabuli chickpea, (*Cicer arietinum L.*) in a short-season Mediterranean-type environment. *Australian Journal of Experimental Agriculture.* **39.** 181–188.
- **Delobel A. and Delobel B. 2005.** Les plantes hôtes des bruches (*Coleoptera Bruchidae*): données nouvelles et corrections. *Bulletin Mensuel de la Société Linnéenne de Lyon.* **74 (7–8).** 277–291.
- **DGPA. 2006.** *Annuaire statistique de la Direction générale de la pêche et de l'aquaculture (DGPA).* Tunis, Tunisie.33.
- **DGPA. 2011.** *Annuaire statistique de la Direction générale de la pêche et de l'aquaculture (DGPA).* Tunis, Tunisie.74.
- **Dinesha M.S., Dhanapal G.N., Prabhudev Dhumgond N.S., Vignesh V., Madhukumar and Raghavendra K. 2012.** Efficiency and economics of broomrape (*Orobanche cernua* Loefl.) control with herbicides in infested tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) field. *Plant Archives.* **12(2).** 833-836
- **Donà M., Ventura L., Macovei A., Confalonieri M., Savio M., Giovannini A., Carbonera D. and Balestrazzi A. 2013.** Gamma irradiation with different dose rates induces different DNA damage responses in *Petunia x hybrida* cells. *Journal of Plant Physiology.* **170.**780–787.
- **Dörr I., Staack A. and Kollmann R. 1994.** Resistance of *Helianthus* to *Orobanche* histological and cytological studies. In: Pieterse AH, Verkleij JAC, ter Borg SJ, eds. *Proceedings of the 3rd International Workshop on Orobanche and Related Striga Research.* Amsterdam: Royal Tropical Institute, 276–289.
- **Dörr I. 1996.** New results on interspecific bridges between parasites and their hosts. *Congresos y Jornadas - Junta de Andalucía. JA DGIA.*

- **Dörr I. 1997.** How *Striga* Parasitizes its Host: a TEM and SEM Study. *Annals of Botany*. **79**. 463.
- **Dos Santos V. C., Delavault P., Letousey P. and Thalouarn P. 2003a.** Identification by suppression subtractive hybridization and expression analysis of *Arabidopsis thaliana* putative defence genes during *Orobanche ramosa* infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **62**. 297–303.
- **Dos Santos V.C., Letousey P., Delavault P. and Thalouarn P. 2003b.** Defence gene expression analysis of *Arabidopsis thaliana* parasitized by *Orobanche ramosa*. *Phytopathology*. **93**. 451–457.
- **Doyle J.J. and Doyle J.L. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. **19**.11-15.
- **Draie R., Péron T., Pouvreau J.B., Véronési C. and Jégou S. 2011.** Invertases involved in the development of the parasitic plant *Phelipanche ramosa*: characterization of the dominant soluble acid isoform, PrSAI1. *Molecular Plant Pathology*. **12**. 638–652.
- **Dubey S.C and Singh B. 2004.** Reaction of chickpea genotypes against *Fusarium osysporum* f. sp. *Ciceri* causing vascular wilt. *Indien Phytopathology*. **57**. 233.
- **Dun E.A., De Saint Germain A., Rameau C. and Beveridge C.A. 2012.** Antagonistic Action of Strigolactone and Cytokinin in Bud Outgrowth Control. *Plant Physiology*. **158**. 487–498.

-E-

- **Eizenberg H., Colquhoun J.B. and Mallory-Smith C.A. 2006.** Imazamox application timing for small broomrape (*Orobanche minor*) control in red clover (*Trifolium pratense*). *Weed Science*. **54**. 923-927.
- **Eizenberg H., Hershenhorn J. and Ephrath J.H. 2013.** Parasitic Mechanisms and Control Strategies. *Parasitic Orobanchaceae*. Springer-Verlag: Berlin. **2**. 415-432.
- **Ellis R.H., Lawn R.J., Summerfield R.J., Qi A., Roberts E.H., Chay P.M., Brouwer J.B., Rose J.L., Yeates S.J. and Sandover S. 1994.** Towards the reliable prediction of time to flowering in six annual crops.V. Chickpea. *Journal of Experimental Agriculture*. **30**. 271–282.
- **Encheva J., Christov M., Nenov N., Tsvetkova F., Ivanov P., Shindrova P. and Encheva V. 2003.** Developing genetic variability in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by combined use of hybridization with gamma radiation or ultrasound. *Helia*. **26**. 99-108.

- **Encheva J., Shindrova P., Encheva V. and Valkova D. 2012.** Treated plant sunflower line R 12003, produced through *in vitro* mutagenesis. *Helia*. **35**. 19-30.
- **Echevarriá-Zomenó S., Pérez-de-Luque A., Jorrín J. and Maldonado A. M. 2006.** Pre-haustorial resistance to broomrape (*Orobanche cumana*) in sunflower (*Helianthus annuus*): cytochemical studies. **57(15)**.4189–4200.
- **Esnault M., Legue F. and Chenal C. 2010.** Ionizing radiation: advances in plant response. *Environmental Experimental Botany*. **68**. 231–237.
- **Evidente A., Fernandez-Aparicio M., Andolfi A., Rubiales D. and Motta A. 2007.** Trigoxazonane, a monosubstituted trioxazonane by *Trigonella foenum-graecum* root exudate, inhibiting agent of *Orobanche crenata* seed germination. *Phytochemistry*. **68** 2487–2492.
- **Evidente A., Cimmino A., Fernández-Aparicio M., Andolfi A., Rubiales D. and Motta A. 2010.** Polyphenols, including the new Peapolyphenols A-C, from pea root exudates stimulate *Orobanche foetida* seed germination. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **58(5)**. 2902-2907.

-F-

- **FAO. 1996.** <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPS/Pgrfa/pdf/tunisia.pdf>.
- **FAO. 2004.** <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5419e/y5419e00.pdf>.
- **FAO. 2008.** Food and Agriculture Organization of the United Nations production. Progress on Farmer Training In Parasitic Weed Management. Rome-Italy. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/i0015b/i0015b00.pdf>.
- **FAOSTA. 2011.** Food and Agriculture Organization of the United Nations statistics. <http://faostat.fao.org./site/567/desktopdefault.aspx?pageid=567/>
- **Fauquet C.M. and Stanley J. 2003.** Geminivirus classification and nomenclature: progress and problems. *Annals of Applied Biology*. **142**. 165-189.
- **Felsenstein J. 1995.** PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Department of Genetics, University of Washington, Seattle, Washington.
- **Fernández-Aparicio M., Sillero J.C. and Rubiales D. 2007.** Intercropping with cereals reduces infection by *Orobanche crenata* in legumes. *Crop Protection*. **26**. 1166–1172.
- **Fernández-Aparicio M., Pérez-De-Luque A., Prats E. and Rubiales D. 2008a.** Variability of interactions between barrel medic (*Medicago truncatula*) genotypes and *Orobanche* species. *Annals of Applied Biology*. **153**.117–126.

