



TESIS DOCTORAL

María Isabel Rodríguez Ojeda

Marzo, 2016

Estudios genéticos y de biología reproductiva en *Orobanche cumana* Wallr.

TITULO: *Estudios genéticos y de biología reproductiva en Orobanche cumana
Wallr*

AUTOR: *María Isabel Rodríguez Ojeda*

© Edita: UCOPress. 2016
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

TESIS DOCTORAL

POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES

**Estudios genéticos y de biología reproductiva
en *Orobanche cumana* Wallr.**

Autora

María Isabel Rodríguez Ojeda

Directores

Dra. Begoña Pérez Vich

Dr. Juan Fernández Escobar

Córdoba, Marzo 2016



MINISTERIO
DE ECONOMIA
Y COMPETITIVIDAD



BEGOÑA PÉREZ VICH, DOCTORA EN BIOLOGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA, CIENTÍFICO TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MEJORA GENÉTICA VEGETAL DEL INSTITUTO DE AGRICULTURA SOSTENIBLE, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC),

INFORMA:

Que **MARÍA ISABEL RODRÍGUEZ OJEDA**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo mi dirección en el Departamento de Mejora Genética Vegetal del Instituto de Agricultura Sostenible el trabajo de investigación titulado "**Estudios genéticos y de biología reproductiva en *Orobanche cumana* Wallr.**". Considero que dicho trabajo reúne los méritos suficientes para optar al Grado de Doctora.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente informe en Córdoba a 8 de marzo de 2016.



JUAN FERNÁNDEZ ESCOBAR, Doctor en Biología por la universidad de Córdoba y actualmente *Thecnical Crop Expert* en oleaginosas y cereales en el Departamento de *Technical Support* de Syngenta España,

INFORMA:

Que **MARÍA ISABEL RODRÍGUEZ OJEDA**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo mi dirección en el Departamento Técnico de Koipesol Semillas (actualmente perteneciente a Syngenta España) el trabajo de investigación titulado "**Estudios genéticos y de biología reproductiva en *Orobanche cumana* Wallr.**". Considero que dicho trabajo reúne los méritos suficientes para optar al Grado de Doctora.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente informe en Córdoba a 14 de marzo de 2016

A handwritten signature in black ink, appearing to be the initials 'JFE' with a stylized flourish.



TÍTULO DE LA TESIS: Estudios genéticos y de biología reproductiva en *Orobanche cumana* Wallr.

DOCTORANDO/A: María Isabel Rodríguez Ojeda

ESCRITO RAZONADO DEL RESPONSABLE DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
(Ratificando el Informe favorable del director. Sólo cuando el director no pertenezca a la Universidad de Córdoba).

Como responsable de la línea de investigación 'Mejora Genética Vegetal' ratifico el informe presentado por los directores de la tesis.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 9 de Marzo de 2016

Firma del responsable de línea de investigación

Fdo.: Juan Gil Ligero



TÍTULO DE LA TESIS: Estudios genéticos y de biología reproductiva en *Orobanche cumana* Wallr.

DOCTORANDO/A: María Isabel Rodríguez Ojeda

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La presente Tesis Doctoral se enmarca en un amplio programa de mejora genética en girasol para control de la mala hierba parásita jopo de girasol (*Orobanche cumana* Wallr.), y se ha llevado a cabo en el marco de colaboración entre el Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC, Córdoba) y la empresa Koiposol Semillas (actualmente Syngenta) en Syngenta España en Carmona, Sevilla. Al inicio de esta Tesis Doctoral, la investigación acerca del sistema parasítico girasol-*O. cumana* estaba centrada prácticamente en su totalidad en la planta hospedadora y, en concreto, en la identificación de fuentes de resistencia genética y en el estudio de su modo de herencia, siendo los estudios acerca del parásito muy escasos. Esta es la razón fundamental que motivó los estudios planteados en esta Tesis Doctoral, la de arrojar luz sobre la biología y genética del parásito, con el objetivo final de desarrollar de manera más eficiente sistemas de control integral y sostenible de esta planta parásita.

La primera parte de la Tesis consistió en la realización de una serie de estudios metodológicos iniciales para el manejo del jopo en estudios genéticos y de biología reproductiva. Se pretendía con ello valorar si el jopo del girasol tolera el aislamiento, es decir, comprobar si podían obtenerse semillas por medio de autofecundación y si éstas eran viables o no, y poner a punto técnicas de hibridación manual en esta especie. Este trabajo se realizó de manera ejemplar por la Doctoranda, de forma muy metódica y exhaustiva, lo cual condujo al desarrollo de un conjunto de técnicas reproductivas de aislamiento e hibridación controlada en *O. cumana* que permitieron llevar a cabo los siguientes objetivos de la Tesis. Estos estudios se publicaron en una de las revistas de mayor prestigio en el área de Ciencias Agrarias y en concreto en el ámbito de las malas hierbas, *Weed Research*.

Una segunda parte de la Tesis consistió en la realización del primer estudio genético llevado a cabo hasta la fecha sobre herencia de caracteres en *O. cumana*. Para ello, se aisló un jopo mutante con ausencia de pigmentación en su tallo y flores, hallado en una población de esta especie, y se estudió la herencia de este carácter, que presentaba un fenotipo bien identificable. Aplicando los métodos de aislamiento, emasculación e hibridación desarrollados con anterioridad, la Doctoranda realizó cruzamientos entre jopos sin pigmentación y jopos normales y mediante el análisis de las generaciones F_1 , F_2 y F_3 determinó la herencia del mencionado carácter. Los resultados obtenidos abrieron las puertas a posibles investigaciones sobre aspectos genéticos en esta maleza parásita, además de presentar utilidad en otros estudios biológicos, como por ejemplo, profundizar en el estudio del sistema reproductivo del jopo del girasol que constituyó otro apartado de esta Tesis Doctoral. Estos estudios se publicaron en la revista *Weed Research*, cuya relevancia en el ámbito de las ciencias de malas hierbas se ha destacado anteriormente.

La tercera parte de la Tesis consistió, como se ha comentado con anterioridad, en el estudio del sistema de reproductivo del jopo del girasol. Para llevar a cabo este objetivo, la Doctoranda empleó líneas de *O. cumana* no pigmentadas (obtenidas por autofecundaciones sucesivas) y las creció, parasitando girasol, conjuntamente con líneas de jopos normales, en un diseño en el que una única planta de jopo no pigmentado se desarrolló rodeada de jopos pigmentados. Tras completar los periodos de floración y maduración, se recolectaron las semillas originadas en las plantas de jopo no pigmentado para volver a infestar con ellas y observar sus progenies. Al igual que en los anteriores objetivos, la Doctoranda demostró ser muy metódica y tener una gran capacidad de trabajo, determinando por primera vez en experimentos directos la tasa de polinización cruzada en la planta parásita *O. cumana*. Estos estudios se publicaron en la revista *Biologia Plantarum*.

Finalmente, la cuarta parte de esta Tesis Doctoral consistió en el estudio de la herencia de la virulencia / avirulencia en *O. cumana*. El trabajo consistió en la realización de cruzamientos entre jopos con diferentes grados de virulencia (de raza E y F) y estudio de las generaciones segregantes. Por la naturaleza parasitaria del jopo, la generación F_2 se empleó para obtener un número suficiente de semillas que se evaluaron para virulencia en familias F_3 . Además, dichas familias F_3 se hubieron de evaluar tanto infectando a la línea diferencial de girasol como a una línea susceptible a todas las razas, para no incluir posibles escapes en el estudio. Este trabajo presentó un enorme esfuerzo debido al elevado número de plantas que se manejaron, con el consiguiente elevado número de inoculaciones, embolsados planta a planta, etc. Destacar de nuevo la ejemplaridad de la Doctoranda en la realización de tales tareas, que condujo a obtener unos resultados de gran relevancia científica. Estos resultados sugirieron que la avirulencia de la raza E y la virulencia de la raza F son alélicas y controladas por un único gen, lo cual

confirmó por vez primera la teoría gen por gen de la interacción girasol-jopo. Estos estudios se publicaron en la revista *Weed Research*.

Como se puede deducir los párrafos anteriores, la Tesis Doctoral ha tenido un componente formativo importante y un nivel de exigencia elevado, abordando diferentes estudios metodológicos, genéticos y de biología reproductiva en una planta parásita en la que no se había realizado ningún estudio de tal naturaleza con anterioridad. En nuestra opinión, la Doctoranda ha llevado a cabo tales estudios de manera ejemplar, obteniendo resultados excepcionales que han supuesto un avance cualitativo en el estudio del jopo, tanto en relación a su evolución racial como en su interacción con el girasol, y que por tanto contribuirán de manera importante al diseño de estrategias de control de esta planta parásita. Los resultados obtenidos se han plasmado en las cuatro publicaciones antes referidas y en este manuscrito de Tesis presentado como compendio de publicaciones.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 7 de Marzo de 2016

Firma del/de los director/es



Fdo.: Begoña Pérez Vich



Fdo.: Juan Fernández Escobar

A mis Padres, Ántipe y Paco,
a mi marido Julio e hijas,
Julia e Isabel.
Con todo mi cariño y admiración.

Cuando el objetivo te parezca difícil, no cambies de objetivo; busca un nuevo camino para llegar a él.

Confucio

AGRADECIMIENTOS

He llegado hasta aquí, siento por ello una gran emoción y alegría, me siento muy feliz, ¿será que se acerca el final?, en cuyo recorrido he encontrado y he trabajado junto a muchas personas de gran valía, grandes profesionales y sobre todo muy generosas, que me han ayudado y aportado mucho.

Si consigo ver más lejos es porque he conseguido auparme a hombros de gigantes. Isaac Newton

Por ello deseo de todo corazón expresarles mi sincero agradecimiento a todos aquellos que, en uno o en otro momento y de muy distintas formas, me han ayudado en todo lo que ha concernido, al trabajo experimental, al desarrollo de las publicaciones y elaboración del manuscrito de esta Tesis Doctoral.

Agradezco a mis directores de Tesis Doctoral, la Dra. Begoña Pérez Vich y el Dr. Juan Fernández Escobar, la amplia dedicación prestada, su labor de supervisión desarrollada con rigor y entusiasmo, perseverando a mi lado en el camino hasta ver culminado este trabajo, con una paciencia y positividad admirables. Nunca me han faltado sus ánimos.

Te doy las gracias Dr. Leonardo Velasco Varo, por creer con firmeza en este proyecto de investigación, por creer en mí, por tener claro que esto debía seguir adelante y no dejarme caer, por contribuir a su éxito, dando lo mejor de lo mejor hasta el final, con alegría.

Al profesor Dr. José María Fernández Martínez, por sumar en este equipo desde sus inicios, por contribuir siempre y apostar por el modo de presentación por publicaciones. Gracias por sus correcciones y revisiones magistrales.

Gracias, sois todo un ejemplo para mí, Dra. Rocío Pineda Martos por aportar y sumarte al equipo y a Dra. Lidia del Moral Navarrete, por transmitir su entusiasmo y experiencia. Las dos me habéis animado mucho. Gracias por invitarme a vuestras lecturas de Tesis, fueron citas muy enriquecedoras.

En los inicios, gracias Francisco Sallago por ser mi mentor en Koipesol Semillas y confiar en mí, abriéndome puertas llenas de grandes oportunidades formativas y profesionales. Aprendí mucho a tu lado.

Miles de Gracias a mi director en la empresa, actualmente Syngenta España, Germán López, siempre ahí, dispuesto a ayudar involucrándose con firmeza en los asuntos más importantes para mi trabajo y en lo relacionado con el desarrollo de las líneas de investigación; especialmente por proporcionar y diligenciar siempre recursos humanos y técnicos que han permitido desarrollar y culminar este trabajo de investigación.

Especial Mención con toda mi gratitud y admiración por su gran contribución al desarrollo teórico y práctico de esta Tesis Doctoral al Dr. Luis Carlos Alonso. Por ser un gran

profesor, aprendí mucho siendo alumna tuya en la Facultad de Biología en la universidad de Sevilla en Mejora Genética Vegetal, los acontecimientos hicieron que unos años más tarde comenzara a trabajar en Koipesol Semillas, donde fuere Director General. Contigo y con tu gran equipo de extraordinarios profesionales me he forjado, gracias por enseñarme todo cuando se del Girasol y por dirigirme en diferentes líneas de investigación todas ellas de gran impacto, la mayoría de ellas precursoras de las incluidas en la Tesis, mil gracias de nuevo, por inculcarme la pasión por investigar, por no dejar de buscar respuestas, esa noble inquietud activa del que de todo duda razonablemente!

Gracias compañeros y compañeras de andadura en lo que fue el trabajo de análisis y otros derivados de la mejora, lidiando con el jopo del girasol, menudo parásito! infinidad de macetas, de campos, en invernaderos y umbráculos, especialmente quiero destacar a Ana Gutiérrez, Enrique García, Concepción Tomillero, José M^a Martínez, Isabel M^a Sánchez, Isabel M^a Benjumea, Rosario García, gracias por vuestra implicación y entusiasmo.

A mis padres, por predicar con el ejemplo, por su espíritu de lucha, por la educación recibida, un gran regalo que me ha dado la vida. A mi hermano y a toda mi familia por el interés mostrado.

A mis amigos por estar siempre ahí, por apoyarme en todo momento, especialmente a los incondicionales Remedios Gram, Elisa Ramos, Marcelo Fernández.

Gracias a los miembros del Tribunal por la lectura de este trabajo.

Al Ministerio de Educación y Cultura, Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica, Subdirección General de Formación, Perfeccionamiento y Movilidad de Investigadores, por otorgarme durante 4 años las ayudas para el intercambio de personal investigador entre industrias y centros públicos de investigación.

Gracias a ello pude cursar los estudios de tercer ciclo en la Universidad de Córdoba, el Dto. de Genética, programa de ingeniería genética Agroforestal en la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes, obteniendo la Suficiencia Investigadora. Tuve magnífico tutor Dr. José Ignacio Cubero y profesores como los Dres. Antonio de Haro Bailón y Luis Miguel Martín Martín.

Mi agradecimiento a este tripartito, a la Universidad de Córdoba al Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC) y a Syngenta por establecer fuertes nexos de unión y hacerlo posible.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	5
Introducción	8
1.- Plantas parásitas	8
1.1.- Definición, clasificación y características	8
1.2.- El género <i>Orobanche</i>	10
2.- <i>Orobanche cumana</i> : El jopo del girasol	12
2.1.- Características morfológicas	13
2.1.1.- Diversidad morfológica en <i>Orobanche</i> spp. en relación con su pigmentación	15
2.2.- Distribución geográfica, dispersión e importancia económica	17
2.3.- Métodos de control	18
2.3.1.- Control mecánico y agronómico	19
2.3.2.- Control químico	20
2.3.3.- Control biológico	21
2.3.4.- Control mediante resistencia genética	22
3.- Aspectos básicos de la biología de <i>Orobanche cumana</i> y otras plantas parásitas del género	23
3.1.- Ciclo del parásito	23
3.2.- Biología reproductiva	26
4.- Aspectos básicos de la genética en <i>Orobanche cumana</i> y otras plantas parásitas del género	28
4.1- Estructura y evolución racial en <i>O. cumana</i>	28
4.2.- Estudios genéticos en <i>Orobanche</i> spp.	29
4.3.- Interacción jopo-girasol. Mecanismos de resistencia y avirulencia	32

4.3.1.- Genética y mecanismos de resistencia a jopo en girasol	32
4.3.1.1.- Identificación y desarrollo de fuentes de resistencia	32
4.3.1.2.- Control genético de la resistencia a jopo	33
4.3.1.3.- Mecanismos de la reacción resistente	34
4.3.2.- Control genético de la avirulencia en <i>Orobanche</i> spp. y otras plantas parásitas.	36
4.3.2.1.- Concepto de genes de avirulencia	36
4.3.2.2.- Genes de avirulencia en plantas parásitas	37
Hipótesis y objetivos	40
Bibliografía	45
Publicaciones	70
Conclusiones	107
Contribuciones	110

Resumen



Abstract

RESUMEN

Estudios genéticos y de biología reproductiva en *Orobanche cumana* Wallr.

Orobanche cumana Wallr., denominada jopo del girasol, es una planta angiosperma, parásita de raíz, carente de clorofila, que vive a expensas del girasol (*Helianthus annuus* L.; Asteraceae), único cultivo que parasita. En la naturaleza, *O. cumana* parasita un número reducido de especies de la familia Asteraceae, principalmente *Artemisia* spp., desde el Suroeste de Europa hasta Asia Central. El jopo del girasol está entre las plantas parásitas de mayor importancia económica, por las pérdidas de producción que ocasiona en la mayor parte de las zonas de producción de girasol de Europa y Asia. Existen diferentes métodos de lucha contra el jopo del girasol, siendo el control genético, mediante el uso de cultivares de girasol resistentes a jopo, y el control químico, mediante el empleo de cultivares de girasol tolerantes a herbicidas, los dos métodos más eficientes empleados hasta la fecha. El control genético de esta planta parásita es complejo, por su elevada capacidad de dispersión y mutación, pues cada planta produce miles de diminutas semillas que se propagan fácilmente y que pueden permanecer viables en el suelo de unos 15 a 20 años.

A diferencia de la mayoría de interacciones entre *Orobanche* spp. y plantas cultivadas, en las que resistencia en la planta hospedadora es normalmente de tipo horizontal, es decir, poligénica, recesiva y no específica de raza, la resistencia a *O. cumana* en girasol es generalmente de tipo vertical, es decir, monogénica, dominante y específica de raza. Dentro del sistema parasítico girasol-*O. cumana*, la mayoría de los estudios se han centrado en la planta hospedadora, en concreto, en la identificación de fuentes de resistencia genética y en el estudio del modo de herencia de la resistencia, siendo los estudios acerca del parásito muy escasos. Esta es la razón fundamental que motiva la realización del trabajo que planteamos, la de arrojar luz sobre la biología y genética de *O. cumana*, para así poder tener una visión de

conjunto de la interacción huésped-parásito con el objetivo final de desarrollar de manera más eficiente sistemas de control integral y sostenible de esta planta parásita.

Hasta el inicio de esta Tesis Doctoral, no se había realizado ningún estudio genético de herencia de caracteres en *O. cumana*, ni estudios específicos de biología reproductiva en esta especie. Para llevar a cabo tales estudios, era preciso desarrollar previamente procedimientos y protocolos para el manejo de la planta parásita. En concreto, **el primero de los objetivos de esta Tesis se centró en la realización de una serie de estudios metodológicos iniciales para valorar si el jopo del girasol tolera bien el aislamiento**, es decir para comprobar si pueden obtenerse semillas autofecundadas mediante aislamiento de las plantas con bolsas, y si el embolsado afecta a la viabilidad e infectividad de las semillas. Las pruebas se realizaron con tres tipos de bolsas: (i) de papel Kraft marrón, (ii) de papel satinado blanco y (iii) de plástico transparente micro-perforado, empleando en esta caso una doble bolsa. Se concluyó que las plantas de *O. cumana* toleran bien la autofecundación mediante embolsado de plantas antes de la floración, si bien el tipo de bolsa empleada tiene efectos significativos sobre el desarrollo de las plantas y sobre la cantidad, calidad y capacidad infectiva de las semillas producidas. De los tres tratamientos de embolsado empleados, únicamente el embolsado con plástico micro-perforado no presentó diferencias significativas en comparación con las plantas control no embolsadas, indicando que este tipo de embolsado es adecuado para las plantas de jopo.

En línea con el primer objetivo, **el segundo objetivo de esta Tesis se centró en el estudio de la producción de semilla mediante cruzamientos controlados en *O. cumana***, como punto de partida para la realización de estudios genéticos en esta especie. Se realizaron experimentos de emasculación manual, empleando bolsas de papel blanco o de plástico micro-perforado para el aislamiento de las plantas. Ambas resultaron ser un aislamiento eficaz frente al polen externo de jopo, ya que plantas aisladas y emasculadas no produjeron semilla. Las plantas control emasculadas y no embolsadas produjeron un 6.5% de ovarios fertilizados, lo que sugirió la existencia de polinización cruzada en esta especie. Experimentos de hibridación controlada de plantas de jopo produjeron semillas viables, lo que indicó que los órganos reproductores femeninos no resultan alterados al manipularse las flores durante la emasculación y fertilización manual. Además, el tipo de bolsa empleada para el aislamiento de

plantas afectó al porcentaje de ovarios fertilizados, siendo éste significativamente mayor cuando se emplearon bolsas de plástico micro-perforado.

El tercer objetivo de la Tesis consistió en el estudio de la herencia del carácter ausencia de pigmentación en *O. cumana*. Se aisló en primer lugar un mutante natural de *O. cumana* carente de pigmentación antociánica, que resulta en color amarillo del tallo y flores blancas. Se cruzaron plantas de la línea mutante con plantas de una línea con pigmentación normal y se evaluaron las generaciones F₁, F₂ y F₃. Se concluyó que la ausencia de pigmentación es un carácter parcialmente recesivo determinado por un único gen, que hemos denominado *Pg*. Las plantas herocigotas para este gen presentan un fenotipo intermedio fácilmente reconocible visualmente. Esto posibilita su uso como marcador visual en diversos tipos de estudios. Asimismo, se demostró que el grado de virulencia de familias F₃ procedentes de plantas F₂ homocigotas dominantes o recesivas para el gen *Pg* no fue significativamente diferente, indicando que la ausencia de pigmentación no tiene efecto alguno sobre la capacidad infectiva del jopo. Es importante destacar que este estudio ha demostrado por primera vez en *O. cumana* la utilidad del uso de las técnicas de hibridación controlada para el desarrollo de poblaciones segregantes en esta especie, necesarias para futuros estudios genéticos y moleculares.

Relacionado con el anterior, **el cuarto objetivo de la Tesis consistió en el estudio de la tasa de polinización cruzada en *O. cumana* empleando para ello el mutante no pigmentado como marcador visual.** Para ello, se realizaron experimentos en condiciones de campo y en macetas en los que plantas individuales de jopo no pigmentado se desarrollaron rodeadas de jopos pigmentados. El estudio de la progenie de las plantas no pigmentadas permitió identificar la presencia de plantas híbridas, que promediaron un 28.8% del total de la progenie en condiciones de campo y un 21.5% en macetas. En el transcurso de estos experimentos, se observó la presencia de insectos polinizadores de la familia Halictidae (Hymenoptera) en el interior de flores de plantas no pigmentadas, lo que sugiere su posible papel en la polinización cruzada de esta especie. A pesar de haber sido considerada hasta la fecha como una especie estrictamente autógena, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral indican la presencia de una cierta tasa de polinización cruzada en *O. cumana*, que debe ser tenida en cuenta para la obtención de líneas puras y aislamiento de genotipos.

Asimismo, la existencia de polinización cruzada debe considerarse para entender aspectos como estructura de poblaciones y evolución racial en este especie.

Por último, **el quinto objetivo de esta Tesis Doctoral fue el estudio de la herencia de la virulencia/avirulencia en *O. cumana***. Para ello, se desarrollaron en primer lugar líneas de jopo correspondientes a dos razas diferentes, la raza E y la raza F del Valle del Guadalquivir. Mediante cruzamientos entre plantas de ambas líneas, se obtuvieron las generaciones F_1 , F_2 y F_3 . De ellas, las generaciones F_1 y F_3 se evaluaron frente a la línea P-1380, portadora del gen de resistencia Or_5 , que confiere resistencia a las razas A a E pero susceptibilidad frente a la raza F. Los resultados mostraron que la avirulencia en este cruzamiento es dominante y está controlada por un único gen, que hemos denominado Avr_{Or_5} . Estos resultados confirman a nivel de la plantas parásita que la interacción girasol-*O. cumana*, en el caso particular del gen Or_5 en girasol y el gen Avr_{Or_5} en *O. cumana*, se ajusta a una interacción gen-a-gen, como se había demostrado previamente a nivel de la planta hospedadora. Los resultados de este estudio permitirán entender mejor la evolución racial en esta mala hierba parásita del girasol.

ABSTRACT

Genetic studies and reproductive biology in *Orobanche cumana* Wallr.

Orobanche cumana Wallr., called sunflower broomrape, is a root parasitic angiosperm that does not synthesize chlorophyll and parasitizes only a cultivated plant, sunflower (*Helianthus annuus* L.; Asteraceae). In the wild, *O. cumana* parasitizes a reduced number of species of the Asteraceae, mainly *Artemisia* spp., from Southwestern Europe to Central Asia. Sunflower broomrape is amongst the parasitic plants with the highest economic impact, on account of the large yield losses that it produces in most of the sunflower production areas in Europe and Asia. Amongst the methods of control of sunflower broomrape, genetic control, through the use of sunflower cultivars with genetic resistance to broomrape, and chemical control, through the use of sunflower cultivars with tolerance to herbicides that control broomrape, are the most effective methods used to date. Genetic control is hampered by the capacity of mutation and dispersal of the species, since every single plant produces thousands of tiny seeds that may remain viable in the soil for more than 15 years.

Unlike most of the interactions between *Orobanche* spp. and cultivated plants, in which resistance in the host is generally horizontal, i.e. polygenic, recessive, and non-race specific, resistance to *O. cumana* in sunflower is in most cases vertical, i.e. monogenic, dominant, and race specific. Within the parasitic system sunflower-*O. cumana*, most studies have focused on the host, particularly on the identification of sources of resistance and the study of their modes of inheritance. Studies on the parasite have been scarce thus far. Accordingly, the motivation of the present research is casting light on biological and genetic aspects of *O. cumana*, in order to get a global picture of the host-parasite interaction and subsequently to develop effective methods for sustainable control of this parasitic weed of sunflower.

At the beginning of this Thesis, no studies had been conducted on the inheritance of specific traits or on the mating system of *O. cumana*. To carry out such studies, it is necessary previous research on optimized procedures on the management of this parasitic plant in genetic studies. In particular, **the first objective of this Thesis focused on the evaluation of the aptitude of broomrape to produce seeds of high quality under isolation conditions.** Different isolation conditions using three types of bags were evaluated: brown Kraft paper bags, white paper bags, and micro perforated plastic bags, in the latter cases using two bags. It was concluded that *O. cumana* plants tolerate well self-fertilization by bagging the plants before flowering, although the type of bag has a great effect on plant development as well as on the quantity, quality, and infective ability of the seeds. From the three types of bags, only microperforated plastic bags showed no significant differences with the unbagged control, indicating that this type of bag is adequate for broomrape plants.

In line with the first objective, **the second objective of the Thesis was the study of seed production in controlled crosses between *O. cumana* plants,** as a starting point for performing genetic studies in this species. Experiments of manual emasculation were conducted using white paper bags and micro perforated plastic bags for plant isolation. Both types of bags were effective to prevent pollen contamination, since plants emasculated and bagged produced no seeds with both types of bags in absence of manual pollination. Control plants, emasculated and unbagged, produced 6.5% of fertilized ovaries, which suggested the existence of cross-pollination in this species. Controlled hybridization produced viable seeds, indicating no alteration in sexual organs during flower manipulation. The type of bag influenced the percentage of fertilized ovaries, with the highest percentage observed with microperforated plastic bags.

The third objective of the Thesis consisted in the study of the inheritance of the absence of pigmentation in *O. cumana*. In a first step, a natural mutant lacking anthocyanic pigmentation, with yellow stems and white flowers, was isolated. Plants of the mutant line were crossed by plants of a normally pigmented line and the F₁, F₂ and F₃ generations were evaluated. It was concluded that the absence of pigmentation is controlled by partially recessive alleles at a single locus, designated *Pg*. Heterozygote plants show intermediate phenotype easily recognized visually. This facilitates the use of the unpigmented trait as a

visual marker for different types of studies in this species. It was also demonstrated that F₃ families from homozygote F₂ plants dominant or recessive at the *Pg* locus did not differ for virulence, which suggested that the absence of pigmentation has no effect on the infective ability of *O. cumana*. It is important to highlight that this study demonstrated for the first time the utility of controlled hybridization techniques for the development of segregating populations in *O. cumana*, required for future genetic and molecular studies.

