

Table des matières

Introduction	1
Structure d'accueil du stage.....	1
Cadre de l'étude et objectifs	1
Généralités concernant le colza	3
Généralités concernant l'orobanche	4
Apports des Fabacées en agronomie et implications dans l'allélopathie	7
Matériels et méthodes.....	8
Matériel végétal	8
Choix des espèces et variétés de Fabacées cultivées	8
Mise en place des cultures de Fabacées et production des exsudats racinaires	9
Lots de graines de <i>P. ramosa</i> utilisés pour les tests d'activité.....	10
Préparation des suspensions de graines stériles et mise en conditionnement.....	11
Tests de germination des graines d'orobanche en plaque 96 puits.....	12
Collecte de la biomasse et extraction à froid des composés hydrophiles et hydrophobes ...	13
Analyse de composés purs.....	14
Analyse statistique des données	14
Résultats	15
Résultats des tests d'activités stimulantes de la germination des graines d'orobanche	15
Résultats des tests d'inhibition de la germination des graines d'orobanche	21
Résultats des tests pour les extraits racinaires et foliaires	22
Résultats des tests d'activité des composés purs	23
Discussion	24
Conclusion.....	27
Références bibliographiques	28
Annexes	32

Glossaire

Tampon Hépès : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

Strigolactones : Famille de composés produits par le métabolisme secondaire de nombreuses plantes et induisant un signal de germination pour les graines de certaines plantes parasites (*Phelipanche ramosa*, *Striga hermonthica*, ...)

GR24 : Analogue synthétique de strigolactones utilisé ici pour stimuler les graines de *Phelipanche ramosa*

PPM : Plant Preservative Mixture. Biocide/ fongicide destiné à la culture de tissus végétaux, évitant les contaminations en milieu aqueux

MTT : MethylThiazolyldiphenyl-Tetrazolium bromide (sel de tetrazolium)

EC50 : En français, concentration efficace médiane (CE50), concentration d'un composé actif qui induit une réponse à 50 % de l'effet maximal qui peut être observé. Ici concentration nécessaire pour induire 50% du taux maximum de germination

IC50 : En français, concentration inhibitrice médiane (CI50), concentration d'un composé inhibiteur qui induit une inhibition de l'activité biologique à 50 % de l'inhibition maximale qui peut être observée. Ici concentration nécessaire en inhibiteur pour induire 50% d'inhibition par rapport au taux maximum de germination dans les mêmes conditions

TT medium : Milieu nutritif « TT » ; Milieu de Tadano et Tanaka

Liste des abréviations

ABA : Acide abcissique (Abcissic acid)

ANITTA : Association Nationale Interprofessionnelle et Technique du Tabac

CETIOM : Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux et du chanvre

ITCF : Institut Technique des Céréales et des Fourrages

MW : Molecular weight (Masse moléculaire d'un composé)

Liste des annexes

Annexe IComposition du milieu TT 50% utilisé pour l'irrigation des Fabacées de l'étude

Annexe II.....Biomasses fraîches aériennes et racinaires des différentes variétés pesées en fin de culture

Rapport-Gratuit.com

Liste des Figures

- Figure 1Cycle biologique de l'orobanche rameuse (*Phelipanche ramosa* L.) de la graine à la fructification
- Figure 2Illustration du dispositif de « double pot » utilisé pour la mise en place des cultures de Fabacées et la collecte des exsudats racinaires
- Figure 3.....Photographies du dispositif expérimental en double pots (hydroponie) en chambre de culture
- Figure 4..... Aperçu de la germination en plaque des graines d'orobanche rameuse en réponse à un stimulant de germination
- Figure 5..... Schémas synoptiques des protocoles de « tests d'activation » et des « tests d'inhibition »
- Figure 6..... Composés testés pour leur activité sur les graines des lots Pram11 et Pram118
- Figure 7.....Cinétiques d'activité stimulante des exsudats de pois vis-à-vis de la germination des graines d'orobanche
- Figure 8..... Cinétiques d'activité stimulante des exsudats de soja vis-à-vis de la germination des graines d'orobanche
- Figure 9..... Cinétiques d'activité stimulante des exsudats de féverole vis-à-vis de la germination des graines d'orobanche
- Figure 10..... Cinétiques d'activité stimulante des exsudats de trèfle blanc vis-à-vis de la germination des graines d'orobanche (Lot Pram11)
- Figure 11.....Cinétiques d'activité inhibitrice des exsudats de féverole vis-à-vis de la germination des graines d'orobanche
- Figure 12..... Cinétiques d'activité inhibitrice des exsudats de lupin vis-à-vis de la germination des graines d'orobanche
- Figure 13.....Cinétiques d'activité inhibitrice des exsudats de pois vis-à-vis de la germination des graines d'orobanche
- Figure 14..... Cinétiques d'activité inhibitrice des exsudats de soja vis-à-vis de la germination des graines d'orobanche
- Figure 15.....Taux de germination des graines du lot Pram11 en fonction d'un gradient décroissant d'inhibiteur et IC50 associées

Liste des tableaux

Tableau I.....Liste des variétés commerciales de Fabacées utilisées pour l'étude, cultivées sur billes de verre sodocalcique en conditions contrôlées

Tableau II.....Valeurs d'IC50 de la germination du lot Pram11 obtenues pour l'ABA ainsi que pour les 3 composés à partir du modèle de régression logistique à 4 paramètres et erreurs standards associée au modèle

Introduction

Structure d'accueil du stage

Le laboratoire de Biologie et Pathologies Végétales (LBPV, EA 1157) de l'Université de Nantes travaille depuis de nombreuses années sur les problématiques inhérentes aux plantes adventices parasites. De nombreux travaux ont porté sur les genres *Striga* et *Orobanche*. Leur biologie, les mécanismes de pathogénicité, leur physiologie (germination, développement en post fixation) y sont étudiés à travers plusieurs approches telles que la génétique des populations, la biochimie et la biologie moléculaire. Le laboratoire accompagne également les chambres d'agriculture et les instituts techniques dans l'évaluation de nouvelles méthodes de lutte (génétique, pratiques culturales).

Les activités du laboratoire se focalisent désormais sur les orobanches qui sont devenues le sujet d'expertise de ce laboratoire. La problématique Orobanche est effectivement croissante en France, sur Colza, Chanvre et Tabac (Orobanche rameuse : *Phelipanche ramosa*) et sur tournesol (*O. cumana*). Le LBPV fait partie de la Structure Fédérative de Recherche QUASAV (Qualité et Santé du Végétal, SFR 4207). L'équipe est présente sur plusieurs projets de recherche, en collaboration avec des organismes publics tels que les chambres d'agriculture, des centres techniques et interprofessionnels tel que le CETIOM et l'ANITTA ou des acteurs privés (sociétés semencières, phytosanitaires...).

Cadre de l'étude et objectifs

La présente étude s'inscrit dans le cadre du projet PHERAFAB (*Phelipanche ramosa*-Fabacées), qui porte sur l'appréciation de la pertinence d'un couvert associé au colza d'hiver, gélif ou non, pour réduire les infestations d'orobanche au champ. La partie du travail en laboratoire qui sera traitée ici est en charge de chercher à identifier et caractériser une potentielle allélopathie sur une collection de variétés commerciales de Fabacées cultivées et portant un intérêt économique ou agronomique en association (fourragères ou engrais « verts ») issues des catalogues des semenciers. Ce projet regroupe les chambres d'agriculture des départements de la Vendée, Charente, des Deux-Sèvres et de l'Aube, ainsi que l'UMR

Agroécologie de Dijon (UMR 1347). L'intégralité des travaux voit son déroulement prévu sur une période de 3 ans de 2014 à 2016.

Le projet PHERAFAB comprend une étude en conditions contrôlées et en laboratoire (partie qui sera traitée ici) ayant pour but le « screening » d'un grand nombre de variétés commerciales. Le projet PHERAFAB englobe également, *a posteriori* par rapport à cette étude (dès 2014) et en plein champs, des expérimentations associant le colza d'hiver à des cultures de Fabacées. Ces expérimentations de terrain sont implantées dans les départements de Vendée, Charente Maritime et Aube, au sein de parcelles infestées par l'orobanche rameuse (ne sera pas traité dans ce document).

L'objectif appliqué sera, à terme, d'identifier les espèces fourragères utilisables en interculture ou en culture associée, qui auraient un impact baissier sur les infestations. Ces cultures seraient valorisables dans un contexte agronomique et bénéfiques dans le cadre d'une lutte contre l'orobanche.

Plusieurs cas de figures sont envisageables et peuvent présenter un intérêt face à la problématique de l'orobanche rameuse sur le colza d'hiver :

- l'un étant le cas où des stimulants de germination des graines d'orobanche sont retrouvés dans les exsudats de Fabacées (allélopathie positive). Si ces espèces sont gélives, leur usage en couvert, placé avant le colza dans la rotation (interculture), est envisageable pour induire une germination « suicide » des graines d'orobanche, diminuant ainsi drastiquement le stock de graines viables des sols. Restant dépendante d'une période de gel hivernal, cette option ne garantit pas une efficacité dans toutes les régions et toutes les années.

- l'autre étant le cas où des inhibiteurs de germination ou de croissance de la radicule sont retrouvés dans les exsudats de Fabacées (allélopathie négative). L'inhibition de la germination des graines engendrée par la présence d'un couvert associé peut effectivement se révéler être une piste très intéressante pour contrôler les infestations, à l'image du 6-chloroacetyl-2-benzoxazolinone, dérivé du 2-benzoxazolinone, un composé présent chez les Poacées comme l'avoine cultivée (*Avena sativa* L.). Ce composé a été identifié et caractérisé comme un inhibiteur de la germination d'*Orobanche crenata* (Fernández-Aparicio *et al.*, 2013). Sur ce même principe, le trigoxazonane, composé identifié chez le fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*) est un inhibiteur de la germination des graines d'*Orobanche crenata* (Evidente *et al.*, 2007).

Les bénéfices de l'association culturale avec ce type d'espèces, ayant au laboratoire un impact négatif sur la germination des orobanches, se révèlent également reproductibles au champ et montrent ainsi des résultats encourageants quant au contrôle de ces adventices parasites (Fernández-Aparicio *et al.*, 2007). En Espagne, les associations céréales (Avoine) – Pois, Fève sont proposées pour réduire les infestations d'*O. crenata* dans les parcelles de pois ou de fève (Fernández-Aparicio *et al.*, 2007). De façon semblable, des associations avec *Desmodium spp.* sont utilisées pour lutter efficacement contre *Striga hermonthica* dans les champs de céréales (sorgho, maïs) en Afrique (Khan *et al.*, 2002).

Dans le cadre de perspectives d'usage de pratiques plus respectueuses de l'environnement et du maintien de l'équilibre des agrosystèmes, les associations utiles sont désormais souvent recherchées en agriculture. Ces solutions apportent une réponse plus intégrée que la lutte chimique, moins coûteuse pour l'exploitant, voire potentiellement bénéfique sur le plan économique si les végétaux d'association sont considérés eux aussi comme valorisables (Deguine *et al.*, 2008). Par ailleurs, ces associations permettent dans certains cas de constituer une barrière de protection génétique et physique contre plusieurs types de pathogènes, en comparaison à la monoculture qui tend à rendre le peuplement agronomique plus vulnérable (Ndzana Abanda, 2012).

Généralités concernant le colza

Le colza (*Brassica napus* L.) est une plante annuelle de la famille des Brassicacées. L'importance et les avantages de la culture du colza sont bien réels quant aux applications possibles et débouchés des produits de culture. Les produits dérivés du colza sont utilisables en alimentation animale (tourteau), en alimentation humaine (huiles) mais également comme agrocarburants (biofuels). Le colza d'hiver fait également office de couvert végétal dans le cadre d'une rotation, et limite ainsi le lessivage de l'azote (De Toffoli *et al.*, 2010).

Sur le territoire français, plusieurs régions se prêtent aisément à l'implantation de parcelles pour l'exploitation de cette grande culture. D'autant plus que depuis ces dernières années, les récentes volontés de développer les agrocarburants encouragent l'usage du colza à des fins autres qu'alimentaires, augmentant la pression de demande sur les produits dérivés de cette culture.

Depuis quelques années, le CETIOM suit de près la répartition géographique des nouvelles infestations de champs de colza par l'orobanche rameuse. Les chambres d'agriculture de Vendée, Deux-Sèvres, Charente maritime et Aube s'impliquent également dans cette problématique du fait que ces régions sont, géographiquement, directement concernées par cette adventice parasite.

L'expansion des infestations sur le territoire français pose problème de manière croissante (Gibot-Leclerc *et al.*, 2006). Dans les régions les plus affectées, la menace d'infestation sur les parcelles de colza pousse de plus en plus d'exploitants agricoles français à se détourner de cette culture qui possède pourtant un potentiel de valorisation certain. Ce constat se combine avec un coût plus élevé des intrants, comme par exemple l'azote, qui résulte de l'accroissement du prix des énergies fossiles sur cette période. La production d'engrais azotés étant majoritairement dépendante de l'approvisionnement en gaz naturel (Ott, 2012).

Généralités concernant l'orobanche

Les Orobanches (*Orobanche* et *Phelipanche* spp) sont des plantes adventices parasites qui impactent de nombreuses espèces dicotylédones dont plusieurs d'intérêt agronomique majeur appartenant pour une grande partie aux familles des Solanacées, Cucurbitacées, Fabacées et Brassicacées. L'orobanche rameuse (*Phelipanche ramosa* L.) est essentiellement représentée dans les agrosystèmes du pourtour méditerranéen. Le Colza (*Brassica napus* L.) entre ainsi dans la large gamme d'hôtes de ce parasite végétal qui a su montrer des capacités d'adaptation remarquables. La présence d'orobanche sur colza a été enregistrée dans plusieurs pays européens. Néanmoins les infestations les plus préoccupantes sont observées en France, particulièrement dans la région Poitou Charente et le Département de la Vendée. A ce jour, ni la lutte génétique, ni la lutte chimique ne permettent une protection efficace des cultures face à l'orobanche (Aly, 2007). La sévérité des dégâts sur les cultures infestés peut aller jusqu'à la simple perte de la parcelle si l'infestation est importante et si la résistance de la variété cultivée est faible. Les végétaux parasités sont en effet limités dans leur développement, voire stoppés selon le degré d'infestation et l'agressivité du pathotype d'orobanche. D'un point de vue agronomique mais surtout économique, l'orobanche rameuse est considérée comme un problème d'une envergure certaine. Les producteurs de colza confrontés à la problématique de l'orobanche rameuse sont fortement demandeurs de solutions du fait du risque économique que font peser les infestations. Cette plante est dite holoparasite ce qui signifie qu'elle est intégralement dépourvue de chlorophylle, ce qui implique l'impossibilité d'autotrophie, et dépend de l'hôte pour ses apports carbonés.

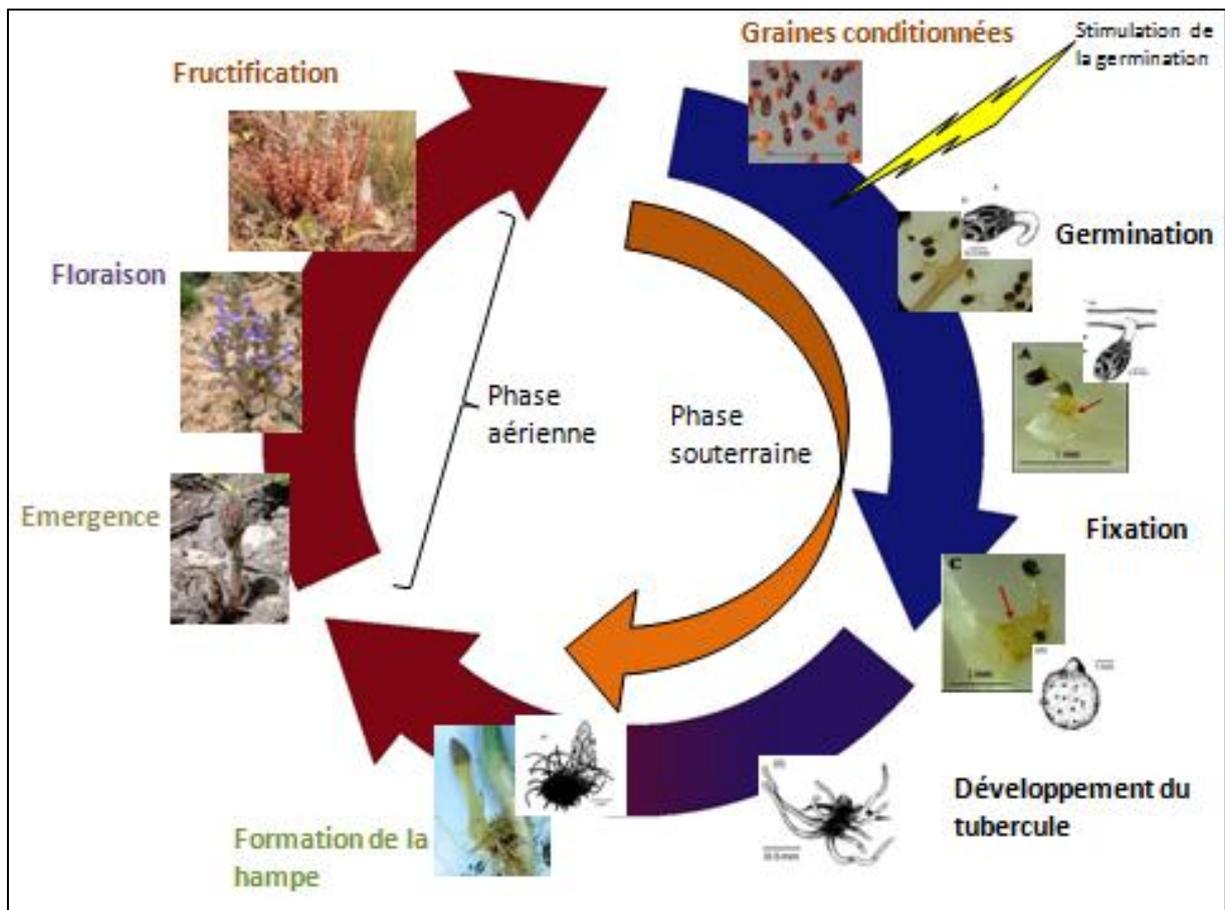


Figure 1. Cycle biologique de l'orobanche rameuse (*Phelipanche ramosa* L.) de la graine à la fructification. La phase souterraine correspond à une durée de développement de 6 à 10 semaines. La phase aérienne correspond à une durée de développement de 2 à 4 semaines.

L'orobanche est également épirhyze c'est-à-dire qu'elle se fixe à l'appareil racinaire de l'hôte. Les orobanches ne possèdent pas de racines fonctionnelles et doivent donc puiser l'eau, mais aussi les nutriments minéraux et organiques dans les tissus conducteurs des plantes hôtes (Hibberd et Jeschke, 2001). La fixation des orobanches sur leur hôte est donc indispensable à leur développement et la connexion vasculaire se fait principalement sur les tissus phloémiens (Hibberd *et al.*, 1999). Une fois la graine germée et la radicule sortie et allongée, le contact entre l'orobanche et la racine hôte est initié (mécanisme intégrant un chimiotactisme). Il y a alors formation de l'haustorium ou « suçoir » qui permettra d'instaurer un continuum symplasmique avec les tissus vasculaires de l'hôte.