- **Fernández-Aparicio M., Sillero J.C., Pérez-De-Luque A. and Rubiales D. 2008b.** Identification of sources of resistance to crenate broomrape (*Orobanche crenata*) in Spanish lentil (*Lens culinaris*) germplasm. *Weed Research*. **48**. 85–94.
 - **Fernández-Aparicio M., Soto M.J., Rubiales D., Ocampo J.A. and García-Garrido J.M. 2009.** The potential of Rhizobium mutants for biological control of *Orobanche crenata*. *Haustorium*. **54**. 3-4.
 - **Fernández-Aparicio M., Emeran A.A. and Rubiales D. 2010.** Inter-cropping with berseem clover (*Trifolium alexandrinum*) reduces infection by *Orobanche crenata* in legumes. *Crop Protection*. **29**. 867-871.
 - **Fernández-Aparicio M., Yoneyama K., and Rubiales D. 2011.** The role of strigolactones in host specificity of *Orobanche* and *Phelipanche* seed germination. *Weed Science Research*. **21(1)**. 55 - 61.
 - **Fernández-Aparicio M. and Rubiales D. 2012.** Differential response of pea (*Pisum sativum*) to *Orobanche crenata*, *Orobanche foetida* and *Phelipanche aegyptiaca*. *Crop Protection*. **31**. 27–30.
 - **Fernández-Aparicio M., Cimmino A., Evidente A. and Rubiales D. 2013.** Inhibition of *Orobanche crenata* Seed Germination and Radicle Growth by Allelochemicals Identified in Cereals. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 1-24.
 - **Fernández-Aparicio M., Kisugi T., Xie X., Rubiales D. and Yoneyama K. 2014.** Low strigolactone root exudation: A novel mechanism of broomrape (*Orobanche* and *Phelipanche* spp.) resistance available for *Faba bean* breeding. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **62**. 7063–7071.
 - **Fernandez-Martinez J.M., Dominguez J., Perez-Vich B. and Velasco L. 2008.** Update on breeding for resistance to sunflower broomrape. *Helia*. **31**.73–84.
 - **Fernández-Martínez J.M., Velasco L. and Pérez-Vich B. 2012.** Progress in research on breeding for resistance to sunflower broomrape. *Helia*. **35(57)**. 47-56.
- G-
- **Gaudin Z., Cerveau D., Marnet N., Bouchereau A., Delavault P., Simier P. and Pouvreau J.B. 2014.** Robust Method for Investigating Nitrogen Metabolism of ¹⁵N Labeled Amino Acids Using AccQ•Tag Ultra Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry: Application to a Parasitic Plant–Plant Interaction. *Analytical Chemistry*. **86(2)**.1138–1145.

- **Gaur P.M., Krishnamurthy L. and Kashiwagi J. 2008.** Improving drought avoidance root traits in chickpea (*Cicer arietinum L.*)- Current status of research at ICRISAT. Plant Production Science. **11(1)**. 3-11.
- **Gauthier M., Véronési C., El Halmouch Y., Leflon M., Jestin C., Labalette F., Simier P., Delourme R., Delavault P. 2012.** Characterisation of resistance to branched broomrape, *Phelipanche ramosa*, in winter oilseed rape. Crop protection. **42**. 56-63.
- **Gawahir M.D. 2006.** Effect of crop sequence on *Orobanche ramosa* management in tomato crop. Journal of Science and Technology. **7(1)**. 01-08.
- **Gibot-Leclerc S., Brault M., Pinochet X. and Sallé G. 2003.** Potential role of winter rape weeds in the extension of broomrape in Poitou Charentes. Comptes Rendus Biologies. **326**.645–658.
- **Gibot-Leclerc S., Sallé G., Reboud X. and Moreau D. 2012.** What are the traits to *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel that contribute to the success of its biological cycle on its host *Brassica napus* L. Flora. **207**.512–521.
- **Gibot-Leclerc S., Reibel C., Dessaint F. and Le Corre V. 2013.** *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel populations differ in life-history and infection response to hosts. Flora. **208**. 247–252.
- **Gloria V., Marcelo A.C., Mercedes S., Norma F. and Alicia L. 2012.** First report of *Ascochyta rabiei* causing Ascochyta blight of chickpea in Argentina. Plant Disease. **96(9)**.1375.
- **Goldwasser Y., Kleifeld Y., Plakhine D. and Rubin B. 1997.** Variation in vetch (*Vicia* spp.) response to *Orobanche aegyptiaca*. Weed Science. **45**. 756–762.
- **Goldwasser Y., Hershenhorn J., Plakhine D., Kleifeld Y. and Rubin B. 1999.** Biochemical factors involved in vetch resistance to *Orobanche aegyptiaca*. Physiological and Molecular Plant Pathology. **54**. 87–96.
- **Goldwasser Y. and Rodenburg J. 2013.** Integrated agronomic management of parasitic weed seed banks. Parasitic Orobanchaceae: Parasitic mechanisms and control strategies. **393**-413.
- **Grenz J.H., Manschadi A.M., Uygur F.N. and Sauerborn J. 2005.** Effects of environment and sowing date on the competition between faba bean (*Vicia faba*) and the parasitic weed *Orobanche crenata*. Field Crop Research. **93**. 300-313.
- **Guchu S.M., Yenesew A., Tsanuo M.K., Gikonyo N.K., Pickett J.A., Hooper A.M. and Hassanali A. 2007.** C-methylated and C-prenylated isoflavonoids from root extract of *Desmodium uncinatum*. Phytochemistry. **68**. 646–651.

-H-

- **Habimanaa S., Murthya K.N.K., Hattia V. and Nduwumuremyib A. 2013.** Management of orobanche in field crops. *Scientific Journal of Crop Science*. **2(11)**. 144-158.
- **Haidar M.A. and Sidahmed M.M. 2000.** Soil solarization and chicken manure for the control of *Orobanche crenata* and other weeds in Lebanon. *Crop Protection*. **19**. 169–173.
- **Harb, A. M., Hameed, K. M., and Shibli, R. A. 2004.** Effect of triiodoben-zoic acid on broomrape (*Orobanche ramosa*) infection and development in tomato plants. *Plant Pathology Journal*. **20**. 81-84.
- **Hassan M. M., Osman A. G., Yagoub S.O., Sherif A.M., Rugheim A.M., Ibrarhim Saeed Mohamed I.S., Gani M.E.S.A. and Babiker A.G.T. 2012.** Effects of Bacterial Strains and Chicken Manure On *Orobanche crenata* Infesting faba bean. *International Journal of Applied Science and Technology*. **2(1)**. 122-129.
- **Haware M.P., Nene Y.L. and Rajeshwari R. 1978.** Eradication of *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceri transmitted in chickpea seeds. *Phytopathology*. **68**. 1364–1367.
- **Haware M.P., Nene Y.L. and Natarajan M. 1996.** Survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceri in soil in the absence of chickpea. *Phytopathologia Mediterranea*. **35**.9-12.
- **Henning S. and Jørgensen H. 2013.** The Parasitic Syndrome in Higher Plants. Parasitic orobanchacea. Parasitic mechanisms and control strategies. 1-14.
- **Holub J. 1990.** Some taxonomic and nomenclatural changes within *Orobanche* s.l. (*Orobanchaceae*). *Preslia*. **62**. 193–198.
- **Hooper A.M., Hassanali A., Chamberlain K., Khan Z. and Pickett J.A. 2009.** New genetic opportunities from legume intercrops for controlling *Striga spp.* Parasitic weeds. *Pest Management Science*. **65**. 546–552.
- **Hwang S.F., Gossen B.D., Chang K.F., Turnbull G.D., Howard R.J. and Blade S.F. 2003.** Etiology and impact of Rhizoctonia seedling blight and root rot of chickpea on the Canadian prairies. *Canadian Journal of Plant Science*. **83**. 959- 967.
- **ICARDA. 1999.** Annual report for 1999. Center Agricultural Research Dry Areas. Aleppo. Syria. 450p.

-I-

- **ICRISAT. 2012.** Field diagnosis of chickpea diseases and their control. Information bulletin. **28**. 1-57.
- **Irving I.J. and Cameron D.D. 2009.** You are what you eat: Interactions between root parasitic plants and their hosts. *Advances in Botanical Research*. **50**. 87-138.