Related to the previous objective, **the fourth objective of the Thesis focused on the study of the cross pollination rate in *O. cumana*, using the unpigmented mutant as a visual marker.** Two experiments in which single unpigmented plants were surrounded by pigmented plants were conducted under field and pot conditions. The presence of hybrid plants with intermediate phenotype in the progenies of unpigmented plants allowed the estimation of the cross fertilization rate, which averaged 28.8% under field conditions and 21.5% under pot conditions. Small insects of the Halictidae family (Hymenoptera) were observed inside the flowers of unpigmented plants, which suggested their role in cross pollination in this species. Despite being considered so far as a strictly autogamous species, the results of this study indicate the presence of a certain degree of cross pollination in *O. cumana*, which should be taken into account for the development of inbred lines and isolation of genotypes. The existence of cross pollination is also relevant to understand the structure of populations and race evolution in this species.

Finally, **the fifth objective of this Thesis was the study of the inheritance of virulence/avirulence in *O. cumana*.** Lines of two different races, E and F from the Guadalquivir Valley, were first developed. Plants of both lines were crossed and the F₁, F₂ and F₃ generations were developed. The F₁ and F₃ generations were evaluated on the differential line P-1380, carrying the resistance gene *Or*₅, which confers resistance to races A to E but not to race F. The results showed that avirulence in this cross is controlled by dominant alleles at a single gene that we have named *Avr*_{*Or*5}. These results confirmed at the *O. cumana* level that the parasitic interaction sunflower-*O. cumana*, in the particular case of the resistance gene *Or*₅ in sunflower and the avirulence gene *Avr*_{*Or*5} in *O. cumana*, follows a gene-for-gene interaction, as it had been shown previously in sunflower. The results of this study will facilitate understanding race evolution in this parasitic weed of sunflower.

Introducción



INTRODUCCION

1.- Plantas parásitas

1.1.- Definición, clasificación y características

Las plantas parásitas son plantas heterótrofas que necesitan incorporar materia orgánica fabricada por otras plantas para completar su ciclo vital. Son denominadas por ello fitoparásitas o parásitas vegetales. Entre las plantas vasculares, el parasitismo se encuentra únicamente en el grupo de angiospermas eudicotiledóneas (Heide-Jørgensen, 2013). De acuerdo con su modo de nutrición, las plantas parásitas se pueden clasificar en dos grandes grupos: (a) *holoparásitas*, que carecen por completo de clorofila y capacidad de realizar fotosíntesis, y son plantas parásitas *obligadas* que precisan desarrollar todo su ciclo vital a expensas de una planta hospedadora y (b) *hemiparásitas*, que tienen cierta capacidad fotosintética, al menos en determinados estadios de su ciclo vital, y pueden sintetizar parcialmente los elementos necesarios para su nutrición (Heide-Jørgensen, 2013). Las plantas hemiparásitas pueden ser *facultativas* u *obligadas*, siendo capaces de completar con éxito su ciclo vital independientemente o no, respectivamente, de la planta hospedadora. Asimismo, en función del rango de hospedadores, podemos encontrar plantas parásitas *generalistas* o bien específicas de huésped, según puedan parasitar a muchas otras especies de plantas o se hayan especializado en una especie y género en concreto, respectivamente (Heide-Jørgensen, 2013).

Las plantas parásitas tienen características propias que las definen y diferencian de las plantas autótrofas, presentando algunos órganos modificados o inexistentes y otros muy característicos y especializados por su adaptación al modo de vida total o parcialmente parásito. Fisiológicamente, es el *haustorio* el que caracteriza, por encima de cualquier otro órgano, a las especies parásitas, ya que constituye la conexión física entre dichas especies y

sus plantas hospedadoras. Se inicia como tubo germinativo que penetra en la planta hospedadora y conecta con su xilema, floema, o ambos, estableciendo una conexión vascular completa que permite extraer de la planta hospedadora agua y sustancias nutritivas con gran eficiencia (Joel et al., 2013). El haustorio constituye además una interface entre la planta parásita y la planta hospedadora que permite no sólo el intercambio de nutrientes, solutos y carbohidratos, sino también de macromoléculas como proteínas (Aly et al., 2011), ADN (Yoshida et al., 2010) o ARNs (Tomilov et al., 2008; Westwood et al., 2009). Además de este órgano altamente especializado, las plantas parásitas carecen de raíces funcionales, o las tienen modificadas, y originan sustancias de naturaleza mucilaginosa con las que son capaces de adherirse fuertemente a las raíces, en caso de que sean parásitas de raíz, o a los tallos del hospedante si toman su alimento de la parte aérea. Las plantas parásitas de raíz pueden responder de un modo preciso y especializado a señales químicas presentes en la rizosfera producidas por otras plantas, que pueden desencadenar la germinación de sus semillas y posteriormente orientar a los tubos germinativos hacia sus futuros hospedantes. Los tallos se desarrollan generalmente de forma vertical, por encima del suelo. Sus funciones son las de sostener las hojas, almacenar las sustancias nutritivas, y conducir el agua y los nutrientes, y pueden ser flexibles o bien formar un tronco rígido y leñoso. Las hojas y sus peciolos, estructuras altamente especializadas en la fabricación y transporte de alimentos en plantas con capacidad fotosintética, están ausentes en las plantas holoparásitas obligadas, pudiendo existir como tales o transformadas en algunas hemiparásitas y parásitas facultativas con alguna o todas sus funciones. Los tallos pueden presentar brácteas. En general, se trata de plantas con vistosas flores, con cálices que pueden o no tener sépalos. Las flores pueden ser unisexuales o hermafroditas, las cuales han desarrollado diferentes formas y mecanismos de polinización según la especie. Tras la fecundación, se producen multitud de semillas que son liberadas de nuevo al ambiente (Musselman y Press, 1995; Nickrent, 2002a, 2002b).

Existen numerosas especies de plantas parásitas que se distribuyen por todo el planeta, pudiendo vivir a costa de un gran número de especies tanto arbóreas como herbáceas a las que parasitan. Se ha estimado que en torno al 1% de las plantas angiospermas presentan algún grado de parasitismo (Parker y Riches, 1993). Una reciente clasificación basada en estudios moleculares ha identificado 28 familias de plantas parásitas, la mayoría de ellas compuestas exclusivamente por este tipo de plantas, con excepción de tres familias (Orobanchaceae,

Lauraceae y Convolvulaceae) que contienen tanto plantas parásitas como no parásitas (Nickrent, 2010). Las familias de plantas parásitas pertenecen a 12 órdenes diferentes, lo que indica que el parasitismo ha evolucionado independientemente varias veces (Heide-Jørgensen, 2013). El número total de especies parásitas se estima en torno a 4,500, agrupadas en 270-275 géneros (Heide-Jørgensen, 2013).

Dentro de las plantas parásitas hay especies que parasitan plantas cultivadas, y que por tanto pueden constituir una importante limitación fitopatológica del rendimiento del cultivo, llegando incluso en casos extremos a su abandono (Nickrent, 2002a; Walters, 2010; Parker, 2013). Las plantas fitoparásitas de mayor importancia económica, por las pérdidas de producción que ocasionan, pertenecen a seis géneros agrupados en tres familias: *Cuscuta* dentro de la familia Convolvulaceae; *Orobanche*, *Phelipanche* y *Striga* pertenecientes a la familia Orobanchaceae; y *Arceuthobium* y *Viscum*, ambos de la familia Viscaceae (Nickrent, 2002b; Schneeweiss, 2013). Dentro de estos géneros, las especies más dañinas pertenecen a los géneros *Striga* (malezas de brujas) y *Orobanche* y *Phelipanche* (jopos) (Musselman, 1980). Sólo el área afectada por *Striga* en África se estima entre 50 y 300 millones de ha, con unas pérdidas importantes de cosecha de cereales (Parker, 2013). Diversas especies de jopo afectan a unas 16 millones de ha en la Cuenca Mediterránea y parte Oeste de Asia (Parker, 2009). Estos tres géneros pueden afectar a más del 4-5% de la superficie cultivada en el mundo (Parker, 2013).

1.2.- El género *Orobanche*

Orobanche L. *sensu lato* (incluyendo *Phelipanche* Pomel) constituye el mayor grupo taxonómico de plantas holoparásitas dentro de la familia Orobanchaceae y consta aproximadamente de 170 especies (Gevezova et al., 2012). La clasificación de las especies dentro de este género supone un problema por varias razones. En primer lugar, existe una variabilidad inherente en plantas pertenecientes a la misma especie, por ejemplo, en cuanto al color de la corola y al tamaño. En segundo lugar, al tratarse de plantas holoparásitas, se reduce el número de caracteres útiles en taxonomía, por su grado de simplificación general.

Finalmente, la planta hospedadora puede influir en la morfología de la planta parásita (Musselman y Parker, 1982). El empleo, entre otras, de algunas características micromorfológicas como la observación microscópica de semillas (Abu Sbaih y Jury, 1994; Plaza et al., 2004) o polen (Zare y Dönmez, 2013; Piwowarczyk et al., 2015), usadas en diversos estudios taxonómicos, ha permitido una clara clasificación del género en secciones, si bien la clasificación de especies dentro de cada sección es más compleja (Portnoy et al., 1997).

El género *Orobanche* es considerado por la mayoría de los taxonomistas como un género único con cuatro secciones: *Gymnocaulis* Nutt., *Myzorrhiza* (Phil.) G. Beck (= *Thalesia* o *Aphyllon*, por algunos autores), *Osproleon* Wallr. (= *Orobanche*), y *Trionychon* Wallr. (Beck-von-Mannagetta, 1930; Gevezova et al., 2012). *Gymnocaulis* y *Myzorrhiza* están distribuidas por el Nuevo Mundo donde atacan plantas en su mayoría silvestres y tienen escaso interés económico, por no ocasionar daños en los cultivos. Las especies de mayor importancia agronómica y económica pertenecen a las secciones *Trionychon* y *Osproleon*, diferenciándose de las otras por tener el cáliz zigomórfico, con cuatro lóbulos, y entre sí por la presencia o no de bracteolas y ramificaciones en el tallo. Así *Trionychon* [*Phelipanche ramosa* (L.) Pomel, *P. aegyptiaca* (Pers.) Pomel] se caracteriza por tener 2 bracteolas, un cáliz tetradentado y un tallo normalmente ramificado, mientras que en la sección *Osproleon* (*Orobanche cernua* Loefl., *O. cumana* Wallr., *O. crenata* Forsk., *O. minor* Sm.) las bracteolas están ausentes, el cáliz tiene uno o dos dientes, y son normalmente plantas no ramificadas (Musselman, 1991).

La distribución predominante del género *Orobanche* es la Cuenca Mediterránea, Oriente Medio, la zona del Mar Negro, y el Suroeste de Asia, si bien, recientemente algunas especies se han introducido en otras áreas geográficas. Así, *O. cernua* también se encuentra en el Oeste de África y en Australia; *O. minor* en África del Sur, Nueva Zelanda, Este de África y Este de los EE.UU.; y *P. ramosa* en África del Sur, Valle Central de Chile, Centroamérica, y Este y Oeste de los EE.UU (Musselman, 1986, 1994; García-Torres, 1993). Ninguna especie de este género tiene una distribución tropical, aunque hay excepciones, ya que individuos de algunas especies pueden vivir en las latitudes superiores de los trópicos. Su distribución

predominante en zonas templadas se explica porque necesitan temperaturas moderadas para la germinación (García-Torres, 1993).

Las especies de *Orobanche* de mayor importancia económica, por parasitar plantas cultivadas, son *P. aegyptiaca* y *P. ramosa* (Sect. *Trionychon* Wallr.), y *O. cernua*, *O. crenata* y *O. cumana* (Sect. *Osproleon* Wallr.) (Musselman, 1986; Parker y Riches, 1993; Parker, 2013), siendo las principales familias afectadas por estas especies las leguminosas (Fabaceae), compuestas (Asteraceae) y solanáceas (Solanaceae) (Parker, 2013). El rango de hospedadores de las especies de *Orobanche* varía desde muy amplio (por ejemplo en *P. ramosa* que parasita un amplio número de cultivos en diversas familias como Fabaceae, Asteraceae, Solanaceae o Apiaceae), a moderado (por ejemplo en *O. cernua* que se encuentra principalmente parasitando cultivos de solanáceas) o muy estricto, como es el caso de *O. cumana* que es específica del girasol (Parker, 2013).

2.- *Orobanche cumana*: El jopo del girasol

El jopo del girasol (*Orobanche cumana* Wallr.) es una planta parásita de raíz. Al igual que otras plantas del género, carece de clorofila, siendo un parásito obligado que depende completamente de la planta hospedadora. La especie fue descrita por Wallroth (1825) sobre plantas recolectadas en zonas desérticas del Suroeste de Asia y el Sureste de Europa. En su zona de origen, *O. cumana* parasita plantas silvestres de *Artemisia* spp. (Novopokrovsky y Tzvelev, 1958) pero tras la introducción del cultivo de girasol en Rusia, *O. cumana* comenzó a parasitar a este cultivo (Vrânceanu et al., 1986). En la Fig. 1 se presentan plantas silvestres de *O. cumana* y como mala hierba parasitando al girasol. Si bien la relación parasítica *O. cumana*-girasol está documentada desde el s. XVIII, es a finales del s. XIX en Rusia cuando se convierte en un problema de importancia económica (Škorić et al. 2010). Hoy en día, el jopo del girasol causa grandes pérdidas de producción en diferentes áreas de cultivo del girasol (Parker, 2013).



Fig. 1. Detalle de plantas de *O. cumana* parasitando plantas silvestres de *Artemisia* spp. (izda.), y al girasol (dcha.)

Existe cierta controversia acerca de la clasificación del jopo de girasol como especie, ya que algunos taxonomistas consideraban esta especie como un taxón infraespecífico de *O. cernua* (Beck-Mannagetta, 1930; Greuter et al., 1989). Sin embargo, existe hoy en día una amplia base de evidencias, basadas tanto en estudios moleculares, quimiotaxonómicos, y micromorfológicos de semillas, que apoyan su clasificación como especie separada de *O. cernua* (Katzir et al., 1996; Paran et al., 1997; Pujadas-Salvá y Velasco, 2000; Velasco et al., 2000; Benharrat et al., 2002; Román et al., 2003).

2.1.- Características morfológicas

O. cumana, por ser una planta fitoparásita obligada, carece de clorofila y de algunas estructuras tales como raíces y hojas. El tallo, en su parte aérea, es erecto, vigoroso, y alcanza una longitud de 20 a 80 cm y un diámetro de hasta 2,5 cm. El color es amarillo verdoso o amarillo oscuro con matices morados, y pubescencias más o menos glandulares. La parte subterránea del tallo está ligeramente engrosada por la base y su color es amarillento, sin

ninguna otra pigmentación. Las plantas de *O. cumana* pueden medir hasta 65 cm de altura, con tallos delgados ligeramente engrosados en la base (Pujadas-Salvà y Velasco, 2000). Sobre el tallo aparecen brácteas simples carentes de bracteolas (5-10 mm), con aspecto de escamas amarillas (Vrânceanu, 1977; Pujadas-Salvà y Velasco, 2000). Las flores, sentadas, tienen un solo plano de simetría. La corola es tubular, curvada y bilabiada, con el labio superior bilobulado y el inferior trilobulado. Las flores, zigomórficas y pentámeras, son hermafroditas, de color pardo con tonos azules o pálido violáceas, y se encuentran dispuestas en un racimo terminal. Están insertadas en las axilas de unas brácteas tectrices cuyas dimensiones oscilan entre 7 y 12 mm, ovaladas o lanceoladas, siendo su coloración similar a la del cáliz (Díaz Celayeta, 1974; Vrânceanu, 1977; Pujadas-Salvà y Velasco, 2000). El gineceo está formado por un ovario súpero, unilocular y bicarpelar. El estilo es casi glabro y el estigma blanquecino y bilobulado. El androceo está constituido por cuatro estambres insertos hacia la mitad del tubo de la corola. El filamento es glabro y las anteras son persistentes, mucronadas y con apertura longitudinal. Tras la polinización se desarrollan los frutos, uno por cada flor fecundada. El fruto es una cápsula de 8-10 mm cuyos lóculos contienen en su interior unas 1,200-1,500 semillas. Las semillas son de muy pequeño tamaño, de 0.25 a 0.4 mm de longitud y 0.12-0.18 mm de anchura (Joel, 1987), estando por consiguiente al límite de la capacidad humana de percepción visual. Con una lupa binocular o microscopio se observan sus distintas formas (ovaladas, piriformes, cuneiformes y triangulares) y los tegumentos reticulados y endurecidos que envuelven al endospermo y al embrión (García-Torres, 1993). Están cubiertas externamente por una capa transparente, lustrosa, de color pardo-amarillento-dorado y elástica en estado húmedo, que corresponde a la testa y está constituida por una sola capa de células alargadas y estrechas. Internamente a la testa se encuentran los tegumentos del embrión y un cuerpo grande, ovoide, que ocupa una parte considerable del interior de la semilla, el endospermo o albumen (Joel, 1987). En la Fig.2 se presentan distintos aspectos de plantas de *O. cumana*.



Fig.2 Detalle de plantas de *O. cumana*.

2.1.1.- Diversidad morfológica en *Orobanche* spp. en relación con su pigmentación

Algunas especies vegetales presentan individuos con diferente coloración, por ejemplo en los pétalos de sus flores, tanto dentro como entre poblaciones. El color de las flores y del tallo ha sido observado y estudiado a lo largo de la historia (ej. Mendel, 1866). El interés por este carácter continua aún vigente ya que es carácter útil para profundizar en procesos ecológicos y evolutivos (Sobel y Streisfeld, 2013).

El color del tallo en *Orobanche* spp. está principalmente determinado por la acumulación de antocianinas, que son más visibles debido a la ausencia de clorofila (Wheldale, 1916). Diversos estudios han puesto de manifiesto diferentes tonos de colores de los tallos, desde blanquecinos (Pujadas-Salvá y Velasco, 2000), amarillentos o marrones (Novopokrovsky y Tzvelev, 1958), a colores como azul-violeta, amarillo o rojizo (Kreutz, 1995). La corola es de color blanco en la base y azulado pálido-violeta en el extremo (Kreutz, 1995).

Salvo en *O. lutea* Baumg., donde toda la planta es generalmente de color amarillo, las variantes no pigmentadas (con tallos amarillos y corola completamente blanca) son poco frecuentes en poblaciones de *Orobanche* spp., si bien se han descrito en *O. alsatica* Kirschl.,

O. rapum-genistae Thuill., *O. teucri* Holandre, *O. hederæ* Duby, *O. elatior* Sutton y *O. crenata* Forsk. (Rumsey y Jury, 1991; Kreutz, 1995). En algunos casos, las variantes amarillas se han separado como un taxón infraespecífico, como por ejemplo *O. rapum-genistae* Thuill. var. *typica* G. Beck forma *flavescens* Durand (Beck-Mannagetta, 1930) o *O. minor* Sm. var. *flava* E. Regel (Rumsey y Jury, 1991). Plantas amarillas, no pigmentadas, de *O. cumana* (Fig. 3) se describieron por primera vez en la población BS-78 recogida en la provincia de Cuenca en 1978 (González-Torres et al., 1982). Tras la evaluación de BS-78 en nueve líneas y cultivares de girasol, estos autores concluyeron que no existían diferencias para parasitismo asociadas con el color del tallo. Hasta la fecha del inicio de esta tesis, no existía ningún estudio en *Orobanchae* spp. acerca del control genético de la ausencia de pigmentación, salvo en una descripción de especies de *Orobanchae* en Gran Bretaña e Irlanda en la que se sugiere que este carácter podría ser monogénico (Rumsey y Jury, 1991; Rumsey, 2007).



Fig. 3 Detalle de plantas no pigmentadas de *Orobanchae cumana* (izda.), aisladas por Rodríguez-Ojeda y col. a partir de una población procedente de Cuenca (dcha, plantas pigmentadas).

2.2.- Distribución geográfica, dispersión e importancia económica

Como mala hierba parásita del girasol, *Orobanche cumana* se distribuye en la actualidad por países productores de girasol principalmente en el Sur y Sudeste de Europa, Asia, y Norte de África (Kaya, 2014). En Europa se ha descrito en España, Moldavia, Rumania, Bulgaria, Serbia, Hungría, Rusia, Ucrania, Turquía y, recientemente, en Francia (Parker, 2009, 2013; Jestin et al., 2014) (Fig. 4). En Asia, se encuentra presente en Israel, Iraq, Irán, Pakistán, India, China y Mongolia (Parker, 2009, 2013; Kaya, 2014; Shi et al., 2015). En el Norte de África se ha observado en Túnez, Egipto y Argelia (Sackston, 1978; Amri et al., 2012). Además, se encuentra en algunas zonas del continente Australiano (Musselman, 1986).

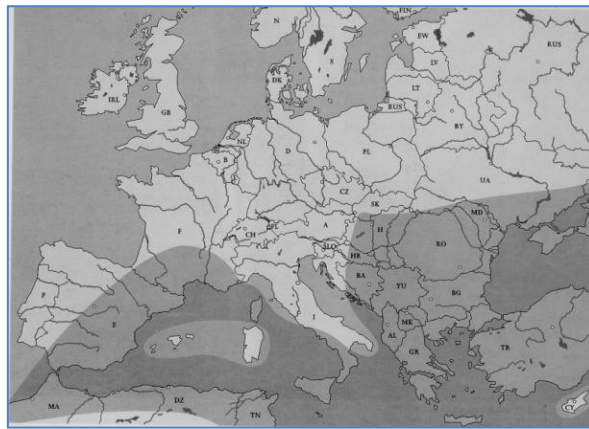


Fig. 4 Distribución europea de *O. cumana* como mala hierba parásita del girasol

En España, el jopo del girasol se detectó por primera vez en 1958 en la provincia de Toledo sobre girasol no oleaginoso. A partir de ese momento se describieron ataques graves de jopo sobre girasol no oleaginoso tanto en provincias de la zona Centro como en la zona Sur. A finales de los años 80, las infecciones aún se concentraban en cultivos de girasol no oleaginoso, siendo testimonial la infección de cultivares oleaginosos. Es a comienzos de la década de los 90 cuando se extienden las infecciones de jopo a cultivares oleaginosos, experimentándose una veloz expansión de las mismas. En Andalucía, se pasó de una estimación de superficie infestada en torno a 75,000 has en 1991 a 350,000 has en 1993, lo

que representaba más de la mitad de la superficie dedicada al cultivo del girasol oleaginoso. Este alto grado de infestación se localizaba principalmente en las campiñas de Córdoba y Sevilla. Observaciones similares se realizaron en Cuenca (Alonso, 1998). Actualmente, el jopo de girasol se encuentra principalmente en las principales zonas de cultivo del girasol en Castilla-La Mancha y Andalucía (Valle del Guadalquivir), si bien se están observando nuevas áreas infestadas en regiones donde previamente no se había detectado, como Castilla y León (Fernández-Escobar et al., 2009; Pineda-Martos et al., 2013).

La elevada proliferación del jopo de girasol, que llega a producir alrededor de 50,000 semillas por planta (Vrânceanu, 1977) de tamaño no superior a medio mm (Joel et al., 2007), facilita su dispersión, ya sea mediante prácticas agrícolas, fenómenos naturales como el viento o el agua, o bien a través de su transporte adheridas a maquinaria o incluso a la superficie de los aquenios de girasol (Castejón et al., 1991; Škorić, 2012). El incremento del área del cultivo del girasol ha permitido la extensión de este parásito vegetal. Esto, junto con la capacidad de persistencia del jopo del girasol en las zonas infestadas, con constancia de que las semillas pueden mantener capacidad infectiva tras permanecer más de 20 años en el suelo (Melero-Vara y Alonso-Arnedo, 1988; Škorić, 2012;), explica el enorme riesgo que *O. cumana* representa para el cultivo del girasol.

Las pérdidas causadas por el ataque de jopo varían según la intensidad de la infección y las condiciones ambientales. Un ataque leve puede reducir la productividad de un 5 a un 20%, un ataque medio de un 20 a un 50%, y una infección fuerte puede provocar más de un 90% de reducción del rendimiento (Škorić, 1988). La intensidad de la infección se mide generalmente por el porcentaje de plantas con jopo (incidencia) y por el número medio de plantas de jopos por planta de girasol (grado de ataque) (Vrânceanu et al., 1986). Actualmente, se estima que entre 4 y 5 millones de has del área mundial cultivada de girasol (15-20% del total de la superficie) están infestadas por jopo (Fernández-Martínez et al., 2015).

2.3.- Métodos de control

En general, los métodos de control del jopo de girasol están basados principalmente en el desarrollo de variedades resistentes, control biológico, aplicación de herbicidas, y manejo

agronómico (fecha de siembra, solarización, no laboreo, etc.). Otros métodos se basan en el empleo de cultivos trampa o el uso de estimulantes sintéticos de la germinación, para inducir la germinación en ausencia del cultivo hospedador (Jonson et al., 1976). En cuanto a la eficacia de los métodos de control, resaltar que el sistema parasítico *O. cumana*-girasol es uno de los sistemas en el que se han obtenido los mejores resultados en cuanto al desarrollo de resistencia genética, y posiblemente uno de los más estudiados (Ramiah, 1987; Fernández-Martínez et al., 2012, 2015). En el apartado 4.3.1 de esta introducción se profundizará y describirán con más detalle los mecanismos y control genético de la resistencia a jopo en girasol. En cuanto a los otros métodos de control, se describen a continuación aquellos estudiados específicamente para esta interacción parasítica.

2.3.1.- Control mecánico y agronómico.

La **modificación de la fecha de siembra** se ha propuesto como un método de control de jopo. Así, algunos estudios realizados en el Valle del Guadalquivir sugirieron que las siembras tempranas de girasol reducen la infección producida por *O. cumana* en torno al 30-50% comparadas con fechas de siembra convencionales (Castejón Muñoz et al., 1993; García-Torres, 1994). Sin embargo, otros estudios realizados en el Valle del Guadalquivir (Akhtouch et al., 2013) y en la región de Tracia en Turquía (Aydin y Mutlu, 1996) arrojaron resultados opuestos, siendo menor el número de jopos por planta en fechas de siembra más tardías.

La rotación con “cultivos trampa” se ha propuesto como un método para reducir el banco de semillas de jopo en el suelo. Los cultivos trampa son aquellos con capacidad de estimular la germinación de las semillas de jopo de girasol pero que no pueden ser parasitados por esta especie. Se trata en definitiva de una especie de germinación suicida, ya que al no encontrar planta hospedadora las semillas mueren. Fernández-Aparicio et al. (2009) describieron como cultivos trampa del jopo de girasol el algodón (*Gossypium hirsutum* L.), mijo (*Panicum miliaceum*, L.), sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), trigo duro (*Triticum durum* L.) y avena (*Avena sativa* L.), que en todos los casos indujeron la germinación de más del 20% de las semillas de jopo en ensayos con exudados de raíz. Tres de estos cultivos trampa (sorgo, mijo y algodón) fueron observados también en estudios llevados a cabo por

Rodríguez-Ojeda et al. (2001a), en los cuales destacó el maíz, que indujo la germinación de semillas de jopo en un 85%.