Le cycle de vie de l'orobanche, qui ne peut avoir lieu qu'en présence d'un hôte, peut être décomposé en deux phases : la phase souterraine et la phase aérienne (Figure 1).

La phase souterraine comporte elle-même plusieurs étapes.

Premièrement, la germination des graines en réponse aux stimulants émis par la plante hôte : ces graines ne seront réceptives aux stimulants qu'après avoir subi une phase de conditionnement, proche du principe du « priming », dépendant des conditions environnementales (température, humidité relative, lumière...). A 21°C, la période nécessaire pour que les graines deviennent réceptives aux stimulants de germination est de 4 jours minimum (Lechat *et al.*, 2012). Ces exsudats peuvent être de nature différente selon les espèces hôtes. Certains composés actifs peuvent être la résultante de la dégradation par la flore de la rhizosphère de molécules synthétisées par la plante hôte. C'est effectivement le cas dans l'allélopathie Colza-Orobanche où les glucosinolates issus d'une voie de biosynthèse du métabolisme secondaire du colza ne sont pas intrinsèquement actifs. Par contre, certains produits de dégradation comme les isothiocyanates sont quant à eux actifs et activateurs de la germination de *P. ramosa* (Auger *et al.*, 2012). Dans d'autres pathosystèmes impliquant l'orobanche, la majeure partie des stimulants de germination sont des strigolactones, des composés dérivés de caroténoïdes synthétisés par la voie de biosynthèse de terpènes (Bouwmeester *et al.*, 2003). Cette germination dépendante de stimulants exogènes pourrait être qualifiée de levée de dormance sur le critère caractéristique du mécanisme de diminution de la dose d'acide abscissique endogène (Kebreab *et al.*, 1999); mais dans ce document nous utiliserons le terme d'activation de la germination lorsque nous citerons un composé allélopathique agissant sur les graines de cette manière.

Deuxièmement, la radicule de l'orobanche adhère à une racine hôte, envahit son cortex racinaire (force mécanique accompagnant des activités pectinolytiques) et se connecte aux tissus phloémiens racinaires *via* la différenciation de l'haustorium.

Troisièmement, le développement post-fixation de l'orobanche est initié par le développement d'un tubercule puis d'une tige (hampe florale) à partir d'un bourgeon axillaire. Cette dernière phase s'accompagne d'une intensification des transferts nutritionnels à partir de l'hôte et impacte significativement le développement de ce dernier.

La phase aérienne comporte l'étape d'émergence de la hampe florale, la floraison puis la fructification (de 2 à 4 semaines) qui est l'étape d'aboutissement du cycle pour la dissémination et la possibilité de commencer un nouveau cycle.

L'orobanche émet après floraison et fructification, un grand nombre de graines (100 000 à 1 million de graines par pied d'orobanche) facilement dispersables et de taille extrêmement réduite. De nombreuses graines ne généreront pas de nouvel individu étant donné les fortes contraintes à la germination, mais du fait de l'abondance des semences produites, cela ne pose aucune limite pour la dissémination de l'espèce, cela faisant partie de la stratégie de reproduction de l'orobanche.

La durée de vie des graines dans le sol est également un aspect qui complexifie l'éradication. Les graines d'orobanche peuvent effectivement rester plusieurs années dans les sols sans perdre de vigueur. Une infestation en un lieu donné et à un moment donné ne peut donc pas être considérée comme un épiphénomène car les cultures suivantes, sous réserve qu'elles soient des hôtes sensibles, feront débiter un nouveau cycle de parasitisme.

Un autre problème majeur dans le contrôle de ce parasite est celui de la faculté de l'orobanche à parasiter certaines espèces sauvages ou adventices parfois endémiques des régions où l'on cultive le colza. L'orobanche est en effet un pathogène à large spectre d'hôte (Brault *et al.*, 2007 ; Boulet *et al.*, 2013). Cet aspect rend d'autant plus difficile l'appréhension et le contrôle de la présence du parasite dans les zones touchées, car il assure à l'orobanche un renouvellement permanent des stocks de graines viables et potentiellement aptes à ré-infester les cultures d'intérêt.

Leur faculté à rester en dormance primaire en l'absence de stimulants de germination empêche toute approche classique de « faux semis » utilisée pour certaines adventices. Cette technique consiste à laisser les adventices germer et lever, sans terminer leur cycle reproducteur par fauche ou application d'herbicides dans le but de faire baisser le stock de graines dans les sols. Ces graines possèdent effectivement la propriété de ne pas germer en l'absence d'élliciteurs biochimiques synthétisés par de nombreuses espèces de dicotylédones sauvages ou cultivées. Il est donc nécessaire pour la graine de recevoir un signal exogène provenant par exemple des exsudats racinaires libérés dans la rhizosphère.

Plusieurs types d'orobanche rameuse semblent être discriminés parmi les populations présentes sur le territoire français en fonction de leur spécificité d'hôtes et leur répartition géographique. On distingue à ce jour au moins trois types génétiques différents d'orobanche rameuse au sein des populations françaises (Benharrat *et al.*, 2005; Voisin *et al.*, 2011) Le pathotype I est quasi-exclusif en Vendée, Deux-Sèvres et Charente Maritime dans tous types de cultures et adventices. Le pathotype II est majoritaire dans l'Aube, principalement dans les parcelles de chanvre. Le pathotype III, moins échantillonné à ce jour que les deux autres types génétiques, serait majoritaire dans les parcelles de tabac dans les départements du Sud-Ouest de la France.

Pour cette étude, nous utiliserons deux lots de graines d'orobanche provenant de deux populations différentes de types 1 et 2 (graines de type III en quantité insuffisante au laboratoire).

Apports des Fabacées en agronomie et implications dans l'allélopathie

Les Fabacées (*Fabaceae* spp.) ou légumineuses sont des dicotylédones comprenant environ 18000 espèces. Economiquement, cette famille végétale prend son importance de par le fait qu'elle constitue une source de protéines pour l'alimentation animale essentiellement, mais également humaine (*Glycine max*, *Pisum sativum*,...). Ces cultures sont souvent peu demandeuses d'intrants et entrent dans la composition de la rotation des cultures en temps que couverts végétaux. Les couverts dits « fourragers » composés de Fabacées sont effectivement souvent qualifiés de pièges à azote d'où le terme de CIPAN (Cultures Intermédiaires Pièges À Nitrate). Les Fabacées offrent une croissance rapide et un gain de biomasse très important du fait des feuillages plus denses que les autres couverts. La masse sèche des fourrages en légumineuse est par exemple plus importante que celle de certaines Brassicacées, comme la moutarde blanche (Pousset, 2000) qui est par ailleurs un des couverts les plus utilisés actuellement en France (ITCF, 2002). L'apport bénéfique en valeur agronomique est donc une des raisons essentielles à l'intégration des Fabacées dans la rotation. Ces propriétés constituent également une plus value environnementale qui, dans le contexte actuel de réduction des intrants crédibilise les pratiques de rotation ou d'association culturales utilisant les espèces de fabacées fourragères comme couvert.

Les Fabacées sont documentés comme étant impliqués dans des processus allélopathiques désormais bien connus, comme la symbiose avec les bactéries rhizobiacées diazotrophes capables de fixer l'azote atmosphérique et de le restituer sous forme ammoniacal (Long, 1989). Hormis les apports cités précédemment, l'allélopathie impliquant les Fabacées peut se révéler positive dans la préservation sanitaire des parcelles, par exemple contre les adventices ou les nématodes. Des filtrats de partie aériennes de *Canavalia ensiformis* et *Mucuna pruriens* ont ainsi montré des effets nématotoxiques (Caamal-Maldonado *et al.*, 2001). Parmi les espèces de Fabacées cultivées, plusieurs ont montré des activités stimulatrices de la germination des graines d'orobanche rameuse (Fernández-Aparicio *et al.*, 2009).

L'orobanchyl acétate, l'orobanchol, le 5-deoxystrigol ainsi que le fabacyl acétate font partie effectivement des métabolites secondaires largement représentés chez les Fabacées et sont des stimulants de germination de plusieurs espèces d'orobanches dont *P. ramosa* (Yoneyama *et al.*, 2008 ; Xie *et al.*, 2009). Evidente *et al.* (2006) ont également démontré que certains composés, isolés du pois (*Pisum sativum* L.) et proches de la structure des strigolactones comme le peagol et le peagoldione, stimulent la germination d'*Orobanche foetida* et *Phelipanche aegyptiaca* (Evidente *et al.*, 2009). L'activité allélopathique des Fabacées peut être également négative vis-à-vis de l'orobanche comme le suggèrent les travaux de Fernandez-Aparicio, (2010) qui démontrent la réduction des infestations d'*Orobanche crenata* sur les cultures de Pois et Féverole, par l'association avec le trèfle d'Alexandrie (*Trifolium alexandrinum*).

Tableau I. Liste des variétés commerciales de Fabacées utilisées pour l'étude, cultivées sur billes de verre sodocalcique en conditions contrôlées. NR : non renseigné.

REF EXPE	Espèce	Variété	Fournisseur	Obtenteur
JAM	<i>Pisum sativum</i> L.	JAMES	R-A-G-T	Serasem (FR)
GER	<i>Pisum sativum</i> L.	GERONIMO	R-A-G-T	Serasem (FR)
IND	<i>Pisum sativum</i> L.	INDIANA	R-A-G-T	Serasem (FR)
BLU	<i>Pisum sativum</i> L.	BLUESTAR	R-A-G-T	Serasem (FR)
MOW	<i>Pisum sativum</i> L.	MOWGLI	R-A-G-T	Serasem (FR)
MAG	<i>Lupinus albus</i>	MAGNUS	Jouffray Drillaud	Gie Prolupin (FR)
CLO	<i>Lupinus albus</i>	CLOVIS	Jouffray Drillaud	Agri Obtentions SA (FR)
ENE	<i>Lupinus albus</i>	ENERGY	Jouffray Drillaud	Groupe Centre Atlantique SCA (FR)
LBA	<i>Lupinus angustifolius</i>	LBA	Jouffray Drillaud	NR
ARA	<i>Lupinus angustifolius</i>	ARABELLA	Jouffray Drillaud	NR
SIR	<i>Glycine max</i> L.	SIRELLIA	R-A-G-T	RAGT 2N (FR)
SPH	<i>Glycine max</i> L.	SPHERA	R-A-G-T	RAGT 2N (FR)
SIG	<i>Glycine max</i> L.	SIGALIA	R-A-G-T	RAGT 2N (FR)
STE	<i>Glycine max</i> L.	STEARA	R-A-G-T	RAGT 2N (FR)
SUL	<i>Glycine max</i> L.	SULTANA	R-A-G-T	RAGT 2N (FR)
FAB	<i>Vicia faba</i>	FABELLE	R-A-G-T	Serasem (FR)
MAY	<i>Vicia faba</i>	MAYA	R-A-G-T	Serasem (FR)
FUE	<i>Vicia faba</i>	FUEGO	R-A-G-T	NR
ESP	<i>Vicia faba</i>	ESPRESSO	R-A-G-T	NR
DIV	<i>Vicia faba</i>	DIVER	Jouffray Drillaud	Institut National de la Recherche Agronomique (FR)
L-FIX	<i>Lens culinaris</i>	LENTI-FIX	SEM-PARTNERS	NR
SAN	<i>Lens culinaris</i>	SANTA	AGRI-OBTENTIONS	Institut National de la Recherche Agronomique (FR)
TAB	<i>Trifolium alexandrinum</i> L.	TABOR	Jouffray Drillaud	NR
SAC	<i>Trifolium alexandrinum</i> L.	SACROMONTE	Jouffray Drillaud	NR
ABE	<i>Trifolium repens</i> L.	ABERACE	Jouffray Drillaud	NR
GIG	<i>Trifolium repens</i> L.	GIGA	Jouffray Drillaud	NR
ALI	<i>Trifolium repens</i> L.	ALICE	R-A-G-T	IGER Institute of grassland & environmental research (GB)
TIV	<i>Trifolium repens</i> L.	TIVOLI	R-A-G-T	Institut National de la Recherche Agronomique (FR)
TRI	<i>Trifolium repens</i> L.	TRIFFID	R-A-G-T	AgResearch (NZ)
CEG	<i>Trifolium incarnatum</i> L.	CEGALO	Jouffray Drillaud	NR
MAR	<i>Trifolium incarnatum</i> L.	MAREMMA 10	R-A-G-T	RAGT 2N (FR)
TRE	<i>Trifolium pratense</i> L.	TREVVIO	R-A-G-T	RAGT 2N (FR)
RAV	<i>Trifolium pratense</i> L.	RAVVI	R-A-G-T	RAGT 2N (FR)
PRU	<i>Medicago sativa</i>	PRUNELLE	R-A-G-T	RAGT 2N (FR)
CAN	<i>Medicago sativa</i>	CANNELLE	R-A-G-T	RAGT 2N (FR)
PER	<i>Onobrychis viciifolia</i>	PERLY	Jouffray Drillaud	NR
LXB	<i>Lotus corniculatus</i> L.	LXB	Jouffray Drillaud	NR

Matériels et méthodes

Matériel végétal

Choix des espèces et variétés de Fabacées cultivées

Les semences de Fabacées utilisés sont des lots envoyés par les semenciers. Les lots reçus n'ont pas été traités pour éviter les biais dus à la présence de molécules potentiellement actives. Les lots de graines n'ont pas été reçus simultanément du fait de notre approvisionnement chez plusieurs semenciers. La mise en place du dispositif expérimental a donc été échelonnée sur 4 mois. Les fournisseurs des variétés de fourragères sont répertoriés dans le **tableau 1** ainsi que la dénomination des espèces commerciales correspondantes. Les obtenteurs de la majorité des semences ont été retrouvés dans le catalogue variétal du GEVES. Cependant, l'obteneur de certaines d'entre elles n'est pas renseigné.

Avant la mise en germination, les semences de Fabacées sont stérilisées en surface dans une solution d'hypochlorite à 2,6% pendant 1 minute sous agitation douce. Quatre rinçages à l'eau distillée stérile sont effectués puis les semences sont gardées en imbibition pendant 2h30 afin de permettre une première hydratation des couches supérieures sans accumuler trop d'eau (avant l'incubation en boîte de pétri). Les semences sont ensuite déposées en conditions stériles sur papier filtre plissé en boîte de pétri carré de 120 mm de côté (30 à 50 graines par boîte) et 10 mL d'eau distillée stérile y sont appliqués. Les boîtes de pétri sont ensuite scellées avec une bande de Parafilm afin de garder stérilité et humidité. L'incubation a lieu pendant 7 jours en chambre de culture à 21°C sous une photopériode de 16h de jour et 8h de nuit.

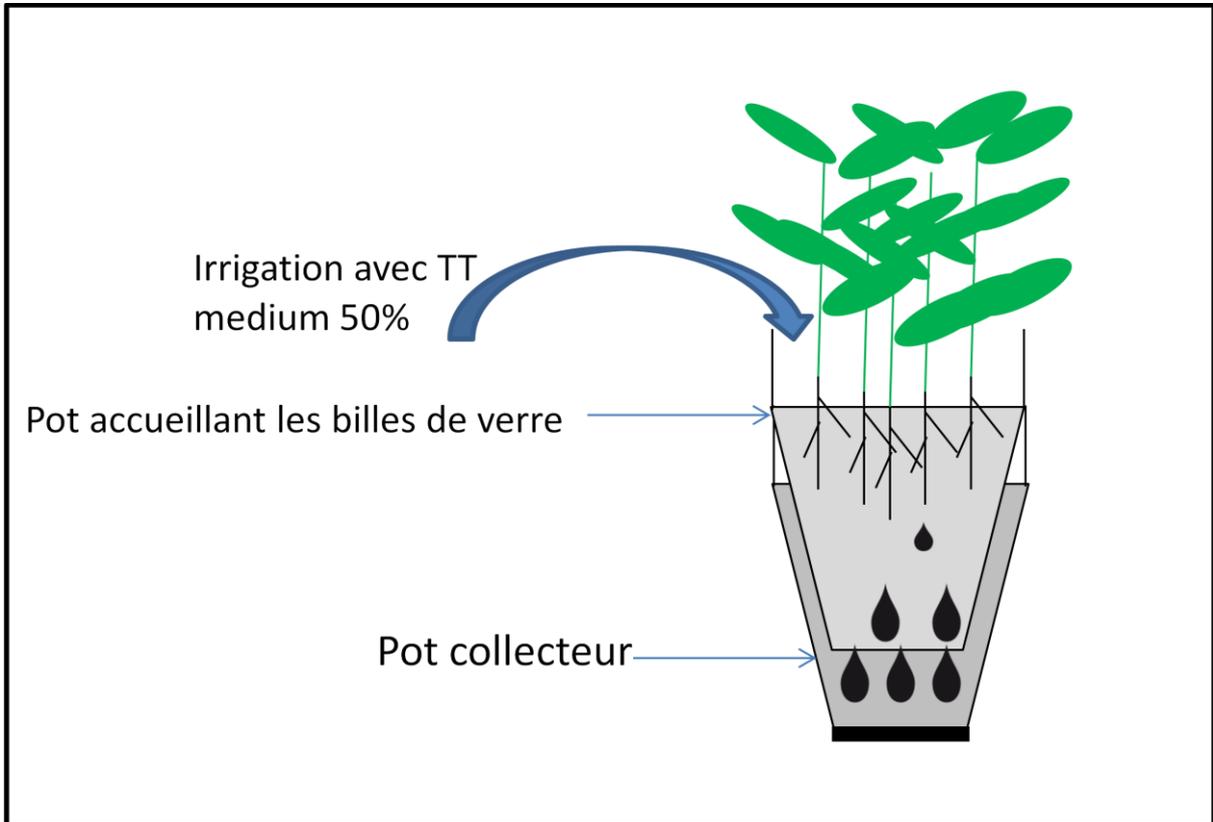


Figure 2. Illustration du dispositif de « double pot » utilisé pour la mise en place des cultures de Fabacées et la collecte des exsudats racinaires.

Mise en place des cultures de Fabacées et production des exsudats racinaires

Après germination en boîte de pétri, les jeunes plantes sont transférées sur billes de verre dès le déploiement des cotylédons ou le verdissement de l'épicotyle selon l'espèce. L'appréciation de l'aptitude à être transféré repose essentiellement sur le développement de la partie aérienne au moment du transfert ; cet aspect variera selon l'espèce. Après transfert, les jeunes plantes sont acclimatées et gardées couvertes par un sac en plastique transparent pour réduire la transpiration avant la formation d'un appareil racinaire fonctionnel. Cette étape intermédiaire permet également aux très jeunes plantes de mieux réagir au rayonnement intense des lampes de la chambre de culture du fait d'un environnement moins sec autour des jeunes feuilles.

Le système de culture utilise des doubles pots d'un volume de 75 cL dont celui du dessus est percé (Figure 2) de manière à ce qu'il y ait percolation la plus continue possible du pot contenant les billes de verre vers le réservoir collecteur (pot du dessous). Le substrat inerte est composé de billes en verre sodocalcique d'un diamètre de 2 et 3 mm qui offrent assez de capacité de rétention pour que les racines soient correctement irriguées (environ 950 Grammes de billes sont distribuées dans chaque pot). Les billes de verre sont autoclavées avant la mise en place des cultures.

