



**HAL**  
open science

# Caractérisation d'un gène majeur de résistance et d'un mécanisme de résistance secondaire à l'orobanche du tournesol

Camille Pubert

► **To cite this version:**

Camille Pubert. Caractérisation d'un gène majeur de résistance et d'un mécanisme de résistance secondaire à l'orobanche du tournesol. Biologie végétale. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2023. Français. NNT : 2023TOU30307 . tel-04558262

**HAL Id: tel-04558262**

**<https://theses.hal.science/tel-04558262>**

Submitted on 24 Apr 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# THÈSE

**En vue de l'obtention du  
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE  
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier**

---

**Présentée et soutenue par  
Camille PUBERT**

Le 6 décembre 2023

**Caractérisation d'un gène majeur de résistance et d'un  
mécanisme de résistance secondaire à l'orobanche du tournesol**

---

École doctorale : **SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et  
Bioingenieries**

Spécialité : **Developpement des plantes, interactions biotiques et abiotiques**

Unité de recherche :

**LIPME - Laboratoire des Interactions Plantes-Microbes-Environnement**

Thèse dirigée par  
**Nicolas LANGLADE et Stéphane MUNOS**

Jury

Mme Stéphanie GIBOT-LECLERC, Rapporteur  
Mme Catherine RAMEAU, Rapporteur  
M. Philippe DELAVault, Examineur  
M. Nicolas LANGLADE, Directeur de thèse  
M. Stéphane MUÑOZ, Co-directeur de thèse  
M. Matthieu ARLAT, Président

# Caractérisation d'un gène majeur de résistance et d'un mécanisme de résistance secondaire à l'orobanche du tournesol

## Résumé

L'orobanche du tournesol (*Orobanche cumana*) est une plante parasite obligatoire qui entraîne des pertes de rendement dans les principaux lieux de production du tournesol, en Europe et en Asie. Incapable de faire de la photosynthèse et dépourvue de racine, elle se connecte au système vasculaire racinaire du tournesol et y prélève les éléments nécessaires à son développement. Actuellement, les résistances génétiques sont le principal moyen de lutter contre *O. cumana*. De manière à obtenir des résistances efficaces et durables, il est nécessaire d'identifier de nouvelles résistances et également de mieux caractériser les résistances existantes. C'est dans ce contexte que s'insère le travail de ma thèse portant sur deux axes : (i) l'identification du gène majeur de résistance *HaOr5* avec la caractérisation de la résistance et (ii) la caractérisation d'une résistance secondaire entraînant la nécrose des tubercules. Le gène *HaOr5* octroie une résistance post-attachement aux populations d'orobanches françaises, chinoises et roumaines de race E. Grâce à une stratégie de clonage positionnel, nous avons localisé le gène dans une région génomique de 193 kb sur le génome de référence XRQ, à partir d'une large population F2 issue du croisement d'une lignée sensible et d'une lignée portant le gène *HaOr5*. Avec le séquençage complet des génomes des parents de la population, nous avons pu analyser les séquences spécifiques de chacun et identifier deux types de gènes candidats codant pour des F-box/LRR et une TIR-NBS-LRR. Le travail portant sur la résistance secondaire a permis d'obtenir de nouvelles informations sur le phénotype de résistance observé. Ces observations nous ont permis de faire évoluer notre protocole pour la suite des analyses et d'envisager d'autres types d'analyses pour caractériser la résistance et orienter l'identification de la résistance génétique sous-jacente. Nos résultats permettent de faire avancer les connaissances sur l'interaction du tournesol et de l'orobanche. Le travail sur *HaOr5* confirme encore une fois la similarité des mécanismes de défenses face aux bioagresseurs que ce soit des microorganismes ou des plantes parasites. Il permet également de se rapprocher de l'identification du gène d'aviorulence *AvrOr5* qui interagit avec *HaOr5* selon un modèle « gène pour gène ». Mon travail apporte de nouvelles connaissances permettant d'avancer vers des stratégies d'utilisation plus efficaces et plus durables des résistances génétiques contre l'orobanche du tournesol.

**Mots clés :** *Helianthus annuus* – tournesol, *Orobanche cumana* - plante parasite, résistance, génétique, génomique

# Characterization of a major resistance gene and a secondary resistance mechanism to sunflower broomrape

## Abstract

Sunflower broomrape (*Orobanche cumana*) is an obligate parasitic plant that causes yield losses in the main sunflower production areas in Europe and Asia. It is unable to produce photosynthesis nor roots, it connects to the sunflower's root vascular system and takes up the nutritive elements, which it needs for its development. Genetic resistances are currently the most efficient to control *O. cumana*. In order to obtain effective and sustainable resistance, it is necessary to identify new resistances and to better characterize existing resistance. My PhD project focused on two axes (i) the identification of the *HaOr5* major resistance gene and characterization of its resistance, and (ii) the characterization of a secondary resistance leading to tuber necrosis. The *HaOr5* gene confers post-attachment resistance to French, Chinese and Romanian broomrapes race E. Using a map-based cloning strategy with a large F2 population from the cross of a susceptible line and a line carrying the *HaOr5* gene, we have located the gene in a 193 kb genomic region in the sunflower reference genome XRQ. With the complete sequencing of the genomes of the parental lines used to produce the F2 population, we were able to analyze the specific sequences of each and we identified two types of candidate genes encoding for F-box/LRR and TIR-NBS-LRR. My work on the secondary resistance has provided new information on the resistance phenotype observed. These observations have enabled us to develop a protocol for further analyses and provided ways for the identification of the underlying genetic genes. My results have enabled to improve our knowledge on the interaction between sunflower and broomrape. The work on *HaOr5* once confirms the similarity of defense mechanisms against pests, whether microorganisms or parasitic plants. It also brings us closer to identifying the *AvrOr5* avirulence gene, which interacts with *HaOr5* gene in a "gene-for-gene" model. My work provides new knowledge that will enable to move towards more efficient and sustainable strategies for using genetic resistance against sunflower broomrape.

**Keywords:** *Helianthus annuus* – sunflower, *Orobanche cumana* - parasitic plant, resistance, genetics, genomics

## Remerciements

Pour commencer, je tiens à remercier Stéphane Muñoz et Claire Coussy, mes encadrants, pour la confiance qu'ils m'ont accordée en me choisissant pour cette thèse. Je me souviens encore, de l'émotion lors de l'appel de Claire en présence de membres de ma famille. La tension était palpable en attendant la fin de l'appel, pour avoir la fameuse réponse. Je remercie Claire pour son accompagnement durant la thèse, les visites à MAS Seeds et les moments difficiles, et pour sa jovialité communicative à chacun de nos échanges. Je remercie Stéphane pour son accompagnement, son aide sur les tâches difficiles pour moi et toutes les connaissances qu'il a partagées avec moi pour cette thèse. Je tiens également à remercier Nicolas Langlade qui a su être là et prendre du temps pour m'accompagner quand j'en ai eu besoin.

Je veux remercier particulièrement Alexandra Legendre, Marie-Claude Boniface et Mireille Chabaud qui m'ont tout d'abord partagé leurs savoirs et compétences pour apprendre à réaliser les différentes expériences. Elles m'ont permis d'obtenir les résultats de ma thèse. Ensuite, je tiens surtout à les remercier pour leur accueil au sein de l'équipe SPI, les discussions à la pause-café, leur présence et leur grand soutien durant les périodes difficiles. J'espère avoir pu leur apporter ne serait-ce qu'un minimum de ce qu'elles m'ont apporté.

Je tiens aussi à remercier Ming Denaes, Estelle Bouvier et Maylis Bobin pour tout le travail qu'elles ont fait lors des multiplications, sous la direction de Marie-Claude. Sans les graines obtenues, je n'aurais rien pu faire. Je les remercie également ainsi que mes stagiaires Gaëlle Mercie et Adèle Lavabre pour l'aide qu'elles m'ont apportée, que ce soit en expérimentation ou au laboratoire.

Ensuite, je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse Alexandre De-Saint-Germain, Philippe Simier et Begonia Pérez-Vich, d'avoir accepté de m'accompagner et de m'avoir apporté leur conseil pour la réalisation de cette thèse.

J'aimerais remercier les autres membres de MAS Seeds liés à la thèse, Camille Henry pour les questions de contrat et de financement du projet de thèse, Aurélie Baussart, Sylvie Lévêque et Didier Lefranc ainsi que tous les membres de leurs équipes pour les expérimentations et les génotypages. Je remercie également les membres du CNRGV liés à la thèse et particulièrement Sonia Vautrin pour son aide avec l'Hamilton et les extractions. Je les remercie aussi, ainsi que les membres de la plateforme Gentyane et Sébastien Carrère de l'équipe BioInformatique du LIPME, pour tout le travail sur les génomes. J'aimerais remercier aussi les responsables microscopie du LIPME et ceux de la plateforme T.R.I. Genotoul pour leurs formations à l'utilisation des outils de microscopie. Je remercie tous les membres des services transversaux du laboratoire, de la direction, de la gestion et de la laverie qui font tourner

le labo. Merci également à tous les membres de l'équipe ASTR, Nicolas Pouilly, Nicolas Blanchet, Olivier Catrice, et Marco Moroldo et à tous les membres passés du bureau des non-permanents pour l'accueil, les petits instants de vie de labo et du bâtiment tournesol et l'aide qu'ils ont pu m'apporter durant ma thèse.

Je tiens à remercier particulièrement Jean Leconte, mon compagnon de galère, mon voisin de bureau. Il faut se soutenir en tant que thésard tournesol. Merci pour nos échanges scientifiques, quand l'un ou l'autre avait besoin d'aide sur son projet et également pour tous les autres précieux échanges et moments d'arrosage qui nous ont aidé à faire des pauses, nous changer les idées et rendre la vie de thésard moins dure. Merci également aux membres des midis jeux de l'ADAS pour toutes ces parties et toutes les franches rigolades qui m'ont, plus d'une fois, permis de souffler pour mieux revenir ensuite.

Ensuite, hors laboratoire, j'aimerais remercier tous mes amis qui ont été là pour écouter mes histoires de thèse, me soutenir et me changer les idées, qu'ils soient nouveaux avec notre arrivée sur Toulouse, Pauline, Vincent, Isa et Caro, d'anciens camarades d'Agrocampus, Maë, Claire, Loïc, Melvin, et Margouse, ou là depuis toujours, merci Aurore. Merci à vous tous !

J'aimerais évidemment remercier ma famille, mes grands-parents, mes parents et leur moitié et ma petite sœur sans qui rien ne serait possible. Merci de croire en moi et de me soutenir depuis toujours même si nous sommes loin et que je ne suis pas très douée pour donner des nouvelles. Vous me manquez et je vous aime, un grand merci.

Pour finir, je tiens à remercier Ju, ma chérie, qui m'a suivi et tellement soutenu depuis bientôt 10 ans. Depuis le début, je n'ai de cesse de la bousculer dans ses petites habitudes et nous partons à l'aventure ensemble. Malgré nos foutus caractères, nous nous sommes bien trouvées, peu importe ce que peuvent dire les gens. Ensemble, nous sommes plus fortes. Merci à notre petite meute qui est le centre de notre monde et le cœur de notre famille, Oliver, Maïko, Orion, Oka et surtout Hippy alias Minouche. Ma plus vieille compagne qui savait tout de moi, partie beaucoup trop tôt au cours des derniers mois de rédaction de ce manuscrit.

Encore un grand merci à vous tous !

## Sommaire

Abréviations .....	8
Chapitre 1 : Introduction .....	10
I. Le tournesol.....	10
1. La famille du tournesol.....	10
2. Histoire du tournesol cultivé, de sa domestication à nos jours .....	13
3. Intérêts et usages du tournesol.....	14
4. Consommation et production .....	16
5. La sélection et les ressources disponibles pour l'amélioration du tournesol .....	18
a. Programme de sélection .....	18
b. Ressources biologiques .....	19
c. Ressources génétiques et génomiques .....	20
6. Les facteurs impactants la culture du tournesol.....	21
a. Stresses abiotiques.....	21
b. Stresses biotiques.....	22
II. Plantes parasites.....	23
1. Les différents types de plantes parasites .....	23
2. Les stades de développement.....	25
a. Germination.....	25
b. Haustorium .....	28
3. Les plantes parasites ayant un impact agronomique.....	30
4. <i>Orobanche cumana</i> .....	30
a. Cycle de vie.....	31
b. Répartition et classement par race .....	32
c. Diversité génétique des populations d'orobanche .....	34
III. Interactions et défenses de la plante-hôte face aux plantes-parasites .....	35
1. Rappel/Principe de résistance des plantes .....	35
a. Perception/Reconnaissance des pathogènes.....	36

b.	Transduction du signal .....	37
c.	Réponse défensive .....	38
2.	Les interactions et les défenses de la plante face aux plantes parasites .....	38
3.	Les méthodes de lutttes face aux plantes parasites.....	40
a.	Méthodes de lutte physiques/culturales .....	40
b.	Méthodes de lutte chimiques .....	41
c.	Méthodes de lutte génétiques.....	42
4.	Les défenses génétiques chez <i>O.cumana</i> /Tournesol .....	42
a.	Résistances quantitatives .....	43
b.	Gènes majeurs de résistance.....	44
IV.	Les objectifs de ma thèse .....	46
Chapitre 2 : Article sur l'identification et la caractérisation du gène majeur de résistance <i>HaOr5</i> .....		48
I.	Introduction de l'article.....	48
II.	Article .....	48
	Introduction.....	49
	Materiel and methods.....	52
	Results .....	61
	Discussion.....	70
Chapitre 3 : Travail sur la caractérisation du mécanisme de résistance secondaire .....		77
I.	Contexte, observations et analyses génétiques chez MAS Seeds.....	77
1.	Observations phénotypiques et analyses génétiques.....	77
2.	Stratégie et objectifs de la thèse.....	77
II.	Premiers tests de caractérisation et problématiques rencontrées par le système .....	78
1.	Observation de l'interaction en rhizotrons .....	78
2.	Observation de l'interaction en pots.....	79
3.	Problématiques rencontrées par le système .....	81
III.	Evaluation de solutions pour répondre aux problématiques et suite de la caractérisation .	81
1.	Test de différents formats de rhizotrons .....	81



2. Cinétique de l'interaction en grands rhizotrons.....	82
3. Observation de l'interaction en cytologie.....	83
4. Séquençage complet des génomes.....	85
IV. Discussion et perspectives de la caractérisation de la résistance secondaire.....	86
Chapitre 4 : Discussions, perspectives et conclusion générales.....	88
I. Discussions et perspectives.....	88
II. Conclusion générale.....	92
Références bibliographiques.....	94

## Abréviations

ABA : Acide abscissique

Avr : Avirulence

Blast : Basic local alignment sequence tool

CC : Coiled-coil

CIM : Composite interval mapping

CRB : Centre de ressources biologiques

CrGRP : Cuscuta reflexa glycine-rich protein

DAMPs : Damage-associated molecular patterns

DCL : Dehydrocostus lactone

ET : Ethylène

ETI : Effector triggered immunity

gDNA : genomic DNA

GRP : Glycine-rich protein

GWA : Genome Wide Association

HMW : High-molecular-weight

IFVC : Institute of Field and Vegetable Crops

JA : Jasmonates

KAI2 : Karrikin Insensitive 2

KAI2c : Karrikin Insensitive 2 conservé

KAI2d : Karrikin Insensitive 2 divergent

KAI2i : Karrikin Insensitive 2 intermédiaire

LR2MS : Lignée résistance secondaire MAS Seeds

LRR : Leucine-rich repeat

LSMS : Lignée sensible MAS Seeds

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

miRNA : micro RNA

NLR/NB-LRR : Nucleotide binding - Leucine rich repeat

PAMPs : Pathogen-associated molecular patterns

PRRs : Pattern recognition receptors

PTI : Pattern-triggered immunity

QTL : Quantative trait locus

RAPD : Random amplification of polymorphic DNA

RIL : Recombinant Inbred Line

RLK : Receptor-Like Kinase

RLP : Receptor-Like Protein

SA : Acide salicylique

SCAR : Sequence characterized amplified region

SIM : Simple interval mapping

SNP : Single nucleotide polymorphism

TFs : Facteurs de transcription

TIR : Toll-interleukin 1 (IL-1) receptor

USDA : United States Department of Agriculture

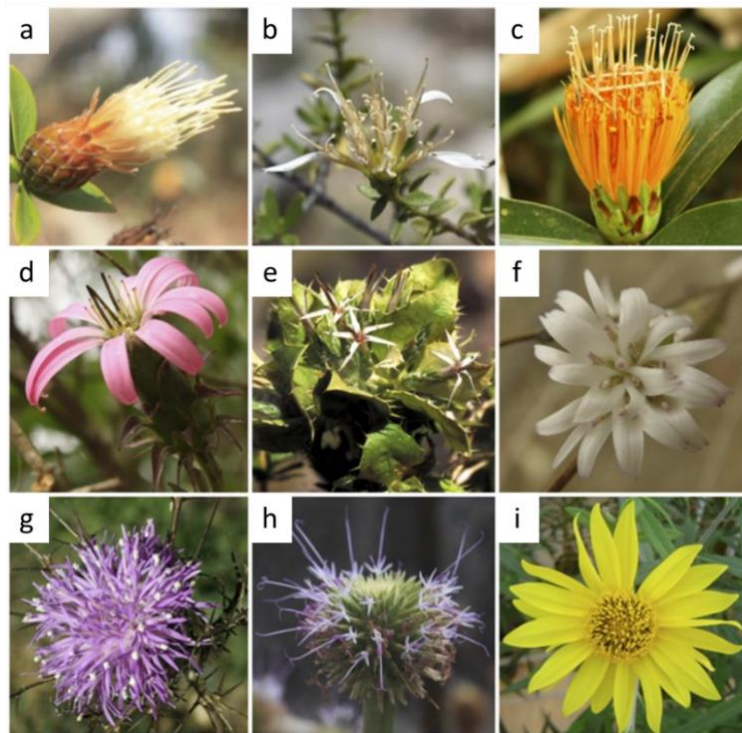
WAK : Wall-associated kinase

# Chapitre 1 : Introduction

## I. Le tournesol

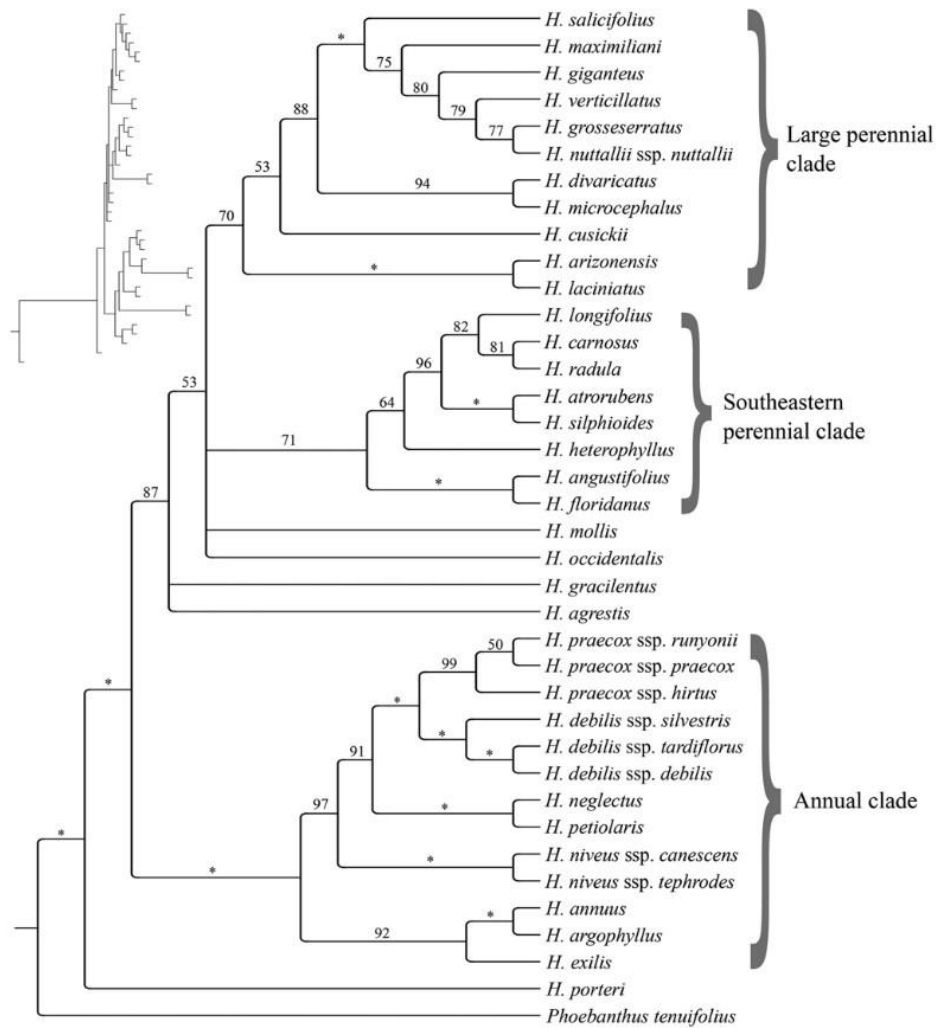
### 1. La famille du tournesol

Le tournesol appartient à la famille des Astéracées (Asteraceae), appelée également Composées (Compositae). Elle est l'une des trois plus larges familles des plantes à fleurs, en nombre d'espèces, avec les Orchidacées et les Fabacées. Le nombre d'espèces classées dans la famille est estimé à plus de 25 000 pour plus de 1 600 genres, soit environ 10 % des espèces angiospermes. Actuellement, la famille est divisée en 12 sous-familles. Des espèces de la famille se trouvent sur tous les continents, dans une grande variété d'habitats (Funk, 2009; Mandel *et al.*, 2019). La principale caractéristique regroupant ces espèces est leur inflorescence qui mime une seule et grande fleur. Cette structure est appelée un capitule. Les fleurs qui le composent peuvent être de deux types, tubulées ou ligulées, et elles sont accrochées à un unique réceptacle. La corolle des fleurs tubulées possède cinq pétales fusionnés ce qui donne une forme de tube à la fleur. Dans le cas des fleurs ligulées, cette corolle de pétales fusionnés forme une unique languette allongée, la ligule (Seiler, 1997). Trois types d'inflorescences sont distingués : radié (constitué de fleurs tubulées et ligulées), ligulé (constitué uniquement de fleurs ligulées) ou discoïde (constitué uniquement de fleurs tubulées) (Zhang and Elomaa, 2021). La figure 1 présente quelques exemples de la diversité des capitules dans les tribus de la famille. Le tournesol appartient plus précisément à la sous-famille des Asteroideae, la tribu Heliantheae (Figure 1 photo i. exemple d'inflorescence), la sous-tribu Helianthinae et le genre *Helianthus*. D'un point de vue évolutif, cette tribu correspond à l'une des dernières évolutions de la famille (Mandel *et al.*, 2019; Katinas and Funk, 2020).



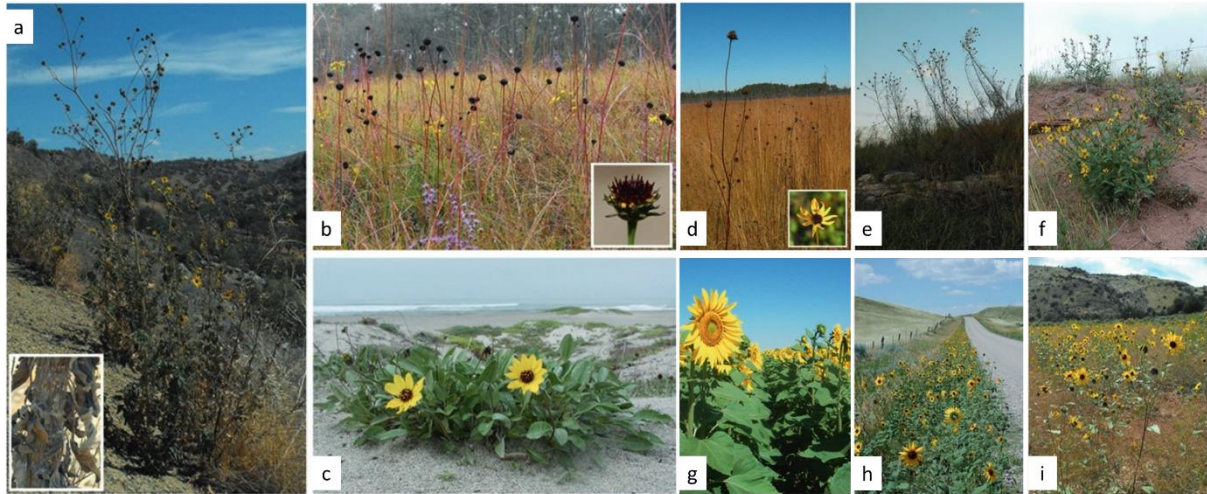
**Figure 1** : Diversité des fleurs de différentes tribus des Astéracées : a. Barnadesieae; b. Famatinantheae; c. Stifftieae; d. Mutisieae; e. Hecastocleideae; f. Pertyeae; g. Cardueae; h. Vernonieae; and i. Heliantheae. (Source Mandel et al. 2019)

Actuellement, les espèces du genre sont réparties en 4 sections *Helianthus*, *Agrestis*, *Ciliares* et *Divaricati*, en fonction de leur cycle de vie et leur morphologie. Le genre présente, au niveau de son évolution, des événements d'hybridations ayant aboutis à de nouvelles espèces (*H. paradoxus*, *H. anomalus* et *H. deserticola*). Ces événements ont également abouti à de la polyploïdie. Au niveau phylogénique (Figure 2), trois clades sont reconnus : un clade regroupant les espèces annuelles, un clade regroupant une partie importante des espèces pérennes et un clade regroupant les espèces pérennes originaires du Sud-est des USA (Timme, Simpson and Linder, 2007; Kane *et al.*, 2013; Stephens *et al.*, 2015).



**Figure 2 :** Arbre phylogénétique des espèces diploïdes du genre *Helianthus* (Source Stephens et al. 2015)

Les espèces du genre *Helianthus* se trouvent à l'état naturel en Amérique du Nord, du Mexique au Canada, d'Est en Ouest. Certaines espèces se trouvent également dans d'autres continents/pays suite à leur introduction volontaire (par exemple, *H. tuberosus* en Europe) ou involontaire (par exemple, *H. annuus* et *H. petiolaris* en Argentine). Certaines sont considérées comme des espèces invasives (Seiler and Gulya, 2004; Balogh, 2008). Le genre compte actuellement 53 espèces et 20 sous-espèces. Ces différents taxons ont un cycle de vie annuel pour 23 d'entre eux et 42 sont considérés comme plantes pérennes. Les tournesols sauvages se développent dans différents types de milieux, mais principalement des milieux ouverts et sur des sols perturbés (désert, prairie, marécage, bord de route, ...) (Figure 3). D'un point de vue morphologique, ils présentent une diversité de structure. Ils peuvent être ramifiés ou non, buissonnants de grande taille ou bas, développant une seule inflorescence ou plusieurs (Figure 3). Dans les cas du tournesol cultivé *Helianthus annuus*, les hybrides cultivés ne présentent qu'une seule tige avec un seul capitule alors que son équivalent sauvage est très souvent ramifié et produit plusieurs capitules (Figure 3 g, h et i) (Marek, 2019).



**Figure 3** : a. *Helianthus winteri* ; b. *H. radula* ; c. *H. niveus* ssp. *niveus* ; d. *H. heterophyllus* ; e. *H. salicifolius* ; f. *H. pumilus* ; g. *H. annuus* tournéeol cultivé ; h. and i. *H. annuus* sauvage. (Source Marek 2019)

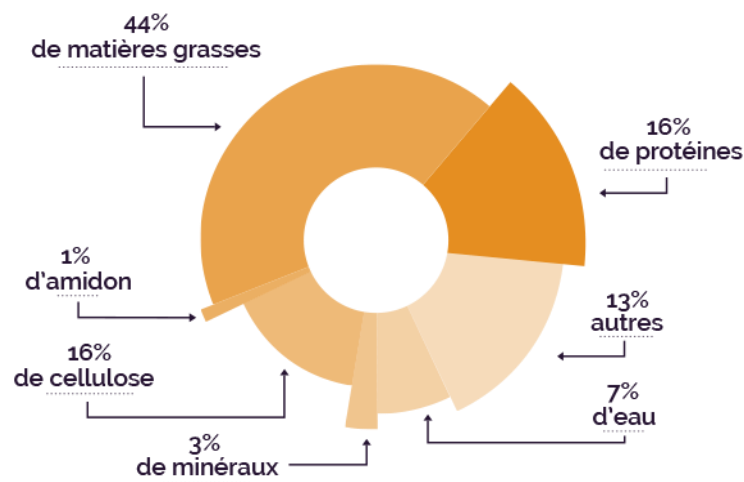
## 2. Histoire du tournesol cultivé, de sa domestication à nos jours

Le tournesol (*Helianthus annuus*) est originaire du centre-est des Etats-Unis d'Amérique. Sa domestication date de 3000 av. J.-C. par les Amérindiens (Blackman *et al.*, 2011; Park and Burke, 2020). Les graines étaient utilisées pour l'alimentation (consommation des graines, farine), la médecine et la culture (teinture, peinture corporelle, cérémonie). Il fut ramené en Europe par les colons espagnols au 16<sup>ème</sup> siècle. Principalement répandu comme plante d'ornement, la consommation des graines s'est développée en parallèle pour devenir courante au 18<sup>ème</sup> siècle. A contrario, l'huile de tournesol fut d'abord utilisée pour l'industrie et ce n'est qu'à la fin du 18<sup>ème</sup> siècle que la consommation pour l'alimentation humaine se développa. L'un des premiers pays à développer la culture pour l'huile, d'un point de vue commerciale, fut la Russie. C'est également l'origine des premiers programmes de sélection pour la résistance aux pathogènes, le rendement et surtout pour l'augmentation de la teneur en huile. Au début du 20<sup>ème</sup> siècle, les deux pays qui produisaient le plus de tournesol étaient la Russie et la Hongrie. C'est au cours de ce siècle que la production se développa dans les différents pays d'Europe, avec les contextes historiques des deux guerres mondiales et les programmes de sélection de l'ex URSS. C'est également à cette époque que le tournesol fit son retour depuis l'Europe vers l'Amérique, via les immigrants européens et la commercialisation des variétés russes. Il y est principalement produit pour la consommation animale (ensilage, fourrage et graines). Des programmes de sélections pour la consommation animale et la production d'huile se développent au Canada et aux USA (Putt, 1997; Marek, 2019). C'est à partir de 1970 que la sélection/production pour l'huile fit un bon grâce aux variétés à forte teneur en huile de l'ex URSS, la découverte d'une stérilité mâle cytoplasmique (CMS) par Leclercq en 1969 et de gènes restaurateurs de la fertilité par Kinman en 1970 et Leclercq en 1971. La CMS a été découverte par l'étude d'un croisement interspécifique

entre *H. petiolaris* et *H. annuus*. C'est au sein de ces espèces que les gènes de restauration de la fertilité ont ensuite été identifiés. D'autres croisements interspécifiques ont également permis d'introduire des résistances à certains bioagresseurs. Ces avancées ont permis la production d'hybrides et ainsi d'augmenter le rendement grâce à l'effet hétérosis, la rentabilité de la culture et sa résistance, mais aussi de faciliter la sélection (Seiler and Rieseberg, 1997; Vear, 2016).

### 3. Intérêts et usages du tournesol

Depuis le début de son histoire, le tournesol est cultivé pour une grande variété d'usages, allant de l'alimentation humaine et animale à l'utilisation dans l'industrie ou l'ornement. La partie la plus utilisée du tournesol est la graine, principalement pour la production d'huile. Sa composition lui permet de faire partie des espèces oléagineuses avec 44 % de matière grasse mais aussi des espèces à protéines avec 16 % de protéines (Figure 4). Dans le cas des graines dites « de bouche », très produites en Chine, la composition diffère avec moins de matière grasse (inférieure ou égale à 35 %) et plus de protéines (entre 25 % et 30 %). Le tournesol est reconnu comme bénéfique pour la santé humaine par la présence de certains acides gras (oméga-6 et oméga-9) mais également pour ses vertus antioxydantes (composé phénolique) et anti-inflammatoires (vitamine E) (Adeleke and Babalola, 2020; Pilorgé, 2020).

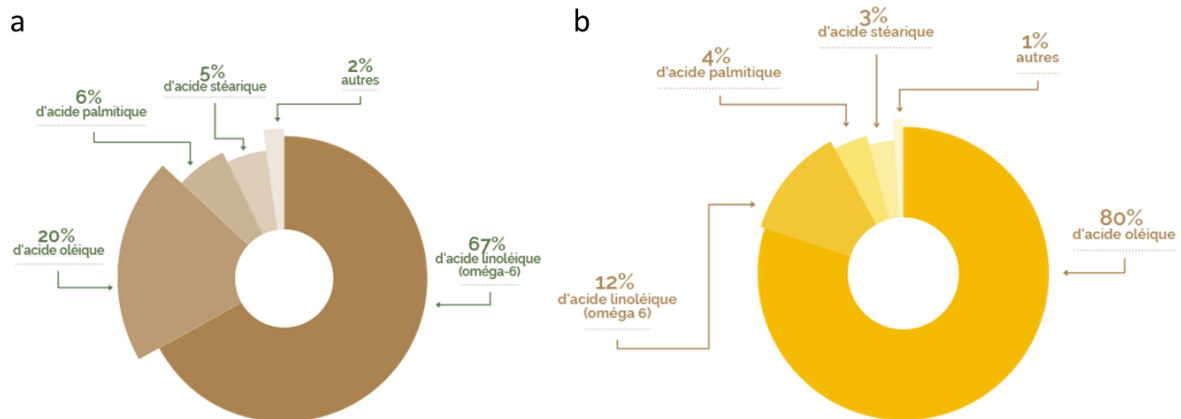


**Figure 4** : Composition d'une graine de tournesol (Source Terres Univia)

L'huile de tournesol est qualifiée de premium du fait de sa composition et de ses caractéristiques « techniques » (couleur, goût, résistance à la chaleur). Deux sortes d'huile existent en fonction du niveau de l'acide gras majoritaire entre l'acide linoléique (oméga-6) et l'acide oléique (oméga-9). L'huile classique, linoléique, est constituée à 67 % d'acide linoléique pour 20 % d'oléique (Figure 5 a). Tandis que l'huile oléique est constituée à 80 % d'acide oléique pour 12 % d'acide linoléique (Figure 5 b). Pour la consommation humaine, l'huile oléique est plus résistante à la chaleur et la rend plus intéressante pour l'industrie alimentaire. L'huile de tournesol peut aussi servir dans la composition de



cosmétique, de peinture et vernis, dans la fabrication de bio plastique ou encore de bio-diesel (Rauf *et al.*, 2017).



**Figure 5 :** a. Composition en acide gras de l'huile de tournesol classique et b. Composition en acide gras de l'huile de tournesol oléique (Source Terres Univia)

L'huile de tournesol est obtenue par trituration. Les graines sont d'abord concassées puis pressées pour extraire l'huile des amandes. Ce procédé permet également de produire du tourteau de tournesol à partir des coques et du reste des amandes après extraction. Le tourteau sert à l'alimentation du bétail. Il en existe plusieurs catégories en fonction de leur contenu en protéine, qui diffère suivant le décorticage des graines pour la trituration. Les graines non décortiquées vont produire un tourteau plus faible en protéine avec plus de fibre que les graines complètement décortiquées (tourteau « Hi-pro ») (Cheng, Dien and Singh, 2019; Pilorgé, 2020).

Les graines dites « de bouche » peuvent être consommées sans modifications, grillées, salées, décortiquées. En fonction des différents pays, la demande diffère pour leur forme, leur taille, leur couleur et leur goût. En fonction de la qualité de la graine (taille et caractéristique de la coque), elles sont réparties en trois catégories qui détermineront le prix du marché et l'usage qui en sera fait. Les meilleures graines servent pour la consommation humaine, celles de qualités moyennes servent comme ingrédients pour l'industrie et les dernières servent pour l'alimentation animale (oiseaux et animaux de compagnie) (Hladni and Miladinović, 2019; Feng, Jan and Seiler, 2022).

Au-delà de la consommation et utilisation des graines, le tournesol est également utilisé en tant que fourrage/ensilage pour nourrir le bétail. Le tournesol est intéressant en tant que culture intermédiaire et en amélioration de la qualité d'ensilage d'autres cultures (Mafakher, M. Meskarbashee, *et al.*, 2010; Mafakher, Moosa Meskarbashee, *et al.*, 2010; Cruvinel *et al.*, 2017). Il est également toujours utilisé comme plante d'ornement que ce soit pour le jardin, en pot ou en fleur coupé. En fonction du marché, les caractéristiques des fleurs diffèrent (la durée de floraison, la ramification, la tenue de la tige...). Pour l'ornement, différents types d'inflorescences ont été développés avec des variations au niveau

de la morphologie et de la couleur des fleurs (Cvejić, Jocić and Mladenović, 2016; Cvejić *et al.*, 2017). Pour finir, le tournesol en tant que culture est également intéressant d'un point de vue environnemental. Il demande peu d'intrants, d'eau ou encore de pesticides. C'est aussi une plante mellifère qui peut être intéressante pour les pollinisateurs (Debaeke, Bedoussac, *et al.*, 2017).

#### 4. Consommation et production

Le tournesol est une culture importante de plusieurs marchés mondiaux. Il se classe 4<sup>ème</sup> des productions d'huile végétale avec 9,2 % de la production mondiale d'huile en 2017/2018 derrière le palme (36,5 %), le soja (27,4 %) et le colza (12,5 %). Pour les tourteaux oléagineux, le tournesol se classe 3<sup>ème</sup> avec 5,6 % derrière le soja (66 %) et le colza (10 %) sur la même période. La consommation d'huile végétale dans le monde a doublé entre 2001 et 2019. L'huile de tournesol est principalement consommée en Europe et en Asie (Figure 6). Pour les tourteaux, ils sont principalement consommés en Europe et pour les graines de bouches, la Chine représente environ la moitié de la consommation mondiale (Pilorgé, 2020).



**Figure 6** : Consommation domestique de l'huile de tournesol par pays en 1000 MnT (Source Pilorgé 2020)

Le tournesol est produit sur tous les continents excepté l'Antarctique. Plus de 75 % de la production mondiale de graine de tournesol se situe en Europe, 12 % en Asie, 8 % en Amérique, 4 % en Afrique et moins de 1 % en Océanie. Entre 2012 et 2021, les dix principaux pays producteurs sont, par ordre d'importance, : l'Ukraine, la Russie, l'Argentine, la Chine, la Roumanie, la Bulgarie, la Turquie, la Hongrie, la France et les USA. Leur production représente 84 % de la production mondiale de graines de tournesol. Ce classement évolue pour plusieurs pays, si on compare la première partie de cette décennie 2012-2016 à la deuxième 2017-2021 (Tableau 1).

	2012-2016			2017-2021			Evolution de la production (%)	Evolution de la superficie (%)	Classement des pays producteurs
	Production (1000T)	Superficie (1000ha)	Rendement (T/ha)	Production (1000T)	Superficie (1000ha)	Rendement (T/ha)			
Ukraine	10876	5327	2,04	14232	6266	2,27	31	18	=
Russie	9222	6647	1,39	13517	8329	1,62	47	25	=
Argentine	2933	1512	1,94	3514	1714	2,05	20	13	=
Chine	2509	954	2,63	2733	958	2,85	9	0	↓
Roumanie	1910	1036	1,84	2902	1111	2,61	52	7	↑
Bulgarie	1789	826	2,17	1935	832	2,32	8	1	↓
Turquie	1576	654	2,41	2099	779	2,70	33	19	↑
Hongrie	1566	609	2,57	1803	629	2,87	15	3	=
France	1419	653	2,17	1531	644	2,38	8	-1	=
USA	1139	659	1,73	1006	543	1,85	-12	-18	↓
Tanzanie	842	848	0,99	1045	1004	1,04	24	18	↑
Monde	42033	25083	1,68	53045	27645	1,92	26	10	

**Tableau 1 :** Production, superficie et rendement des principaux pays producteurs et leur évolution sur deux périodes de 5 ans, 2012-2016 et 2017-2021 (Source FAOStat)

La Roumanie passe 4<sup>ème</sup> devant la Chine. La Turquie passe 6<sup>ème</sup> devant la Bulgarie. Pour finir, la Tanzanie fait son entrée dans le top 10 à la place des USA. En termes d'évolution de la production entre ces périodes, l'Ukraine, la Russie, la Roumanie et la Turquie ont augmenté de plus de 26 % leur production. Ce qui correspond à une évolution supérieure au pourcentage d'évolution de la production mondiale. Ils ont également augmenté leur superficie de manière plus importante que le pourcentage d'évolution mondiale (10 %), excepté pour la Roumanie (7 %). La Tanzanie a également plus augmenté sa superficie récoltée par rapport à l'évolution mondiale et l'évolution de sa production est proche de celle mondiale avec 24 % d'augmentation. Les seuls pays ayant une évolution négative, entre les deux périodes, sont les USA pour la production (-12 %) et la superficie (-18 %) et la France pour la superficie (-1 %). Le rendement de tous les pays a augmenté entre ces deux périodes. Seulement 3 pays (la Russie, les USA et la Tanzanie) ont un rendement inférieur à 2 tonnes par hectare, mais également inférieur au rendement mondial qui est à 1,92 T/ha. Les trois pays ayant le rendement le plus élevé sont la Hongrie (2,87 T/ha), la Chine (2,85 T/ha) et la Turquie (2,70 T/ha).