- **Islam M., Akmal M. and Khan M.A. 2013.** Effect of phosphorus and sulphur application on soil nutrient balance under chickpea (*Cicer arietinum*) monocropping. Romanian Agricultural Research. **30**. 223-232.

-J-

- **Jermy T. and Szentesi A. 2003.** Evolutionary aspects of host plant specialization a study on bruchids (Coleoptera: Bruchi dae). Oikos .**101**.196–204.
- **Joel D.M. and Losner-Goshen D. 1994.** The attachment organ of the parasitic angiosperms *Orobanche cumana* and *O. aegyptiaca* and its development. Canadian Journal of Botany. **72**. 564–574.
- **Joel D.M., Losner-Goshen D., Goldman-Guez T. and Portnoy V.H. 1998.** The Haustorium of Orobanche. In: Wegmann K., Musselman L.J., Joel D.M. (Eds.), Current Problems in Orobanche Research. Proceedings of the Fourth International Workshop on Orobanche. Albena. Bulgaria. 101-106.
- **Joel D.M., Hershenhorm Y. and Eizenberg H. 2007.** Biology and management of weedy root parasites. Horticultural Reviews. **33**. 267–350.
- **Johnson A.W., Rosebery G. and Parker C. 1976.** A novel approach to Striga and Orobanche control using synthetic germination stimulants. Weed Research. **16**. 223-227.
- **Jukanti A.K., Gaur P.M., Gowda C.L.L and Chibbar R.N. 2012.** Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.). British Journal of Nutrition. **108**. 11-26.

-K-

- **Kar M. and Mishra D. 1976.** Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology. **57**. 315-319.
- **Kashiwagi J., Krishnamurthy L., Crouch J.H. and Serraj R. 2006.** Variability of root length density and its contributions to seed yield in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under terminal drought stress. Field Crops Research. **95**. 171–181.
- **Karim K.M.R., Islam A.K.M.R., Hossain M.M., Azad H.M.S. and Rahman M.W. 2008.** Effect of gamma ray on yield and yield attributes of large seeded chickpea. Journal of Soil Nature. **2(2)**. 19-24.
- **Kaur G., Kumar S., Nayyar H. and Upadhyaya H. D. 2008.** Cold Stress Injury during the Pod-Filling Phase in Chickpea (*Cicer arietinum* L.): Effects on Quantitative and Qualitative Components of Seeds. Journal of Agronomy and Crop Science. **194**. 457–464.
- **Kebreab E. and Murdoch A.J. 1999.** A quantitative model for loss of primary dormancy and induction of secondary dormancy in imbibed seeds of Orobanche spp. Journal of Experimental Botany. **50**. 211-219.

- **Keyes W.J., Taylor J.V., Apkarian R.P. and Lynn D.G. 2001.** Dancing together. Social controls in parasitic plant development. *Plant Physiology*. **127**.1508–1512.
- **Khalil S. and Erskine W. 1999.** Breeding for Orobanche resistance in faba bean and lentil. In: Resistance to broomrape, the state of the art, (Cubero J.I., Moreno M.T., Rubiales D. and Sillero J.C., Eds.), (Sevilla, SP), 63-76.
- **Khan M.S.A., Ramsey M.D., Corbiere R., Infantino A., Porta-Puglia A., Bouznad Z. and Scott E.S. 1999.** Ascochyta blight of chickpea in Australia: identification, pathogenicity and mating type. *Plant Pathology*.**48**. 230–234.
- **Khan Z.R., Hassanali A., Overholt W., Khamis T.M., Hooper A.M., Pickett A.J., Wadhams L.J. and Woodcock C.M. 2002.** Control of witchweed *Striga hermonthica* by intercropping with *Desmodium* spp. and the mechanism defined as allelopathic. *Journal of Chemical Ecology*. **28**. 1871–1885.
- **Kharrat M., Ben Salah H. and Halila H.M. 1991.** Faba bean status and prospects in Tunisia. *Options Méditerranéennes*.**10**. 169-172.
- **Kharrat M., Halila M.H., Linke K.H. and Haddar T. 1992.** First report of *Orobanche foetida* Poiret on *faba bean* in Tunisia. *FABIS Newsletters*. **30**. 46–47.
- **Kharrat M. and Halila M.H. 1996.** Control of *Orobanche foetida* on *Vicia faba*: comparison between different control measures. In: Moreno, M.T., Cubero, J.I., Berner, D., Joel, D., Musselman, L.J., Parker, C. (Eds.), *Advances in Parasitic Plant Research*. Junta de Andalucía, Córdoba. 734–738.
- **Kharrat M. 2002.** Sélection de lignées de féverole, résistantes à l'*Orobanche foetida*. p. 92. In Kharrat M., Abbad Andaloussi F., Maatougui M.E., Sadiki H. and Bertenbreiter W. (eds.) *Devenir des légumineuses alimentaires dans le Maghreb*. GTZ, Tunis, Tunisia.
- **Kim D.S., Kim J.B., Goh E.J., Kim W.J., Kim S.H., Seo Y.W., Jang C.S. and Kang Y. 2011.** Antioxidant response of *Arabidopsis* plants to gamma radiation: genome-wide expression profiling of the ROS scavenging and signal transduction pathways. *Journal of Plant Physiology*. **168**. 1960-1971.
- **Klein O. and Kroschel J. 2002.** Biological control of *Orobanche* spp. with *Phytomyza orobanchia*. *BioControl*. **47**. 245-277.
- **Kostov K., Batchvarova R. and Slavov S. 2007.** Application of chemical mutagenesis to increase the resistance of tomato to *Orobanche ramosa*. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. **13**. 505-513.
- **Kucera B., Cohn M.A. and Leubner-Metzger G. 2005.** Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research*. **15**. 281–307.

- **Kudapa H., Azam S., Sharpe A.G., Taran B. and Li R. 2014** Comprehensive Transcriptome Assembly of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Using Sanger and Next Generation Sequencing Platforms: Development and Applications. PLoS ONE 9(1): e86039.doi:10.1371/journal.pone.00
- **Kuijt J. 1969.** The Biology of Parasitic Flowering Plants. Berkeley, CA, USA: University of California Press. 89p.
- **Kumar J. and Abbo S. 2001.** Genetics of flowering time in chickpea and its bearing on productivity in semiarid environments. Advanced Agronomy. **72**.107–138.
- **Kumar S., Mangal M., Dhawan A.K. and Singh N. 2011.** Assessment of genetic fidelity of micropropagated plants of *Simmondsia chinensis* (Link) Schneider using RAPD and ISSR markers. Acta Physiologiae Plantarum. **33**.2541–2545.
- **Kumar S., Thakura P., Kaushala N., Malika J. A. Gaurb P. and Nayyar H. 2013.** Effect of varying high temperatures during reproductive growth on reproductive function, oxidative stress and seed yield in chickpea genotypes differing in heat sensitivity. Archives of Agronomy and Soil Science. **59(6)**. 1-21.
- **Kumari S.G., Makkouk K., Asaad N., Attar N. and Loh M. 2007.** Chickpea chlorotic stunt virus Affecting Cool-Season Food Legumes in West Asia and North Africa. In: Abstract Book of 10th International Plant Virus Epidemiology Symposium, on the Theme “Controlling Epidemics of Emerging and Established Plant Virus Diseases The Way Forward”, from 15–19 October 2007, Hyderabad, India. 157.