2.3.2.- Control químico

El uso de herbicidas selectivos se ha empleado con éxito en habas (*Vicia faba* L.) y otras especies cultivadas como estrategia para controlar diferentes especies de *Orobanche* (Kasasian, 1973; García-Torres y López-Granados, 1991). Estudios iniciales indicaron que en girasol y otros cultivos algunos herbicidas del grupo de las imidazolinonas resultaban ser eficaces en la reducción de la infección (Lolas, 1994; García-Torres, 1994). Entre ellos, el imazetapyr mostró un buen control de jopo en algunas leguminosas hospedadoras de *Orobanche* en tratamientos en pre- y post-emergencia (García-Torres y López-Granados, 1991; Saber et al., 1994). En girasol, estos herbicidas producían también una reducción significativa de la infección, pero aparecían efectos tóxicos en el cultivo (García-Torres et al., 1994, 1995). En la Fig.5 se muestra el efecto en *O. cumana* del tratamiento con herbicidas.



Fig. 5. Efecto sobre *O. cumana* del tratamiento con herbicidas

El empleo de herbicidas selectivos en girasol se facilitó con el desarrollo de germoplasma de girasol tolerante a ciertos tipos de herbicidas. Su origen se remonta a una

población silvestre de *H annuus* recolectada en Kansas (Estados Unidos) en un cultivo de soja tras un tratamiento con imazetapyr al que fue resistente. Su descendencia mostró en torno a un 25% de plantas resistentes a imazetapyr aplicado en post-emergencia en dosis comprendidas entre 26,6 y 53,2 g materia activa / ha. Algunas de las plantas sobrevivieron a dosis 32 veces superiores a las recomendadas para el cultivo de la soja. Esta población resultó susceptible a *O. cumana* con una incidencia del 100%. El imazetapyr aplicado en post-emergencia resultó ser un método eficaz para el control de jopo en plantas de esta población de *H. annuus* silvestre, lo cual permitió el inicio del desarrollo de un nuevo método de control del jopo del girasol basado en el desarrollo de variedades de girasol tolerantes al herbicida y en el tratamiento en post-emergencia con imazetapyr (Alonso et al., 1998). Hoy en día, se han desarrollado diferentes sistemas genéticos de tolerancia a herbicidas en girasol que se están empleando ampliamente en determinadas regiones como sistema de control de jopo y malas hierbas (Salas, 2012).

Otro sistema de control químico del jopo de girasol es a través de **estimulantes químicos de la germinación**, naturales o sintéticos. Estos estimulantes estimulan una germinación que se puede considerar como suicida, pues se produce en ausencia de la planta hospedadora, lo que contribuye a reducir el banco de semillas en el suelo (Rubiales et al., 2009). Si bien se han llevado a cabo numerosos estudios básicos en este sentido, su aplicación como método de control en condiciones de campo no es posible aún debido a diversos factores, tanto económicos como agronómicos (Rubiales et al., 2009). Recientemente, se han sintetizado artificialmente nuevas moléculas análogas de estrigolactonas capaces de inducir la germinación de *O. cumana*, cuyo potencial como sistema de control del jopo mediante inducción de germinación suicida se está evaluando (Lachia et al., 2015).

2.3.3.- Control biológico

Los métodos de control biológico son los que utilizan organismos vivos (insectos y microorganismos) como enemigos naturales de las plantas fitoparásitas. El modo de aplicación de este método de control puede hacerse a partir de estrategias de inoculación clásica de los patógenos sobre las plantas parásitas o bien por aplicación de bioherbicidas

extraídos a partir de cultivos de estos organismos (Templeton et al., 1986). El primer procedimiento incluye la introducción y el desarrollo del organismo antagonista de modo estable en el suelo, mientras que en la elaboración de los bioherbicidas se desarrollan técnicas de producción en masa de los microorganismos y de extracción de las sustancias tóxicas para ser utilizadas sobre plantas parásitas.

Phytomyza orobanchia Kaltenbach (Diptero: Agromyzidae) es una mosca monófaga que se alimenta de plantas de jopo, en concreto de las especies *O. cernua*, *O. cumana*, *O. crenata*, *O. major* y *O. aegyptiaca*, entre otras (Klein y Kroschel, 2002). En su estado larvario (3.4-4.0 mm de longitud, 1,0 mm de diámetro) se alimenta de las semillas inmaduras de jopo alojadas en las cápsulas del fruto, destruyéndolas en su totalidad. Además, en sus desplazamientos perfora túneles desde la parte subterránea hasta la aérea del tallo (Klein y Kroschel, 2002). Este método de control biológico de *Orobanche* spp. se ha utilizado con éxito en Egipto (Hammad et al., 1967), Turquía (Nemly y Giray, 1983) e Irak (Al-Khesraji y Abdel-Wahid, 1988).

Entre las estrategias que utilizan **organismos vivos en la elaboración de productos de naturaleza tóxica contra *Orobanche*** destaca uno de los bioherbicidas más extendidos, el Producto F, desarrollado a partir de *Fusarium oxysporum* Schlecht. f.sp. *orthoceras* (Appel & Wollenw.) Bilai. Fue desarrollado en la antigua Unión Soviética y se utilizó especialmente contra *O. aegyptiaca* en tomate, melón y berza (Parker y Riches, 1993). Estudios en girasol han demostrado el potencial de este hongo en el control de *O. cumana* (Bedi y Donchev 1991; Shabana et al., 2003; Müller-Stover et al., 2004).

2.3.4.- Control mediante resistencia genética

El empleo de cultivares de girasol resistentes ha sido uno de los mecanismos de control de jopo más eficientes y económicos empleados hasta la fecha (Fernández-Martínez et al., 2015) (Fig. 6). Por su relevancia en esta Tesis se profundizará en el apartado 4.3.1 de esta Introducción.



Fig. 6. Cultivares de girasol resistentes a *O. cumana* (dcha.) frente a cultivares susceptibles (izda.)

3.- Aspectos básicos de la biología de *O. cumana* y otras plantas parásitas del género

3.1.- Ciclo del parásito

La interacción huésped-parásito en el sistema girasol-*O. cumana* es compleja de analizar, al igual que ocurre en otros sistemas parasíticos estudiados, ya que en este tipo de interacción no sólo intervienen los genotipos del huésped y del parásito, sino también la acción ambiental sobre cada uno de ellos y sobre su interacción (Cubero et al., 1999).

La fase de germinación es un periodo crítico del ciclo vegetativo de las especies holoparásitas (Musselman y Press, 1995; Dhanapal y Struik, 1996) ya que durante este periodo, y hasta lograr la efectiva conexión con el sistema vascular del huésped, vivirá a expensas de sus propias reservas nutritivas. Con las condiciones adecuadas, incluyendo temperatura, humedad y calidad del suelo, las semillas de *O. cumana* tienen capacidad de

responder a estímulos químicos de la germinación producidos por las raíces de la planta hospedadora. Existe una amplia información acerca del período de acondicionamiento de las semillas de *Orobancha* spp., que ha de ser de varios días en condiciones adecuadas de temperatura y humedad (Chae et al., 2003; Louarn et al, 2012; Maširević et al, 2012; Pieterse, 1979; Press et al., 1990). La temperatura del suelo óptima se encuentra entre los 20 y 25°C (Maširević et al, 2012; Škorić, 2012), si bien se ha puesto de manifiesto cierta variabilidad interespecífica e intraespecífica en *Orobancha* en cuanto al efecto de dicho parámetro sobre la germinación, siendo este factor muy importante en la interacción girasol-*O. cumana* (Sukno, 1997). Después de este período de acondicionamiento, es necesaria la presencia de los exudados radiculares de su hospedador específico, el girasol, para estimular la germinación de las semillas de jopo, si bien como se ha comentado previamente otros cultivos que se denominan cultivos trampa pueden estimular también la germinación. Dichos exudados son liberados por las raíces de las plantas a la rizosfera al crecer y son sólo activos en las proximidades de su lugar de origen y difusión (aproximadamente < 10 mm) (García-Torres, 1993). Los principales compuestos descritos que estimulan la germinación del jopo de girasol son estrigolactonas (Yoneyama et al., 2011), sesquiterpeno lactonas (Joel et al., 2011; Raupp y Spring, 2013) y heliolactonas (Ueno et al., 2014).

La semilla de jopo desarrolla al germinar un delgado filamento denominado tubo germinativo o procauloma que alcanza una longitud de 3-4 mm. Esta estructura emerge del extremo más estrecho de la semilla, y se diferencia de una radícula por la ausencia de cofia en su ápice (Stewart y Press, 1990). El tubo germinativo crece en la rizosfera en dirección a la raíz hospedante por elongación de sus células y por división celular. Una vez que se ha producido el contacto, el ápice del tubo germinativo segrega una secreción mucilaginosa, por la cual queda adherido fuertemente a la superficie de la raíz de la planta hospedadora (Joel y Losner-Goshen, 1994). A continuación, se produce un engrosamiento en el punto de contacto y se desarrolla una estructura denominada el apresorio. Esta estructura ataca la epidermis de la raíz, degradando las células de la superficie en contacto con el ápice del tubo germinativo (Press y Graves, 1995; Joel et al., 1996). Posteriormente, se diferencia una estructura engrosada en el ápice que constituye el haustorio (Joel, 2013). El haustorio libera exoenzimas capaces de degradar las paredes celulares y las láminas medias, lo que hace que esta estructura penetre suavemente en los tejidos del huésped abriéndose camino entre las células del córtex,

la endodermis, hasta llegar al cilindro central (Joel y Losner-Goshen, 1994). Sus células intrusivas ejercen presión e invaden los huecos originados por la degradación enzimática, lo que le permite crecer y desarrollarse en el apoplasto, sin provocar la destrucción de las células de la planta hospedadora (Dörr y Kollmann, 1974). El haustorio establece conexiones vasculares entre los tejidos del parásito y de la planta hospedadora, estableciendo una continuidad apoplástica entre el xilema y el floema de la planta hospedadora y la planta parásita, quedando ésta última integrada fisiológicamente con su hospedadora (Dörr y Kollmann, 1975). Una vez establecidas las conexiones vasculares, el jopo comienza a desarrollarse gracias al agua y a las sustancias nutritivas procedentes del girasol, comenzando la fase de vida parásita, ya que durante la fase de germinación y penetración, en la fase independiente, los nutrientes necesarios se encontraban presentes en las sustancias de reservas acumuladas en la semilla (Joel et al., 1995).

El crecimiento del jopo se inicia con un engrosamiento en el lugar de penetración del haustorio y esta zona aparece de color amarilla, iniciándose el desarrollo del nódulo, distinguible morfológicamente, que produce numerosas prolongaciones o protuberancias a modo de pequeñas falsas raíces carentes de pelos absorbentes. Del nódulo se diferencia un vástago que emerge en pocos días y da lugar a un tallo erecto, con brácteas y flores que tras la fecundación generan de nuevo semillas (Škorić, 1988). Éstas, una vez maduras, se liberan de los frutos al abrirse las cápsulas, que quedan prendidas al tallo (Plaza et al., 2004; Pujadas-Salvà, 2002). Se liberan alrededor de 1,200 a 1,500 semillas por cápsula, por lo que una sola planta puede producir entre 50,000 y 500,000 semillas, lo cual permite que el banco de semillas parásitas se incremente en el suelo de forma muy rápida (Gevezova et al., 2012). En la Fig. 7 se presenta esquematizado el ciclo de *O. cumana*.



Fig. 7. Ciclo de *O. cumana*.

3.2.- Biología reproductiva

Existen muy pocos estudios específicos sobre la biología reproductiva en *Orobanche* spp. (Prider, 2015) y la mayoría de las conclusiones acerca del sistema reproductivo de estas especies se han inferido indirectamente a partir del estudio de caracteres como la morfología floral o bien a partir de la estructura genética de las poblaciones, ya que el sistema de reproducción es un determinante importante de esta estructura (Lloyd y Schoen, 1992; Charlesworth, 2003).

La mayoría de las especies de *Orobanche* son polinizadas por insectos, particularmente abejorros y abejas, si bien algunas especies son autógamas (Musselman et al., 1981; Kreutz, 1995; Toth et al., 2013). Sus sistemas de reproducción se correlacionan generalmente con la morfología de la flor; mientras que algunas especies consideradas autógamas como *O. cumana* desarrollan corolas tubulares dobladas con pequeños labios inferiores, que no facilitan el posado de insectos polinizadores, otras especies como *O. crenata* Forsk. y *O. foetida* Poir. tienen corolas con grandes labios inferiores que sirven como plataformas de posado para los insectos polinizadores (Satovic et al. 2009).

Por otro lado, estudios de diversidad genética y estructura poblacional en *Orobanche* spp. han permitido diferenciar entre especies de *Orobanche* predominantemente autógamas, con un alto grado de diferenciación genética entre poblaciones y niveles relativamente bajos de diversidad genética dentro de poblaciones, como es el caso de *P. ramosa* (Vaz Patto et al., 2009), y especies alógamas, con diferencias menos marcadas entre poblaciones y mayor grado de diversidad genética dentro de las poblaciones, como es el caso de *O. crenata* (Román et al., 2002) y *O. foetida* (Román et al., 2007a). En *O. cumana*, un estudio molecular realizado con marcadores RAPD para determinar la variación genética intra e interpoblacional en ocho poblaciones europeas (tres de Bulgaria, una de Rumanía, una de Turquía y tres de España) parasitando girasol identificó un bajo grado de diversidad genética intra-poblacional y mayor variación genética entre las poblaciones, que apuntaban a un sistema de apareamiento por autofecundación (Gagne et al. 1998). Resultados similares se obtuvieron en un estudio con marcadores RAPD sobre 27 poblaciones de *O. cumana* procedentes de diferentes áreas geográficas (Molinero-Ruiz et al., 2014), así como en dos estudios con marcadores microsatélites (SSRs), uno de ellos sobre poblaciones de *O. cumana* recolectadas en España (Pineda-Martos et al., 2013), y otro sobre poblaciones parasitando especies silvestres o girasol en el este de Bulgaria (Pineda-Martos et al., 2014a).

Recientemente Prider (2015), mediante experimentos con metodología específica de emasculación y/o aislamiento mediante embolsado de plantas en *O. ramosa*, determinó que esta especie es autógama y que la autopolinización puede tener lugar antes de la antesis. En *O. cumana*, a pesar de los estudios anteriormente mencionados que sugieren que se trata

principalmente una especie autógama, hasta el inicio de esta Tesis Doctoral no existía ningún estudio acerca de la tasa de fertilización cruzada y capacidad de autofecundación en esta especie usando una metodología específica para ello.

4.- Aspectos básicos de genética en *Orobanche cumana* y otras plantas parásitas del género

4.1- Estructura y evolución racial en *O. cumana*

Una particularidad de *O. cumana* en su relación parasítica con el girasol es la existencia de una clara diferenciación de razas fisiológicas, debida principalmente a mecanismos de resistencia de tipo vertical en el girasol, como se describirá en detalle más adelante. La aparición de nuevas razas de jopo, debida a la presión de selección que ejerce el empleo masivo de cultivares de girasol con resistencia genética, ha sido una constante a lo largo de la historia del cultivo (Škorić, 1988). Las primeras razas de jopo de girasol se identificaron en Rusia (Vrânceanu, 1977). También en Rusia comenzaron los primeros programas de búsqueda de fuentes de resistencia genética en girasol a estas poblaciones de jopo, denominadas inicialmente raza A (Pustovoit, 1966). Durante 1912-17 se desarrollaron variedades con resistencia a dicha raza, si bien en pocos años una raza más virulenta denominada raza B, capaz de parasitar a los cultivares resistentes a la raza A, apareció en algunas zonas de Rusia. Durante 1928-1935, se desarrollaron nuevos cultivares resistentes a las razas A y B, por ejemplo Zhdanovsky 8281 y Zhdanovsky 8885 (Škorić, 2012). La búsqueda de nuevas fuentes de resistencia en girasol se convirtió en un asunto prioritario de los programas de mejora genética debido a la amenaza que suponían las nuevas razas. En los años 60, apareció en Moldavia y Ucrania una nueva y más virulenta variante denominada raza C, para la que se obtuvieron en 1970 las primeras variedades de girasol resistentes (Škorić, 2012). De nuevo, una nueva raza de jopo denominada raza M hizo su aparición en Moldavia, como respuesta al

empleo masivo de variedades de girasol resistentes. Pustovoit y Gubin (1974) y Burlov y Kostyuk (1976) obtuvieron material resistente a la nueva raza M de jopo a partir de un híbrido interespecífico entre *H. tuberosus* y girasol cultivado. En los años 80, Vrânceanu et al. (1980) identificaron cinco razas fisiológicas, denominadas A, B, C, D, y E, en el área de Braila en Rumania, estableciendo asimismo un conjunto de cinco variedades diferenciales portadoras de cinco genes distintos de resistencia denominados *Or1* a *Or5* que conferían resistencia a las razas A a E, respectivamente. Estudios posteriores confirmaron la prevalencia de razas D y E en diversos países como España (Melero-Vara et al., 1989), Serbia (Maširević y Medic-Pap, 2009), Turquía (Bulbul et al., 1991), y Bulgaria (Shindrova, 2006).

En 1995 se detectaron en el Sur de España los primeros focos de una nueva raza con capacidad de parasitar a todos los híbridos comerciales del momento, portadores del gen *Or5*. Siguiendo la designación racial realizada en Rumania (Vrânceanu et al., 1980, 1986), estas nuevas poblaciones con capacidad de superar los genes de resistencia *Or1* a *Or5* se denominaron raza F (Alonso et al., 1996; Dominguez et al., 1996; Castejón-Muñoz y García-Torres, 1997; Sukno et al., 1999). Poblaciones de jopo capaces de superar la resistencia conferida por el gen *Or5* se describieron también en Turquía (Kaya et al., 2004), Rumanía (Pacureanu-Joita et al., 2004), Bulgaria (Shindrova, 2006), Ucrania (Burlov y Burlov, 2010), y Rusia (Antonova et al., 2013). Estas poblaciones se denominaron asimismo raza F, si bien la relación existente entre ellas no se ha determinado. Actualmente, se han descrito ya en la mayoría de los países anteriormente citados poblaciones de jopo que superan la resistencia desarrollada para la raza F, denominadas razas G y H (Kaya et al., 2009; Pacureanu-Joita et al., 2009; Shindrova y Penchev, 2012; Antonova et al., 2013).

4.2.- Estudios genéticos en *Orobanche* spp.

Los estudios genéticos realizados en *Orobanche* spp. son escasos y han estado centrados en estudios de diversidad genética y estructura de poblaciones. No se ha realizado, hasta el inicio de esta Tesis, ningún estudio genético de herencia de caracteres, asociados o no al parasitismo. Inicialmente, los estudios de variabilidad genética se basaron en caracteres morfológicos, si bien, debido a las características intrínsecas del parasitismo, este tipo de caracteres no

permitían definir y diferenciar correctamente especies ni, con mayor motivo, poblaciones (Román, 2013). El tipo y rango de huéspedes también se empleó para diferenciar poblaciones y razas del parásito (Román, 2013). Sin embargo, son los estudios basados en marcadores moleculares, inicialmente bioquímicos y posteriormente basados en ADN, los que han permitido un mayor avance en la determinación de la estructura y variación genética dentro y entre especies de *Orobanche*.

Estudios isoenzimáticos en poblaciones de *O. cumana* con diferente grado de virulencia procedentes del Sur de España manifestaron en general una escasa variabilidad intrapoblacional, con excepción de una población de jopo recolectada sobre una variedad de girasol no oleaginoso, carente de genes de resistencia a jopo. El resto de poblaciones, con escasa variabilidad genética, fueron recolectadas sobre cultivares de girasol oleaginosos, con genes de resistencia a jopo. Los autores sugirieron que sólo una subpoblación seleccionada a partir de la población inicial fue capaz de parasitar a las variedades de girasol oleaginoso que incorporaban genes de resistencia, y que ésta subpoblación logró extenderse rápidamente hacia otras áreas de cultivo (Castejón-Muñoz et al., 1991). Verkleij et al. (1986, 1991) utilizaron también isoenzimas para estudiar la diversidad genética en poblaciones de *O. crenata* y *P. aegyptiaca* de Siria, y en poblaciones de *O. crenata* de España, encontrando escasa diversidad genética en las poblaciones sirias y mayor diversidad en las españolas. Los isoenzimas, como productos de la expresión de los genes, pueden presentar variaciones cuantitativas y cualitativas que vienen determinadas por el tejido del que se extraen, el estadio de desarrollo de la planta, y de las condiciones ambientales, por lo que no son marcadores completamente reproducibles (Katzir et al., 1996). La influencia del ambiente sobre el polimorfismo isoenzimático quedó demostrado en el estudio realizado por Verkleij et al. (1991), en el que las poblaciones recolectadas en invernadero mostraron menor variabilidad isoenzimática que las obtenidas en condiciones de campo.

Los marcadores basados en el ADN han superado las desventajas de otros tipos de marcadores, y se han usado con éxito en diversos estudios de diversidad genética en *Orobanche* y *Phelipanche* spp. Así, se han empleado marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) en estudios filogenéticos (Katzir et al., 1996; Paran, et al., 1997; Román et al., 2003) y en estudios de variación interpoblacional y/o intrapoblacional (Paran et al.,

1997, Zeid et al., 1997; Román et al., 2001, 2007a, 2007b; Atanasova et al., 2005; Brault et al., 2007). Asimismo, se han empleado marcadores ISSR (Inter-simple Sequence Repeat markers) en estudios de diversidad sobre *Orobanche* spp. (Benharrat et al., 2002; Hristova et al., 2011; Stoyanov et al., 2012), y sobre especies individuales como *O. crenata* (Román et al., 2002), *O. minor* (Westwood y Fagg, 2004; Thorogood et al., 2008, 2009) y *P. ramosa* (Buschmann et al., 2005), marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) en *O. cumana* (Gagne et al., 2000) y *O. foetida* (Vaz Patto et al., 2008), y marcadores de diagnóstico del genoma plasmídico (plastoma) en las especies más importantes de *Orobanche* en Andalucía (*O. crenata*, *P. ramosa*, *O. cumana* y *O. minor* Sm.) (Román et al., 2007c).

Los primeros estudios genéticos con marcadores de ADN llevados a cabo en *O. cumana*, bien en análisis interespecíficos o de variación inter- o intrapoblacional, emplearon mm marcadores RAPD. Así, Katzir et al. (1996) demostraron la existencia de diferenciación genética entre las especies *O. aegyptiaca*, *O. ramosa* L., *O. cernua*, *O. cumana* y *O. crenata* procedentes de campos de cultivo de Israel y Paran et al. (1997) encontraron un patrón de diversidad interespecífica y distancias genéticas entre poblaciones naturales de *O. aegyptiaca*, *O. mutelli* F. Schultz., *O. cernua*, *O. cumana* y *O. crenata* coincidente con la caracterización taxonómica (basada en las características morfológicas) de estas especies (Musselman, 1986). Gagne et al. (1998) estudiaron la diversidad genética de poblaciones de *O. cumana* procedentes de países europeos (Bulgaria, Rumanía, Turquía y España) usando asimismo marcadores RAPD. Los resultados indicaron que la especie es probablemente autógama, ya que se observó una baja diversidad intrapoblacional y mayor diversidad interpoblacional. Román et al. (2003) utilizaron también marcadores RAPD para estudiar la diversidad genética entre 20 especies de la Península Ibérica del género *Orobanche*, incluidas *O. cumana* y *O. cernua*. El patrón de diversidad interespecífica observado se correspondía con estudios morfológicos y quimiotaxonómicos realizados previamente (Beck von Mannagetta, 1930; Velasco et al., 2000). Estudios de poblaciones de *O. cumana* parasitando girasol en Bulgaria, Rumanía, Turquía, España, Rusia y Ucrania indicaron una alta diversidad genética con marcadores RAPD entre las poblaciones procedentes de zonas geográficas distintas (Atanasova et al., 2005). Finalmente, Gagne et al. (2000) demostraron la mayor resolución de los marcadores AFLPs en relación a los marcadores RAPD para estudios de diversidad genética en *O. cumana*.

Recientemente, se han desarrollado marcadores SSR (Simple Sequence Repeats) en *O. cumana* (Pineda-Martos et al., 2014b) y se han empleado en estudios de diversidad genética en esta especie. Así, Pineda-Martos et al. (2013) analizaron la diversidad genética inter- e intrapoblacional en un conjunto de poblaciones españolas parasitando girasol, encontrando dos grupos genéticos claramente identificables, uno en la zona de Castilla-La Mancha (provincia de Cuenca) y otro en Andalucía (Valle del Guadalquivier). Dentro de cada grupo genético se observó una escasa variabilidad intra- e interpoblacional, atribuida a un efecto fundacional. Molinero-Ruiz et al. (2014) corroboraron la existencia de estos dos grupos genéticos en España, analizando un conjunto diferente de poblaciones. Mediante el empleo asimismo de marcadores SSR, Guchetl et al. (2014) estudiaron la diversidad genética interpoblacional de poblaciones de *O. cumana* de Rumanía, Rusia y Kazajistán, concluyendo la existencia de dos grupos no muy divergentes de poblaciones, constituido uno por poblaciones de Rusia y Kazajistán, y otro por poblaciones de Rumanía.

4.3.- Interacción jopo-girasol. Mecanismos de resistencia y avirulencia

4.3.1.- Genética y mecanismos de resistencia a jopo en girasol

Debido a la selección realizada sobre el girasol como especie cultivada a lo largo de su historia en relación a su interacción con *O. cumana*, se han desarrollado diferentes fuentes de resistencia genética, tanto dentro de la especie *H. annuus* como en otras especies del género *Helianthus*. El empleo de cultivares de girasol resistentes ha sido uno de los mecanismos de control de jopo más eficientes y económicos empleados hasta la fecha (Fernández-Martínez et al., 2015).

4.3.1.1.- Identificación y desarrollo de fuentes de resistencia

Las fuentes de resistencia genética a *O. cumana* se desarrollaron inicialmente a partir de germplasma de girasol cultivado. Así, entre 1910 y 1927 se utilizó principalmente la selección

individual. Las plantas se testaban en el campo con infestación natural y mediante selección individual y prueba de la descendencia se seleccionaban genotipos resistentes. Así, cuando la raza B se dispersó por las áreas tradicionalmente dedicadas al cultivo del girasol en la antigua URSS en 1930, las fuentes de resistencia se obtuvieron mediante selección a partir de una variedad local procedente de Ucrania (Pustovoit, 1966, 1976). Por otro lado, el empleo de especies silvestres de *Helianthus*, particularmente *H. tuberosus*, como fuente de genes para la mejora genética del girasol ha sido común desde los primeros años de la mejora genética científica de este cultivo en Rusia (Pustovoit, 1966; Pogorlestskii, 1974; Logvinenko y Logvinenko, 1980; Kostiuk, 1986).

La aparición de razas de jopo cada vez más virulentas hizo que la disponibilidad de fuentes de resistencia en germoplasma de girasol cultivado fuera cada vez menor. Así, en Turquía, Gulya et al. (1994) encontraron sólo 22 entradas resistentes a raza E en una evaluación en campo de un total de 903 entradas, mientras que en España, Domínguez et al. (1996) describieron 8 entradas resistentes y 33 segregantes para resistencia a raza E en la evaluación de 429 accesiones. A pesar de la baja frecuencia de entradas resistentes, se identificó germoplasma valioso con resistencia a la raza E en girasol cultivado en programas llevados a cabo en España, Rumanía, Turquía y Rusia (Fernández-Martínez et al., 2015). Por el contrario, se ha documentado la presencia mucho más abundante de fuentes de resistencia a *O. cumana* en especies silvestres de *Helianthus*, particularmente en la especie perennes (Christov et al., 2009; Fernández-Martínez et al., 2015). La hibridación interespecífica con estas fuentes de resistencia ha permitido el desarrollo de germoplasma de girasol resistente a las razas más recientes y virulentas de jopo (F, G), tanto a partir de especies anuales (Hladni et al., 2009; Velasco et al., 2012), como a partir de especies perennes (Jan et al., 2002; Christov et al., 2009; Petcu y Pacureanu, 2011; Cvejić et al., 2012).