Pour l'huile et le tourteau, les principaux pays producteurs sont similaires à ceux produisant les graines de tournesol. En effet, l'une des particularités de la filière d'huile de tournesol est le faible export des graines depuis les pays producteurs. La transformation des graines se fait principalement dans les pays producteurs. L'huile et le tourteau sont ensuite en partie exportés (Pilorgé, 2020). Les graines de bouches sont également produites dans les mêmes principaux pays que les graines à huile (Chine en grande majorité puis Russie, Ukraine, Turquie, USA, Argentine, Serbie et Espagne). En moyenne, la production correspond à 7 % de la superficie plantée, excepté pour la Chine qui produit en majorité des graines de bouches. (Feng, Jan and Seiler, 2022).

Pour toutes ces productions et dans tous les pays, la culture de tournesol est impactée par des contraintes et aléas climatiques ainsi que par la présence de bio-agresseurs qui peut varier d'une année sur l'autre.

## **5. La sélection et les ressources disponibles pour l'amélioration du tournesol**

### **a. Programme de sélection**

Pour répondre aux demandes des différents marchés et aux contraintes de production, les semenciers et les chercheurs ont plusieurs axes de travail pour la sélection. La première des préoccupations a toujours été l'amélioration du rendement en grain pour tous les usages. Cette amélioration passe également par la réduction de l'impact de l'environnement et des bioagresseurs sur la culture (Jocić, Miladinović and Kaya, 2015).

Plusieurs résistances génétiques ont déjà été identifiées pour les principaux pathogènes, tels que les gènes *PI* contre le mildiou du tournesol, les gènes *R* contre la rouille ou les gènes *Or* contre l'orobanche (Rauf *et al.*, 2020). Cependant l'évolution des pathogènes entraîne la nécessité de trouver de nouvelles résistances ou de rendre les résistances plus durables. La résistance du tournesol aux herbicides est également un élément de recherche pour la sélection dans le but de faciliter le traitement des adventices et de l'orobanche (Vear, 2016; Dimitrijevic and Horn, 2018). A contrario de l'objectif de suppression des stress biotiques, la sélection doit également travailler sur l'attrait des fleurs pour les insectes pollinisateurs (Vear, 2016). Avec la prise en compte croissante de l'effet des cultures sur l'environnement et le changement climatique, l'accent est également mis sur la capacité du tournesol à se développer correctement dans un large panel de stress environnementaux (résistance au froid pour les semis précoce, résistance à la sécheresse à tout moment du développement de la culture, ...) (Škorić, 2009; Vincourt, 2014).

Le contenu de la graine est un autre axe important de sélection, avec par exemple l'augmentation du rendement en huile ou l'amélioration de la qualité de l'huile. Cette dernière peut passer par la modification de la teneur en acide gras, comme l'acide oléique et également pas la proportion de certains éléments mineurs, tels que les tocophérols bénéfiques pour la santé humaine (Vincourt, 2014; Vear, 2016; Rauf *et al.*, 2020). Pour l'alimentation animale, la teneur en protéine et la facilité de décorticage sont des axes importants de sélection (Vear 2016). C'est également des éléments primordiaux pour le marché des graines de bouches, en plus du travail sur la qualité nutritionnelle et les caractères morphologiques des graines (uniformité, couleur, taille, ...) (Hladni and Miladinović, 2019; Feng, Jan and Seiler, 2022).

Pour finir, les axes de sélection pour l'ornement portent principalement sur l'architecture de la plante, la forme et la couleur des capitules. Les objectifs varient ensuite en fonction de l'usage. Par exemple pour les fleurs coupées, l'accent est mis sur la nécessité d'avoir de longues tiges et une longue tenue en vase (Jocic', Miladinovic' and Kaya, 2015).

#### **b. Ressources biologiques**

Toutes les espèces sauvages et apparentées du genre *Helianthus* sont très importantes pour l'amélioration du tournesol cultivé. Plusieurs des caractères les plus importants dans la culture du tournesol ont été obtenues par des croisements interspécifiques. Il s'agit principalement de résistances aux bioagresseurs avec par exemple *H. argophyllus* et la résistance au mildiou ou encore *H. tuberosus* et la résistance à l'orobanche. Ces croisements ont aussi permis l'introduction de la CMS déjà présenté plus haut ou encore l'introduction de résistances à certains herbicides tel que l'Imidazoline à partir d'*H. annuus* sauvage. Au niveau des tolérances abiotiques, *H. agrophyllus* a également servi pour la tolérance à la sécheresse. Les tournesols sauvages font partie des ressources principales à conserver en tant que ressources génétiques, car ils ont été et sont encore une source de résistances aux bioagresseurs et de tolérance aux stress abiotiques. Ils sont conservés à la fois *ex situ* permettant d'assurer leur conservation et leur distribution et également conservés et collectés régulièrement *in situ* pour maintenir l'adaptation/l'évolution des espèces suite aux changements des contraintes environnementales. Malgré l'intérêt de ces espèces, il est difficile de croiser certaines d'entre elles notamment du fait de la variabilité de ploïdie et de l'incompatibilité (Kantar *et al.*, 2015; Seiler, Qi and Marek, 2017; Marek, 2019).

En-dehors des ressources sauvages, un grand nombre de tournesols cultivés est disponible pour servir de ressources génétiques pour l'obtention d'hybrides, car plus faciles à croiser entre elles. Les « land races » et populations locales sont une autre source d'adaptation à l'environnement. Elles descendent de tournesols cultivés et elles se sont spécifiquement adaptés au milieu où elles se sont développées. Les « Open Pollinated Varieties », sont les premiers types de variétés produits au début des programmes de sélection. Elles ont permis d'obtenir les premières évolutions et caractères d'intérêt (amélioration du rendement et de la qualité et résistances aux maladies) (Kaya, 2016). Une grande quantité de ressources crée pour et par la recherche et la sélection existe également. Elles regroupent les populations de variétés synthétiques, issues de croisement à fort taux de compatibilité, les populations de mutants, les RIL (« Recombinant inbred line ») des lignées élites et les hybrides (Kaya, 2016; Dimitrijevic and Horn, 2018).

Pour conserver ces ressources, plusieurs centres de ressources biologiques existent dont les trois principaux sont aux Etats Unis, en Serbie et en France. Le premier centre de ressources génétiques

était celui de Russie, où les premiers programmes de sélection pour l'amélioration de la teneur en huile ont débuté. Il a vu le jour en 1922. Du point de vue des accessions sauvages, les plus importants centres de conservations sont l'USDA Gene bank (USA), le CRB Tournesol (INRAE-France) et l'IFVC Gene bank (Novi Sad, Serbie). Du point de vue des accessions cultivées il s'agit de l'USDA Gene bank (USA), du CRB Tournesol (INRAE-France) (Terzić *et al.*, 2020).

### c. Ressources génétiques et génomiques

Outre la valorisation de la diversité phénotypique des ressources génétiques pour la sélection, elles diffèrent également au niveau génomique. Les espèces du genre *Helianthus* varient au niveau de leur ploïdie avec un nombre de chromosomes de N=17 pour le tournesol cultivé. Toutes les espèces annuelles sont diploïdes et les espèces pérennes sont diploïdes, tétraploïdes et/ou hexaploïdes. Une grande variabilité de la taille du génome existe au sein des différentes espèces (Figure 7). La taille du génome haploïde varie de 3,1 Gb pour *H. neglectus* une annuelle diploïde (6,38 pg sur la Figure 4) à 11,9 Gb pour *H. smithii* une pérenne tétraploïde (24,41 pg sur la Figure 4). Cette variabilité est corrélée par certaines contraintes environnementales et à des événements de diminution ou d'extension du génome liés à un grand nombre d'éléments transposables et répétitif dans les génomes des tournesols (Kane *et al.*, 2013; Qiu *et al.*, 2019).

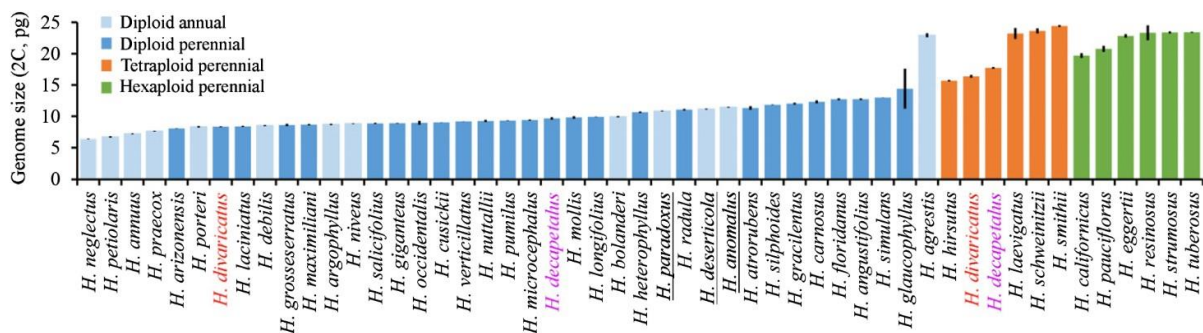


Figure 7 : Tailles estimées du génome de 49 espèces du genre *Helianthus*. (Source : Qiu *et al.* 2019)

La taille du génome cultivé est estimée à 3,6 Gb et présente également un grand nombre de longues séquences répétées. Au cours des recherches, de nombreuses cartes génétiques ont été construites pour *Helianthus annuus* à partir de marqueur RFLP pour commencer (Gentzittel *et al.*, 1995; Jan *et al.*, 1998), puis à partir de marqueur SSR (Tang *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2003) pour aboutir à un génome de référence (Kane *et al.*, 2011, p. 20; Badouin *et al.*, 2017). Badouin *et al.* ont obtenu un assemblage de 3 Gb soit 80 % du la taille du génome (3,6 Gb) comportant plus de 52 000 gènes codant pour des protéines, depuis une deuxième version du génome a été obtenu. Par le biais de l'International Consortium on Sunflower Genomics, plusieurs autres génomes de tournesols cultivés sont maintenant

disponibles. Plusieurs génomes de tournesols sauvages ont également été obtenus ou sont en cours d'obtention.

D'autres ressources génomiques ont également été caractérisées au niveau des gènes et de leur expression. Hübner et al. (2019) ont développé un pan-génome, répertoriant les gènes communs aux tournesols cultivés, des « land races » et des espèces sauvages. Ce pan-génome permet l'analyse de la diversité et de la variabilité des gènes du tournesol. Un atlas d'expression des gènes, appelé « SunExpress » (Carrere, Langlade and Moroldo, 2022), a également été développé sur la base de ce qui a été fait chez *Medicago truncatula* avec l'atlas « MtExpress » (Carrere, Verdier and Gamas, 2021). L'objectif est de regrouper en un seul endroit les données publiées d'expression des gènes sur le tournesol pour en faciliter l'usage.

## **6. Les facteurs impactants la culture du tournesol**

### **a. Stresses abiotiques**

Le tournesol étant une culture d'été, il est amené à subir des périodes de sécheresse durant son développement. Le tournesol est connu pour être relativement tolérant à la sécheresse grâce à son système racinaire en pivot permettant d'explorer un grand volume de terre. Cependant, de trop longues périodes de sécheresse impactent son développement et le rendement en graines et en huile. Au moment de la germination, le stress hydrique réduit le taux de graines qui germent. Lors du développement végétatif, il impacte les fonctions physiologiques de la plante (photosynthèse, acquisition des nutriments, ...) et réduit ainsi le développement des feuilles et leur survie. Cette réduction induit une diminution du rendement en graine et en huile de même que des épisodes de sécheresses durant la floraison le remplissage des graines. La sécheresse impacte également la qualité de l'huile en modifiant les taux des acides gras, en augmentant de l'acide linoléique au détriment de l'oléique et augmentation de l'acide stéarique (Debaeke, Casadebaig, *et al.*, 2017; Hussain *et al.*, 2018; Miladinović *et al.*, 2019).

Les hautes températures sont également un facteur limitant important, surtout durant la période d'anthèse et de remplissage des graines. Elles induisent une réduction de la fertilité en impactant les gamètes, et diminuent la production du pollen et la fertilité des ovules. Lorsque cela arrive durant le remplissage des graines, la taille des amandes est réduite ainsi que leur taux d'huile et la composition en acide gras est modifiée (Kalyar *et al.*, 2013; Debaeke, Casadebaig, *et al.*, 2017).

Les températures basses sont également un facteur limitant notamment pour les semis précoces. Elles impactent la culture lors de la germination et des premiers stades de développement. La croissance de la plantule est réduite et l'intégrité des cellules est impactée. En fonction de la durée du stress et

de son intensité, le tournesol peut être affecté (perte de feuilles, mort du bourgeon apical) ou même ne pas survivre (Hniličková *et al.*, 2017; Miladinović *et al.*, 2019).

Bien que le manque d'eau soit un facteur limitant pour la culture, l'excès d'eau l'est également. Là encore la croissance est diminuée ainsi que le rendement en graines, en huile et la composition de l'huile est altérée. Ces effets sont dus en partie à une réduction de la chlorophylle et des composés azotés dans les feuilles. Le tournesol est plus vulnérable à l'excès d'eau au tout début de son développement lors de l'établissement de la culture (Yasumoto *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2019).

Le niveau de salinité du sol est un facteur limitant dont les impacts sont similaires à ceux observés avec la sécheresse. En effet, la salinité du sol diminue la capacité d'absorption de l'eau par les plantes. Cela induit une réduction du développement des plantes et de ce fait une réduction du rendement. La composition de l'huile est également modifiée avec l'augmentation de l'acide palmitique, stéarique et linoléique et une réduction de l'acide oléique (Ebeed *et al.*, 2019; Miladinović *et al.*, 2019)

#### **b. Stresses biotiques**

La culture du tournesol est également limitée par plusieurs types de bio-agresseurs : des animaux, un oomycète, plusieurs champignons pathogènes et une plante parasite.

Les oiseaux font partie des principaux facteurs affectant la production. En fonction des espèces et des pays de production, ils impactent le tournesol aux semis, à l'émergence et/ou à la maturation. Ils entraînent une diminution du rendement ou ils sont un coût supplémentaire pour les agriculteurs lorsqu'ils doivent ressemer les parties touchées du champ (Sausse and Lévy, 2021; Sausse, Chevalot and Lévy, 2021). Pour ce qui est des insectes, il y en a peu qui sont considérés comme nuisible. C'est-à-dire que leur impact sur la culture est moins coûteux que la gestion qu'il faudrait mettre en place pour gérer leur impact. La zone de production la plus touchée est l'Amérique du Nord, la zone d'origine du tournesol. En effet, les insectes se sont adaptés aux tournesols sauvages puis aux tournesols cultivés. Deux types d'insectes sont distingués, ceux qui infestent le capitule (par exemple la pyrale du tournesol *Homoeosoma electellum*) et ceux qui infestent les tiges (par exemple le charançon tacheté du tournesol *Cylindrocopturus adpersus*). Cependant, il est à noter que les insectes ont un impact plus négatif pour les cultures de graines de bouches, en abîmant l'aspect des graines (Prasifka, 2015).

Les maladies importantes touchant le tournesol sont dues à un oomycète *Plasmapara halstedii* et à des champignons pathogènes tels que plusieurs espèces du genre *Diaporthe helianthi*, *Puccinia helianthi*, *Sclerotinia sclerotiorum* et *Verticillium dahliae*. Ces bioagresseurs ont un impact au niveau mondial (Markell *et al.*, 2015). *P. halstedii* est responsable du mildiou du tournesol. Il peut engendrer des pertes importantes lorsqu'il infecte les plantules amenant au nanisme des plantes et à des fleurs



infertiles (Gascuel *et al.*, 2015). Plusieurs gènes de résistances, appelés *PI* ont été identifiés pour lutter contre cet oomycète. Certains de ces gènes sont proches de gènes de résistances à la rouille du tournesol, induite par *P. helianthi*. Cette maladie touche les feuilles du tournesol ce qui impacte la productivité et la qualité des graines (Vear, 2016; Molinero-Ruiz, 2022). *Verticillium dahliae* a également un impact important sur les feuilles au fur et à mesure de sa propagation dans la tige. Il est responsable de la verticilliose reconnaissable par des symptômes de marbrure sur les feuilles (Markell *et al.*, 2015; Shamimuzzaman *et al.*, 2023). *D. helianthi*, agent pathogène du phomopsis impacte les feuilles par lesquelles il pénètre pour ensuite créer des lésions au niveau de la tige. Dans ces circonstances, le capitule du tournesol peut sécher de manière prématurée ou la tige peut directement céder à cause du développement trop important des lésions (Markell *et al.*, 2015; Talukder *et al.*, 2020). *Sclerotinia sclerotiorum* est à l'origine de la pourriture blanche du tournesol. Il peut s'attaquer aux racines, à la tige ou au capitule entraînant de pertes importantes pouvant aller jusqu'à la mort de la plante (Markell *et al.*, 2015). D'autres champignons impactent la culture du tournesol de manière plus localisée ou avec un impact économique moins important en fonction des zones de production. C'est par exemple le cas d'*Alternaria helianthi*, du *Phoma macdonaldii* ou encore du *Rhizopus stolonifer* (Markell *et al.*, 2015; Vear, 2016).

Pour finir, le tournesol est également l'hôte d'une plante parasite, *Orobanche cumana*. Elle se fixe aux racines pour détourner les éléments nécessaires à son développement. L'interaction et l'impact de l'orobanche sur le tournesol sont détaillés dans la partie « II.4. *Orobanche cumana* » de cette introduction.

## **II. Plantes parasites**

### **1. Les différents types de plantes parasites**

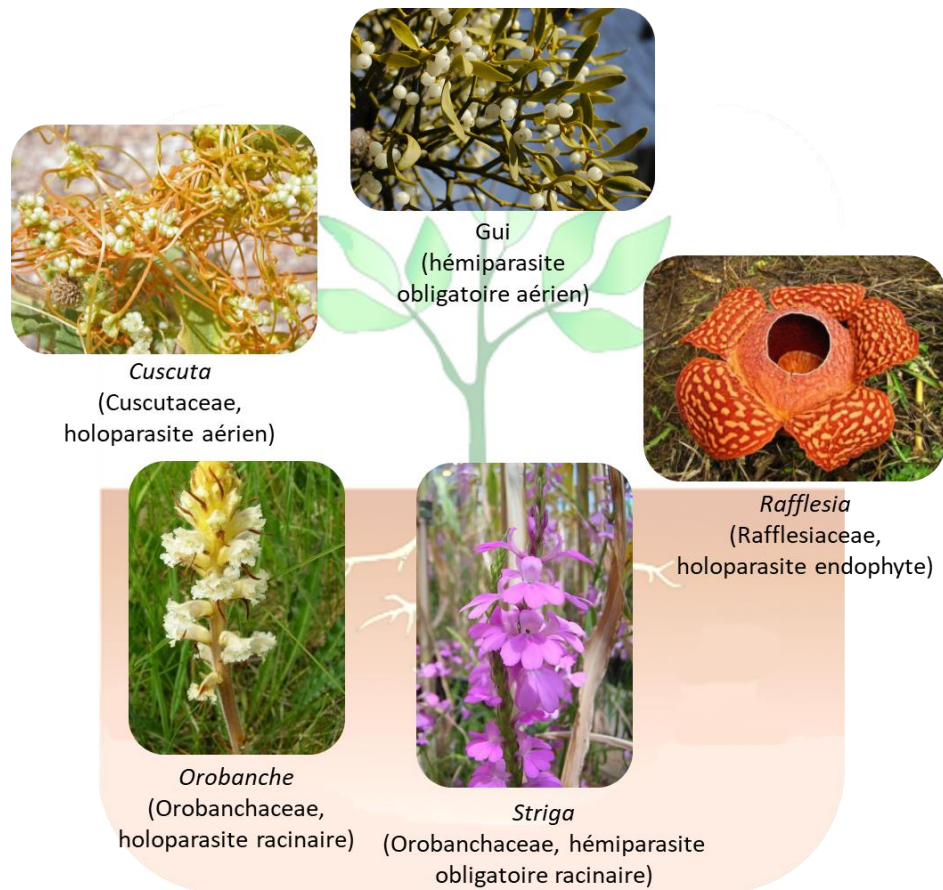
Il existe plus de 4 750 espèces de plantes parasites, qui représentent environ 1,6 % des espèces des plantes à fleurs. Elles occupent une grande diversité de milieu allant du désert à la forêt tropicale en passant par les prairies et forêts tempérées. Ces plantes ont évolué 12 fois indépendamment de leurs ancêtres non-parasites (Nickrent, 2020). Le principal élément d'évolution qui permet à la plante de parasiter son hôte est l'haustorium. Il s'agit d'un organe spécifique qui permet la pénétration, la connexion et le prélèvement des éléments nécessaires à la plante parasite (Westwood *et al.*, 2010). Les plantes parasites sont traditionnellement divisées en deux catégories en fonction de leur capacité à faire de la photosynthèse. Les hémiparasites correspondent aux plantes parasites ayant conservé leur capacité à faire la photosynthèse tandis que les holoparasites l'ont perdu. Ces dernières sont de ce fait dépendantes de leur hôte pour réaliser leur cycle de vie, ce sont des parasites obligatoires. Chez les hémiparasites, deux sous-catégories sont distinguées. Elles sont liées à la réalisation de leur cycle

de vie : (i) les hémiparasites facultatifs qui sont capables de faire l'ensemble de leur cycle de vie sans avoir besoin d'un hôte et (ii) les hémiparasites obligatoires qui ont obligatoirement besoin d'un hôte pour réaliser une partie de leur cycle de vie. Les deux plus grandes familles de plantes parasites sont les Santalacées et les Orobanchacées. Elles contiennent toutes les deux des hémiparasites et des holoparasites avec l'ajout des Balanophoracées dans les Santalacées (Figure 8) (Těšitel, 2016).

Hemiparasite		Holoparasite
Facultative		Obligate
	Orobanchaceae (r; 90/1800)	
		<i>Cuscuta</i> (s; 1/145)
		Lennoaceae (r; 2/5)
		Mitrastemonaceae (r; 1/2)
Santalales (r, s; 149/2101–2114)		Balanophoraceae (r; 17/43–44)
		Rafflesiaceae (e; 3/19)
		Apodanthaceae (e; 3/23)
Krameriaceae (r; 1/18)		Cytinaceae (r; 2/7–11)
		Cynomoriaceae (r; 1/2)
	<i>Cassytha</i> (s; 1/16)	
		Hydnoraceae (r; 2/15–18)

**Figure 8 :** Diversité des familles des plantes parasites en fonction de leurs caractéristiques de parasitisme ; hémiparasite en vert facultative en clair et obligatoire en foncé et holoparasite en marron ; entre parenthèses la localisation du parasitisme (« r » racinaire, « s » aérienne, « e » néophyte) et le nombre de genres puis le nombre estimé d'espèces (Source Westwood et al. 2010 avec modification des Santalacées Těšitel 2016)

Il est également possible de distinguer les plantes parasites en fonction de l'organe où l'haustorium se connecte. On peut distinguer deux catégories : (i) les parasites racinaires qui se connectent aux racines de l'hôte (Figure 9) telles que les strigas ou les orobanches et (ii) les parasites aériens qui se connectent au niveau des tiges ou des branches (Figure 9) telles que les cuscutes. Il existe également des plantes parasites endophytes qui pénètrent par les racines ou les tiges et se développent ensuite à l'intérieur de la plante. L'exemple le plus connu est la rafflèsia (Figure 9). Les différentes familles des plantes parasites sont pour la plupart spécifiques à une de ces catégories hormis pour les Santalacées qui contiennent des plantes parasites racinaires et aériennes (Těšitel, 2016).



**Figure 9** : Exemple de plusieurs plantes parasites suivant leur lieu de connexion et entre parenthèses la famille de la plante et ses catégories

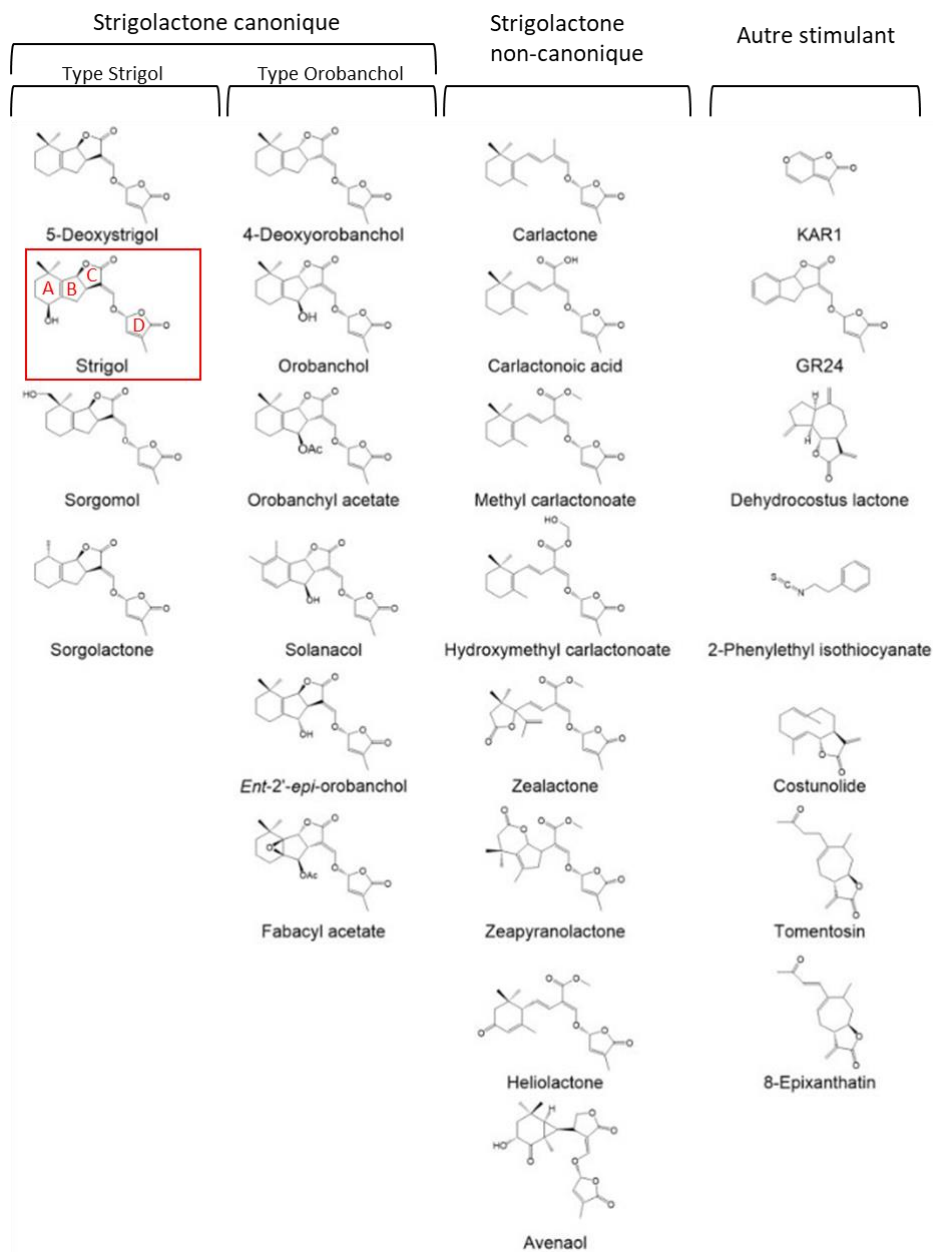
Un autre élément important de l'évolution des plantes parasites est le développement de leur capacité de reconnaissance des hôtes. On définit comme hôte une plante sur laquelle la plante parasite est capable de se développer. Les plantes parasites sont tout d'abord capables de différencier leurs propres organes (racine et tige) de ceux des hôtes possibles. Certaines plantes parasites ont la capacité de parasiter un large spectre d'hôte tandis que d'autres vont être plus spécifiques à un nombre restreint d'hôtes. Que ce soit pour l'haustorium ou pour la germination, les plantes parasites sont capables de percevoir des molécules qui contrôlent leur développement (Westwood *et al.*, 2010).

## 2. Les stades de développement

### a. Germination

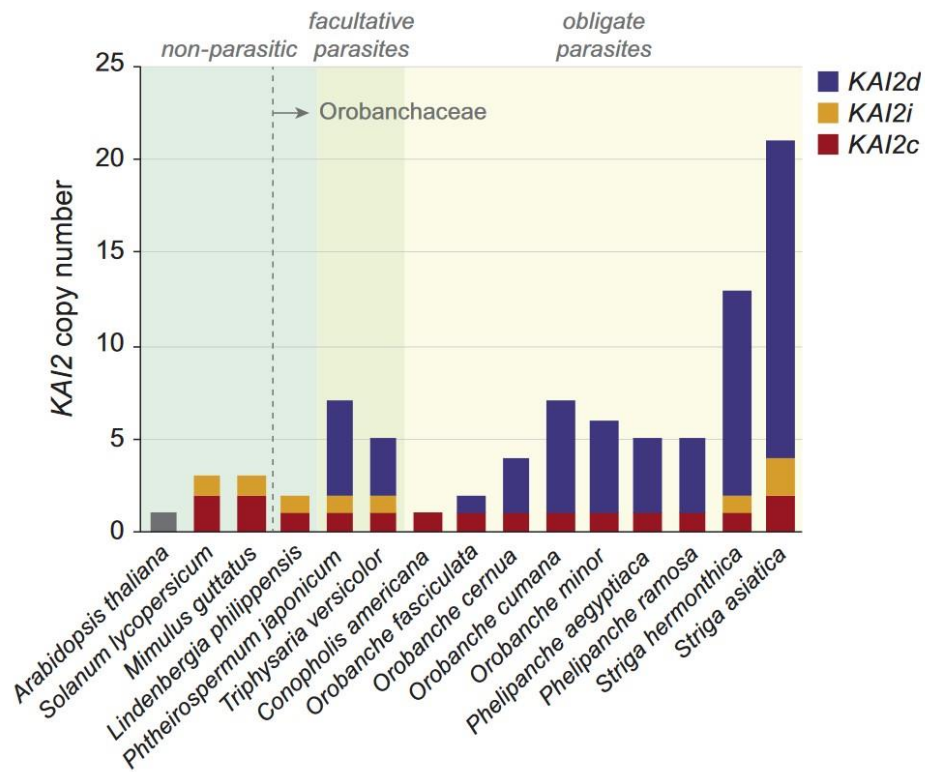
Les plantes parasites obligatoires ont acquis la capacité à détecter la présence de leurs plantes hôtes, pour éviter de débiter leur cycle en l'absence d'un hôte. Pour commencer, les graines des plantes parasites passent par une phase de conditionnement avec l'imbibition et la levée de la dormance. Elles sont ensuite capables de percevoir des molécules exsudées par les racines des plantes hôtes (Brun *et al.*, 2021) stimulant de la germination. La première molécule identifiée comme stimulant de la

germination est le strigol pour une striga par Cook et al. en 1972. Il appartient à la famille des strigolactones, qui comporte deux types de structures moléculaires les canoniques (possédant une lactone tricyclique intacte, cycles A, B et C et un cycle D) et les non-canoniques (ayant en commun avec les canoniques uniquement le cycle D). Le strigol est une strigolactone canonique et il induit la germination de *Striga hermonthica*. Plus de 35 strigolactones sont maintenant connues pour induire la germination, en plus de la structure les strigolactones canoniques sont également classé en deux types, strigol et orobanchol (Figure 10) (Bouwmeester *et al.*, 2021). Ces molécules ont d'autres rôles chez la plante hôte. Elles interviennent pour la mise en place de symbiose avec des champignons mycorhiziens et également comme hormone pour réguler le développement de la plante (croissance axillaire, élongation des racines et tiges, transport de l'auxine,...) (Nelson, 2021). D'autres molécules ont également été identifiées comme stimulant de la germination tel que le 2-phenylethyl isothiocyanate du colza induisant la germination de *Pelipanche ramosa* (Figure 10) (Bouwmeester *et al.*, 2021).



**Figure 10** : Exemple de molécules inductrices de la germination de différents types, le Strigol est encadré en rouge et les différents cycles le composant A, B, C et D sont notés (Source Bouwmeester et al. 2021)

Les exsudats racinaires d'une espèce sont composés d'un mélange de plusieurs molécules. Ce mélange ainsi que les molécules spécifiques sont a priori à l'origine du développement de la spécificité d'hôte de certaines plantes parasites (Bouwmeester *et al.*, 2021). Les strigolactones sont perçus grâce à des gènes de la famille du gène *KAI2*. Une famille multigénique de ce gène se trouve dans les génomes des plantes parasites et plusieurs types de protéines se distinguent les protéines *KAI2c* (conservés), *KAI2i* (intermédiaires) et *KAI2d* (divergents) (Figure 11) (Nelson, 2021).

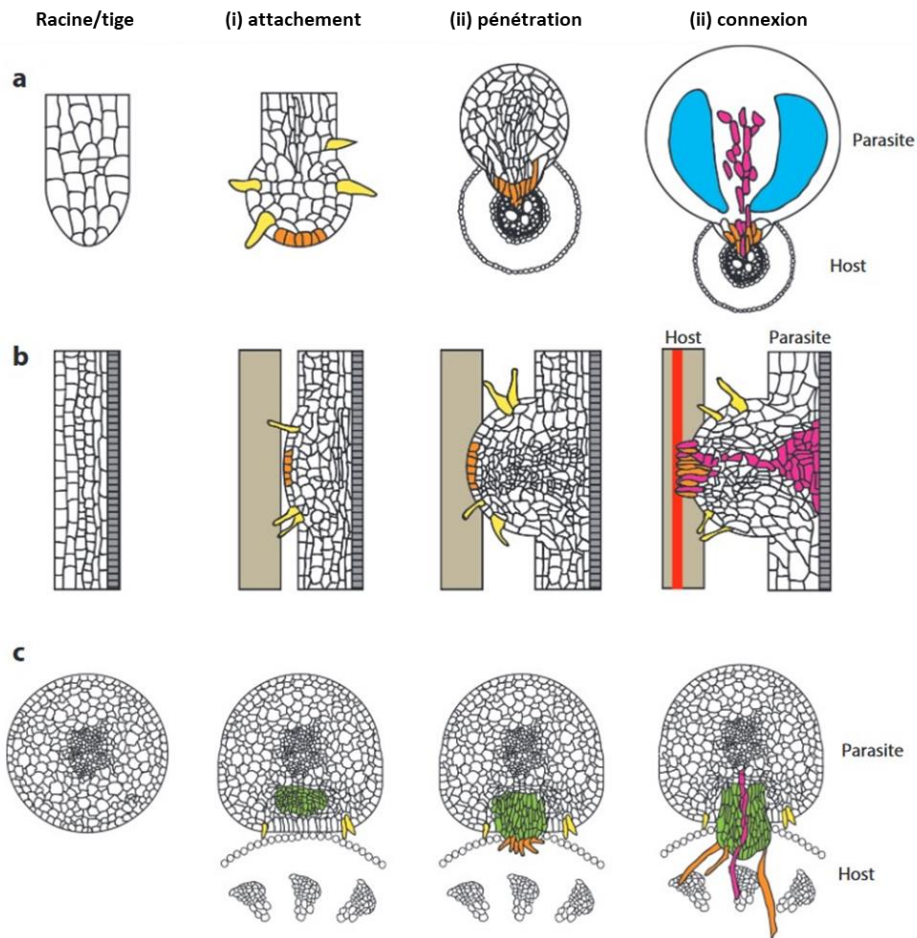


**Figure 11** : Diversité et nombre de copies des gènes Kai2 chez différentes Orobanchaceae en comparaison de plantes non-parasites (Source Nelson 2021)

Les gènes Kai2i sont les plus dupliqués et ont été identifiées comme récepteurs de strigolactones mais également récepteurs d'autres molécules inductrices de la germination. C'est le cas de PrKAI2d chez *Phelipanche ramosa* pouvant interagir avec des strigolactones mais également des isothiocyanates (de Saint Germain *et al.*, 2021; Nelson, 2021). Si la graine ne détecte pas de stimulants de germination, elle ne germe pas et retombe en dormance assurant ainsi sa survie (Bouwmeester *et al.*, 2021). Dans le cas où, la graine germe une fois en contact avec la plante hôte elle va pouvoir développer un haustorium pour se connecter au système vasculaire de l'hôte.

### b. Haustorium

Deux types d'haustoriums existent chez les plantes parasites, les latéraux et les terminaux. Dans la première catégorie, l'haustorium se développe sur le côté des tiges ou des racines. Ils sont formés par les plantes parasites facultatives et quelques plantes parasites obligatoires. Tandis que la deuxième catégorie est présente uniquement chez les plantes parasites obligatoires. Dans celle-ci, l'haustorium se forme à l'extrémité de la radicule. La formation de l'haustorium est divisée en 3 étapes (Figure 12) : (i) l'attachement, (ii) la pénétration de l'hôte et (iii) et la connexion au système vasculaire (Yoshida *et al.*, 2016; Brun *et al.*, 2021).



**Figure 12** : Illustration du développement de l'haustorium chez *Striga sp.* (a), *Phtheirospermum japonicum* (b) et *Cuscuta sp.* (c). En jaune : poils haustoriaux ; orange : cellule intrusive (a et b) et hyphes de recherche (c) ; vert : primordia endophyte ; rose : cellule de connexion au système vasculaire (Source Yoshida et al. 2016)

Le développement de l'haustorium est induit par des éléments physiques et/ou chimiques. Chez la cuscute, le contact et la lumière induisent l'initiation de l'haustorium. Pour d'autres plantes parasites, ce sont des composés phénoliques, des flavonoïdes ou encore des cytokinines. Ces composés chimiques sont identifiés comme des facteurs d'induction de l'haustorium ou Haustorium Induction Factors (Yoshida *et al.*, 2016; Brun *et al.*, 2021). Suite à l'initiation, les éléments permettant à la plante parasite de s'attacher se mettent en place (Figure 12 i). Ils peuvent prendre la forme de crampons, de papilles, de trichomes ou de poils haustoriaux. La sécrétion de mucilage ou de composé adhésif vient renforcer l'attachement de la plante parasite à son hôte (Yoshida *et al.*, 2016; Brun *et al.*, 2021).

La phase de pénétration commence ensuite avec des types de cellules spécifiques (Figure 12 ii). Pour les Orobanchaceae, ces cellules sont appelées « cellules intrusives ». Elles vont croître rapidement et vont pouvoir pénétrer les différentes couches cellulaires de l'hôte. L'invasion s'effectue grâce à la force mécanique et à des enzymes permettant la modification des parois cellulaires de l'hôte. Pour les cuscutes, elles forment un primordia endophyte dont les cellules à l'extrémité s'allongent pour arriver

aux systèmes vasculaires en formant des « hyphes de recherche » (Yoshida *et al.*, 2016; Furuta *et al.*, 2021).

Une fois en contact avec le système vasculaire, ces cellules vont se différencier pour prendre la forme de vaisseaux et de trachéides (Figure 12 iii). De cette manière les cellules de l'haustorium relie le xylème de l'hôte au parasite en créant un « pont de xylème ». Pour certaines plantes parasites, un lien avec le phloème de l'hôte est également créé. Après connexion la plante parasite va pouvoir détourner les éléments qui lui sont nécessaire pour son développement en se comportant comme un nouvel organe puit de l'hôte (Yoshida *et al.*, 2016; Furuta *et al.*, 2021).