Les premiers jours après transfert, le volume d'irrigation appliqué se situe en dessous de la surface des billes pour inciter un développement plus profond de l'appareil racinaire dans le pot. Cette précaution évite également les nécroses du collet ou des racines que nous avons observées pour des plantules ayant des racines positionnées trop en surface (les billes laissant passer la lumière en surface).

Chaque modalité représentée par une variété se compose de trois répétitions. Une unité expérimentale se compose d'un pot dans lequel sont implantés cinq plants (Figure 3) (± 2 du fait des difficultés de maintien des végétaux en parallèle dans les billes de verre et dans des conditions normalisées). Les jeunes plantes sont transférées au départ au nombre de 7 par pot lorsque cela est possible afin de prévenir les pertes. Si les jeunes plantes survivent au delà de 5 par pot, des spécimens seront retirés. Après chaque collecte, les exsudats sont placés à 4°C.

Pour certaines espèces à biomasse plus (Trèfles, Lotier), nous avons choisi de multiplier le nombre de plantes implantées dans chaque pot pour que la production d'exsudats racinaires soit suffisamment abondante pour ne pas être trop diluée dans la solution nutritive. Les



Figure 3. Photographies du dispositif expérimental en double pots (hydroponie) en chambre de culture. Lupin blanc variété « MAGNUS » juste après repiquage (a) collection de lupins blancs et bleus, respectivement : *Lupinus albus* et *Lupinus angustifolius* 12 jours après repiquage (b). Variétés de soja (*Glycine max*) 14 jours après repiquage (c). Boîtes de pétri contenant les graines en germination et tubes contenant les graines en imbibition (d).

densités de semis en couvert, en champ impliquent également un nombre de graines plus important pour ce type d'espèce. Dans ce type de cas, 5 g de graines sont pesés (par pot) et sont distribués sur les billes de verre directement. Un ajout d'une fine couche de bille de verre est versé au dessus des graines pour que les plantes se situent ultérieurement « à un bon niveau ». La germination sur billes de verre optimise la survie des jeunes plantes de petite taille en évitant l'étape de transfert. Le niveau de la solution d'irrigation est vérifié régulièrement pour éviter l'assèchement (niveau trop bas), mais également l'anoxie racinaire (niveau trop haut). Les pots sont ainsi laissés « à l'étouffée » c'est-à-dire enveloppé dans un voile plastique transparent quasi hermétiquement (maintient d'une atmosphère humide).

La solution nutritive utilisée est le milieu de TT ou « TT medium » (Tadano et Tanaka, 1980). La composition de cette solution nutritive (Annexe 1) est relativement pauvre en macroéléments et accentue ainsi l'exsudation racinaire. (Li *et al.*, 1997).

Les premiers jours d'acclimatation, l'éclairage est assuré par des tubes néons en chambre de culture à 21°C. Les plantes acclimatées sont transférées en phytotron sous lampes HPS (OSRAM E40/ES 200-300 $\mu\text{mol photons PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$), à 21°C constant et dans une atmosphère de 70% d'humidité relative. La photopériode est de 16h lumière et 8h d'obscurité.

Chaque double pot est alimenté avec 100 mL de milieu TT après chaque collecte d'exsudats, le pot collecteur ayant été préalablement vidé (purge) avant chaque irrigation. La collecte des exsudats est effectuée une fois par semaine en prélevant 2 mL de solution directement dans le pot collecteur.

Lots de graines de *P. ramosa* utilisés pour les tests d'activité

Deux lots de graines de *Phelipanche ramosa* ont été utilisés pour cette étude, l'un appartenant au type 1 et le deuxième au type 2, ce dernier ayant été aimablement fourni par l'UMR Agroécologie de Dijon (partenaire du projet). Le lot de type 1 utilisé (désigné Pram11) provient d'une parcelle de Colza (*Brassica napus* L.) sur la commune de Saint Jean d'Angely

dans la région Poitou-Charentes (2012). Son appartenance au type I a été initialement validé, de part sa forte sensibilité à un stimulant de synthèse (GR24, $EC_{50} \sim 4,45 \cdot 10^{-11}$ M) et son insensibilité vis-à-vis des exudats racinaires bruts de chanvre.

Le lot de type 2 utilisé (désigné Pram118) provient d'une parcelle de chanvre (*Cannabis sativa* L.) sur la commune de Neuville-Lès-Champlitte dans la région Franche Comté (2012). Son appartenance au type 2 a été initialement validé, de part son EC_{50} ($\sim 8,38 \cdot 10^{-10}$ M) vis-à-vis du GR24, et sa sensibilité vis-à-vis d'exsudats bruts de chanvre.

Ces deux lots ont été stockés à 25°C constant à l'obscurité depuis l'échantillonnage.

Préparation des suspensions de graines stériles et mise en conditionnement

La stérilisation de surface se fait par séries de 150 mg de graines sèches auquel est appliqué le protocole suivant pour un volume de suspension de 15 mL (10 mg de graines mL^{-1}) :

Les manipulations sont effectuées en conditions stériles, la première étape étant l'immersion des graines sèches dans une solution d'hypochlorite à 2,6% pendant 5 min sur agitation rotative (vortex, 800 rpm), suivie de 4 rinçages successifs à l'eau distillée stérile de 3 min. La suspension de graines est ensuite reprise dans 15 mL d'eau stérile avec 1 mM de tampon Hépès et 0,2% de solution PPM™ (Plant Cell Technology) afin d'éviter les contaminations.

Le tube de 50 mL contenant la suspension de graines stériles est ensuite enveloppé de papier aluminium et placé à 21°C pendant une période de 4 à 5 jours représentant la période de conditionnement nécessaire aux graines d'orobanche pour être sensible aux stimulants de germination (Lechat *et al.*, 2012). Ce tube est par ailleurs incliné pour laisser une surface d'échange suffisante entre le liquide et l'oxygène présent dans le tube de manière à ce que les graines ne soient pas en situation d'anoxie.

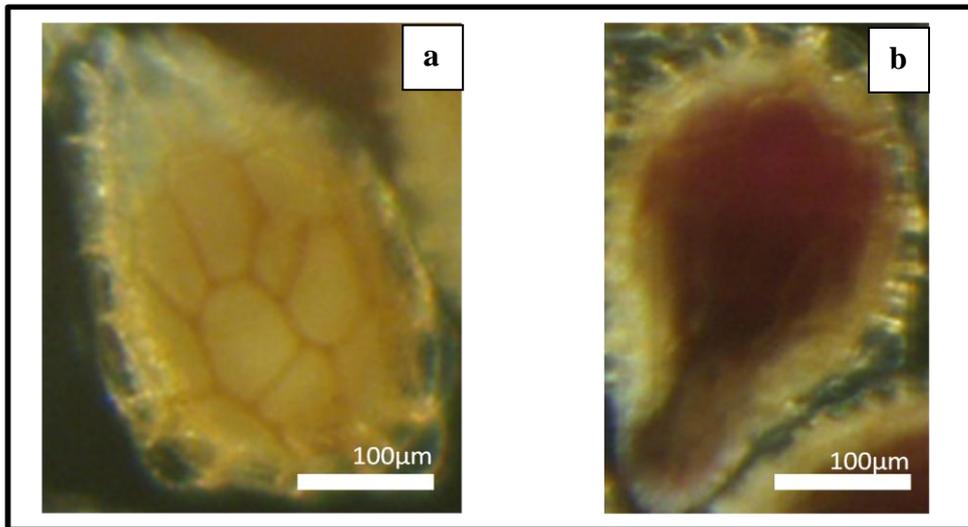


Figure 4. Aperçu de la germination en plaque des graines d’orobanche rameuse en réponse à un stimulant de germination (ici le GR24 à une concentration 10^{-7} M). Les graines non germées (a) restent de couleurs claires. Les graines germées (b) apparaissent colorées grâce à l’application de MTT en excès dans le milieu (phénomène de réduction du sel de tetrazolium lors de la reprise métabolique de la graine).

Tests de germination des graines d'orobanche en plaque 96 puits

Les tests de germination conduits en plaques 96 puits permettent l'analyse d'un grand nombre de modalités, de manière reproductible et avec des résultats rapidement lisibles. L'activité des exsudats racinaires et des extraits (racines, parties aériennes, inflorescence) des plantes criblées est testée par cette méthode.

Les graines conditionnées sont distribuées dans les plaques à raison d'un aliquot de 50 μL de suspension de graines par puits, ce qui représente environ une centaine de graines par puits.

La méthode colorimétrique ($A_{550\text{nm}}$) de détermination des taux de germination se fait selon un test de réduction du sel de tetrazolium (MTT) en cristaux de formazan. Cette réduction est réalisée par l'activation de déshydrogénases mitochondriales qui accompagne la germination des graines. Le sel de tetrazolium en solution est de couleur jaune et les cristaux de formazan forment un précipité violet. Pouvreau *et al.* (2013) ont ainsi démontré l'existence d'une relation linéaire entre le delta d'absorbance à 550 nm et le taux de germination des graines d'orobanche.

La solution de MTT (MethylThiazolyldiphenyl-Tetrazolium bromide) concentrée à 5 g L^{-1} est appliquée environ 7 jours après stimulation des graines ($10\mu\text{L puits}^{-1}$). Ce délai d'application est nécessaire pour pouvoir observer également les radicules et mesurer leurs longueurs sous microscope (**Figure 4**). Après incubation des graines pendant 24h à l'obscurité dans la solution de MTT, un tampon de lyse à base d'isopropanol est appliqué ($100\ \mu\text{L puits}^{-1}$) pour solubiliser les cristaux de formazan formés.

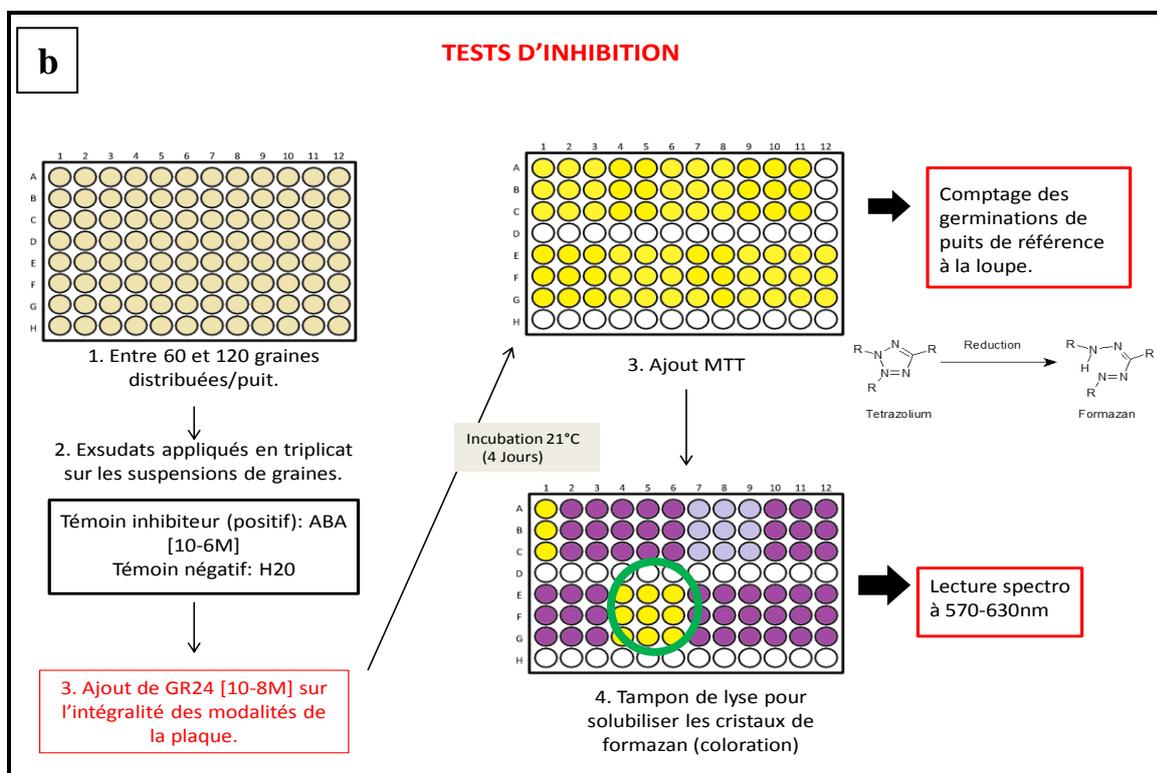
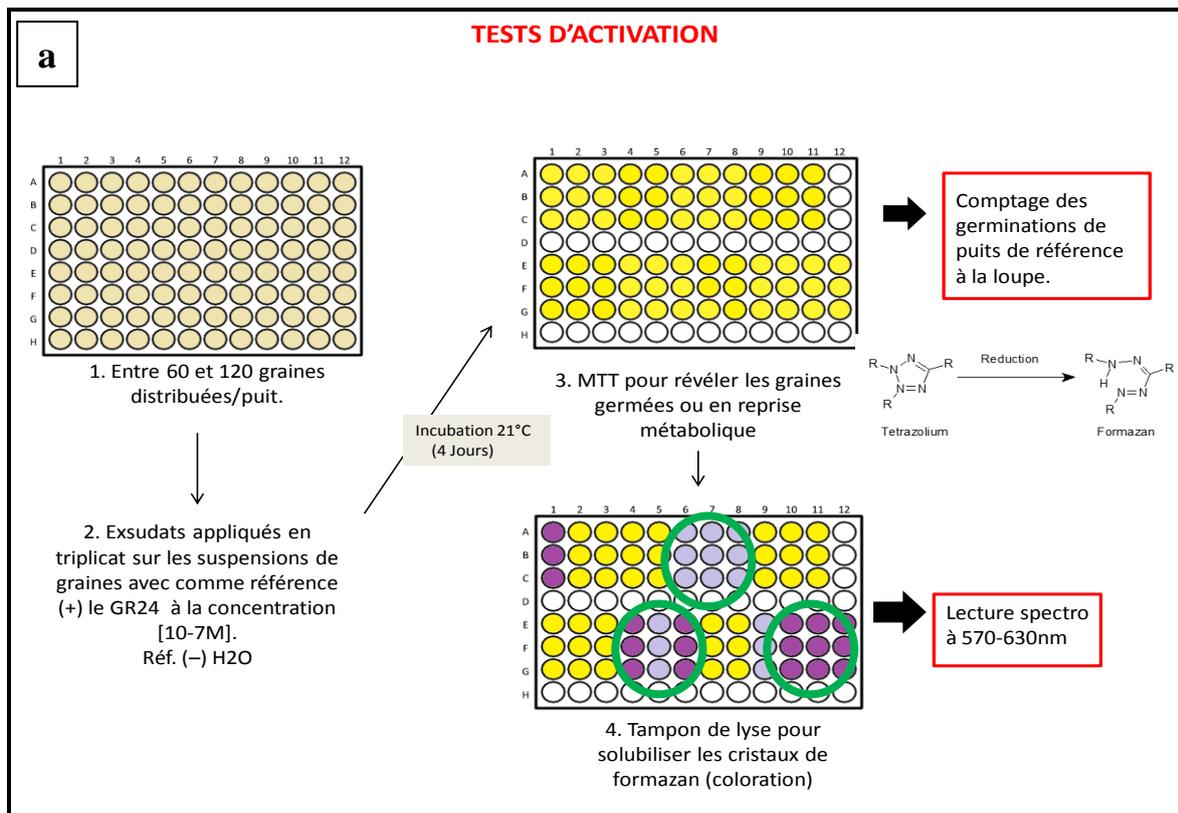


Figure 5. Schémas synoptiques des protocoles de « tests d'activation (a) » et des « tests d'inhibition (b) ». Les puits colorés en violet contiennent des graines germées. Les cercles de couleur verte entourent les puits montrant un résultat positif pour chaque test, soit l'activation de la germination (a) soit l'inhibition de la germination (b).

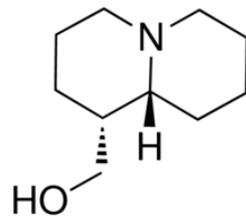
Une partie de ces tests consiste donc à évaluer l'activité stimulante potentielle des exsudats et des extraits des plantes criblées vis-à-vis de la germination des graines d'orobanches. Il s'agit dans ce type de test que nous désignons « tests d'activations », de détecter pour chaque extrait collecté à un moment donné sur une variété donnée, une capacité à déclencher la germination lorsqu'il est appliqué à l'état brut et dilué au demi. Le protocole de révélation permet de visualiser rapidement les puits contenant des composés stimulants (**Figure 5a**). Le taux d'activation est évalué par rapport au témoin positif GR24 10^{-7} M. Les comptages sous loupe binoculaire donnent des pourcentages relatifs au nombre de graines germées par rapport au nombre de graines présentes dans le puits considéré.

L'autre partie des tests sont focalisés sur l'activité inhibitrice potentielle des exsudats et des extraits des plantes criblées vis-à-vis de la germination en présence de GR24. Les « tests d'inhibitions » ainsi désignés sont conduits sur le même principe, à la différence que les puits contiennent tous du GR24 10^{-8} M. Ce « fond » de GR24 homogène sur la plaque permet de stimuler potentiellement les graines de toutes les modalités et ainsi mettre en lumière les modalités (extraits) qui montrent une activité inhibitrice de la germination (Figure 5b). Le GR24 est appliqué environ 30 minutes après avoir confronté extraits bruts et suspensions de graines pré-conditionnées, à l'aide d'une pipette à distribution répétitive de manière à éviter les variations de volume distribué. L'acide abscissique 10^{-5} M est utilisé ici comme témoin positif de l'inhibition (Pouvreau *et al.*, 2013).

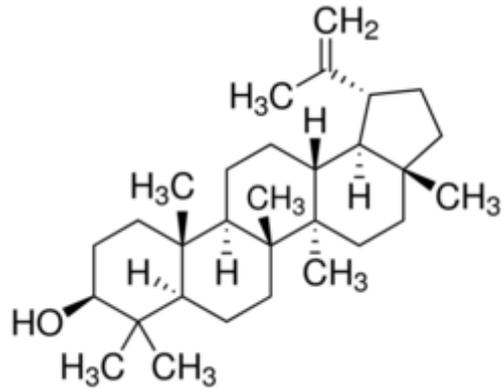
Collecte de la biomasse et extraction à froid des composés hydrophiles et hydrophobes

Au terme des 8 semaines de collecte d'exsudats racinaires, les plantes sont dépotées et séparées de leur substrat (billes de verre). Les parties racinaires, aériennes et les fructifications sont isolées, pesées et immédiatement immergés dans l'azote liquide (en papillotes d'aluminium). La conservation de ces différents échantillons se fait à -80°C . Les échantillons sont lyophilisés au cryodessicateur (Heto Freeze Dryer FD3, Thermo corporation) 0,6 Pa, -56°C , 72h)

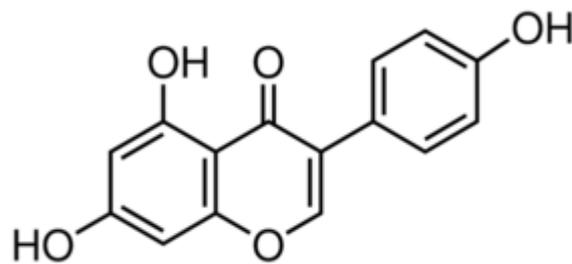
Cent mg des échantillons sont ensuite broyés à l'aide d'un broyeur à billes (Qiagen-TissueLyser II). Les broyats sont suspendus dans xx mL d'eau distillée additionnée de tampon Hepès 1mM (extraction des composés hydrophiles), ou d'un mélange acétonitrile/eau distillée (80/20 v/v ; extraction des composés hydrophobes). Les suspensions sont mises à incuber dans la glace pendant 2 h puis centrifugées (20 min, 20000 g, 4°C). Les surnageants seront repris, et testés après dilutions dans l'eau distillée. Les extraits hydrophiles seront préalablement filtrés à $0,2\mu\text{m}$ pour la stérilité (Filtres à seringues GVS, Acétate de cellulose, Pore: $0.20\mu\text{m}$, Diam: 25 mm).