4.3.1.2.- Control genético de la resistencia a jopo

La resistencia a *Orobanche* spp. en especies cultivadas es normalmente poligénica y no específica de raza, siendo el girasol una notable excepción, puesto que se ha descrito en este cultivo la resistencia a jopo como un carácter generalmente monogénico, dominante y

específico de raza (Pérez-Vich et al., 2013). Los primeros datos que hacen referencia a una herencia debida a una tasa de segregación simple fueron publicados en 1936 (Vrânceanu et al., 1986). Los mejoradores soviéticos observaron segregaciones monogénicas dominantes en cruzamientos con germoplasma resistente de girasol, lo que apuntaba a una relación gen a gen (Pustovoit, 1976). En la década de los 80, Vrânceanu et al. (1980) describieron cinco razas de jopo, A a E, controladas, respectivamente, por cinco genes de resistencia dominantes, *Or1* a *Or5*. Estos autores concluyeron que cada gen confería resistencia tanto a su raza correspondiente como a las razas anteriores. Otros trabajos corroboraron que la herencia de la reacción de resistencia frente a estas razas de *O. cumana* se debe a alelos dominantes en un único gen (Ish-Shalom-Gordon et al., 1993; Saavedra del Río et al., 1994; Sukno et al., 1999; Lu et al., 2000; Pérez-Vich et al., 2004). Sin embargo, otros estudios describieron una herencia más compleja de la resistencia a la razas A a E, como dos genes dominantes (Domínguez, 1996), un gen recesivo (Ramaiah, 1987), o la existencia de un componente cuantitativo adicional a la resistencia conferida por el gen *Or5* (Pérez-Vich et al., 2004).

Para razas de jopo que superan la resistencia de *Or5* se ha descrito asimismo que resistencia genética en girasol que está determinada por un gen dominante (Pacureanu-Joita et al., 2004; Velasco et al., 2012), si bien se han descrito otros sistemas como dos genes dominantes (Pacureanu-Joita et al., 2008), un gen dominante y un gen modificador (Velasco et al., 2007), un número no determinado de genes recesivos (Cvejić et al., 2014), dos genes recesivos (Rodríguez-Ojeda et al., 2001b; Akhtouch et al., 2002), o bien una epistasia dominante-recesiva (Aktouch et al., 2016).

4.3.1.3.- Mecanismos de la reacción resistente

Los mecanismos de la reacción resistente en el girasol han de limitar en alguno de sus pasos el éxito del establecimiento y de la conexión directa entre el hospedador y el parásito. La primera indicación de resistencia se basó en mecanismos de barrera (Pustovoit, 1966). Se sugirió que la peroxidasa excretada por el parásito en los puntos de penetración del haustorio actuaba como inductora desencadenante de la lignificación en las raíces de plantas de girasol de reacción resistente (Panchenko y Antonova, 1974; Antonova, 1976, 1978). Estudios más

recientes detectaron diferencias en la producción de peroxidadas entre razas de *O. cumana*, lo que permitió postular una posible explicación para varias interacciones gen por gen en este sistema parasítico (Antonova y ter Borg, 1996). Estos autores observaron que las plantas de cultivares de girasol resistentes a la raza A de jopo (Kruglik A 41, Saratovskii 169) presentaban abultamientos en los puntos de ataque, observándose en el centro de dichos abultamientos la presencia de semillas de jopo germinadas y muertas, indicando una reacción de la planta hospedadora que había detenido el proceso de parasitación. La evaluación de estos cultivares con la raza B de jopo, frente a la que no mostraban resistencia, mostró ausencia de abultamientos en la superficie de las raíces. Análisis de la actividad peroxidasa realizados en tejidos extraídos de tallos de jopo pertenecientes a ambas razas, A y B, dieron como resultado que la actividad peroxidasa presente en individuos de la raza B era el doble que en los de raza A (Antonova y ter Borg, 1996). La mayor virulencia de esta nueva raza de jopo se explicó por su elevada actividad peroxidasa. Los cultivares resistentes a la raza B no mostraron abultamientos en la superficie de las raíces, pero sí se observaron células del parásito encapsuladas en el cortex de la raíz (Dörr et al., 1994). En otros estudios se han observado células necróticas de la raíz rodeando al haustorio en capas profundas del cortex (Antonova, 1978). La pared formada por células necróticas y los restos de citoplasma a menudo presentaban lignificación. Antonova y ter Borg (1996) concluyeron que el haustorio de la raza B de *O. cumana* no puede atravesar el cortex de las plantas de reacción resistente y perece en sus capas internas. La raza de *O. cumana* C pudo, por el contrario, atravesar el cortex de variedades resistentes hasta el momento. El éxito de la penetración hasta realizar la conexión vascular entre ambos individuos se podría deber a la alta tasa de crecimiento en el parásito ayudado por la producción de peroxidasa intra y extra celular. La resistencia a la raza C, presente en cultivares como Odesski 63, Star, Record, Progress, etc., está controlada por un gen dominante *Or3*, que se ha hipotetizado que controla la formación de lignina en los haces vasculares del girasol (Tolmachev, 1991). Antonova y ter Borg (1996) concluyeron que la producción de lignina en las raíces infectadas de girasol está inducida por depósitos externos de peroxidasa. Asimismo, estos autores propusieron que la nueva y más virulenta raza D se había desarrollado a partir de la raza C por la ausencia de producción de peroxidasa extracelular por las células apicales del haustorio.

Se ha planteado asimismo el papel de las fitoalexinas como sustancias involucradas en la reacción de resistencia en el girasol (Wegmann, 1986; Jorrín et al., 1996, 1998; Eizenberg et al., 2001). Algunos de estos compuestos fenólicos como la escopoletina y la ayapina se desarrollan en el girasol como consecuencia de estrés abiótico, como el causado por la sequía, ó biótico, causado por infecciones producidas por hongos, bacterias, virus, o plantas parásitas, entre otros. Así, Wegmann et al. (1991) encontraron que la cantidad de escopoletina presente en tejidos de raíz de una variedad de girasol resistente a *O. cumana* fue el doble al hallado en un cultivar susceptible en presencia de semillas del parásito. Estos autores indicaron asimismo que la biosíntesis de fitoalexinas tiene una herencia simple y en la mayoría de los casos monogénica. Los resultados de otros estudios refuerzan la implicación de estos compuestos en la defensa del girasol frente a *O. cumana*. Así, Gutiérrez-Mellado et al. (1995) encontraron que las fitoalexinas ayapina y escopoletina excretadas por las raíces de girasol inhiben la germinación de las semillas de jopo previamente inducida por la estrigolactona sintética GR-24, produciendo asimismo necrosis en las semillas germinadas. Por otro lado, se ha observado una elevada acumulación de estos compuestos fenólicos en los tejidos de las raíces y un elevada excreción de los mismos en variedades de girasol resistentes en respuesta a la infección de *O. cumana* (Al-Menoufi et al., 1996; Jorrín et al., 1996, 1998; Pérez-de-Luque et al., 2000; Pérez-de-Luque et al., 2001; Serghini et al., 2001).

4.3.2.- Control genético de la avirulencia en *Orobanche* spp. y otras plantas parásitas.

4.3.2.1.- Concepto de genes de avirulencia

Las plantas son capaces de detectar organismos patógenos y desencadenar en consecuencia respuestas de defensa ante los mismos. El reconocimiento del patógeno se puede dar de diferentes maneras, ya sea directamente mediante la percepción de patrones moleculares asociados a patógenos (o sus siglas en inglés PAMPs), o indirectamente a través de la percepción de los daños causados por el patógeno, tales como fragmentos solubilizados de las paredes celulares, etc. (en conjunto DAMPs o patrones moleculares asociados a lesión)

(Boller y Felix, 2009). El reconocimiento de PAMPs o DAMPs se da vía receptores proteicos situados en la superficie de la célula vegetal, y es capaz de activar un tipo de inmunidad denominada “Inmunidad activada por PAMPs” o por sus siglas en inglés “PTI” (Boller y Felix, 2009; Dodds y Rathjen, 2010). El concepto de PTI equivaldría a un tipo de resistencia basal u horizontal. Cuando el patógeno es capaz de superar este tipo de inmunidad, debe enfrentarse a un mecanismo de detección mucho más especializado denominado “Inmunidad activada por efectores” (ETI), que se basa en genes de resistencia (genes R) que codifican para proteínas R, generalmente intracelulares, y que equivaldría en este caso a una resistencia vertical (Bent y Mackey, 2007). Los efectores son moléculas que los patógenos utilizan para intentar suprimir la inmunidad PTI (Bent y Mackey, 2007). Los primeros efectores identificados se denominaron genes *Avr* (de avirulencia) dado que su actividad, detectada a través de los genes R, induce defensas que previenen su virulencia (Bent y Mackey, 2007). La interacción genes *Avr*-genes R sigue la teoría gen-a-gen propuesta por Flor (1971) que describe interacciones planta-patógeno en las que las reacciones de resistencia se rigen por la interacción de los genes del hospedador para la resistencia y los correspondientes genes de avirulencia del patógeno. Como se mencionó anteriormente, una particularidad de *O. cumana* parasitando al girasol es una clara diferenciación de razas fisiológicas y una interacción planta hospedadora-planta parásita que generalmente se ajusta a este modelo de interacción gen-a-gen, lo que no ocurre en otros sistemas cultivo-*Orobancha* (Pérez-de-Luque et al. 2009; Pérez-Vich et al., 2013).

4.3.2.2.- Genes de “avirulencia” en plantas parásitas

Hasta la fecha no existe ningún estudio específico sobre genes *Avr* en interacciones planta-planta parásita, si bien se trata de genes que se han caracterizado en interacciones planta-bacteria, planta-hongo, planta-virus y planta-nematodo (Rouxel y Balesdent, 2010). En cualquier caso, del elevado conjunto de efectores producidos por bacterias, hongos y virus, sólo un número reducido se ha correspondido con un gen R en el huésped correspondiente y, en consecuencia, se ha podido asignar finalmente a un gen de avirulencia (Rouxel y Balesdent, 2010).

En girasol, un ejemplo bien caracterizado de interacción gen *Avr*-gen *R* es el caso del mildiu de girasol, enfermedad causada por el oomiceto *Plasmopara halstedii*. Este sistema sigue en general un modelo gen-a-gen, en el que genes de resistencia dominante en girasol, denominados genes *Pl*, confieren resistencia a razas de mildiu con un grado de virulencia específico (Gascuel et al., 2015). Hasta la fecha, se han cartografiado 10 genes *Pl* en el mapa genético de girasol, en al menos cuatro regiones genómicas complejas en las que se han localizado genes *R* que codifican para proteínas del tipo NBS-LRR (NBS es un sitio conservado de unión a un nucleótido y LRR es un dominio rico en repeticiones de leucina) (Bouzidi et al., 2002, Radwan et al., 2008, 2011), si bien hasta la fecha no se ha clonado ningún gen *Pl*. Por otro lado, se están caracterizando efectores de *Plasmopara halstedii*. En otros oomicetos fitopatógenos, los efectores citoplasmáticos se caracterizan por ser proteínas del tipo RXLR (caracterizadas por poseer un dominio con aminoácidos RXLR relacionado con su translocación a la célula del huésped) o Crinklers (CRN, con un motivo de aminoácidos LXLFLAK asociado asimismo con la localización intracelular de este efector) (Stassen y Van den Ackerveken, 2011). Así, a partir del análisis de su transcriptoma, se han secuenciado un total de 49 RXLRs y 54 CRNs en *Plasmopara halstedii*, algunos de los cuales son específicos de *P. halstedii*, mientras que otros están conservados dentro del grupo de oomicetos, y se está determinando su función en la patogenicidad de *P. halstedii* (Mestre et al., 2015).

Dentro de las interacciones planta-planta parásita, uno de los sistemas mejor caracterizados que sigue un modelo gen-a-gen es la interacción de la planta parásita *Striga gesnerioides* (Willd.) con *Vigna unguiculata* (L.) Walp. En las regiones del Este y Centro de África donde se cultiva esta leguminosa, se han descrito hasta el momento siete razas de *S. gesnerioides* (SG1 a SG4, SG4z, SG5 y SG6), caracterizadas mediante reacciones diferenciales en el huésped *V. unguiculata* y estudios de diversidad molecular (Omoigui et al., 2015). La resistencia a *S. gesnerioides* específica de raza es, en general, monogénica y dominante (Timko y Scholes, 2013). Se han cartografiado en dos grupos de ligamiento del mapa genético de *V. unguiculata* un total de seis de estos genes de resistencia. Así, los genes de resistencia a las razas SG1, SG2, SG3 y SG5 se han localizado en el grupo 1, mientras que aquellos que confieren resistencia a las razas SG1 y SG4z se encuentran el grupo 6 (Timko y Scholes, 2013). El gen de resistencia a la raza SG3 en el genotipo resistente B301 se ha

podido clonar y codifica para una proteína R (RSG3-301) con dominios estructurales NBS-LRR (Li y Timko, 2009) similares a los encontrados en otras proteínas R de plantas (Caplan et al., 2008). La proteína RSG3-301 presentó en concreto un 54% de homología con la proteína R de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) Rpg1-b (Li y Timko, 2009). El gen *Rpg1-b* confiere resistencia a la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* que contiene el gen de avirulencia *avrB* (Ashfield et al., 2004) si bien, como hemos mencionado anteriormente, no existe hasta la fecha ningún estudio genético ni gen *AVR* caracterizado en sistemas planta-planta parásita.

Hipótesis y objetivos



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El jopo de girasol (Orobanche cumana Wallr.) es una planta angiosperma holoparásita que penetra en los tejidos vasculares de las raíces del girasol y obtiene de ellos tanto el agua como los nutrientes necesarios para completar su ciclo vital, constituyendo una importante limitación fitopatológica del rendimiento del cultivo de girasol en España y en la mayoría de los países productores de girasol en Europa y Asia. Dentro del sistema parasítico girasol-O. cumana, la mayoría de los estudios se han centrado en la planta hospedadora, en concreto en la identificación de fuentes de resistencia genética y el estudio de su modo de herencia, siendo los estudios acerca del parásito muy escasos. Esta es la razón fundamental que motiva la realización del estudio que planteamos, la de arrojar luz sobre la biología y genética de O. cumana, para así poder ampliar conocimientos acerca de la interacción huésped-parásito con el objetivo final de desarrollar de manera más eficiente sistemas de control integral y sostenible de esta mala hierba parásita.

Así, la presente Tesis Doctoral persigue los siguientes objetivos específicos basados en las hipótesis que a continuación se describen.

1. Estudio de la influencia del aislamiento de plantas en floración de *Orobanche cumana* en la producción y en la calidad de las semillas.

Como se ha mencionado, los estudios realizados hasta la fecha sobre la interacción girasol-O. cumana se han centrado en entender los mecanismos implicados en la reacción de resistencia en la planta hospedadora, pero los estudios realizados sobre el parásito son escasos. Hasta el inicio de esta Tesis Doctoral, no se había realizado ningún estudio genético de herencia de caracteres en O. cumana, ni estudios específicos de biología reproductiva en esta especie. Para llevar a cabo tales estudios, era preciso desarrollar previamente metodologías, protocolos y procedimientos para el manejo del jopo en tal tipo de estudios. En concreto, este objetivo se centró en realizar una serie de estudios metodológicos iniciales para valorar si el jopo del

girasol tolera el aislamiento mediante el embolsado de plantas en floración, estudiar el método óptimo de embolsado, y determinar la capacidad de producir semillas viables con capacidad infectiva bajo esas condiciones.

Estudios realizados en otras especies vegetales habían mostrado que el tipo de bolsa empleado en el aislamiento tenía efectos sobre la cantidad y la calidad de las semillas obtenidas por autofecundación (Pickering, 1982). Esto estaba bastante estudiado en plantas cultivadas donde se desarrollaban programas de mejora genética, como por ejemplo el olivo (Del Río y Caballero, 1999). Era conocido que la germinación y el vigor de las semillas podían verse afectadas por las condiciones ambientales, es decir por la humedad, la temperatura, por la cantidad y la calidad de la luz (Basu, 1995). Nuestra hipótesis de trabajo es que el tipo de bolsa puede afectar a la cantidad y/o a la calidad de las semillas producidas bajo condiciones de aislamiento, incluyendo dentro de la calidad, por tratarse de una planta parásita, su capacidad infectiva. La puesta a punto de un método optimizado de aislamiento es indispensable para realizar estudios biológicos y genéticos en la especie objeto de nuestro estudio. Las técnicas aplicadas podrían abrir nuevos caminos en la investigación sobre esta planta parásita, tanto a nivel genético como de su interacción con la planta hospedadora.

2. Estudio de la producción de semilla mediante cruzamientos controlados en el jopo del girasol.

En línea con el anterior objetivo, se encuentra la posibilidad de poder hacer cruzamientos entre plantas de *O. cumana* para realizar estudios genéticos en esta planta parásita. No existía al inicio de esta Tesis Doctoral ningún estudio previo en *O. cumana* sobre la técnica a seguir para realizar hibridaciones controladas, así como sobre la calidad e infectividad de la semilla producida. Nuestra hipótesis es que, con el sistema de aislamiento de inflorescencias previamente desarrollado y comprobado, es posible obtener semilla híbrida procedente de cruzamientos controlados entre plantas de *O. cumana*.

Los objetivos 1 y 2 se encuentran en el Artículo de Investigación:

Rodríguez-Ojeda, M. I., Pérez-Vich, B., Alonso, L.C., Fernández-Escobar, J. **2010**. The influence of flowering plant isolation on seed production and seed quality in *Orobancha cumana*. *Weed Research* 50: 515-518.

3. Estudio de la herencia genética de la ausencia de pigmentación en *Orobancha cumana*.

El color del tallo en las especies de *Orobancha* spp., debido a la falta de clorofila, se debe principalmente a la acumulación de antocianinas (Wheldale, 1916). La herencia de este carácter se ha estudiado en especies pertenecientes a otras familias botánicas, pero no así en *Orobancha* spp., si bien, mediante observaciones indirectas, se había propuesto que la ausencia de pigmentación antociánica en algunas especies de este género podía tratarse de un carácter de herencia simple (Rumsey y Jury, 1991; Rumsey, 2007). Una vez identificado un mutante natural de *O. cumana* que carece de pigmentación antociánica, caracterizado por tallo amarillo y flores blancas frente a tallo verde-azulado y flores con tonalidad azul en los bordes de la corola en las plantas no mutantes, nuestra hipótesis se basa en que podemos realizar el estudio genético de la ausencia de pigmentación en *O. cumana* empleando las técnicas de aislamiento e hibridación puestas a punto en el primer trabajo de esta Tesis. Con este estudio se pretende contrastar la metodología y técnicas aplicadas a la hora de embolsar, emascular y cruzar de forma dirigida individuos de jopo, así como realizar el primer estudio genético de herencia de caracteres en esta especie. Para ello, se empleará la ausencia de pigmentación como marcador visual en cruzamientos entre plantas de jopo con ausencia de pigmentación y plantas de jopo con pigmentación normal, y se estudiará la segregación para la pigmentación de la planta en la progenie de dichos cruzamientos.

El objetivo 3 se encuentra en el Artículo de Investigación:

Rodríguez-Ojeda, M. I., Velasco, L., Alonso, L. C., Fernández-Escobar, J., Pérez-Vich, B. **2011**. Inheritance of the Unpigmented Plant Trait in *Orobanche cumana*. *Weed Research* 51: 151-156.

4. Estudio de la tasa de polinización cruzada en *Orobanche cumana* usando un mutante no pigmentado como marcador visual.

El sistema reproductivo de una planta es el carácter adaptativo por excelencia, y determina su grado de diversidad genética y la distribución de la misma. Conocer el sistema reproductivo de *O. cumana* es además esencial para establecer estrategias de control de esta planta parásita. Hasta de inicio de esta Tesis Doctoral, existían muy pocos estudios específicos de la biología reproductiva en *Orobanche* spp. (Prider, 2015) y la mayoría de las conclusiones sobre el sistema reproductivo de estas especies se habían inferido indirectamente a partir del estudio de caracteres tales como la morfología floral o bien a partir de la estructura genética de las poblaciones. La mayoría de las especies de *Orobanche* se polinizan mediante la acción de los insectos, es decir que son plantas predominantemente alógamas, si bien se han descrito también algunas especies que se reproducen principalmente mediante autopolinización (Kreutz, 1995). En *O. cumana*, Gagne et al. (1998) concluyeron, tras realizar estudios moleculares en poblaciones de esta especie, que se trataba de una especie con un mecanismo de reproducción predominantemente autógeno, debido a la observación de escasa diversidad genética dentro de las poblaciones. También se llegó a la misma conclusión observando la morfología de sus flores, que aparentemente no favorecen la acción de grandes polinizadores como abejas y abejorros (Satovic et al., 2009). En este trabajo, se pretende estudiar el mecanismo de reproducción del jopo del girasol mediante determinación directa de la tasa de polinización cruzada, usando como marcador fenotípico la ausencia de pigmentación.

El objetivo 4 se encuentra en el Artículo de investigación:

Rodríguez-Ojeda, M. I., Fernández-Martínez, J. M., Velasco, L., Pérez-Vich, B. **2013**. Extent of Cross Fertilization in *Orobanche cumana* Wallr. *Biologia Plantarum* 57: 559-562.

5. Estudio de la herencia de la virulencia/avirulencia en *Orobanche cumana*.

La resistencia a *Orobanche* spp. en plantas cultivadas es normalmente de tipo horizontal, es decir, poligénica, recesiva, y no específica de raza, siendo el girasol una notable excepción, puesto que se ha descrito en este cultivo que la resistencia a *O. cumana* es generalmente de tipo vertical, es decir, monogénica, dominante y específica de raza (Pérez-Vich et al., 2013). Esta resistencia de tipo vertical está principalmente gobernada por interacciones gen-a-gen (Flor, 1971) en las que las reacciones de resistencia se rigen por la interacción de los genes de resistencia en la planta hospedadora y los correspondientes genes de avirulencia en la planta parásita. Todos los estudios genéticos realizados en el sistema girasol-*O. cumana* se han centrado en la caracterización de genes de resistencia en el girasol, no existiendo hasta el inicio de esta Tesis Doctoral ningún estudio sobre genes de avirulencia en *O. cumana* ni en ninguna otra especie de *Orobanche*. El objetivo de este trabajo, bajo la hipótesis de una resistencia de tipo vertical en girasol, es estudiar desde la perspectiva de la planta parásita si el sistema parasítico girasol-*O. cumana* está gobernado por una interacción gen-a-gen, como parece suceder en los estudios realizados en girasol. Para ello se estudiará la herencia de la virulencia/avirulencia en el parásito mediante la realización de cruzamientos entre individuos pertenecientes a diferentes razas, con el objetivo de estudiar el número de genes implicados y el modo de herencia de este carácter.

El objetivo 5 se encuentra en el Artículo de investigación:

Rodríguez-Ojeda, M. I., Pineda-Martos, R., Alonso, L. C., Fernández-Escobar, J., Fernández-Martínez, J. M., Pérez-Vich, B., Velasco, L. **2013**. A dominant avirulence gene in *Orobanche cumana* triggers *Or5* resistance in sunflower. *Weed Research* 53: 322-327.

Bibliografía



BIBLIOGRAFÍA

- Abu Sbaih, H. A., Jury, S. L. **1994**. Seed micromorphology and taxonomy in *Orobanche* (Orobanchaceae). *Flora Mediterranea* 4: 41-48.
- Akhtouch, B., Muñoz-Ruiz, J., Melero-Vara, J., Fernández-Martínez, J., Domínguez, J. **2002**. Inheritance of resistance to race F of broomrape in sunflower lines of different origins. *Plant Breeding* 121: 266-268.
- Akhtouch, B., Molinero-Ruiz, L., Dominguez, J., Melero-Vara, J.M., Fernández-Martínez, J.M. **2013**. Using sowing date modification and genetic resistance to manage sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.). *Helia* 36: 17-34.
- Akhtouch, B., del Moral, L., Leon, A., Velasco, L., Fernández-Martínez, J. M., Pérez-Vich, B. **2016**. Genetic study of recessive broomrape resistance in sunflower. *Euphytica* DOI 10.1007/s10681-016-1652-z.
- Al-Khesraji, T. O., Abdel-Wahid, A. U. **1988**. *Orobanche aegyptiaca* Pers. in Arbil governorate northern Iraq and its infestation by *Phytomyza orobanchia* Kalt. *Iraqi Journal of Agricultural Science* “ZANCO“ 6: 71-83.
- Al-Menoufi, O. A., El-Safwani, N. A., Adam, M. A. **1996**. Biological and chemical inhibition of *Orobanche* seed germination. En: Moreno, M. T., Cubero, J. I., Berner, D., Joel, D., Nusselman, L. J., Parker, C. (eds.), *Advances in parasitic plant research*. Junta de Andalucía, Sevilla, Spain, pp. 417-423.
- Alonso, L. C., Fernández-Escobar, J., López, G., Rodríguez-Ojeda, M. I., Sallago, F. **1996**. New highly virulent sunflower broomrape (*Orobanche cernua* Loefl.) pathotypes in Spain. En: Moreno, M. T., Cubero, J. I., Berner, D., Joel, D., Nusselman, L. J., Parker, C. (eds.). *Advances in parasitic plant research*. Junta de Andalucía, Sevilla, pp. 639-644.

- Alonso, L. C., Rodríguez-Ojeda, M. I., Fernández-Escobar, J., López-Ruiz-Calero, G. **1998**. Chemical control of broomrape (*Orobanche cernua* Loefl.) in sunflower (*Helianthus annuus* L.) resistant to imazethapyr herbicide. *Helia* 21: 45-54.
- Alonso, L. C. **1998**. Resistance to *Orobanche* and resistance breeding: A Review. En: Wegmann, H., Musselman, L. J., Joel, D. M. (eds.), *Current Problems of Orobanche Research, Proceedings of the Fourth International Workshop on Orobanche*, Dubroudjia, Albena, Bulgaria, September 23-26, 1998. Institute of Wheat and Sunflower Research: General Toshevo, Bulgaria, pp 233-237.
- Aly, R., Hamamouch N., Abu-Nassar J. **2011**. Movement of protein and macromolecules between host plants and the parasitic weed *Phelipanche aegyptiaca* Pers. *Plant Cell Reports* 30: 2233-2241.
- Amri, M., Abbes, Z., Ben Youssef, S., Bouhadida, M., Ben Salah, H., Kharrat, M. **2012**. Detection of the parasitic plant, *Orobanche cumana* on sunflower (*Helianthus annuus* L.) in Tunisia. *African Journal of Biotechnololy* 11: 4163-4167.
- Antonova, T.S., Ter Borg, S. J. **1996**. The role of peroxidase in the resistance of sunflower against *Orobanche cumana* in Russia. *Weed Research* 36: 113-121.
- Antonova, T. S., Araslanova, N. M., Strelnikov, E. A., Ramazanova, S. A., Guchetl, S. Z., Chelyustnikova, T. A. **2013**. Distribution of highly virulent races of sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in the Southern regions of the Russian Federation. *Russian Agricultural Sciences* 39: 46-50.
- Antonova, T. S. **1976**. About the possible role of broomrape peroxidase in sunflower resistance to new races of the parasite. *Bulletin of Scientific Information on Oil crops (VNIIMK)* 1: 47-51.
- Antonova, T. S. **1978**. The development of the haustoria of *Orobanche cumana* Wallr. in the roots of immune and susceptible forms of sunflower. *Botanicheskii Zhurnal* 63: 1025-1030 (Ru) *Weed Abstracts* 1979, 27: 406.