### **3. Les plantes parasites ayant un impact agronomique**

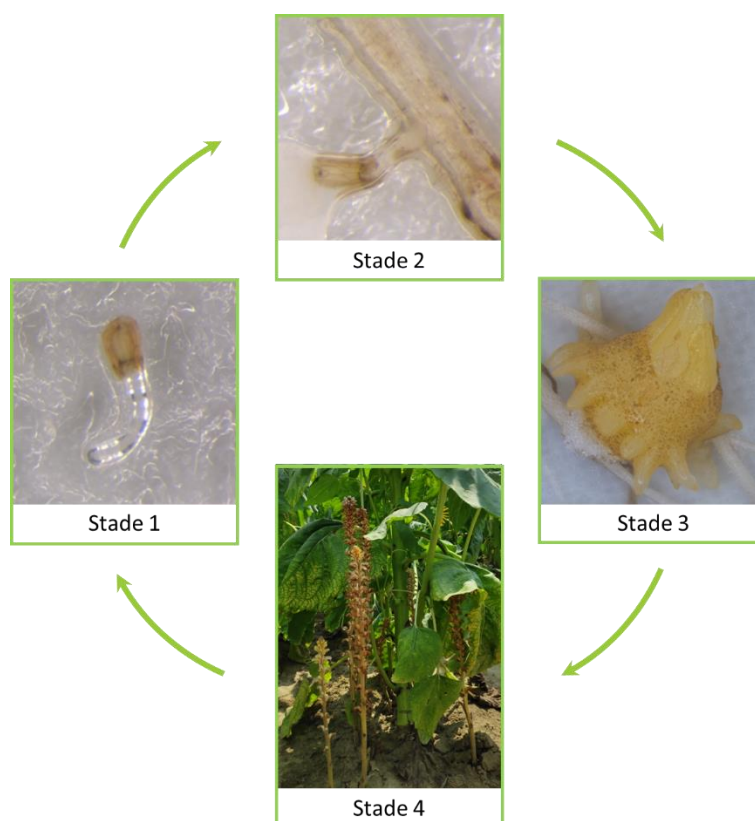
Le détournement des ressources par les plantes parasites a un impact sur le développement de l'hôte. Dans le cas des plantes ayant un intérêt agronomique, l'infection peut entraîner une réduction très importante du rendement. C'est notamment le cas de plusieurs cuscutes, des *Striga* et des orobanches (Parker, 2012). Les espèces du genre *Cuscuta* sont présentes partout dans le monde. Ce sont des holoparasites aériens qui infestent un très large spectre d'hôte, des plantes herbacées aux arbres fruitiers. Par exemple, *C. campestris* peut s'attaquer à la luzerne, mais également à la betterave sucrière ou aux orangers (Parker, 2012; Roozkhosh *et al.*, 2022). Elles peuvent développer de nombreux haustoriums latéraux sur une même plante. En fonction de la sensibilité de l'hôte, la croissance et le rendement peuvent être fortement impactés (Kaiser *et al.*, 2015; Hartenstein, Albert and Krause, 2023). Trois espèces de *Striga* ont un impact important pour l'agriculture, *Striga hermonthica*, *Striga asiatica* et *Striga gesnerioides*. Ce sont des hémiparasites obligatoires racinaires, mais dont la capacité de photosynthèse n'est pas efficace. Elles sont notamment présentes en Afrique et en Asie. Plusieurs céréales importantes sont des plantes hôtes pour les deux premières espèces, le maïs, le riz, la canne à sucre et le sorgho. *S. gesnerioides* a un panel d'hôte plus restreint et n'attaque pas les graminées. Sa principale culture hôte est le niébé (Parker, 2012; Jamil, Kountche and Al-Babili, 2021). Les orobanches regroupent les espèces de deux genres *Orobanche* et *Phelipanche*. Elles appartiennent à la catégorie des holoparasites racinaires. Les principales espèces sont *O. crenata*, *O. cumana*, *O. cernua*, *P. ramosa* et *P. aegyptiaca*. Elles se retrouvent principalement autour du bassin Méditerranéen mais leur répartition s'étend en Europe, Asie et Afrique. Une même culture peut être infectée par plusieurs espèces telles que les tomates ou le tabac par *O. cernua*, *P. ramosa* et *P. aegyptiaca*. Elles ont soit des spectres d'hôtes larges comme *O. crenata* avec plusieurs légumineuses (fèves, pois, pois chiches, lentilles) soit très étroit comme *O. cumana* sur le tournesol (Parker, 2012; Das *et al.*, 2020). Cette dernière est présentée en détail dans la partie suivante.

### **4. *Orobanche cumana***



### a. Cycle de vie

Le cycle de vie d'*O.cumana* se déroule pour la majeure partie dans le sol. C'est seulement lors de l'émergence de la hampe florale qu'elle est visible au pied des cultures. Les graines peuvent survivre dans le sol pendant 15-20 ans en attendant la présence d'un hôte potentiel (Fernández-Martínez, Pérez-Vich and Velasco, 2015). Le cycle biologique de l'orobanche peut être divisé en quatre stades comme suit (Figure 13) :



**Figure 13** : Illustration des quatre stades de développement du cycle de vie de l'orobanche du tournesol

- **Stade 1, germination** : *O.cumana* fait partie des plantes parasites qui détectent une molécule stimulatrice de leur hôte pour pouvoir germer. La levée de la dormance répond à des conditions favorables de température et d'humidité sur plusieurs jours, spécifiques à l'espèce (Delavault, 2015). Elle leur permet ensuite d'être en condition de détecter les molécules exsudées par les racines du tournesol. Dans le cas de l'orobanche du tournesol, plusieurs molécules inductrices de la germination ont été identifiées : des sesquiterpènes lactones (dehydrocostus lactone, costunolide, tomentosin et 8-epixanthatin) et une strigolactone non-canonique, l'heliolactone (Joel *et al.*, 2011; Raupp and Spring, 2013; Ueno *et al.*, 2014). Après détection, la graine va développer une radicule également appelée tube germinatif de quelques millimètres. La direction de croissance du tube vers l'hôte est supposée être due à du chimiotropisme (Delavault, 2015). Une fois en contact avec la racine, l'orobanche passe au stade 2.

- **Stade 2, attachement et connexion** : *O. cumana* met en place uniquement un haustorium terminal. Les facteurs d'induction de l'haustorium pour cette orobanche ont été peu étudiés, mais Fernández-Aparicio et al. (2021) ont démontré l'effet de deux benzoquinones. Après la détection des facteurs, l'extrémité de la racine se différencie en papille pour adhérer à l'hôte. Les cellules du méristème deviennent le pré-haustorium avec les cellules intrusives. Elles pénètrent les différentes couches cellulaires de la racine pour arriver au système vasculaire du tournesol. L'orobanche établit ensuite une connexion au xylème et au phloème du tournesol via l'haustorium (Delavault, 2015).

- **Stade 3, développement du tubercule** : une fois la connexion établie et efficiente, l'orobanche forme un organe de réserve appelé tubercule. Le développement de petites racines adventives peut être observé à la base du tubercule. Ces racines ne sont pas fonctionnelles mais permettent d'augmenter l'effet « organe puit » de l'orobanche et ainsi prélever les ressources nécessaires pour son développement. A partir de ce tubercule, une tige souterraine va se développer. (Delavault, 2015; Molinero-Ruiz et al., 2015).

- **Stade 4, émergence et floraison** : l'émergence de cette tige hors du sol est le début du dernier stade de développement. *O. cumana* est considérée comme partiellement allogame par rapport à son taux d'autofécondation. L'orobanche du tournesol produit une seule hampe florale portant plusieurs fleurs de formes tubulaires. Chaque fleur est capable de produire des milliers de graines de très petite taille (200-300 µm). Après maturation, ces graines sont dispersées par divers moyens tels que le vent, l'eau, les animaux/humain ou les machines (Rodríguez-Ojeda et al., 2013; Fernández-Martínez, Pérez-Vich and Velasco, 2015).

#### **b. Répartition et classement par race**

*Orobanche cumana* est originaire de l'est de la Méditerranée et de l'est de l'Europe. Elle parasite des Astéracées sauvages, principalement *Artemisia maritima* (Parker, 2012; Fernández-Martínez, Pérez-Vich and Velasco, 2015). La première observation d'orobanche sur le tournesol date de 1866 en Russie avec le développement de la culture dans ce pays. Au fur et à mesure de l'expansion de la culture, la plante parasite s'est répandue dans d'autres pays depuis le milieu du 20<sup>ème</sup> siècle jusqu'au début du 21<sup>ème</sup> siècle. Aujourd'hui, elle est présente dans les pays producteurs du sud et de l'est de l'Europe, au nord de l'Afrique et en Asie (Parker, 2012; Fernández-Martínez, Pérez-Vich and Velasco, 2015; Molinero-Ruiz et al., 2015).

Suite à la découverte de l'orobanche sur le tournesol, les premières variétés de tournesol résistantes ont été commercialisées en 1920 grâce au programme de sélection russe. Elles présentaient des résistances pour les premières races d'orobanche de virulence A et B, présentes dans différentes régions de Russie (Molinero-Ruiz et al., 2015). Au cours des années d'autres races sont apparus dans

les différents pays producteurs. Pour pouvoir différencier les races (A à E) en Roumanie, Vranceanu et al. (1980) a sélectionné un set de tournesols différentiels, chacun portant un gène majeur de résistance permettant de contrôler une race ainsi que les races de virulences inférieures à celle-ci. L'évolution de la culture avec l'intensification, la réduction des rotations de cultures et l'utilisation de géotypes résistants spécifiques à une race a créé une pression de sélection sur l'orobanche induisant une rapide évolution (Molinero-Ruiz *et al.*, 2015; Clapco, 2021). Aujourd'hui, la race la plus virulente est notée de niveau H. Les orobanches, les plus virulentes qui ont contournés les gènes de résistance et agressives qui peuvent se développer en grand nombre sur une seule plante hôte, se situent principalement autour de la mer noire en Turquie, Ukraine, Roumanie et Moldavie (Clapco, 2021).

Le système de notation des races a cependant des limites. La correspondance des races entre les différents pays n'est pas claire. L'utilisation de sets d'hôtes différentiels différents, le mélange de plusieurs races sur un champ, l'évolution in situ de l'orobanche et l'identification de différents pools génétiques amènent à penser que les races d'un pays peuvent ne pas être équivalentes aux races considérées de même niveau de virulence d'un autre pays (Molinero-Ruiz *et al.*, 2015; Clapco, 2021). Par exemple, Martín-Sanz et al. (2016) a comparé la virulence de quatre populations d'une race G d'Espagne (attaquant les hybrides résistants à la race F espagnole) à plusieurs races G de différents pays de l'est de l'Europe (Roumanie, Grèce, Turquie, Bulgarie, Russie et Ukraine). Les résultats obtenus à partir de la lignée de tournesol P96 (résistant à la race F espagnole et sensible aux races G d'autres pays) les ont amenés à conclure que la race G espagnole est clairement différente des autres races G puisque la lignée P96 est résistante à celle-ci. Pour faciliter et clarifier le travail sur les races d'orobanche, il est nécessaire d'homogénéiser la nomenclature. Pour ce faire, Molinero-Ruiz et al. (2015) propose d'utiliser le même système de notation que celui utilisé pour un autre pathogène du tournesol, *Plasmopara halstedii* (oomycète obligatoire responsable du mildiou du tournesol), consistant à classer les races suivant un code à trois chiffres représentant leur réponse à trois sets différentiels (Figure 14).

Line of sunflower	Proposed codes for <i>O. cumana</i> races							
	100	300	700	710	730	770	771	773
AD66	S <sup>a</sup>	S	S	S	S	S	S	S
K A-41	R	S	S	S	S	S	S	S
J8281	R	R	S	S	S	S	S	S
Record	R	R	R	S	S	S	S	S
S1358	R	R	R	R	S	S	S	S
P1380	R	R	R	R	R	S	S	S
LC1093	R	R	R	R	R	R	S	S
P96	R	R	R	R	R	R	R	S
Historical race	A	B	C	D	E	F	F or G?	F or G?

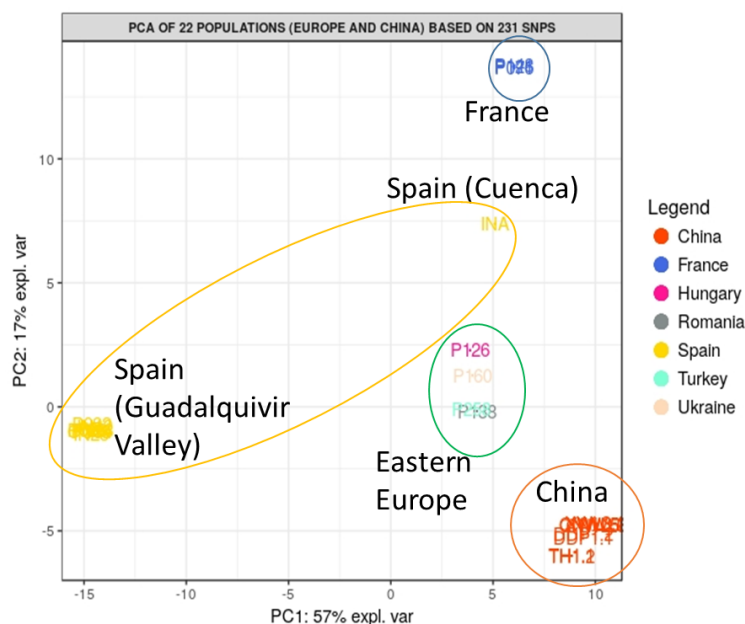
<sup>a</sup> S: susceptible, R: resistant.

**Figure 14** : Exemple d'application du système de code à triplet à partir de trois sets différentiels de tournesol (AD66/KA-41/J8281, Record/S1358/P1380 et LC1093/P96) et de la correspondance au système de race actuel (Source Molinero-Ruiz et al. 2015)

Chaque set différentiel contient trois génotypes de tournesol qui en fonction de la capacité de l'orobanche à les parasiter donne une valeur de 1, 2 ou 4, dont la somme donne la valeur du chiffre correspondant au set dans le code. Par exemple, si l'orobanche parasite le premier génotype (+1), le deuxième génotype (+2) est le troisième génotype (+4) d'un set, elle obtient la valeur de 7 pour le premier chiffre. Ensuite, elle parasite uniquement le premier génotype du second set, elle obtient la valeur de 1 pour le deuxième chiffre et ensuite de 0 pour le dernier ne parasitant aucun des trois génotypes. Sa nomenclature finale est donc 710. D'autres sets pourront ensuite venir compléter les premiers en fonction de l'évolution d'*Orobanche cumana* dans les différents pays. La caractérisation des races d'orobanche passe également par leur caractérisation d'un point de vue génétique et génomique.

### c. Diversité génétique des populations d'orobanche

Différents pools génétiques ont été identifiés entre les pays principalement, mais aussi pour certains dans un même pays. C'est le cas des populations espagnoles qui présentent deux pools génétiques distincts entre le centre (région de Cuenca) et le sud (vallée de Guadalquivir) (Pineda-Martos *et al.*, 2013). Ces deux pools sont également différents des populations des pays de l'Est tels que la Turquie ou la Hongrie (Molinero-Ruiz *et al.*, 2014). Aujourd'hui, cinq pools génétiques sont identifiés en lien avec la répartition géographique de l'orobanche : deux pools génétiques espagnols, un pool de l'est de l'Europe, un pool chinois et un pool français (Figure 15).



**Figure 15** : Analyse de la diversité génétique de différentes populations d'orobanche de différents pays mettant en évidence cinq pools génétiques

Au niveau génomique, *Orobanche cumana* est une espèce diploïde avec  $2n=38$  chromosomes pour une taille estimée de 1,42 Gb (Piednoël *et al.*, 2012). Un premier assemblage du génome a été obtenu par Gouzy *et al.* (2017) à partir d'*O. cumana* IN23 (Espagne, race F). L'annotation du génome a permis d'identifier 52 435 gènes codant pour des protéines. L'annotation fonctionnelle des protéines a permis de construire le réseau métabolique comprenant 447 voies métaboliques composées de 3 458 réactions. Comparées au réseau du tournesol, 399 voies métaboliques sont communes aux deux plantes, 48 voies spécifiques à l'orobanche et 76 voies manquantes comme la biosynthèse des chlorophylles ou la biosynthèse des caroténoïdes, la biosynthèse des huiles de tournesol. D'autres génomes d'orobanche du tournesol ont depuis été obtenus, notamment celui de la race référence française collectée à Bourret dans le Tarn et Garonne. En plus de données génomiques, une carte génétique est également disponible à partir de marqueurs SSR et SNP. Le nombre de groupes de liaison obtenus correspond au nombre de paires de chromosome précédemment identifiées soit 19 pour une longueur totale de 1 795,7 cM (Calderón-González *et al.*, 2019). Toutes ces ressources sont utiles pour mieux caractériser le fonctionnement d'*Orobanche cumana* et son interaction avec le tournesol. Elles sont l'un des leviers pour mettre en place des méthodes de défense et de contrôle efficaces et durables pour la culture.

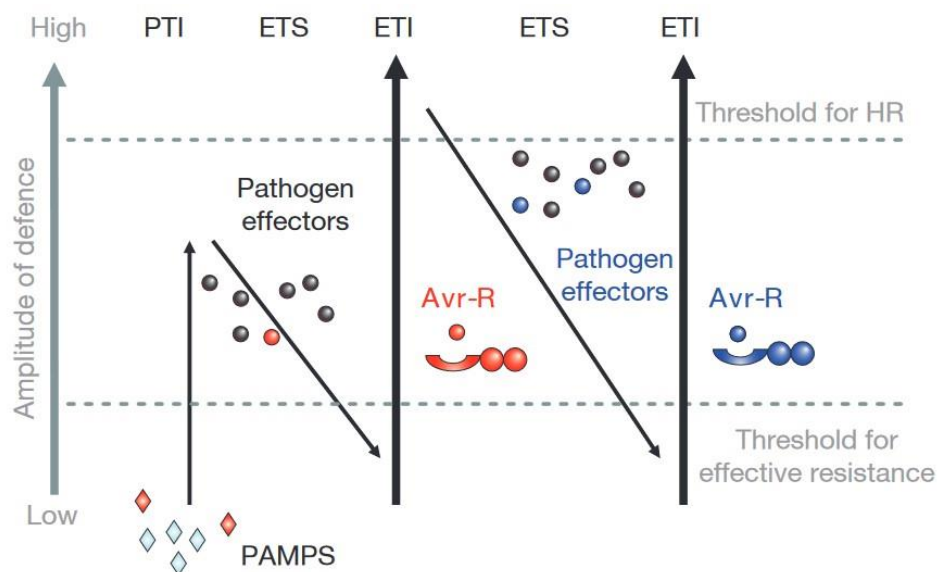
### III. Interactions et défenses de la plante-hôte face aux plantes-parasites

#### 1. Rappel/Principe de résistance des plantes

Face aux agents pathogènes, les plantes possèdent un système de défense constitué de 3 principales étapes : (i) la perception du pathogène par différents types de récepteurs qui vont induire une cascade de réponses pour mettre en place le système en commençant par (ii) la transduction du signal qui va activer (iii) la réponse défensive de la plante.

### a. Perception/Reconnaissance des pathogènes

La plante a la capacité de détecter différents éléments pouvant indiquer la présence d'un pathogène. Tout d'abord, les motifs moléculaires associés à des pathogènes PAMPs « Pathogen-associated molecular patterns » sont détectés par des récepteurs de reconnaissance de formes, les PRRs « Pattern recognition receptors ». Les PAMPs sont des structures typiques du pathogène telles que des protéines (la flagelline de bactéries), des carbohydrates (la chitin de champignons), des acides nucléiques (ARN double brin de virus) ou encore des peptides (par exemple, le Pep13 d'oomycètes) (Albert, 2013; Andersen *et al.*, 2018). Les PRRs sont des protéines très diverses situées au niveau de la membrane des cellules possédant un domaine LRRs « Leucine-rich repeats » et un domaine kinase (Andersen *et al.*, 2018). La reconnaissance des pathogènes par ces récepteurs est la première phase du modèle zig-zag de Jones and Dangl (2006) schématisant l'interaction pathogène biotrophe-système immunitaire de la plante dans le cas d'une réponse d'hypersensibilité (Figure 16).



**Figure 16** : Modèle zig-zag illustrant les mécanismes de fonctionnement du système immunitaire des plantes (PTI et ETI) (Source Jones and Dangl 2006)

La détection de PAMPs entraîne la première réponse immunitaire de la plante, PTI « pattern-triggered immunity ». Pour contourner cette réponse, les pathogènes utilisent des molécules spécifiques appelées effecteurs qui ont la capacité d'interférer avec le système de défense. Ceci correspond à la phase 2 du modèle zig-zag. Ces effecteurs, des protéines ou dérivés, sont l'un des éléments de

l'interaction « gène pour gène » qui associe un gène d'avirulence (Avr) à l'origine de l'effecteur et un gène de résistance (R) (Rouxel and Balesdent, 2010). En plus de cette interaction directe, certaines protéines R peuvent reconnaître l'impact de l'effecteur sur la cible du système immunitaire de la plante au lieu de l'effecteur lui-même. La majorité des protéines NLR ou NB-LRR « nucleotide binding - leucine rich repeat » que ces gènes codent, possède un domaine leucine-rich repeat et un site de liaison de nucléotide qui peut être ensuite de deux types avec un domaine coiled-coil (CC) ou un domaine Toll-interleukin 1 (IL-1) receptor (TIR) (Jones and Dangl, 2006; Maekawa, Kufer and Schulze-Lefert, 2011; Corrion and Day, 2015). La détection des effecteurs entraîne une deuxième réponse de défense, l'ETI « effector triggered immunity ». Il existe un troisième type de reconnaissance non-présent dans le modèle zig-zag, la détection des dommages causés par les pathogènes durant l'infection. Il repose sur le même principe que PAMPs/PRRs à la différence que le motif identifié correspond à un motif de dommage tel que des composants cellulaires abimés par l'action d'enzymes du pathogène. Ces éléments sont nommés motif moléculaire associé aux dommages DAMPs « damage-associated molecular patterns » et sont détectés par les récepteurs WAKs « wall-associated kinase » (Andersen *et al.*, 2018). Comme les autres types de récepteurs, leur action de détection va permettre de lancer un signal d'alerte pour mettre en place les défenses de la plante.

#### **b. Transduction du signal**

Ces récepteurs vont initier une voie de signalisation ou directement agir comme des facteurs de transcription. Une grande variété de voie de signalisation existe. Elles gèrent les différents types de défenses en agissant directement sur les gènes de défense ou en agissant sur un autre élément de signalisation (Andersen *et al.*, 2018). Les mécanismes de signalisation connus sont par exemple les cascades mitogen-activated protein kinase (MAPK). Elles peuvent être initiées par les trois types de récepteurs et peuvent agir sur les gènes de défense ou sur d'autres éléments de signalisation tels que les hormones. Les protéines-G, l'ubiquitine et les fluctuations du calcium sont également des mécanismes de signalisation pour la mise en place des défenses (Pitzschke, Schikora and Hirt, 2009; Andersen *et al.*, 2018). Plusieurs hormones ont également un rôle dans la transmission du signal et dans la régulation des défenses. C'est le cas notamment de l'acide salicylique (SA), des jasmonates (JA) et de l'éthylène (ET) qui sont les hormones dont les mécanismes ont été les plus étudiés. Les différentes voies de signalisation liées aux hormones dépendent du type de pathogène détecté et elles peuvent interagir entre elles de manière antagoniste ou synergique. Par exemple, les défenses activées par le réseau lié à SA correspondent à des défenses contre des pathogènes biotrophes ou hemi-biotrophes alors que JA et ET mettent en place des défenses adaptées aux nécrotrophes ou aux insectes. D'autres hormones servent également à la transmission du signal telles que l'acide abscissique (ABA), l'auxine, l'acide gibbérellique, les cytokinines ou les brassinostéroïdes (Bari and

Jones 2009). Un troisième type d'élément intervient dans l'activation et la régulation des gènes de défense, les facteurs de transcription (TFs). Les TFs sont des protéines de liaison à l'ADN. Plusieurs familles impliquées dans les systèmes de défense existent : WRKY, AP2/ERF, TGA/bZIP, MYB, MYC/bHLH et NAC. Ces protéines peuvent réguler directement des gènes de défense, mais aussi réguler les voies de signalisation hormonales ou interagir entre elles en régulant d'autres TFs (Jalali, Bhargava and Kamble, 2006; Andersen *et al.*, 2018). Lorsque la transduction du signal est effective, elle aboutit à la mise en place de la réponse défensive de la plante face aux pathogènes détectés.

### **c. Réponse défensive**

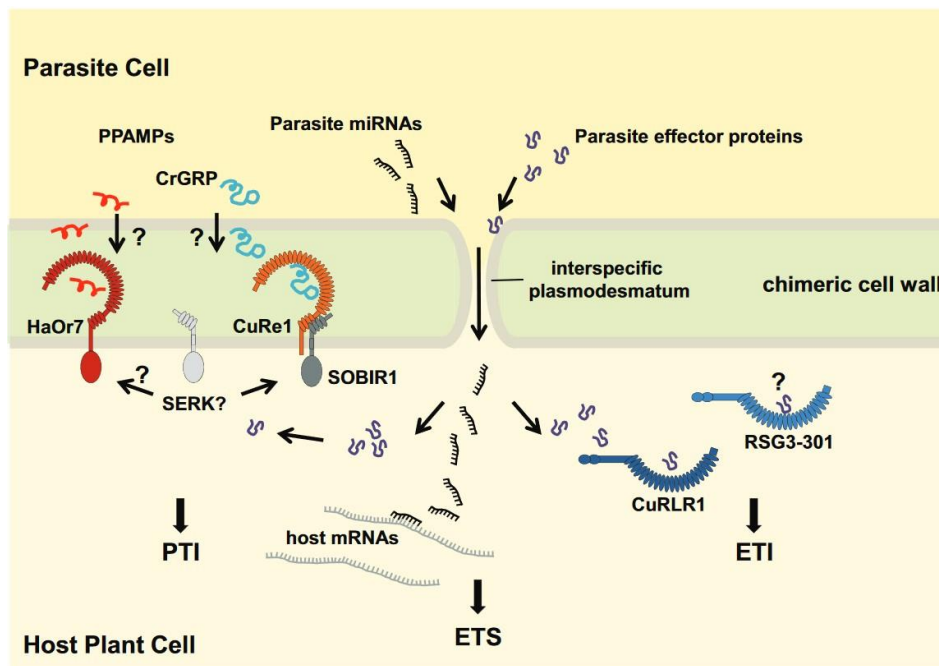
En fonction du signal, plusieurs types de réponses peuvent être mis en place. Elles peuvent être de nature à bloquer le pathogène ou à l'impacter directement. Par exemple, la modification des parois des cellules de la plante fait partie de cette première catégorie, telle que le renforcement dû à l'accumulation de callose en réponse à la détection de PAMPs ou DAMPS. D'autres éléments peuvent servir au renforcement des parois comme par exemple la lignine qui limite également la diffusion des toxines du pathogène (Bellincampi, Cervone and Lionetti, 2014; Malinovsky, Fangel and Willats, 2014). Pour bloquer le développement des biotrophes, la plante peut aussi mettre en place une réponse d'hypersensibilité suite à la détection des effecteurs. Cette réponse correspond à la mort rapide des cellules en contact avec le pathogène au niveau de la zone d'intrusion (Noman *et al.*, 2020). En-dehors de ces barrières, les plantes peuvent produire différents éléments de défense tels que des enzymes, des protéines de défense spécialisées ou des métabolites secondaires. Les enzymes servent à la fois comme défenses en dégradant les composants du pathogènes et comme activateur des défenses en produisant des éléments servant de PAMPs (Andersen *et al.*, 2018). Les défensines et thaumatin-like protéines possèdent des propriétés anti-fongiques. Elles peuvent induire une modification des membranes des cellules du pathogène en augmentant leur perméabilité, entraînant l'arrêt de leur développement ou leur mort (Stotz, Thomson and Wang, 2009; Andersen *et al.*, 2018). Pour finir, les phytoalexines sont des métabolites secondaires produits uniquement lors de la détection d'un stress principalement biotique. Une grande diversité de composés existe et ils peuvent impacter les pathogènes au niveau de leur métabolisme, leur développement ou leur reproduction. En fonction des plantes, différentes phytoalexines sont majoritaires, par exemple les camaléxines pour *Arabidopsis*, les alkalaloïdes chez les Brassicacées, les médicarpines chez certaines Fabacées ou encore les capsidiols pour certaines Solanacées (Ahuja, Kissen and Bones, 2012; Andersen *et al.*, 2018). En conclusion, la plante dispose d'un large panel de réponses de défense lui permettant de se préserver des pathogènes. C'est également le cas dans l'interaction avec les plantes parasites.

## **2. Les interactions et les défenses de la plante face aux plantes parasites**



Le système de défense des plantes face aux plantes parasites est similaire à celui mis en place dans l'interaction plante-pathogène, même si elle n'entraîne pas de maladie de la plante. Cependant, deux types de résistances sont définis en fonction du stade d'interaction avec la plante parasite. Tout d'abord, la résistance pré-attachement correspond à tous les mécanismes protégeant la plante avant le contact entre l'haustorium et les tissus de l'hôte. Ensuite, la résistance post-attachement regroupe tous les mécanismes interférant avec le développement de la plante parasite dans la plante hôte (intrusion dans les différentes couches cellulaires, connexion au système vasculaire et développement du parasite) (Clarke *et al.*, 2019). Les résistances dans cette deuxième catégorie peuvent aussi être définies en primaire/pré-haustorium, si elles interviennent avant la connexion au système vasculaire, ou secondaire/post-haustorium, si elles interviennent après la connexion aux vaisseaux de la plante hôte (Pérez-De-Luque *et al.*, 2009).

Les résistances pré-attachement interfèrent avec la germination ou l'initiation de l'haustorium. Les mécanismes liés peuvent prendre la forme d'une diminution de la quantité de stimulant de germination exsudée par les racines de l'hôte, une modification du mélange de molécules exsudées ou la production de composés toxiques (Jhu and Sinha, 2022). Dans les mécanismes de résistance post-attachement, des gènes de résistance ont été identifiés comme récepteur dans différents couples parasite-hôte (Figure 17). Les deux types de récepteurs présents dans le modèle zig-zag ont été identifiés dans des interactions parasite-hôte ce qui suggère l'existence de PAMPs, DAMPS ou d'effecteurs des plantes parasites (Albert, Axtell and Timko, 2021). L'un des premiers gènes identifiés fut *RSG3-301* chez le niébé qui code pour une protéine CC-NBS-LRR et permet la résistance à *Striga genseioides* (Li and Timko, 2009). Chez la tomate, les deux types de récepteurs ont été identifiés *CuRe1* (LRR-RLP) et *CuRLR1* (CC-NBS-LRR), impliqués dans la résistance à *Cuscuta reflexa* et *Cuscuta campestris* respectivement (Hegenauer *et al.*, 2016; Jhu *et al.*, 2022). De plus pour le premier, Hegenauer *et al.* (2020) ont identifié le peptide Crip21 comme étant le motif moléculaire de la cuscute détecté par *CuRe1*. Un autre récepteur présenté sur la figure 17, *HaOr7* intervient entre le tournesol et *O. cumana*. Il est présenté en détail dans la partie dédiée aux résistances génétiques chez le tournesol.



**Figure 17** : Représentation des interactions de défenses des plantes hôtes au niveau cellulaire avec les gènes de résistances connus : *HaOr7* (tournesol/orobanche), *CuRe1* (tomate/cuscute), *CuRLR1* (tomate/cuscute) et *RSG3-301* (niébé/striga)

Au niveau de la signalisation, plusieurs hormones ont également été identifiées dans les mécanismes de défense contre les plantes parasites. L'activation des voies de signalisation de JA, SA, ABA et de l'ET a été mise en évidence dans plusieurs interactions avec les plantes parasites (Albert, Axtell and Timko, 2021; Jhu and Sinha, 2022). Les défenses mises en place ensuite peuvent être une réponse hypersensible permettant de bloquer l'avancée de la plante parasite dans les cellules et de l'empêcher d'atteindre le système vasculaire. La résistance liée au gène *RSG3-301* est de ce type (Li and Timko, 2009). Pour bloquer l'intrusion et la connexion, la modification des parois des cellules est également un système de défense important dans ce type d'interaction. Le gène *CuRLR1* suite à la détection de la cuscute va induire une accumulation de lignine dans les cellules du cortex situées au niveau de l'attachement (Jhu *et al.*, 2022). Pour finir, l'usage de métabolites secondaires a également été observé avec la sécrétion et l'accumulation de composés phénoliques empêchant la germination ou le développement de l'haustorium par exemple (Jhu and Sinha, 2022).

### 3. Les méthodes de luttes face aux plantes parasites

Dans le cadre de la protection des cultures, les défenses naturelles de la plante peuvent être utilisées directement en tant que méthode de lutte ou inspirer des méthodes de lutte. Dans le cadre de l'interaction avec les plantes parasites, il est possible de mettre en place des moyens de contrôle physique/culturelle, chimique ou génétique.

#### a. Méthodes de lutte physiques/culturelles

Au niveau des pratiques agricoles, les actions servent principalement à limiter la dispersion des plantes parasites et à diminuer la quantité de graines viables dans le sol. Le nettoyage des machines, du matériel et des récoltes permet de limiter le transport des graines entre les champs. Dans les cas où cela est possible, le contrôle des parcelles et l'élimination des plantes parasites avant la montée à graine permet de limiter son installation (Dechassa and Regassa, 2021; Negewo *et al.*, 2022). En termes de préparation du sol, l'amélioration de la fertilité du sol ou son maintien permet de réduire l'attaque de certaines Orobanchacées tout en étant bénéfique pour la culture (Jamil, Kountche and Al-Babili, 2021; Negewo *et al.*, 2022). Il est également possible d'agir sur la banque de graines présentes dans le sol avec la solarisation. Cette technique consiste à augmenter la température du sol pendant une certaine durée de manière à tuer les graines des adventices présentes. Elle est efficace sur les graines d'orobanches après imbibition de la graine avec une température de plus de 40 °C sur plusieurs semaines (Mauro *et al.*, 2015; Das *et al.*, 2020). Cependant, la solarisation impacte également le microbiome du sol, or, il a été démontré que certains champignons et bactéries peuvent aider au contrôle des plantes parasites. Ils interviennent en tant qu'agents pathogènes comme le champignon *Fusarium* ou produisent des éléments interférant avec le développement des plantes parasites (Masteling *et al.*, 2019; Cartry, Steinberg and Gibot-Leclerc, 2021). Ensuite, la rotation des cultures permet de limiter la production de graines sur une parcelle en espaçant la présence de la culture hôte, mais elle n'a que très peu d'impact sur la quantité déjà présente du fait de la longévité des graines. Pour y remédier, il est intéressant d'incorporer dans la rotation des cultures pièges. Il s'agit d'une culture hôte de la plante parasite qui permettra son développement, mais qui sera détruite avec la plante parasite avant la floraison et la production de nouvelles graines du parasite. Des cultures non-hôtes induisant la germination peuvent également être utilisées dans la rotation. Sous l'effet des stimulateurs, la graine va germer, mais sans pouvoir s'attacher à un hôte, elle va mourir, amenant à un suicide germinatif (Fernández-Aparicio, Reboud and Gibot-Leclerc, 2016; Jamil, Kountche and Al-Babili, 2021). Une autre possibilité est l'utilisation de cultures associées qui permettent une réduction de l'impact des plantes parasites sur la culture hôte. Cela peut prendre la forme d'une modification de l'environnement avec une diminution de la lumière pour la cuscute (Dechassa and Regassa, 2021) ou par les effets allélopathiques des cultures associées sur les plantes parasites. Pour cette deuxième catégorie, les effets peuvent être l'inhibition de la germination, de la croissance, de la racine ou bien du développement de l'haustorium (Cimmino *et al.*, 2018; Cartry, Steinberg and Gibot-Leclerc, 2021).

#### **b. Méthodes de lutte chimiques**

L'utilisation des produits chimiques dans la lutte contre les plantes parasites est complexe du fait de la résistance des graines, de la nature proche du système plante hôte/plante parasite et du rapport efficacité/coût. La fumigation du sol est un des traitements possibles pour tuer les graines à partir de

fumée de produit chimique. Le bromure de méthyle fait partie des produits efficaces, mais, trop dangereux pour l'environnement, il a été interdit. D'autres produits comme le métamsodium ou le dazomet peuvent être utilisés, mais leur coût est important et leur efficacité variable (Fernández-Aparicio, Reboud and Gibot-Leclerc, 2016). Pour lutter contre les plantes parasites au stade graine, de nombreuses recherches sont menées pour obtenir des produits stimulants ou inhibiteurs. Plusieurs analogues de strigolactones ont été synthétisés dans l'objectif de générer le suicide germinatif de la banque de graines du sol. Des tests sont menés pour rendre leur production plus efficiente et définir des protocoles d'utilisation en fonction de la cible et de l'environnement (Kountche *et al.*, 2019; Jamil, Kountche and Al-Babili, 2021; Zorrilla *et al.*, 2022). Une fois la plante parasite développée, il est possible d'utiliser des herbicides lorsque la plante hôte est résistante à ceux-ci. L'exemple le plus répandu est l'utilisation des herbicides à l'imidazolinone avec des cultures résistantes. Il agit en inhibant l'enzyme acétohydroxyacide synthase qui sert dans la biosynthèse des acides aminés à chaîne ramifiée. Le maïs et le tournesol sont deux cultures où des variétés tolérantes ont été obtenues pour utiliser l'herbicide contre les strigas et les orobanches (Tan *et al.*, 2005; Fernández-Aparicio, Reboud and Gibot-Leclerc, 2016).

### **c. Méthodes de lutte génétiques**

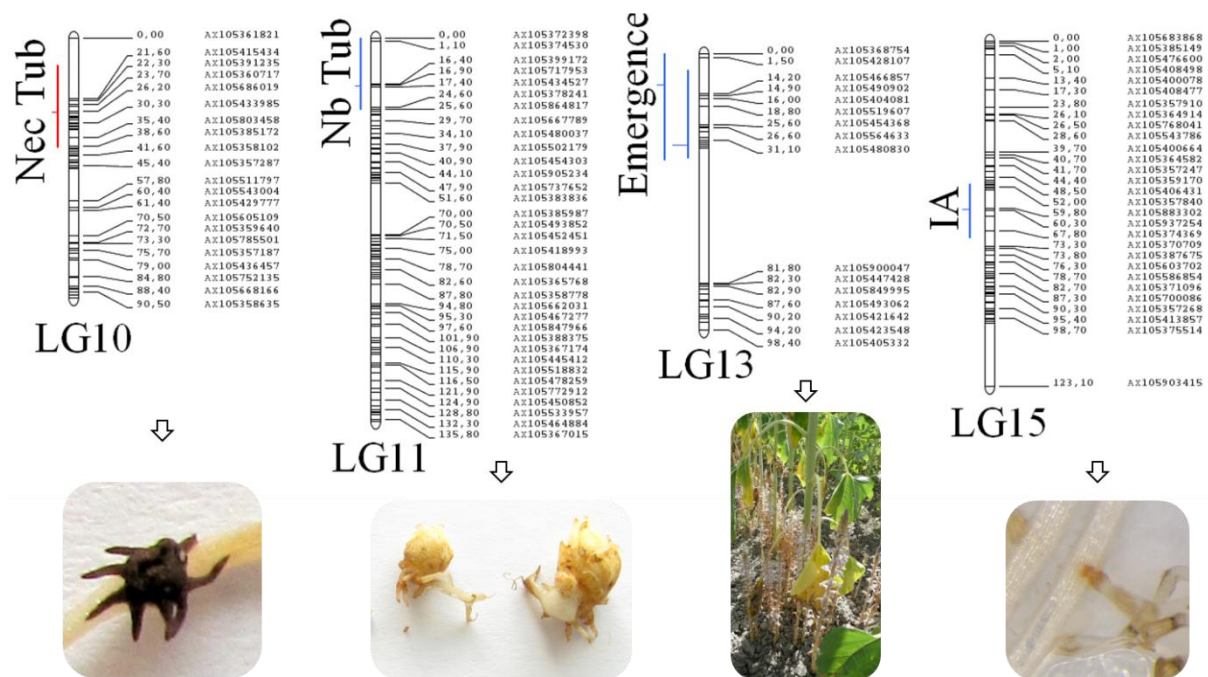
Actuellement, la méthode de lutte la plus efficace est l'utilisation des résistances génétiques présentes chez les plantes hôtes via la sélection. Les ressources génétiques telles que les espèces sauvages proches ou les « landraces » sont très importantes pour cette méthode de lutte puisqu'elles sont des réservoirs de résistances (Chabaud *et al.*, 2022; Dossa *et al.*, 2023). Comme présenté dans la partie « Les interactions et les défenses de la plante face aux plantes parasites », des résistances peuvent être identifiées à tous les stades de l'interaction entre la plante parasite et la plante hôte. Par exemple chez le sorgho et le pois, la résistance de génotypes à *Striga hermonthica* et *Orobanche crenata* respectivement est lié à une réduction de la production de strigolactones (Pavan *et al.*, 2016; Mohamed *et al.*, 2018). Certains génotypes présentent une combinaison de résistance pré et post-attachement tels que le cultivar de riz NERICA (Cissoko *et al.*, 2011) ou la variété de maïs KSTP 94 (Mutinda *et al.*, 2018). Des résistances post-attachement ont été identifiées chez de nombreux couples hôte/parasite, par exemple la tomate/cuscutes avec les gènes *CuRe1* et *CuRLR1* (Hegenauer *et al.*, 2016; Jhu *et al.*, 2022), plusieurs légumineuses/*O. crenata* (Perez-De-Luque *et al.*, 2005; Rubiales, Fondevilla and Fernández-Aparicio, 2021), le niébé/ *S. gesnerioides* avec le gène *RSG3-301* (Li and Timko, 2009), le maïs/*S. hermonthica* (Amusan *et al.*, 2008) ou encore le tournesol/*O. cumana*.