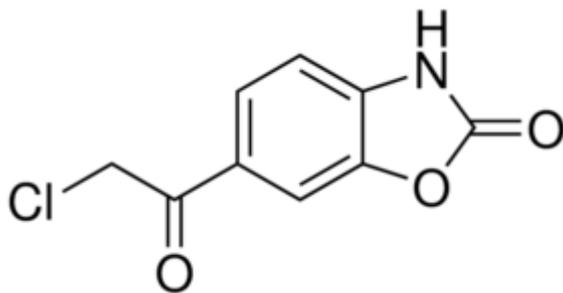
Lupinine



Lupéol



Génistéine



6-chloroacétyl-2-benzoxazolinone

Figure 6. Composés testés pour leur activité sur les graines des lots Pram11 et Pram118.
(Image: Sigma-Adrich)

Analyse de composés purs

Nous avons choisi de tester l'activité du 6-chloroacétyl-2-benzoxazolinone (Figure6) (MW : 211,60), molécule issue du métabolisme des Poacées sur la germination des graines d'Orobanche. L'activité de ce composé a fait l'objet d'études sur *Orobanche crenata* et a montré un effet inhibiteur de la germination (Fernandez-Aparicio *et al.*, 2013). Nous souhaitons en mesurer l'effet sur la germination des graines de *Phelipanche ramosa*. Le 6-chloroacétyl-2-benzoxazolinone (Sigma-Aldrich) sous forme de poudre est dilué à une concentration de 10^{-3} M dans l'acétonitrile pur.

La Génistéine (MW : 270,24), est également testée. Des études montrent que ce composé est présent dans les racines du Soja (Zhang *et al.*, 1996). La Génistéine est également synthétisée chez le Lupin jaune (*Lupinus luteus*) (Kneer *et al.*, 1999) et chez *Desmodium uncinatum* (Tsanuo *et al.*, 2003). Cette molécule a été par ailleurs documentée comme étant active dans l'interaction avec *Bradyrhizobium japonicum* (Kosslak *et al.*, 1987; Zhang et Smith, 1995). La Génistéine en poudre (Sigma-Aldrich) est diluée à une concentration de 10^{-3} M dans l'éthanol 100%.

Nous testons le Lupéol (MW : 426,72), qui est une molécule présente chez le Pois chiche (*Cicer arietinum*), la Luzerne cultivée (*Medicago sativa*), le Lupin blanc (*Lupinus albus*) et la Féverole (*Vicia faba*) (Bisby, 1994). Le Lupéol en poudre (Sigma-Aldrich) est dilué à une concentration de 10^{-4} M dans l'éthanol 100%.

La Lupinine (MW : 169,26), molécule présente chez le Lupin jaune (*Lupinus luteus*) est également testée sur les graines de *P. ramosa*. La Lupinine en poudre (Sigma-Aldrich) est diluée à une concentration de 10^{-4} M dans l'acétonitrile 100%.

Ces composés font l'objet de tests de stimulation et d'inhibition de la germination (cf: Figure 5) sur le lot de graines Pram11. Chaque composé est testé en triplicat. Les tests d'inhibition se font sur un gradient de concentration de chaque composé (de 10^{-5} à 10^{-11} pour la Génistéine, de 10^{-3} à 10^{-9} pour le 6-chloroacétyl-2-benzoxazolinone et de 10^{-4} à 10^{-10} pour le Lupéol et la Lupinine). Le contrôle pour les tests d'inhibition est un gradient d'ABA de 10^{-3} à 10^{-9} .

Analyse statistique des données

Les différentes données (groupes de données) ont été comparées et testées en appliquant l'analyse de variance ANOVA une voie (versus contrôle) à l'aide du logiciel Sigmastat (Version 3.5 pour Windows). Les analyses de variance ANOVA une voie reposent sur un post-test statistique Student-Newman-Keuls, avec une différence statistique significative de $P < 0,001$, et un risque de première espèce $\alpha = 0,05$. La normalité et l'égalité des variances sont également vérifiées au préalable par le logiciel.

Résultats

Résultats des tests d'activités stimulantes de la germination des graines d'orobanche

Lors des tests de stimulation de la germination des graines d'orobanche, les contrôles négatifs (suspension de graines en présence d'eau distillée) ont montré en moyenne un taux de germination de 0,11% \pm 0,43 sur l'intégralité des mesures du lot Pram11 (Pathotype 1). Pour le lot Pram118 (Pathotype 2), les contrôles négatifs ont montré des taux moyens de germination de 0,05% \pm 0,25 en moyenne sur l'intégralité des mesures de ce lot. Les contrôles positifs pour les tests d'activation de la germination (suspensions de graines en présence de GR24 10-7 M) montrent un taux moyen de germination de 97,26% \pm 3,18 pour le lot de graines d'orobanche Pram11. Le taux moyen correspondant pour le lot Pram118 est de 95,73% \pm 3,36. L'ensemble de ces résultats sont concordants et témoignent notamment de la très bonne qualité germinative de ces lots de graines. Nous présenterons par ailleurs ici les résultats issus des mesures étalonnées sur les comptages optiques effectués sur les contrôles à la loupe binoculaire (SZX10, Olympus).

Remarque:

Les problèmes à la germination pour les Fabacées sont intervenus sur seulement deux références ; la variété de pois (*Pisum sativum*) « INDIANA » sur laquelle nous n'aurons pas de données. La variété de sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) « PERLY » pour laquelle le lot de graines ne germe pas dans les conditions de notre protocole. Les graines de sainfoin ont été mises à germer avec la cosse mais également décossées sans résultat dans les deux cas.

Les valeurs des biomasses au terme de la période de culture pour chaque variété et chaque espèce sont données dans le (ANNEXE II). Il y est indiqué la masse fraîche de la totalité des 3 pots (en grammes) ainsi que le nombre de jours post-transfert écoulés lors de la date de collecte des plants pour la mesure des biomasses.

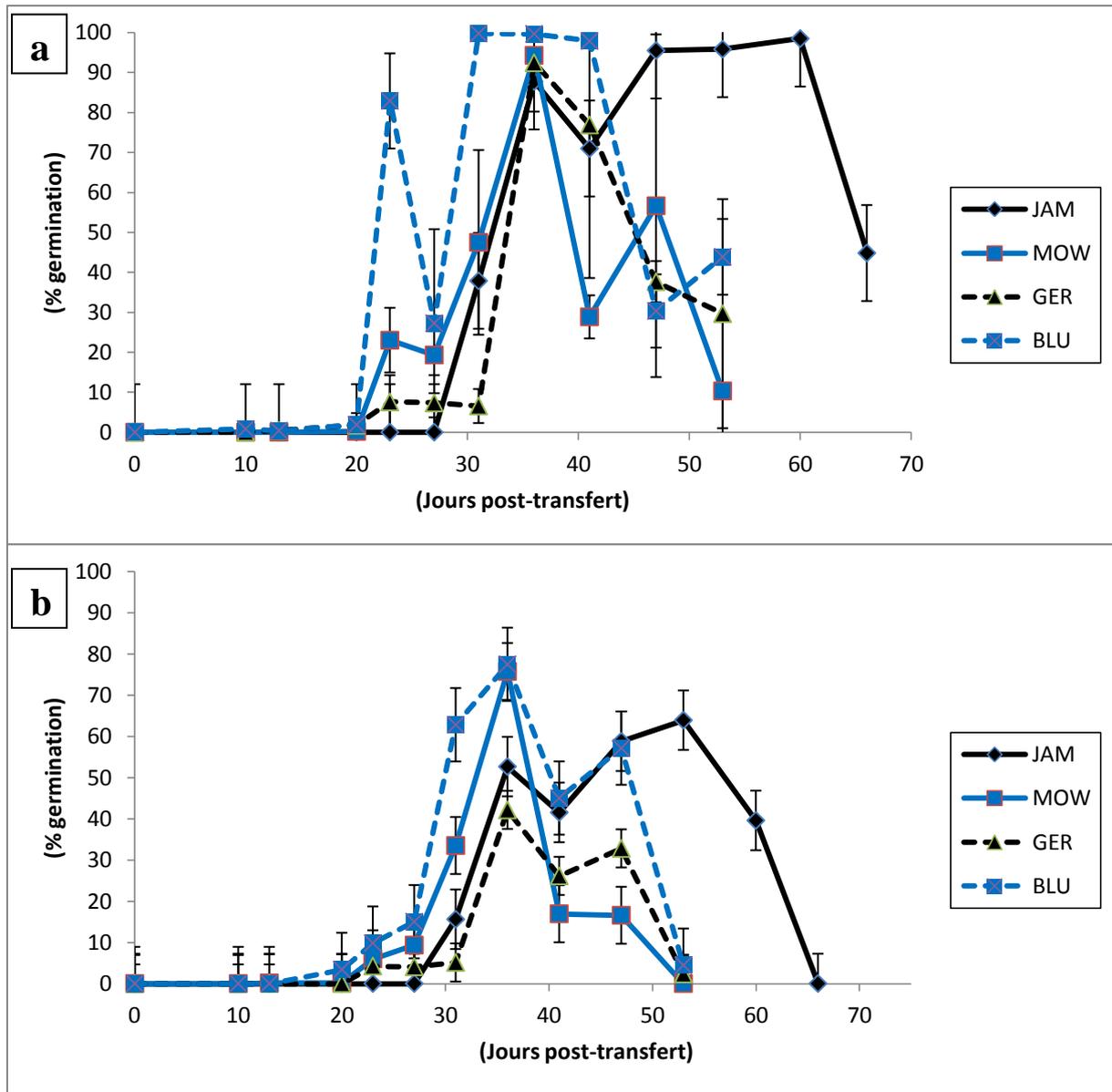


Figure 7. Cinétiques d'activité stimulante des exsudats de pois vis-à-vis de la germination des graines d'orobanche.

Les quatre variétés représentées sont JAMES (courbe noire continue), MOWGLI (courbe bleue continue), GERONIMO (courbe noire pointillée), BLUESTAR (courbe bleue pointillée). L'activité sur les graines d'orobanche du lot Pram11 est représentée en (a) ; celle sur les graines du lot Pram118 en (b). Les données sont les moyennes \pm erreurs standards (n=3).

Résultats obtenus pour les tests de stimulation sur exsudats de pois (*Pisum sativum*)

Les 4 variétés de pois (*Pisum sativum*) testées exsudent des composés qui stimulent fortement la germination et ceci pour les deux lots de *P. ramosa* (Pram11 et Pram118). Nous observons en revanche des différences de cinétique, de précocité d'exsudation stimulante et des taux maximum différents selon le lot de graines d'orobanche et selon les variétés testées. En effet, la sensibilité des graines d'orobanche du lot Pram11 (Figure 7a) aux exsudats de pois est significativement ($P > 0,05$) plus élevée que celles du lot Pram118 (Figure 7b) avec des taux maximums de germination n'excédant pas 87% dans le cas du lot Pram118 et atteignant parfois 100% pour le lot Pram11 (les contrôles effectués avec du GR24.10-7 M ne sont ici pas significativement différents d'un lot à l'autre).

Les exsudats de la variété de pois de printemps BLUESTAR stimulent la germination à partir d'environ 25 jours post-transfert en pot, ceci pour les deux lots de graines d'orobanche. Cette variété semble être légèrement plus précoce à exsuder des composés stimulants dans nos conditions de culture et semble décrire une cinétique plus proche de la deuxième variété de pois de printemps MOWGLI. Cette légère précocité par rapport aux deux variétés de pois d'hiver se vérifie également dans les résultats des tests effectués avec le lot de graines de *P. ramosa* Pram118. L'augmentation est néanmoins plus rapide pour le lot Pram11 et les taux maximum plus élevés ($97,14\% \pm 1,97$ pour Pram11 et $86,69\% \pm 3,36$ pour Pram118) pour la variété BLUESTAR. Les deux variétés de pois d'hiver GERONIMO et JAMES semblent au contraire montrer une forte augmentation des exsudations stimulantes 5 jours plus tard, à environ 30 jours post transfert.

Les cinétiques d'exsudation des variétés de pois de printemps et d'hiver montrent un décalage au début de l'exsudation, mais la diminution d'activité observée autour de 50 jours après transfert (diminution plus précoce pour le lot Pram118) n'est pas constatée plus tardivement pour les pois d'hiver. C'est le cas avec la variété de pois d'hiver GERONIMO dont l'exsudation de composés stimulants décroît dans les mêmes temps que les variétés de pois de printemps MOWGLI et BLUESTAR. La période d'exsudation active de la variété GERONIMO est donc ici plus courte, s'étalant ainsi sur une vingtaine de jours. Cette variété est par ailleurs la moins stimulante sur le lot Pram118 si l'on considère les taux maximum atteints, et ce pour les deux lots de graines de *P. ramosa* ($69,33 \pm 2,64$ maximum pour le lot Pram118). Cette variété atteint cependant des taux de stimulation avoisinant les 90% maximum dans le cas du lot Pram11. La variété de pois d'hiver JAMES quant à elle maintient des taux plus élevés jusqu'à 50 jours. Nous avons cependant deux mesures supplémentaires pour cette variété permettant de visualiser le moment où l'activité décroît pour la variété JAMES. Cette chute d'activité stimulante a lieu presque 10 jours plus tard par rapport à la baisse généralisée aux autres variétés (des taux de $98,66 \pm 1,52$ sont encore mesurés avec le lot Pram11 à 60 jours post transfert). La période d'exsudation active de cette variété est de ce fait plus longue malgré un début plus tardif que les pois de printemps. D'autre part, la biomasse relevée en fin de culture sur cette variété est la plus élevée de la collection de pois.

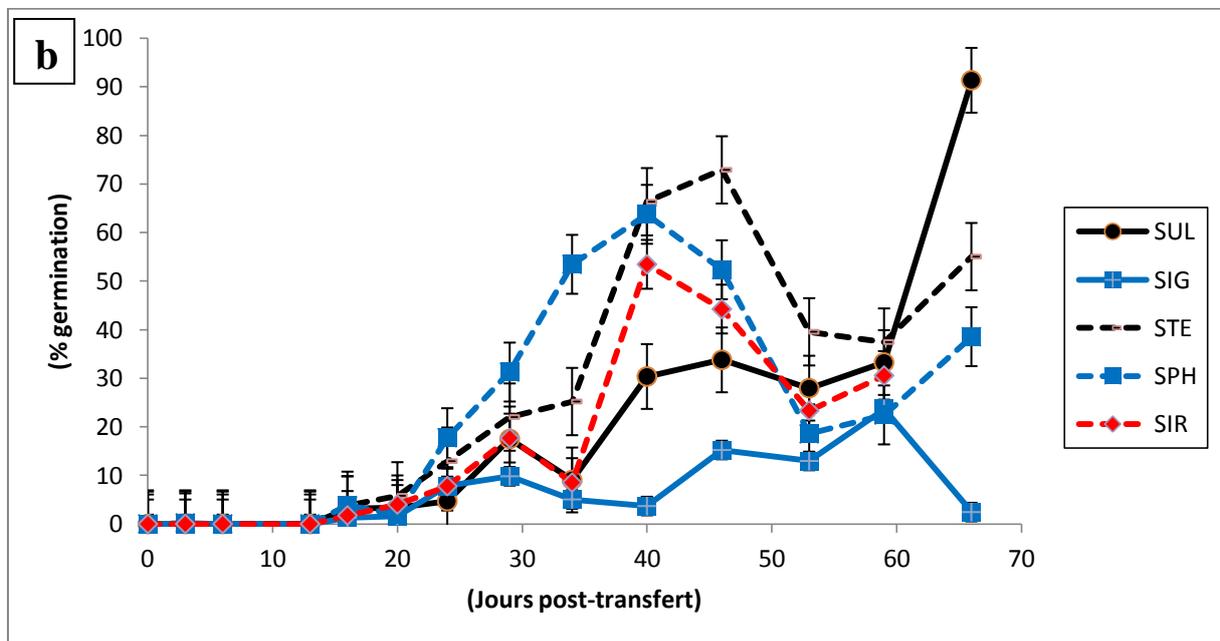
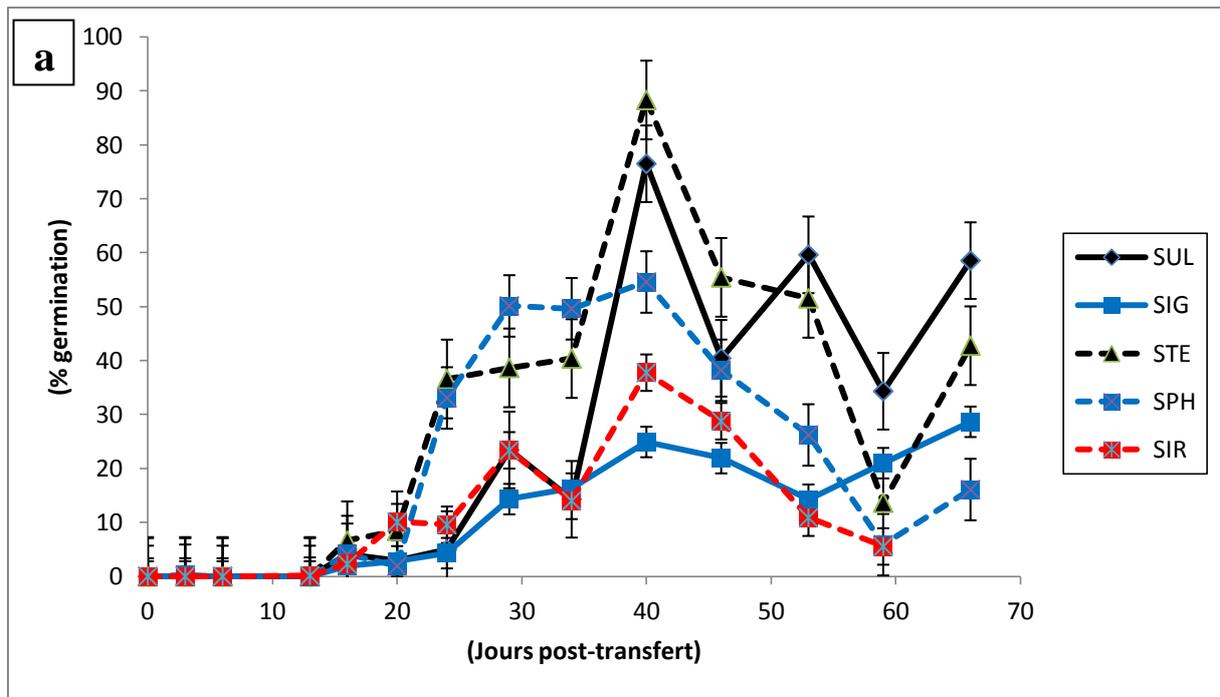


Figure 8. Cinétiques d'activité stimulante des exsudats de soja vis-à-vis de la germination des graines d'orobanche.