- Ashfield, T., Ong, L. E., Nobuta, K., Schneider, C. M., Innes, R. W. **2004**. Convergent evolution of disease resistance gene specificity in two flowering plant families. *Plant Cell* 16: 309-318.
- Atanasova, R., Batchvarova, R., Todorovska, E., Atanassov, A. **2005**. Molecular study of broomrape (*Orobanche* spp.) by RAPD analyses. *Biotechnology Biotechnological Equipment* 19: 51-60.
- Aydin, A, Mutlu, ve H. **1996**. Broomrape development on sunflower planted at different dates. *Helia* 19: 105-110.
- Basu, R. N. **1995**. Seed viability. En: Basra, A. S. (ed.), *Seed Quality: Basic Mechanisms and Agricultural Implications*. The Haworth Press, New York, pp. 1-44.
- Beck von Mannagetta, G. **1930**. Orobanchaceae. En: Engler, A. (ed.), *Das Pflanzenreich*, vol. IV. Verlag von Wilhelm Engelmann: Leipzig, Germany, pp 1-348.
- Bedi, J. S, Donchev. N. **1991**. Results on mycoherbicides control of sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) under glasshouse and field conditions. En: Ransom, J. K., Musselman, L. J., Worsham A. D., Parker C. (eds.), *Proceedings of the 5th Symposium on Parasitic Weeds*, Nairobi, Kenya, June 24-30, 1991. CIMMYT, Nairobi, Kenya pp. 76-82.
- Benharrat, H., Veronesi, C., Theodet, C., Thalouarn, P. **2002**. *Orobanche* species and population discrimination using Intersimple Sequence Repeat (ISSR). *Weed Research* 42: 470-475.
- Bent, A.F., Mackey, D. **2007**. Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annual Review of Phytopathology* 45: 399-436.
- Boller T., Félix, G. A. **2009**. Enaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review Plant Biology* 60: 379-406.
- Bouzidi, M. F., Badaoui S., Cambon F., Vear F., De Labrouhe D. T., Nicolas P., Mouzeyar, S. **2002**. Molecular analysis of a major locus for resistance to downy mildew in sunflower with specific PCR-based markers. *Theoretical Applied Genetics* 104: 592-600.

- Brault, M., Betsou, F., Jeune, B., Tuquet, C., Sallé, G. **2007**. Variability of *Orobancha ramosa* populations in France as revealed by cross infestations and molecular markers. *Environmental Experimental Botany* 61: 272-280.
- Bulbul, A., Salihoglu, M., Sari, C., Aydin, A. **1991**. Determination of broomrape (*Orobancha cumana* Wallr.) races of sunflower in the Thrace region of Turkey. *Helia* 15: 21-26.
- Burlov, V., Burlov, V. **2010**. Breeding of sunflower resistant to new races of broomrape (*Orobancha cumana* Wallr.). *Helia* 33: 165-172.
- Burlov, V. V., Kostyuk, S. V. **1976**. Inheritance of the resistance to the local race of broomrape (*Orobancha cumana* Wallr.) in sunflower. *Genetika* 12: 44-51.
- Buschmann, H., Gonsior, G., Sauerborn, J. **2005**. Pathogenicity of branched broomrape (*Orobancha ramosa*) populations on tobacco cultivars. *Plant Pathology* 54: 650-656.
- Caplan, J., Padmanabhan, M., Dinesh-Kumar, S. P. **2008**. Plant NB-LRR immune receptors: from recognition to transcriptional reprogramming. *Cell host & microbe* 3: 126-135.
- Castejón, M., Romero-Munoz, F., García-Torres, L. **1991**. *Orobancha cernua* seed dispersal through sunflower achenes. *Helia* 14: 51-54.
- Castejón-Muñoz, M., Romero-Muñoz, F., García-Torres, L. **1993**. Effect of planting date on broomrape (*Orobancha cernua* Loefl.) infections in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Weed Research* 33: 171-176.
- Castejón-Muñoz, M., Suso, M. J., Romero-Muñoz, F., García-Torres, L. **1991**. Isoenzymatic study of broomrape (*Orobancha cernua*) populations infesting sunflower (*Helianthus annuus*). En: Ransom, J. K., Musselman, L. J., Worsham A. D., Parker C. (eds.), *Proceedings of the 5th Symposium on Parasitic Weeds*, Nairobi, Kenya, June 24-30, 1991. CIMMYT, Nairobi, Kenya, pp 313-319.
- Castejon-Muñoz, M., García Torres, L. **1997**. Incidencia de las infestaciones del jopo del girasol en Andalucía. *Agricultura* 66: 456-460.

- Chae, S. H., Yoneyama, K., Takeuchi, Y., Joel, D. M. **2003**. Fluridone and norflurazon, carotenoid biosynthesis inhibitors, promote seed conditioning and germination of the holoparasite *Orobanche minor*. *Physiologia Plantarum* 120: 328-337.
- Charlesworth, D. Effects of inbreeding on the genetic diversity of populations. **2003**. *Philosophical Transactions Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 358: 1051-1070.
- Christov, M., Batchvarova, R., Hristova-Cherbadzhi, M. **2009**. Wild Species of *Helianthus* L. sources of resistance to the parasite *Orobanche cumana* Wallr. *Helia* 32: 65-74.
- Cubero, J.I., Moreno, M.T., Rubiales, D., Sillero, J. **1999**. *Resistance to Orobanche: the state of the art*. Junta de Andalucía, Sevilla, Spain.
- Cvejić, S., Dedić, B., Jocić, S., Miladinović, D., Miklič, V. **2012**. Broomrape resistance in newly developed sunflower inbred lines. En: *Proceedings of the 18th International Sunflower Conference*, Mar del Plata, Argentina, February 27-March 1, 2012. International Sunflower Association (ISA), Paris, France, pp 1037-1042.
- Cvejić, S., Jocić, S., Dedić, B., Radeka, I., Imerovski, I., Miladinović, D. **2014**. Determination of resistance to broomrape in newly developed sunflower inbred lines. En: *Proceedings of the 3rd International Symposium on Broomrape (Orobanche spp.) in Sunflower*, Córdoba, Spain, June 3rd-6th, 2014. International Sunflower Association, Paris, France, pp. 184-188.
- Del Río, C., Caballero, J. M. **1999**. A new bag for olive pollination studies. *Acta Horticulturae* 474: 233-236.
- Dhanapal, G. N., Struik, P. C. **1996**. Broomrape (*Orobanche cernua*) control before attachment to host through chemically or biologically manipulating seed germination. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 44: 279-291.
- Díaz-Celayeta, F. **1974**. Algunas plantas parásitas de otras de interés agrícola o medicinal. *Anales INIA Serie Protección Vegetal* 4: 143-160.
- Dodds, P. N., Rathjen, J. P. **2010**. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* 11: 539-548.

- Domínguez, J., Melero-Vara J. J., Ruso J., Miller J., Fernández-Martínez, J. M. **1996**. Screening for resistance to broomrape (*Orobanche cernua*) in cultivated sunflower. *Plant Breeding* 115: 201-202.
- Domínguez, J. **1996**. R41, a sunflower restorer line, carrying two genes for resistance against a highly virulent Spanish population of *Orobanche cernua*. *Plant Breeding* 115: 203-204.
- Dörr, I., Staack, A., Kollmann, R. **1994**. Resistance of *Helianthus* to *Orobanche*: histological and cytological studies. En: Pieterse, A. H., Verkleij, J. A. C., ter Borg, S. J. (eds.) *Proceedings of the 3rd International Workshop on Orobanche and Striga Research*, 1994. Amsterdam, Netherlands: Royal Tropical Institute, pp. 276-289.
- Dörr, I., Kollmann, R. **1974**. Structural features of parasitism of *Orobanche*. I. Growth of the haustorial cells within the host tissue. *Protoplasma* 80: 245-259.
- Dörr, I., Kollmann, R. **1975**. Structural features of parasitism of *Orobanche*. II. The differentiation of assimilate conducting elements within the haustorium [*Orobanche ramosa* on hemp, *Orobanche crenata* on broadbeans]. *Protoplasma* 83: 185-199.
- Eizenberg, H., Tanaami, Z., Jacobsohn, R., Rubin, B. **2001**. Effect of temperature on the relationship between *Orobanche* spp. and carrot (*Daucus carota* L.). *Crop Protection* 20: 415-420.
- Fernández-Aparicio, M., Flores, F., Rubiales, D. **2009**. Recognition of root exudates by seeds of broomrape (*Orobanche* and *Phelipanche*) species. *Annals of Botany* 103: 423-443.
- Fernández-Escobar, J., Rodríguez-Ojeda, M. I., Fernández-Martínez, J. M., Alonso, L. C. **2009**. Sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in Castilla-León, a traditionally non-broomrape infested area in Northern Spain. *Helia* 51: 57-64.
- Fernández-Martínez, J. M., Velasco, L., Pérez-Vich, B. **2012**. Progress in research on breeding for resistance to broomrape. En: *Proceedings of the 18th International Sunflower Conference*, Mar del Plata, Argentina, February 27-March 1, 2012. International Sunflower Association (ISA), Paris, France. Publicación electrónica (http://www.asagir.org.ar/asagir2008/buscar_congreso.asp).

- Fernández-Martínez, J. M., Pérez-Vich, B., Velasco, L. **2015**. Sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.). En: Martínez-Force, E., Dunford, N. T., Salas, J. (eds) *Sunflower: Chemistry, Production, Processing, and Utilization*, AOCS Press, Urbana, Illinois, USA, pp. 129-156.
- Flor, H. H. **1971**. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9: 275-296.
- Gagne, G., Roeckel-Drevet, P., Grezes-Besset, B., Shindrova, P., Ivanov, P., Grand-Ravel, C., Vear, F., Tourvieille de Labrouhe, D., Charmet, G., Nicolas, P. **1998**. Study of the variability and evolution of *Orobanche cumana* populations infesting sunflower in different European countries. *Theoretical Applied Genetics* 96: 1216-1222.
- Gagne, G., Roeckel Drevet, P., Grezes Besset, B., Shindrova, P., Ivanov, P., Grandravel, C., Vear, F., Charmet, G., Nicolas, P. **2000**. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) as suitable markers to study *Orobanche cumana* genetic diversity. *Journal of Phytopathology* 148: 457-459.
- García-Torres, L., López-Granados, L., Castejón-Muñoz, M. **1994**. Preemergence herbicides for the control of broomrape (*Orobanche cernua* Loefl.) in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Weed Research* 34: 395-402.
- García-Torres, L., Castejón-Muñoz, M., López-Granados, F., Jurado-Expósito, M. **1995**. Imazapyr applied postemergence in sunflower (*Helianthus annuus*) for broomrape (*Orobanche cernua*) control. *Weed Technology* 9: 819-824.
- García-Torres, L., López-Granados, F. **1991**. Control of broomrape (*Orobanche crenata* Forssk.) in broad bean (*Vicia faba* L.) with imidazolinones and other herbicides. *Weed Research* 31: 227-235.
- García-Torres, L. **1993**. *Biología y control de especies parásitas: jopos, cuscutas, striga y otras*. Agrícola Española, Madrid, España.
- García-Torres, L. **1994**. Progress in Orobanche control: An overview. En: Pieterse, A. H., Verkleij, J. A. C., ter Borg, S. J. (eds.) *Proceedings of the 3rd International Workshop on*

- Orobanche and Striga Research, 1994. Amsterdam, Netherlands: Royal Tropical Institute, pp. 824.
- Gascuel, Q., Martinez, Y., Boniface, M. C., Vear, F., Pichon, M., & Godiard, L. **2015**. The sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*. *Molecular Plant Pathology* 16: 109-122.
- Gevezova, M., Dekalska, T., Stoyanov, K., Hristeva, T., Kostov, K., Batchvarova, R., Denev, I. **2012**. Recent Advances in Broomrapes Research. *Journal of Biosciences and Biotechnology* 1: 91-105.
- González-Torres R., Jiménez-Díaz, R. M., Melero-Vara, J. M. **1982**. Distribution and virulence of *Orobanche cernua* in sunflower crops in Spain. *Phytopathologische Zeitschrift* 104: 78-89.
- Greuter, W. R., Burdet, H. M, Long, G. **1989**. Med-checklist. A Critical Inventory of Vascular Plants of the Circum-Mediterranean Countries. (Lauraceae-Rhamnaceae). *Conservatoire et Jardin Botaniques de la Ville de Genève*, Genève, Switzerland. Vol. 4.
- Guchetl, S., Antonova, T. S., Tchelustnikova, T. **2014**. Interpopulation genetic differentiation *Orobanche cumana* Wallr. from Russia, Kazakhstan and Romania using molecular genetic markers. *Helia* 37: 181-191.
- Gulya, T., Berlin, N., Lamey, A. **1994**. Sunflower diseases. En: Berjlund, D.R. (ed.), *Sunflower Production Extension Bulletin*. North Dakota Agricultural Experiment Station and North Dakota State University, pp. 44-62.
- Gutiérrez-Mellado, C., Parry, A., Tena, M., Jorin, J., Edwards, R. **1995**. Abiotic elicitation of coumarin phytoalexins in sunflower. *Phytochemistry* 38: 1185-1191.
- Hammad, S., El-Arosi H., Al-Menoufi O. **1967**. *Phytomyza orobanchia* Kalt. feeding on *Orobanche crenata* Forsk. in Egypt (Diptera: Agromyzidae). *Bulletin de la Société Entomologique d’Egypte* 51: 141-144.

- Heide-Jørgensen, H. S. **2013**. The Parasitic syndrome in higher plants. En: Joel, D. M., Gressel, J., Musselman L. (eds.), *Parasitic Orobanchaceae - Parasitic Mechanisms and Control Strategies*. Springer, Heidelberg Berlin, Germany, pp. 1-18.
- Hladni, N., Jocić, S., Miklič, V., Saftić-Panković, D., Škorić, D. **2009**. Using new Rf inbred lines originating from an interspecific population with *H. deserticola* for development of sunflower hybrids resistant to broomrape. *Helia* 32: 81-89.
- Hristova, E., Stoyanov, K., Gevezova, M., Denev, I. **2011**. Application of ISSR methods in studying Broomrape`s (Orobanchaceae) biodiversity in Bulgaria. *BiotechnolyBiotechnological Equipment* 25: 2248-2253.
- Ish-Shalon-Gordon, N., Jacobsohn, R., Cohen, Y. **1993**. Inheritance of resistance to *Orobanche cumana* in sunflower. *American Phytopathological Society* 83: 1250-1252.
- Jan, C. C., Fernández-Martínez, J. M., Ruso, J., Muñoz-Ruz, J. **2002**. Registration of four sunflower germplasm populations resistant to broomrape race F. *Crop Science* 42: 2217-2218.
- Jestin C., Lecomte V., Duroueix F. **2014**. Current situation of sunflower broomrape in France. En: *Proceedings 3rd International Symposium on broomrape (Orobanche spp.) in sunflower*, Córdoba, Spain, June 3rd-6th, 2014. International Sunflower Association, Paris, France, pp. 28-31.
- Joel D. M., Steffens J. C., Matthews, D. E. **1995**. Germination of weedy root parasites. En: Kigel, J., Galili, G. (eds.) *Seed Development and Germination*. New York: Marcel Dekker, Inc., pp. 567-597.
- Joel, D. M., Losner-Goshen, J., Hershenhorn, J., Goldwasser, Y., Assayag, M. **1996**. The haustorium and its development in compatible and resistance hosts. En: Moreno, M. T., Cubero, J. I., Berner, D., Joel, D., Nusselman, L. J., Parker, C. (eds.), *Advances in parasitic plant research*. Junta de Andalucía, Sevilla, Spain, pp. 531-541.

- Joel, D. M., Hershenhorn, Y., Eizenberg, H., Aly, R., Ejeta, G., Rich, P. J., Ransom, J. K., Sauerborn, J., Rubiales, D. **2007**. Biology and management of weedy root parasites. *Horticultural Reviews* 33: 267-349.
- Joel, D. M., Chaudhury, S., Plakhine, D., Ziadna, H., Steffens, J. **2011**. Dehydrocostus lactone is exuded from sunflower roots and stimulates germination of the root parasite *Orobanche cumana*. *Phytochemistry* 72: 624-634.
- Joel, D. M., Gressel, J., Musselman, L. J. **2013**. Parasitic Orobanchaceae: Parasitic mechanisms and control strategies, Springer: Heidelberg, Berlin, Germany.
- Joel, D. M., Losner-Goshen, D. **1994**. The attachment organ of the parasitic angiosperms *Orobanche cumana* and *O. aegyptiaca* and its development. *Canadian Journal of Botany* 72: 564-574.
- Joel, D. M. **1987**. Detection and identification of *Orobanche* seeds using fluorescence microscopy. *Seed Science and Technology* 15: 119-124.
- Joel, D. M. **2013**. The Haustorium and the life cycles of parasitic Orobanchaceae. En: Joel, D. M., Gressel, J., Musselman L. (eds.), *Parasitic Orobanchaceae - Parasitic Mechanisms and Control Strategies*. Springer, Heidelberg Berlin, Germany, pp 21-23.
- Johnson, A. W., Rosebery, G., Parker, C. **1976**. A novel approach to *Striga* and *Orobanche* control using synthetic germination stimulants. *Weed Research* 16: 223-227.
- Jorrín, J., de Ruc, E., Serghini, K., Pérez-de-Luque, A., Muñoz-García, García-Torres, L., Castejón-Muñoz, M. **1996**. Biochemical aspects of the parasitism of sunflower by *Orobanche*. En: Moreno, M. T., Cubero, J. I., Berner, D., Joel, D. M., Musselman, L. J., Parker, C. (eds.) *Advances in Parasitic Plant Research*. Junta Andalucía, Sevilla, Spain, pp. 551-558
- Jorrín, J., Serghini, K., Pérez De Luque, A. **1998**. Plant resistance to parasitic angiosperms: a biochemical point of view. En: Wegmann, K., Musselman, L. J., Joel, D. (eds.) *Current Problems of Orobanche Research, Proceedings of the 4th International Workshop on*

- Orobanche, Albena, Bulgaria Sep. 23-26, 1998. Institute for Wheat and Sunflower Research, General Toshevo, Bulgaria, pp. 43-49.
- Kasasian, L. **1973**. The chemical control of *Orobanche crenata* in *Vicia faba* and the susceptibility of 53 cultivars of *V. faba* to *O. crenata*. Proceedings European Weed Research Council Symposium on Parasitic Weeds, Malta, 1973. European Weed Research Council, Wageningen, pp. 224-230.
- Katzir, N., Portnoy, V., Tzuri, G., Castejón-Muñoz, M., Joel. D. M. **1996**. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in the study of the parasitic weed *Orobanche*. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 367-372.
- Kaya, Y., Demirci, M., Evcı, G. **2004**. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) breeding in Turkey for broomrape (*Orobanche cernua* Loeffl.) and herbicide resistance. *Helia* 27: 199-210.
- Kaya, Y., Evcı, G., Pekcan, V., Gucer, T., Yilmaz, M. I. **2009**. Evaluation of broomrape resistance in sunflower hybrids. *Helia* 51: 161-170.
- Kaya, Y. **2014**. Current situation of sunflower broomrape around the world. En: *Proceedings of the 3rd International Symposium on Broomrape (Orobanche spp.) in Sunflower*, Córdoba, Spain, June 3rd-6th, 2014. International Sunflower Association, Paris, France, pp. 9-18.
- Klein, O., Kroschel, J. **2002**. Biological control of *Orobanche* spp. with *Phytomyza orobanchia*, a review. *Biocontrol* 47: 245-277.
- Kostiuk, S. V. **1986**. Resistance of forms from the sunflower collection to broomrape. *Plant Breeding Abstracts* 57: 9148
- Kreutz, C.A.J. **1995**. *Orobanche: The European Broomrape Species, a Field Guide*. Natuurhistorisch Genootschap in Limburg, Maastricht, The Netherlands.
- Lachia, M., Wolf, A.C., Jung, P.J.M., Screpanti, C., De Mesmaeker, A. **2015**. Strigolactam: New potent strigolactone analogues for the germination of *Orobanche cumana*. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters* 25: 2184-2188.

- Li, J., Timko, M. P. **2009**. Gene-for-gene resistance in *Striga*-cowpea associations. *Science* 325: 1094.
- Lloyd, D. G., Schoen, D. J. **1992**. Self- and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *International Journal Plant Science* 153: 358-369.
- Logvinenko, V. A., Logvinenko, M. I. **1980**. Breeding sunflower for resistance to broomrape. *Plant Breeding Abstracts* 53: 8338.
- Lolas, P. C. **1994**. Herbicides for control of broomrape (*Orobanche ramosa* L.) in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Weed Research* 34: 205-209.
- Louarn, J., Carbonnel, F., Delavault, P., Bécard, G., Rochange, S. **2012**. Reduced germination of *Orobanche cumana* seeds in the presence of arbuscular mycorrhizal fungi or their exudates. *Plos One* 7: e49273.
- Lu, Y. H., Melero-Vara, J. M., García-Tejada, J. A., Blanchard, P. **2000**. Development of SCAR markers linked to the gene *Or5* conferring resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in sunflower. *Theoretical Applied Genetics* 100: 625-632.
- Maširević, S., Medić-Pap, S., Terzić, A. **2012**. Broomrape seed germination on nutritive media and possibility of its biological control. *Helia* 35: 79-86.
- Maširević, S., Medic-Pap, S. **2009**. Broomrape in Serbia from its occurrence till today. *Helia* 51: 91-100.
- Melero-Vara, J. M., Alonso-Arnedo, L. C. **1988**. Las Enfermedades del Girasol. En *Enfermedades y Daños de Herbicidas en el Cultivo del Girasol*, Koipesol Eds., Madrid, España, pp. 33-39.
- Melero-Vara, J. M., Domínguez, J., Fernández-Martínez, J. M. **1989**. Evaluation of differential lines and a collection of sunflower parental lines for resistance to broomrape (*Orobanche cernua*) in Spain. *Plant Breeding* 102: 322-326.

- Mendel, G. **1866**. Versuche über Pflanzenhybriden. Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn, Bd. für das Jahr 1865, Abhandlungen, pp. 3-47. [Facsímil electrónico: <http://www.esp.org/foundations/genetics/classical/gm-65.pdf>.]
- Mestre, P., Carrere, S., Gouzy, J., Piron, M. C., Tourvieille de Labrouhe, D., Vincourt, P., Delmotte, F., Godiard, L. **2015**. Comparative analysis of expressed CRN and RXLR effectors from two *Plasmopara* species causing grapevine and sunflower downy mildew. *Plant Pathology* (en prensa, DOI 10.1111/ P. 12469).
- Molinero-Ruiz, M. L., García-Carneros, A. B., Collado-Romero, M., Raranciuc, S., Domínguez, J., Melero-Vara, J. M. **2014**. Pathogenic and molecular diversity in highly virulent populations of the parasitic weed *Orobanche cumana* from Europe. *Weed Research* 54: 87-96.
- Müller-Stöver, D., Thomas, H., Sauerborn, J., Kroschel, J. **2004**. Two granular formulations of *F. oxysporum* f. sp. *orthoceras* to mitigate sunflower broomrape *Orobanche cumana*. *Biocontrol* 49: 595-602.
- Musselman, L. J., Parker, C., Dixon, N. **1981**. Notes on the autogamy and flower structure in agronomically important species of *Striga* (Scrophulariaceae) and *Orobanche* (Orobanchaceae). *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 56: 329-343.
- Musselman, L. J., Parker, C. **1982**. Preliminary host ranges of some strains of economically important broomrapes (*Orobanche*). *Economic Botany* 36: 270-273.
- Musselman, L. J., Press, M. C. **1995**. Introduction to Parasitic Plants. En: Press, M. C., Graves J. D. (eds.), *Parasitic Plants*. Chapman and Hall, London, pp. 1-13.
- Musselman, L. J. **1980**. The Biology of *Striga*, *Orobanche*, and other root-parasitic weeds. *Annual Review of Phytopathology* 18: 463-489.
- Musselman, L. J. **1986**. Taxonomy of *Orobanche*. En: ter Borg, S. J. (ed.), *Proceedings of a Workshop on the Biology and Control of Orobanche*. LH/VPO, Wageningen. The Netherlands, pp. 2-20.

- Musselman, L. J. **1991**. *Orobanche ramosa* and *Orobanche aegyptiaca* in Flora Palaestina. En: Wegmann K., Musselman L., Tübingen J. (eds.) *Progress in Orobanche Research*. Eberhard-Karls University, Germany, pp. 1-5.
- Musselman, L. J. **1994**. *Striga* Species. Weed Management for Developing Countries. FAO Plant Production and Protection Paper 120. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Nemli, Y., Giray, H. **1983**. Investigations on natural control of broomrape (*Orobanche* sp.) by *Phytomyza orobanchia* Kalt. (Dipt., Agromyzidae) in Izmir (Turkey). *Journal Turkish Phytopathology* 1: 239-44
- Nickrent, D. L. **2002a**. Plantas Parásitas en el Mundo. En: López-Sáez, J. A., Catalán, P., Sáez, L. (eds.), *Plantas Parásitas de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Mundi-Prensa, Madrid, España, pp. 7-27.
- Nickrent, D. L. **2002b**. Orígenes Filogenéticos de las Plantas Parásitas. En: López-Sáez, J. A., Catalán, P., Sáez, L. (eds.), *Plantas Parásitas de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Mundi-Prensa, Madrid, España, pp. 29-56.
- Nickrent, D. L., Malecot, V., Vidaj-Russell, R., Der, J. P. **2010**. A revised classification of santales. *Taxon* 59: 538-558.
- Novopokrovsky, I. V., Tzvelev, N. N. **1958**. Orobanchaceae Lindl. En: Komarov, V. L. (ed.) *Flora SSSR Vol. 23*, Botaniceskij Institut (Akademija Nauk SSSR), Leningrad, pp. 19-117.
- Omoigui, L.O., Ishiyaku, M. F., Gowda, B. S., Kamara, A. Y., Timko M. P. **2015**. Suitability and use of two molecular markers to track race-specific resistance striga gesnerioides in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *African Journal of Biotechnology* 14: 2179-2190.
- Pacureanu-Joita, M., Veronesi, C., Raranciuc, S., Stanciu, D. **2004**. Parasite-host plant interaction of *Orobanche cumana* Wallr. (*Orobanche cernua* Loefl) with *Helianthus annuus*. En: Seiler, G.J. (ed.), *Proceedings of the 16th International Sunflower Conference*, Fargo, ND, USA, Aug 29 Sept 2, 2004. International Sunflower Association, Paris, France, pp. 171-177.