### **4. Les défenses génétiques chez *O.cumana*/Tournesol**

Dans le cas de l'orobanche du tournesol, des résistances génétiques ont été observées à tous les stades d'interaction. Elles sont majoritairement monogénétiques (relation « gène pour gène ») mais quelques résistances sont quantitatives (Velasco, Pérez-Vich and Fernández Martínez, 2016; Rubiales, 2018).

### a. Résistances quantitatives

Au cours des 20 dernières années, plusieurs Quantitative Trait Locus (QTLs) ont été identifiés contre différentes races d'*O. cumana*, avec différents types de résistances et sur différents groupes de liaisons du tournesol. Tout d'abord, Pérez-Vich et al. (2004) ont identifié chez une population issue de P-96 une lignée possédant une résistance dominante aux races E et récessive à une race F, cinq QTLs liés à la résistance à des races E (*or3.1*, *or7.1*, *or13.1*, *or13.2* et *or1.1*) et six QTLs liés à la résistance à une race F (*or1.1*, *or4.1*, *or5.1*, *or13.1*, *or13.2* et *or16.1*). Le QTL *or3.1* est lié à un gène majeur de résistance *HaOr5* octroyant la résistance totale aux races E. L'impact des autres QTLs portent sur le nombre d'orobanche. Ensuite, Louarn et al. (2016) ont identifié à partir de lignées recombinantes (RILs) des QTLs associés à différents caractères de résistance à une race F et une race G. La figure 18 présente certains de ces QTLs avec leur position sur le groupe de liaison et le phénotype de résistance observé.



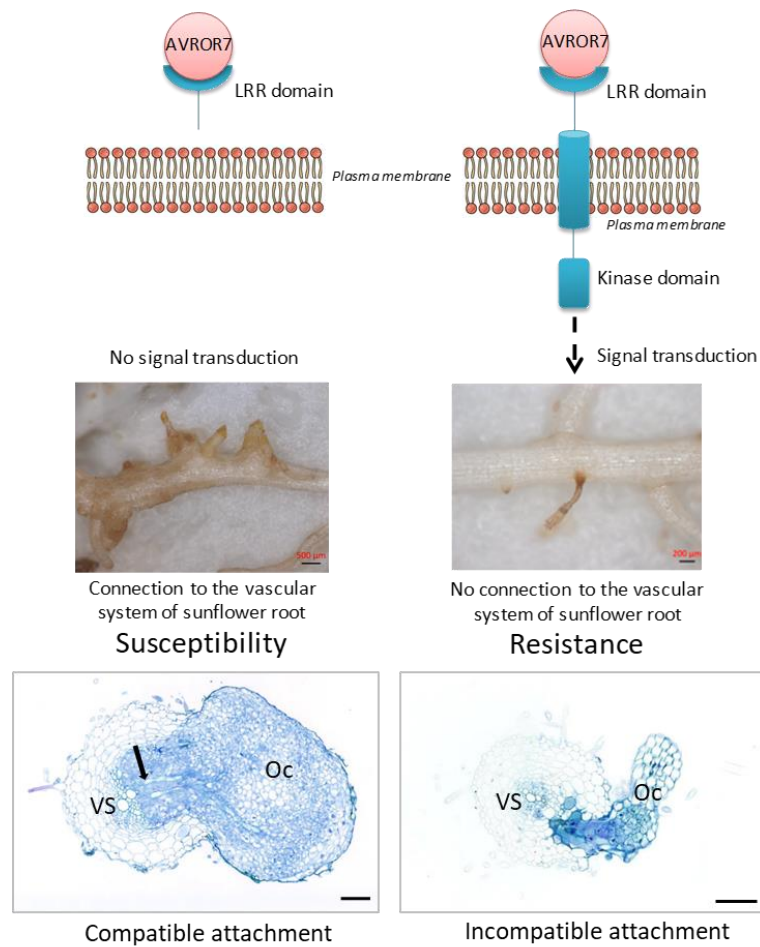
**Figure 18 :** Exemple de QTLs identifiés sur les groupes de liaisons 10, 11, 13 et 15 présentant différents types de résistances (IA : attachements incompatibles, Nec Tub : nécrose des tubercules, Nb Tub : nombre de tubercules et Emergence : nombre d'émergences) à une race F (en bleu) ou à une race G (en rouge) (Source Louarn et al. 2016)

Plus récemment, Imerovski et al. (2019) ont travaillé à partir de quatre populations pour identifier des QTLs de résistance à une race G. Sur ces quatre populations, 2 à 23 QTLs ont été identifiés et la présence d'un ou deux QTLs sur le chromosome 3 est commun aux différentes populations. Le premier

*or3.1* correspondrait comme précédemment à la zone du gène *HaOr5* (gène de résistance à la race E) et le deuxième *or3.2* serait à l'origine de la résistance aux races de virulence plus élevée, ici la résistance à la race G.

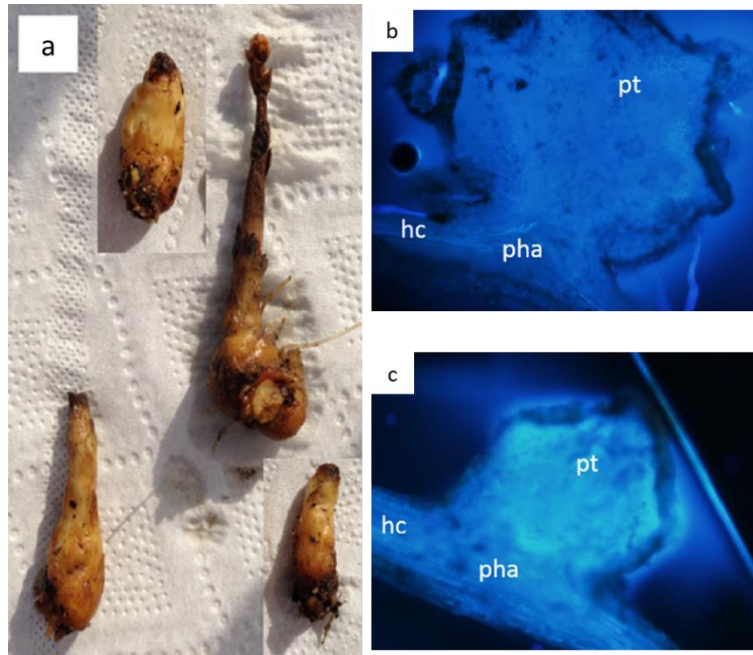
#### **b. Gènes majeurs de résistance**

Les premiers gènes majeurs de résistance observés sont liés à l'histoire de l'orobanche et du tournesol. Ils sont à l'origine de la classification en race d'*O. cumana*. En effet, les premières résistances génétiques sont contrôlées par des gènes dominants de résistances appelés *HaOr* ou *Or*. Ils ont permis l'identification des races en observant leur capacité à contourner ces gènes majeurs. Ainsi, *HaOr1* confère la résistance à la race A, *HaOr2* à la race A et B et ainsi de suite jusqu'à *HaOr5* pour la résistance à la race E et aux races inférieures (Molinero-Ruiz *et al.*, 2015). *HaOr5* est le premier gène de résistance du tournesol qui a été cartographié. Tout d'abord, Lu *et al.* (2000) ont développé la première carte génétique du gène à partir de marqueurs SCAR et RAPD. Ensuite, Tang *et al.* (2003) ont réussi à cartographier le gène sur une carte de marqueurs SSR sur la partie supérieure du groupe de liaison 3, dans une partie télomérique avec un haut niveau de recombinaison. *HaOr5* est reconnu comme fonctionnant dans une relation « gène pour gène » avec le gène d'avorulence *Avr<sub>Or5</sub>*, dont la dominance a été identifiée par Rodríguez-Ojeda *et al.* (2013). Actuellement, le seul gène majeur de résistance identifié est *HaOr7*. Il se situe sur le chromosome 7 et il est présent en deux copies. La protéine codée est une Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinase (LRR-RLK). Son action confère une résistance à la race F en empêchant la connexion au système vasculaire. Des attachements incompatibles sont observés (Figure 19).



**Figure 19** : Modèle moléculaire de résistance du gène *HaOr7* entraînant une résistance de type attachement incompatible et coupes transversales microscopiques de racines de tournesol représentant un attachement compatible et un incompatible d'une lignée porteuse d'*HaOr7* (VS : système vasculaire du tournesol, Oc : *O. cumana*, la flèche noire indique la connexion de la plante parasite (Source Duriez et al. 2019)

Deux autres gènes majeurs de résistance, hors de la classification *HaOr*, ont été étudiés récemment. Tout d'abord, *Or<sub>SI1</sub>* a été cartographié sur le chromosome 4. Il confère une résistance aux races F et G en induisant la nécrose des tubercules matures à partir de l'apex (Figure 20). Des observations de coupes fraîches de tubercules avec les racines de tournesol ont permis d'observer une accumulation de composés phénoliques dans le tubercule (Martín-Sanz *et al.*, 2020).



**Figure 20** : Phénotype observé en lien avec *OrSI1* a. photo de tubercule dont l'apex est nécrosé, b et c. sections de racines de tournesol et de tubercules d'orobanche observés sous fluorescence (340-380 nm) mettant en évidence l'accumulation de composés phénoliques (fluorescence de la photo c) (hc : cortex de l'hôte, pha : haustorium du parasite et pt : tubercule du parasite) (Source Martín-Sanz et al. 2020)

Plus récemment, le gène *OrDeb2* a été cartographié. Ce gène a été introgressé à partir d'une espèce de tournesol sauvage, *Helianthus debilis subsp. Tardiflorus*, par croisement interspécifique. Il se situe dans un intervalle de 1,38 Mb dans la moitié supérieure du chromosome 4. Cette région génomique, sur le génome de référence XRQ2.0, contient un cluster de gènes codant pour des récepteurs Receptor-Like Proteins (RLPs) et Receptor-Like Kinase (RLKs). La caractérisation de la résistance a permis d'observer un blocage de la pénétration de l'orobanche dans le cortex empêchant la plante parasite d'atteindre le système vasculaire. Les observations cytologiques montrent une couche d'encapsulation (Velasco *et al.*, 2012; Fernández-Aparicio *et al.*, 2022).

#### IV. Les objectifs de ma thèse

Ces gènes majeurs de résistance permettent un contrôle complet sur certaines races avec des hybrides porteur d'un unique gène. Cependant cela entraîne également une forte pression d'évolution sur l'orobanche qui amène au contournement de ces résistances. Pour continuer à lutter contre l'orobanche du tournesol, il est nécessaire d'obtenir de nouvelle résistance mais également de mieux comprendre celles existantes pour mieux les utiliser. C'est dans ce cadre que s'insèrent mes travaux de thèse, financée par une bourse CIFRE avec l'INRAE et l'entreprise MAS Seeds. Mon projet porte sur deux résistances : (i) le gène majeur de résistance *HaOr5* et (ii) une résistance secondaire entraînant la nécrose des tubercules. Pour la première, les objectifs de la thèse portent sur la caractérisation physiologie du mécanisme de résistance et l'identification du gène *HaOr5*. Les précédents travaux



réalisés sur ce gène par plusieurs équipes de chercheurs ont permis de cartographier le gène dans la partie supérieure du chromosome 3 (Lu *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2003). De plus, plusieurs analyses réalisées par MAS Seeds (détection de QTLs et GWAS) ont également mis en évidence cette région. Dans le cadre de la thèse, une stratégie de cartographie fine a été utilisée à partir d'une large population de F2, obtenue à partir d'une lignée porteuse du gène (LC1093) et d'une lignée non-porteuse (LSMS1). Elle a permis d'obtenir une réduction de la région génomique contenant le gène de résistance et d'identifier des gènes candidats de type récepteur LRR et NLR. En complément, plusieurs tests phénotypiques ont été réalisés pour caractériser le mécanisme de résistance aux différents stades de l'interaction. Ils ont permis d'observer que la résistance intervient après l'attachement de l'orobanche en empêchant la connexion au système vasculaire du tournesol. Les résultats obtenus sont présentés dans le chapitre suivant sous la forme d'un article soumis au journal « Theoretical and Applied Genetics ». Pour la deuxième partie, les travaux commencés pendant la thèse ont pour but de caractériser les mécanismes physiologiques, moléculaires et génétiques entraînant la nécrose des tubercules. L'origine génétique n'a pas pu être identifiée au cours des précédentes analyses réalisées par MAS Seeds. Durant la thèse, plusieurs éléments du mécanisme de la résistance ont été mis en évidence par différents tests phénotypiques, tels que le début des nécroses à la base de l'orobanche. Ces travaux permettent de préciser les protocoles de prélèvements qui serviront à la réalisation d'analyses métabolomiques et transcriptomiques, dans le but de remonter à la base génétique de la résistance via les voies métaboliques et l'expression des gènes. Les travaux de cette partie sont présentés dans le chapitre 3. Pour finir, la dernière partie de ce manuscrit porte sur des discussions et perspectives sur les résistances génétiques dans le système plante-hôte/plante parasite et la conclusion générale de ma thèse.

## **Chapitre 2 : Article sur l'identification et la caractérisation du gène majeur de résistance *HaOr5***

### **I. Introduction de l'article**

Ce chapitre présente l'article résumant le travail réalisé sur le premier axe de la thèse, l'identification du gène majeur de résistance *HaOr5* et la caractérisation de la résistance. Il a été soumis au journal « Theoretical and Applied Genetics » et a été jugé comme accepté pour publication une fois que nous aurions effectué les corrections mineures suggérées par les reviewers et l'éditrice, le 4 octobre. L'article présenté dans ce manuscrit correspond à celui soumis avant les corrections. Les figures de l'article ont leur propre numérotation indépendamment des autres figures présentées dans le manuscrit et sont notées « Fig. X » conformément aux consignes du journal. Les références bibliographiques citées sont intégrées à celles du manuscrit. La figure supplémentaire est présentée à la fin de ce chapitre avec les titres des tableaux supplémentaires disponibles en téléchargement sur le lien ci-dessous, valable jusqu'au 22/11/2023.

<https://filesender.renater.fr/?s=download&token=1d5620c1-df62-4b3b-98b9-eb018b0309a6>

### **II. Article**

#### **A cluster of putative resistance genes is associated with a dominant resistance to sunflower broomrape**

Camille Pubert, Marie-Claude Boniface, Alexandra Legendre, Mireille Chabaud, Sébastien Carrère, Caroline Callot, Charlotte Cravero, Isabelle Dufau, Mihaela Patrascoiu, Aurélie Baussart, Elodie Belmonte, Véronique Gautier, Charles Poncet, Jun Zhao, Luyang Hu, Weijun Zhou, Nicolas Langlade, Sonia Vautrin, Claire Coussy, Stéphane Muñoz

#### **Key message**

*HaOr5* resistance gene is located in a large genomic insertion containing putative resistance genes, and provides resistance to *O. cumana*, preventing an efficient connection to the sunflower root vascular system.

#### **Key words**

Resistance gene, parasitic plants, sunflower, Genomic, Genetic

#### **Summary**

*Orobanche cumana* (sunflower broomrape) is a parasitic plant, part of the Orobanchaceae family that specifically infests sunflower crop. This weed is an obligate parasitic plant that does not carry out photosynthetic activity nor develop roots, being fully dependent of its host for its development. It produces thousands of dust-like seeds per plant. It possesses a high spreading ability and has shown to quickly overcome the resistance genes successively introduced by selection in the cultivated sunflower varieties. The first part of its life cycle occurs underground. The connection to the sunflower vascular system is essential for the parasitic plant survival and development. The HaOr5 gene provides resistance to sunflower broomrape race E by preventing the connection of *O. cumana* to the root vascular system. We mapped a single position of the HaOr5 gene by Quantitative Trait Loci mapping using two segregating populations. The same location of the HaOr5 gene was identified by Genome-Wide Association. Using a large population of thousands of F2 plants, we restricted the location of the HaOr5 gene to a genomic region of 193kb. By sequencing the whole genome of the resistance line carrying the HaOr5 major resistance gene, we identified a large insertion of a complex genomic region containing a cluster of putative resistance genes.

## Introduction

Parasitic plants are pests that partially or fully depend on their plant host for their development by connecting to the host vascular system (shoots or roots). The Orobanchaceae family includes facultative and obligate weeds (Westwood *et al.*, 2010). Among them, the *Striga* (witchweeds) and the *Orobanche* (broomrapes) cause damages on important crops. Some have a large range of hosts while others infest few hosts. *Orobanche cumana* is an obligate parasitic plant that specifically infests sunflower crop.

Sunflower is an important oilseed crop for human oil production. Russia and Ukraine are the main producing countries. Populations of *O. cumana* are found from Spain to China and differ for their virulence level (also named race). Some of the most virulent races of sunflower broomrapes are located in Russia and Ukraine and *O. cumana* can cause severe yield loss.

If the genetic resistances have been and are still to some extent efficient to control *O. cumana*, they are often overcome by more virulent populations. The parasitic virulence levels are classified from A to H, the race A being the less virulent while the race G-H are the most virulent. A set of five sunflower differential lines was selected to distinguish between the broomrape races from A to E (Vrânceanu *et al.*, 1981). Each of the five sunflower lines carried a resistance *Or* gene now named *HaOr* in respect of the international nomenclature. The sunflower line carrying the *HaOr1* resistance gene providing resistance to broomrape race A. The others sunflower lines carried the genes *HaOr2*, *HaOr3*, *HaOr4*

and *HaOr5* providing resistance to races B to E respectively. The populations of *O. cumana* evolved and showed higher virulence such as F (Pérez-Vich *et al.*, 2002) or G and H (Molinero-Ruiz *et al.*, 2015). The *HaOr6* and *HaOr7* genes provided resistance to race F (Antonova, 2014; Duriez *et al.*, 2019). It is more difficult to distinguish between these most virulent races (H and G) because (i) there are no sunflower lines specifically discriminating for races higher than G and (ii) it is unclear if the populations located in different countries showing the same virulence level could be considered as the same race. To address these limitations, Molinero-Ruiz *et al.* (2015), proposed a nomenclature using triplets of differential lines (Limpert and Müller, 1994) which was already used to discriminate the virulence of *Plasmopara halstedii* strains causing downy mildew in sunflower but not yeast used for *O. cumana*.

There are many resistances to *O. cumana* in sunflower but only few major genes have been mapped (Tang *et al.*, 2003; Fernández-Aparicio *et al.*, 2022). The *HaOr7* is the only identified gene (Duriez *et al.*, 2019) and it encodes a receptor-like kinase that provides resistance to race F. Another sunflower resistance gene, the *Or<sub>Deb2</sub>* gene was mapped in a complex genomic region containing a cluster of genes encoding LRR (leucine-rich repeat) receptor-like proteins and was introgressed from *Helianthus debilis*, providing resistance to the broomrape race G (Fernández-Aparicio *et al.*, 2022). Finally, the sunflower resistance gene *Or<sub>SII</sub>* was mapped on chromosome 4 providing resistance to races F and G, its function remaining unknown. (Martín-Sanz *et al.*, 2020). More complex quantitative resistances were also mapped but the genes involved were not identified (Pérez-Vich *et al.*, 2004; Louarn *et al.*, 2016; Imerovski *et al.*, 2019).

In addition to the unique sunflower resistance gene *HaOr7*, some other resistance genes to parasitic plants have been fully characterized in other species. *Cuscuta reflexa* is a stem holoparasite. The resistance gene *Cure1* to *Cuscuta reflexa* in tomato encodes a LRR-receptor like kinase (Hegenauer *et al.*, 2016). A glycine-rich protein (CrGRP) induces defence by interacting with the *Cure1* resistance protein. In cowpea, the race-specific *RSG3-301* resistance gene to *Striga gesnerioides* encodes a CC-NBS-LRR protein (Li and Timko, 2009).

The cycle of *O. cumana* development is divided in four main steps (Louarn *et al.*, 2016). The first three steps occur underground. The seeds germinate and then penetrate the sunflower root and connect to the vascular system. From this attachment, a storage organ (the tubercle) will develop on the root. From this tubercle a single flowering shoot will emerge from the soil. Tens of broomrapes can develop on a single sunflower plant. The *O. cumana* seeds in the soil need to perceive germination stimulants from sunflower root exudate to break their dormancy. The germination stimulants are known to belong of the strigolactone and sesquiterpene-lactones families (Nelson, 2021; Rahimi and Bouwmeester, 2021). Sunflower synthesizes heliolactone, a specific germination stimulant (Ueno *et*

*al.*, 2014) and also other stimulants such as dehydrocostus lactone (DCL), or costunolide (Joel *et al.*, 2011; Raupp and Spring, 2013). Nevertheless, no fully resistant sunflower lines have been identified to be involved in the biosynthesis of germination stimulants. However, it has been shown that the LGS1 mutant in sorghum synthesized a low amount of strigolactones conferring resistance to *Striga hermonthica* (Gobena *et al.*, 2017). Chabaud *et al.* (2022) showed that sunflower wild relatives have different ability to induce *O. cumana* seeds and that *O. cumana* populations respond differently according to synthetic germination stimulants meaning that we could breed resistant sunflower varieties by interspecific crosses.

The attachment of *O. cumana* to the roots and the connection to the vascular system is the second important step of the sunflower broomrape life cycle. Parasitic plants first develop a specific organ named haustorium that enables the attachment and the penetration of the parasitic plant into the host roots or shoots. In a successful interaction between *O. cumana* and a susceptible sunflower, the parasitic weed connects to the vascular system, both xylem and phloem (Krupp, Heller and Spring, 2019). Resistant sunflowers can block the connection to the vascular system.

The molecular mechanisms that enable or prevent the interaction remain unknown or poorly described. Modification of the sunflower root cell wall or cell division have been shown to be involved in the penetration of the parasitic plant. Transcriptomic analysis of two contrasted lines revealed differentially expressed sunflower genes upon *O. cumana* inoculation (Yang *et al.*, 2020). In the susceptible line, the differentially expressed genes encoded proteins involved in cell division, cell-cell communication or in the biosynthesis and cell wall modifications. *O. cumana* seems to modulate sunflower gene expression to facilitate its penetration in the roots of susceptible sunflowers. Proteins secreted by *O. cumana* could be involved in sunflower genes expression reprogramming. By contrast, genes encoding defense proteins and DNA regulation were mainly differentially expressed in the resistant line. Transcriptomic analysis of pre-haustorium resistance showed that genes encoding proteins involved in metabolic activity, catalytic and hydrolase activities were mainly differentially expressed (Sisou *et al.*, 2021). Finally, transcriptomic analysis was performed at the very early stages of the interaction between 0 to 72h after inoculation (Huang *et al.*, 2023) and genes encoding stress related proteins were mainly linked to the resistance. At the metabolic level, the sunflower resistance gene Or<sub>SII</sub> was characterized as being involved in the modulation of phenolic compounds content which reduced the growth of the broomrape (Martín-Sanz *et al.*, 2020).

How *O. cumana* is able to reprogram sunflower gene expression remains unclear. MicroRNAs from *Cuscuta campestris* can move from the parasitic plant to the host when they are connected (Shahid

*et al.*, 2018). The parasitic miRNAs can target host genes showing transpecies gene regulation and hypothesizing that they could act as virulence factors.

All these findings illustrate that the identification of new sunflower resistance genes is essential to better understand the molecular basis of the interaction and to understand the resistance mechanisms to *O. cumana*.

The *HaOr5* gene has been mapped on the extremity of the chromosome 3 (Tang *et al.*, 2003). In this chromosome 3 region, there are at least two resistance genes, including *HaOr5* (Imerovski *et al.*, 2019). The dominant *avrOr5* avirulence gene in *O. cumana* has been described to interact as a gene-to-gene with *HaOr5* (Rodríguez-Ojeda *et al.*, 2013) and is the unique avirulence *O. cumana* gene described so far.

The identification of the *HaOr5* is a key to understand the molecular interaction between resistance protein and avirulence protein in the pathosystem. By combining genetic and genomic experiments in our study, we located the *HaOr5* resistance gene in a cluster of putative resistance genes. We described that it provides resistance to *O. cumana* race E by preventing the connection to the sunflower root vascular system. Our results will help to identify alleles in sunflower seed banks (Terzić *et al.*, 2020) that could confer resistance to more virulent broomrape populations and enable to decipher the molecular dialog between sunflower resistance genes and *O. cumana* virulence factors.

## **Material and methods**

### **Plant material**

#### *Sunflower*

We produced two populations using the same LC1093 resistant line that we crossed with the susceptible lines LSMS1 and LSMS2. The populations were composed of F2 398 plants from the cross with LSMS1 and of F2 237 plants from the cross with LSMS2. The LC1093 resistant line carried the *HaOr5* resistance gene previously located on chromosome 3 (Tang *et al.*, 2003) and providing resistance to the broomrape race with a virulence level E. Both populations were used to map resistance QTL as described thereafter.

The Genome Wide Association (GWA) mapping was computed using a set of 544 genotypes. From these 544 genotypes, 309 and 304 were phenotyped in Romanian infested field in 2014 and in 2016 respectively. Between the two years, 69 genotypes were in common.

A large population of 10,223 F2 plants was obtained by selfing the F1 from the cross of the LC1093 resistant line and the LSMS1 susceptible line. The population was genotyped for the fine mapping of the *HaOr5* gene in the map-based cloning strategy.

For the phenotypic assays, we added the susceptible control lines XRQ or 2603 and the resistant control lines LRMS1 and DEB2. The LRMS1 line carries the *HaOr7* gene providing resistant to *O. cumana* race F. The DEB2 line carries the *Or<sub>Deb2</sub>* gene providing resistance to race G.

#### *Orobanche cumana*

The phenotypic evaluation in Romanian infested field was done in Tandarei (latitude 44.7N, longitude 27.7E). This broomrape population is referred hereafter as E-RIA and corresponded to race E.

The phenotypic evaluation in controlled conditions was performed using broomrape seeds collected in infested field. We used one race from Romania (G-GRO), one race from Ukraine (G-KZP) one race from France (E-BOU), one race from China (E-DDP) and two races from Spain (E/F-EEC and F-IN23). The populations are detailed in the Supplementary table 1.

### **Phenotypic evaluations**

#### *Field assays*

The field phenotypic data for mapping analyses were obtained with E-RIA broomrape population during the summers 2014 to 2016. In 2015 for the QTL detection, we used the two LC1093 cross populations. We counted the number of broomrape emergences per plant (PORO). In 2014 and 2016 for the GWA analyses, we used the two sets of genotypes. We counted the number of broomrape emergences per plot and the number of susceptible plants per plot (25 plants per plot). With the notation, we calculated the broomrape frequency (number of broomrape emergences per plot/number of plant per plot).

#### *Phenotypic evaluation in pots*

The sunflower seeds were treated with a fungicide solution for four hours. They were then germinated in Petri dish containing a wet paper filter and placed for 48h at 25°C. After 24h, the husks were removed for the seeds that did not germinate correctly. The germinated sunflower seeds were sown in small pot (160mL) contained a mix of sand and vermiculite (1:1 v:v) inoculated with E-BOU broomrape seeds (120mg/L of substrate). The pots were placed in growth chamber with photoperiod of 16h-8h (day-night) and at 22°C with 60% of hygrometry. Three weeks post inoculation, we transferred the pots of the plantlets in 3L pots of soil. The pots were placed in greenhouse with a temperature of at least 15°C, 400W/m<sup>2</sup>/s of light during 12h. The plants were watered with 2L of water

every 2 days. The volume was adjusted if needed, according to plant demand. Six weeks later, we started the phenotyping once a week during four weeks by counting the number of broomrape emergences.

#### *Multi-pots trays assays*

We carried out five assays in multi-pots trays for evaluating the recombinant plants. The three first assays were carried out to phenotype the F2:3 recombinant families. The F3:4 families from the previous F2:3 families were evaluated in the two last assays. The multi-pots trays assays were performed with the broomrape population E-BOU. We used the same protocol for sunflower germination than the one used for the assay in pot. We prepared the inoculated substrate one day before sowing. For the first assay, we prepared a mix of sand and vermiculite (50:50 v:v) with broomrape seeds (120mg/L). The secondary resistance was checked using this substrate. For all other assays, we prepared a mix of sand, vermiculite and loam (1:1:1 v:v:v) inoculated with the same concentration of broomrape seeds (120mg/L). We sowed one sunflower seed per pot and 9 plants/batch of seeds. We placed the multi-pots trays in growth chamber (photoperiod: 16h-8h day-night, temperature: 22°C and hygrometry: 60%). We watered with either half-strength Long Ashton nutrient solution supplemented with 370 µM phosphate (Chabaud *et al.*, 2022) or water. For the phenotyping evaluation, we uprooted each plant and we counted the number of broomrape tubercles.

#### *Cytological experiments*

We selected two homozygous F3:4 with and without recombination from the same F2 recombinant family (recombination between the AX-105596697 and SFW5438 markers), and in addition XRQ and LC1093, as susceptible and resistant control respectively. The broomrape population E-BOU was used. Samples were prepared from inoculated plantlets grown in rhizotrons (five rhizotrons per sunflower accessions) following the protocol of Le Ru *et al.* (2021) with a few modification. Disinfected sunflower seeds were directly sown in multi-pots trays with a mix substrate of sand and vermiculite (1:1 v:v). The rhizotrons were watered with a half Long Ashton nutrient solution containing 370 µM phosphate 3 times per week.

At 14 and 28 days after inoculation, we sampled sunflower roots segments with broomrape attachments in a solution of acetic acid and 100% ethanol (1:3 v:v) and we fixed the samples under vacuum for 10min. The samples were clarified in a chloral hydrate solution (5g/mL) for at least one night under agitation and observed using an Axioplan 2 microscope (Zeiss). The number of observed samples per accession was 16 on average at 14 dai and 10 at 21 dai.

#### **Molecular biology**



### *High-molecular-weight genomic DNA extraction for sequencing of LSMS and LC1093*

We extracted high-molecular-weight genomic DNA for the sequencing for the parental lines genomes. We used an adapted protocol from Mayjonade et al., (2016). Young leaves of three-week old plants were harvested in liquid nitrogen. We grinded manually the tissues in a mortar cooled with liquid nitrogen and containing sand to obtain a fine powder. We used 1g of powder for the extraction in 9 mL of lysis buffer (for 10mL: 0.1g of 1% sodium metabisulfite, 0.1g of PVP40, 2mL of 2.5M NaCl, 1mL of 1M Tris HCl, 1mL of 0.5M EDTA, 750µL of 20% SDS and 200µL BetaMercaptoEthanol and water up to 10mL). The sample was homogenized using a vortex and incubated 20 minutes at 55°C. We mixed by inverting the tube after 10 min of incubation. After incubation, we added 40µL of RNase [100mg/mL] and incubated 10 min at ambient temperature in a rotator at 10 rpm. For the precipitation of contaminants, we added 3mL of 5M potassium acetate and mixed by inversion. Then, we added 12mL of phenol-chloroform-IAA (25:24:1 v:v) and incubate 10 min in a rotator at 20 rpm. After centrifugation (4500xg, 10 min, 20°C, Eppendorf Centrifuge 5804 R), we collected the supernatant (9mL). We added one volume of chloroform-IAA (24:1 v:v) and incubated 10 min in a rotator at 20rpm. We centrifuged (4500xg, 10 min, 20°C) and collected the supernatant (6mL). The gDNA was purified using carboxylated magnetic beads (Sera-Mag SpeedBeads®). We added 0.25 volume of solution of 2% beads and incubated in a rotator at 10rpm during at least one hour. We removed the liquid that did not contain gDNA using a magnetic holder. We washed the beads with 70% ethanol (25mL). The ethanol was removed using the magnetic holder. The beads were washed one more time. The gDNA was eluted from the beads using 150 µL elution buffer. During the washes and elution steps, we carefully resuspended the beads in the solutions. To remove contaminant beads from the gDNA solution, the eluted gDNA was transferred in a new tube placed on the magnetic holder during 1 night at 4°C. The final HMW gDNA solution was conserved at 4°C.

We controlled the quality, measured the concentration and the purity of the gDNA solution. We first used a Nanodrop Lite (Thermo Fisher Scientific) for quantification, and selected gDNA with a ratio of OD 260/280 nm between 1.80 and 2 and a ratio OD 260/230 nm between 2 and 2.20. We compared the concentration measured with the Nanodrop with one measured with Qubit 3 (Thermo Fisher Scientific). The DNA quantity of each do not be more than the double of the other. The integrity of HMW gDNA was evaluated with the FemtoPulse system (Agilent). We selected the HMW gDNA with at least 50% of DNA fragments longer than 40 kb.

### *Genomic DNA extraction for GWA and QTL analyzes*

The extraction for GWA and QTL analyzes were realized in MAS Seeds laboratory with a manual classic protocol.

### *Genomic DNA extraction for the map-based cloning strategy*

The extraction were realized on young plant leaf. We sampled six foliar disks (6mm diameter) per plants. In control condition, the plants were sampled in 96 wells plate at five-weeks old and in field at six or seven-weeks old. After frozen them, the plates of foliar disks were lyophilized. We added 3 glass beads per well (diameter 3mm) to grind them with vibro-broyeur (Retsch MM400). We added 750µL per well of extraction buffer (for one 96w plate: 20mL of 2.5M NaCl, 10mL of 1M Tris HCl, 10mL of 0.5M EDTA, 6.25mL of 20% SDS, 1g of PVP40, water up to 100mL, 1g of sodium metabisulphite and 100µL of 10mg/mL RNase A). Then, we incubated the samples at 65°C during 30min with manual agitation. To precipitate the contaminant, we added 235µL per well of 3M potassium acetate, previously storage at 4°C. The samples were incubated at 4°C at least 1 hour. After centrifugation (3200xg, 15min, 4°C), the supernatant were harvested with Hamilton robotic (2 times 275µL) and added to new 96 wells plate previously filled with 900µL of fixing buffer per well (8M guanidium chloride, 96% ethanol, 1:2 v:v). To collect the gDNA, we used filter plates and series of vacuum. With Hamilton robotic, we transferred 50µL/well of the samples (96w plate) on a 384 wells filter plate. We realized two washings with wash buffer, 70µL each time (for one 96w plate: 360µL of 1M Tris HCl, 3µL of 0.5M EDTA, 800µL of 3M KoAc, water up to 6mL and 9mL of 100% ethanol). The elution was realized manually in a final volume of 50µL with elution buffer. Finally, we controlled the homogeneity of quantity of gDNA in several wells of the plate with Nanodrop Lite (Thermo Fisher Scientific).

In addition, we extracted parental lines gDNA with DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen). These gDNA were used for the validation of new markers and as control for the population genotyping.

### *Genotyping for GWA and QTL analyses*

For the QTL detection, we selected polymorphic markers every 5cM in the MAS Seeds intern markers set. We obtained 227 markers for the population 1 (LSMS1/LC1093) and 229 markers for the population 2 (LSMS2/LC1093). We used Kaspar™ technology (LGC genomics).

The genotyping data for GWA analyses were obtained from a 50k AXIOM array containing 49,449 SNPs and proprietary set of 1537 markers. Only markers with a minor frequency allele (MAF) superior of 0.05 were taken. We obtained 28,116 and 27,694 markers for 2014 and 2016 respectively.

### *Genotyping for the map-based cloning strategy*

We used the Kaspar™ technology to genotype the population for the map-based cloning strategy. We realized genotyping in two cases/for two objectives: (i) selection of individuals for selfing during the multiplication step and (ii) for some genotype control of individuals during phenotypic assays. Due to the large number of plants in filed nursery 2020 and 2021, the first genotyping were carried out in MAS

Seeds laboratory (high flow genotyping). All other genotyping (second genotyping in nursery, genotyping of field nursery 2022 and phenotypic assay) were carried out in LIPME laboratory.

To prepare the population gDNA plates, we added in empty wells the gDNA of parental line (LSMS1, LC1093 and a mix of them) as control of markers. The samples were dried in steam room at 35°C o/n. We prepared the mix for genotyping with 33.6µL of primers mix (specific oligo to LC1093 SNP, specific oligo to LSMS1 SNP, common oligo and water, 1:1:5:5 v:v:v:v), 1200µL of PACE® Genotyping Master Mix (concentration 2x, Low ROX) and 1222.4µL of water. We realized the amplification with the following cycle: 94°C 15min, 11 cycles 94°C 20sec. 65°C 1min, 45 cycles 94°C 20sec. 57°C 1min. We used a LightCycler® 480 II (Roche) to do an end-point reading (37°C and acquisition).

We used the same protocol to test the new markers at first with the parental line gDNA.

## **Genome sequencing**

### *Sequencing libraries preparation*

For each genotype, an HIFI SMRTbell® library was constructed using the SMRTbell® Template Prep kit 2.0 (Pacific Biosciences) according to PacBio recommendations (PN 101-853-100, version 05).

We sheared by using Megaruptor<sup>2</sup> system (Diagenode) to obtain a 18-20Kb average size. An enzymatic treatment was done on 10µg of sheared DNA sample to remove single-strand overhangs, followed by a DNA damage repair. Then a ligation with overhang adapters was performed on both ends of the targeted double-stranded DNA (dsDNA) molecules, to create closed single-stranded circular DNA. A nuclease treatment was performed using SMRTbell® Enzyme Clean-up kit 2.0 (Pacific Biosciences). A final size-selection with Blue-Pippin system (Sage Science) combined with a 1X AMPure PB beads purification (Pacific Biosciences) allowed to remove residual DNA fragments smaller than 10Kb. The size and concentration of the final library were assessed using the FemtoPulse system (Agilent) and the Qubit Fluorometer with Qubit dsDNA HS reagents Assay kit (Thermo Fisher Scientific), respectively.

Sequencing primer and Sequel® II DNA Polymerase were annealed and bound. Each library was loaded on 2 SMRTcell 8M at an on-plate concentration of 90pM. Sequencing was performed on the Sequel® II system with a run movie time of 30 hours and 120 min pre-extension step and Software version 10.1 PacBio by Gentyane Genomic Platform (INRAE Clermont-Ferrand, France).

### *Bionano optical mapping*

Ultra High molecular weight DNA was purified from 0.5 g of fresh dark treated very young leaves according to the Bionano Prep Plant Tissue DNA Isolation Base Protocol (30068 - Bionano Genomics) with the following specifications and modifications. Plant leaves were ground in liquid nitrogen and

then disrupted using a Tissue Ruptor grinder (Qiagen) in homogenization buffer containing spermine, spermidine and beta-mercaptoethanol. Nuclei were washed, purified using a density gradient and then embedded in agarose plugs. After overnight proteinase K (Qiagen) digestion in Lysis Buffer (Bionano Genomics) and 1-hour treatment with RNase A (Qiagen), plugs were washed and solubilized with AGARase enzyme (ThermoFisher Scientific). A dialysis step was performed in TE Buffer (ThermoFisher Scientific) for 45 minutes to purify DNA from any residues. The DNA samples were quantified by using the Qubit dsDNA BR Assay (Invitrogen). The presence of mega base size DNA was visualized by pulsed field gel electrophoresis (PFGE).