Les cinq variétés représentées sont SULTANA (courbe noire continue), SIGALIA (courbe bleue continue), STEARA (courbe noire pointillée), SPHERA (courbe bleue pointillée) et SIRELIA (courbe rouge pointillée). L'activité sur les graines d'orobanche du lot Pram11 est représentée en (a) ; celle sur les graines du lot Pram118 en (b). Les données sont les moyennes \pm erreurs standards (n=3).

D'une manière générale, l'analyse des exsudats de la collection des 4 variétés de pois composée pour moitié de variétés de pois d'hiver et de pois de printemps nous permet d'observer, au moins sur une première moitié de la culture, une similitude entre les variétés de même créneau de culture (pois d'hiver vs. pois de printemps).

Résultats obtenus pour les tests de stimulation sur exsudats de soja (*Glycine max*)

Les 5 variétés de soja (*Glycine max*) exsudent également des composés stimulants. Les profils observés (**Figure 8**) suivent une précocité similaire aux pois avec un début d'activité stimulante dès les 15 premiers jours. Les cinétiques se montrent cependant plus linéaires dans un premier temps si l'on fait un parallèle avec les profils d'exsudation active des variétés de pois.

Les variétés de soja SIGALIA et SIRELIA montrent des activités stimulantes du lot de graines Pram11 relativement faibles par rapport aux trois autres variétés de soja testées (**Figure 8a**). Les valeurs maximales atteintes pour les germinations des deux lots de graines d'orobanche en présence des exsudats de la variété SIGALIA (Pram11 $34,33\% \pm 2,51$ à 66 jours post transfert- Maximum $43,62 \pm 10,81$ pour Pram118 à 59 jours post transfert). Si les résultats montrent des taux de germination globalement plus faibles avec le lot Pram118 (**Figure 8b**), on peut également constater des variations périodiques de taux, qui sont dans certains cas peu corrélées avec le lot Pram11. La période de collecte a été effectuée sur 66 jours après transfert et nous n'observons pas d'arrêt de l'activité sur les dernières mesures.

Les variétés ayant stimulé le plus fortement les graines du lot Pram11 sont SULTANA et STEARA. Bien que nous puissions faire le même constat avec le lot Pram118, les taux maximum atteints, résultant de la stimulation par les exsudats de ces deux variétés, ne sont pas mesurés au même moment. Le maximum de 40 jours mesuré sur le lot Pram11 pour ces deux variétés ne se retrouve pas dans les mesures effectuées sur le lot Pram118.

Les maximum atteints pour les deux lots de graines d'orobanches sont proches ($97,2\% \pm 3,12$ pour Pram11 à 40 jours post-transfert - $96,66 \pm 2,51$ pour Pram118 à 66 jours post-transfert). Nous n'observons pas d'arrêt de l'exsudation active au cours de la période de 66 jours d'expérience. Les taux maximums sont atteints avec les exsudats de la variété STEARA (Pram11) et SULTANA (Pram118).

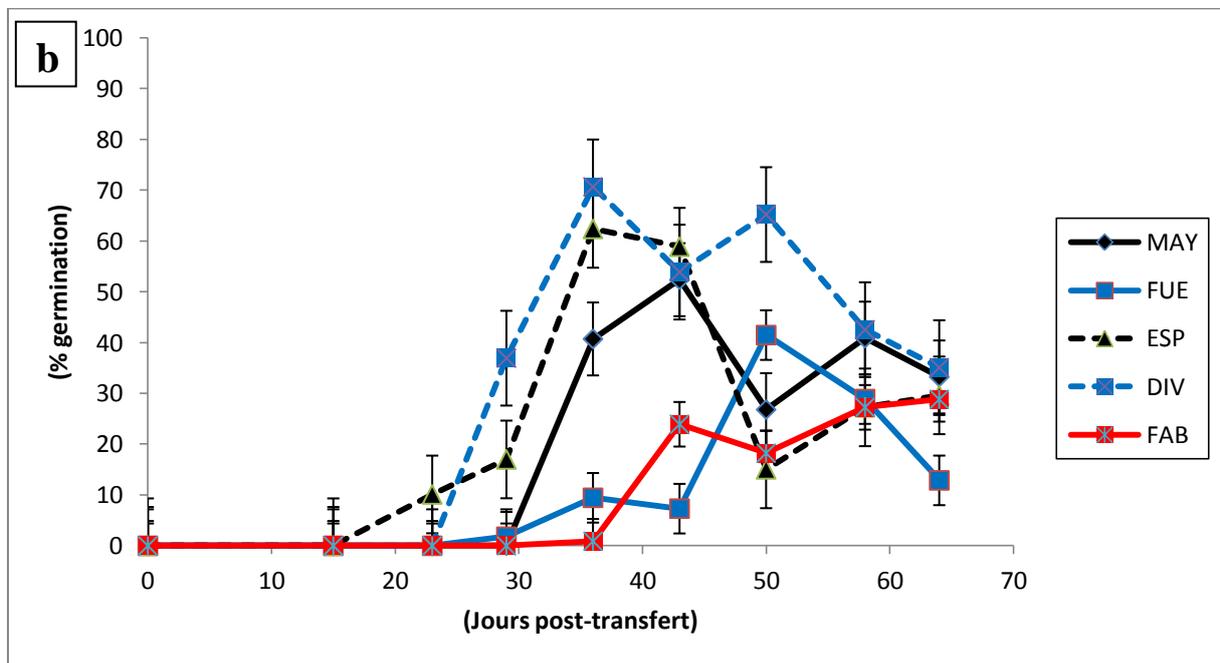
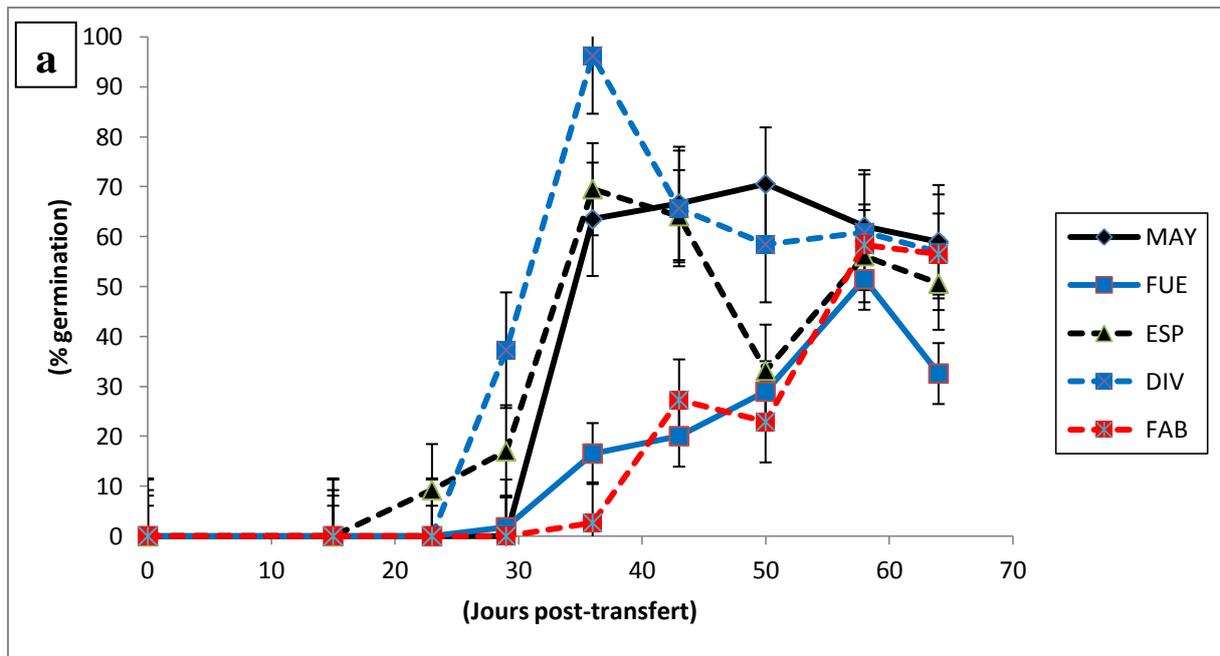


Figure 9. Cinétiques d'activité stimulante des exsudats de féverole vis-à-vis de la germination des graines d'orobanche.

Les cinq variétés représentées sont MAYA (courbe noire continue), FUEGO (courbe bleue continue), ESPRESSO (courbe noire pointillée), DIVER (courbe bleue pointillée) et FABELLE (courbe rouge continue). L'activité sur les graines d'orobanche du lot Pram11 est représentée en (a) ; celle sur les graines du lot Pram118 en (b). Les données sont les moyennes \pm erreurs standards (n=3).

Résultats obtenus pour les tests de stimulation sur exsudats de féverole (*Vicia faba*)

Remarque:

Le lot de graines dont nous disposions pour la variété de féverole (*Vicia faba*) DIVER a montré après germination une contamination que nous supposons fongique (noircissement des feuilles rappelant *Ascochyta fabae* macroscopiquement). Les plants ont donc subis une infection pathogène durant l'expérience. Nous avons malgré cela fait le choix de continuer les collectes d'exsudats sur les unités expérimentales touchées. Les symptômes sur plante ont, de part la proximité entre elles, été observés sur trois autres variétés de *Vicia faba*. Ainsi, seule la variété MAYA ne présentait pas de tâches noires sur les feuilles au cours de l'expérience. Les symptômes sur les variétés touchées ont persisté jusqu'à la fin des collectes d'exsudats, soit 64 jours après transfert en pot, avec néanmoins une atténuation marquée des nécroses généralisées au-delà d'une quarantaine de jours après transfert.

Les différentes variétés de féverole ont chacune stimulé la germination des graines d'orobanches, et ce pour les deux lots de graines (Pram11 et Pram118). Certaines variétés se différencient de par leur précocité à engendrer la stimulation. La première variété à stimuler est la variété ESPRESSO : nous n'observons pas de différence entre les deux lots de graines quant à cette précocité. La variété ESPRESSO débute l'exsudation de composés stimulants entre 15 et 20 jours et c'est après 20 jours que nous mesurons une activité stimulante pour la variété DIVER suivi de la variété MAYA après 30 jours. Ces deux variétés ont un profil d'exsudation relativement proche. On peut les dissocier des deux autres variétés FUEGO et FABELLE en terme de cinétique globale. Les taux maximums de germination sont également plus élevés pour les trois variétés les plus précoces à exsuder des composés actifs. La variété de féverole MAYA (Figure 9) débute « brutalement » l'exsudation de composés stimulants au point de collecte 36 jours post-transfert ; le point de mesure précédent « donne » $0\% \pm 0$ de germination pour les trois répétitions et pour les deux lots ; à 36 jours, le taux de stimulation atteint $98,14\% \pm 1,73$ pour le lot Pram11 (Figure 9a) et $78,85\% \pm 3,51$ pour le lot Pram118 (Figure 9b).

Lors de la récupération de la biomasse (dépotage), nous avons constaté dans certains cas un noircissement complet de l'appareil racinaire, cet état correspondant aux unités expérimentales produisant des solutions d'exudation « noircies ». Cette observation correspond également aux répétitions qui ont montré un effondrement de la stimulation après 40 jours.

Nous n'avons cependant pas noté de différences sur les parties aériennes de ces plantes. Les biomasses fraîches n'indiquent pas de différence de croissance significative ($P < 0,05$) entre les variétés avant montré un noircissement et celles ne montrant pas de noircissement prononcé.

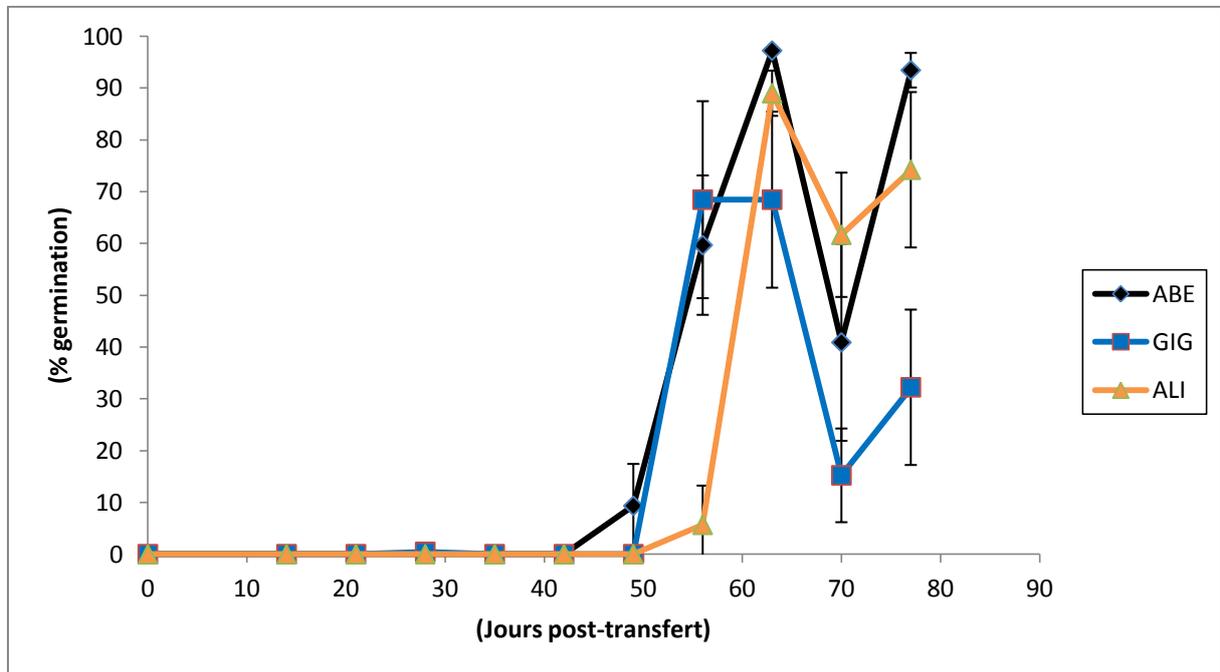


Figure 10. Cinétiques d'activité stimulante des exsudats de trèfle blanc vis-à-vis de la germination des graines d'orobanche (Lot Pram11).

Les trois variétés représentées sont ABERACE (courbe noire continue), GIGA (courbe bleue continue) et ALICE (courbe orange continue). Les données sont les moyennes \pm erreurs standards (n=3).

Résultats obtenus pour les tests sur exsudats de Trèfle blanc (*Trifolium repens*) / Trèfle incarnat (*Trifolium incarnatum*) / Trèfle violet (*Trifolium pratense*) / Trèfle d'Alexandrie (*Trifolium alexandrinum*).

Pour la plupart des espèces de trèfle testées nous avons constaté des activités stimulantes dans les exsudats collectés. Les exsudats des variétés de trèfle d'Alexandrie (*Trifolium alexandrinum*) TABOR et SACROMONTE stimulent les deux lots de graines de *P. ramosa* dans les tests avec un début à 29 jours post-transfert et un maximum de $89,33\% \pm 8,06$ (lot Pram11) pour TABOR et 22 jours pour SACROMONTE montrant un maximum de $97\% \pm 1,15$ (Lot Pram11). Les cultivars de trèfle Incarnat (*Trifolium incarnatum*) MAREMMA et CEGALO stimulent également les deux lots de graines d'orobanche avec un début de stimulation à 19 jours pour la variété MAREMMA et 34 jours pour CEGALO. Nous n'avons pas de cinétiques complètes pour ces variétés mais les taux maximum de germination constatés sont supérieurs à 90% de stimulation pour le lot Pram11. Certaines données obtenues avec le lot Pram118 ne sont pas exploitables du fait de problème de germination (Témoin positif GR24 à 0% de stimulation).

Nous observons également des stimulations avec quatre des cinq variétés de trèfle Blanc (*Trifolium repens*) ALICE, GIGA, ABERACE (Figure 10) et TRIFFID (début à 41 jours et taux maximum constaté à plus de 95%). La variété de trèfle blanc TIVOLI est la seule variété à ne pas stimuler les graines de *P. ramosa*. Ici encore des données sont manquantes du fait des problèmes de germination du lot Pram118. Sur les 3 variétés dont nous avons la cinétique complète, nous constatons un léger retard au début de stimulation (une semaine de décalage environ) de la variété ALICE relativement aux variétés ABERACE ET GIGA.

Les deux variétés de trèfle violet (*Trifolium pratense*) RAVVI et TREVVIO stimulent également les graines dans les tests à environ 27 jours pour le début et pour les deux variétés avec des taux maximum de plus de 90% stimulation de la germination du lot Pram11. Nous n'avons pas de cinétiques complètes pour ces variétés.

Résultats obtenus pour les tests de stimulation sur exsudats de Luzerne cultivée (*Medicago sativa*)

Nous avons testé deux variétés de Luzerne cultivée (*Medicago sativa*). Pour ces deux variétés PRUNELLE et CANNELLE nous obtenons des taux de stimulation (à partir de 27 jours pour la variété CANNELLE et 34 jours pour la variété PRUNELLE) sur le lot Pram11.