- Pacureanu-Joita, M., Raranciuc, S., Stanciu, D., Sava, E., Nastase, D. **2008**. Virulence and aggressiveness of sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) populations in Romania. *Romanian Agricultural Research* 25: 47-50.
- Pacureanu-Joita, M., Raranciuc, S., Sava, E., Stanciu, D., Nastase, D. **2009**. Virulence and aggressiveness of sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) populations in Romania. *Helia* 51: 111-118.
- Panchenko, A. Y., Antonova, T. S. **1974**. Peculiarities of protective reactions of resistant sunflower forms to broomrape intrusion. *Agricultural Biology* 9: 554-558.
- Paran, I., Gidoni, D., Jacobsohn, R. **1997**. Variation between and within broomrape (*Orobanche*) species revealed by RAPD markers. *Heredity* 78: 68-74.
- Parker, C., Riches, C. R. **1993**. *Parasitic Weeds of the World: Biology and Control*. CAB International: Wallingford, United Kingdom.
- Parker, C. **2009**. Observations on the current status of *Orobanche* and *Striga* problems worldwide. *Pest Management Science* 65: 453-459.
- Parker, C. **2013**. The Parasitic Weeds of the Orobanchaceae. En: Joel, D. M., Gressel, J., Musselman L. (eds.), *Parasitic Orobanchaceae - Parasitic Mechanisms and Control Strategies*. Springer, Heidelberg Berlin, Germany, pp. 313-344.
- Pérez-De-Luque, A., Galindo, J. C. G., Macías, F. A., Jorrín, J. **2000**. Sunflower sesquiterpene lactone models induce *Orobanche cumana* seed germination. *Phytochemistry* 53: 45-50.
- Pérez-de-Luque, A., Cubero, J. I., Rubiales, D., Joel, D. M. Histology of the incompatible interactions between *Orobanche crenata* and some host legumes. **2001**. En: Fer, A., Thalouarn, P., Joel, D. M., Musselman, L. J., Parker, C., Verkleij, J. A. C. (eds.) *Proceedings of the 7th International Parasitic Weed Symposium*, 5-8 June 2001, Nantes, France Faculté des Sciences, pp. 174-177.
- Pérez-de-Luque, A., Fondevilla, S., Pérez-Vich, B., Aly, R., Thoiron, S., Simier, P., Castillejo, M. A., Fernández-Martínez, J. M., Jorrín, J., Rubiales, D., Delavault, P. **2009**.

- Understanding *Orobanche* and *Phelipanche*-host plant interaction and developing resistance. *Weed Research* 49 (S1): 8-22.
- Pérez-Vich, B., Akhtouch, B., Knapp, S.J., Leon, A. J., Velasco, L., Fernández-Martínez, J. M., Berry, S. T. **2004**. Quantitative trait loci for broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) resistance. *Theoretical Applied Genetics* 109: 92-102.
- Pérez-Vich, B., Velasco, L., Rich, P. J., Ejeta, G. **2013**. Marker-assisted and physiology-based breeding for resistance to Orobanchaceae. En: Joel, D. M., Gressel J., Musselman L. (eds.), *Parasitic Orobanchaceae - Parasitic Mechanisms and Control Strategies*. Springer, Heidelberg Berlin, Germany, pp. 369-391.
- Petcu, E., Păcureanu, J. M. **2011**. Developing drought and broomrape resistant sunflower germplasm utilizing wild *Helianthus* species. *Helia* 34: 1-8.
- Pickering, R.A. **1982**. The effect of pollination bag type on seed quality and size in *Hordeum* inter- and intraspecific hybridization. *Euphytica* 31: 439-449.
- Pieterse, A. H. **1979**. The Broomrapes (Orobanchaceae): a Review. *Abstracts on Tropical Agriculture* 5: 9-35.
- Pineda-Martos, R., Velasco, L., Fernández-Escobar, J., Fernández-Martínez, J.M., Pérez-Vich, B. **2013**. Genetic diversity of sunflower broomrape (*Orobanche cumana*) populations from Spain. *Weed Research* 53: 279-289.
- Pineda-Martos, R., Pujadas-Salvà, A.J., Fernández-Martínez, J.M., Stoyanov, K, Velasco, L., Pérez-Vich, B. **2014a**. The genetic structure of wild *Orobanche cumana* Wallr. (Orobanchaceae) populations in Eastern Bulgaria reflects introgressions from weedy populations. *Scientific World Journal*: e150432.
- Pineda-Martos, R., Velasco, L., Pérez-Vich, B. **2014b**. Identification, characterisation and discriminatory power of microsatellite markers in the parasitic weed *Orobanche cumana*. *Weed Research* 54: 120-132.

- Piwowarczyk, R., Madeja, J., Nobis, M. **2014**. Pollen morphology of the Central European broomrapes (Orobanchaceae: *Orobanche*, *Phelipanche* and *Orobanchella*) and its taxonomical implications. *Plant Systematics Evolution* 301: 795-808.
- Plaza, L., Fernández, I., Juan, R., Pastor, J., Pujadas, A. J. **2004**. Micromorphological studies on seeds of *Orobanche* species from the Iberian Peninsula and the Balearic Islands, and their systematic significance. *Annals of Botany* 94: 167-178.
- Pogorlestskii, P. K. **1974**. Inbred lines in sunflower immune o broomrape. *Plant Breeding Abstracts* 47: 1510.
- Portnoy, V. H., Katzir, N., Joel, D. M. **1997**. Species identification of soilborne *Orobanche* Seeds by DNA fingerprinting. *Pesticide Biochemistry Physiology* 58: 49-54.
- Press, M. C., Graves, J. D., Stewart, G. R. **1990**. Physiology of the interaction of angiosperm parasites and their higher plant hosts. *Plant Cell Environment* 13: 91-104.
- Press, M. C., Graves, J. D. **1995**. Parasitic Plants, Chapman & Hall: London, United Kingdom.
- Prider, J. **2015**. The reproductive biology of the introduced root holoparasite *Orobanche ramosa* subsp. *mutelii* (Orobanchaceae) in South Australia. *Australian Journal of Botany* 63: 426-434.
- Pujadas-Salvá, A. J., 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: 513-527.
- Pujadas-Salvà, A. J. **2002**. Orobanchaceae. En: López-Sáez, J. A., Catalán, P., Sáez, L. (eds.), *Plantas Parásitas de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Ediciones Mundi-Prensa Libros, S.A.: Madrid, Spain, pp. 345-451.
- Pustovoit, G. V., Gubin, I. A. **1974**. Results and prospects in sunflower breeding for group immunity by using the interspecific hybridization method. En: *Proceedings of the 6th International Sunflower Conference*, Bucharest, Romania, July 22-24, 1974, pp. 373-381.

- Pustovoit, V. S. **1966**. Selection, seed culture and some agrotechnical problems of sunflower. Translated from Russian in **1976** by Indian National Scientific Documentation Center (INSDOC): Delhi, India.
- Pustovoit, V. S. **1976**. Sunflower. En: Pustovoit, V. S. (Ed) *Handbook of Selection and Seed Growing of Oil Plants*, Israel Programme of Scientific Tranlations, Jerusalem, pp. 4-35.
- Radwan, O., Gandhi, S., Heesacker, A., Whitaker, B., Taylor, C., Plocik, A., Kesseli, R., Kozik, A., Michelmores, R.W., Knapp, S. J. **2008**. Genetic diversity and genomic distribution of homologs encoding NBS-LRR disease resistance proteins in sunflower. *Molecular Genetics Genomics* 280: 111-125.
- Radwan, O., Bouzidi, M. F., Mouzeyar, S. **2011**. Molecular characterization of two types of resistance in sunflower to *Plasmopara halstedii*, the causal agent of downy mildew. *Phytopathology* 101: 970-979.
- Ramaiah, K. V. **1987**. Control of *Striga* and *Orobanche* Species. A Review. En: Weber, H. C., Forstreuter, W. (eds.), *Parasitic Flowering Plants*. Philipps-Universität: Marburg, Germany, pp. 637-664.
- Raupp, F. M., Spring, O. **2013**. New sesquiterpene lactones from sunflower root exudate as germination stimulants for *Orobanche cumana*. *Journal Agricultural Food Chemistry* 61: 10481-10487.
- Rodríguez-Ojeda, M. I., Alonso, L.C., Fernández-Escobar, J. **2001a**. Effect of different crops on the germination of *Orobanche cernua* Loef. (*O. cumana* Wallr) seeds. En: Fer, A., Thalouarn, P., Joel, D. M., Musselman, L. J., Parker, C., Verkleij, J. A. C. (eds.) *Proceedings of the 7th International Parasitic Weed Symposium*, 5-8 June 2001, Nantes, France Faculté des Sciences, pp. 124.
- Rodríguez-Ojeda, M. I., Fernández-Escobar, J., Alonso, L. C. **2001b**. Sunflower inbred line (KI 374), carrying two recessive genes for resistance against a highly virulent spanish population of *Orobanche cernua* Loelf / *O. cumana* Wallr race "F". En: Fer, A., Thalouarn, P., Joel, D. M., Musselman, L. J., Parker, C., Verkleij, J. A. C. (eds.) *Proceedings of the 7th*

International Parasitic Weed Symposium, 5-8 June 2001, Nantes, France Faculté des Sciences, pp. 208.

Román, B., Rubiales, D., Torres, A. M., Cubero, J. I., Satovic, Z. **2001**. Genetic diversity in *Orobanche crenata* populations from Southern Spain. *Theoretical Applied Genetics* 103: 1108-1114.

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

Román, B., Alfaro, C., Torres, A. M., Moreno, M. T., Satovic, Z., Pujadas, A., Rubiales, D. **2003**. Genetic Relationships among *Orobanche* Species as Revealed by RAPD Analysis. *Annals of Botany* 91: 637-642.

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

Román, B., Hernández, R., Pujadas, A., Cubero, J. I., Rubiales, D., Satovic, Z. **2007b**. Genetic Diversity in two variants of *Orobanche gracilis* Sm. [var. *gracilis* and var. *deludens* (Beck) A. Pujadas] from different regions of Spain. *Electronical Journal of Biotechnology* 10: 221-229.

Román, B., González Verdejo, C. I., Satovic, Z., Madrid, M. D., Cubero, J. I., Nadal, S. **2007c**. Detecting *Orobanche* species by using cpDNA diagnostic markers. *Phytoparasitica* 35: 129-135.

Román, B. **2013**. Population diversity and dynamics of parasitic weeds. En: Joel, D. M, Gressel, J., Musselman L. (eds.), *Parasitic Orobanchaceae - Parasitic Mechanisms and Control Strategies*. Springer, Heidelberg Berlin, Germany, pp. 345-356.

Rouxel, T., Balesdent, M. H. **2010**. Avirulence genes. En: *Encyclopedia of Life Sciences* (ELS), John Wiley & Sons.

- Rubiales, D., Fernández-Aparicio, M., Wegmann, K., Joel, D. M. **2009**. Revisiting strategies for reducing the seedbank of *Orobanche* and *Phelipanche* spp. *Weed Research* 49 (S1): 23-33.
- Rumsey, F. J., Jury, S. L. **1991**. An account of *Orobanche* L. in Britain and Ireland. *Watsonia* 18: 257-295.
- Rumsey, F.J. **2007**. A reconsideration of *Orobanche maritima* Pugsley (Orobanchaceae) and related taxa in southern England and the Channel Islands. *Watsonia* 26: 473-476.
- Saavedra-del-Río, M., Fernández-Martínez, J. M., Melero-Vara, J. M. **1994**. Studies on the inheritance of sunflower resistance to *Orobanche cernua* Loefl. En: Pieterse, A. H., Verkleij, J. A. C., ter Borg, S. J. (eds.) *Proceedings of the 3rd International Workshop on Orobanche and Striga Research*, 1994. Amsterdam, Netherlands: Royal Tropical Institute, pp. 488-492.
- Saber, H. A., El-Hady, M., Khalil, S. A., El-Sherbeeney, M. H., Hassan, M. W. **1994**. New herbicides for *Orobanche* control in faba bean in Egypt. En: Pieterse, A. H., Verkleij, J. A. C., ter Borg, S. J. (eds.) *Proceedings of the 3rd International Workshop on Orobanche and Striga Research*, 1994. Amsterdam, Netherlands: Royal Tropical Institute, pp. 572-575.
- Sackston, W. E. **1978**. Sunflower disease mapping in Europe and adjacent Mediterranean countries. En: *Proceeding of the 8th International Sunflower Conference*, Minneapolis, EE.UU., July 23-27, 1978. International Sunflower Association, Paris, France, pp. 7-29.
- Salas, C. A., Bulos, M., Altieri, E., Ramos, M. L. **2012**. Genetics and breeding of herbicide tolerance in sunflower. *Helia* 35: 57-70.
- Satovic, Z., Joel, D. M., Rubiales, D., Cubero, J. I., Román, B. **2009**. Population genetics in weedy species of *Orobanche*. *Australasian Plant Pathology* 38: 228-234.
- Schneeweiss, G. M. **2013**. Phylogenetic relationships and evolutionary trends in Orobanchaceae. En: D. M. Joel, J. Gressel, L. Musselman (eds.), *Parasitic Orobanchaceae - Parasitic Mechanisms and Control Strategies*. Springer, Heidelberg Berlin, Germany, pp 243-266.

- Serghini, K., de Luque, A. P., Castejón-Muñoz, M., García-Torres, L., Jorrín, J. V. **2001**. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to broomrape (*Orobancha cernua* Loefl.) parasitism: induced synthesis and excretion of 7-hydroxylated simple coumarins. *Journal of Experimental Botany* 52: 2227-2234.
- Shabana, Y. M., Müller-Stöver, D., Sauerborn, J. **2003**. Granular Pesta formulation of *Fusarium oxysporum* f.sp. orthoceras for biological control of sunflower broomrape: efficacy and shelf life. *Biological Control* 26: 189-201.
- Shi, B. X., Chen, G. H. , Zhang Z. J., Hao J. J., Jing L., Zhou, H. Y., Zhao, J. **2015**. First report of race composition and distribution of sunflower broomrape, *Orobancha cumana*, in China. *Plant Disease* 99: 291.
- Shindrova, P., Penchev, E. **2012**. Race composition and distribution of broomrape (*Orobancha cumana* Wallr.) in Bulgaria during 2007- 2011. *Helia* 57: 87-94.
- Shindrova, P. **2006**. Broomrape (*Orobancha cumana* Wallr.) in Bulgaria. Distribution and race composition. *Helia* 44: 111-120.
- Škorić, D., Păcureanu-Joița, M., Sava, E. **2010**. Sunflower breeding for resistance to broomrape (*Orobancha cumana* Wallr.). *Analele I.N.C.D.A. Fundulea* 78: 63-79.
- Škorić, D. **1988**. Sunflower breeding. *Journal Edible Oil Industry "Uljarstvo"* 25: 1-90.
- Škorić, D., **2012**. The genetics of sunflower. En: Škorić, D., Sakac, Z. (eds.), *Sunflower Genetics and Breeding*. Serbian Academy of Sciences and Arts, Novi Sad, Serbia, pp. 1-163.
- Sobel, J. M., Streisfeld, M. A. **2013**. Flower color as a model system for studies of plant evo-devo. *Frontiers Plant Science* 4: 321.
- Stassen J. H., Van den Ackerveken, G. **2011**. How do oomycete effectors interfere with plant life? *Current Opinion Plant Biology* 14: 407-414.
- Stewart, G. R., Press, M. C. **1990**. The physiology and biochemistry of parasitic angiosperms. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 41: 127-151.

- Stoyanov, K., Gevezova, M., Denev, I. **2012**. Identification of ISSR markers for studying the biodiversity of Bulgarian representatives of genus *Orobanche* subsection *Minores*. *Biotechnology Biotechnological Equipment* 26: 2743-2749.
- Sukno, S., Melero-Vara, J. M., Fernández-Martínez, J. M. **1999**. Inheritance of resistance to *Orobanche cernua* Loefl. in six sunflower lines. *Crop Science* 39: 674-678.
- Sukno, S. A. **1997**. Identificación y caracterización de la resistencia al jopo (*Orobanche cernua*) de girasol. Ph. D Thesis, University of Córdoba (UCO): Córdoba, Spain.
- Templeton, G. E., Smith, R. J., TeBeest, D. O. **1986**. Progress and potential of weed control with mycoherbicides. *Reviews Weed Science* 2: 1-14.
- Thorogood, C. J., Rumsey, F. J., Harris, S. A., Hiscock, S. J. **2008**. Host-driven divergence in the parasitic plant *Orobanche minor* Sm. (Orobanchaceae). *Molecular Ecology* 17: 4289-4303.
- Thorogood, C. J., Rumsey, F. J., Harris, S. A., Hiscock, S. J. **2009**. Gene flow between alien and native races of the holoparasitic angiosperm *Orobanche minor* (Orobanchaceae). *Plant Systematic Evolution* 282: 31-42.
- Timko, M.P., Scholes, J. D. **2013**. Host reaction to attack by root parasitic plants. En: D. M. Joel, J. Gressel, L. Musselman (eds.), *Parasitic Orobanchaceae - Parasitic Mechanisms and Control Strategies*. Springer, Heidelberg Berlin, Germany, pp. 21-23.
- Tolmachev, V. V. **1991**. Identification of broomrape races and genes of sunflower resistance to the Moldavian` race. En: Dragavcec, V. A. (ed.) *Plant growing, Genetics and Breeding of Industrial Crops. Collection of Scientific Works on Applied Botany, Genetics and Breeding*, Leningrad, Russia, pp. 92-101.
- Tomilov, A. A., Tomilova, N. B., Wroblewski, T. **2008**. Trans-specific gene silencing between host and parasitic plants. *Plant Journal* 56: 389-397.
- Toth, P., Lukas, J., Bouwmeester, H. **2013**. Broomrape pollinators in the light of floral volatiles. En: Scholes, J., Cameron, D., Yoneyama, K. (eds.), *12th World Congress on*

- Parasitic Plants*, July 15-20, 2013, Sheffield, United Kingdom. International Parasitic Plants Society: Sheffield, UK, pp. 56.
- Ueno, K., Furumoto, T., Umeda, S., Mizutani, M., Takikawa, H., Batchvarova, R., Sugimoto, Y. **2014**. Heliolactone, a non-sesquiterpene lactone germination stimulant for root parasitic weeds from sunflower. *Phytochemistry* 108: 122-128.
- Vaz Patto, M. C., Díaz-Ruiz, R., Satovic, Z., Román, B., Pujadas-Salvà, A. J., Rubiales, D. **2008**. Genetic diversity of Moroccan populations of *Orobanche foetida*: from wild parasitic plants to parasitic weeds. *Weed Research* 48: 179-186.
- Vaz Patto, M., Fernández-Aparicio, M., Satovic, Z., Rubiales, D. **2009**. Extent and pattern of genetic differentiation within and between European populations of *Phelipanche ramosa* revealed by amplified fragment length polymorphism analysis. *Weed Research* 49: 48-55.
- Velasco L, Goffman F.D., Pujadas-Salvà A.J. **2000**. Fatty acids and tocochromanols in seeds of *Orobanche*. *Phytochemistry* 54: 295-300.
- Velasco, L., Pérez-Vich, B., Jan, C.C., Fernández-Martínez, J.M. **2007**. Inheritance of resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) race F in a sunflower line derived from wild sunflower species. *Plant Breeding* 126: 67-71.
- Velasco, L., Pérez-Vich, B., Yassein, A. A. M., Jan, C. C., Fernández-Martínez, J. M. **2012**. Inheritance of resistance to sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in a interspecific cross between *Helianthus annuus* and *Helianthus debilis* subsp. *tardiflorus*. *Plant Breeding* 121: 220–221.
- Verkleij, J. A. C., Janssen, J., Pieterse, A. H. **1986**. A preliminary study on isoenzymic variation in *Orobanche crenata* and *Orobanche aegyptiaca* from Syria. En: ter Borg, S. J. (ed.), *Proceedings of a Workshop on the Biology and Control of Orobanche*. LH/VPO, Wageningen. The Netherlands, pp. 154-159.
- Verkleij, J. A. C., Koevoets, P., López-Granados, F., Geber, W. S., García-Torres, L., Pieterse, A. H. **1991**. Genetic variability in populations of *Orobanche crenata* from Spain. En: Ransom, J. K., Musselman, L. J., Worsham A. D., Parker C. (eds.), *Proceedings of the*

- 5th *Symposium on Parasitic Weeds*, Nairobi, Kenya, June 24-30, 1991. CIMMYT, Nairobi, Kenya pp. 462-469.
- Vrânceanu, A. V., Tudor, V. A., Stoenescu, F. M., Pirvu, N. **1980**. Virulence groups of *Orobanche cumana* Wallr., differential hosts and resistance sources and genes in sunflower. En: *Proceedings of the 9th International Sunflower Conference*; Torremolinos, Spain, July 8-13, 1980. International Sunflower Association, Paris, France, pp. 74-80.
- Vrânceanu, A.V., Pirvu, N., Stoenescu, F. M., Pacureanu, M. **1986**. Some aspects of the interaction *Helianthus annuus* L. / *Orobanche cumana* Wallr. and its implications in sunflower breeding. En: ter Borg, S. J. (ed.), *Proceedings of a Workshop on the Biology and Control of Orobanche*. LH/VPO, Wageningen. The Netherlands, pp. 181-188.
- Vrânceanu, A. V. **1977**. *El Girasol*. Mundi, Prensa: Madrid, Spain.
- Wallroth, K.F.W. **1825**. *Orobanches Generis*. Francofurti ad Moenum: Frederic Wilmans.
- Walters, D. **2010**. *Plant Defense: Warding off Attack by Pathogens, Herbivores and Parasitic Plants*. Wiley-Blackwell, UK.
- Wegmann, K., Von Elert, E., Harloff, H. J., Stadler, M. **1991**. Tolerance and resistance to *Orobanche*. En: Wegmann, K., Musselman L. J. (eds.), *Progress in Orobanche Research, Proceedings International Workshop on Orobanche Research*. Eberhard-Karls University, Tübingen, Germany, pp. 318-321
- Wegmann, K. **1986**. Biochemistry of osmoregulation and possible biochemical reasons of resistance against *Orobanche*. En: ter Borg, S. J. (ed.), *Proceedings of a Workshop on the Biology and Control of Orobanche*. LH/VPO, Wageningen. The Netherlands, pp. 113.
- Westwood, J. H., Roney, J. K., Khatibi, P. A., Stromberg, V. K. **2009**. RNA translocation between parasitic plants and their hosts. *Pest Management Science* 65: 533-539.
- Westwood, J. H., Fagg, C. M. **2004**. ISSR Characterization of *Orobanche minor* populations in the US. En: Joel, D.M., Bouwmeester, H., Delavault, P., Ejeta, G., Kanampiu, F., Press, M., Román, B., Timko, M.P., Verkleij, J.A.C., Westwood, J.H., Yoneyama, K., Zhou, W.J.

(eds.), *Proceedings of the 8th International Parasitic Weeds Symposium*. IPPS, Durban, South Africa, pp. 15.

Wheldale. **1916**. *The Anthocyanin Pigments of Plants*. Cambridge University Press, London.

Yoneyama, K., Xie, X., Kusumoto, D., Kisugi, T., Nomura, T., Sekimoto, H., Yokota, T., Yoneyama, K. **2011**. Characterization of strigolactones exuded by Asteraceae plants. *Plant Growth Regulation* 65: 495-504.

Yoshida, S., Maruyama, S., Nozaki, H. **2010**. Horizontal gene transfer by the parasitic plant *Striga hermonthica*. *Science* 328: 1128.

Zare, G., Dönmez, A. A. **2013**. Two new records of the Genus *Orobanche* (Orobanchaceae) from Turkey. *Turkish Journal of Botany* 37: 597-563.

Zeid, M., Madkour M., Koraiem, Y., Nawar, A., Soliman, M. Zaitoun, F. **1997**. Molecular studies on *Orobanche*. *Journal of Phytopathology* 141: 351-355.

Publicaciones



PUBLICACIONES

Cada artículo está acompañado por su factor de impacto y cuartil del Journal Citation Reports (SCI y/o SSCI) o de las bases de datos de referencia del área en el que se encuentran las publicaciones presentadas.

ARTÍCULO 1: Rodríguez-Ojeda, M. I., Pérez-Vich, B., Alonso, L.C., Fernández-Escobar, J. (2010)
 The influence of flowering plant isolation on seed production and seed quality in *Orobanche cumana*.
Weed Research 50: 515-518.

FACTOR DE IMPACTO EN 2010

Cites in 2010 to items published in: 2009= 114 Number of items published in: 2009= 80

2008= 118

2008= 63

Sum: 232

Sum: 143

Calculation: Cites to recent items 232 = **1.622**

Number of recent items 143

For **2010**, the journal **Weed Research** has an Impact Factor of **1.622**
 This table shows the ranking of this journal in its subject categories based on Impact Factor.

Category Name	Total Journals in Category	Journal Rank in Category	Quartile in Category
AGRONOMY	75	20	Q2
PLANT SCIENCES	188	72	Q2

2010 JCR Science Edition

ARTÍCULO 2: Rodríguez-Ojeda, M. I., Velasco, L., Alonso, L. C., Fernández-Escobar, J., Pérez-Vich, B. (2011) Inheritance of the Unpigmented Plant Trait in *Orobanche cumana*. *Weed Research* 51: 151–156.

FACTOR DE IMPACTO EN 2011

Cites in 2011 to items published in: 2010 = 104 Number of items published in: 2010 = 65

2009 = 175

2009 = 80

Sum: 279

Sum: 145

Calculation: <u>Cites to recent items</u>	<u>279</u>	=	1.924
Number of recent items	145		

For **2011**, the journal **Weed Research** has an Impact Factor of **1.924**.

This table shows the ranking of this journal in its subject categories based on Impact Factor.

Category Name	Total Journals in Category	Journal Rank in Category	Quartile in Category
AGRONOMY	80	17	Q1
PLANT SCIENCES	190	63	Q2

2011 JCR Science Edition

ARTÍCULO 3: Rodríguez-Ojeda, M. I., Fernández-Martínez, J. M., Velasco, L., Pérez-Vich, B. (2013) Extent of cross fertilization in *Orobancha cumana* Wallr. *Biologia Plantarum* 57: 559-562.

FACTOR DE IMPACTO EN 2013

Cites in 2013 to items published in: 2012 = 191 Number of items published in: 2012 = 124

2011 = 237

2011 = 122

Sum: 428

Sum: 246

Calculation: <u>Cites to recent items</u>	<u>428</u>	= 1.740
Number of recent items	246	

For 2013, the journal **Biologia Plantarum** has an Impact Factor of **1.740**

This table shows the ranking of this journal in its subject categories based on Impact Factor.

Category Name	Total Journals in Category	Journal Rank in Category	Quartile in Category
PLANT SCIENCES	199	73	Q2

2013 JCR Science Edition

ARTÍCULO 4: Rodríguez-Ojeda, M. I., Pineda-Martos, R., Alonso, L. C., Fernández-Escobar, J., Fernández-Martínez, J. M., Pérez-Vich, B., Velasco, L. (2013) A dominant avirulence gene in *Orobanche cumana* triggers *Or5* resistance in sunflower. *Weed Research* 53: 322-327.

FACTOR DE IMPACTO EN 2013

Cites in 2013 to items published in: 2012 = 73	Number of items published in: 2012 = 62
2011 = 189	2011 = 68
Sum: 262	Sum: 130

Calculation: <u>Cites to recent items</u>	<u>262</u>	=	2.015
Number of recent items	130		

For **2013**, the journal **Weed Research** has an Impact Factor of **2.015**
 This table shows the ranking of this journal in its subject categories based on Impact Factor.

Category Name	Total Journals in Category	Journal Rank in Category	Quartile in Category
AGRONOMY	79	18	Q1
PLANT SCIENCES	199	67	Q2

2013 JCR Science Edition



The influence of flowering plant isolation on seed production and seed quality in *Orobanche cumana*

M I RODRÍGUEZ-OJEDA*, B PÉREZ-VICH†, L C ALONSO* & J FERNÁNDEZ-ESCOBAR*

*Koipesol Semillas S.A., Sevilla, Spain, and †Institute for Sustainable Agriculture (CSIC), Córdoba, Spain

Received 6 December 2009

Revised version accepted 8 July 2010

Summary

Orobanche cumana is an important parasitic weed of sunflower. The objective of this research was to study seed production and seed quality in *O. cumana* using three different bag types to isolate flowering plants. Maximum seed production was obtained on unbagged plants (91.2 mg per plant), followed by micro-perforated transparent plastic bags (MPB) (84.2 mg per plant), white paper (46.5 mg per plant) and brown paper bags (37.5 mg per plant). Seed quality, measured as germination percentage and infectivity, did not differ between unbagged plants and plants isolated with MPB, whereas it was considerably reduced in plants isolated with paper

bags. A second experiment studied bagging effect on controlled hybridisation. When using white paper bags and MPB, 45.2% and 60.1% of the emasculated and hand-pollinated flowers were fertilised, respectively, compared with 88.6% in unbagged plants. The data suggested that *O. cumana* plants produce seed under isolation, even though the bag type affects seed production and quality. These results will be useful for basic and applied research demanding *O. cumana* seed production under isolated conditions.