-L-

- **Labrousse P., Arnaud M.C., Serieys H., Bervillé A. and Thalouarn P. 2001.** Several mechanisms are involved in resistance of Helianthus to *Orobanche cumana* Wallr. Annals of Botany. **88**. 859–868.
- **Landa B.B., Navas-Cortes J.A. and Jimenez-Diaz R.M. 2004.** Integrated management of Fusarium wilts of chickpea with sowing date, host resistance and biological control. Phytopathology. **94**. 946-960.
- **Lane J.A. and Bailey J.A. 1992.** Resistance of cowpea and cereals to the parasitic angiosperm Striga. Euphytica. **63**. 85-93.
- **Lechat M.M., Pouvreau J.B., Peron T., Gauthier M., Montiel G., Véronési C., Yasushi T., Le Bizec B., Monteau F., Macherel D., Simier P., Thoiron S. and Delavault P. 2012.** PrCYP707A1, an ABA catabolic gene, is a key component of *Phelipanche ramosa* seed germination in response to the strigolactone analogue GR24. Journal of Experimental Botany. **63**. 5311–5322.

- **Leport L., Turner N.C., Davies S.L. and Siddique K.H.M. 2006.** Variation in pod production and abortion among chickpea cultivars. *European Journal Agronomy*. **24**. 236-246.
- **Losner-Goshen D., Portnoy V.H., Mayer A.M. and Joel D.M. 1998.** Pectolytic activity by the haustorium of the parasitic plant *Orobanche L.* (Orobanchaceae) in host roots. *Annals of Botany*. **81**. 319–326.
- **Lozano Baena M.D., Moreno M.T., Rubiales D. and Pérez de-Luque A. 2007.** *Medicago truncatula* as a model for non-host resistance in legume-parasitic plant interactions. *Plant Physiology*. **145**. 437-449.

-M-

- **Mabrouk Y., Zourgui L., Sifi B., Delavault P., Simier P. and Belhadj O. 2007.** Some compatible *Rhizobium leguminosarum* strains in peas decrease infections when parasitised by *Orobanche crenata*. *Weed Research*. **47**. 44-53.
- **Macovei A. and Tuteja N. 2013.** Different expression of miRNAs targeting helicases in rice in response to low and high dose rate gamma-ray treatments. *Plant Signaling and Behavior*. **8**. 25-28.
- **Macovei A., Garg B., Raikwar S., Balestrazzi A., Carbonera D., Buttafava A., Bremont J. F. J., Gill S.S. and Tuteja N. 2014.** Synergistic Exposure of Rice Seeds to Different Doses of γ -Ray and Salinity Stress Resulted in Increased Antioxidant Enzyme Activities and Gene-Specific Modulation of TC-NER Pathway. *BioMed Research International*. 676934. 1-15.
- **Maiti R.K. and Wesche-Ebeling P. 2001.** Vegetative and reproductive growth and productivity. *Advances in chickpea science*. Science Publishers. Enfield. 67–104.
- **Makkouk K.M., Kumari S.G., Hughes J.d.A., Muniyappa V. and Kulkarni N.K. 2003.** Other legumes: faba bean, chickpea, lentil, pigeonpea, mungbean, blackgram, lima bean, horsegram, bambara groundnut and winged bean. *Virus and Virus-like Diseases of Major Crops in Developing Countries*. 447–476.
- **Maluszynski M., Szarejko I., Bhatia C.R., Nichterlein K. and Lagoda P.J.L. 2009.** Plant breeding and farmer participation. In: Ceccarelli, S., E. P. Guimarães, and E. Weltzien (eds), *Methodologies for generating variability. Mutation techniques*, pp. 159-194. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

- **Marcu D., Cristea V. and Darban L. 2013.** Dose-dependent effects of gamma radiation on lettuce (*Lactuca sativa* var. capitata) seedlings. *International Journal of Radiation Biology*. **89**. 219-223.
- **Marzec M., Muszynska A. and Gruszka D. 2013.** The Role of Strigolactones in Nutrient-Stress Responses in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*. **14**. 9286-9304
- **Matusova R., Rani K., Verstappen F.W.A., Franssen M.C.R., Beale M.H. and Bouwmeester H.J. 2005.** The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanch*e spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiology*. **139**. 920–934.
- **Matvienko M., Wojtowicz A., Wrobel R., Jamison D., Goldwasser Y. and Yoder J.I. 2001.** Quinone oxidoreductase message levels are differentially regulated in parasitic and non-parasitic plants exposed to allelopathic quinones. *The Plant Journal*. **25**. 375–387.
- **McKinney G. 1941.** Absorption of light by chlorophyll solution. *Biological Chemistry*. 140. 315–332.
- **Mejri S., Mabrouk Y., Voisin M., Delavault P., Simier P., Saidi M. and Belhadj O. 2012.** Variation in quantitative characters of faba bean after seed irradiation and associated molecular changes. *African Journal of Biotechnology*. **11(33)**. 8383-8390.
- **Melki M. and Salami D. 2008.** Studies the effects of low dose of gamma rays on the behavior of chickpea under various conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. **11**. 2326-2330.
- **Millan T., Clarke H.J., Siddique K.H.M., Bhuriwalla H.K., Gaur P.M., Kumar J., Gil J., Kahl G. and Winter P. 2006.** Chickpea molecular breeding: new tools and concepts. *Euphytica*. **147**. 81-103.
- **Miller M.W. 1987.** Radiation hormesis in plants. *Health Physics*. **52**. 607-616.
- **Mokhtar M., Abdel K. and Nehal S.E.M. 2009.** Prospects of mycoherbicides for control of broomrapes (*Orobanch*e spp.) in Egypt. *Journal of Plant Protection and Reserach*. **49(1)**.64-74.
- **Mor A., Mayer A.M. and Levine A. 2008.** Possible peroxydase functions in the interaction between the parasitic plant, *Orobanch*e *aegyptica*, and its host, *Arabidopsis thaliana*. *Weed Biology and Management*. **8**. 1-10.
- **Morandi D., Prado E., Sagan M. and Duc G. 2005.** Characterisation of new symbiotic *Medicago truncatula* (Gaertn.) mutants, and phenotypic or genotypic complementary information on previously described mutants. *Mycorrhiza*. **15**. 283-289.

- **Moreno M. and Cubero J.I. 1978.** Variation in *Cicer arietinum L.* Euphytica. **27.** 465-485.
- **Moussa H.R. 2011.** Low dose of gamma irradiation enhanced drought tolerance in soybean. Bulgarian Journal of Agricultural Science. **17(1).** 63-72.
- **Muir J.P., Pitman W.D. and Foster J.L. 2011.** Sustainable, low-input warm-season pasture grass-legume mixes: Mission (nearly) impossible? Grass Forage Science. **66.** 301-452.
- **Müller-Stöver D., Buschmann H. and Sauerborn J. 2005.** Increasing control reliability of *Orobanche cumana* through integration of a biocontrol agent with a resistance-inducing chemical. European Journal of Plant Pathology. **111.** 193-202.
- **Murthy K. N., Chitrashree F.U. and Srinivas C. 2014.** Induction of Systemic Resistance in Tomato against *Ralstonia solanacearum* by *Pseudomonas fluorescens*. American Journal of Plant Sciences. **5.** 1799-1811.
- **Musselman L.J. 1980.** The biology of *Striga*, *Orobanche* and other root-parasitic weeds. Ann. Rev. Phytopathology. **18.** 463-489.