Résultats obtenus pour les tests de stimulation sur exsudats de Lotier (*Lotus corniculatus*)

Nous n'avons pu tester qu'une seule variété de Lotier au cours de l'expérience. Les exsudats de cette variété LXB stimulent fortement les deux lots de graines de *P. ramosa* à partir de 21 jours après transfert (>90% de germination). Nous ne connaissons pas le profil complet

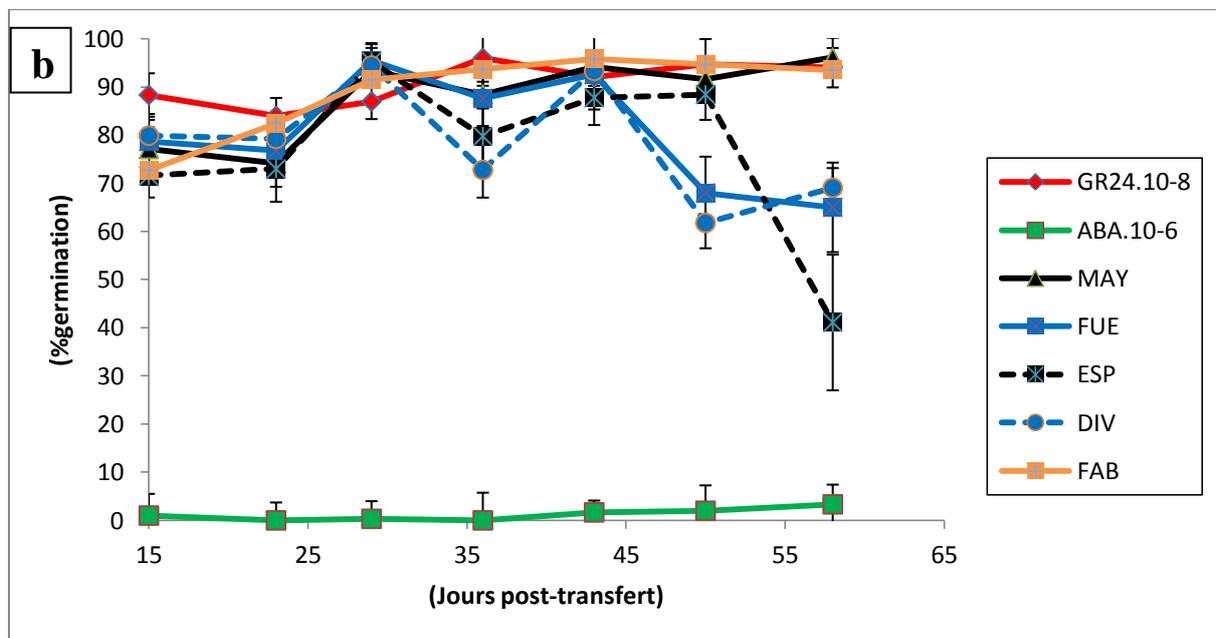
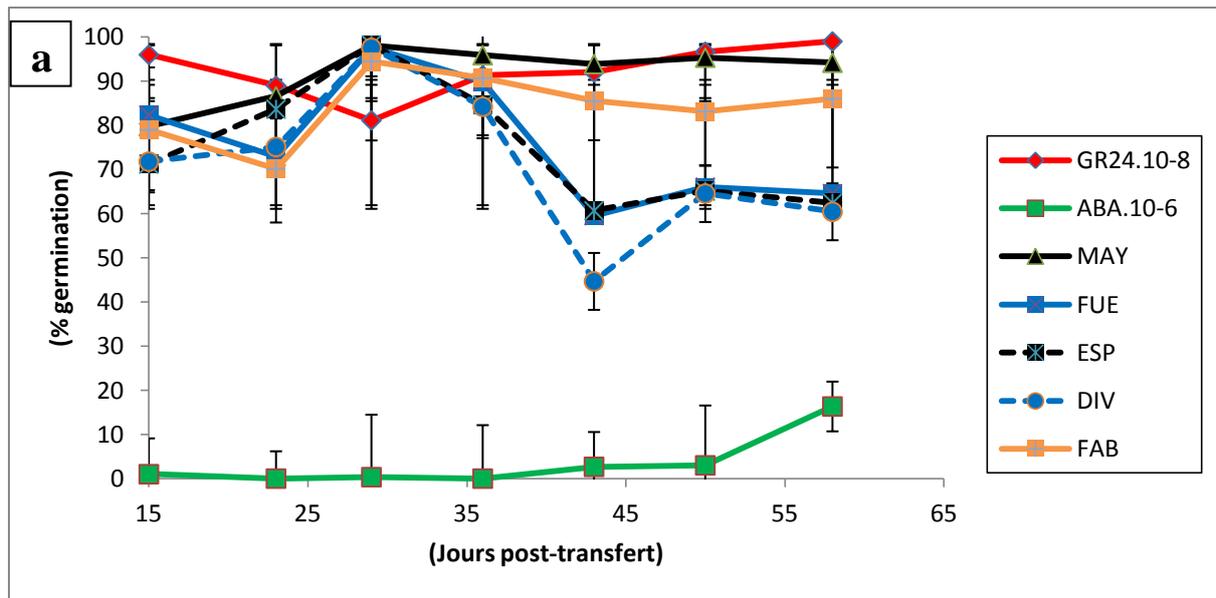


Figure 11. Cinétiques d'activité inhibitrice des exsudats de féverole vis-à-vis de la germination des graines d'orobanche.

Les cinq variétés représentées sont MAYA (courbe noire continue), FUEGO (courbe bleue continue), ESPRESSO (courbe noire pointillée), DIVER (courbe bleue pointillée) et FABELLE (courbe orange pointillée). La courbe rouge représente le contrôle négatif d'inhibition (GR24 0 10-8M+ Eau distillée). La courbe verte représente le contrôle positif d'inhibition (GR24 0 10-8M+ ABA à la concentration 10-6 M) L'activité sur les graines d'orobanche du lot Pram11 est représentée en (a) ; celle sur les graines du lot Pram118 en (b). Les données sont les moyennes \pm erreurs standards (n=3).

d' exsudation pour cette variété. Néanmoins, nous relevons des valeurs maximales de 95,7 % \pm 1,85 (début de stimulation à 22 jours post transfert).

Résultats obtenus pour les tests de stimulation sur exsudats de vesce cultivée (*Vicia sativa*), Vesce pourpre (*Vicia purpurea*) et Vesce velue (*Vicia villosa*)

Nous ne relevons pas de stimulation des graines de *P.ramosa* en provenance des exsudats des variétés SAVANE et MASSA (*Vicia villosa*), NACRE et LIBIA (*Vicia sativa*) et VB19 (*Vicia purpurea*). Nous ne connaissons cependant pas les profils cinétiques de ces variétés au-delà de 28 jours.

Résultats obtenus pour les tests de stimulation sur exsudats de fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*)

Nous disposons de la variété de fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*) FENU-FIX. Cette variété exsude des composés stimulants la germination à partir de 10 jours post transfert pour les deux lots de graines d'orobanche. Les taux maximum sont supérieurs à 95% pour les deux lots de graines. Nous n'avons pas de données au-delà de 24 jours post transfert.

Résultats obtenus pour les tests de stimulation sur exsudats de lupin blanc (*Lupinus albus*) et lupin bleu (*Lupinus angustifolius*)

Les tests de stimulation ont été effectués tout d'abord sur 3 variétés (MAGNUS ; CLOVIS; ENERGY) de lupin blanc (*Lupinus albus*). Les mesures ont été prises sur une période de 45 jours avec les deux lots de graines d'orobanche. Aucune de ces variétés n'a produit d'exsudats actifs dans la stimulation de la germination. Les mêmes tests ont été effectués également sur deux variétés de lupin bleu (*Lupinus angustifolius*), LBA et ARABELLA sans stimuler la germination sur cette période. Les valeurs de taux de germinations relevées ne sont pas significativement différentes du témoin négatif ($P < 0,05$).

Nous avons par ailleurs mesuré en fin de culture un ratio de biomasse aérienne/racinaire supérieur à 1 pour les 3 variétés de Lupins blancs et inférieur à 1 pour les deux variétés de Lupin bleu, ce qui suggère un développement racinaire relatif plus important dans nos conditions de culture chez le lupin bleu.

Résultats obtenus pour les tests de stimulation sur exsudats de Lentille (*Lens culinaris*)

Nous avons conduit le protocole de tests de stimulation de la germination avec les deux lots de graines de *P.ramosa* (Pram11 et Pram118) sur deux variétés de lentille : la variété de lentille blonde SANTA et la variété de lentille noire LENTI-FIX. Les mesures ont été prises sur une période de 53 jours. Nous n'avons mesuré aucune activité de stimulation provenant des exsudats de ces variétés. Les exsudats collectés ne stimulent pas la germination des lots utilisés Pram11 (Pathotype1), et Pram118 (Pathotype2) dans nos conditions expérimentales. Les valeurs de taux de germination ne sont pas significativement différentes du témoin négatif

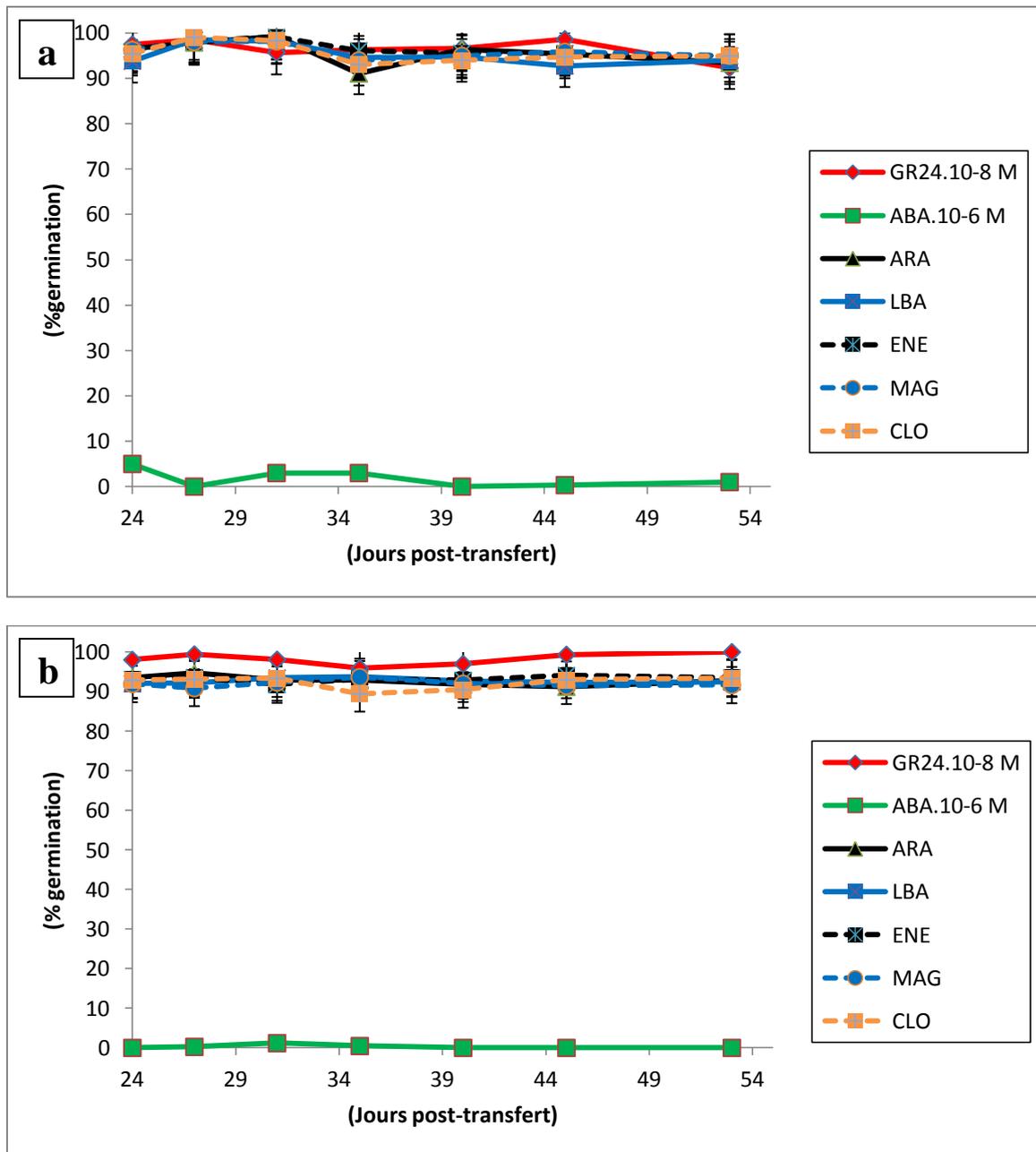


Figure 12. Cinétiques d'activité inhibitrice des exsudats de lupin vis-à-vis de la germination des graines d'orobanche.

Les cinq variétés représentées sont ARABELLA (courbe noire continue), LBA (courbe bleue continue), ENERGY (courbe noire pointillée), MAGNUS (courbe bleue pointillée) et CLOVIS (courbe orange pointillée). La courbe rouge représente le contrôle négatif d'inhibition (GR24 0 10-8M+ Eau distillée). La courbe verte représente le contrôle positif d'inhibition (GR24 0 10-8M+ ABA à la concentration 10-6 M) L'activité sur les graines d'orobanche du lot Pram11 est représentée en (a) ; celle sur les graines du lot Pram118 en (b). Les données sont les moyennes \pm erreurs standards (n=3).

Résultats des tests d'inhibition de la germination des graines d'orobanche

Les contrôles positifs pour les tests de l'activité inhibitrice sur les graines d'orobanche sont effectués en appliquant de l'acide abscissique à une concentration de 10^{-6} M. Les graines sont ensuite stimulées avec l'ajout de GR24 à une concentration de 10^{-7} M. Pour les témoins positifs d'inhibition en présence d'ABA, nous obtenons des valeurs moyennes de germination de $1,72\% \pm 3,40$ pour les suspensions de graines du lot Pram11 et de $0,88\% \pm 1,32$ avec le lot Pram118. Pour les contrôles effectués avec de l'eau distillée (et addition de GR24), les taux de germination sont de $95,56\% \pm 4,25$ pour le lot Pram11 et $92,79\% \pm 3,99$ avec le lot Pram118.

Résultats obtenus pour les tests d'inhibition sur exsudats de Féverole (*Vicia faba*)

Concernant les résultats des tests d'inhibition effectués avec les exsudats de féverole, nous avons observé une baisse de la germination en présence de GR24 à la concentration 10^{-8} M et ceci significativement pour les deux lots de graines d'orobanches testés ($P > 0,05$) respectivement pour Pram11 (Figure 11a) et Pram118 (Figure 11b) au-delà de 45 jours post-transfert. Cependant, les modalités présentant des baisses conséquentes du taux de germination se sont accompagnées d'un brunissement de la solution d'exsudation. La solution collectée présente, même après filtration à $0,2\mu\text{m}$ une coloration brune opaque. Nous pouvons noter également une correspondance avec un brunissement des racines des féveroles constaté lors des collectes de biomasse en fin de culture dans les pots concernés. Il apparaît par ailleurs que les exsudats restés incolores durant la période de l'expérience ne présentent pas d'effet inhibiteur significatif et ce, au sein des trois répétitions d'une variété donnée. Les variétés MAYA et FABELLE ne montrent pas d'activité d'inhibition durant cette période. L'inhibition constatée relève donc probablement de l'infection des plants.

Résultats obtenus pour les tests d'inhibition sur exsudats de Lentille (*Lens culinaris*)

Les exsudats de lentilles collectés sur les deux variétés SANTA et LENTI-FIX n'ont pas permis de montrer d'inhibition significative de la germination par rapport au contrôle négatif (eau distillée + GR24. 10^{-8} M). Nous ne constatons pas de différence significative entre les deux variétés ($P < 0,05$). La germination d'aucun des deux lots de graines d'orobanche n'est inhibée par les exsudats de lentille dans nos conditions expérimentales.

Résultats obtenus pour les tests d'inhibition sur exsudats de Lupin Blanc (*Lupinus albus*) et bleus (*Lupinus angustifolius*)

Aucun écart significatif ($P < 0,05$) par rapport au standard négatif n'a été mesuré pour les résultats des tests avec les exsudats de lupin blanc et bleus et ceci avec les deux lots de graines de *P. ramosa* (Figure 12). Nous n'observons aucune inhibition significative ($P < 0,05$) de la germination pendant la période de test et par rapport au contrôle négatif d'inhibition.

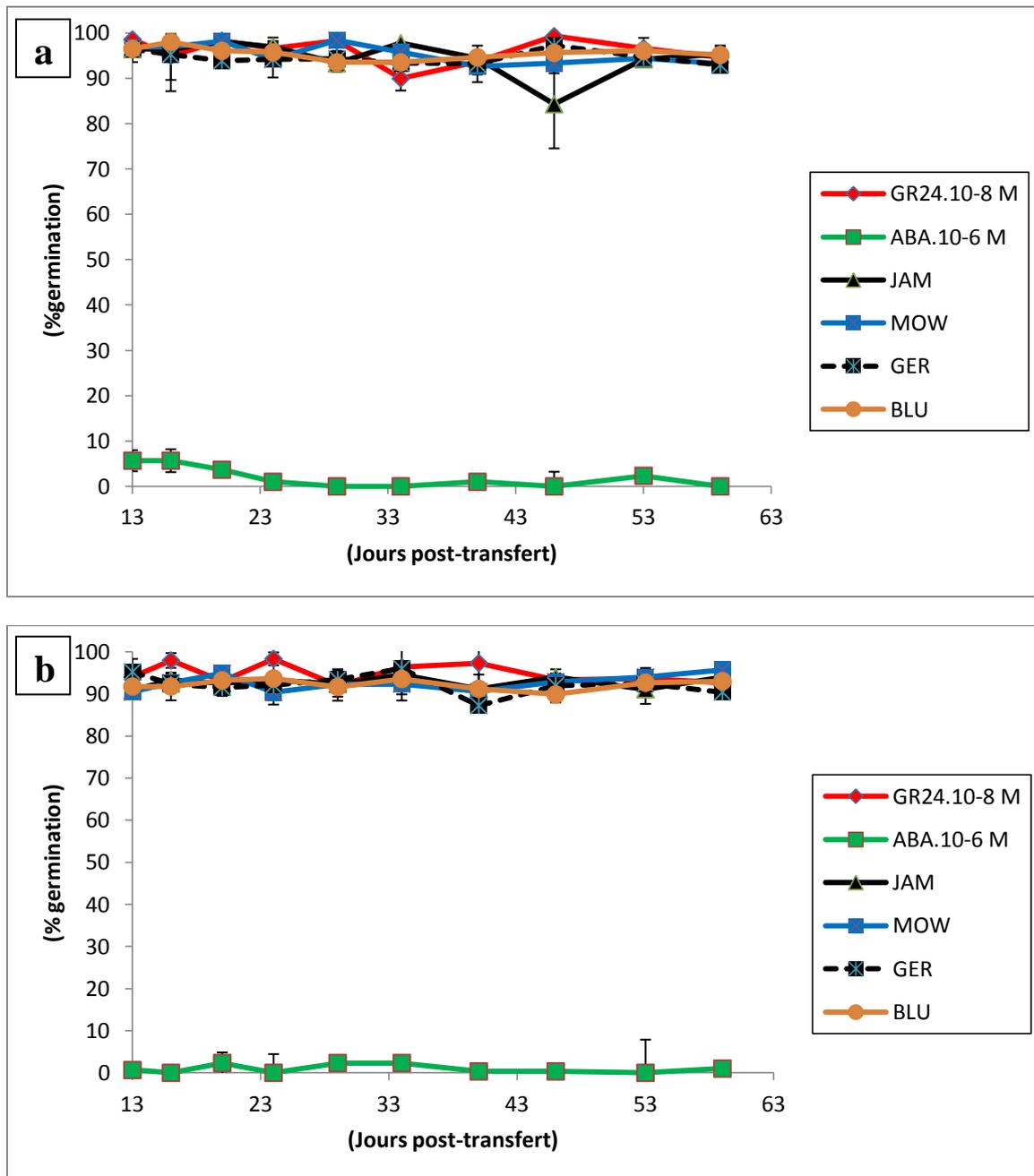


Figure 13. Cinétiques d'activité inhibitrice des exsudats de pois vis-à-vis de la germination des graines d'orobanche.

Les quatre variétés représentées sont JAMES (courbe noire continue), MOWGLI (courbe bleue continue), GERONIMO (courbe noire pointillée) et BLUESTAR (courbe orange continue). La courbe rouge représente le contrôle négatif d'inhibition (GR24 0 10-8M+ Eau distillée). La courbe verte représente le contrôle positif d'inhibition (GR24 0 10-8M+ ABA à la concentration 10-6 M) L'activité sur les graines d'orobanche du lot Pram11 est représentée en (a); celle sur les graines du lot Pram118 en (b). Les données sont les moyennes \pm erreurs standards (n=3).

Résultats obtenus pour les tests d'inhibition sur exsudats de Pois (*Pisum sativum*)

Les tests d'inhibition avec les exsudats de pois (Figure 13) n'ont pas permis de déceler de baisse de germination significative ($P < 0,05$) par rapport au contrôle (eau distillée + GR24).

Résultats obtenus pour les tests d'inhibition sur exsudats de Soja (*Glycine max*)

Les tests effectués en inhibition avec les exsudats de Soja (Figure 14) n'ont pas montré de baisse de germination significative ($P < 0,05$) par rapport au contrôle (eau distillée + GR24).