Keywords: bag type, bagging, broomrape, hybridisation, infectivity, germination, plant isolation, self-pollination.

RODRÍGUEZ-OJEDA MI, PÉREZ-VICH B, ALONSO LC & FERNÁNDEZ-ESCOBAR J (2010). The influence of flowering plant isolation on seed production and seed quality in *Orobanche cumana*. *Weed Research* **50**, 515–518.

Introduction

Orobanche cumana Wallr. is a holoparasitic angiosperm whose seeds germinate in response to chemical signals exuded from the roots of the host. The emerging radicle adheres to the roots of the host forming an appressorium, followed by haustoria production, which establishes physiological connections with the host xylem and phloem (Westwood, 2000). As a result, *O. cumana* plants deplete the infected sunflower plant of water and nutrients, which reduces crop yield (Fernández-Martínez *et al.*, 2008).

Studies on sunflower resistance to *O. cumana* have been concentrated so far on understanding the mecha-

nisms underlying resistance in the host plant, but little is known on the parasite side. The study of important aspects, such as the breeding systems or the number of genes associated with changes of virulence and their role, will require techniques such as bagging to force inbreeding or to produce F₁ hybrids and subsequent segregating populations. However, how bagging and self-pollination conditions will affect seed production and seed quality in *O. cumana* has not been studied.

Seed quality mainly refers to the ability of the seed to germinate vigorously. Seed germination and seed vigour are closely related, in such a way that loss of viability is usually preceded by loss of vigour (Basu, 1995). The environmental conditions under which the plant grows

will affect seed development and influence seed quality. The use of bags to isolate the inflorescences for breeding purposes and also the bag type, have been reported to affect seed quality in several crops (Pickering, 1982). However, the response of *O. cumana* plants to bagging has not been studied. Accordingly, the objectives of this research were to study seed production and seed quality in *O. cumana* under several isolation conditions, using different bag types and to evaluate any effect on controlled hybridisation.

Materials and methods

Plant material and general design of the experiments

An experiment was conducted in 2005 in a sunflower field with high natural infestation of *O. cumana*, located at El Coronil, South-western Spain (37°05'N, 5°38'W). Soil texture was loamy-clay with a pH of 7.7. The *O. cumana* population was classified as race E, based on its reaction to differential lines of sunflower (Vrănceanu *et al.*, 1980). Sixty non-flowering *O. cumana* plants 6–12 cm tall were chosen for isolation with three different types of bags: brown paper bags 26 × 7 × 49.5 cm (width × gusset × length), white paper bags 25 × 8.5 × 46 cm, and micro-perforated plastic bags (MPB) 61 × 8 cm and 15 µm thickness. For the MPB, two bags per *O. cumana* stalk were used based on previous studies in olive trees (Del Río & Caballero, 1999). Paper bags were purchased in local markets. MPB were made of SM570Y film (Cryovac®; Sealed Air Corporation, Elmwood Park, NJ, USA). The three bag types used in the present study are identical to those used by Del Río and Caballero (1999) in olive trees. The authors reported light penetration and temperature changes inside the bags for the three bag types. Twenty *O. cumana* plants were bagged with each type of bag, whereas 20 unbagged plants were used as a control following a completely randomised design. At maturity, *O. cumana* plants were harvested and the seeds weighed. The seeds of plants from each bagging treatment were bulked for studies on viability, measured as the rate of seed germination and infective ability.

A second experiment was conducted within the same field to evaluate fruit set under controlled hybridisation, as described below, using white paper bags and MPB. Unbagged plants were used as a control. Each bagging treatment comprised 150 *O. cumana* plants. The flowers of 50 plants were emasculated and hand pollinated as described below, the flowers of 50 plants were only emasculated and not pollinated, whereas the flowers of the remaining 50 plants were not manipulated and used as controls. The experiment was laid out in a completely randomised design.

Flower emasculatation and controlled cross-pollination

The corolla was removed with forceps 2 days before flower opening and the four stamens were also removed (Fig. 1). Absence of pollen at the time of stamen removal was checked by observation under a stereoscopic microscope at ×30 magnification. Emasculatation was performed during several consecutive days, until most of the flowers were emasculated. The upper part of the inflorescence was then removed. In bagged plants, the bag was removed immediately before emasculatation and placed back immediately after. For controlled cross-pollination, the stamens from flowers opened within the same day were picked up with the forceps and rubbed into the stigma of the emasculated flowers. At maturity, the number of fertilised and non-fertilised flowers per *O. cumana* plant within each treatment was determined.

Test of seed germination

Seeds of *O. cumana* seeds weighing 25 g (equivalent to around 5000 seeds) from each bagging treatment were uniformly scattered on the upper half of a filter paper sheet of 400 g m⁻² and 51.5 × 42 cm, previously moistened with a solution 0.2% (V/V) of the fungicide Tiram in water. The filter paper sheet was then folded and rolled, forming a two-layer cylinder 21-cm long containing the *O. cumana* seeds. The cylinder was then covered with plastic to maintain humidity. Three replications were used per bag treatment. Seeds from the sunflower hybrid CLIP were surface sterilised by immersion for 3 min in a 2% aqueous solution of calcium hypochlorite. The seeds were thoroughly rinsed with distilled water and then germinated on moistened filter paper in Petri dishes at 20°C in the dark. One germinated sunflower seed was placed between the two filter paper layers of the cylinder, at *c.* 2 cm from the top. The cylinder was then placed vertically on a sterile



Fig. 1 Intact (left) vs. emasculated (right) *Orobancha cumana* plants.

polypropylene tray containing the culture medium (Labin 9-18-27, Macasa, Igualada, Spain) and maintained in a growth chamber at 25°C with a 16-h photoperiod for 40 days. After this time, the cylinder was unrolled and the two layers of filter paper were separated. Twenty circular areas of 3.5 cm diameter were marked in the zones with high root density and the seeds within each area were observed under a stereoscopic microscope at $\times 30$ magnification to determine germination percentage.

Test of infectivity

Seeds of the sunflower hybrid CLIP were planted in small pots $5.5 \times 6 \times 16$ cm containing a mixture of sand and peat (1:1, *V/V*). The soil mixture (*c.* 330 cm³) was carefully mixed with 25 mg of *O. cumana* seeds from each bagging treatment, to obtain a homogeneously infested substrate. The plants were maintained in a growth chamber for 45 days at 24°C/20°C (day/night) with a 16-h photoperiod for incubation. After this time, the plants were uprooted and the roots were washed in tap water to remove the soil. The number of infected plants (incidence) and the number of *O. cumana* attachments per infected sunflower plant (degree of attack) were counted.

Statistical analyses

Comparisons of means were performed by using one-way analysis of variance with *post hoc* analysis based on

Duncan's multiple range test (SPSS Statistics 17.0). Percentage data were arcsine of square root transformed except for the cases in which all observed percentage data ranged between 0 and 20% or between 80 and 100%, where square root transformations were used (Steel & Torrie, 1980).

Results

All the *O. cumana* plants bagged with white paper and MPB showed a normal erect growth pattern. However, seven of the 20 *O. cumana* plants bagged with brown paper bags displayed a twisted growth pattern. The bag type significantly influenced seed production per plant (Table 1).

The use of MPB did not affect significantly the viability of the seeds, which showed 90.8% germination as compared with 94.0% in seeds from unbagged plants (Table 1). The use of paper bags produced a similar reduction in germination ability, which was 70.4% in seeds from plants isolated with white bags and 66.5% in seeds from plants isolated with brown bags. Inoculation of sunflower plants with seeds from all bag types resulted in 100% incidence, but an effect of the bag type on the degree of attack was observed (Table 1).

The influence of the bag type on seed production under controlled hybridisation was studied in a second experiment. The results revealed that both white paper and MPB provided complete isolation of the plants, as all the flowers that were emasculated but not hand pollinated remained unfertilised (Table 2). In contrast,

Table 1 Seed production per plant, germination percentage of the seeds and degree of attack in an *Orobanche cumana* population subjected to bagging with three different types of bags as compared to the unbagged check. Data are presented as mean \pm SEM

Bag type	Seed production* (mg)	Germination (%)	Incidence (%)	Degree of attack
Brown paper	37.5 \pm 1.4a	66.5 \pm 2.0a	100	10.7 \pm 1.0a
White paper	46.5 \pm 0.9a	70.4 \pm 1.9a	100	11.5 \pm 0.9a
Micro-perforated plastic	84.2 \pm 1.0b	90.8 \pm 1.6b	100	27.9 \pm 1.5b
Unbagged	91.2 \pm 1.2b	94.0 \pm 1.0b	100	28.1 \pm 1.2b

Mean values within each column followed by the same letter are not significantly different ($P = 0.05$).

Degree of attack: number of *O. cumana* stalks per infected sunflower plant.

*Average of 20 *O. cumana* plants per bagging treatment.

Table 2 Percentage of fertilised *Orobanche cumana* ovaries in function of several flower manipulation and bagging treatments. Data are presented as mean \pm SEM

Bag type	Flower treatment		
	Emasculated, not pollinated	Emasculated, hand pollinated	Non-emasculated (check)
White paper	0a	45.2 \pm 5.9a	80.7 \pm 2.7a
Micro-perforated	0a	60.1 \pm 5.9b	99.5 \pm 0.3b
Non-isolated (check)	6.5 \pm 2.8b	88.6 \pm 3.5c	99.7 \pm 0.2b

Mean values within each column followed by the same letter are not significantly different ($P = 0.05$).

6.5% of the emasculated flowers from unbagged plants were naturally fertilised. When the stigma of emasculated flowers were hand pollinated, 45.2% of the flowers from plants bagged with white paper bags were fertilised, compared with 60.1% in plants bagged with MPB and 88.6% in unbagged plants (Table 2).

Discussion

Most *Orobanche* species are pollinated by insects, but some species are self-pollinating (Kreutz, 1995). In the case of *O. cumana*, there are no specific studies on its mode of pollination. Based on molecular studies on *O. cumana* populations, Gagne *et al.* (1998) concluded that *O. cumana* is a self-pollinated species. The results of the present research indicated that *O. cumana* is self-compatible, but greater seed production occurs in unbagged flowers, suggesting that cross pollination might improve seed set.

The bag type used to isolate *O. cumana* plants clearly determined seed production. The best results were obtained using transparent MPB, which allow both good aeration and illumination of the plants. A greater seed production by plants isolated with MPB as compared with those bagged with paper bags also gave much better seed quality, measured as a function of viability and infectivity. Aeration has been suggested as a key factor for the optimisation of seed quality, when fertilisation and seed maturation occur under bagging conditions (Kameswara Rao *et al.*, 2002). Experiments conducted in olive trees concluded that the temperature into MPB is similar to the environmental one and lower than in paper bags, whereas light intensity was reduced by 84% inside brown paper bags, 62% in white paper bags and only 12% in MPB (Del Río & Caballero, 1999). Accordingly, a combination of better aeration and associated reduced temperature, together with better light penetration, may result in greater seed production and better seed quality in *O. cumana* plants bagged with MPB.

Basic and applied genetic studies in *O. cumana* will require the use of inbreeding and hybridisation techniques. The results of this study suggested that *O. cumana* plants tolerate seed production under isolation, both under self-pollination as well as in controlled

hybridisation. Bagging can be also used to collect *O. cumana* seeds of a given plant or population without pollen contamination from other genotypes. Particular attention should be paid to the bag type used for plant isolation, as the present study showed this is crucial for ensuring good seed production and quality.

Acknowledgement

The research was partly funded by Fundación Ramón Areces, Madrid, Spain.

References

- BASU RN (1995) Seed viability. In: *Seed Quality: Basic Mechanisms and Agricultural Implications* (AS BASRA ed), 1–44. The Haworth Press, New York, USA.
- DEL RÍO C & CABALLERO JM (1999) A new bag for olive pollination studies. *Acta Horticulturae* **474**, 233–236.
- FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ JM, DOMÍNGUEZ J, PÉREZ-VICH B & VELASCO L (2008) Update on breeding for resistance to sunflower broomrape. *Helia* **31**, 73–84.
- GAGNE G, ROECKEL-DREVET P, GREZES-BESSET B *et al.* (1998) Study of the variability and evolution of *Orobanche cumana* populations infesting sunflower in different European countries. *Theoretical and Applied Genetics* **96**, 1216–1222.
- KAMESWARA RAO N, BRAMEL PJ, REDDY KN *et al.* (2002) Optimizing seed quality during germplasm regeneration in pearl millet. *Genetic Resources and Crop Evolution* **49**, 153–157.
- KREUTZ CAJ (1995) *Orobanche*: the European broomrape species. I. Central and Northern Europe. Stichting Natuurpublicaties Limburg, Maastricht, the Netherlands.
- PICKERING RA (1982) The effect of pollination bag type on seed quality and size in *Hordeum* inter- and intraspecific hybridization. *Euphytica* **31**, 439–449.
- STEEL RGD & TORRIE JH (1980) *Principles and Procedures of Statistics: a Biometrical Approach*. McGraw-Hill, New York, USA.
- VRÂNCEANU AV, TUDOR VA, STOENESCU FM & PIRVU N (1980). Virulence groups of *Orobanche cumana* Wallr. differential hosts and resistance sources and genes in sunflower. In: *Proceedings of the 9th International Sunflower Conference*. 74–80. International Sunflower Association, Paris.
- WESTWOOD JH (2000) Characterization of the *Orobanche–Arabidopsis* system for studying parasite–host interactions. *Weed Science* **48**, 742–748.



Inheritance of the unpigmented plant trait in *Orobanche cumana*

M I RODRÍGUEZ-OJEDA*, L VELASCO†, L C ALONSO*,
J FERNÁNDEZ-ESCOBAR* & B PÉREZ-VICH†

*Koipesol Semillas S.A. Avda. San Francisco Javier, Sevilla, Spain, and †Institute for Sustainable Agriculture (CSIC), Alameda del Obispo s/n, Córdoba, Spain

Received 24 March 2010

Revised version accepted 8 September 2010

Summary

Unpigmented plants characterised by yellow stems and white flowers have been observed in several *Orobanche* spp. The objective of this research was to study the inheritance of the unpigmented plant trait in *Orobanche cumana*. Plants of the unpigmented line EK-A1 that had been self-pollinated for three generations (S_3) were crossed with plants of the wild-type line EK-12 using hand emasculation and pollination. F_1 plants showed an intermediate phenotype, characterised by a greenish stem compared with a yellow stem in EK-A1 plants and bluish-violet stem in EK-12 plants. F_2 plants segregated in a 1:2:1 (bluish-violet: greenish: yellow) ratio, suggest-

ing that plant pigmentation in *O. cumana* is controlled by a partially dominant allele at a single locus. Monogenic inheritance was confirmed in the F_3 plant generation, which also revealed that the lack of pigmentation has no effect on *O. cumana* parasitism. This study demonstrated for the first time the feasibility of using hybridisation techniques for developing segregating populations in this species. Because of its simple mode of inheritance, the unpigmented plant trait may have a particular use as a morphological marker in basic and applied studies on *O. cumana*.

Keywords: hybridisation, parasitism, segregating populations, sunflower broomrape, unpigmented plants.

RODRÍGUEZ-OJEDA MI, VELASCO L, ALONSO LC, FERNÁNDEZ-ESCOBAR J & PÉREZ-VICH B (2011). Inheritance of the unpigmented plant trait in *Orobanche cumana*. *Weed Research* **51**, 151–156.

Introduction

Orobanche cumana Wallr. (sunflower broomrape) is a weedy parasitic angiosperm that represents a serious constraint on the growth of cultivated sunflower in many countries of Europe and the former USSR (Fernández-Martínez *et al.*, 2008). The species was first described by Wallroth (1825) on plants collected in desert areas of south-western Asia and south-eastern Europe. In the wild, *O. cumana* mainly parasitises *Artemisia* spp. (Novopokrovsky & Tzvelev, 1958), but, shortly after the expansion of sunflower cultivation in Russia at the end of the 19th century, *O. cumana* started attacking this crop (Vrânceanu *et al.*, 1986).

The status of *O. cumana* as a separate species has been the subject of extended debate. Even though some taxonomists considered this species as an infraspecific taxon of *O. cernua* (Beck-Mannagetta, 1930; Rechinger, 1943; Greuter *et al.*, 1989), there is nowadays a wide base of evidence supporting its classification as a separate species (Katzir *et al.*, 1996; Paran *et al.*, 1997; Pujadas-Salvà & Velasco, 2000; Benharrat *et al.*, 2002; Román *et al.*, 2003). *Orobanche cumana* plants are up to 65 cm tall, with slender stems slightly thickened at the base (Pujadas-Salvà & Velasco, 2000). Stem colour is variable, and it has been reported to be whitish (Pujadas-Salvà & Velasco, 2000), yellowish or brownish (Novopokrovsky & Tzvelev, 1958), and bluish-violet,

Correspondence: Begoña Pérez-Vich, Institute for Sustainable Agriculture (CSIC), Alameda del Obispo s/n, 14004 Córdoba, Spain.
Tel: (+34) 957 499281; Fax: (+34) 957 499252; E-mail: bperez@ias.csic.es

yellow or reddish (Kreutz, 1995). The corolla is white at the base and bluish to pale-violet in the limb (Kreutz, 1995).

Stem colour in *Orobanche* spp. is mainly determined by the accumulation of anthocyanins, which are more conspicuous because of the absence of chlorophyll (Wheldale, 1916). Anthocyanins also confer red colour to the stem of many chlorophyll-bearing plants. The number of genes involved in stem colour and their interaction depends on the species, with alleles for red stems being in most cases dominant over alleles for green stems. One of the most detailed genetic studies was conducted in tomato (*Solanum lycopersicum* L.), where 12 independent genes were reported to be involved in anthocyanin accumulation in different plant organs. Recessive alleles at four loci (*Af*, *Ah*, *Aw* and *Bs*) independently determined absence of anthocyanin pigmentation in the whole plant, whereas recessive alleles at locus *Ag* conditioned absence of anthocyanin pigmentation in the stems, but not in other plant organs, such as leaves (Wettstein-Knowles, 1968). In sunflower, anthocyanin colour of the stem is controlled by dominant alleles at three loci *T₁*, *T₂* and *Ha₄* (Skaloud & Kovacik, 1978); though, monogenic inheritance has also been reported (Stoenescu, 1974). The combination of two genes with dominant–recessive epistasis conditioning anthocyanin pigmentation has been reported in castor (*Ricinus communis* L.) (Moshkin & Dvoryadkina, 1986) and cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) (Ishiyaku & Singh, 2004), whereas a combination of one dominant and two recessive genes has been reported in peanut (*Arachis hypogaea* L.) (Essomba *et al.*, 1991). Dominant, monogenic inheritance of red stem pigmentation has been reported in several species, such as pigeonpea (*Cajanus cajan* [L.] Millsp.) (Narkhede *et al.*, 1980), winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* [L.] DC) (Erksine & Khan, 1977), *Medicago polymorpha* L. (De Haan & Barnes, 1998), *Brassica rapa* L. (Burdzinski & Wendell, 2007) and *Exacum affine* Balf.f. ex Regel; though, in the latter species two additional modifying genes that intensify red stem colour were also identified (Wolf & Craig, 1988).

Unpigmented variants, with yellow stem and white corolla, have been observed in many populations of *Orobanche* spp. Except for *O. lutea* Baumg., where the entire plant is usually yellow, unpigmented yellow variants are rather infrequent. However, they have been reported in *Orobanche alsatica* Kirschl., *Orobanche rapum-genistae* Thuill., *Orobanche teucri* Holandre, *Orobanche hederiae* Duby, *Orobanche elatior* Sutton and *Orobanche crenata* Forsk. (Rumsey & Jury, 1991; Kreutz, 1995). In some cases, the yellow variants have been separated as a subspecific taxon, as for example *O. rapum-genistae* Thuill. var. *typica* G. Beck forma

flavescens Durand (Beck-Mannagetta, 1930) or *Orobanche minor* Sm. var. *flava* E. Regel (Rumsey & Jury, 1991).

Unpigmented yellow plants of *O. cumana* were first identified within the population BS-78 collected in Cuenca (Spain) in 1978 (González-Torres *et al.*, 1982). The authors reported no differences in parasitisation associated with stem colour, in the evaluation of population BS-78 on nine sunflower lines and cultivars. In the course of a resistance evaluation test carried out in the glasshouse, we identified a spontaneous unpigmented mutant plant of *O. cumana* characterised by bright yellow stem and completely white corolla within population EK-36, collected in Cuenca, Spain, and classified as race E. Because of the potential interest of this trait for future studies on *O. cumana* biology, the unpigmented plant was isolated and multiplied. The objective of this research was to study the inheritance of the unpigmented plant trait in *O. cumana*.

Materials and methods

Mutant isolation

A spontaneous unpigmented mutant plant of *O. cumana* was isolated before flowering with two microperforated plastic bags 61 × 8 cm made up of Cryovac[®] SM570Y film (Sealed Air Corporation, Elmwood Park, NJ, USA). First generation self-pollinated seeds (*S*₁) were collected from the unpigmented plant at maturity and stored at 4°C. *S*₁ seeds were used to inoculate eight plants of the susceptible sunflower cultivar DMM, as described later, for confirmation of the heritability of the trait, as well as for seed multiplication. All the plants were bagged in this and subsequent generations, as described earlier. *S*₂ seeds from unpigmented plants were bulked and used for a new generation of trait evaluation and seed multiplication, this time on 48 DMM sunflower plants. All the *S*₃ seeds harvested on unpigmented plants were bulked and the line was named EK-A1.

Genetic study

The study of the inheritance of the unpigmented plant trait in *O. cumana* was conducted using *S*₃ seeds from the lines EK-A1 and EK-12. EK-12 is an *S*_{2;3} line developed by inbreeding a population collected in Écija, Spain, on the sunflower cultivar Sirio. One hundred and fifty plants of the susceptible sunflower cultivar DMM were inoculated with *S*₃ seeds of *O. cumana* line EK-A1, whereas another 150 plants of DMM were inoculated with seeds of line EK-12. After emergence, 20 plants of EK-A1 and 20 plants of EK-12 were bagged before flowering. The flowers of 10 plants of each line were emasculated and hand pollinated with fresh pollen of the

other line, as described later. F_1 seeds collected on each pollen receptor plant were used to inoculate three plants of the sunflower cultivar DMM. F_1 plants were bagged to enforce self-fertilisation. Only 16 F_1 plants produced enough quantity of F_2 seeds for evaluation of the segregation of the trait. F_2 seeds were used to inoculate between 8 and 16 plants of the sunflower cultivar DMM, depending on the amount of seed produced by each F_1 plant. Individual F_2 plants were bagged to produce F_3 seeds. F_3 seeds from 120 F_2 plants belonging to four F_1 families were used to study plant colour segregation at the F_3 plant level. For this, F_3 seed from each individual F_2 plant was used to inoculate three plants of the sunflower cultivar DMM. Stem colour was visually scored at each F_1 , F_2 and F_3 plant generation. In the F_2 generation, plant stems were visually scored as yellow (unpigmented), bluish-violet (fully pigmented) and greenish (intermediate pigmented). In the F_3 generation, plant stems were visually scored as unpigmented (yellow) and pigmented (bluish-violet and greenish), because of the large number of *O. cumana* plants in some pots that made it difficult to distinguish greenish from bluish-violet plants.

Flower emasculation and controlled cross-pollination

The corolla of flowers from bagged plants was removed with a forceps 2 days before flower opening, and the four stamens were also removed. For controlled cross-pollination, the stamens from flowers opened within the same day were picked up with the forceps and rubbed onto the stigma of the emasculated flowers. Pollination on the same flower was repeated for two additional days. As in all cases, the plants were bagged, the bag was removed immediately before emasculation and placed back immediately after pollination.

Sunflower inoculation and cultivation conditions

Small pots $5.5 \times 6 \times 16$ cm were filled with a mixture of sand and peat (1:1 by wt). The soil mixture (approximately 330 cm^3) was carefully mixed with 25 mg of *O. cumana* seed (equivalent to around 5000 seeds) to obtain a homogeneously infested substrate. Sunflower seeds of the cultivar DMM were germinated on moistened filter paper in Petri dishes and 2-day-old seedlings were planted in the pots. The plants were maintained in a growth chamber for 21 days at $23^\circ\text{C}/20^\circ\text{C}$ (day/night) with a 16-h photoperiod for incubation. After this time, the plants were transplanted to pots containing 3 L of a fertilised (Osmocote, 14:14:14, 3/4 months, 2 g L^{-1} medium), uninfested sand-silt-peat (2:1:1 by wt) soil mixture and maintained in a cage enclosure under open-air conditions without artificial illumination, covered

with a polyethylene mesh 2.5×2.5 cm for bird protection. Environmental conditions within the cage enclosure did not differ from open-air conditions. The plants were grown in the spring–summer season, from mid-March to mid-August. They were watered as needed, but were not further fertilised.

Statistical analysis

The mode of inheritance was assessed by the chi-square goodness of fit between expected and observed phenotypic ratios for stem colour, as described by Steel and Torrie (1980). Segregation for stem colour was adjusted to a 1:2:1 (unpigmented:intermediate pigmented:fully pigmented) ratio in the F_2 generation and to a 1:3 (unpigmented:pigmented) ratio in the F_3 generation of F_2 plants classified as intermediate. A test for heterogeneity of the data of F_2 and F_3 populations was carried out. The data of different populations were pooled for a combined chi-square analysis only in the case that the heterogeneity chi-square was not statistically significant ($P < 0.05$) (Sánchez-Monge & Jouve, 1989).

Results

Mutant isolation

A single unpigmented *O. cumana* plant was identified in a pot experiment aimed at evaluating resistance to *O. cumana* population EK-36 in sunflower breeding lines. The unpigmented plant had a yellow stem and white corolla, compared with a bluish-violet stem and bluish to pale-violet corolla in the other plants of population EK-36 (Fig. 1). The plant was self-fertile and produced S_1 seeds under isolation. All the S_1 plants obtained by inoculating sunflower plants with S_1 seeds



Fig. 1 S_3 unpigmented plants isolated from sunflower broomrape population EK-36 (right) and wild-type plants of the same population (left).



Fig. 2 Sunflower broomrape plants of the lines EK-12 (left), EK-A1 (right) and the F₁ between them (centre).

reproduced the unpigmented plant phenotype, indicating homozygosity of the gene(s) underlying the trait.