Labeling and staining of the uHMW DNA were performed according to the Direct Label and Stain (DLS) protocol (Bionano Genomics). Briefly, labeling was performed by incubating 750 ng uHMW genomic DNA with DLE-1 Enzyme (Bionano Genomics) in the presence of DL-Green dye (Bionano Genomics). The DLE 1 enzyme recognizes the CTTAAG motif. Following proteinase K digestion and non-fixed dye clean-up by membrane adsorption, the DNA backbone was stained with DNA Stain solution (Bionano Genomics). After overnight room temperature incubation, the labeled DNA concentration was measured with the Qubit dsDNA HS Assay (Invitrogen).

## **Statistical analysis**

### *QTL detection*

The QTL detection was carried out with the R package “R/qtl” (Broman *et al.*, 2003). As phenotypic data, we used PORO (number of broomrape emergences per plant) and as genotypic data we used SNP polymorphism. We calculated with the two methods: simple interval mapping (SIM) and composite interval mapping (CIM).

### *Genome Wide Association Study*

The GWA analyze and representation were realized with the package “MLMM” (Segura *et al.* 2012, package authors Bonnafous *et al.* 2019). As phenotypic data, we used the frequency and as genotypic data the 50k AXIOM chip (markers with a MAF > 0.05 only). We realized the kinship with the function “kin” from the package “synbreed” (Wimmer *et al.*, 2012). We used the resulting kinship matrix and the structure of the population as cofactor.

### *Selection and design of SNP markers for the map based cloning strategy*

MAS Seeds provide the initials markers from their intern set of markers (mkMAS.1, SFW5768, mkMAS2, SFW5438, SFW0430). To densify the screen we used the AXIOM chip 600k data (Louarn *et al.*, 2016; Duriez *et al.*, 2019; Calderón-González *et al.*, 2022; Fernández-Aparicio *et al.*, 2022). We selected SNPs polymorphic between the two parental lines. We use BatchPrimer3 v1.0 software

(Koressaar and Remm, 2007; You *et al.*, 2008; Untergasser *et al.*, 2012) to design specific markers, primer type “Allele-specific primers and allele-flanking primers”. We modified parameters than default parameters as follow: (i) SNP or Allele-specific Primer Settings: Primer<sup>TM</sup> min: 60, opt: 65 and max: 67; Max Self Complementarity: 100; Max 3' Self Complementarity: 100; (ii) General Settings for Generic Primers: Product Size max: 80; Primer Size min: 19, opt: 25; Primer <sup>TM</sup> min: 62, opt: 67 and max: 69; Max Self Complementarity: 100; Max 3' Self Complementarity: 100. We selected the two primers “allele-specific” with the best score and one complementary “allele flanking”. We controlled the specificity of markers with bioinformatics analyses. For Kaspar genotyping, we added to specific marker sequence a FAM or VIC probes for the Fluorescence Resonance Energy Transfer. Then we tested them on parental line gDNA to verify their capacity to discriminate LC1093 allele, LSMS1 allele and heterozygous allele. We obtained five new markers AX-105471344, AX-105437464, AX-105388905, AX-105596697 and AX-105939348. The markers are detailed in the Supplementary table 2.

#### *Phenotypic statistical analyses*

For the test of LC1093 and LSMS1 in 3L pots, we compared the number of emergences between the different genotype/accession in each race. The phenotypic data were analyzed with the pairwise.t.test (package “stats” in R version 4.0.4). As adjustment of the p-value, we used the Bonferroni method/correction.

#### *Genetic map*

For the genetic map construction, a matrix containing the 2,268 F2 recombinant (Supplementary table 3), 1,490 fixed genotypes of susceptible line, 1,490 fixed genotypes of resistant line and 2,980 heterozygous fixed genotypes in the genomic region was used. We added the compilation of phenotype obtaining in multi-pots trays assays with E-BOU as broomrape. To calculate the genetic distance between markers and the resistance gene the Carthagene software (de Givry *et al.*, 2005) was used. Finally to draw the genetic map, we used Mapchart software (Voorrips, 2002).

### **Bioinformatics**

#### *Control of new markers specificity*

We controlled the specificity of markers with function “blastn” (Nucleotide-Nucleotide BLAST 2.11.0+) on XRQ v2.0 genome, parental line genomes not yet available.

#### *Whole genome sequencing and assembly*

A total of 2 SMRTCells per genome were sequenced using CCS mode. The resulting data were corrected using standard parameters with the pbcromwell workflow contained in SMRTLink, the web-based end-to-end workflow manager for PacBio Sequel systems. The CCS3 corrected data was generated with default settings (number of passes equal or superior to 3) and were assembled using PacBio HiFiasm assembler (v0.15.1, Cheng et al. 2021) with standard parameters. The assembler provided two assembly files for each genotype, a Primary complete assembly and an Alternative fragmented and partial assembly, containing putative alternative versions of the genome, representing mostly residual heterozygous regions.

### *Genome assembly*

Labeled and stained DNA was loaded on the Saphyr chip. Chip Loading and running of the Bionano Saphyr System were performed according to the Saphyr System User Guide (30247 - Bionano Genomics). Data processing was performed using Bionano Access and Solve software (<https://bionano.com/software-and-data-analysis-support-materials/>).

Briefly filtered data were generated (molecules with a size larger than 150kb) corresponding to 100X minimal coverage of the genome estimated size. Then resulting filtered data were assembled in optical genome maps. Finally, a hybrid scaffolding was performed between the PacBio Primary assembly (HiFiasm) and the optical genome maps using the Bionano Hybrid Scaffold pipeline with default parameters.

A final scaffolding based on the mapping of the HanXRQr2.0-SUNRISE-2.1 genome against the hybrid scaffolds was performed with minimap2 (Li, 2018) and the resulting contigs were renamed according to the ICSG nomenclature.

### *Genomes annotation*

Structural gene annotation was performed using the Eugene-EP (Sallet, Gouzy and Schiex, 2019) v2.0.0 pipeline (Carrere and Gouzy, 2023a), which combined five training sets for structural annotation, including the cleaned Iso-Seq data from 3 *H. annuus* genotypes (after trimming of polyX, minimum size of 150bp) and four different protein databases: SwissProt, TrEMBL Plants, and predicted proteins from the *Brachypodium distachyon* and *Arabidopsis thaliana* reference genome.

Functional annotation was done using a pipeline (Carrere and Gouzy, 2023b) combining InterPro v91, BlastP against both the 'Viridiplantae' section of non-redundant NCBI database and the UniProt 'Asterids' database, Blast2GO, E2P2, iTAK and PlantTFcat databases as described previously (Pecrix et al., 2018).

### *Comparison sequences and genes content*

We extracted the complete genomic window sequence between the markers Mk.MAS1 and SFW0430 from LC1093 and LSMS1 genome. We used in Unix the function “extractseq” (EMBOSS:6.6.0.0). Then, to compare the similarity of the sequences, we used D-Genies (Cabanettes and Klopp, 2018), an online tool. We entered the parameters as follows: LSMS1 sequence as target, LC1093 sequence as query, aligner Minimap2 V2.24 with the default options.

We carried out the same method with the sequences of reduced genomic region between the markers AX105596697 and SFW5438.

#### *Phylogeny of the F-Box/LRR-repeat*

From the annotation of both genome sequences, we obtained the protein sequences of all F-Box/LRR repeat proteins for LSMS1 and LC1093. We combined all fasta sequences in a single multifasta file that was used for a multiple sequence alignment using mafft (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>). We showed that two proteins in LC1093 were miss annotated and we combined both as a single protein sequence. We redid the multiple sequence alignment. We then constructed the phylogenetic tree using FastTree (version 2.1.9), selecting newick output format. The visualization of the tree was done using AliTreeViz (<https://lipm-browsers.toulouse.inrae.fr/alitreeviz/>).

#### *Annotation of the LTR-retrotransposons*

We annotated the LTR retrotransposons in the genomic region of the susceptible and the resistant lines. We used ltrharvest from the gt suite (version 4.6.3).

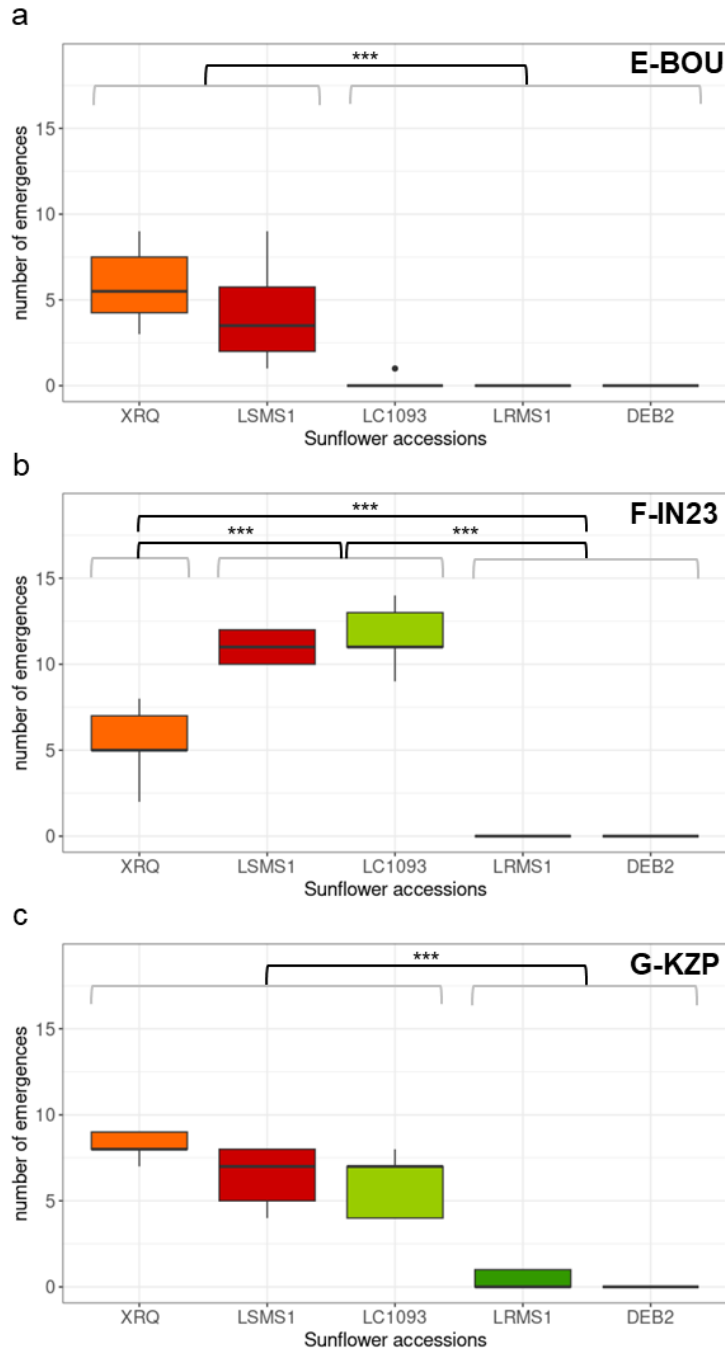
## **Results**

### **LSMS1 and LC1093 display different resistance spectra to broomrape populations of virulence E to G**

We evaluated the two parental lines LSMS1 and LC1093 in pots for their resistance to six races of *O. cumana*. These races covered various virulence levels from E to G and were collected in different countries. These races were: the French race E-BOU (race E), the two Spanish races F-IN23 (race F) and E/F-EEC (race E/F), the Ukrainian race G-KZP (race G), the Chinese race E-DDP (race E) and the Romanian race G-GRO (race G). As a susceptible control, we added the XRQ genotype. As the resistant controls, we added the LRMS1 and DEB2 genotypes, carrying the resistance genes *HaOr7* and *Or<sub>Deb2</sub>* respectively. The five sunflower lines were evaluated for their resistance by counting the number of broomrape emergences per sunflower plant (Fig. 1 and Supplementary Fig. 1). As expected, the control XRQ was susceptible to all races, the DEB2 line was resistant to all races while the LRMS1 line was resistant to the races E and F. For statistical analysis, the sunflowers lines were compared individually two by two. We grouped the lines with no significant differences. Two groups were identified when

the lines were inoculated with the race E-BOU (Fig. 1a); the LC1093, LRMS1 and DEB2 lines were resistant and XRQ and LSMS1 were susceptible with approximately five emergences per sunflower plant. The results were more complex when using the F-IN23 race (Fig. 1b). Indeed, we identified three groups with LSMS1 and LC1093 being highly susceptible, XRQ susceptible and LRMS1 and DEB2 fully resistant. Two groups were identified for the G-KZP race (Fig. 1c) with LSMS1, XRQ and LC1093 being susceptible and LRMS1 and DEB2 resistant. Resistance evaluation using the three other races E-DDP, E/F-EEC and G-RO gave similar results than the three races described above (Supplementary Fig. 1) except that LC1093 was susceptible to E/F-EEC. However, the virulence level of this population was unclear and could be superior to E.





**Fig. 1 Evaluation of the HaOr5 resistance to various virulent broomrape populations**

The parental lines LSMS1 and LC1093 were phenotyped using six broomrape populations (E-DDP, E-BOU, E/F-EEC, F-IN23, G-KZP and G-RO) in 3L pots in greenhouse. The figure represents the results for E-BOU, F-IN23 and G-KZP populations (see Supplementary Fig. 1 for the three others). We added the susceptible line XRQ and two resistant lines LRMS1 and DEB2 carrying the resistance gene HaOr7 and OrDeb2 respectively as controls. Broomrape emergences were counted 12 weeks after inoculation.

Significant pair-wise t-tests between lines are grouped for clarity and illustrated as \*\*\*  $p < 0.01$  and \*\*  $p < 0.05$ .

These first results confirm in our phenotyping conditions the extent of genotype-races resistance specific interaction and in particular, that LC1093 was resistant to the races E only, simplifying the genetic study of the underlying resistance mechanism.

### ***HaOr5* mapping**

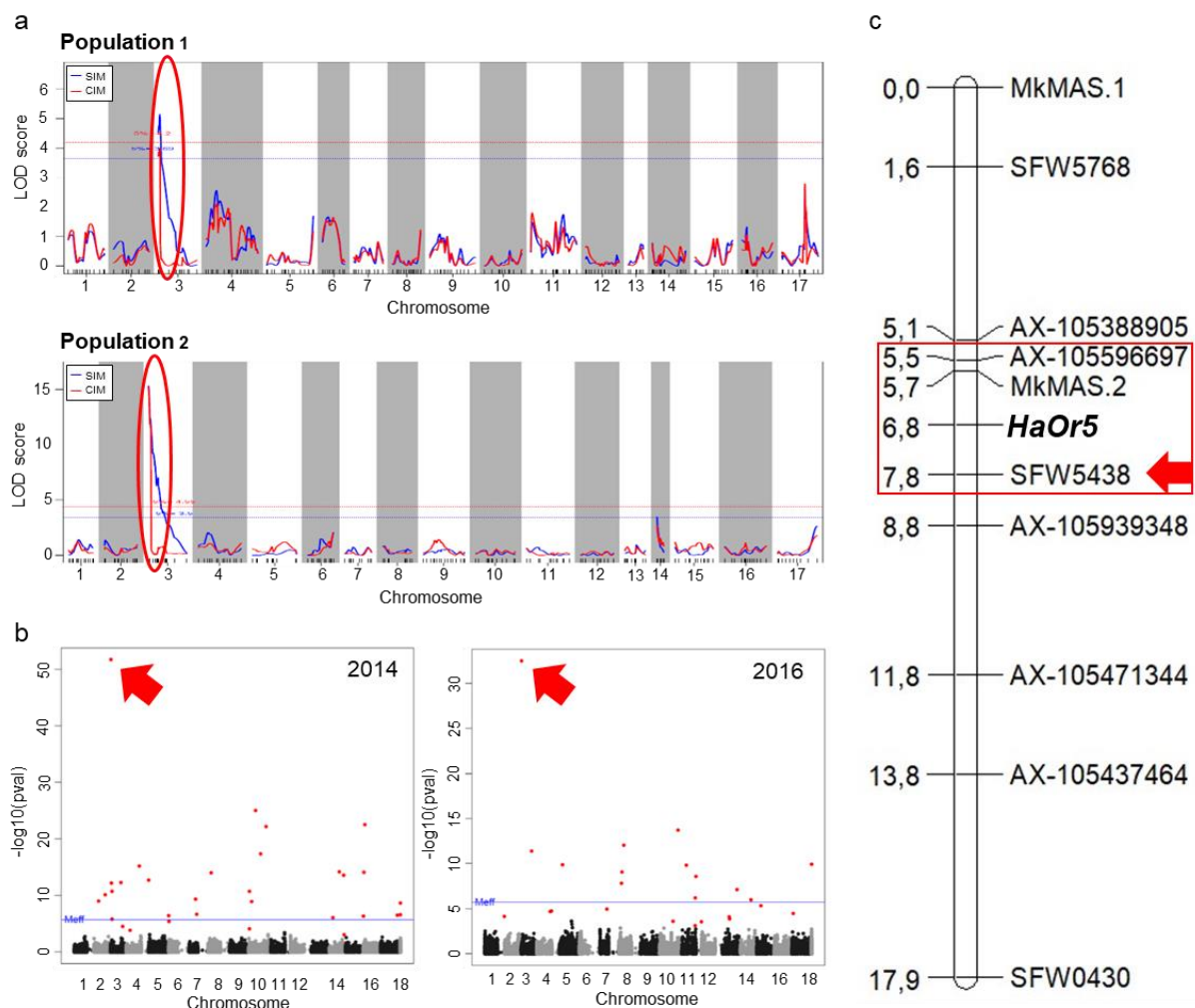
The single genetic origin of race E resistance by LC1093 was studied using different mapping approaches. First, the QTL detection was performed on two F2 populations, using the same LC1093 sunflower resistant line crossed with two susceptible lines LSMS1 and LSMS2. The population 1 (LSMS1xLC1093) and population 2 (LSMS2/LC1093) contained 398 plants and 237 plants respectively. All individuals were genotyped with a set 227 markers for the population 1 and with 229 markers for the population 2. The mean distance between the markers was 5cM. These populations were phenotyped with the broomrape population E-RIA in field in 2015. The resistance and susceptibility of LC1093, LSMS1 and LSMS2 were confirmed. For the phenotyping, we used the number of broomrape emergences per plant. For the population 1, using the simple interval mapping (threshold of 5% at 3.69), we obtained a single QTL at the beginning of the chromosome 3 (LODscore=5). With the CIM threshold at 4.2, we obtained a peak in the same location but with a LODscore of 4, below the threshold (Fig. 2a). For the population 2, we mapped a QTL in the same region with a LODscore of 15 (SIM threshold 3.5 and CIM threshold 4.55).

We performed a Genome Wide Association analysis with 544 sunflower genotypes to confirm the mapping of the *HaOr5* gene. The sunflower genotypes were phenotyped in the same E-RIA race in field over two years (2014 and 2016). The set of sunflower genotypes contained 309 genotypes in 2014 and 304 in 2016. Sixty-nine genotypes were common between the two sets of 309 and 304 genotypes and were phenotyped over the two years. All sunflower genotypes were genotyped with a 50k markers AXIOM chip and a proprietary set of 1537 markers. We selected markers with a MAF higher than 0.05. We obtained a set of 28,116 markers and 27,694 markers, for the evaluations in 2014 and 2016 respectively. We phenotyped the frequency of broomrape emergences for each sunflower genotypes. The results are represented in Fig. 2b. A single SNP on chromosome 3 was strongly linked to the phenotype over the two years, explaining a large part of the variance, respectively 25% for 2014 and 34% for 2016 (2014 p-val=1.79E-52 and 2016 p-val=3.15E-33). This SNP corresponded to the marker SFW5438 located in the QTL region.

We then fine-mapped the *HaOr5* gene by using a large F2 population from the cross between LSMS1 and LC1093. The F1 plants were resistant, indicating that the resistant allele was dominant. In 2020, we sowed a first part of the population and genotyped all the 6193 F2 plants with the two extreme markers MkMAS.1 and SFW0430. The selected recombinant plants were genotyped with three additional markers (SFW5768, MkMAS.2, SFW5438, Fig. 2c and Supplementary table 2) in the 8.41Mb genomic region between MkMAS.1 and SFW043.

We identified 1054 F2 recombinant plants in this 8.4Mb genomic region (Supplementary table 4). The marker MkMAS.2 gave many missing data for all F2 plants and was excluded from the genotyping of the recombinant plants. These recombinant plants enabled to reduce the genomic region to 2.76 Mb between the markers SFW5768 and AX-105471344. In 2021, we identified 466 recombinant plants from 4029 F2 plants (Supplementary table 5).

From the recombinant plants screening in 2020 and 2021, we selected 186 F2:3 recombinant families between the extreme markers MkMAS.1 and SFW0430 which covers the 8.4Mb genomic region (Supplementary table 6). All the 186 families were phenotyped in multipots tray using the E-BOU broomrape population. We located the recombinations around the resistant gene by designing five new markers using the data from a 600k AXIOM chip. We reduced the genomic region of the *HaOr5* gene from 8.41 Mb to 193 kb between AX-105596697 and SFW5438 markers (Fig. 2c)



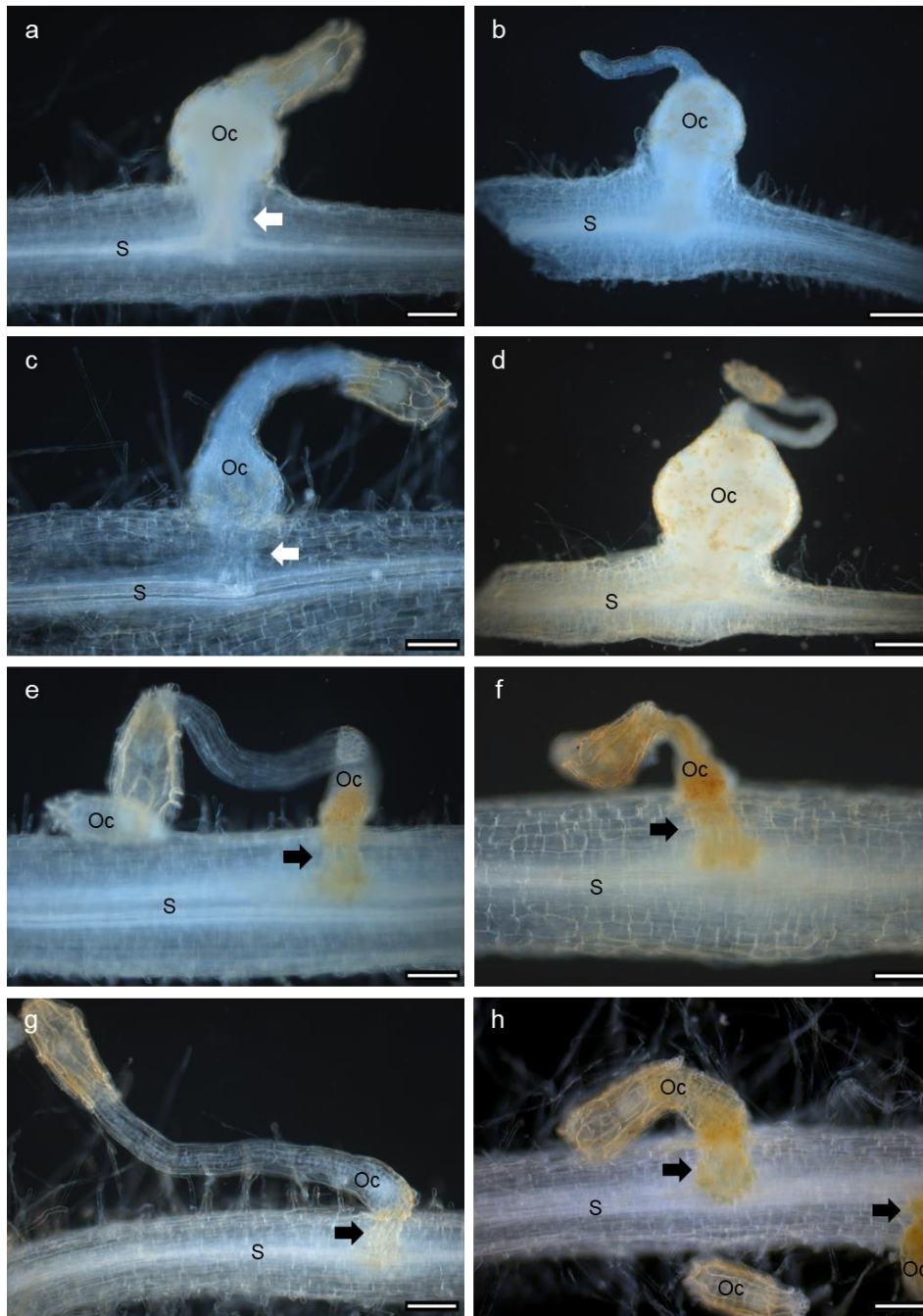
**Fig. 2 Genetic mapping of the resistance gene *HaOr5* on chromosome 3**

(a) Interval mapping of the broomrape E-RIA resistance in the F2, population 1 LSMS1xLC1093 (top, nplants=398, nSNP=227) and population 2 LSMS2xLC1093 (bottom, nplants=237, nSNP=229). LC1093 carries the *HaOr5* resistance allele, LSMS1 and LSMS2 carry the sensitive allele. For both populations, a single resistance locus was mapped on the same location of the chromosome 3. (b) Genome-Wide Association Studies of the broomrape E-

RIA resistance in two sunflower panels in 2014 (nlines=309, nSNP=28,116) and 2016 (nlines=304, nSNP=27,694) with 69 common genotypes including LSMS1, LSMS2 and LC1093. For both year, a unique SNP linked to the resistance was identified in the same region of chromosome 3 (red arrow). (c) Fine mapping of the HaOr5 resistance gene. Genetic position of molecular markers and HaOr5 resistance gene in successive recombinant populations totaling 10,223 plants. The HaOr5 R-gene was mapped in a 2.3 cM window between markers AX-105596697 and SFW5438 corresponding to 193kb (red box).

### **Mechanisms of the resistance**

We carried out a cytological study. We sampled broomrape attachments on sunflower roots grown in rhizotrons at 14 and 21 dai. The plants were inoculated with the same E-BOU race used for phenotyping in the fine mapping step. XRQ (Fig. 3a and b) and LC1093 (Fig. 3e and f) lines were used as susceptible and resistant controls respectively. Two homozygous F3:4 families were selected for the sampling, one susceptible (Fig. 3c and d) and the other resistant (Fig. 3g and h), from the same F2:3 recombinant family (20ZN0877.013). Attachments were present for all the lines at 14 dai (Fig. 3a, c, e and g), but phenotypes between susceptible and resistant could be distinguished by the absence of attachment swelling and the brownish staining at the attachment basis for the resistant lines (Fig. 3e and g). By contrast, vascular connection leading to attachment swelling was visible from 14 dai on susceptible lines and there was no brownish staining. At 21 dai, these phenotypic distinctions were even more contrasted with tubercle development observed on the susceptible lines (Fig. 3b and d) and absence of efficient vascular connections resulting into incompatible attachment on the resistant lines (Fig. 3f and h). Altogether, we concluded that the *HaOr5* prevented efficient connection of *O. cumana* race E to the sunflower vascular system and nutrient fluxes to broomrape, thus preventing tubercle development.



**Fig. 3 Cytological characterization of HaOr5 resistance to broomrape population E-BOU with contrasted homozygous F3:4 families from the same F2:3 recombinant family**

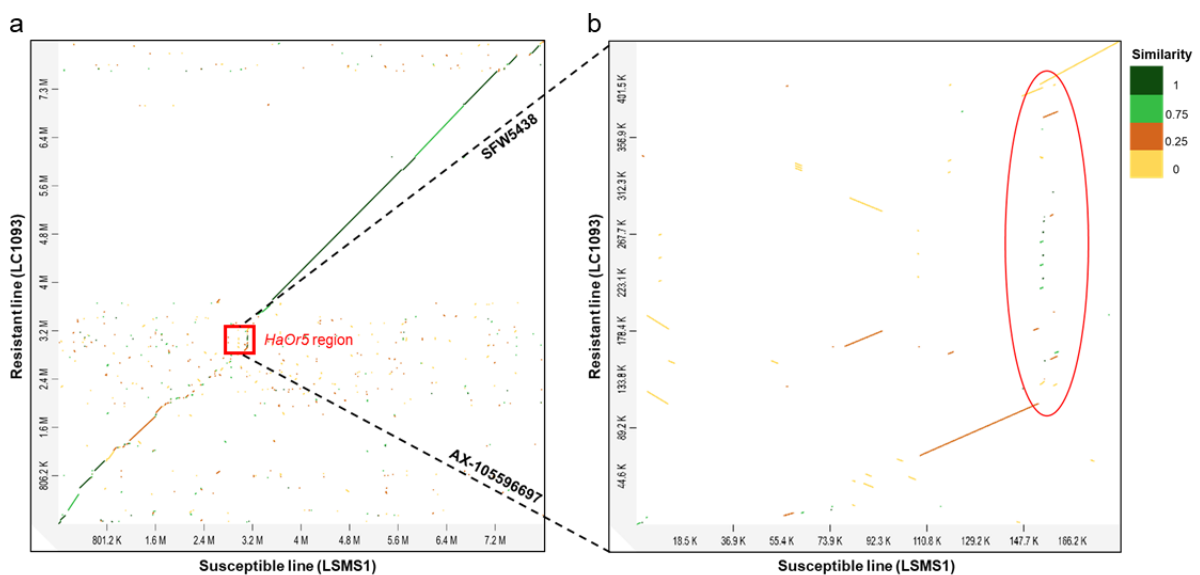
(a, b) XRQ susceptible line (c, d) susceptible F3:4 isogenic family HaOr5<sup>-</sup> (e, f) LC1093 resistant line (g, h) Resistant F3:4 isogenic family HaOr5<sup>+</sup>. Attachments were observed at 14 dai (a, c, e and g) and 21 dai (b, d, f and h). Oc=Orobancha cumana ; S=Sunflower. Bars represent 100μm (a, c, e, f, g and h), or 200μm (b and d). Black or white arrows indicate respectively compatible or incompatible attachments.

### **HaOr5 show complex genomic rearrangement**

We sequenced the whole genome of the two parental lines LC1093 and LSMS1. The genome of the LC1093 line was assembled at the chromosome level for a total size of 3.01Gb with 0.05% of missing nucleotide. Four additional contigs (from 81.5kb to 624.8kb) were not anchored. The genome of the

LSMS1 line was assembled in 17 chromosomes without unanchored contigs. The size of its genome was similar to the one of LC1093 (3.02Gb) with 0.5% of missing nucleotide. Both genomes were annotated using the same pipeline and reference data leading to similar gene contents, ie 69,385 protein-coding genes for LSMS1 and 70,002 protein-coding genes in LC1093.

We extracted the genomic sequence of LSMS1 and LC1093 between the markers Mk.MAS1 and SFW0430. We obtained a sequence length of 8.06 Mb and 8.01 Mb, for LSMS1 and LC1093 respectively. We carried out the sequence alignment with the software D-Genies. The results are shown in the Fig. 4a. We observed a large sequence of about 1.6Mb with a very low similarity in the first half of the sequences. We extracted the reduced sequence between the marker AX-105596697 and the marker SFW5438 containing the *HaOr5* gene. The sequence of the resistant line (446kb) was larger than the one of the susceptible line (184kb). We observed a very poor similarity between the two sequences (Fig. 4b) and a large insertion (approx. 295kb) in the LC1093 sequence, which contained additional structural variations (reverse duplication and inverted duplication).



**Fig. 4 Structural variation of *HaOr5* genomic region**

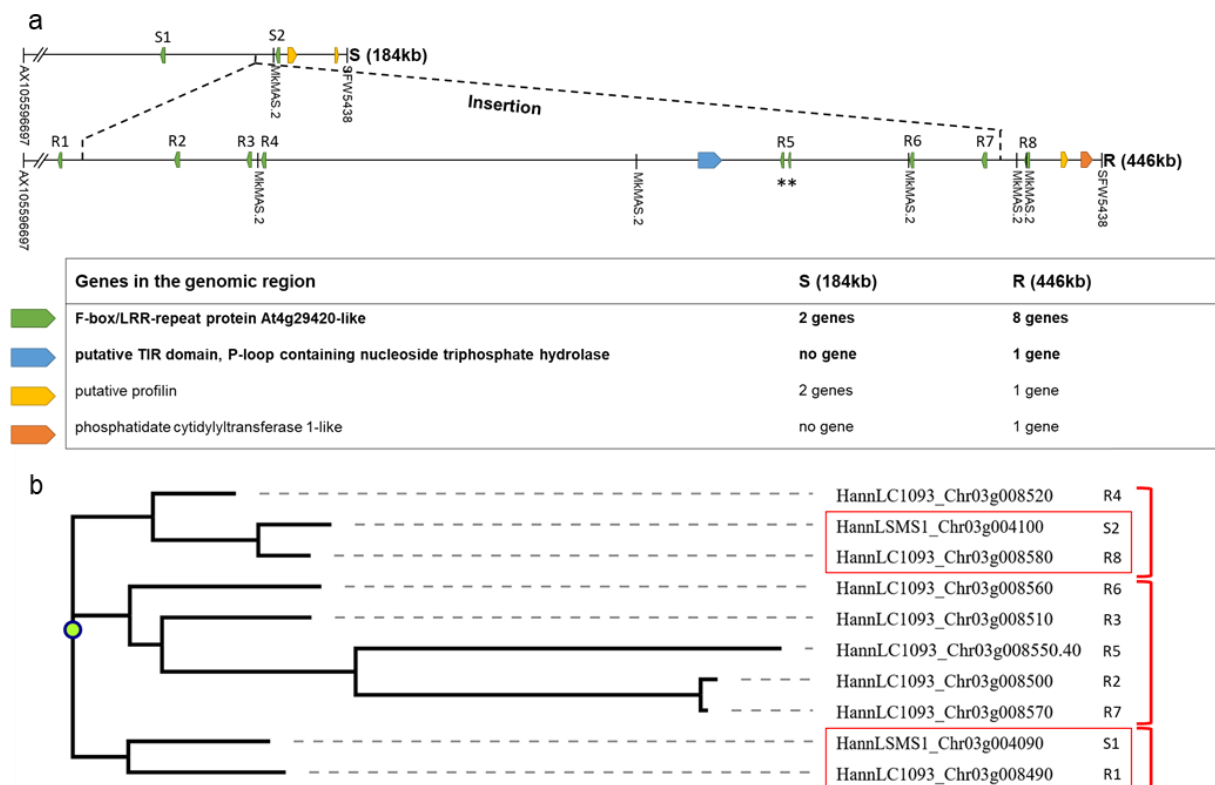
(a) Large scale alignment of susceptible LSMS1 and resistant LC1093 genomic regions between markers MkMAS.1 and SFW0430 comprising respectively 8.01Mb and 8.06Mb. (b) Close-up alignment *HaOr5*+ and *HaOr5*- between markers AX-105596697 and SFW5438 spanning 184kb in the susceptible line LSMS1 and 446kb the resistant line LC1093. Insertion in the resistant line (red ellipse) is approximately 295kb. Alignments were produced using D-Genies

The comparison of *HaOr5* gene contents showed that the short and susceptible LSMS1 sequence contained four genes encoding two F-box/LRR-repeat proteins and two putative profilin (Fig. 5a). There are eight additional genes in the LC1093 resistant genomic region, twelve predicted overall. Eight of them encoded F-box/LRR-repeat proteins, one disease resistance gene encoding a TIR domain P-loop

containing nucleoside triphosphate hydrolase, one putative profilin protein and the last one a phosphatidate cytidyltransferase 1-like protein.

By looking to the result of Multi Alignment Sequence, we identified that two miss-annotated proteins, splitted in two while there should have been considered as a single protein meaning that there were only eight genes encoding Fbox/LRR-repeat proteins instead of nine in LC1093 *HaOr5* region (Fig. 5a). We found a LTR-retrotransposon positioned at a distance of few kb from all genes except one of the two genes in the susceptible line. Interestingly, the presence/absence variation of a gene cluster and its presence in the resistance genotype agrees with the dominant resistant phenotype observed in the F1 hybrid.

The phylogenetic analysis of the two and eight F-box/LRR-repeat proteins distinguished three groups (Fig. 5b). Two groups contained each a protein from the susceptible line and either one (the first one) or two homologues from LC1093 (one being the last one). The third groups contained five proteins from the resistance background, but none from the susceptible line, suggesting the loss of 250kb region the LSMS1 susceptible genotype.



**Fig. 5 Gene content of the *HaOr5* genomic region**

(a) Genomic positions of markers and genes in the *HaOr5* region. MkMAS.2 is unique in LSMS1 susceptible background and maps at five positions in resistant LC1093 background. Genes are colored according to annotations, presence-absence and copy number variations are summarized for LSMS1 (S) and LC1093 (R). The two genes HannLC1093\_Chr03g008540 and HannLC1093\_Chr03g008550 are highlighted with a star, as they

merged and are considered as a single gene in the phylogenetic analysis. (b) Phylogeny of the F-box/LRR proteins present in HaOr5 region. Protein alignments using MAFFT of the F-box/LRR genes (2 in LSMS1 and 8 in LC1093) three groups (red brackets), corresponding to two pairs of homologue genes between S and R lines, with a local duplication R4 of the R8 gene, and a group of five genes only present in the R background with a complex duplications and rearrangements.

## Discussion

In our study, we wanted to identify the function of the protein encoded by the major resistance *HaOr5* to sunflower broomrape. We first mapped the gene and used a map-based cloning approach to fine map *HaOr5*. We sequenced of the resistant line and identified a complex region which was rich in genes encoding resistance proteins. We hypothesized that this complex genomic region was introgressed from a wild sunflower.

In addition to the cultivated sunflower *Helianthus annuus*, there are 52 species of *Helianthus*. Many wild relatives were found to be resistant to *O. cumana* (Chaubaud *et al.*, 2022). Interestingly, there are no sunflower broomrapes in North America where all the wild relatives are originated. We can hypothesize that the absence of *O. cumana* in the American continent could be related to the resistance of the wild sunflowers. *O. cumana* spread in Europe where the sunflower breeding started and extended. *Artemisia spp.* was a host of *O. cumana* (Pujadas-salvà and Velasco, 2000) and it infested sunflower when the breeding extended. In our study, we found that the intergenic sequences were highly divergent in the resistant line, indicating that the resistance could have been introgressed from a wild sunflower. The *HaOr7* resistance gene was hypothesized to have been introgressed from a wild sunflower as well (Duriez *et al.*, 2019).

Interspecific crosses between *H. annuus* and its wild relatives have been used to improve many traits in the cultivated varieties (Christov *et al.*, 1996; Seiler, Qi and Marek, 2017). *Helianthus debilis* was used to introgress the resistance gene *Or<sub>Deb2</sub>* to *O. cumana* (Velasco *et al.*, 2012; Fernández-Aparicio *et al.*, 2022). Other species were used to improve the resistance in the cultivated sunflower varieties (Cvejić *et al.*, 2020). However, because of the structural variations and the divergence of the genomic sequences compared to *H. annuus*, the recombination rate is lower and makes the breeding difficult especially attempting to reduce the size of introgressed regions. In addition, the large genomic regions can introgress genes of negative traits (Huang *et al.*, 2023).

The sequencing of the whole genome of an introgressed sunflower is now possible. Indeed, few years ago, we had to use a Bacterial Artificial Chromosome (BAC) approaches to sequence a targeted genomic region that took several weeks. Now, the sequencing technologies are much more efficient, cheaper and the sequences of better quality. Together with efficient assembly softwares, it is possible to sequence a sunflower genome within a few weeks. In contrast to our high quality genome sequences



that we produced with a high depth. Even if a low sequencing depth producing a fragmentary assembly, the chance to obtain a targeted genomic region of hundreds kb is high, making the sequencing cheaper. The sequencing of the *HaOr7* resistant gene was performed by BAC screening and sequencing. In our study, these technologic improvements allow us to sequence the whole genome of the LC1093 resistant line containing the *HaOr5* gene which was scaffolded up to 17 pseudomolecules.