-N-

- **Nayyar H., Bains T. and Kumar S. 2005.** Low temperature induced floral abortion in chickpea: relationship to abscisic acid and cryoprotectants in reproductive organs. Environmental and Experimental Botany. **53(1).** 39–47.
- **Nayyar H., Kaur G., Kumar S. and Upadhyaya H.D. 2007.** Low Temperature Effects during Seed Filling on Chickpea Genotypes (*Cicer arietinum L.*): Probing Mechanisms affecting Seed Reserves and Yield. Journal of Agronomy and Crop Science. **193.** 336-344.
- **Nei M. and Li W. 1979.** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America. **79.** 5269–5273.
- **Nene Y.L., Reddy M.V., Haware M.M., Ghaneker A.M., Amin K.S., Pande S. and Sharma M. 2012.** Information Bulletin No. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. 60.
- **Nizakat B., Amal B.K., Gul S.S.K., Zahid M. and Ihsanullak I. 2007.** Quality and consumers acceptability studies and their inter relationship of newly evolved desi type chickpea genotypes (*Cicer arietinum L.*). Quality evolution of new chickpea genotypes. International Journal of Food Science Technology. **42.** 528–534.

-O-

- **O’Neil C.E., Nicklas T.A. and Fulgoni V.L. 2014.** Chickpeas and Humus are associated with Better Nutrient Intake, Diet Quality, and Levels of Some Cardiovascular Risk Factors: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2010. *Nutrition and Food Sciences*. **4(1)**. 1-7.
- **Olmstead R.G., De Pamphillis C.W., Wolfe A.D., Young N.D., Elisons W.J. and Reeves P.A. 2001.** Disintegration of the Scrophulariaceae. *American Journal of Botany*. **88**. 348–361.
- **Oswald A., Ransom J.K., Kroschel J. and Sauerborn J. 2002.** Intercropping controls *Striga* in maize based farming systems. *Crop Protection*. **21**. 367–374.

-P-

- **Pacucci G.C., Troccoli B. and Leoni B. 2006.** Effect of supplementary irrigation on yield of chickpea genotypes in a Mediterranean climate. *Agricultural Engineering International*. **8**.
- **Palmer A.G., Gao R., Maresh J., Erbil W.K. and Lynn D.G. 2004.** Chemical biology of multi-host/pathogen interactions: Chemical Perception and Metabolic Complementation. *Annual Review of Phytopathology*. **42**. 439–464.
- **Pande S., Siddique K.H.M., Kishore G.K., Bayaa B., Guar P.M., Gowda C.L.L., Bretag T.W. and Crouch, G.H. 2005.** Ascochyta blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review of biology, pathogenicity, and disease management. *Australian Journal of Agricultural Research*. **56**. 317-332.
- **Pande S., Narayana R.J. and Sharma M. 2007.** Establishment of the chickpea wilt pathogen *Fusarium oxysporium* f.sp. *ciceris* in the soil through seed transmission. *The Plant Pathology Journal*. **1**. 3-6.
- **Parker C. and Riches C.R. 1993.** Parasitic Weeds of the World: Biology and Control, CAB International, Wallingford UK.
- **Parker C. 2009.** Observations on the current status of *Orobanche* and *Striga* problems world-wide. *Pest Management Science*. **65**. 453–459.
- **Parry M.A., Madgwick P.J., Bayon C., Tearall K., Hernandez-Lopez A., Baudo M., Rakszegi M., Hamada W., Al-Yassin A., Quabbou H., Labhilili M. and Phillips A. 2009.** Mutation discovery for crop improvement. *Journal of Experimental Botany*. **60**. 2817-2825.
- **Pérez-de-Luque A., Rubiales D., Galindo J.C.G., Macias F.A. and Jorrín J. 2001.** Allelopathy and allelochemicals within the plant-parasitic weed interaction. *Studies with*

the sunflower *Orobanche cumana* system. 7th International Parasitic Weed Symposium, Nantes, France, pp. 197-200.

- **Pérez-de-Luque A., Jorrin J. V. and Rubiales D. 2004.** Crenate broomrape control in pea by foliar application of benzothiazole (BTH). *Phytoparasitica*. **32**. 21-29.
- **Pérez-De-Luque A., J Jorrin J., Cubero J.I. and Rubiales D. 2005a.** *Orobanche crenata* resistance and avoidance in pea (*Pisum spp.*) operate at different developmental stages of the parasite. *Weed Research*. **45**. 379–387.
- **Pérez-De-Luque A., Rubiales D., Cubero J.I., Press M.C., Scholes J., Yoneyama K., Takeuchi Y., Plakhine D. and Joel D.M. 2005b.** Interaction between *Orobanche crenata* and its host legumes: unsuccessful haustorial penetration and necrosis of the developing parasite. *Annals of Botany*. **95**. 935–942.
- **Pérez-De-Luque A., González-Verdejo C.I., Lozano M.D., Dita M.A., Cubero J.I., González-Melendi P., Risueño M.C. and Rubiales D. 2006a.** Protein cross linking, peroxidase and β -1,3-endoglucanase involved in resistance of pea against *Orobanche crenata*. *Journal of Experimental Botany*. **57**. 1461–1469.
- **Pérez-De-Luque A., Lozano M.D., Cubero J.I., González-Melendi P., Risueño M.C. and Rubiales D. 2006b.** Mucilage production during the incompatible interaction between *Orobanche crenata* and *Vicia sativa*. *Journal of Experimental Botany*. **57**. 931–942.
- **Pérez-de-Luque A., Lozano M.D., Moreno M.T., Testillano P.S. and Rubiales D. 2007.** Resistance to broomrape (*Orobanche crenata*) in faba bean (*Vicia faba*): cell wall changes associated with prehaustorial defensive mechanisms. *Annals of Applied Biology*. **151**. 89–98.
- **Pérez-De-Luque A., Fondevilla S., Pérez-Vich B., Aly R., Thoiron S., Simier P., Castillejo M.A., Fernández-Martínez J.M., Jorrin J., Rubiales D. and Delavault P. 2009.** Understanding *Orobanche* and *Phelipanche*–host plant interaction and developing resistance. *Weed Research*. **49**. 8–22.
- **Pérez-De-Luque A., Eizenberg H., Grenz J.H., Sillero J.C., Avila C., Sauerborn J. and Rubiales D. 2010.** Broomrape management in faba bean. *Field Crops Research*. **115**. 319-328.
- **Pérez-Vitch B., Vlasco L., Rich P.J. and Ejeta G. 2013.** Marker-assisted and physiology-based breeding for resistance to root parasitic *Orobanchaceae*. In: Joel, D. M., and M. Musselman (eds), *Parasitic Orobanchaceae. Parasitic mechanisms and control strategies*, 369-391.