Résultats des tests pour les extraits racinaires et foliaires

Les extractions après récolte des biomasses foliaires et racinaires n'ont pas pu couvrir toutes les espèces étudiées pendant l'expérience dans le temps imparti au stage. L'ajustement des temps de lyophilisation a également été un frein à l'avancée de ce volet d'étude. Nous avons effectivement dû allonger les temps de lyophilisation (72h) après avoir constaté la présence de cristaux de glace dans les extraits récupérés à la sortie du lyophilisateur après 48h. Ainsi, le broyage (suivant la lyophilisation) a été effectué sur les extraits racinaires des 3 variétés de lupin blanc et les 2 variétés de Lupin bleu. Ces tests ont ciblé prioritairement le lupin du fait d'absence d'activité stimulante exsudée dans nos précédents tests. Nous avons donc réalisé 2 extraits à partir de ces racines : un hydrophile avec de l'eau distillée et un hydrophobe avec de l'acétonitrile 80%).

Les extraits hydrophiles sont testés à 10%, 1% et 0,1% sur le lot Pram11. Les extraits hydrophobes sont quant à eux testés à 0,1%, 0,01% et 0,001%. La dilution est supérieure pour les extraits hydrophobes pour éviter un « effet solvant » dû à l'acétonitrile.

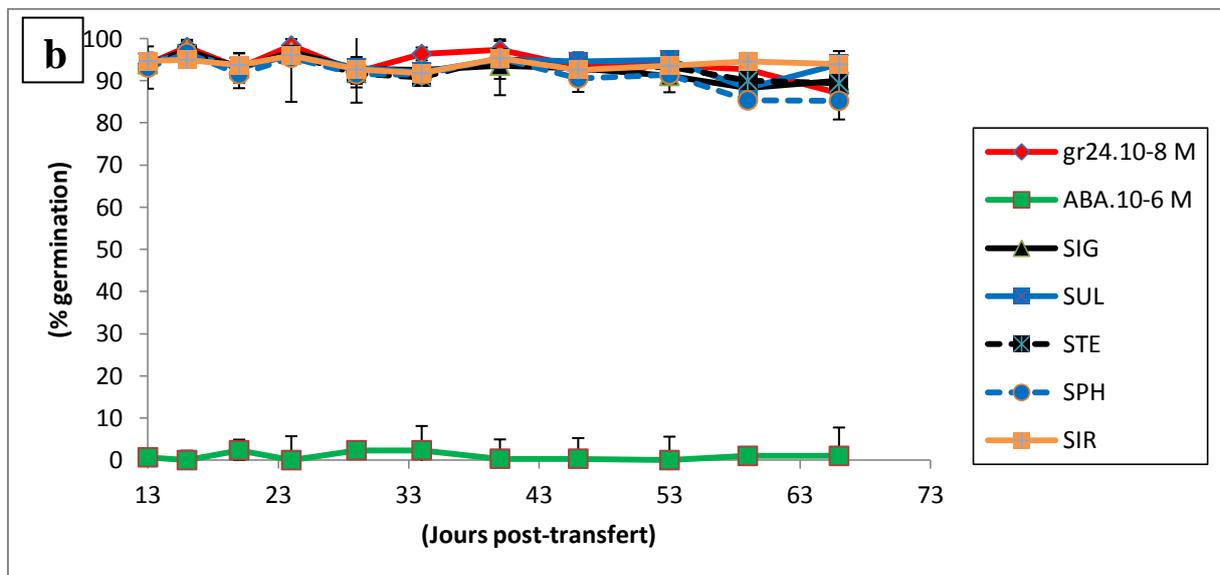
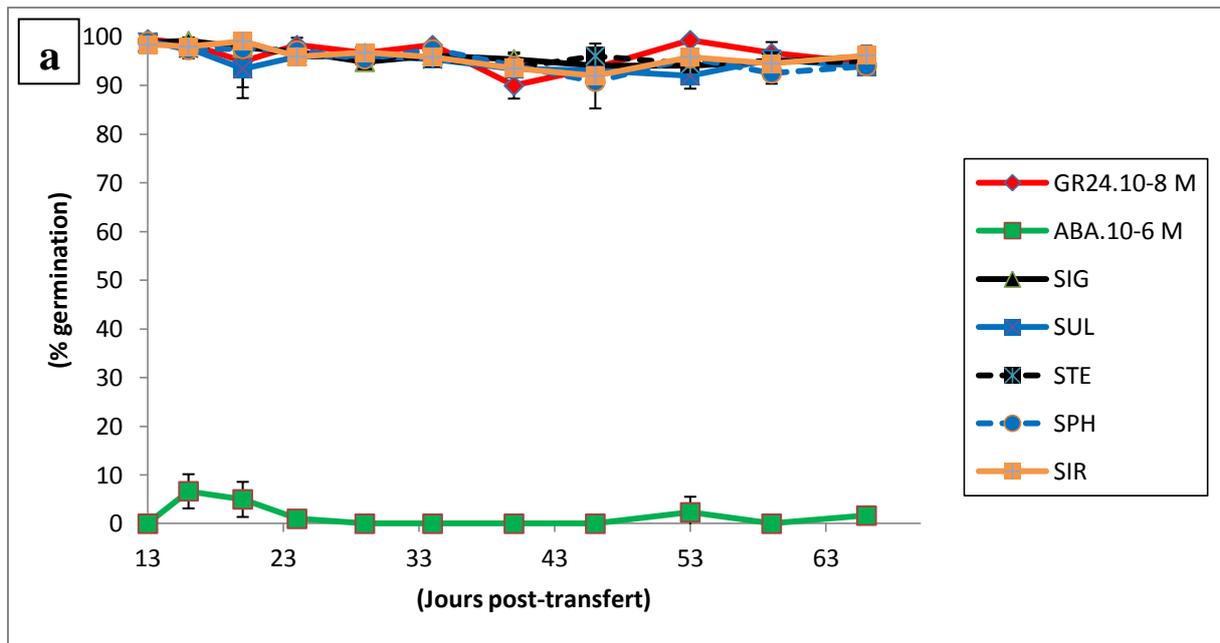


Figure 14. Cinétiques d'activité inhibitrice des exsudats de soja vis-à-vis de la germination des graines d'orobanche.

Les cinq variétés représentées sont SIGALIA (courbe noire continue), SULTANA (courbe bleue continue), STEARA (courbe noire pointillée) et SPHERA (courbe bleue pointillée) et SIRELIA (courbe orange continue). La courbe rouge représente le contrôle négatif d'inhibition (GR24 0 10-8M+ Eau distillée). La courbe verte représente le contrôle positif d'inhibition (GR24 0 10-8M+ ABA à la concentration 10-6 M) L'activité sur les graines d'orobanche du lot Pram11 est représentée en (a) ; celle sur les graines du lot Pram118 en (b). Les données sont les moyennes \pm erreurs standards (n=3).

Concernant les tests de stimulation de la germination, nous ne constatons pas d'activité stimulante émanant des extraits racinaires issus de l'extraction hydrophile testés sur Pram11.

Nous observons une faible stimulation de la germination avec certains des extraits hydrophobes. C'est le cas des extraits issus des racines de la variété de Lupin bleu.

ARABELLA qui présente, à une dilution de 0,01%, $5,33\% \pm 1,52$ de stimulation par rapport au témoin négatif (eau distillée). Les extraits hydrophobes de la variété de Lupin blanc MAGNUS montrent une stimulation plus prononcée puisque celle-ci est observable jusqu'à la dilution à 0,001% des extraits. Pour ces dilutions, nous obtenons des valeurs de $74,33\% \pm 3,05$ de graines stimulées lors d'une dilution à 0,01% et $65,66\% \pm 7,09$ en diluant les extraits à 0,001%.

Résultats des tests d'activité des composés purs

Nous avons testé les 4 composés sur le lot Pram11. Les résultats des tests effectués avec les composés purs (Figure 15) n'ont pas révélé d'activité stimulantes sur la germination des graines. Nous constatons néanmoins des inhibitions de la germination (en présence de GR24.10-8M) en présence de trois de ces composés testés. En effet, la Génistéine semble inhiber la germination des graines en présence de GR24, nous obtenons, selon le modèle de régression logistique à 4 paramètres, une IC₅₀ (Tableau II) de $1,62 \cdot 10^{-9}$ M. Le Lupéol semble également avoir une action inhibitrice de la germination du lot Pram11 avec une IC₅₀ de $5,58 \cdot 10^{-10}$ M. La Lupinine montre également un résultat semblable et nous obtenons, selon notre modèle une IC₅₀ de $1,26 \cdot 10^{-9}$ M. Le 6-chloroacétyl-2-benzoxazolinone ne semble pas avoir d'activité sur la germination des graines d'orobanche du lot Pram11.

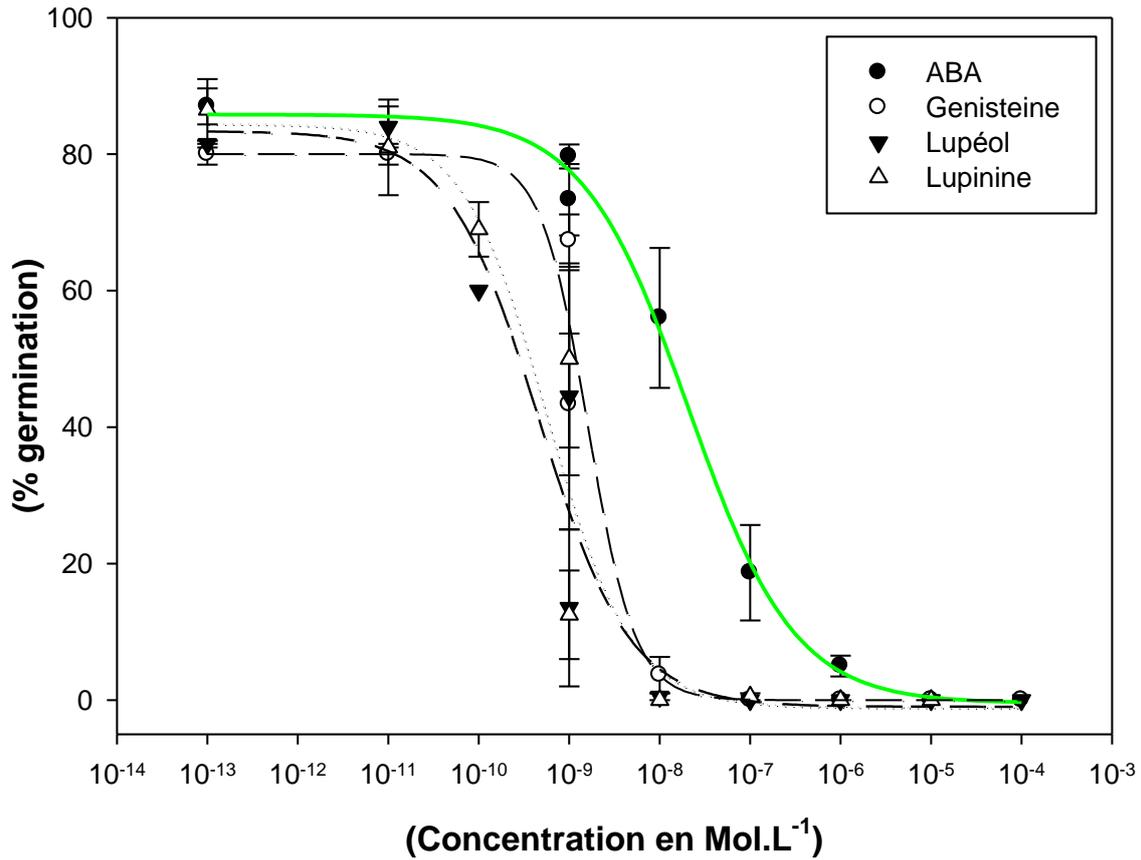


Figure 15. Taux de germination des graines du lot Pram11 en fonction d'un gradient décroissant d'inhibiteur et IC50 associées. La courbe verte représente le taux d'inhibition de la germination des graines par l'ABA en fonction de la concentration. Les IC50 sont obtenues à partir d'un modèle de régression logistique à 4 paramètres effectué par le logiciel SigmaPlot 10. Les données sont les moyennes \pm erreurs standards (n=3).

Tableau II. Valeurs d'IC50 de la germination du lot Pram11 obtenues pour l'ABA ainsi que pour les 3 composés à partir du modèle de régression logistique à 4 paramètres et erreurs standards associée au modèle.

Molécule	IC50	Erreur standard
ABA	2,09.10-8 M	6,03.10-9
Génistéine	1,62.10-9 M	3,70.10-10
Lupéol	5,58.10-10 M	2,16.10-10
Lupinine	1,26.10-9 M	3,71.10-10

Discussion

Dans le cas de l'allélopathie, l'interaction est biotique car elle implique un organisme végétal émetteur de composés actifs et un organisme « receveur » végétal, fongique ou bactérien. Cette interaction peut être délétère d'un point de vue du développement du « receveur » des composés allélopathiques mais peut aussi bien conduire à un signal de développement de ce partenaire comme dans le cas de la symbiose rhizobiacées-légumineuses ou bien la stimulation des graines d'orobanche par la plante hôte.

Ce criblage spécifique et variétal portant sur des Fabacées cultivées nous a permis de visualiser un ensemble de profils plus ou moins variants. En expérimentant dans des conditions environnementales fixées, ce qui implique l'objectif d'isoler les effets génétiques des différentes accessions utilisées, nous avons pu mettre en lumière les divergences qualitatives et quantitatives quant 'à l'activité des exsudats de ces plantes sur les graines de *Phelipanche ramosa*.

Le premier point qui peut être souligné est le fait qu'aucune variété dans la collection de Fabacées criblée n'a montré d'activité d'inhibition de la germination des graines de *P. ramosa* (tests sur exsudats). Les résultats des tests effectués sur les deux lots de graines sont formels, nous n'avons à aucun moment pu mettre en évidence une baisse significative des taux de germination en présence des exsudats pour les graines stimulées au GR24. Le cas unique où nous avons pu mesurer une inhibition relève probablement d'un biais dû à l'infection des plants de féverole. Nous utilisons un milieu de culture relativement pauvre en macroéléments. Il est possible que le milieu nutritif utilisé favorise un type d'exsudation en particulier. En effet, le niveau des apports en nutriments peut faire varier quantitativement, mais aussi qualitativement l'exsudation de composés dans la rhizosphère (Yoneyama *et al.*, 2007; 2012), certains composés synthétisés ont pu être maintenus dans le milieu intracellulaire des racines. L'activité inhibitrice constatée avec la Génistéine, le Lupéol et la Lupinine suggère que certains composés présents dans les racines de ces plantes peuvent être inhibiteurs et ne sont pas obligatoirement retrouvés dans les exsudats. Dans certains cas, il se peut au contraire que le milieu nutritif ait favorisé l'exsudation de certains composés actifs.

Il apparaît dans nos résultats d'importantes divergences interspécifiques quant à la nature de l'activité des exsudats sur la germination des graines de *P. ramosa*. Ceci peut s'expliquer en partie par la grande diversité des métabolites secondaires synthétisés par les Fabacées. Il se peut que pour des activités stimulantes, les acteurs moléculaires impliqués ne soient pas les mêmes selon l'espèce voire même selon les variétés d'une espèce donnée. Ceci ouvre, en outre, le champ à l'étude et à la caractérisation biochimique de ces composés présents dans les exsudats actifs.

Au sein même des espèces de Fabacées étudiées, nous avons également montré des différences d'intensité et de précocité de l'exsudation active dans la stimulation. Il peut effectivement être pertinent d'approfondir le lien entre une stimulation plus précoce de la germination des graines d'orobanches et le comportement agronomique d'une variété. Nous avons constaté ces différences de précocité principalement chez le Pois et la Féverole. Les variétés de pois d'hiver semblent débiter l'exsudation stimulante plus tardivement. Les variétés étant en partie sélectionnées sur leur précocité, il se peut que les composés impliqués ici dans la stimulation aient un rôle métabolique perceptible dans leur développement végétatif ou reproducteur.

Il a été montré que chez la féverole (*Vicia faba*), l'exsudation de composés actifs dans la stimulation de la germination de certaines orobanches et appartenant à la famille des strigolactones tels que l'orobanchol et l'orobanchyl acétate sont régulés au cours du développement (Fernandez-Aparicio *et al.*, 2014). Cette étude montre également les divergences quantitatives de ces composés entre plusieurs variétés. Nous retrouvons dans nos résultats des variations d'activités qui s'apparentent probablement à des changements physiologiques qui peuvent être reliés au développement de la plante.

L'allélopathie a déjà été mentionnée au sujet d'interactions intervenant sur la germination entre certaines adventices, plus précisément dans des relations d'inhibition de la germination d'une plante sur une autre. Par exemple, l'Alliaire officinale, *Alliaria petiolata* (Brassicacées) a été identifiée comme inhibitrice de la germination de la Benoîte commune, *Geum urbanum* (Rosacées) (Prati *et al.*, 2004). La nature et la quantité de composés exsudés dans la rhizosphère peut varier selon de nombreux paramètres, d'ordre génétique (spécifiques ou variétaux) ou bien encore environnemental (pH du substrat, disponibilité en nutriments). Les échanges de composés entre le milieu souterrain et l'appareil racinaire des plantes sont une composante indispensable au développement de ces dernières. La grande faculté adaptative des végétaux en un milieu donné résulte en partie de ce type de processus qui permet en quelque sorte de moduler l'état biochimique ou dans certains cas microbologique des espaces confinés autour des racines.

Bien que nous ayons constaté un grand nombre de stimulations des graines de *P. ramosa* par les espèces étudiées, ces dernières ne constituent pas nécessairement un hôte pour le parasite. En effet, pour qu'une plante soit hôte, l'exsudation de stimulants est certes un pré-requis, mais il faut également permettre les étapes suivantes du parasitisme. Certaines espèces sont dites faux hôte, c'est-à-dire qu'elles stimulent la germination des graines mais ne permettent pas l'accrochage et la suite du cycle parasitaire. C'est par exemple le cas de la Vesce poupre, *Vicia purpurea* (Fabacées) (Boulet *et al.*, 2013).

Nous n'avons par ailleurs pas constaté de comportements opposés entre les deux pathotypes de *P. ramosa* représentés par les deux lots de graines. Les divergences restent quantitatives et montrent, en outre, une sensibilité plus grande du pathotype 1 (représenté par le lot Pram11) par rapport au pathotype 2 (représenté par le lot Pram118) et ceci, dans chaque cas où une activité stimulante est observée en réponse aux exsudats de Fabacées. Dans nos résultats nous n'observons en aucun cas une stimulation du lot Pram118 plus élevée que celle du lot Pram11. Ceci reste également cohérent avec le fait que le pathotype 2 est moins sensible au GR24 que le pathotype 1 (Boyer *et al.*, 2014).