Starting from this whole genome annotated sequence, we focused on the resistance interval and identified a large insertion in the resistant line containing six additional genes encoding F-box/LRR-repeat proteins. All of them were closely located near a LTR-retrotransposon. We could hypothesize that the duplications of the F-box/LRR coding genes have been mediated by LTR-retrotransposons. A similar situation was observed for the *HaOr7* resistance gene encoding a receptor like kinase with two duplicated genes (Duriez *et al.*, 2019). It has been shown since decades that LTR-retrotransposons play an important role in plant genome evolution (Galindo-González *et al.*, 2017). F-box proteins play diverse roles and hundreds of genes encode F-box in plant genomes (Lechner *et al.*, 2006; Abd-Hamid *et al.*, 2020). In tomato, the expression a F-box/LRR gene which protein binds to the EIN3 protein, is related to the tomato fruit shape (Guo *et al.*, 2018). An F-box/LRR was shown to be related to plant resistance in tobacco and in tomato (van den Burg *et al.*, 2008). The change of the genomic context within the insertion could result in the resistance to sunflower broomrape. This is consistent with the dominance of the resistance but we cannot exclude the two other genes present in the resistant line. The gene encoding a phosphatidate cytidyltransferase 1-like protein is present and located elsewhere in the genome of the susceptible line (Fig. 5a). The gene that was unique in the insertion of the resistant line encodes a TIR-NLR. TIR-NLR are well known proteins involved in the plant immune system (Liu *et al.*, 2023). It is a very good candidate gene for the *HaOr5* gene and consistent with the dominance of the resistance. It will be interesting, although not straightforward, to validate candidate genes to complement susceptible lines by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation (Parks and Yordanov, 2020). However, as the transformation efficiency is dependent of the genotype, it should be confirmed as a first step, that these susceptible lines are able to be transformed. Validating the F-box/LRR coding genes would be more difficult as there are many copies by contrast to the single gene encoding the TIR-NLR.

Finally, because of the complexity of the genomic region containing the resistance gene, we cannot conclude definitively about the gene(s) nor the molecular mechanism responsible of the resistance. A similar situation was found for the *Or<sub>Deb2</sub>* gene that was located in a complex genomic region. Indeed, even if the genomic region of the DEB2 resistant line was not available, the gene was located in a RLK-rich region on the reference genome sequence of the XRQ line (Badouin *et al.*, 2017).

We showed that the resistance of *HaOr5* gene did not prevent the adhesion nor the penetration of *O. cumana* but prevented the efficient connection of the sunflower broomrape to the root vascular system in sunflower leading to incompatible attachments and haustorium necrosis. The same phenotype was observed for the resistances expressed by *Or<sub>Deb2</sub>* (Fernández-Aparicio *et al.*, 2022) and *HaOr7* (Duriez *et al.*, 2019) genes. However, this resistance phenotype to sunflower broomrape is not universal. Indeed, Chabaud *et al.* (2022) showed that some resistances were due to a low ability to germinate the broomrape seeds and some others can affect the development of the tubercles at a later stage, following connection establishment. The *Or<sub>SII</sub>* resistance gene, located on chromosome 4, affects the development of the broomrape tubercles correlating with the synthesis of phenolic compounds (Martín-Sanz *et al.*, 2020).

The avirulence gene interacting with *HaOr5* has been shown to be a single gene in *O. cumana* involved in a gene-to-gene interaction (Rodríguez-Ojeda *et al.*, 2013). The molecular dialog between plants is fascinating but there are few genes or mechanisms that have been identified or detailed (Subrahmaniam *et al.*, 2018). Segregating populations of *O. cumana* have been successfully obtained and a genetic map has been constructed (Calderón-González *et al.*, 2019). Using such segregating populations, it has been shown that the avirulence gene interacting with *HaOr5* is a dominant monogenic locus (Rodríguez-Ojeda *et al.*, 2013). Combining with our results, it will help understanding the molecular mechanisms of the resistance to *O. cumana*. To go further, genomic and biochemistry experiments should help to identify the proteins involved in the virulence genes.

For example, plants have developed a strategy to rapidly re-colonize the area after a fire. Indeed, the smoke contain karritins that are stimulant of the seed germination (Nelson *et al.*, 2012). The KAI2 protein in *Arabidopsis thaliana* is a receptor of karritins (Smith and Li, 2014), while D14 (Yao *et al.*, 2016) perceive the strigolactones, plant hormones that regulate shoot branching and root development. In parasitic plants, there are more KAI genes, divided in three clade, the genes of one are called KAI2d, because they are divergent (Conn *et al.*, 2015). The KAI2d receptors can perceive sesquiterpene lactones, other germination stimulants than strigolactones. Sunflowers roots exudate Heliolactone, a germination stimulant specific to sunflower (Ueno *et al.*, 2014). In sorghum, a mutant producing a low amount of germination stimulant was resistant to *Striga*, another root parasitic plants (Gobena *et al.*, 2017). In sunflower, the genes involved in the biosynthesis of germination stimulants have not been identified so far. But it has been shown that some wild relatives do not induce broomrape seeds germination (Chabaud *et al.*, 2022). The STIGO research project funded by the French National Research Agency aims at identifying germination stimulants and characterizing there receptors in *O. cumana*. It could be interesting to find alleles for biosynthesis genes that do not induce the germination of *O. cumana* seeds to breed new resistant sunflower varieties.

Most of the modern sunflower varieties contain major resistance genes (*HaOr5*, *Or<sub>Deb2</sub>* and *HaOr7*) providing resistance to most of the *O. cumana* populations. The only resistance gene to *O. cumana* precisely identified encodes a receptor-like kinase (Duriez *et al.*, 2019). Two other major resistance genes to parasitic plants have been characterized and are involved in the perception of parasitic plant molecules (Albert, Axtell and Timko, 2021) and in the signaling. The *Cure1* gene encodes a LRR receptor protein that provides resistance to *Cuscuta reflexa* in tomato (Hegenauer *et al.*, 2016). Interesting, as we hypothesize for the introgressions from a wild sunflower relative for the *HaOr5* resistance, the tomato resistance gene has been introgressed from *Solanum pennellii*, a wild relative of tomato (Eshed and Zamir, 1995). It has been shown that the CURE1 membrane receptor interacts with a 119-aa glycine-rich protein (Hegenauer *et al.*, 2020). It is the first example illustrating how we can go further to understand the molecular dialog between the parasitic plants and their host. There are other strategies to identify virulence genes in parasitic plant. For example, the genome sequence of *Striga hermonthica* enabled to identify putative secreted proteins. Combined with a diversity analysis, 38 putative virulence genes have selected (Qiu *et al.*, 2022).

In cowpea, the *RSG3-301* gene is a race-specific resistance gene to *Striga gesnerioides*. They used a map-based cloning approach (Li and Timko, 2009) like in our study. The *RSG3-301* gene encodes a nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing (NLR) protein similar to the one that we considered as a very good candidate gene for *HaOr5*.

In conclusion, our study shows that the *HaOr5* gene is located in a genomic insertion of approximately 300kb that contains a cluster of putative resistance genes. The *HaOr5* resistance blocks the development of *O. cumana* race E. The sunflower broomrapes can penetrate the root but do not connect efficiently to the vascular system, preventing the feeding by the sunflower and resulting in the death of *O. cumana*. More experiments are needed to conclude definitively for the function of the *HaOr5* gene but the TIR-NLR is a very good candidate that could be validated by complementation. Another way to validate the gene would be to identify the avirulence protein and to test the interaction with the TIR-NLR. This will provide knowledge about how the host perceives parasitic plants at the molecular level. Our data will help to breed for new resistant sunflower varieties by identifying other alleles or haplotypes of the *HaOr5* region. Finally, it will be possible to evaluate the epistatic effect between *HaOr5*, *HaOr7* and *Or<sub>DEB2</sub>* for a better resistance to the highest virulent *O. cumana* population.

## Acknowledgements

We thank all students and people who worked in the nurseries for selfing and harvesting the capitula of the sunflower plants. We thank Ming Denaes for the harvesting of the seeds. Genotoul

bioinformatics platform Toulouse Midi- for providing computing resources. This work was supported by the French Laboratory of Excellence project TULIP (ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02). This study is set within the framework of the École Universitaire de Recherche TULIP-GS (ANR-18-EURE-0019).

## **Funding**

This work was funded by MAS SEEDS, INRAE, ANRT and the Region Occitanie (Genosol project).

## **Author information**

### **Authors and Affiliations**

**Laboratoire des Interactions Plantes Microbes-Environnement (LIPME), CNRS, INRAE, Université de Toulouse, Castanet-Tolosan, France**

Camille Pubert, Marie-Claude Boniface, Alexandra Legendre, Mireille chabaud, Sébastien Carrère, Nicolas Langlade, Stéphane Muños.

**Centre National de Ressources Génomiques Végétales (CNRGV), INRAE, Castanet-Tolosan, France**

Caroline Callot, Charlotte Cravero, Isabelle Dufau, Sonia Vautrin.

**MAS SEEDS, Haut-Mauco, France**

Mihaela Patrascoiu, Aurélie Baussart, Claire Coussy.

**Plateforme de Géotypage et séquençage en Auvergne (Gentyane), INRAE, Clermont Ferrand, France**

Elodie Belmonte, Véronique Gautier, Charles Poncet.

**Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, China**

Jun Zhao.

**Postdoctoral Research Station of Mizuda Group, Huzhou 313000, and Institute of Crop Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China**

Luyang Hu, Weijun Zhou.

## **Contributions**

Camille Pubert coordinated the selection of the recombinant plants and participated to the fine mapping, the genomic analysis, the markers design, the molecular experiments and the phenotyping.

Marie-Claude Boniface coordinated the nursery, the phenotyping and the harvesting of the plants and the seeds. Alexandra Legendre did the gDNA extractions and the genotyping experiments. Mireille Chabaud performed the cytological experiments. Sébastien Carrère annotated the genome sequences. Caroline Callot prepared the sequencing libraries. Isabelle Dufau performed the optical map experiments. Charlotte Cravero assembled the genome sequences. Sonia Vautrin coordinated the Genosol project for genome sequences assembling. Mihaela Patrascioiu supervised the production of the F2 population. Aurélie Baussart participated to the phenotyping of the parental lines and phenotyped the plants for QTL mapping and GWAs. Véronique Gautier and Elodie Belmonte did the sequencing. Charles Poncet coordinated the sequencing. Jun Zhao collected the *O. cumana* Chinese population. Luyang Hu characterized the *O. cumana* Chinese population. Weijun Zhou supervised the characterization of the *O. cumana* Chinese population. Claire Coussy did the QTL mapping and GWAs analysis. Nicolas Langlade, Claire Coussy and Stéphane Muños supervised the study. Claire Coussy and Stéphane Muños designed the study. Stéphane Muños coordinated the study. Camille Pubert and Stéphane Muños contributed to data analysis and wrote the manuscript. All authors contributed and revised the manuscript.

### **Corresponding Author**

Correspondence to Stéphane Muños, [stephane.munos@inrae.fr](mailto:stephane.munos@inrae.fr), ORCID: 0000-0003-0261-2759

### **Declarations**

We declare no conflicts of interest in regard to this manuscript.

### **Supplementary data**

**Supplementary table 1** Informations on *Orobanche cumana* populations

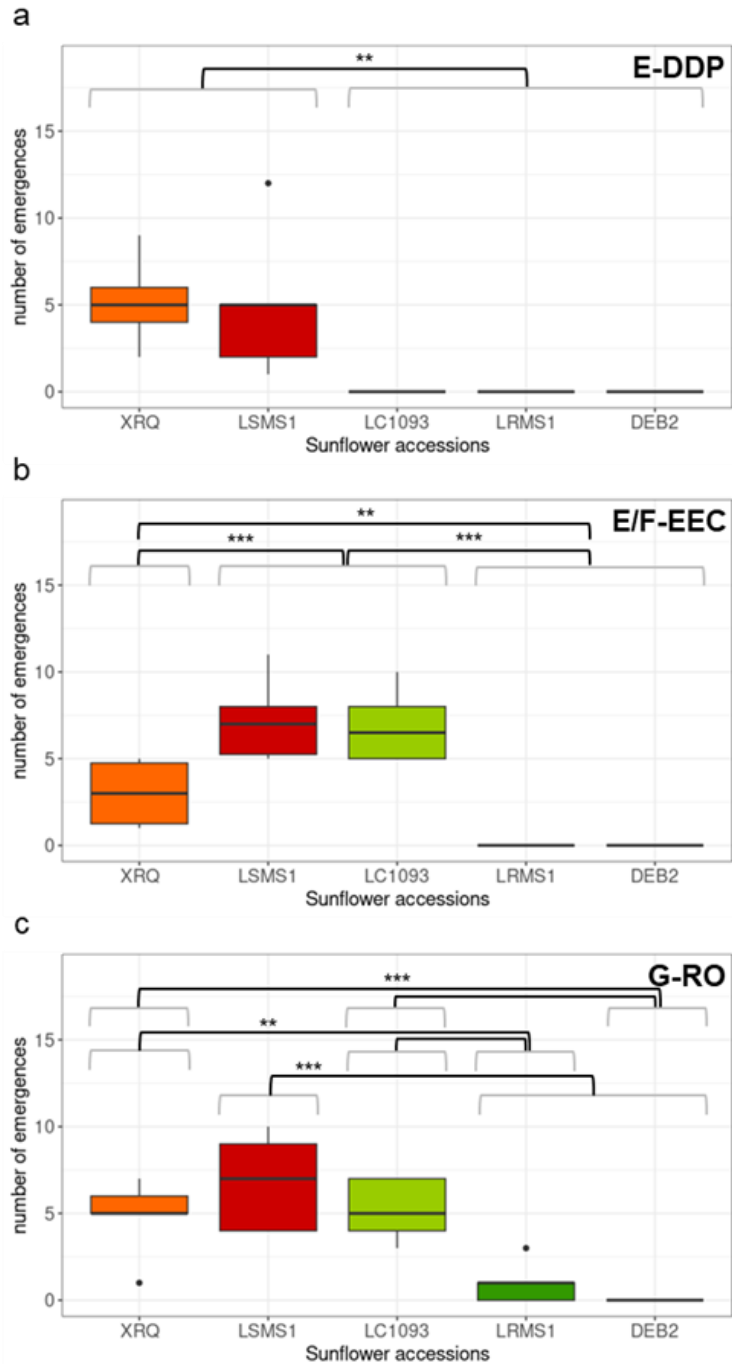
**Supplementary table 2** Informations on SNP markers used for genotyping

**Supplementary table 3** Genotypic and phenotypic data of the F2 recombinants used for the mapping using Cartagene (Fig.2).

**Supplementary table 4** List of the selected F2 recombinants in spring 2020 with the genotypic data obtained for each plant using four markers within the genomic region of HaOr5 gene.

**Supplementary table 5** List of the selected F2 recombinants in spring 2021 with the genotypic and phenotypic data obtained for each plant using three markers within the genomic region of HaOr5 gene.

**Supplementary table 6** List of 186 phenotyped F2 recombinants with genotypic and phenotypic data



**Supplementary Fig. 1 Evaluation of the resistance for various broomrape populations**

The parental lines LSMS1 and LC1093 were phenotyped using six broomrape populations (E-DDP, E-BOU, E/F-EEC, F-IN23, G-KZP and G-RO) in 3L pots in greenhouse. The figure represents the results for E-DDP, E/F-EEC and G-RO populations (see Fig. 1 for the three others). We added the susceptible line XRQ and two resistant lines LRMS1 and DEB2 carrying the resistance gene HaOr7 and OrDeb2 respectively as controls. Broomrape emergences were counted 12 weeks after inoculation. Significant pair-wise t-tests between lines are grouped for clarity and illustrated as \*\*\*  $p < 0.01$  and \*\*  $p < 0.05$ .

## **Chapitre 3 : Travail sur la caractérisation du mécanisme de résistance secondaire**

### **I. Contexte, observations et analyses génétiques chez MAS Seeds**

Ce chapitre porte sur les travaux réalisés dans le cadre du deuxième axe de la thèse, la caractérisation d'une résistance secondaire entraînant la nécrose des tubercules de l'orobanche en vue d'identifier des gènes candidats.

#### **1. Observations phénotypiques et analyses génétiques**

Deux lignées présentant cette résistance ont été mises à disposition par MAS Seeds LR2MS1 et LR2MS2 ainsi qu'une lignée sensible LS2MS ayant servi avec LR2MS1 à produire une population de RILs. Les deux lignées résistantes ont été identifiées suite à différents tests phénotypiques réalisés par l'entreprise. Ils ont réalisé des tests au champ (évaluation du nombre d'émergences) et en biotest (évaluation de l'interaction au stade jeune tubercule) avec des races allant de E à G. Les résultats obtenus ont montré une incohérence de classification entre les deux types de tests, lignées résistantes au champ et sensibles en biotest. Ils ont pu observer des émergences nécrosées durant leurs tests au champ et des tubercules nécrosés ont été observés en rhizotron dans le cadre du projet Imago de l'équipe Sunflower Pest Interactions. La population issue du croisement LR2MS1 et LS2MS a servi pour des analyses génétiques, dans l'objectif d'identifier la position de la résistance et des marqueurs liés pour le travail de sélection. Une étude d'association (GWA) a été réalisée avec pour données phénotypiques le nombre d'émergences par plante et pour données génétiques des marqueurs SNP polymorphes entre les deux parents (puce AXIOM). Les résultats de l'analyse n'ont pas permis d'identifier de SNP liés à la résistance.

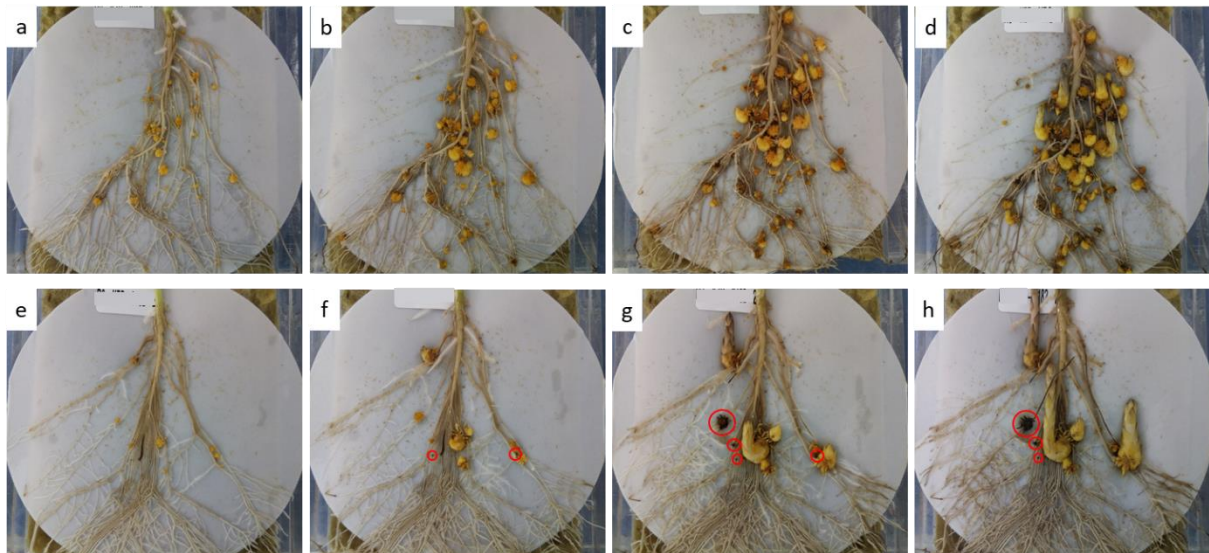
#### **2. Stratégie et objectifs de la thèse**

Dans ce cadre, l'objectif de ma thèse sur cette partie était de réaliser des analyses métabolomiques et transcriptomiques dans le but d'identifier des éléments permettant de remonter vers des gènes candidats, via les voies métaboliques liées à la résistance et l'expression différentielle des gènes durant l'interaction. Pour pouvoir réaliser ces tests, des travaux de caractérisation de l'interaction ont été mis en place pour définir le protocole de prélèvements à mettre en place (le support, la ou les races d'orobanche, les dates des prélèvements). Les résultats obtenus dans cette partie ont permis d'avancer sur la caractérisation de cette résistance ainsi que sur la mise en place du protocole de prélèvements et d'ouvrir à d'autres types d'analyses pour continuer à caractériser la résistance.

## II. Premiers tests de caractérisation et problématiques rencontrées par le système

### 1. Observation de l'interaction en rhizotrons

Les premiers tests menés avaient pour objectif d'observer et valider le développement en rhizotrons de l'interaction des trois lignées (LR2MS1, LR2MS2 et LS2MS) avec différentes races d'orobanche de E à G (France E-BOU, Chine E-DDP, Espagne E/F-EEC, Ukraine G-KZP et Roumanie G-GRO). Les rhizotrons permettent d'observer les premiers stades d'interaction avec l'évaluation du taux de germination (7 jours après inoculation), le comptage des attachements (14 jours après inoculation) et le comptage des tubercules sains et nécrosés sur photos (21, 28, 35 et 42 jours après inoculation) (Figure 21). Le protocole utilisé correspond à celui présenté par Le Ru et al. (2021) avec une modification du développement des plantules de tournesol. Les graines après désinfection sont directement semées en plaques alvéolées (mélange 50/50 de sable et vermiculite). Les témoins utilisés durant ces tests sont XRQ comme témoin sensible et LRMS1 (porteur du gène *HaOr7*) et/ou DEB2 (porteur du gène *Or<sub>Deb2</sub>*) comme témoin résistant. Cinq rhizotrons ont été montés par génotype de tournesol, par test avec une race d'orobanche. L'arrosage des rhizotrons a été fait avec une demi-solution nutritive Long Ashton contenant 370 µM de phosphate, trois fois par semaine. Au total, cinq tests ont été réalisés, chaque test correspondant à une race d'orobanche et cinq rhizotrons par génotype de tournesol ont été faits à chacun des tests.



**Figure 21** : Photos de l'évolution d'un rhizotron de XRQ (a, b, c et d) et d'un rhizotron de LR2MS2 (e, f, g et h) avec l'orobanche G-KZP, à 21 jours après inoculation (a et e), 28 jours après inoculation (b et f), 35 jours après inoculation (c et g) et 42 jours après inoculation (d et h). Des tubercules nécrosés sont présents sur les photos g, g et h (cercles rouges)

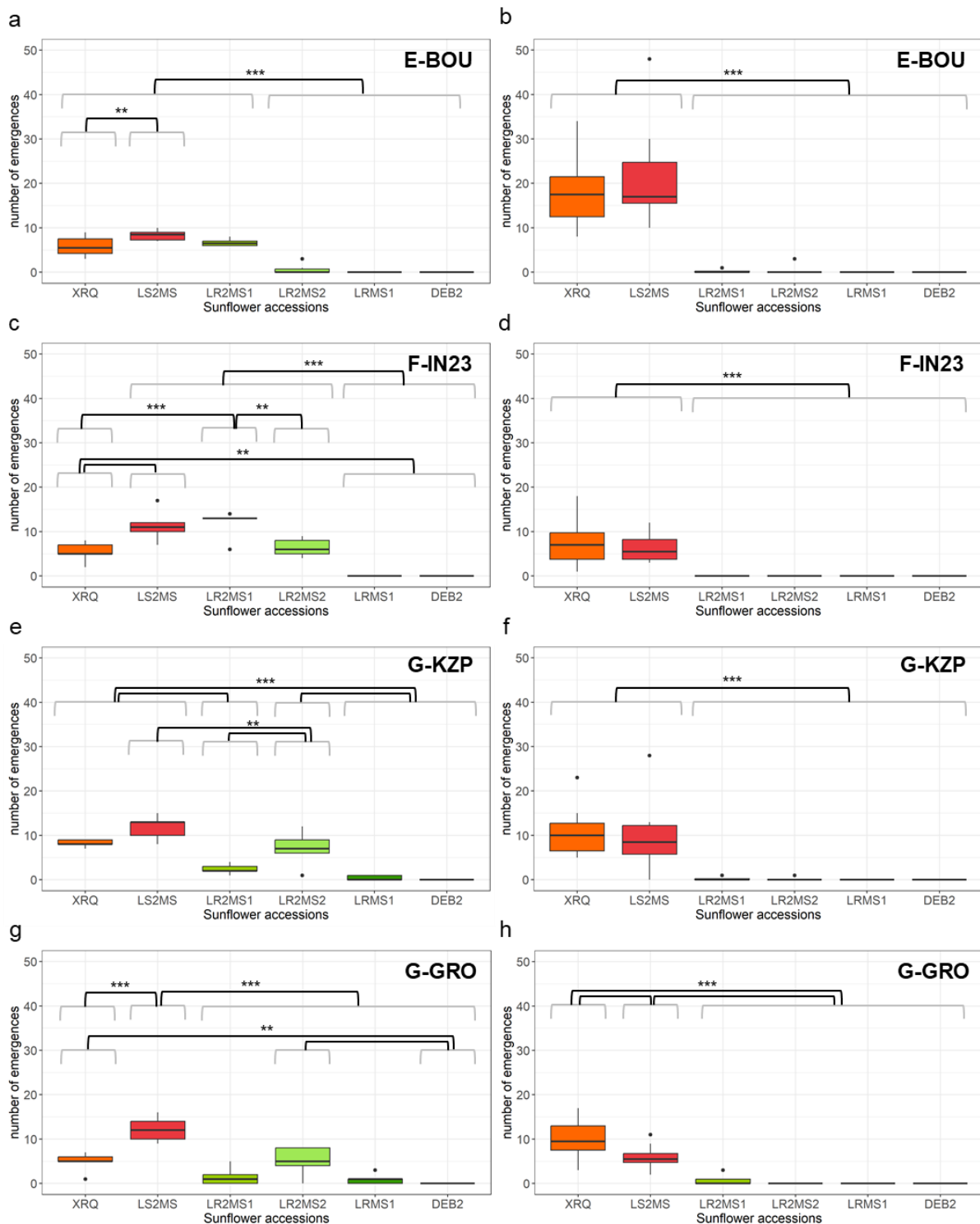


La quantité de tubercules développés est moins importante chez LR2MS1 et LR2MS2 que chez le témoin sensible XRQ. Par exemple, pour E-BOU, 64 tubercules ont été comptés en moyenne pour XRQ contre 24,5 pour LR2MS1 et 30,4 pour LR2MS2. Pour G-KZP, 62,25 tubercules ont été comptés en moyenne pour XRQ contre 13,75 pour LR2MS1 et 14,4 pour LR2MS2. Les premiers tubercules nécrosés ont principalement été observés lors des comptages à 28 jours et plus rarement à partir de 21 jours (1 tubercule nécrosé sur 1 ou 2 rhizotrons de LR2SM2 avec les deux races G). Les nécroses observées ne sont pas toutes survenues au même stade de développement des tubercules (Figure 21 photo f, g et h). J'ai également observé des tubercules nécrosés chez les génotypes sensibles, XRQ et LS2MS. Néanmoins, le ratio de tubercules nécrosés sur l'ensemble des tubercules est moins important que celui des génotypes résistants dans la majorité des cas (différences variables entre les races d'orobanches). Je n'ai pas réalisé d'analyses statistiques pour évaluer la significativité par rapport aux objectifs définis de ces premiers tests. Pour finir, j'ai également observé un brunissement des systèmes racinaires sur la durée des tests.

## 2. Observation de l'interaction en pots

Pour compléter la caractérisation, nous avons également observé l'interaction au stade émergence à l'aide de tests en pots de 3 L et de 10 L. Pour les deux tests, nous avons utilisé les mêmes génotypes de tournesol que les tests en rhizotrons (LR2MS1, LR2MS2, LS2MS, XRQ, LRMS1 et DEB2) et les races d'orobanche suivantes E-BOU, F-IN23, G-KZP et G-GRO (origine France, Espagne, Ukraine et Roumanie respectivement). Cinq pots par génotype ont été réalisés pour le test en 3 L et huit pots par génotype pour le test en 10 L, ceci pour chaque race d'orobanche. Les résultats présentés sur la figure 22 correspondent au comptage des émergences 83 jours après le semis pour les pots de 3 L (graphique a, c, e et g) et pour les pots de 10 L (graphiques b, d, f et h). Pour les deux tests, les témoins présentent les phénotypes attendus, sensible pour XRQ et résistant pour LRMS1 et DEB2. A contrario, les résultats obtenus pour LR2MS1 et LR2MS2 ne sont pas concordants avec ceux obtenus précédemment par MAS Seeds. En effet, des émergences ont été comptabilisées avec les quatre races sur tous les pots à l'exception de E-BOU pour LR2MS2 et G-GRO pour LR2MS1. Ces résultats nous ont amenés à réaliser le test en pots de 10 L pour se rapprocher des conditions du champ. Les résultats de ce deuxième test sont similaires à ceux obtenus précédemment par MAS Seeds avec pas ou très peu d'émergences pour les quatre races d'orobanches. Pour pouvoir mieux comparer et valider les résultats, j'ai utilisé le même test de comparaison que celui utilisé durant le travail sur *HaOr5* (pair-wise t-test, \*\*\*  $p < 0,01$  et \*\*  $p < 0,05$ ). Pour le test en pots de 3 L avec E-BOU, le phénotype observé de LR2MS1 est significativement différent des témoins résistants, mais pas des lignées sensibles alors que pour le phénotype de LR2MS2, c'est l'inverse. Pour la race F-IN23, LR2MS1 et LR2MS2 sont significativement différents des témoins résistants. Pour les deux races G, le phénotype de LR2MS2 est significativement

différent de celui de DEB2, ce qui n'est pas le cas de LR2MS1. Pour le test en pots de 10 L, les phénotypes de LR2MS1 et LR2MS2 sont significativement différents des lignées sensibles XRQ et LS2MS et non différents des témoins résistants.



**Figure 22 :** Evaluation de l'interaction des géotypes LS2MS, LR2MS1 et LR2MS2 (témoin sensible XRQ et témoins résistants LRMS1 et DEB2) au stade émergence avec 4 races d'orobanches E-BOU (a et b), F-IN23 (c et d), G-KZP (e et f) et G-GRO (g et h) en pots de 3 L (a, c, e et g) et en pots de 10 L (b, d, f et h). La significativité des résultats est évaluée en comparaison géotype par géotype avec une analyse pair-wise t-test (\*\*\*)  $p < 0,01$  et \*\*  $p < 0,05$

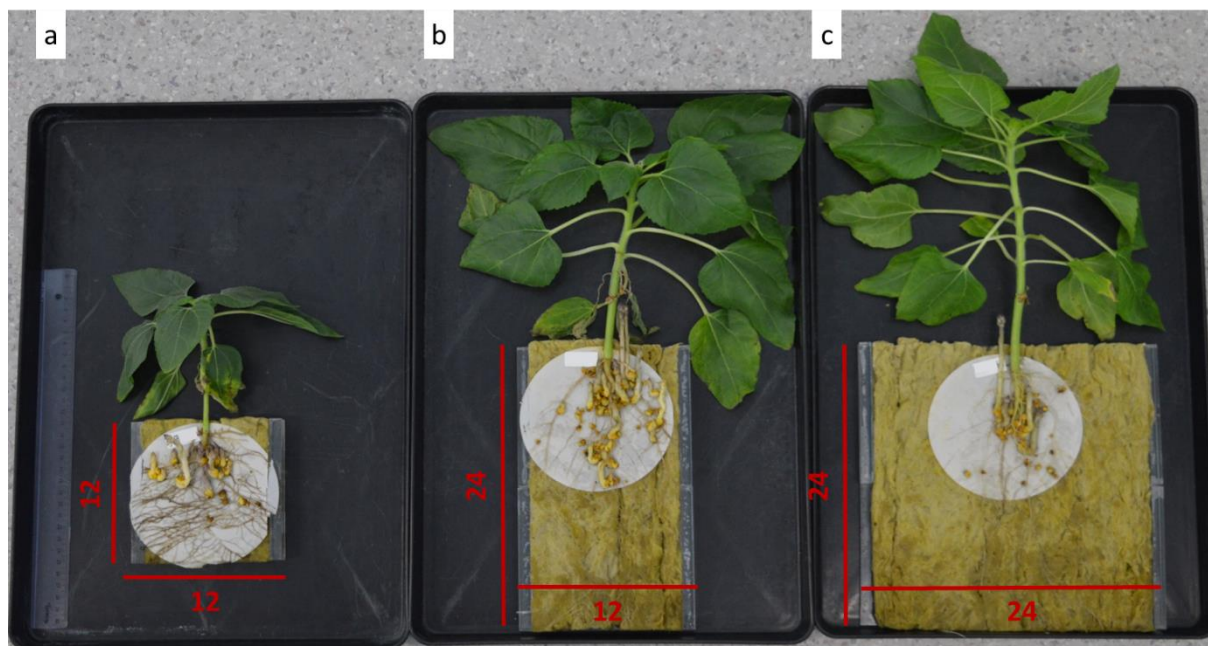
### **3. Problématiques rencontrées par le système**

Les premiers tests en rhizotrons ont permis de confirmer le développement correct de l'interaction pour les deux lignées LR2MS1 et LR2MS2 avec la présence de tubercules nécrosés. En plus de l'observation des premiers stades d'interaction, les rhizotrons sont un système facilitant les prélèvements grâce à l'absence de substrat en contact avec le système racinaire et l'étalement de ce dernier sur le filtre. Cependant, les systèmes racinaires ont pris un aspect bruni sur la durée des tests. Dans le cadre des prélèvements, nous avons estimé que ce brunissement entraînerait un bruit de fond pour les analyses de métabolomiques et transcriptomiques. Avec les tests en pots, nous avons observé une différence de phénotype en fonction de la taille du contenant. Cette différence nous a amenés à émettre l'hypothèse que la résistance secondaire est impactée lorsque les tournesols sont stressés, ici le stress est lié à la petite taille des pots. Ensuite, le test en pots de 3 L nous a également permis d'observer une différence de réponse entre les deux lignées en fonction des races. Ces résultats semblent mettre en évidence une différence dans le mécanisme de résistance malgré le phénotype de résistance similaire. Pour la suite des analyses de cette partie, il nous a fallu chercher un moyen de réduire le brunissement du système racinaire et de limiter les risques de stress des tournesols.

## **III. Evaluation de solutions pour répondre aux problématiques et suite de la caractérisation**

### **1. Test de différents formats de rhizotrons**

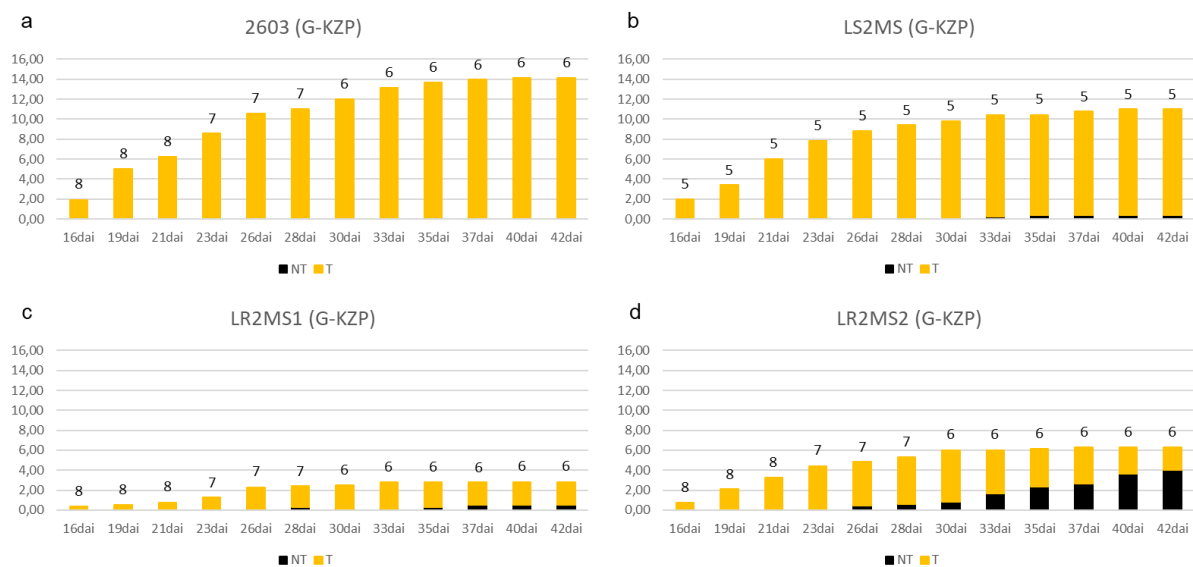
Pour essayer de limiter le brunissement, j'ai testé deux autres formats de rhizotron (24 cm par 12 cm et 24 cm par 24 cm), mais toujours avec la même taille de filtre (surface recevant la plantule de tournesol et les graines d'orobanches) (Figure 23). L'objectif de ce changement de format était de réduire le contact du système racinaire utilisable avec le fond des caisses et avec la solution nutritive lors des arrosages. Le test de comparaison des différentes tailles a été réalisé avec les génotypes LS2MS et LR2MS2 et la race G-GRO. J'ai pu observer une amélioration du développement du système racinaire et de la partie aérienne du tournesol, mais pas d'amélioration au niveau du brunissement du système racinaire.



**Figure 23** : Photos des différents formats de rhizotrons de LS2MS avec la race G-GRO, format classique 12x12 cm (a), format moyen 24x12 cm (b) et grand format 24x24 cm (c)

## 2. Cinétique de l'interaction en grands rhizotrons

Malgré cette observation, l'amélioration du développement du tournesol avec les grands formats de rhizotrons nous a amenés à utiliser ce format pour réaliser une cinétique plus précise de l'interaction. L'objectif de cette cinétique était de mieux caractériser le développement des tubercules pour essayer d'optimiser le choix des dates de prélèvements. J'ai réalisé cette nouvelle expérimentation en grands rhizotrons en suivant le même protocole que celui des premiers tests. Sauf pour l'arrosage qui s'est fait un temps sur le dessus du rhizotron avant d'être mis dans le bac pour éviter le dessèchement du filtre et de la plantule. Les géotypes de tournesols utilisés sont LS2MS, LR2MS1, LR2MS2 et 2603 comme témoin sensible avec l'orobanche G-KZP. Le comptage des tubercules a été réalisé trois fois par semaine à partir de 16 jours après inoculation jusqu'à 42 jours après inoculation. Cinq grands rhizotrons ont été réalisés pour LS2MS et 9 pour 2603, LR2MS1 et LR2MS2. Quatre de ces derniers grands rhizotrons (2603, LR2MS1 et LR2MS2) étaient destinés à des prélèvements pour réaliser des observations cytologiques à 14, 21 et 28 jours après inoculation.



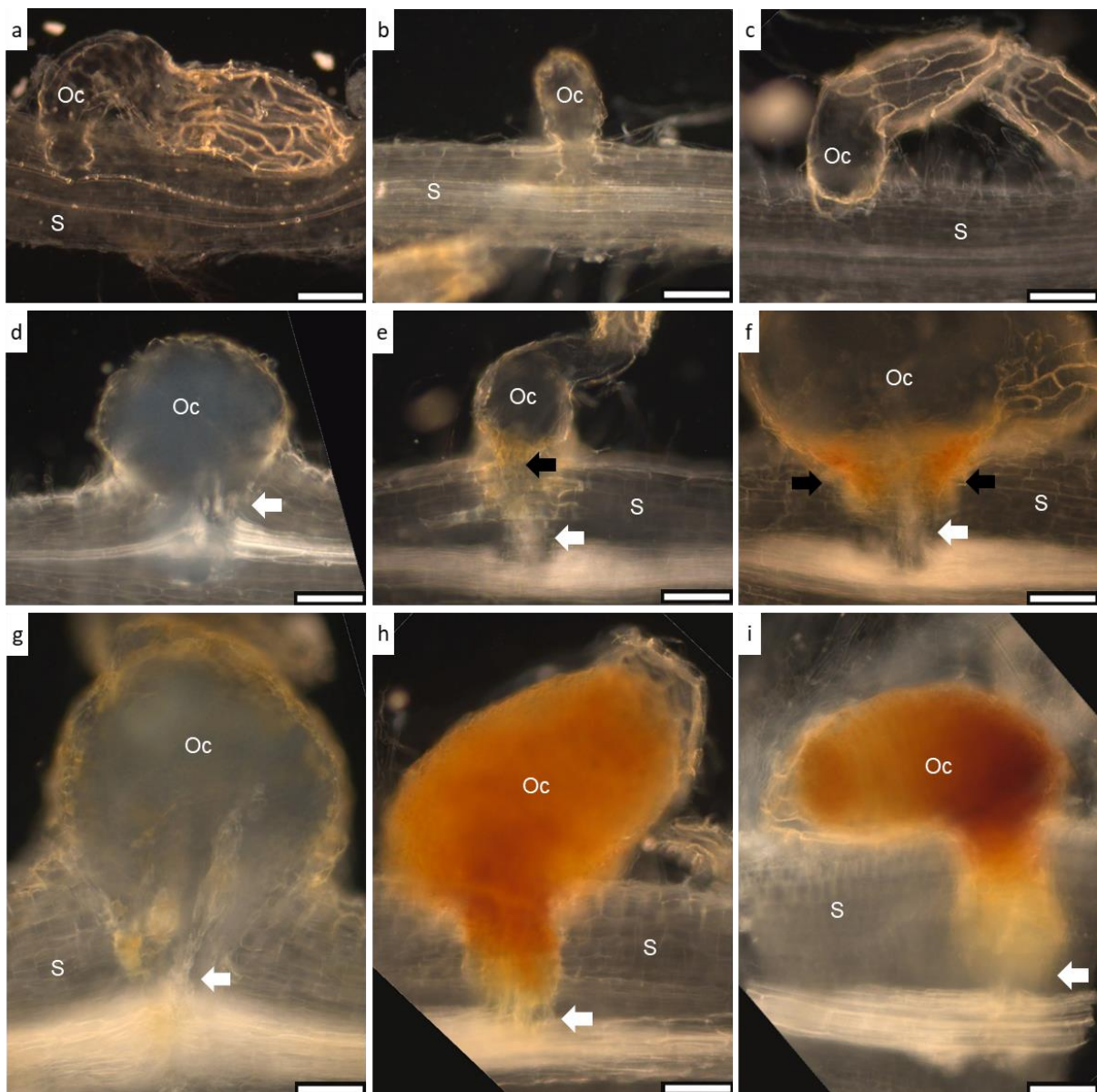
**Figure 24 :** Représentations graphiques des cinétiques du développement moyen des tubercules de l’orobanche G-KZP avec les tournesols 2603 (a), LS2MS (b), LR2MS1 (c) et LR2MS2 (d). NT=tubercule nécrosé (en noir) et T=tubercule sain (en jaune), les chiffres au-dessus des barres correspondent au nombre de rhizotrons évalué.