- **Péron T., Véronési C., Mortreau E., Pouvreau J-B., Thoiron S., Leduc N., Delavault P. and Simier P. 2012.** Role of the sucrose synthase encoding PrSus 1 gene in the development of the parasitic *Phelipanche ramosa* L. (Pomel). *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **25**. 402-411.
- **Pickett J.A., Hamilton M.L., Hooper A.M. Khan Z.R. and Midega C.A.O. 2010.** Companion cropping to manage parasitic plants. *Annual Review of Phytopathology*. **48**. 161-177.
- **Pieterse A.H. 1979.** The broomrapes (Orobanchaceae). *Tropical Agriculture*. **5**. 9-35.
- **Plakhine D., Ziadna H. and Joel D.M. 2009.** Is seed conditioning essential for Orobanche germination. *Pest Management Science*. **65**. 492-496.
- **Plakhine D., Tadmor Y., Ziadne H. and Joel D.M. 2012.** Maternal tissue is involved in stimulant reception by seeds of the parasitic plant Orobanche. *Annals of Botany*. **109**. 979–986.
- **Plaza L., Fernandez I., Juan R., Pastor J. and Pujadas A. 2004.** Micromorphological Studies on Seeds of Orobanche Species from the Iberian Peninsula and the Balearic Islands, and Their Systematic Significance. *Annals of Botany*. **94**.167-178.
- **Poulin R. and Morand S. 2000.** The diversity of parasites. *Quarterly Review Biology*. **75**. 277–293.
- **Pouvreau J.B., Gaudin Z., Auger B., Lechat M.M., Gauthier M., Delavault P. and Simier P. 2013.** A high-throughput seed germination assay for root parasitic plants. *Plant Methods*. **9(32)**.1–11.
- **Pradeep Reddy M., Sarla N. and Siddiq E.A. 2002.** Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*. **128**. 9–17.
- **Pradhan S., Bandhiwal N., Shah N., Kant C., Gaur R. and Bhatia S. 2014.** Global transcriptome analysis of developing chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. *Frontiers in Plant Science*. **5**. 698. doi: 10.3389/fpls.2014.00698
- **Pujadas-Salva A.J., Fraga I., Arguinbau P., Sanchez-Gullon E. and Molina-Mahedero N. 2003.** *Orobanche crenata* and *Orobanche foetida* Poir. (Orobanchaceae) in the West Mediterranean area. *Bocconea*. **16**. 737–744.
- **Pushparajan G., Surendran S. and Harinarayanan M.K. 2014.** Effect of gamma rays on yield attributing characters of Okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench). *International Journal of Advanced. Research*. **2(5)**. 535-540.

-R-

- **Rahman M.M., Bakr M.A., Mia M.F., Idris K.M., Gowda C.L.L., Kumar J., Deb U.K., Malek M.A. and Sobhan A. 2000.** Legumes in Bangladesh, Legumes in Rice and Wheat Cropping Systems of the Indo-Gangetic Plain—Constraints and Opportunities, pp. 5–34, International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Patancheru, AP 502 324, India; and Cornell University, Ithaca, New York, USA.
- **Rajin Anwar R., McKenzie B.A. and Hill G.D. 2003.** Phenology and growth response to irrigation and sowing date of Kabuli chickpea (*Cicer arietinum L.*) in a coll-temperate subhumid climate. *Journal of Agricultural Science*. **141**. 273-284.
- **Raju S., Jayalakshmi S.K. and Sreeramulu K. 2008.** Comparative study on the induction of defense related enzymes in two different cultivars of chickpea (*Cicer arietinum L.*) genotypes by salicylic acid, spermine and *Fusarium oxysporum f. sp ciceri*. *Australian Journal of Crop Science*. **3**.121-140.
- **Rao L.S., Usha Rani P., Deshmukh P.S., Kumar P.A. and Panguluri S.K. 2007.** RAPD and ISSR fingerprinting in cultivated chickpea (*Cicer arietinum L.*) and its wild progenitor *Cicer reticulatum* Ladizinsky. *Genetic Resources Crop Evolution*. **54**. 1235–1244.
- **Ravichandran V. and Jayakumar S. 2014.** Effects of gamma rays on quantitative traits of sesame (*Sesamum indicum L.*) in M1 generation. *International Journal of Advanced Research*. **2(8)**. 593-597.
- **Rodenburg J., Bastiaans L., Kropff M.J. and Van Ast A. 2006.** Effects of host plant genotype and seedbank density on *Striga* reproduction. *Weed Research*. **46**. 251–263.
- **Rodríguez-Conde M. F., Moreno M. T., Cubero J.I. and Rubiales D. 2004.** Characterization of the *Orobanche–Medicago truncatula* association for studying early stages of the parasite–host interaction. *Weed Research*. **44(3)**. 218–223.
- **Rogers W.E. and Nelson R.R. 1962.** Penetration and nutrition of *Striga asiatica*. *Phytopathology*. **52**.1064–70.
- **Roman B., Satovic Z., Alfaro C., Morenoa M.T., Kharrat M., Perez-de-Luque A. and Rubiales D. 2007.** Host differentiation in *Orobanche foetida* Poir. *Flora*. **202**. 201-208.
- **Roy F., Boye J.I. and Simpson B.K. 2010.** Bioactive proteins and peptides in pulse crops: pea, chickpea and lentil. *Food Research International*. **43**. 432–442.
- **Rubiales D., Alcántara C., Pérez-de-luque A., Gil J. and Sillero J.C. 2003a.** Infection of chickpea (*Cicer arietinum*) by crenate broomrape (*Orobanche crenata*) as influenced by sowing date and weather conditions. *Agronomie*. **23**. 359-362.

- **Rubiales D., Pérez-De-Luque A., Cubero J.I. and Sillero J.C. 2003b.** Crenate broomrape (*Orobanche crenata*) infection in field pea cultivars. *Crop Protection*. **22**. 865–872.
- **Rubiales D., Pérez-de-Luque A., Joel D.M., Alcántara C., and Sillero J.C. 2003c.** Characterization of resistance in chickpea to crenate broomrape (*Orobanche crenata*). *Weed Science*. **51(5)**. 702-707.
- **Rubiales D., Alcantara C. and Sillero J.C. 2004.** Variation in resistance to *Orobanche crenata* in species of Cicer. **44 (1)**. 27-32.
- **Rubiales D., Sadiki M. and Román B. 2005.** First report of *Orobanche foetida* on common vetch (*Vicia sativa*) in Morocco. *Plant Disease*. **89**. 528.
- **Rubiales D., Pérez-De-Luque A., Fernández-Aparicio M., Sillero J.C., Román B., Kharrat M., Khalil S., Joel D.M. and Riches C. 2006.** Screening techniques and sources of resistance against parasitic weeds in grain legumes. *Euphytica*. **147**. 187–199.
- **Rubiales D. and Heide-Jørgensen H.S. 2011.** Parasitic plants. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester. doi:10.1002/9780470015902.a0021271. 92p.
- **Rubiales D. and Fernández-Aparicio M. 2012.** Innovations in parasitic weeds management in legume crops. *Agronomy for Sustainable Development*. **32**. 433–449.
- **Rubiales D. 2014.** Legume breeding for broomrapes resistance. *Czech Journal of Genetics and Plant breeding*. **50**. 144-150.
- **Ruso J., Sukno S., Domínguez-Gimenez J., Melero-Vara J.M. and Fernández-Martínez J.M. 1996.** Screening wild *Helianthus* species and derived lines for resistance to several populations of *Orobanche cernua*. *Plant Disease*. **80**. 1165–1169.

-S-

- **Sackston W.E. 1992.** On a treadmill: breeding sunflowers for resistance to disease. *Annual Review of Phytopathology*. **30**. 529–551.
- **Sakata T. and Higashitani A. 2008.** Male sterility accompanied with abnormal anther development in plants – genes and environmental stresses with special reference to high temperature injury. *International Journal of Plant Developmental Biology*. **2**. 42.
- **Sauerborn J., Buschmann H., Ghiasvan-Ghiasi K. and Kogel K. H. 2002.** Benzothiazole activates resistance in sunflower (*Helianthus annuus*) to the root-parasitic weed *Orobanche cumana*. *Phytopathology*. **92**. 59-64.