Conclusion

L'utilisation des Fabacées en tant que couvert végétal ou bien entrant dans la rotation des cultures est indéniablement une plus value économique et environnementale si l'on considère leur qualités d' « engrais verts ». Nos expériences ont montré qu'en conditions contrôlées, de nombreuses espèces se révèlent stimulatrices de la germination des graines de *P. ramosa*. L'intégration de ces espèces dans la rotation ou bien en association dans le cadre de la lutte contre l'Orobanche doit absolument prendre en compte l'aspect temporel et développemental des trois acteurs que sont la culture d'intérêt (le colza), le couvert associé (les Fabacées) et l'Orobanche rameuse sous forme de stocks de graines au moment précédent l'implantation des cultures. L'importance de la maîtrise du cycle de ces acteurs est probablement une composante essentielle du contrôle des infestations utilisant l'association ou la rotation dans le cadre d'une lutte contre l'Orobanche rameuse. La précocité avec laquelle un couvert végétal est en mesure d'engendrer une germination des stocks grainiers des sols peut effectivement être considérée. Ces germinations « suicides » peuvent permettre un assainissement des sols, sous réserve d'une intensité de stimulation assez forte. L'appréhension de ces paramètres requière un contrôle affiné des parcelles qui peut avoir lieu dans un premier temps dans un cadre expérimental de terrain. La connaissance du couvert et de son activité sur la germination des graines du parasite est donc primordiale si l'on veut connaître les périodes optimales d'implantation. Nous avons pu voir que les activités stimulatrices étaient présentes dans les exsudats sur une période donnée principalement. Il est possible que ces périodes soient différées dans des conditions de terrain, dépendantes d'un grand nombre de paramètres à forte variabilité. Il est également envisageable que la nature et la quantité de composés exsudés soient différentes dans des conditions de terrain.

Il est également important de considérer le fait que dans le cadre de l'utilisation d'un couvert végétal, l'appareil végétatif aérien peut être coupé et laissé à la surface du sol. Ceci suggère également l'importance du contenu métabolique de l'appareil aérien qui doit également faire l'objet d'analyses quant à son activité sur la germination des graines. La poursuite de l'étude de cette collection de Fabacée doit passer par l'analyse des extraits de biomasses collectés en fin de culture. Faute de temps disponible, nous n'avons malheureusement pas pu analyser l'intégralité de ces extraits. Ce volet d'étude permettra de dresser la caractérisation globale de l'activité des Fabacées de la collection sur les graines d'Orobanches.

Enfin, des expérimentations en champs doivent être conduites dans des parcelles potentiellement infestées. La mise en place de ces expérimentations par les chambres d'agriculture intégrera les références de cultivars de Fabacées de notre collection en association avec une culture de Colza. Nous avons ici mis en évidence sur une collection de Fabacée, un grand nombre d'espèces capables de stimuler les graines de *P. ramosa*. Ceci converge avec le large spectre d'hôtes potentiels déjà documentés de cette plante parasite, des essais au champ peuvent effectivement permettre d'aller plus loin dans la caractérisation et le comportement de l'orobanche vis-à-vis de différentes espèces de fabacées.

Références bibliographiques

Aly, R. (2007). Conventional and biotechnological approaches for control of parasitic weeds. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43(4), 304-317.

Auger, B., Pouvreau, J. B., Pouponneau, K., Yoneyama, K., Montiel, G., Le Bizec, B., Yoneyama, K., Delavault, P., Delourme, R., & Simier, P. (2012). Germination stimulants of *Phelipanche ramosa* in the rhizosphere of *Brassica napus* are derived from the glucosinolate pathway. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(7), 993-1004.

Benharrat, H., Boulet, C., Theodet, C., & Thalouarn, P. (2005). Virulence diversity among branched broomrape (*O. ramosa* L.) populations in France. *Agronomy for Sustainable Development*, 25(1), 123-128.

Bisby, F. (1994). *Phytochemical dictionary of the Leguminosae* (Vol. 1). CRC Press, (1180 p).

Boulet, C., Molenat, D., Benharrat, H., Delavault, P., Simier, P. (2013). Etude de la sensibilité des adventices et de quelques espèces cultivées vis à vis de l'orobanche rameuse (*Phelipanche ramosa* (L.) Pomel) en vue d'une lutte intégrée. 22^{ème} Conférence du COLUMA. Dijon, France. 10-12/12/ 2013.

Bouwmeester, H.J., Matusova, R., Zhongkui, S., & Beale, M.H. (2003). Secondary metabolite signalling in host-parasitic plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(4), 358-364.

Boyer, F. D., de Saint Germain, A., Pouvreau, J. B., Clavé, G., Pillot, J. P., Roux, A., Rasmussen, A., Depuydt, S., Laressergues, D., Frei Dit Frey, N., Heugebaert, T. S., Stevens, C. V., Geelen, D., Goormachtig, S., Rameau, C. (2014). New strigolactone analogs as plant hormones with low activities in the rhizosphere. *Mol Plant*. 7(4), 675-90.

Brault, M., Betsou, F., Jeune, B., Tuquet, C., & Sallé, G. (2007). Variability of *Orobanche ramosa* populations in France as revealed by cross infestations and molecular markers. *Environmental and Experimental Botany*, 61(3), 272-280.

Caamal-Maldonado, J. A., Jiménez-Osornio, J. J., Torres-Barragán, A., & Anaya, A. L. (2001). The use of allelopathic legume cover and mulch species for weed control in cropping systems. *Agronomy Journal*, 93(1), 27-36.

De Toffoli, M., Bontemps, P. Y., & Lambert, R. (2010). Synthèse de résultats d'essais de cultures intermédiaires pièges à nitrate à l'Université catholique de Louvain. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 14(S1), 79-89.

Deguine, J. P., Ferron, P., & Russell, D. (2008). *Protection des cultures: de l'agrochimie à l'agroécologie*. Editions Quae, (192 p).

Evidente, A., Fernández-Aparicio, M., Andolfi, A., Rubiales, D., & Motta, A. (2007). Trigoxazonane, a monosubstituted trioxazonane from *Trigonella foenum-graecum* root exudate inhibits *Orobanche crenata* seed germination. *Phytochemistry*, 68(19), 2487-2492.

Evidente, A., Fernández-Aparicio, M., Cimmino, A., Rubiales, D., Andolfi, A., & Motta, A. (2009). Peagol and peagoldione, two new strigolactone-like metabolites isolated from pea root exudates. *Tetrahedron Letters*, 50(50), 6955-6958.

Fernández-Aparicio, M., Cimmino, A., Evidente, A., & Rubiales, D. (2013). Inhibition of *Orobanche crenata* seed germination and Radicle growth by allelochemicals identified in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(41), 9797-9803.

Fernández-Aparicio, M., Flores, F., & Rubiales, D. (2009). Recognition of root exudates by seeds of broomrape (*Orobanche* and *Phelipanche*) species. *Annals of Botany*, 103(3), 423-431.

Fernández-Aparicio, M., Emeran, A. A., & Rubiales, D. (2010). Inter-cropping with berseem clover (*Trifolium alexandrinum*) reduces infection by *Orobanche crenata* in legumes. *Crop Protection*, 29(8), 867-871.

Fernández-Aparicio, M., Sillero, J. C., & Rubiales, D. (2007). Intercropping with cereals reduces infection by *Orobanche crenata* in legumes. *Crop Protection*, 26(8), 1166-1172.

Fernandez-Aparicio, M., Kisugi, T., Xie, X., Rubiales, D., Yoneyama, K. (2014), Low Strigolactone Root Exudation: a Novel Mechanism of Broomrape (*Orobanche* and *Phelipanche spp.*) Resistance Available for Faba Bean Breeding, *J. Agric. Food Chem.*, **Just Accepted Manuscript** • Publication Date (Web): 28 Jun 2014

Hibberd, J. M., & Jeschke, W. D. (2001). Solute flux into parasitic plants. *Journal of Experimental Botany*, 52(363), 2043-2049.

Hibberd, J. M., Quick W.P., Press M.C., Scholes J.D. and Jeschke W.D. (1999). Solute fluxes from tobacco to the parasitic angiosperm *Orobanche cernua* and the influence of infection on host carbon and nitrogen relations. *Plant, Cell and Environment*, 22(8), 937-947.

ITCF, (2002). Les inter-culturales : colloque au champ, Edition ITCF.

Kebreab, E., & Murdoch, A. J. (1999). Modelling the effects of water stress and temperature on germination rate of *Orobanche aegyptiaca* seeds. *Journal of Experimental Botany*, 50(334), 655-664.

- Khan, Z. R., Hassanali, A., Overholt, W., Khamis, T. M., Hooper, A. M., Pickett, J. A., & 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(9), 1871-1885.
- Kneer, R., Poulev, A. A., Olesinski, A., & Raskin, I. (1999).** Characterization of the elicitor-induced biosynthesis and secretion of genistein from roots of *Lupinus luteus* L. *Journal of experimental botany*, 50(339), 1553-1559.
- Kosslak, R. M., Bookland, R., Barkei, J., Paaren, H. E., & Appelbaum, E. R. (1987).** Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common nod genes by isoflavones isolated from *Glycine max.* *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(21), 7428-7432.
- Lechat, M. M., Pouvreau, J. B., Péron, T., Gauthier, M., Montiel, G., Véronési, C., Todoroki, Y., Le Bizec, B., Monteau, F., Macherel, D., Simier, P., Thoiron, S., & 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(14), 5311-22.
- Li, M., Shinano, T., & Tadano, T. (1997).** Distribution of exudates of lupin roots in the rhizosphere under phosphorus deficient conditions. *Soil Science and Plant Nutrition*, 43(1), 237-245.
- Long, S. R. (1989).** Rhizobium-legume nodulation: life together in the underground. *Cell*, 56(2), 203-214.
- Nun, N. B., & Mayer, A. M. (1993).** Preconditioning and germination of *Orobanche* seeds: respiration and protein synthesis. *Phytochemistry*, 34(1), 39-45.
- Ndzana Abanda, R. F. X. (2012).** Régulation des bio-agresseurs dans les cultures associées de blé dur et de pois: impact de la diversité végétale sur la démographie des pucerons du pois. Thèse de l'Université de Toulouse III-Paul Sabatier. (141 p).
- Ott, H. (2012).** Fertilizer markets and their interplay with commodity and food prices. *JRC Scientific and Policy Report*. Institute for Prospective Technological Studies. (36 p).
- Pousset J., (2000).** Engrais verts et fertilité des sols, Edition Agridécisions. (320 p).
- Pouvreau, J. B., Gaudin, Z., Auger, B., Lechat, M. M., Gauthier, M., Delavault, P., & Simier, P. (2013).** A high-throughput seed germination assay for root parasitic plants. *Plant methods*, 9(1), 32 (11p).

Prati, D., & Bossdorf, O. (2004). Allelopathic inhibition of germination by *Alliaria petiolata* (Brassicaceae). *American Journal of Botany*, 91(2), 285-288.

Tadano T, Tanaka A (1980). The effect of low phosphate concentrations in culture medium on early growth of several crop plants. *Japan Journal Soil Science Plant Nutrition*, 51, 399-404.

Tsanuo, M. K., Hassanali, A., Hooper, A. M., Khan, Z., Kaberia, F., Pickett, J. A., & Wadhams, L. J. (2003). Isoflavanones from the allelopathic aqueous root exudate of *Desmodium uncinatum*. *Phytochemistry*, 64(1), 265-273.

Voisin M., Duffé P., Perez E., Hadjou F., Delavault P., Delourme R., Simier P. (2011). Host specificity and genetic diversity of the parasitic plant *Phelipanche ramosa* on winter oilseed rape in France. *Comptes-rendus du 13th International Rapeseed Congress (IRC 2011)*. Prague, République Tchèque. 5-9/06/2011. 1352, 1205–1208.

Xie, X., Yoneyama, K., Harada, Y., Fusegi, N., Yamada, Y., Ito, S., Yokotae, T., & Yoneyama, K. (2009). Fabacyl acetate, a germination stimulant for root parasitic plants from *Pisum sativum* *Phytochemistry*, 70(2), 211-215.

Yoneyama, K. (2008). Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from Fabaceae plants. *New Phytologist*, 179(2), 484-494.

Yoneyama, K., Xie, X., Sekimoto, H., Takeuchi, Y., Ogasawara, S., Akiyama, K., Hayashi, H & Yoneyama, K. (2008). Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from Fabaceae plants. *New Phytologist*, 179(2), 484-494.

Yoneyama, K., Xie, X., Kim, H. I., Kisugi, T., Nomura, T., Sekimoto, H., & Yoneyama, K. (2012). How do nitrogen and phosphorus deficiencies affect strigolactone production and exudation?. *Planta*, 235(6), 1197-1207.

Yoneyama, K., Yoneyama, K., Takeuchi, Y., & Sekimoto, H. (2007). Phosphorus deficiency in red clover promotes exudation of orobanchol, the signal for mycorrhizal symbionts and germination stimulant for root parasites. *Planta*, 225(4), 1031-1038.

Zhang, F., & Smith, D. L. (1995). Preincubation of *Bradyrhizobium japonicum* with genistein accelerates nodule development of soybean at suboptimal root zone temperatures. *Plant Physiology*, 108(3), 961-968.

Zhang, F., & Smith, D. L. (1996). Genistein accumulation in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) root systems under suboptimal root zone temperatures. *Journal of Experimental Botany*, 47(6), 785-792.

Annexes

Annexe I. Composition du milieu TT 50% utilisé pour l'irrigation des Fabacées de l'étude

Composition du milieu TT (1/2)				
	Concentration	MM	Masse (g)	
	(M)	(g.mol ⁻¹)	50 mL, 500x	
NH₄NO₃	1,43E-03	80,04	2,86	
NaNO₃	1,00E-03	84,99	2,12	
NaH₂PO₄	1,60E-04	119,98	0,48	Macroéléments
CaCl₂	1,00E-03	110,99	2,77	
MgSO₄/H₂O	1,00E-03	120,36	3,01	
MES	1,00E-03	195,24	4,88	
Microéléments				
MnSO₄/H₂O	2,00E-05	169,01	1,69	
H₃BO₃	5,00E-05	61,83	1,55	
ZnSO₄/7H₂O	3,00E-06	287,54	0,43	
CuSO₄/5H₂O	2,00E-07	249,68	2,50E-02	
(NH₄)₆/Mo₇O₂₄/4H₂O	5,00E-08	1235,90	3,09E-02	
K₂SO₄	1,00E-03	174,25	4,36	
FeSO₄/7H₂O	4,00E-05	278,02	5,56	

Annexe II. Biomasses fraîches aériennes et racinaires des différentes variétés pesées en fin de culture.

Variétés	Jours post transfert	Masse fraîche totale (g) de l'appareil aérien des trois bouquets de plantes	Masse fraîche totale (g) de l'appareil racinaire des trois bouquets de plantes
JAMES (<i>Pisum sativum</i>)	66 jours	54,53	100,4
MOWGLI (<i>Pisum sativum</i>)	60 jours	59,7	61,33
BLUESTAR (<i>Pisum sativum</i>)	60 jours	61,42	74,96
GERONIMO (<i>Pisum sativum</i>)	60 jours	58,36	85,89
SIGALIA (<i>Glycine max</i>)	68 jours	68,14	102,30
SULTANA (<i>Glycine max</i>)	68 jours	59,77	114,11
STEARA (<i>Glycine max</i>)	68 jours	72,58	104,58
SPHERA (<i>Glycine max</i>)	68 jours	90,52	97,86
SIRELIA (<i>Glycine max</i>)	68 jours	63,47	89,55
ENERGY (<i>Lupinus albus</i>)	68 jours	52,52	46,48
MAGNUS (<i>Lupinus albus</i>)	68 jours	55,71	43,54
CLOVIS (<i>Lupinus albus</i>)	56 jours	75,20	63,21
ARABELLA (<i>Lupinus angustifolius</i>)	60 jours	70,71	149,57
LBA (<i>Lupinus angustifolius</i>)	56 jours	61,16	100,85
MAYA (<i>Vicia faba</i>)	56 jours	87,45	61,23
FUEGO (<i>Vicia faba</i>)	63 jours	96,32	83,74
ESPRESSO (<i>Vicia faba</i>)	63 jours	98,90	70,32
DIVER (<i>Vicia faba</i>)	63 jours	76,98	68,96
FABELLE (<i>Vicia faba</i>)	63 jours	92,63	98,56
LENTI-FIX (<i>Lens culinaris</i>)	57 jours	4,00	2,96
SANTA (<i>Lens culinaris</i>)	57 jours	7,01	3,19



Diplôme / Mention : Master 2 professionnel

Spécialité : Production et Technologie du Végétal (ProTeV)

Parcours : PVS

Option : Semences et plants

Auteur(s) : Alexis PAYRAUDEAU

Date de naissance: 15/11/1988

Nb pages : 32

Annexe(s) : 2

Année de soutenance : 2014

Organisme d'accueil : LBPV Nantes

Adresse : 2, rue de la Houssinière

BP 92208

44322 NANTES

Maître de stage : Philippe SIMIER

Co-Encadrant : Jean Bernard POUVREAU

Titre français : Evaluation du caractère allélopathique d'une collection de Fabacées cultivées vis-à-vis du développement d'une adventice parasite du colza, l'orobanche rameuse (*Phelipanche ramosa* L.)

Titre anglais : Allelopathy evaluation from legume crops towards the development of rapeseed adventitious parasitic plant, the branched broomrape (*Phelipanche ramosa* L.)

Résumé:

L'Orobanche rameuse (*Phelipanche ramosa* L.) est une plante parasite non chlorophyllienne qui engendre d'importants dégâts sur certaines cultures dont le Colza (*Brassica napus* L.). Dans un contexte de développement de pratiques agricoles raisonnées, les associations culturales peuvent apporter des bénéfices aussi bien structuraux que sanitaires pour les parcelles cultivées en augmentant la fertilité des sols et en y apportant une diversité génétique à un peuplement uniforme souvent fragile. Cette étude tente de caractériser la nature des interactions allélopathiques de variétés de Fabacées cultivées sur la germination des graines de *P. ramosa*. En effet, chez les Orobanches, les graines ne germent pas sans la présence de composés stimulants comme les strigolactones exsudés par certaines plantes. Ce criblage s'intéresse aux cultivars de Fabacées entrant dans la composition des couverts végétaux proposés par les semenciers spécialisés. L'expérience utilise un système de culture hydroponique en conditions contrôlées afin de produire des exsudats racinaires. Les mesures d'activités des exsudats sur les graines de *P. ramosa* ont permis de montrer que de nombreuses espèces de Fabacées stimulent la germination de ces graines. On constate néanmoins des différences quantitatives et de précocité entre les variétés de Fabacées plus ou moins marquées entre les espèces.

Abstract:

Branched broomrapes (*Phelipanche ramosa* L.) are non chlorophyllous parasitic plants causing significant damages to many crops including Rapeseed (*Brassica napus* L.). Expansion of sustainable manners in agriculture leads to consider benefits brought by intercropping and crop associations for soil and crop protection. Increasing soil fertility and bringing genetic diversity to monoculture often more susceptible. This study aims to characterize allelopathic interactions between cultivated Fabaceae species used in the composition of cover crops proposed by specialized seed companies. Experiment uses a system of hydroponic culture in controlled conditions to produce root exudates. Activities measures of exudates on *P. ramosa* seeds shown that numerous of cultivated Fabaceae species stimulates germination of those seeds. Nevertheless there are quantitative and earliness differences between varieties more or less depending on species.

Mots-clés : *Phelipanche ramosa*, *Brassica napus*, Fabacées, Allélopathie, Germination,

Key Words: *Phelipanche ramosa*, *Brassica napus*, Fabaceae, Allelopathy, Germination