La figure 24 présente les cinétiques de développement moyen des tubercules sains en jaune et des tubercules nécrosés en noirs et les chiffres au-dessus des barres correspondent au nombre de rhizotrons utilisés pour le comptage. Comme pour les premiers tests, j’ai observé moins de développement de tubercules chez LR2MS1 et LR2MS2 que chez le témoin sensible. L’apparition des premiers tubercules nécrosés intervient à 26 jours pour LR2MS2 et 28 jours pour LR2MS1. Ces deux lignées présentent également moins de développement de tubercules que les lignées sensibles 2603 et LS2MS. Pour LS2MS, un seul tubercule nécrosé a été observé sur deux des cinq rhizotrons du génotype et ils sont apparus plus tardivement à 33 et 35 jours après inoculation.

### 3. Observation de l’interaction en cytologie

Deux types d’observations ont été réalisés à partir de segments de racine de tournesol avec un attachement d’orobanche à 14, 21 et 28 jours. Tout d’abord, l’interaction a été observée par transparence (Figure 25). Les échantillons (3 à 7 par génotype) ont été déposés dans une solution d’acide acétique et fixés par infiltration sous vide pendant 10min. Puis ils ont été éclaircis à l’aide d’une solution de chloral hydrate (5g/mL) pendant une nuit pour ensuite être observés au microscope (Axioplan 2, Zeiss). J’ai pu observer à 14 jours des attachements pas encore connectés au système vasculaire pour les trois génotypes (2603, LR2MS1 et LR2MS2) (Figure 25 a, b et c) et des attachements connectés pour LR2MS2. A 21 jours, tous les échantillons étaient connectés au système vasculaire avec le début plus ou moins important du gonflement de l’orobanche sauf pour un échantillon de LR2MS1 qui n’était pas encore connecté. Un brunissement à la base de l’orobanche a été observé sur plusieurs échantillons de LR2MS1 et LR2MS2 (Figure 25 e et f). Pour finir à 28 jours, l’ensemble des échantillons

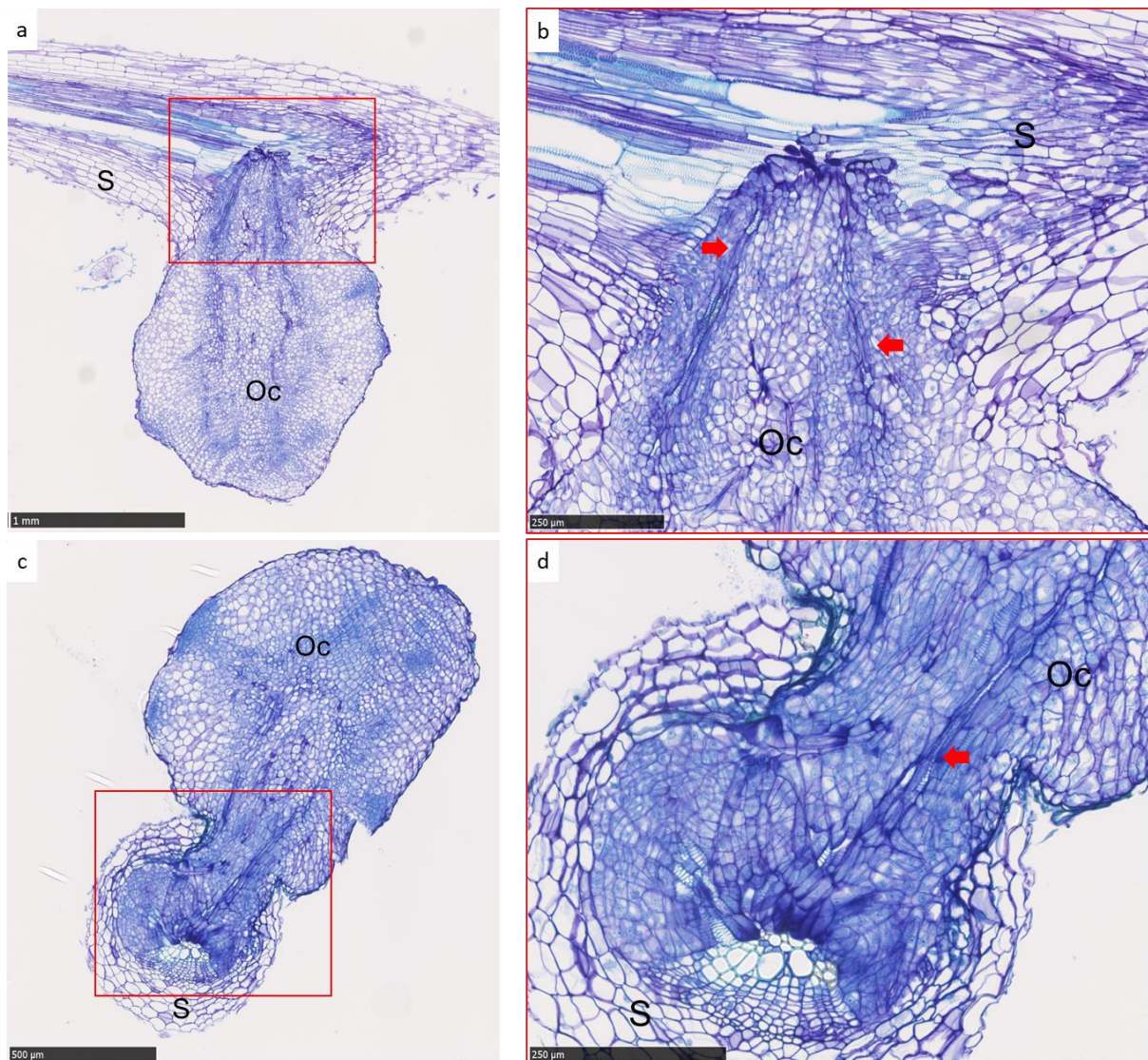
présentaient un attachement connecté avec ou sans développement du tubercule (Figure 25 g, h et i). De plus, les échantillons de LR2MS1 et LR2MS2 étaient soit partiellement soit complètement brunis (nécrosés) (Figure 25 h et i).



**Figure 25 :** Observations par transparence de l'interaction des génotypes de tournesol 2603 (a, d et g), LR2MS1 (b, e et h) et LR2MS2 (c, f et i) avec l'orobanche G-KZP à 14 jours (a, b et c), 21 jours (d, e et f) et 28 jours (g, h et i) après inoculation. S=Tournesol et Oc=Orobanche cumana. La barre correspond 100 µm sur chaque photo. Les flèches blanches pleines indiquent la connexion au système vasculaire et les flèches noires indiquent le brunissement de la base de l'orobanche.

Ensuite, des échantillons ont également été prélevés pour réaliser des coupes fines de l'interaction et pouvoir observer au niveau cellulaire l'interaction. Les échantillons sont fixés dans une solution de FAA (10 % formaldéhyde, 5 % d'acide acétique et 50 % éthanol) par infiltration sous vide 5 min, puis conservés dans l'éthanol 70 % après 3 rinçage à l'éthanol 50 %. Ils sont ensuite déshydratés à l'éthanol et imprégnés pour les inclure dans des blocs (Technovit 7100). Des sections de 10 µm sont découpées

et mises sur des lames pour coloration avec du bleu de toluidine (0,2 %). Les lames sont ensuite scannées au NanoZoomer. L'ensemble des échantillons ont été inclus durant ma thèse mais je n'ai pas eu le temps de réaliser l'ensemble des coupes. La figure 26 correspond à un échantillon de 2603 (Figure 26 a et b) et un échantillon de LR2MS2 (Figure 26 c et d) à 21 jours après inoculation. Dans les deux cas, l'orobanche est connectée au système vasculaire du tournesol et la formation du tubercule a commencé.



**Figure 26** : Coupe longitudinale de l'interaction entre le tournesol 2603 et l'orobanche G-KZP (a et b) et coupe transversale de l'interaction entre LR2MS2 avec l'orobanche G-KZP (c et d), 21 jours après l'inoculation. Les photos b et d sont des grossissements numériques de la connexion de l'orobanche au système vasculaire du tournesol (encadré rouge). S=Tournesol et Oc=Orobanche cumana. La barre correspond à 1 mm (a), 500 µm (c) et 250 µm (b et d). Les flèches rouges indiquent les vaisseaux du xylème de l'orobanche permettant de relier les systèmes vasculaires du tournesol et de l'orobanche

#### 4. Séquençage complet des génomes

En complément de ces tests, les génomes des lignées LS2MS, LR2MS1 et LR2MS2 ont été complètement séquencés. Le travail a été réalisé par le CNRGV et la plateforme de séquençage Gentyane. Il est similaire à celui fait pour les génomes de la partie *HaOr5* à l'exception de l'extraction faite cette fois-ci directement par le CNRGV. Les trois génomes obtenus sont de bonnes qualités avec une taille proche des 3,2 Gb du génome de référence XRQ et de faible taux de nucléotides manquants (0,02 % pour LS2MS et LR2MS2 et 0,03 % pour LR2MS1).

#### **IV. Discussion et perspectives de la caractérisation de la résistance secondaire**

Les différents tests réalisés ont permis d'observer le développement de l'interaction entre les lignées porteuses de résistance secondaire et différentes races d'orobanches. J'ai pu observer un développement en moins grande quantité des tubercules. Le début de l'observation de tubercules nécrosés intervient entre 26 et 28 jours en fonction des tests et du génotype de tournesol. De plus, les tubercules ne se sont pas nécrosés au même stade de développement. Les résultats de l'étude du stade émergence m'a amené à émettre l'hypothèse d'une diminution de la résistance en cas de stress de la plante et également l'existence d'une différence de mécanismes entre les deux lignées étudiées. Les observations cytologiques ont permis de voir un début de réaction de défense vers 21 jours après inoculation avec le brunissement de l'orobanche à partir de la base, partie en contact avec les cellules du tournesol. Nous pouvons supposer que ce brunissement à un stade assez précoce de l'interaction, attachement connecté sans gonflement, est à l'origine du nombre moins important de tubercules développés.

Au niveau de la préparation des prélèvements pour les analyses métabolomiques et transcriptomiques, le système des grands rhizotrons ne nous a pas permis de nous affranchir du brunissement du système racinaire. Pour pouvoir corriger le bruit de fond, 3 modalités devront être prélevées, racines seules (rhizotrons inoculés à l'eau), tubercules sains et tubercules nécrosés. L'évolution de la résistance rend cependant compliquée la sélection de tubercules complètement sains, d'autant plus avec la demande d'une quantité définie de matériel nécessaire pour les analyses. Pour pallier cette problématique, l'usage de descendants des lignées étudiées présentant un phénotype sensible et résistant pourrait permettre d'avoir un fond similaire et de faciliter l'identification des éléments liés au mécanisme de résistance.

Pour la suite, il serait intéressant de finir et de répéter sur un plus grand nombre les analyses cytologiques réalisées. Les résultats permettraient à la fois de mieux caractériser le mécanisme de résistance et d'aider et orienter l'identification des voies métaboliques et des gènes liés. L'observation



au niveau cellulaire avec les coupes fines et différentes colorations pourrait permettre d'observer des modifications des cellules ou l'apparition d'éléments de défense. Par exemple, Jhu et al. (2022) a pu mettre en évidence l'accumulation de lignine à partir de coupe fine entre une variété de tomate et *Cuscuta campestris*. D'autres types d'analyses histologiques pourraient également aider telles que l'observation sous fluorescence des tubercules nécrosés comme cela a été fait par Martín-Sanz et al. (2020), permettant de mettre en évidence l'accumulation de composés phénoliques dans les tubercules d'orobanches.

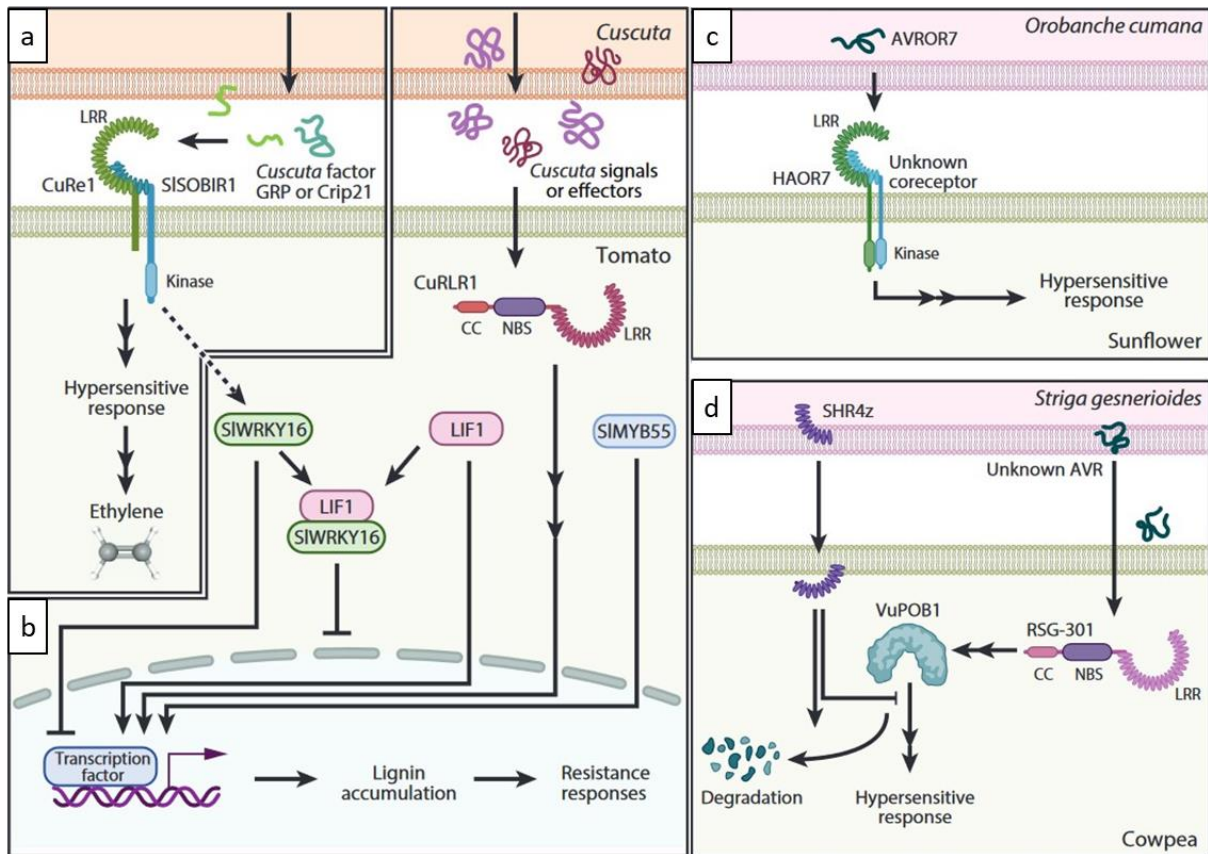
Ensuite, l'obtention des génomes va permettre de mieux comparer le polymorphisme entre les lignées et donc potentiellement de réaliser un criblage plus efficace. Les précédentes analyses génétiques ont été faites à partir de marqueurs polymorphes issus de la puce AXIOM et du set de marqueurs de MAS Seeds. Certaines zones ne sont pas ou moins bien criblées. L'utilisation d'autres sets de marqueurs ou d'autres analyses pourraient permettre de mettre en évidence des zones candidates liées à la résistance.

En conclusion, le travail réalisé dans cette partie a amené des éléments de caractérisations de la résistance secondaire, tels que la différence du développement des tubercules, l'observation des différents stades de développement où interviennent la nécrose et l'observation du début de la résistance. Ces éléments ont ouvert à d'autres réflexions de tests pour pouvoir faciliter la suite des analyses en orientant les analyses pour l'identification des voies métaboliques et génétiques. L'obtention des génomes est également un atout qui pourra aider à l'identification de gènes candidats et permettre in fine d'obtenir des marqueurs liés à la résistance pour faciliter le travail de sélection de la résistance secondaire.

## Chapitre 4 : Discussions, perspectives et conclusion générales

### I. Discussions et perspectives

Grâce à la stratégie de clonage positionnel, nous avons localisé la région du gène *HaOr5* dans une fenêtre de 193 kb sur le génome de référence XRQ et avec le séquençage des génomes nous avons pu analyser cette région chez la lignée porteuse du gène en comparaison de celle de la lignée sensible. La région d'*HaOr5* présente des F-box/LRR-repeat protein et une TIR-NBS-LRR. Les protéines F-box sont une très grande famille impliquée dans la régulation de nombreux mécanismes chez les plantes (développement, réponses aux stress, voies de signalisation hormonale) (Abd-Hamid *et al.*, 2020). Des gènes codants pour des F-box/LRR ont été identifiés en lien avec le système immunitaire de la plante. Par exemple, van den Burg *et al.* (2008) ont montré que le gène *ACIF1* fait partie de la mise en place du mécanisme de résistance HR chez le tabac et la tomate face à des pathogènes. La fonction de ce gène serait liée à la régulation de la réponse défensive en lien avec les voies de signalisation hormonale. Chez *Arabidopsis*, des protéines F-box/LRR ont été identifiées comme interagissant avec les lipooligosaccharides de la bactérie *Xanthomonas campestris*. Ce composé est un élément majeur de la surface des cellules des bactéries et est reconnu comme PAMP. La reconnaissance de ces éléments par les Fbox/LRR entrainerait l'initiation de voies de signalisation (Proietti *et al.*, 2014). Les protéines TIR-NBS-LRR sont connues pour être des récepteurs intracellulaires du système immunitaire des plantes. Elles détectent directement (effecteurs) ou indirectement (cibles des effecteurs) la présence des pathogènes et initient des voies de signalisation pour activer les mécanismes de défense. Bien qu'elles soient moins représentées que les CC-NBS-LRR, elles interviennent tout de même dans de nombreuses interactions avec une grande diversité de pathogènes (bactérie, virus, champignon, oomycètes et herbivores) (Kourelis and van der Hoorn, 2018; Ngou, Ding and Jones, 2022; Liu *et al.*, 2023). Actuellement l'ensemble des gènes de résistance identifiés chez les hôtes des plantes parasites sont des récepteurs de type LRR ou NLR. Les gènes *HaOr7* et *CuRe1* font partie de la première catégorie en codant pour des protéines LRR-RLP et LRR-RLK respectivement (Figure 21 a et c) et les gènes *CuRLR1* et *RSG3-301* font partie de la deuxième catégorie en codant tous les deux pour une protéine CC-NBS-LRR (Figure 21 b et d) (Li and Timko, 2009; Hegenauer *et al.*, 2016; Duriez *et al.*, 2019; Jhu *et al.*, 2022). Le gène d'*Or<sub>Deb2</sub>*, bien qu'il ne soit pas encore identifié, se situe dans une région riche en récepteurs RLP et RLK (Fernández-Aparicio *et al.*, 2022). Au vue du contenu de la région génomique d'*HaOr5*, l'hypothèse la plus probable pour le gène est donc un récepteur, LRR avec les Fbox/LRR ou NLR avec la TIR-NBS-LRR.



**Figure 27** : Représentation des différents mécanismes immunitaires liés aux gènes de résistances contre les plantes parasites a. mécanisme lié au gène *CuRe1* de la tomate détectant une protéine GRP et le peptide Crip21 de *Cuscuta reflexa* entraînant une réponse d'hyper sensibilité b. mécanisme lié au gène *CuRLR1* de la tomate amenant à l'accumulation de lignine qui bloque la pénétration de *Cuscuta campestris* c. mécanisme lié au gène *HaOr7* du tournesol empêchant la pénétration d'*Orobanche cumana* d. mécanisme lié au gène *RSG3-301* du niébé entraînant l'activation d'un régulateur de la réaction d'hyper sensibilité contre *Striga gesnerioides* et mécanisme de l'effecteur *SHR4z* permettant le contournement de la résistance de *RSG3-301* (Source Jhu and Sinha 2022)

Pour mieux comprendre les résistances des plantes hôtes face aux plantes parasites et leurs évolutions, la caractérisation des éléments reconnus par les récepteurs est également un axe de travail. Le seul élément actuellement identifié chez les plantes parasites appartient à *Cuscuta reflexa* et il est détecté par la protéine LRR-RLP codé par *CuRe1*. Il correspond à une protéine riche en glycines (glycine-rich protein, GRP) et plus particulièrement un petit peptide (Crip21) présent dans cette protéine (Figure 21 a). La GRP est présente dans les parois des cellules de la cuscute. Des protéines homologues ont été identifiées par blast chez *Cuscuta campestris* et *C. australis* montrant que ce facteur n'est pas spécifique à l'espèce (Hegenauer *et al.*, 2020). Un effecteur a été identifié chez *Striga gesnerioides* interférant avec le mécanisme de résistance de la plante parasite, mais pour l'instant sans liaison avec un gène de résistance. Il a été mis en évidence chez une nouvelle race SG4z, apparue suite à une pression de sélection exercée par une longue utilisation du génotype de niébé B301 porteur du gène majeur de résistance *RSG3-301*. Cet effecteur, *SHR4z*, est une petite protéine soluble présentant une homologie avec le domaine LRR des protéines de la famille somatic embryogenesis receptor-like

kinase. Il interférerait avec les voies de transduction du signal ce qui limite la mise en place de la réponse hypersensible (Figure 21 d). Il est produit au niveau de l'haustorium de la plante parasite et il serait transféré à l'hôte rapidement suite à l'attachement. Pour l'identifier, Su et al. (2020) ont réalisé une analyse du profil transcriptomique de plusieurs races à partir de données de RNA HiSeq. D'autres candidats de facteur de virulence ont également été identifiés chez une autre espèce de striga, *S. hermonthica* avec le riz, à partir du génome assemblé (Qiu et al., 2022). Dans le cas de l'orobanche du tournesol, Rodríguez-Ojeda et al. (2013) ont montré que le gène d'avirulence, interagissant avec le gène *HaOr5*, est dominant. Pour ce faire, ils ont croisé des races E avec des races F et étudié la réponse de la descendance face à un génotype de tournesol porteur du gène de résistance *HaOr5* octroyant la résistance seulement aux parents de race E. Les croisements ont été faits à partir d'orobanches développées par autofécondation sur plusieurs générations avant d'être croisées ensemble pour obtenir plusieurs populations F1. Les tests phénotypiques ont montré la non capacité des F1s à parasiter le génotype *HaOr5+* malgré l'apport des races F. Pour les F2s obtenues ensuite, les trois quarts des populations n'ont pas pu parasiter le génotype de tournesol. Ces résultats indiquent que le gène d'avirulence *AvrOr5* est dominant et que la virulence E et F dépend d'une variation d'allèle d'un même gène. Depuis cette étude, le premier génome d'*O. cumana* a été assemblé pour une race F (Gouzy et al., 2017) et à ce jour d'autres sont finalisés tels que Bourret la race E française utilisée dans notre travail. Il serait intéressant de répéter cette étude avec ces nouvelles connaissances avec ces races, d'autant plus avec l'identification à venir du gène *HaOr5* qui permettrait également de tester l'interaction avec *AvrOr5* et ainsi confirmer pour la première fois la relation « gène pour gène » de l'interaction tournesol/*O. cumana*.

Cependant, pour finaliser l'identification du gène *HaOr5*, il est nécessaire de valider la fonction de ou des gènes candidats. Au vu de la séquence, il serait pertinent de se concentrer sur le gène unique codant pour une protéine TIR-NBS-LRR. Sa validation serait plus simple à mettre en place en comparaison des gènes *Fbox/LRR* dupliqués. De plus, sa fonction, obtenue par l'analyse de la séquence protéique, le cible uniquement comme impliquée dans le système immunitaire des plantes. A contrario, les *Fbox/LRR* peuvent être impliqués dans divers mécanismes. Chez le tournesol, l'obtention de mutant a été réalisée par le biais de traitement à l'éthyl-méthane-sulfonate ou de radiation, dans le cadre de la recherche de nouveaux traits (Zambelli, León and Garcés, 2015). Ces techniques entraînent de nombreuses mutations non ciblées qui nécessitent ensuite tout un travail de criblage pour trouver l'origine génétique des phénotypes de mutants d'intérêts (Darvishzadeh et al., 2008; Cvejić et al., 2011). Pour faciliter ce travail, des technologies telles que le TILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genomes) permettent de cibler des régions génomiques lors du criblage des mutations. Récemment, Fanelli et al. (2021) ont utilisé les nouvelles générations de séquençage pour

cibler directement des gènes. Cependant, dans le cadre d'une validation fonctionnelle, des mutations ponctuelles ciblées sont plus informatives que des mutations aléatoires. Parks and Yordanov (2020) ont mis au point un protocole de transformation de racines de tournesol par *Agrobacterium rhizogenes* permettant d'obtenir des plantes « composites » dont seule la racine est transformée. Cette méthode pourrait permettre d'utiliser le système CRISPR/Cas9 pour obtenir des mutations ciblées dans un gène s'exprimant dans les racines. Plusieurs génotypes ont été testés et le taux de transformation est variable suivant les génotypes. Ils ont également confirmé l'usage de ce protocole pour la validation fonctionnelle d'un gène via la surexpression et l'extinction d'un gène lié à la mise en place des racines latérales. Auriac et al. (2023) ont appliqué ce protocole pour observer la pénétration de l'orobanche dans les racines du tournesol via une approche microscopique d'imagerie de cellules vivantes de tissus hôtes fluorescents transgéniques. Ce protocole pourrait permettre de valider le gène candidat pour *HaOr5*, mais nécessite d'abord de vérifier l'efficacité de la transformation sur nos génotypes de tournesol.

En plus de l'identification et de la validation génétique, la caractérisation du mécanisme de résistance est importante pour comprendre le fonctionnement des résistances. Par exemple, pour compléter les connaissances sur la résistance *HaOr5* et la résistance secondaire, il serait intéressant de réaliser d'autres tests cytologiques et histologiques pour analyser le mécanisme de résistance. En effet, ces études peuvent permettre de visualiser les modifications des parois cellulaires ou l'accumulation d'éléments de défense. Ce type de test a permis de visualiser l'accumulation de lignine dans le cortex de la tomate pour bloquer la connexion de la cuscute dans le cadre du gène *CuRLR1* (Jhu et al., 2022) et l'accumulation de composés phénoliques dans les tubercules d'orobanche entraînant leur nécrose dans le cadre du gène *Or<sub>SII</sub>* (Martín-Sanz et al., 2020). Pour finir, il serait intéressant de compléter l'analyse d'*HaOr5* en recherchant l'origine du gène. Le gène *Or<sub>Deb2</sub>* provient d'une espèce sauvage proche, *H. debilis*, (Fernández-Aparicio et al., 2022) et Duriez et al. (2019) ont émis l'hypothèse d'une introgression du gène de résistance *HaOr7* depuis un tournesol sauvage. Cette information pourrait permettre de mieux comprendre les interactions du gène *HaOr5* dans son fond génétique d'origine.

L'utilisation d'hybrides avec une résistance monogénétique face à l'orobanche du tournesol a amené à des contournements et une rapide évolution d'*O. cumana*. Depuis la première résistance mise en place en 1920, sept races de virulence plus élevée sont apparues. Pour limiter l'apparition de nouvelles races, il est nécessaire de mettre en place des résistances plus durables. L'une des possibilités est de cumuler les résistances dans une « pyramide de gènes ». Il est possible de rendre la résistance plus efficace et plus durable, en associant différents types de résistances génétiques (gène majeur et QTL), différents niveaux de résistance (partiel ou totale), différentes spécificités de résistance (spécifique à différentes races) et différents mécanismes de résistance (primaire et secondaire) (Mundt, 2018;

Nelson *et al.*, 2018). L'efficacité de l'association de plusieurs gènes a été démontrée chez différents pathosystèmes avec une augmentation de l'efficacité par rapport à l'utilisation des gènes seuls, c'est le cas par exemple chez le riz avec l'association de *Xa7* et *Xa21* contre le feu bactérien (Zhang *et al.*, 2006). La compilation de plusieurs gènes a octroyé une importante résistance chez un cultivar de blé contre la rouille, de 1991 à 2014, et cela, alors même que ces gènes seuls ont été contournés ou ont perdu en niveau de résistance (McCallum *et al.*, 2016). Le fond génétique est également un facteur permettant d'améliorer la résistance. Palloix *et al.* (2009) ont montré que la présence dans le fond génétique de résistance partiel (via des QTLs) associé au gène majeur *pvr2<sup>3</sup>* permettait de limiter le contournement de la résistance visible avec un fond génétique sensible. Bien que contourné, le gène *HaOr5* pourrait permettre d'obtenir des résistances plus durables et efficaces en association avec d'autres, de même que l'association de la résistance secondaire avec des résistances d'autres types. Il est donc nécessaire, pour rendre ces associations les plus durables possibles, de caractériser au mieux les résistances pour les utiliser au mieux en combinant différents mécanismes de résistance par rapport aux différentes étapes de l'interaction (faible induction de la germination, blocage du développement dans la racine, nécrose des tubercules...).

## II. Conclusion générale

A partir d'une large population de F2 obtenue par croisement entre LC1093, porteur du gène *HaOr5* et LSMS1 une lignée sensible, nous avons pu réduire la région du gène majeur de résistance à une fenêtre de 193 kb sur le génome de référence XRQ. Avec le séquençage complet des génomes des lignées parentales, nous avons pu comparer les séquences d'intérêts et observer une très faible similarité avec la présence d'une large insertion d'environ 295 kb chez LC1093. L'annotation de ces génomes nous a permis de constater la présence d'une duplication de gènes codants pour une protéine F-box/LRR, en passant de deux gènes chez le sensible à huit gènes chez le résistant et la présence d'un gène unique codant pour une protéine TIR-NBS-LRR. Les analyses phénotypiques et cytologiques ont permis d'observer la résistance avec des attachements incompatibles pour les populations françaises, chinoises et roumaines de race E. L'orobanche s'attache, mais elle est bloquée et n'arrive pas à mettre en place une connexion efficace avec le système vasculaire du tournesol. D'autres analyses sont nécessaires pour identifier clairement le gène *HaOr5* en passant par une validation fonctionnelle. Pour la caractérisation de la résistance, la réalisation de coupes fines de l'interaction serait intéressante pour observer au niveau cellulaire le système de défense mis en place. Pour mieux comprendre l'interaction du tournesol et de l'orobanche, l'identification des gènes du modèle *HaOr5-AvrOr5* serait une grande avancée ainsi que l'identification de l'origine du gène de résistance. Le travail sur la caractérisation de la résistance secondaire nous a permis d'observer la résistance sous différentes conditions. Il nous a également permis de mettre en évidence plusieurs

éléments, tels qu'un nombre de tubercules développés moins important, l'observation de la nécrose à différents stades de développement et l'observation du début du mécanisme de résistance dans la partie basse de l'orobanche en contact avec le tournesol. Les résultats nous ont amenés à tester un nouveau système qui permet d'avoir des plantes plus développées mais pas d'éviter le brunissement du système racinaire pour les analyses métabolomiques et transcriptomiques. Ils nous ont également amenés à penser à d'autres possibilités d'observation du mécanisme pour axer la suite du travail. Pour conclure, la caractérisation et l'identification des résistances génétiques de ma thèse permettent d'avancer vers une meilleure connaissance de ces résistances et pourraient permettre d'obtenir des résistances plus durables. Pour ce faire, il serait intéressant de mener des tests de combinaison des résistances génétiques comme cela a été fait chez d'autre espèces.

## Références bibliographiques

- Abd-Hamid, N.-A. *et al.* (2020) 'Diverse and dynamic roles of F-box proteins in plant biology', *Planta*, 251(3), p. 68. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03356-8>.
- Adeleke, B.S. and Babalola, O.O. (2020) 'Oilseed crop sunflower (*Helianthus annuus*) as a source of food: Nutritional and health benefits', *Food Science & Nutrition*, 8(9), pp. 4666–4684. Available at: <https://doi.org/10.1002/fsn3.1783>.
- Ahuja, I., Kissen, R. and Bones, A.M. (2012) 'Phytoalexins in defense against pathogens', *Trends in Plant Science*, 17(2), pp. 73–90. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.11.002>.
- Albert, M. (2013) 'Peptides as triggers of plant defence', *Journal of Experimental Botany*, 64(17), pp. 5269–5279. Available at: <https://doi.org/10.1093/jxb/ert275>.
- Albert, M., Axtell, M.J. and Timko, M.P. (2021) 'Mechanisms of resistance and virulence in parasitic plant–host interactions', *Plant Physiology*, 185(4), pp. 1282–1291. Available at: <https://doi.org/10.1093/plphys/kiaa064>.
- Amusan, I.O. *et al.* (2008) 'Resistance to *Striga hermonthica* in a maize inbred line derived from *Zea diploperennis*', *New Phytologist*, 178(1), pp. 157–166. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02355.x>.
- Andersen, E.J. *et al.* (2018) 'Disease Resistance Mechanisms in Plants', *Genes*, 9(7), p. 339. Available at: <https://doi.org/10.3390/genes9070339>.
- Antonova, T.S. (2014) 'The History of Interconnected Evolution of *Orobanche cumana* Wallr. and Sunflower in the Russian Federation and Kazakhstan', *Helia*, 37(61), pp. 215–225. Available at: <https://doi.org/10.1515/helia-2014-0017>.
- Auriac, M.C. *et al.* (2023) 'The penetration of sunflower root tissues by the parasitic plant *Orobanche cumana* Wallr. is intracellular'. *bioRxiv*, p. 2023.07.24.550254. Available at: <https://doi.org/10.1101/2023.07.24.550254>.
- Badouin, H. *et al.* (2017) 'The sunflower genome provides insights into oil metabolism, flowering and Asterid evolution', *Nature*, 546(7656), pp. 148–152. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature22380>.
- Balogh, L. (2008) 'Sunflower species', in *The most important invasive plants in Hungary*, pp. 227–255.
- Bari, R. and Jones, J.D.G. (2009) 'Role of plant hormones in plant defence responses', *Plant Molecular Biology*, 69(4), pp. 473–488. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9435-0>.
- Bellincampi, D., Cervone, F. and Lionetti, V. (2014) 'Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant-pathogen interactions', *Frontiers in Plant Science*, 5, p. 228. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00228>.
- Blackman, B.K. *et al.* (2011) 'Sunflower domestication alleles support single domestication center in eastern North America', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(34), pp. 14360–14365. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1104853108>.



- Bouwmeester, H. *et al.* (2021) 'Adaptation of the parasitic plant lifecycle: germination is controlled by essential host signaling molecules', *Plant Physiology*, 185(4), pp. 1292–1308. Available at: <https://doi.org/10.1093/plphys/kiaa066>.
- Broman, K.W. *et al.* (2003) 'R/qt1: QTL mapping in experimental crosses', *Bioinformatics (Oxford, England)*, 19(7), pp. 889–890. Available at: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg112>.
- Brun, G. *et al.* (2021) 'Molecular actors of seed germination and haustoriogenesis in parasitic weeds', *Plant Physiology*, 185(4), pp. 1270–1281. Available at: <https://doi.org/10.1093/plphys/kiaa041>.
- van den Burg, H.A. *et al.* (2008) 'The F-Box Protein ACRE189/ACIF1 Regulates Cell Death and Defense Responses Activated during Pathogen Recognition in Tobacco and Tomato', *The Plant Cell*, 20(3), pp. 697–719. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.107.056978>.
- Cabanettes, F. and Klopp, C. (2018) 'D-GENIES: dot plot large genomes in an interactive, efficient and simple way', *PeerJ*, 6, p. e4958. Available at: <https://doi.org/10.7717/peerj.4958>.
- Calderón-González, Á. *et al.* (2019) 'An SSR-SNP Linkage Map of the Parasitic Weed *Orobanche cumana* Wallr. Including a Gene for Plant Pigmentation', *Frontiers in Plant Science*, 10. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00797>.
- Calderón-González, Á. *et al.* (2022) 'Association mapping for broomrape resistance in sunflower', *Frontiers in Plant Science*, 13, p. 1056231. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1056231>.
- Carrere, S. and Gouzy, J. (2023a) 'Eukaryote EuGene pipeline Version 2'. *Methods in Molecular Biology*. Available at: <https://doi.org/10.5281/zenodo.7648710>.
- Carrere, S. and Gouzy, J. (2023b) 'LIPME Functional Annotation Pipeline'. *Zenodo*. Available at: <https://doi.org/10.5281/zenodo.7603192>.
- Carrere, S., Langlade, N. and Moroldo, M. (2022) 'SunExpress, a Comprehensive and Curated RNAseq-based Gene Expression Atlas for the Sunflower (*Helianthus annuus*)', *Unpublished [Preprint]*. Available at: <https://www.heliagene.org/sunexpress.html>.
- Carrere, S., Verdier, J. and Gamas, P. (2021) 'MtExpress, a Comprehensive and Curated RNAseq-based Gene Expression Atlas for the Model Legume *Medicago truncatula*', *Plant and Cell Physiology*, 62(9), pp. 1494–1500. Available at: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcab110>.
- Cartry, D., Steinberg, C. and Gibot-Leclerc, S. (2021) 'Main drivers of broomrape regulation. A review', *Agronomy for Sustainable Development*, 41(2), p. 17. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13593-021-00669-0>.
- Chabaud, M. *et al.* (2022) 'Wild *Helianthus* species: A reservoir of resistance genes for sustainable pyramidal resistance to broomrape in sunflower', *Frontiers in Plant Science*, 13, p. 1038684. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1038684>.
- Cheng, H. *et al.* (2021) 'Haplotype-resolved de novo assembly using phased assembly graphs with hifiasm', *Nature Methods*, 18(2), pp. 170–175. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41592-020-01056-5>.
- Cheng, M.-H., Dien, B.S. and Singh, V. (2019) 'Economics of plant oil recovery: A review', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, p. 101056. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101056>.