- **Schneeweiss G.M., Colwell A., Park J.M., Jang C.G. and Stuessy T.F. 2003.** Phylogeny of holoparasitic Orobanche (Orobanchaceae) inferred from nuclear ITS sequences. *Molecular Phylogenetic Evolution*. **30(2)**. 465-78.
- **Scholes J.D. and Press M.C. 2008.** Striga infestation of cereal crops an unsolved problem in resource limited agriculture. *Current Opinion in Plant Biology*. **11**. 180–186.
- **Seel W.E. and Jeschke W.D. 1999.** Simultaneous collection of xylem sap from *Rhinanthus minor* and the hosts *Hordeum* and *Trifolium*: hydraulic properties, xylem sap composition and effects of attachment. *New Phytologist*. **143**. 281–298.
- **Segev A., Badani H., Kapulnik Y., Shomer I., Oren-Shamir M. and Galili S. 2010.** Determination of polyphenols, flavonoids, and antioxidant capacity in colored chickpea (*Cicer arietinum L.*). *Journal of Food Science*. **75**.115–119.
- **Sengupta M., Chakraborty A. and Raychaudhuri S.S. 2013.** Ionizing radiation induced changes in phenotype, photosynthetic pigments and free polyamine levels in *Vigna radiat (L.) Wilczek*. *Applied Radiation Isotopes*. **75**. 44-49.
- **Serghini K., Perez-de-Luque A., Castejon-Munoz M., Garcia-Torres L. and Jorriñ J. 2001.** Sunflower response to broomrape parasitism: induced synthesis and excretion of 7-hydroxylated simple coumarins. *Journal of Experimental Botany*. **52**. 2227–2234.
- **Serraj R., Krishnamurthy L., Kashiwagi J., Kumar J., Chandra S. and Crouch J.H. 2004.** Variation in root traits of chickpea (*Cicer arietinum L.*) grown under terminal drought. *Field Crops Research*. **88**.115–127.
- **Shabana Y.M., Müller-Stöver D. and Sauerborn J. 2003.** Granular Pesta formulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. orthoceras for biological control of sunflower broomrape: efficacy and shelf-life. *Biological Control*. **26**. 189-201.
- **Shah T.S., Babar M.A., Iqbal J. M. and Ahsanul M.H. 2009.** Screening of chickpea (*Cicer arietinum*) induced mutants against Fusarium Wilt. *Pakistan Journal of Botany*.**4**. 1945-1955.
- **Sifi B., Kharrat M. and Khaldi R. 2006.** Introduction de la culture de pois chiche d’hiver dans les systèmes de production en zone semi arides en Tunisie. Gestion des ressources et applications biotechnologiques en aridocultures et cultures sahariennes : perspectives pour la valorisation des potentialités du Sahara. Séminaire international : Jerba du 25 au 28 Décembre 2006.
- **Sillero J.C., Moreno M.T. and Rubiales D. 2005.**Sources of resistance to crenate broomrape among species of *Vicia*. *Plant Diseases*. **89(1)**. 22-27.

- **Sillero J.C., Fondevilla S., Davidson J., Patto M.C.V., Warkentin T.D., Thomas J. and Rubiales D. 2006.** Screening techniques and sources of resistance to rusts and mildews in grain legumes. *Euphytica*. **147**. 255–272.
- **Sillero J.C., Villegas-Fernandez A.M., Thomas J., Rojas-Molina M.M., Emeran A.A., Fernandez Aparicio M. and Rubiales D. 2010.** *Faba bean* breeding for disease resistance. *Field Crops Research*. **115**. 297–307.
- **Singh K.B., Malhotra R.S., Halila M.H., Knights E.J. and Verma M.M. 1994.** Current status and future strategy in breeding chickpea for resistance to biotic and abiotic stresses. *Euphytica*. **73**. 137-149.
- **Singh K.B., Malhotra R.S., Saxena M.C. and Bejiga G. 1997.** Superiority of winter sowing over traditional spring sowing of chickpea in the Mediterranean region. *Agronomy Journal*. **89**. 112-118.
- **Singh P. K., Sharma H., Srivastava N. and Bhagyawant S.S. 2014.** Analysis of Genetic Diversity among Wild and Cultivated Chickpea Genotypes Employing ISSR and RAPD Markers. *American Journal of Plant Sciences*. **5**. 676-682.
- **Song W.J., Zhou W.J., Jin Z.L., Cao D.D., Joel D.M., Takeuchi Y. and Yoneyama K. 2005.** Germination response of Orobanche seeds subjected to conditioning temperature, water potential and growth regulator treatments. *Weed Research*. **45**. 467-476.
- **Sukno S., Jan C.C., Melero-Vara M. and Fernandez-Martinez J.M. 1998.** Reproductive behavior and broomrape resistance in interspecific hybrids of sunflower. *Plant Breeding*. **117**. 279–285.

-T-

- **Tahir N.A.R. and Karim H.F.H. 2011.** Determination of genetic relationships among some varieties of chickpea (*Cicer arietinum L*) in Sulaimani by RAPD and ISSR Markers. *Jordan Journal of Biological Sciences*. **4**. 77-86.
- **Tosh S.M. and Yada S. 2010.** Dietary fibres in pulse seeds and fractions: Characterization, functional attributes, and applications. *Food Research International*. **43 (2)**. 450-460.
- **Tsanuo M.K., Hassanali A., Hooper A.M., Khan Z., Kabiera F., Pickett J.A. and Wadhams L.J. 2003.** Isoflavanones from the allelopathic aqueous root exudates of *Desmodium uncinatum*. *Phytochemistry*. **64**. 265–273.

-U-

- **Upadhyaya H.D., Bramel P.J. and Singh S. 2001.** Development of a chickpea core collection using geographic distribution and quantitative traits. *Crop Sciences*. **41**. 206–210.

- **Urbanek H., Kuzniak-Gebarowska E. and Herka K.1991.** Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. *Acta Physiologia Plantarum*. **13**. 43-50.

-V-

- **Vazpatto M.C.,Diaz Ruiz R.,Satovic Z., Roman B., Pujadas- Salva A.J. and Rubiales D. 2008.** Genetic diversity of Moroccan populations of *Orobancha foetida*: from wild parasitic plants to parasitic weeds. *Weed Research*. **48**.179–186
- **Véronési C., Bonnin E., Calvez S., Thalouarn P. and Simier P. 2007.** Activity of secreted cell wall modifying enzymes and expression of peroxidase-encoding gene following germination of *Orobancha ramosa*. *Biologia Plantarum*. **51**.391–394.
- **Veselovskii V.A., Veselova T.V., Korogodina V.L., Florko B.V. and Mokrov I. 2006.** Bimodal changes in germinability of pea seeds under the influence of low doses of gamma radiation. *Radiats Biol Radioecol*. **46**. 691-696.
- **Vovlas N., Rapoport H.F., Jiménez Díaz R.M. and Castillo P. 2005.** Differences in feeding sites induced by root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., in chickpea. *Phytopathology*. **4**. 368–375.

-W-

- **Wang J., Gan Y. T., Clarke F. and McDonald C. L. 2006.** Response of Chickpea Yield to High Temperature Stress during Reproductive Development. *American Society of Agronomy*. **46(5)**. 2171-2178.
- **Wang N., Hatcher D. W., Tyler R. T., Toews R. and Gawalko E. J. 2010.** Effect of cooking on the composition of beans (*Phaseolus vulgaris L.*) and chickpeas (*Cicer arietinum L.*). *Food Research International*. **43 (2)**. 589-594.
- **Wang Y. and Zhang Y.2010.** Salicylic acid induces the accumulation of defense-related enzymes in Whangkeumbae pear and protects from pear black spot. *Frontiers of Agriculture in China*. **3**. 2-5.
- **Watling J. R. and Press M. C. 2001.** Impacts of infection by parasitic angiosperms on host photosynthesis. *Plant Biology*. **3**. 244–250.
- **Wegmann K., von Elert E., Harloff H.J. and Stadler M. 1991.** Tolerance and resistance to *Orobancha*. In: Wegmann K, Musselman LJ, eds. *Progress in Orobancha research*. Tübingen, Germany: Eberhard- Karls-Universität, 318-321.
- **Weising K., Nybom H. and Wolf K. 2005.** DNA fingerprinting in plants: principles, methods and applications. – CRC Press/Taylor and Francis. 32p.