- Christov, M. *et al.* (1996) 'Development of fertility restorer lines originating from interspecific hybrids of genus *Helianthus*', *HELIA*, 24, pp. 65–72.
- Cimmino, A. *et al.* (2018) 'Allelopathy for Parasitic Plant Management', *Natural Product Communications*, 13(3), p. 1934578X1801300307. Available at: <https://doi.org/10.1177/1934578X1801300307>.
- Cissoko, M. *et al.* (2011) 'New Rice for Africa (NERICA) cultivars exhibit different levels of post-attachment resistance against the parasitic weeds *Striga hermonthica* and *Striga asiatica*', *New Phytologist*, 192(4), pp. 952–963. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03846.x>.
- Clapco, S. (2021) 'Virulence and Aggressiveness of Some Sunflower Broomrape Populations Belonging to Different Countries', *Scientific Papers-Series a-Agronomy*, 64(1), pp. 266–272.
- Clarke, C.R. *et al.* (2019) 'Molecular Dialog Between Parasitic Plants and Their Hosts', *Annual Review of Phytopathology*, 57(1), pp. 279–299. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100043>.
- Conn, C.E. *et al.* (2015) 'Convergent evolution of strigolactone perception enabled host detection in parasitic plants', *Science*, 349(6247), pp. 540–543. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aab1140>.
- Cook, C.E. *et al.* (1972) 'Germination stimulants. II. Structure of strigol, a potent seed germination stimulant for witchweed (*Striga lutea*)', *Journal of the American Chemical Society*, 94(17), pp. 6198–6199. Available at: <https://doi.org/10.1021/ja00772a048>.
- Corrion, A. and Day, B. (2015) 'Pathogen Resistance Signalling in Plants', in *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0020119.pub2>.
- Cruvinel, W.S. *et al.* (2017) 'Fermentation profile and nutritional value of sunflower silage with *Urochloa brizantha* cultivars in the off-season', *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 18, pp. 249–259. Available at: <https://doi.org/10.1590/S1519-99402017000200004>.
- Cvejić, S. *et al.* (2011) 'CREATING NEW GENETIC VARIABILITY IN SUNFLOWER USING INDUCED MUTATIONS', *HELIA*, 34(55), pp. 47–54. Available at: <https://doi.org/10.2298/hel1155047c>.
- Cvejić, S. *et al.* (2017) 'Evaluation of combining ability in ornamental sunflower for floral and morphological traits', *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 53(2), pp. 83–88. Available at: <https://doi.org/10.17221/50/2016-CJGPB>.
- Cvejić, S. *et al.* (2020) 'Genetic and Genomic Tools in Sunflower Breeding for Broomrape Resistance', *Genes*, 11(2), p. E152. Available at: <https://doi.org/10.3390/genes11020152>.
- Cvejić, S., Jocić, S. and Mladenović, E. (2016) 'Inheritance of floral colour and type in four new inbred lines of ornamental sunflower (*Helianthus annuus* L.)', *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 91(1), pp. 30–35. Available at: <https://doi.org/10.1080/14620316.2015.1110989>.
- Darvishzadeh, R. *et al.* (2008) 'Genetic variation and identification of molecular markers associated with partial resistance to *Phoma macdonaldii* in gamma-irradiation-induced mutants of sunflower', *Canadian Journal of Plant Pathology*, 30(1), pp. 106–114. Available at: <https://doi.org/10.1080/07060660809507501>.

- Das, T.K. *et al.* (2020) 'The weed Orobanche: species distribution, diversity, biology and management', *Journal of Research in Weed Science*, 3(2), pp. 162–180. Available at: <https://doi.org/10.26655/JRWEEDSCI.2020.2.4>.
- Debaeke, P., Casadebaig, P., *et al.* (2017) 'Sunflower crop and climate change: vulnerability, adaptation, and mitigation potential from case-studies in Europe', *OCL Oilseeds and fats crops and lipids*, 24(1), p. 15 p. Available at: <https://doi.org/10.1051/ocl/2016052>.
- Debaeke, P., Bedoussac, L., *et al.* (2017) 'Sunflower crop: environmental-friendly and agroecological', *OCL Oilseeds and fats crops and lipids*, 23(4), p. 12 p. Available at: <https://doi.org/10.1051/ocl/2017020>.
- Dechassa, N. and Regassa, B. (2021) 'Current Status, Economic importance and Management of Dodders (*Cuscuta* Spp) of Important Crops', *Advances in Life Science and Technology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.7176/ALST/87-04>.
- Delavault, P. (2015) 'Knowing the Parasite: Biology and Genetics of Orobanche', *Helia*, 38(62), pp. 15–29. Available at: <https://doi.org/10.1515/helia-2014-0030>.
- Dimitrijevic, A. and Horn, R. (2018) 'Sunflower Hybrid Breeding: From Markers to Genomic Selection', *Frontiers in Plant Science*, 8. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02238>.
- Dossa, E.N. *et al.* (2023) 'Genetic resources and breeding of maize for Striga resistance: a review', *Frontiers in Plant Science*, 14. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1163785>.
- Duriez, P. *et al.* (2019) 'A receptor-like kinase enhances sunflower resistance to Orobanche cumana', *Nature Plants*, 5(12), pp. 1211–1215. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0556-z>.
- Ebeed, H.T. *et al.* (2019) 'Comparative Analysis of Seed Yield and Biochemical Attributes in Different Sunflower Genotypes under Different Levels of Irrigation and Salinity', *Egyptian Journal of Botany*, 59(2), pp. 339–355. Available at: <https://doi.org/10.21608/ejbo.2019.5043.1205>.
- Eshed, Y. and Zamir, D. (1995) 'An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL.', *Genetics*, 141(3), pp. 1147–1162. Available at: <https://doi.org/10.1093/genetics/141.3.1147>.
- Fanelli, V. *et al.* (2021) 'A TILLING by sequencing approach to identify induced mutations in sunflower genes', *Scientific Reports*, 11(1), p. 9885. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89237-w>.
- Feng, J., Jan, C.-C. and Seiler, G. (2022) 'Breeding, production, and supply chain of confection sunflower in China', *OCL*, 29, p. 11. Available at: <https://doi.org/10.1051/ocl/2022004>.
- Fernández-Aparicio, M. *et al.* (2021) 'Effects of Benzoquinones on Radicles of Orobanche and Phelipanche Species', *Plants*, 10(4), p. 746. Available at: <https://doi.org/10.3390/plants10040746>.
- Fernández-Aparicio, M. *et al.* (2022) 'Genetic and physiological characterization of sunflower resistance provided by the wild-derived OrDeb2 gene against highly virulent races of Orobanche cumana Wallr', *Theoretical and Applied Genetics*, 135(2), pp. 501–525. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00122-021-03979-9>.
- Fernández-Aparicio, M., Reboud, X. and Gibot-Leclerc, S. (2016) 'Broomrape Weeds. Underground Mechanisms of Parasitism and Associated Strategies for their Control: A Review', *Frontiers in Plant Science*, 7. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00135>.

- Fernández-Martínez, J.M., Pérez-Vich, B. and Velasco, L. (2015) 'Sunflower Broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.)', in E. Martínez-Force, N.T. Dunford, and J.J. Salas (eds) *Sunflower*. AOCS Press, pp. 129–155. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-94-3.50011-8>.
- Funk, V.A. (2009) 'Classification of Compositae', in *Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae*. International Association for Plant Taxonomy.
- Furuta, K.M. *et al.* (2021) 'Molecular dissection of haustorium development in Orobanchaceae parasitic plants', *Plant Physiology*, 186(3), pp. 1424–1434. Available at: <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab153>.
- Galindo-González, L. *et al.* (2017) 'LTR-retrotransposons in plants: Engines of evolution', *Gene*, 626, pp. 14–25. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.04.051>.
- Gao, L. *et al.* (2019) 'Genetic and phenotypic analyses indicate that resistance to flooding stress is uncoupled from performance in cultivated sunflower', *New Phytologist*, 223(3), pp. 1657–1670. Available at: <https://doi.org/10.1111/nph.15894>.
- Gascuel, Q. *et al.* (2015) 'The sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*', *Molecular Plant Pathology*, 16(2), pp. 109–122. Available at: <https://doi.org/10.1111/mpp.12164>.
- Gentzittel, L. *et al.* (1995) 'Development of a consensus linkage RFLP map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.)', *Theoretical and Applied Genetics*, 90(7), pp. 1079–1086. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00222925>.
- de Givry, S. *et al.* (2005) 'Carhta Gene: multipopulation integrated genetic and radiation hybrid mapping', *Bioinformatics*, 21(8), pp. 1703–1704. Available at: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti222>.
- Gobena, D. *et al.* (2017) 'Mutation in sorghum LOW GERMINATION STIMULANT 1 alters strigolactones and causes *Striga* resistance', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(17), pp. 4471–4476. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1618965114>.
- Gouzy, J. *et al.* (2017) 'The complete genome sequence of *Orobanche cumana* (sunflower broomrape)'. Available at: <https://digital.csic.es/handle/10261/167964> (Accessed: 16 March 2023).
- Guo, X. *et al.* (2018) 'Overexpression of an EIN3-binding F-box protein2-like gene caused elongated fruit shape and delayed fruit development and ripening in tomato', *Plant Science*, 272, pp. 131–141. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.04.016>.
- Hartenstein, M., Albert, M. and Krause, K. (2023) 'The plant vampire diaries: a historic perspective on *Cuscuta* research', *Journal of Experimental Botany*, 74(10), pp. 2944–2955. Available at: <https://doi.org/10.1093/jxb/erad082>.
- Hegenauer, V. *et al.* (2016) 'Detection of the plant parasite *Cuscuta reflexa* by a tomato cell surface receptor', *Science*, 353(6298), pp. 478–481. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aaf3919>.
- Hegenauer, V. *et al.* (2020) 'The tomato receptor CuRe1 senses a cell wall protein to identify *Cuscuta* as a pathogen', *Nature Communications*, 11(1), p. 5299. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19147-4>.
- Hladni, N. and Miladinović, D. (2019) 'Confectionery sunflower breeding and supply chain in Eastern Europe', *OCL*, 26, p. 29. Available at: <https://doi.org/10.1051/ocl/2019019>.

- Hniličková, H. *et al.* (2017) 'The effect of freezing temperature on physiological traits in sunflower', *Plant, Soil and Environment*, 63(8), pp. 375–380. Available at: <https://doi.org/10.17221/214/2017-PSE>.
- Huang, K. *et al.* (2023) 'The genomics of linkage drag in inbred lines of sunflower', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(14), p. e2205783119. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.2205783119>.
- Hübner, S. *et al.* (2019) 'Sunflower pan-genome analysis shows that hybridization altered gene content and disease resistance', *Nature Plants*, 5(1), pp. 54–62. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0329-0>.
- Hussain, M. *et al.* (2018) 'Drought stress in sunflower: Physiological effects and its management through breeding and agronomic alternatives', *Agricultural Water Management*, 201, pp. 152–166. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2018.01.028>.
- Imerovski, I. *et al.* (2019) 'BSA-seq mapping reveals major QTL for broomrape resistance in four sunflower lines', *Molecular Breeding*, 39(3), p. 41. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11032-019-0948-9>.
- Jalali, B.L., Bhargava, S. and Kamble, A. (2006) 'Signal Transduction and Transcriptional Regulation of Plant Defence Responses', *Journal of Phytopathology*, 154(2), pp. 65–74. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2006.01073.x>.
- Jamil, M., Kountche, B.A. and Al-Babili, S. (2021) 'Current progress in Striga management', *Plant Physiology*, 185(4), pp. 1339–1352. Available at: <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab040>.
- Jan, C.C. *et al.* (1998) 'Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower', *Theoretical and Applied Genetics*, 96(1), pp. 15–22. Available at: <https://doi.org/10.1007/s001220050703>.
- Jhu, M.-Y. *et al.* (2022) 'Heinz-resistant tomato cultivars exhibit a lignin-based resistance to field dodder (*Cuscuta campestris*) parasitism', *Plant Physiology*, 189(1), pp. 129–151. Available at: <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac024>.
- Jhu, M.-Y. and Sinha, N.R. (2022) 'Parasitic Plants: An Overview of Mechanisms by Which Plants Perceive and Respond to Parasites', *Annual Review of Plant Biology*, 73(1), pp. 433–455. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-102820-100635>.
- Jocić, S., Miladinović, D. and Kaya, Y. (2015) 'Breeding and Genetics of Sunflower', in *Sunflower*. Elsevier, pp. 1–25. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-94-3.50007-6>.
- Joel, D.M. *et al.* (2011) 'Dehydrocostus lactone is exuded from sunflower roots and stimulates germination of the root parasite *Orobanche cumana*', *Phytochemistry*, 72(7), pp. 624–634. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.037>.
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L. (2006) 'The plant immune system', *Nature*, 444(7117), pp. 323–329. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature05286>.
- Kaiser, B. *et al.* (2015) 'Parasitic plants of the genus *Cuscuta* and their interaction with susceptible and resistant host plants', *Frontiers in Plant Science*, 6. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00045>.

- Kalyar, T. *et al.* (2013) 'Handling Sunflower (*Helianthus annuus* L.) populations under heat stress.', *Archives of Agronomy and Soil Science*, 60. Available at: <https://doi.org/10.1080/03650340.2013.799276>.
- Kane, N.C. *et al.* (2011) 'Progress towards a reference genome for sunflower', *Botany*, 89(7), pp. 429–437. Available at: <https://doi.org/10.1139/b11-032>.
- Kane, N.C. *et al.* (2013) 'Sunflower genetic, genomic and ecological resources', *Molecular Ecology Resources*, 13(1), pp. 10–20. Available at: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12023>.
- Kantar, M.B. *et al.* (2015) 'Ecogeography and utility to plant breeding of the crop wild relatives of sunflower (*Helianthus annuus* L.)', *Frontiers in Plant Science*, 6. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00841>.
- Katinas, L. and Funk, V.A. (2020) 'An updated classification of the basal grade of Asteraceae (= Compositae): from Cabrera's 1977 tribe Mutisieae to the present', *New Zealand Journal of Botany*, 58(2), pp. 67–93. Available at: <https://doi.org/10.1080/0028825X.2020.1718168>.
- Kaya, Y. (2016) 'Chapter 4 - Sunflower', in S.K. Gupta (ed.) *Breeding Oilseed Crops for Sustainable Production*. San Diego: Academic Press, pp. 55–88. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801309-0.00004-5>.
- Kinman, M. (1970) 'New Developments in the USDA and State Experiment Station Sunflower Breeding Programs', in *4th Int. Sunflower Conf.*, Memphis, Tenn, USA, pp. 181–183. Available at: [www.isasunflower.org/publications](http://www.isasunflower.org/publications).
- Koressaar, T. and Remm, M. (2007) 'Enhancements and modifications of primer design program Primer3', *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23(10), pp. 1289–1291. Available at: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm091>.
- Kountche, B.A. *et al.* (2019) 'Suicidal germination as a control strategy for *Striga hermonthica* (Benth.) in smallholder farms of sub-Saharan Africa', *PLANTS, PEOPLE, PLANET*, 1(2), pp. 107–118. Available at: <https://doi.org/10.1002/ppp3.32>.
- Kourelis, J. and van der Hoorn, R.A.L. (2018) 'Defended to the Nines: 25 Years of Resistance Gene Cloning Identifies Nine Mechanisms for R Protein Function', *The Plant Cell*, 30(2), pp. 285–299. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00579>.
- Krupp, A., Heller, A. and Spring, O. (2019) 'Development of phloem connection between the parasitic plant *Orobanche cumana* and its host sunflower', *Protoplasma*, 256(5), pp. 1385–1397. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01393-z>.
- Le Ru, A. *et al.* (2021) 'Image analysis for the automatic phenotyping of *Orobanche cumana* tubercles on sunflower roots', *Plant Methods*, 17(1), p. 80. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13007-021-00779-6>.
- Lechner, E. *et al.* (2006) 'F-box proteins everywhere', *Current Opinion in Plant Biology*, 9(6), pp. 631–638. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.09.003>.
- Leclercq, P. (1969) 'Une sterilité mâle cytoplasmique chez le tournesol.', *Annales de l'Amélioration des Plantes*, (2), p. 99.

- Leclercq, P. (1971) 'La stérilité mâle cytoplasmique du tournesol. 1. Premières études sur la restauration de la fertilité', *Annales de l'Amélioration des Plantes*, (21), pp. 45–54.
- Li, H. (2018) 'Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences', *Bioinformatics*, 34(18), pp. 3094–3100. Available at: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty191>.
- Li, J. and Timko, M.P. (2009) 'Gene-for-Gene Resistance in Striga-Cowpea Associations', *Science*, 325(5944), pp. 1094–1094. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1174754>.
- Limpert, E. and Müller, K. (1994) 'Designation of Pathotypes of Plant Pathogens', *Journal of Phytopathology*, 140(4), pp. 346–358. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1994.tb00617.x>.
- Liu, Y. *et al.* (2023) 'The evolution of plant NLR immune receptors and downstream signal components', *Current Opinion in Plant Biology*, 73, p. 102363. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2023.102363>.
- Louarn, J. *et al.* (2016) 'Sunflower Resistance to Broomrape (*Orobanche cumana*) Is Controlled by Specific QTLs for Different Parasitism Stages', *Frontiers in Plant Science*, 7. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00590>.
- Lu, Y.H. *et al.* (2000) 'Development of SCAR markers linked to the gene Or5 conferring resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in sunflower', *Theoretical and Applied Genetics*, 100(3), pp. 625–632. Available at: <https://doi.org/10.1007/s001220050083>.
- Maekawa, T., Kufer, T.A. and Schulze-Lefert, P. (2011) 'NLR functions in plant and animal immune systems: so far and yet so close', *Nature Immunology*, 12(9), pp. 817–826. Available at: <https://doi.org/10.1038/ni.2083>.
- Mafakher, E., Meskarbashee, Moosa, *et al.* (2010) 'Evaluation of Sunflower Silage in Different Developmental Stages', *Asian Journal of Crop Science*, 2. Available at: <https://doi.org/10.3923/ajcs.2010.20.24>.
- Mafakher, E., Meskarbashee, M., *et al.* (2010) 'Study of chemical composition and quality characteristics of corn, sunflower and corn-sunflower mixture silages.', *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 5(2), pp. 175–179. Available at: <https://doi.org/10.3923/ajava.2010.175.179>.
- Malinovsky, F.G., Fangel, J.U. and Willats, W.G.T. (2014) 'The role of the cell wall in plant immunity', *Frontiers in Plant Science*, 5. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00178>.
- Mandel, J.R. *et al.* (2019) 'A fully resolved backbone phylogeny reveals numerous dispersals and explosive diversifications throughout the history of Asteraceae', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(28), pp. 14083–14088. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1903871116>.
- Marek, L.F. (2019) 'Crop Wild Relatives of Sunflower in North America', in S.L. Greene *et al.* (eds) *North American Crop Wild Relatives, Volume 2*. Cham: Springer International Publishing, pp. 453–483. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-97121-6\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-97121-6_14).
- Markell, S.G. *et al.* (2015) 'Sunflower Diseases', in E. Martínez-Force, N.T. Dunford, and J.J. Salas (eds) *Sunflower*. AOCS Press, pp. 93–128. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-94-3.50010-6>.

- Martín-Sanz, A. *et al.* (2016) 'Increased Virulence in Sunflower Broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) Populations from Southern Spain Is Associated with Greater Genetic Diversity', *Frontiers in Plant Science*, 7, p. 589. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00589>.
- Martín-Sanz, A. *et al.* (2020) 'Characterization of post-haustorial resistance to sunflower broomrape', *Crop Science*, 60(3), pp. 1188–1198. Available at: <https://doi.org/10.1002/csc2.20002>.
- Masteling, R. *et al.* (2019) 'Harnessing the microbiome to control plant parasitic weeds', *Current Opinion in Microbiology*, 49, pp. 26–33. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.09.006>.
- Mauro, R.P. *et al.* (2015) 'Eradication of *Orobanche/Phelipanche* spp. seedbank by soil solarization and organic supplementation', *Scientia Horticulturae*, 193, pp. 62–68. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.06.038>.
- Mayjonade, B. *et al.* (2016) 'Extraction of high-molecular-weight genomic DNA for long-read sequencing of single molecules', *BioTechniques*, 61(4), pp. 203–205. Available at: <https://doi.org/10.2144/000114460>.
- McCallum, B.D. *et al.* (2016) 'A review of wheat leaf rust research and the development of resistant cultivars in Canada', *Canadian Journal of Plant Pathology*, 38(1), pp. 1–18. Available at: <https://doi.org/10.1080/07060661.2016.1145598>.
- Miladinović, D. *et al.* (2019) 'Sunflower and Climate Change: Possibilities of Adaptation Through Breeding and Genomic Selection', in C. Kole (ed.) *Genomic Designing of Climate-Smart Oilseed Crops*. Cham: Springer International Publishing, pp. 173–238. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-93536-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-93536-2_4).
- Mohemed, N. *et al.* (2018) 'Genetic variation in *Sorghum bicolor* strigolactones and their role in resistance against *Striga hermonthica*', *Journal of Experimental Botany*, 69(9), pp. 2415–2430. Available at: <https://doi.org/10.1093/jxb/ery041>.
- Molinero-Ruiz, L. *et al.* (2014) 'Pathogenic and molecular diversity in highly virulent populations of the parasitic weed *Orobanche cumana* (sunflower broomrape) from Europe', *Weed Research*, 54(1), pp. 87–96. Available at: <https://doi.org/10.1111/wre.12056>.
- Molinero-Ruiz, L. *et al.* (2015) 'History of the race structure of *Orobanche cumana* and the breeding of sunflower for resistance to this parasitic weed: A review'. Available at: <https://doi.org/10.13039/501100000780>.
- Molinero-Ruiz, L. (2022) 'Sustainable and efficient control of sunflower downy mildew by means of genetic resistance: a review', *Theoretical and Applied Genetics*, 135(11), pp. 3757–3771. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00122-022-04038-7>.
- Mundt, C.C. (2018) 'Pyramiding for Resistance Durability: Theory and Practice', *Phytopathology*®, 108(7), pp. 792–802. Available at: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-17-0426-RVW>.
- Mutinda, S.M. *et al.* (2018) 'KSTP 94, an Open-pollinated Maize Variety Has Postattachment Resistance to Purple Witchweed (*Striga hermonthica*)', *Weed Science*, 66(4), pp. 525–529. Available at: <https://doi.org/10.1017/wsc.2018.24>.
- Negewo, T. *et al.* (2022) 'Biological Characteristics, Impacts, and Management of Crenate Broomrape (*Orobanche crenata*) in Faba Bean (*Vicia faba*): A Review', *Frontiers in Agronomy*, 4. Available at: <https://doi.org/10.3389/fagro.2022.708187>.



- Nelson, D.C. *et al.* (2012) 'Regulation of seed germination and seedling growth by chemical signals from burning vegetation', *Annual Review of Plant Biology*, 63, pp. 107–130. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105545>.
- Nelson, D.C. (2021) 'The mechanism of host-induced germination in root parasitic plants', *Plant Physiology*, 185(4), pp. 1353–1373. Available at: <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab043>.
- Nelson, R. *et al.* (2018) 'Navigating complexity to breed disease-resistant crops', *Nature Reviews Genetics*, 19(1), pp. 21–33. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.82>.
- Ngou, B.P.M., Ding, P. and Jones, J.D.G. (2022) 'Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system', *The Plant Cell*, 34(5), pp. 1447–1478. Available at: <https://doi.org/10.1093/plcell/koac041>.
- Nickrent, D.L. (2020) 'Parasitic angiosperms: How often and how many?', *TAXON*, 69(1), pp. 5–27. Available at: <https://doi.org/10.1002/tax.12195>.
- Noman, A. *et al.* (2020) 'Plant hypersensitive response vs pathogen ingress: Death of few gives life to others', *Microbial Pathogenesis*, 145, p. 104224. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104224>.
- Palloix, A., Ayme, V. and Moury, B. (2009) 'Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies', *New Phytologist*, 183(1), pp. 190–199. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02827.x>.
- Park, B. and Burke, J.M. (2020) 'Phylogeography and the Evolutionary History of Sunflower (*Helianthus annuus* L.): Wild Diversity and the Dynamics of Domestication', *Genes*, 11(3), p. 266. Available at: <https://doi.org/10.3390/genes11030266>.
- Parker, C. (2012) 'Parasitic Weeds: A World Challenge', *Weed Science*, 60(2), pp. 269–276. Available at: <https://doi.org/10.1614/WS-D-11-00068.1>.
- Parks, T. and Yordanov, Y.S. (2020) 'Composite plants for a composite plant: an efficient protocol for root studies in the sunflower using composite plants approach', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 140(3), pp. 647–659. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01760-x>.
- Pavan, S. *et al.* (2016) 'Characterization of Low-Strigolactone Germplasm in Pea (*Pisum sativum* L.) Resistant to Crenate Broomrape (*Orobanche crenata* Forsk.)', *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 29(10), pp. 743–749. Available at: <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-16-0134-R>.
- Pecrix, Y. *et al.* (2018) 'Whole-genome landscape of *Medicago truncatula* symbiotic genes', *Nature Plants*, 4(12), pp. 1017–1025. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0286-7>.
- Perez-De-Luque, A. *et al.* (2005) 'Interaction between *Orobanche crenata* and its host legumes: unsuccessful haustorial penetration and necrosis of the developing parasite', *Annals of Botany*, 95(6), pp. 935–942. Available at: <https://doi.org/10.1093/aob/mci105>.
- Pérez-De-Luque, A. *et al.* (2009) 'Understanding *Orobanche* and *Phelipanche*–host plant interactions and developing resistance', *Weed Research*, 49(s1), pp. 8–22. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2009.00738.x>.

Pérez-Vich, B. *et al.* (2002) 'Inheritance of resistance to a highly virulent race f of *Orobanche cumana* Wallr. in a sunflower line derived from interspecific amphiploid', *HELIA*, 25(36), pp. 137–144. Available at: <https://doi.org/10.2298/hel0236137p>.

Pérez-Vich, B. *et al.* (2004) 'Quantitative trait loci for broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) resistance in sunflower', *Theoretical and Applied Genetics*, 109(1), pp. 92–102. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1599-7>.

Piednoël, M. *et al.* (2012) 'Next-generation sequencing reveals the impact of repetitive DNA across phylogenetically closely related genomes of *Orobanchaceae*', *Molecular Biology and Evolution*, 29(11), pp. 3601–3611. Available at: <https://doi.org/10.1093/molbev/mss168>.

Pilorgé, E. (2020) 'Sunflower in the global vegetable oil system: situation, specificities and perspectives', *OCL*, 27, p. 34. Available at: <https://doi.org/10.1051/ocl/2020028>.

Pineda-Martos, R. *et al.* (2013) 'Genetic diversity of *Orobanche cumana* populations from Spain assessed using SSR markers', *Weed Research*, 53(4), pp. 279–289. Available at: <https://doi.org/10.1111/wre.12022>.

Pitzschke, A., Schikora, A. and Hirt, H. (2009) 'MAPK cascade signalling networks in plant defence', *Current Opinion in Plant Biology*, 12(4), pp. 421–426. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.06.008>.

Prasifka, J.R. (2015) 'Sunflower Insect Pests', in E. Martínez-Force, N.T. Dunford, and J.J. Salas (eds) *Sunflower*. AOCS Press, pp. 157–174. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-94-3.50012-X>.

Proietti, S. *et al.* (2014) 'Xanthomonas campestris lipooligosaccharides trigger innate immunity and oxidative burst in Arabidopsis', *Plant Physiology and Biochemistry*, 85, pp. 51–62. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.10.011>.

Pujadas-salvà, A.J. and Velasco, L. (2000) 'Comparative studies on *Orobanche cernua* L. and *O. cumana* Wallr. (*Orobanchaceae*) in the Iberian Peninsula', *Botanical Journal of the Linnean Society*, 134(4), pp. 513–527. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2000.tb00548.x>.

Putt, E.D. (1997) 'Early History of Sunflower', in *Sunflower Technology and Production*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–19. Available at: <https://doi.org/10.2134/agronmonogr35.c1>.

Qiu, F. *et al.* (2019) 'Phylogenetic trends and environmental correlates of nuclear genome size variation in *Helianthus* sunflowers', *New Phytologist*, 221(3), pp. 1609–1618. Available at: <https://doi.org/10.1111/nph.15465>.

Qiu, S. *et al.* (2022) 'Genome-enabled discovery of candidate virulence loci in *Striga hermonthica*, a devastating parasite of African cereal crops', *New Phytologist*, 236(2), pp. 622–638. Available at: <https://doi.org/10.1111/nph.18305>.

Rahimi, M. and Bouwmeester, H. (2021) 'Are sesquiterpene lactones the elusive KARRIKIN-INSENSITIVE2 ligand?', *Planta*, 253(2), p. 54. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03571-x>.

Rauf, S. *et al.* (2017) 'Progress in modification of sunflower oil to expand its industrial value', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(7), pp. 1997–2006. Available at: <https://doi.org/10.1002/jsfa.8214>.

- Rauf, S. *et al.* (2020) 'Validated markers for sunflower (*Helianthus annuus* L.) breeding', *OCL*, 27, p. 47. Available at: <https://doi.org/10.1051/ocl/2020042>.
- Raupp, F.M. and Spring, O. (2013) 'New Sesquiterpene Lactones from Sunflower Root Exudate as Germination Stimulants for *Orobanche cumana*', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(44), pp. 10481–10487. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf402392e>.
- Rodríguez-Ojeda, M.I. *et al.* (2013) 'A dominant avirulence gene in *Orobanche cumana* triggers Or5 resistance in sunflower', *Weed Research*, 53(5), pp. 322–327. Available at: <https://doi.org/10.1111/wre.12034>.
- Rodríguez-Ojeda, M.I. *et al.* (2013) 'Extent of cross-fertilization in *Orobanche cumana* Wallr.', *Biologia Plantarum*, 57(3), pp. 559–562. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10535-012-0301-1>.
- Roozkhosh, M. *et al.* (2022) 'Tolerance to dodder (*Cuscuta campestris* L.) in citrus species of south of Kerman province – Iran', *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 21(5), pp. 331–338. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2021.10.002>.
- Rouxel, T. and Balesdent, M.-H. (2010) 'Avirulence Genes', in *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd. Available at: <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021267>.
- Rubiales, D. (2018) 'Can we breed for durable resistance to broomrapes?', *Phytopathologia Mediterranea*, 57(1), pp. 170–185. Available at: [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-22543](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-22543).
- Rubiales, D., Fondevilla, S. and Fernández-Aparicio, M. (2021) 'Development of Pea Breeding Lines with Resistance to *Orobanche crenata* Derived from Pea Landraces and Wild *Pisum* spp.', *Agronomy*, 11(1), p. 36. Available at: <https://doi.org/10.3390/agronomy11010036>.
- de Saint Germain, A. *et al.* (2021) 'A *Phelipanche ramosa* KAI2 protein perceives strigolactones and isothiocyanates enzymatically', *Plant Communications*, 2(5), p. 100166. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100166>.
- Sallet, E., Gouzy, J. and Schiex, T. (2019) 'EuGene: An Automated Integrative Gene Finder for Eukaryotes and Prokaryotes', in M. Kollmar (ed.) *Gene Prediction: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer (Methods in Molecular Biology), pp. 97–120. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0_6).
- Sausse, C., Chevalot, A. and Lévy, M. (2021) 'Hungry birds are a major threat for sunflower seedlings in France', *Crop Protection*, 148, p. 105712. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105712>.
- Sausse, C. and Lévy, M. (2021) 'Bird damage to sunflower: international situation and prospects', *OCL*, 28, p. 34. Available at: <https://doi.org/10.1051/ocl/2021020>.
- Segura, V. *et al.* (2012) 'An efficient multi-locus mixed-model approach for genome-wide association studies in structured populations', *Nature Genetics*, 44(7), pp. 825–830. Available at: <https://doi.org/10.1038/ng.2314>.
- Seiler, G.J. (1997) 'Anatomy and Morphology of Sunflower', in *Sunflower Technology and Production*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 67–111. Available at: <https://doi.org/10.2134/agronmonogr35.c3>.

- Seiler, G.J. and Gulya, T.J. (2004) 'Exploration for wild helianthus species in North America: challenges and opportunities in the search for global treasures', in. *Proc. 16th International Sunflower Conference*, Fargo, ND USA.
- Seiler, G.J., Qi, L.L. and Marek, L.F. (2017) 'Utilization of Sunflower Crop Wild Relatives for Cultivated Sunflower Improvement', *Crop Science*, 57(3), pp. 1083–1101. Available at: <https://doi.org/10.2135/cropsci2016.10.0856>.
- Seiler, G.J. and Rieseberg, L.H. (1997) 'Systematics, Origin, and Germplasm Resources of the Wild and Domesticated Sunflower', in *Sunflower Technology and Production*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 21–65. Available at: <https://doi.org/10.2134/agronmonogr35.c2>.
- Shahid, S. *et al.* (2018) 'MicroRNAs from the parasitic plant *Cuscuta campestris* target host messenger RNAs', *Nature*, 553(7686), pp. 82–85. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature25027>.
- Shamimuzzaman, M. *et al.* (2023) 'Mutation and sequencing-based cloning and functional studies of a rust resistance gene in sunflower (*Helianthus annuus*)', *The Plant Journal*, n/a(n/a). Available at: <https://doi.org/10.1111/tpj.16238>.
- Sisou, D. *et al.* (2021) 'Biological and Transcriptomic Characterization of Pre-Haustorial Resistance to Sunflower Broomrape (*Orobanche cumana* W.) in Sunflowers (*Helianthus annuus*)', *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(9), p. 1810. Available at: <https://doi.org/10/gm44zg>.
- Škorić, D. (2009) 'Sunflower breeding for resistance to abiotic stresses', *HELIA*, 32(50), pp. 1–16. Available at: <https://doi.org/10.2298/hel0950001s>.
- Smith, S.M. and Li, J. (2014) 'Signalling and responses to strigolactones and karrikins', *Current Opinion in Plant Biology*, 21, pp. 23–29. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.06.003>.
- Stephens, J.D. *et al.* (2015) 'Species tree estimation of diploid *Helianthus* (Asteraceae) using target enrichment', *American Journal of Botany*, 102(6), pp. 910–920. Available at: <https://doi.org/10.3732/ajb.1500031>.
- Stotz, H.U., Thomson, J. and Wang, Y. (2009) 'Plant defensins', *Plant Signaling & Behavior*, 4(11), pp. 1010–1012. Available at: <https://doi.org/10.4161/psb.4.11.9755>.
- Su, C. *et al.* (2020) 'SHR4z, a novel decoy effector from the haustorium of the parasitic weed *Striga gesnerioides*, suppresses host plant immunity', *The New Phytologist*, 226(3), pp. 891–908. Available at: <https://doi.org/10.1111/nph.16351>.
- Subrahmaniam, H.J. *et al.* (2018) 'The genetics underlying natural variation of plant-plant interactions, a beloved but forgotten member of the family of biotic interactions', *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 93(4), pp. 747–770. Available at: <https://doi.org/10.1111/tpj.13799>.
- Talukder, Z.I. *et al.* (2020) 'Genetic Dissection of Phomopsis Stem Canker Resistance in Cultivated Sunflower Using High Density SNP Linkage Map', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), p. 1497. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21041497>.
- Tan, S. *et al.* (2005) 'Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future', *Pest Management Science*, 61(3), pp. 246–257. Available at: <https://doi.org/10.1002/ps.993>.
- Tang, S. *et al.* (2002) 'Simple sequence repeat map of the sunflower genome', *Theoretical and Applied Genetics*, 105, pp. 1124–1136. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0989-y>.

- Tang, S. *et al.* (2003) 'Genetic Mapping of the Or5 Gene for Resistance to Orobanche Race E in Sunflower', *Crop Science - CROP SCI*, 43. Available at: <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.1021>.
- Terzić, S. *et al.* (2020) 'Gene banks for wild and cultivated sunflower genetic resources', *OCL*, 27, p. 9. Available at: <https://doi.org/10.1051/ocl/2020004>.
- Těšitel, J. (2016) 'Functional biology of parasitic plants: a review', *Plant Ecology and Evolution*, 149(1), pp. 5–20. Available at: <https://doi.org/10.5091/plecevo.2016.1097>.
- Timme, R.E., Simpson, B.B. and Linder, C.R. (2007) 'High-resolution phylogeny for Helianthus (Asteraceae) using the 18S-26S ribosomal DNA external transcribed spacer', *American Journal of Botany*, 94(11), pp. 1837–1852. Available at: <https://doi.org/10.3732/ajb.94.11.1837>.
- Ueno, K. *et al.* (2014) 'Heliolactone, a non-sesquiterpene lactone germination stimulant for root parasitic weeds from sunflower', *Phytochemistry*, 108, pp. 122–128. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.09.018>.
- Untergasser, A. *et al.* (2012) 'Primer3—new capabilities and interfaces', *Nucleic Acids Research*, 40(15), p. e115. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>.
- Vear, F. (2016) 'Changes in sunflower breeding over the last fifty years', *OCL*, 23(2), p. D202. Available at: <https://doi.org/10.1051/ocl/2016006>.
- Velasco, L. *et al.* (2012) 'Inheritance of resistance to sunflower broomrape (Orobanche cumana Wallr.) in an interspecific cross between Helianthus annuus and Helianthus debilis subsp. tardiflorus', *Plant Breeding*, 131(1), pp. 220–221. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2011.01915.x>.
- Velasco, L., Pérez-Vich, B. and Fernández Martínez, J.M. (2016) 'Research on resistance to sunflower broomrape: an integrated vision'. Available at: <https://doi.org/10.13039/501100000780>.
- Vincourt, P. (2014) 'Research fields, challenges and opportunities in European oilseed crops breeding', *OCL*, 21(6), p. D602. Available at: <https://doi.org/10.1051/ocl/2014043>.
- Voorrips, R.E. (2002) 'MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs', *Journal of Heredity*, 93(1), pp. 77–78. Available at: <https://doi.org/10.1093/jhered/93.1.77>.
- Vranceanu, A.V. *et al.* (1980) 'Virulence groups of Orobanche cumana Wallr. [root parasite], differential hosts and resistance sources and genes in sunflower', in. [9. *International Conference of Sunflower*, Torremolinos, Malaga (Spain), 8-13 Jun 1980, Ministerio de Agricultura, Servicio de Publicaciones Agrarias. Available at: [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Virulence+groups+of+Orobanche+cumana+Wallr.+%5Broot+parasite%5D%2C+differential+hosts+and+resistance+sources+and+genes+in+sunflower&author=Vranceanu%2C+A.V.&publication\\_year=1981](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Virulence+groups+of+Orobanche+cumana+Wallr.+%5Broot+parasite%5D%2C+differential+hosts+and+resistance+sources+and+genes+in+sunflower&author=Vranceanu%2C+A.V.&publication_year=1981) (Accessed: 17 May 2023).
- Westwood, J.H. *et al.* (2010) 'The evolution of parasitism in plants', *Trends in Plant Science*, 15(4), pp. 227–235. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.01.004>.
- Wimmer, V. *et al.* (2012) 'synbreed: a framework for the analysis of genomic prediction data using R', *Bioinformatics*, 28(15), pp. 2086–2087. Available at: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts335>.
- Yang, C. *et al.* (2020) 'Transcriptional profiling of underground interaction of two contrasting sunflower cultivars with the root parasitic weed Orobanche cumana', *Plant and Soil*, 450(1), pp. 303–321. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04495-3>.

Yao, R. *et al.* (2016) 'DWARF14 is a non-canonical hormone receptor for strigolactone', *Nature*, 536(7617), pp. 469–473. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature19073>.

Yasumoto, S. *et al.* (2011) 'Effects of High Water Table and Short-Term Flooding on Growth, Yield, and Seed Quality of Sunflower', *Plant Production Science*, 14, pp. 233–248. Available at: <https://doi.org/10.1626/pp.14.233>.

Yoshida, S. *et al.* (2016) 'The Haustorium, a Specialized Invasive Organ in Parasitic Plants', *Annual Review of Plant Biology*, 67(1), pp. 643–667. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111702>.

You, F.M. *et al.* (2008) 'BatchPrimer3: A high throughput web application for PCR and sequencing primer design', *BMC Bioinformatics*, 9(1), p. 253. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-253>.

Yu, J.-K. *et al.* (2003) 'Towards a Saturated Molecular Genetic Linkage Map for Cultivated Sunflower', *Crop Science - CROP SCI*, 43. Available at: <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.0367>.

Zambelli, A., León, A. and Garcés, R. (2015) 'Mutagenesis in Sunflower', in E. Martínez-Force, N.T. Dunford, and J.J. Salas (eds) *Sunflower*. AOCS Press, pp. 27–52. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-94-3.50008-8>.

Zhang, J. *et al.* (2006) 'Pyramiding of Xa7 and Xa21 for the improvement of disease resistance to bacterial blight in hybrid rice', *Plant Breeding*, 125(6), pp. 600–605. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2006.01281.x>.

Zhang, T. and Elomaa, P. (2021) 'Don't be fooled: false flowers in Asteraceae', *Current Opinion in Plant Biology*, 59, p. 101972. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.09.006>.

Zorrilla, J.G. *et al.* (2022) 'Strategies for the synthesis of canonical, non-canonical and analogues of strigolactones, and evaluation of their parasitic weed germination activity', *Phytochemistry Reviews*, 21(5), pp. 1627–1659. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11101-022-09801-8>.