- **Wencai Q., Liang Z., Lin W., Hangbo X., Qingsheng J. and Zhen J. 2015.** Pretreatment with low-dose gamma irradiation enhances tolerance to the stress of cadmium and lead in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **115**. 243–249.
- **Wery J. 1990.** Adaptation to frost and drought stress in chickpea and implications in plant breeding. *Options Méditerranéennes*. **9**. 77-85.
- **Wery J., Silim S.N., Knights E.J., Malhotra R.S. and Cousin S. 1994.** Screening techniques and sources and tolerance to extremes of moisture and air temperature in cool season food legumes. *Euphytica*. **73**. 73–83.
- **Westwood J.H. 2013.** The physiology of established Parasite-host association. Parasitic orobanchaceae. Springer, Berlin. 87-114p.
- **Wi S.G., Chung B.Y. and Kim J.S. 2007.** Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants. *Micron*. **38**. 553-564.

-X-

- **Xie X., Yoneyama K., Kusumoto D., Yamada Y., Takeuchi Y., Sugimoto Y. and Yoneyama K. 2008a.** Sorgomol, germination stimulant for root parasitic plants, produced by *Sorghum bicolor*. *Tetrahedon Letters*. **49(13)**. 2066-2068.
- **Xie X., Yoneyama K., Kusumoto D., Yamada Y., Yokota T., Takeuchi Y. and Yoneyama K. 2008b.** Isolation and identification of alectrol as (+)-orobanchyl acetate, a germination stimulant for root parasitic plants. *Phytochemistry*. **69**. 427–431.
- **Xie X., Yoneyama K. and Yoneyama K. 2010.** The strigolactone story. *Annual Review of Phytopathology*. **48**. 93-117.

-Y-

- **Yenish J.P. 2007.** Weed management in chickpea. In: Yada S.S., Redden B., Chen W. and Sharma B. (eds) Chickpea breeding and management. CAB International, Wallingford. 233-245.
- **Yamunarani K., Jaganathan R., Bhaskaran R., Govindaraju P. and Velazhahan R. 2004.** Induction of early blight resistance in tomato by *Quercus infectoria* gall extract in association with accumulation of phenolics and defense-related enzymes. *Acta Physiologia Plantarum*. **26**. 281-290.
- **Yoder J.I. 2001.** Host–plant recognition by parasitic Scrophulariaceae. *Current Opinion in Plant Biology*. **4**. 359–365.

- **Yoneyama K., Xie X., Sekimoto H., Takeuch, Y., Ogasawara S., Akiyama K., Hayashi H. and Yoneyama K. 2008.** Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular myco rhizal fungi, from Fabaceae plants. *New Phytologist*. **179**. 484–494.
- **Yoneyama K., Ruyter-Spira C. and Bouwmeester H. 2013.** Induction of germination. *Parasitic Orobanchacea*. Springer, Berlin. 167-194p.
- **Yust M.M., Pedroche J., Giron-Calle J., Alaiz M., Millan F. and Vioque J. 2003.** Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. *Journal of Food Chemistry*. **81**. 363–369.

-Z-

- **Zoghlami A. and Hassen H. 1999.** Observations on the distribution and ecology of annual *Medicago* species in Northern Tunisia. In «Genetic Resources of Mediterranean Pasture and Forage Legumes», Kluwer Academic Publishers. **33**. 235-238.

Thèse de Doctorat

Ines BRAHMI

Obtention et caractérisation de nouveaux génotypes de pois chiche, par radio-mutagenèse, résistants à l'*Orobanche foetida*

Résumé

Les orobanches sont des adventices parasites largement répandues dans les agrosystèmes du bassin méditerranéen. En Tunisie, *Orobanche foetida* s'attaque aux Légumineuses cultivées et en cause d'importantes pertes. Les méthodes de lutte actuellement proposées demeurent insuffisantes. Parmi ces dernières, la sélection des variétés résistantes reste la méthode de contrôle la plus économique. Dans ce contexte, l'induction de mutations génétiques en utilisant les rayons gamma a été testé pour augmenter la variabilité génétique de pois chiche avec l'objectif ici à moyen terme de proposer de nouvelles lignées résistantes. L'effet de l'irradiation sur la germination et la croissance des plantes de pois chiche (cv. Amdoun) a été étudié. La dose 150 Gy a été définie comme la dose mutagène capable d'induire des mutations génétiques chez le pois chiche (cv. Amdoun). Une première sélection phénotypique dans une parcelle naturellement infestée par *O. foetida* a permis de sélectionner 30 génotypes mutants (M2), en raison de leur faible sensibilité, qui se traduisait par un nombre réduit d'orobanches émergées. Ces génotypes ont été ensuite étudiés au laboratoire pour apprécier d'une part leur capacité à induire la germination des graines d'orobanche et d'autre part leur degré de résistance en conditions d'infestation artificielle. Aucun des mutants n'a perdu totalement sa capacité à induire la germination de l'orobanche mais cinq d'entre eux ont une capacité significativement réduite par rapport au témoin Amdoun. La résistance repose également sur l'induction d'une nécrose précoce du parasite, empêchant la formation du suçoir, et sur une perturbation du développement souterrain de la hampe florale qui limite l'émergence du parasite. L'ensemble de ces caractères induits par radiomutagenèse est stable puisque conservés dans la génération M3. L'efficacité de la radiomutagenèse pour induire une résistance forte repose sur la modulation, dans les racines sous infestation, du profil d'accumulation des composés phénoliques solubles et de l'expression d'acteurs majeurs de la résistance à l'orobanche tels que les peroxydases et la polyphénoloxylase.

Mots clés :

Rayons gamma ; mutation induite ; nouveaux génotypes ; pois chiche ; plante parasite ; résistance ; *Orobanche foetida* ; minirhizotron

Abstract

Broomrapes are parasitic weeds widespread in agricultural systems of the Mediterranean basin. In Tunisia, *Orobanche foetida* attacks on cultivated legumes cause significant losses. Currently proposed control methods are insufficient. The selection of resistant varieties is the most economic method of control. In this context, the induction of genetic mutations is used to increase the genetic variability in the medium term for propose new resistant lines. In our study, the effectiveness of radio mutagenesis was evaluated in chickpea. The effect of irradiation on the germination and growth of chickpea plants (cv. Amdoun) was studied. The 150 Gy dose was defined as the mutagen dose capable of causing genetic mutations in chickpea A first phenotypic selection in a naturally *O. foetida* infested plot was used to select 30 genotypes (M2 progeny), because of their low sensitivity which resulted in a reduced number of emerged orobanche. These genotypes were then studied in the laboratory to appreciate first their ability to induce seed germination broomrape and also their degree of resistance under artificial infestation. None of the mutants has completely lost the ability to induce germination of *Orobanche* seeds but five of them displayed a significantly reduced capacity compared to Amdoun control. Additional resistance components were observed, such as early necrosis of the parasite which prevents haustorium formation, and late disturbance in the subterranean development of the floral shoot which reduced parasite emergence. All the radiomutagenesis induced characters were stable as kept in the following M3 generation. This study shows that the effectiveness of radiomutagenesis for producing strong resistance is related to modulations of accumulation of phenolic compounds and expression patterns of peroxidases and polyphenoloxidase in chickpea roots under infestation.

Key Words:

Gamma ray; induced mutation; new genotypes; chickpea; parasitic plant; strength; *Orobanche foetida*; mini-rhizotron