Inheritance of the unpigmented plant trait

Ten F₁ populations from the cross EK-A1 × EK-12 and 10 F₁ populations from the reciprocal cross were evaluated, resulting in 126 and 166 F₁ plants, respectively. In all cases, F₁ plants showed an intermediate phenotype characterised by a greenish stem, compared with a yellow stem in EK-A1 plants and a bluish-violet stem in EK-12 plants (Fig. 2). No apparent differences between F₁ plants from reciprocal crosses were identified, suggesting that the trait is nuclear and not maternally inherited. F₂ plants segregated into bluish-violet, greenish and yellow stem colour in the 16 F₂ populations evaluated, which fit a 1:2:1 (bluish-violet: greenish: yellow) ratio (Table 1). This suggested that plant

Table 1 Segregation for stem colour in 16 F₂ populations (F₂ plants evaluated) derived from the cross between sunflower broomrape lines EK-A1 (unpigmented) and EK-12 (wild type)

F ₂ family	Individuals with phenotype			Adjustment to 1:2:1	
	Bluish-violet	Greenish	Yellow	χ^2	<i>P</i>
F2-1	35	78	25	3.80	0.15
F2-2	45	103	47	0.66	0.72
F2-3	25	71	21	5.62	0.06
F2-4	39	82	33	1.12	0.57
F2-5	9	17	15	2.95	0.23
F2-6	11	25	16	1.04	0.59
F2-7	8	36	11	5.58	0.06
F2-8	17	24	8	3.33	0.19
F2-9	27	42	23	1.04	0.59
F2-10	10	17	6	1.00	0.61
F2-11	7	22	18	5.34	0.07
F2-12	11	31	20	2.61	0.27
F2-13	11	29	9	0.95	0.62
F2-14	15	21	14	1.32	0.52
F2-15	15	29	16	0.10	0.95
F2-16	8	16	8	0.00	1.00
Pooled data	293	643	290	2.95	0.23
Heterogeneity (df = 15)			33.51	0.35	

pigmentation in *O. cumana* is controlled by partially dominant alleles at a single locus, which we have named *P_g*.

The progenies of 120 F₂ plants from four F₁ populations were used to inoculate sunflower plants to confirm homozygosity of the parental classes. The progenies of 30 bluish-violet-stemmed F₂ plants produced 1146 bluish-violet F₃ plants and no plants with other stem colour, averaging 38.2 ± 25.3 plants per F_{2:3} family. The progenies of 21 yellow-stemmed F₂ plants produced 955 yellow F₃ plants and no plants with other stem colour, which averaged 45.5 ± 33.7 plants per F_{2:3} family. The average number of emerged plants per F_{2:3} family was not significantly different ($t = 0.88$, $P = 0.38$) between families derived from bluish-violet-stemmed F₂ plants and yellow-stemmed F₂ plants, suggesting that the unpigmented plant trait has no effect on parasitism. The progenies of 69 greenish-stemmed F₂ plants were pooled (heterogeneity $\chi^2 = 79.29$, $P = 0.16$) and they produced 2037 pigmented (bluish-violet and greenish) plants and 708 unpigmented (yellow) plants, which did not differ significantly ($\chi^2 = 0.92$, $P = 0.34$) from a 3:1 segregation ratio. This confirmed the segregation of alleles at a single locus. According to this monogenic mode of inheritance, expected genotypes are *P_gP_g* for plants with bluish-violet stems, *P_gp_g* for plants with greenish stems and *p_gp_g* for plants with yellow stems.

Discussion

Unpigmented plants are rarely observed in populations of different *Orobanch* spp. (Kreutz, 1995; Rumsey, 2007), including *O. cumana* (González-Torres *et al.*, 1982), and no attempts to study the inheritance of the trait have been made thus far. Rumsey (2007) hypothesised that *Orobanch* plants lacking pigmentation might be the result of a single-gene mutation. The results of the present research demonstrated that the unpigmented plant trait in *O. cumana* is caused by partially recessive alleles at a single locus. A similar monogenic and dominant mode of inheritance of anthocyanin pigmentation has been reported in several chlorophyll-bearing species, such as tomato (Wettstein-Knowles, 1968),

pigeonpea (Narkhede *et al.*, 1980), winged bean (Erksine & Khan, 1977), *M. polymorpha* (De Haan & Barnes, 1998), *Brassica rapa* (Burdzinski & Wendell, 2007), *Exacum affine* (Wolf & Craig, 1988) and some sunflower genotypes (Stoenescu, 1974). More complex inheritance patterns have been found in other species, such as castor (Moshkin & Dvoryadkina, 1986), cowpea (Ishiyaku & Singh, 2004), peanut (Essomba *et al.*, 1991) and some sunflower genotypes (Skaloud & Kovacic, 1978).

Orobanche spp. are often highly variable with regard to size, pubescence and colouration (Rumsey & Jury, 1991). There are several examples of *Orobanche* spp. variants lacking anthocyanin (Kreutz, 1995; Rumsey, 2007), and the trait has been used in intraspecific classifications (Beck-Mannagetta, 1930). The results of the present study indicate that the absence of anthocyanin pigmentation in *O. cumana* is the result of a single-gene mutation and that such a mutation has no effect on parasitism. Because of the simple genetic basis of the trait, care should be taken not to rely on a single character such as plant colour in taxonomic classifications.

The results obtained from experiments of sunflower plants inoculated with F₃ seeds from homozygous P_gP_g (pigmented) and p_gp_g (unpigmented) F_{2:3} families suggested that the lack of pigmentation of *O. cumana* plants has no effect on parasitism, which is in agreement with previous observations of González-Torres *et al.* (1982).

The genus *Orobanche* encompasses a large number of species of holoparasitic plants, some of them of great agricultural relevance because of their ability to parasitise important crops (Kreutz, 1995). In the case of *O. cumana*, this species has become a major constraint on sunflower cultivation in many countries of Europe and the former USSR. This has promoted huge breeding efforts to develop genetic resistance in sunflower (Fernández-Martínez *et al.*, 2008). Such efforts have been successful in the short term, but the parasite has demonstrated a capacity to overcome sunflower resistance mechanisms (Fernández-Martínez *et al.*, 2008). One of the problems for developing more stable sources of resistance to *O. cumana* is the scarce information about its reproductive biology, the genetic structure of the populations and the mode of inheritance of traits related to parasitism. The partially recessive nature of the unpigmented trait and the ease of identifying the recessive homozygote from the wild type and the heterozygote confer the potential use of the unpigmented plant trait as a morphological marker for basic and applied studies on *O. cumana*. For example, recessive colour markers are of great value for determining cross-pollination rates (Bannert *et al.*, 2008), which is an important aspect of *O. cumana* reproductive biology yet to be determined. This study demonstrated for the first

time the utility of using hybridisation techniques for developing *O. cumana* segregating populations, which will be required for further genetic and molecular studies in this species.

Acknowledgements

The research was partly funded by Fundación Ramón Areces, Madrid, Spain.

References

- BANNERT M, VOGLER A & STAMP P (2008) Short-distance cross-pollination of maize in a small-field landscape as monitored by grain color markers. *European Journal of Agronomy* **29**, 29–32.
- BECK-MANNAGETTA G (1930) Orobancheaceae. In: *Das Pflanzenreich*, vol. IV (ed. A ENGLER), 1–348. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig, Germany.
- BENHARRAT H, VERONESI C, THEODET C & THALOUARN P (2002) *Orobanche* species and population discrimination using intersimple sequence repeat (ISSR). *Weed Research* **42**, 470–475.
- BURDZINSKI C & WENDELL DL (2007) Mapping the *anthocyaninless* (*anl*) locus in rapid-cycling *Brassica rapa* (RBr) to linkage group R9. *BMC Genetics* **8**, 64.
- DE HAAN RL & BARNES DK (1998) Inheritance of pod type, stem color, and dwarf growth habit in *Medicago polymorpha*. *Crop Science* **38**, 1558–1561.
- ERKSINE W & KHAN TN (1977) Inheritance of pigmentation and pod shape in winged bean. *Euphytica* **26**, 829–831.
- ESSOMBA NB, COFFELT TA, BRANCH WD & VAN SCOYOC SW (1991) Inheritance of stem color and non-nodulation in peanut. *Peanut Science* **18**, 126–131.
- FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ JM, DOMÍNGUEZ J, PÉREZ-VICH B & VELASCO L (2008) Update on breeding for resistance to sunflower broomrape. *Helia* **31**, 73–84.
- GONZÁLEZ-TORRES R, JIMÉNEZ-DÍAZ RM & MELERO-VARA JM (1982) Distribution and virulence of *Orobanche cernua* in sunflower crops in Spain. *Phytopathologische Zeitschrift* **104**, 78–89.
- GREUTER WR, BURDET HM & LONG G (1989) *Med-checklist. A Critical Inventory of Vascular Plants of the Circum-Mediterranean Countries*. Vol. 4 (*Lauraceae-Rhamnaceae*). Conservatoire et Jardin Botaniques de la Ville de Genève, Genève, Switzerland.
- ISHIYAKU MF & SINGH BB (2004) Inheritance of purple pigmentation on vegetative parts in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). *Scientia Horticulturae* **102**, 369–373.
- KATZIR N, PORTNOY V, TZURI G, CASTEJÓN-MUÑOZ M & JOEL DM (1996) Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in the study of the parasitic weed *Orobanche*. *Theoretical and Applied Genetics* **93**, 367–372.
- KREUTZ CAJ (1995) *Orobanche: The European Broomrape Species*. I. Central and Northern Europe. Stichting Natuurpublicaties Limburg, Maastricht, The Netherlands.
- MOSHKIN VA & DVORYADKINA AG (1986) Cytology and genetics of qualitative characteristics. In: *Castor* (ed. VA MOSHKIN), 93–103. Amerind Publishing, New Delhi.

- NARKHEDE BN, DAOKAR AB & D'CRUZ R (1980) Inheritance of some characters in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp). *Journal of Maharashtra Agricultural Universities* **5**, 205–208.
- NOVOPOKROVSKY IV & TZVELEV NN (1958) Orobanchaceae Lindl. In: *Flora SSSR 23* (ed. VL KOMAROV), 19–117. Botaniceskij Institut Akademija Nauk SSSR, Leningrad.
- PARAN I, GIDONI D & JACOBSON R (1997) Variation between and within broomrape (*Orobanche*) species revealed by RAPD markers. *Heredity* **78**, 68–74.
- PUJADAS-SALVÀ A & 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**, 513–528.
- RECHINGER KH (1943) *Flora Aegea: Flora der Insel und Halbinseln des Aegaeischen Meeres*. Springer, Vienna.
- ROMÁN B, ALFARO C, TORRES AM *et al.* (2003) Genetic relationships among *Orobanche* species as revealed by RAPD analysis. *Annals of Botany* **91**, 637–642.
- RUMSEY FJ (2007) A reconsideration of *Orobanche maritima* Pugsley (Orobanchaceae) and related taxa in southern England and the Channel Islands. *Watsonia* **26**, 473–476.
- RUMSEY FJ & JURY SL (1991) An account of *Orobanche* L. in Britain and Ireland. *Watsonia* **18**, 257–295.
- SÁNCHEZ-MONGE E & JOUVE N (1989) *Genética*. Omega, Barcelona.
- SKALOUD V & KOVACIK A (1978) Survey on inheritance of sunflower characters which are conditioned by a small number of genes. In: *Proceedings of the 8th International Sunflower Conference*, 490–496. International Sunflower Association, Paris.
- STEEL RGD & TORRIE JH (1980) *Principles and Procedures of Statistics: a Biometrical Approach*. McGraw-Hill, New York.
- STOENESCU F (1974) Genetics. In: *Floarea-Soarelui* (ed. AV VRÂNCEANU), 92–125. Academiei Republicii Socialiste România, Bucharest.
- VRÂNCEANU AV, PIRVU N, STOENESCU FM & PĂCUREANU M (1986) Some aspects of the interaction *Helianthus annuus* L./*Orobanche cumana* Wallr. and its implications in sunflower breeding. In: *Proceedings of a Workshop on Biology and Control of Orobanche* (ed SJ TER BORG), 181–188. LH/VPO, Wageningen, The Netherlands.
- WALLROTH KFW (1825) *Orobanches Generis Diaskene*. Frederic Wilmans, Frankfurt am Main, Germany.
- WETTSTEIN-KNOWLES P (1968) Mutations affecting anthocyanin synthesis in the tomato. *Hereditas* **60**, 317–346.
- WHELDAL M (1916) *The Anthocyanin Pigments of Plants*. Cambridge University Press, London.
- WOLF SJ & CRAIG R (1988) Inheritance of flower and stem color in *Exacum affine* Balf. *Journal of Heredity* **79**, 303–306.

BRIEF COMMUNICATION

Extent of cross-fertilization in *Orobanche cumana* Wallr.M.I. RODRÍGUEZ-OJEDA¹, J.M. FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ², L. VELASCO², and B. PÉREZ-VICH^{2*}*Koiposol Semillas S.A. Avda. San Francisco Javier 24-7, E-41018 Sevilla, Spain¹**Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), Alameda del Obispo s/n, E-14004 Córdoba, Spain²***Abstract**

Sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) is considered a self-fertilizing species, but there is no indication as to whether it is strictly self-fertilized or that it presents some extent of cross-fertilization. The objective of this research was to measure the rate of cross-fertilization in *O. cumana* using an unpigmented recessive mutant as a visual marker. A pot and a field experiment in which single unpigmented plants were surrounded by a large number of pigmented plants were conducted. Occurrence of F₁ hybrids, readily distinguishable from unpigmented plants in the progenies of unpigmented plants provided a direct measurement of the cross-fertilization rate. Progenies of unpigmented plants contained 21.5 % of F₁ hybrids in the pot experiment and 28.8 % in the field experiment. The results revealed that *O. cumana* is a partially allogamous species, which has great relevance for understanding the genetic structure and dynamics of populations and, ultimately, race evolution in this parasitic plant.

Additional key words: allogamy, anthocyaninless, autogamy, sunflower broomrape, unpigmented plants.

Sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) is a holoparasitic plant that constrains sunflower production in many countries around the world (Škorić *et al.* 2010). A particularity of *O. cumana* parasitisation of sunflower is a clear differentiation of parasitic races and a host-parasite interaction that generally fits the gene-for-gene model which does not occur in other crop/*Orobanche* associations (Pérez-de-Luque *et al.* 2009). In recent years, the appearance of new *O. cumana* races has jeopardized sunflower production in large areas of Spain, Romania, Turkey, Ukraine, and Russia (Fernández-Martínez *et al.* 2009). Understanding race evolution in *O. cumana* would require a previous knowledge of the genetic structure and dynamics of *O. cumana* populations.

The mating system is a major determinant of the genetic structure of populations (Lloyd and Schoen 1992, Charlesworth 2003). Most *Orobanche* species are pollinated by insects, particularly bumblebees and bees, but some species are self-fertilizing (Musselman *et al.* 1981, Kreutz 1995). Their mating systems are commonly correlated with flower morphology; whereas some self-fertilizing species such as *O. cumana* develop bent tubular corollas with small lower lips that may not

facilitate pollinator landing, other species like *O. crenata* Forssk. and *O. foetida* Poir. have large lower lips that serve as landing platforms for pollinating insects (Satovic *et al.* 2009). A molecular study on intra- and inter-population genetic variation in eight European populations of *O. cumana* parasitizing sunflower identifies low intra-population and large inter-population genetic variations which pointed to a self-fertilizing mating system (Gagne *et al.* 1998).

Despite the above mentioned studies, which suggest that *O. cumana* is primarily a self-fertilizing species, no studies to measure the rate of cross-fertilization have been undertaken. The objective of this research was to measure the rate of cross-fertilization in *O. cumana* using an unpigmented recessive mutant as a visual marker.

Two experiments to evaluate the cross-pollination rate were conducted in Córdoba, Spain in 2008, one of them in pots and the other one in a field. *O. cumana* lines EK-12, developed by inbreeding a population collected in Écija, Spain, and EK-A1, developed by inbreeding a single unpigmented plant lacking anthocyanin (Rodríguez-Ojeda *et al.* 2011), were used. The unpigmented plant trait is determined by partially recessive alleles at a single locus in such a way that

Received 5 June 2012, accepted 15 October 2012.

Acknowledgements: The research was funded by Fundación Ramón Areces, Madrid, Spain. The contribution of Dr. Enrique Quesada Moraga, entomologist from the University of Córdoba, Spain, to taxonomic classification of pollinators is gratefully acknowledged.

* Corresponding author; fax: (+34) 957 499252, e-mail: bperez@ias.csic.es

heterozygotes $P_g p_g$ show greenish stems that are easily distinguishable from homozygotes $P_g P_g$ with bluish-violet stems and $p_g p_g$, with yellow stems (Rodríguez-Ojeda *et al.* 2011).

Seeds of the confectionery sunflower (*Helianthus annuus* L.) line B-117, susceptible to all tested *O. cumana* populations, were planted in small pots (7 × 7 × 7 cm) containing a mixture of sand and peat (1:1, v/v). The mixture (approximately 330 cm³) had been previously carefully mixed with 25 mg of broomrape seeds of either EK-12 or EK-A1 lines to obtain a homogeneously infested substrate. In total, 498 pots were inoculated with EK-12 and 140 pots with EK-A1. The plants were kept in a growth chamber for 15 - 20 d at day/night temperatures of 25/18 °C, air humidity of 55 %, and a 14-h photoperiod with irradiance of 300 μmol m⁻² s⁻¹. After this time, about half of the plants were used for the pot experiment and the other half were used for the field experiment. Additionally, 96 pots containing soil inoculated with EK-12 and 96 pots containing soil inoculated with EK-A1 were prepared as described above for seed multiplication.

In the pot experiment, the plants were transplanted into 3500-cm³ plastic pots filled with uninfested sand-silt-peat (2:1:1; v/v/v) mixture. Pots inoculated with EK-12 and EK-A1 were arranged in five rows of 35 pots each in such a way that every EK-A1 pot was surrounded by eight EK-12 pots. The pots were maintained under open air conditions, *i.e.*, they were placed on the ground with no mesh cover. Shoots of EK-A1 were removed periodically before flowering, usually at the stage of 3 - 4 cm height to leave one single shoot per pot in order to avoid cross-fertilization between neighbouring unpigmented plants. Shoots of EK-12 were not removed. The number of EK-12 shoots per pot was recorded. Sunflower plants used for seed multiplication of lines EK-12 and EK-A1 were transplanted into plastic pots as described above and maintained under open air conditions in an area separated from the outcrossing experiment. Individual plants of EK-12 and EK-A1 were bagged before flowering (Rodríguez-Ojeda *et al.* 2010).

In the field experiment, the sunflower plants were transplanted into the field at the experimental farm of the Institute for Sustainable Agriculture, Córdoba, in 17 rows 5 m long with a distance of 1 m between rows and 25 cm between plants in the row. Plants grown in soil inoculated with EK-12 and EK-A1 were arranged in a similar pattern to that in the pot experiment, *i.e.*, sunflower plants inoculated with EK-A1 were surrounded by eight plants inoculated with EK-12. Shoots of EK-A1 were removed periodically as described for the pot experiment to leave one single shoot per sunflower plant. Shoots of EK-12 were not removed. The number of EK-12 shoots per sunflower plant was recorded.

Plants of EK-A1 from both the pot and field experiments were bagged around 2 weeks after the end of flowering to avoid seed losses. At maturity, the bags were cut and the seeds of each plant were threshed separately. Seeds from 15 EK-A1 plants, seven from the pot experi-

ment and eight from the field experiment, produced sufficient amounts of seed for evaluation of progenies. For this purpose, seed from each progeny was used to inoculate soil as described above, and this soil was used for filling 18 small pots in which seeds of sunflower line B117 were sown. Eighteen pots containing soil inoculated with seeds of EK-12 and 18 pots containing soil inoculated with seeds of EK-A1 from the previous-year seed multiplication were prepared as a control. The plants were transplanted into larger pots with the same soil and maintained under open air conditions. After broomrape emergence, the number of shoots with yellow or greenish stems was recorded periodically. Plants of EK-12 and EK-A1 were used as a visual control. They bred true for plant colour, *i.e.*, all plants of EK-12 were pigmented (bluish-violet stems) and all plants of EK-A1 were unpigmented (yellow stems). The rate of cross-fertilization was calculated as the percentage of broomrape shoots with greenish stems in the progenies of EK-A1 plants. It is important to note that plant pigmentation has no effect on parasitism as revealed in a previous study (Rodríguez-Ojeda *et al.* 2011). A χ^2 -test for homogeneity was conducted within each experiment (Steel and Torrie 1980).

Table 1. Number of yellow and greenish broomrape shoots and percentage of greenish ones obtained in the evaluation of the progenies of individual yellow-stemmed plants of line EK-A1 under open-pollination conditions in pot and field experiments.

Exp.	EK-A1	Number of progenies yellow	greenish	[%]	χ^2 (P)
Pots	1	21	7	25.0	26.2 (<0.01)
	2	40	21	34.4	
	3	65	34	34.3	
	4	218	41	15.8	
	5	36	14	28.0	
	6	27	5	15.6	
	7	109	19	14.8	
	total	516	141	21.5	
Field	1	34	14	29.2	13.6 (0.06)
	2	16	3	15.8	
	3	56	11	16.4	
	4	18	5	21.7	
	5	36	24	40.0	
	6	27	11	28.9	
	7	14	6	30.0	
	8	27	18	40.0	
total	228	92	28.8		

The average number of bluish-violet shoots per sunflower plant in the pot experiment was 17.7 ± 13.9 (mean \pm SD). Evaluation of progenies of seven unpigmented plants revealed that between 14.8 and 34.4 % of the progeny shoots had greenish stems, *i.e.*, they were F₁ plants derived from hybrid seeds produced by cross-fertilization with pollen of bluish-violet plants (Table 1). The progenies were not homogeneous

($\chi^2 = 26.2$, $P < 0.01$) for the cross-fertilization rate. The sum of the seven progenies resulted in 516 yellow shoots (S_1 plants) and 141 greenish shoots (F_1 plants) indicating an average occurrence of 21.5 % cross-fertilization in the conditions of the pot experiment.

The average number of bluish-violet broomrape shoots per sunflower plant was 21.1 ± 14.7 in the field experiment. Evaluation of stem colour of the progenies of 8 unpigmented mutants revealed that between 15.8 and 40.0 % of the progeny shoots had greenish stems (Table 1). Homogeneity of the progenies ($\chi^2 = 13.6$, $P = 0.06$) was indicated. The sum of the 8 progenies resulted in 228 yellow shoots and 92 greenish shoots indicating an average cross-fertilization of 28.8 % in the field experiment.

These results suggest that *O. cumana* is a partially allogamous species. The observed rates of cross-fertilization were only applicable to the plant material, experimental design, and environments under which the experiments were conducted, as a number of studies have suggested that there is both temporal and spatial variation in the rate of cross-pollination in partially allogamous plants (Suso and Moreno 1999). However, the results of this research clearly indicate that *O. cumana* is not a strictly self-pollinated species and some extent of cross-fertilization should be expected. Previous studies based on flower morphology (Satovic *et al.* 2009) and genetic structure of populations (Gagne *et al.* 1989) suggest that *O. cumana* is a self-pollinating species. There was a large variation for the rate of cross-fertilization among progenies in the two environments of this study, particularly in the pot experiment. Spatial heterogeneity for the rate of cross-fertilization has been reported in other partially allogamous species such as safflower (McPherson *et al.* 2009).

Even though the objective of the research was not to determine the agents of cross-pollination in *O. cumana*, which, on the other hand, would have required specific additional experiments, we observed the presence of insects visiting *O. cumana* flowers. They corresponded to small to moderate-sized specimens of *Hymenoptera* with a length from around 3 to 9 mm. Fig. 1 shows a small specimen (5 mm length) of the *Halictidae* family captured inside a flower of an unpigmented *O. cumana* plant in the course of the field experiment. It is important to note that species of *Halictidae* are known as pollinators as well as pollen feeders (Armbruster and Baldwin 1998). Nevertheless, it could not be checked whether putative pollinators carried *O. cumana* pollen. Full demonstration of the role of insects on *O. cumana* cross pollination will require additional insect capture and confirmation that

they actually carry pollen of this species.

Flowering at the host species and the parasite overlapped under the conditions of the experiments. Sunflowers are well known as excellent plants for attracting pollinators (Jones and Gillett 2005). The direction in which sunflower attractiveness to pollinators may have influenced the results of the present research is unknown. Studies in the host-parasite system *Centaurea scabiosa-Orobancha elatior* found that the bumblebee pollinator *Bombus pascuorum* only rarely moved between inflorescences of the host and the parasite and therefore the presence of one plant was unlikely to be facilitating pollination in the other (Ollerton *et al.* 2007). But, on the other hand, competition between the host and the parasite species for pollinators may be important if flowering overlap and pollinators are a limiting resource (Ollerton *et al.* 2007).



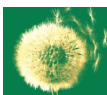
Fig. 1. Putative pollinator of the *Halictidae* family (*Hymenoptera*) captured inside a flower of an unpigmented *Orobancha cumana* plant.

Investigating genetic diversity within and among populations is useful for understanding the evolutionary potential of a species. The mating system greatly influences the amount and partitioning of genetic diversity within and among populations (Lloyd and Schoen 1992, Charlesworth 2003). The existence of a significant rate of outcrossing in *O. cumana* implies the possibility of gene flow between plants and subsequently genetic recombination of avirulence genes which might contribute to the complex racial status of this species.

References

- Armbruster, W.S., Baldwin, B.G.: Switch from specialized to generalized pollination. - *Nature* **394**: 632, 1998.
- Charlesworth, D: Effects of inbreeding on the genetic diversity of populations. - *Phil. Trans. roy. Soc. B* **358**: 1051-1070, 2003.
- Fernández-Martínez, J.M., Domínguez, J., Pérez-Vich, B., Velasco, L.: Current research strategies for sunflower broomrape control in Spain. - *Helia* **32**: 73-84, 2009.

- Gagne, G., Roeckel-Drevet, P., Grezes-Besset, B., Shindrova, P., Ivanov, P., Grand-Ravel, C., Vear, F., Tourvieille de Labrouhe, D., Charmet, G., Nicolas, P.: Study of the variability and evolution of *Orobanche cumana* populations infesting sunflower in different European countries. - *Theor. appl. Genet.* **96**: 1216-1222, 1998.
- Jones, G.A., Gillett, J.L.: Intercropping with sunflowers to attract beneficial insects in organic agriculture. - *Florida Entomol.* **88**: 91-96, 2005.
- Kreutz, C.A.J.: *Orobanche*: the European Broomrape Species. I. Central and Northern Europe. - Stichting Naturpublicaties Limburg, Maastricht 1995.
- Lloyd, D.G., Schoen, D.J.: Self- and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. - *Int. J. Plant Sci.* **153**: 358-369, 1992.
- McPherson, M.A., Good, A.G., Topinka, A.K.C., Yang, R.C., McKenzie, R.H., Cathcart, R.J., Christianson, J.A., Strobeck, C., Hall, L.M.: Pollen-mediated gene flow from transgenic safflower (*Carthamus tinctorius* L.) intended for plant molecular farming to conventional safflower. - *Environ. Biosafety Res.* **8**: 19-32, 2009.
- Musselman, L.J., Parker, C., Dixon, N.: Notes on the autogamy and flower structure in agronomically important species of *Striga* (Scrophulariaceae) and *Orobanche* (Orobanchaceae). - *Beitr. Biol. Pflanz.* **56**: 329-343, 1981.
- Ollerton, J., Stott, A., Allnut, E., Shove, S., Taylor, C., Lamborn, E.: Pollination niche overlap between a parasitic plant and its host. - *Oecologia* **151**: 473-85, 2007.
- Pérez-de-Luque, A., Fondevilla, S., Pérez-Vich, B., Aly, R., Thoiron, S., Simier, P., Castillejo, M.A., Fernández-Martínez, J.M., J Jorrín, J., Rubiales, D., Delavault, P.: Understanding *Orobanche* and *Phelipanche*-host plant interaction and developing resistance. - *Weed Res.* **49** (S1): 8-22, 2009.
- Rodríguez-Ojeda, M.I., Pérez-Vich, B., Alonso, L.C., Fernández-Escobar, J.: The influence of flowering plant isolation on seed production and seed quality in *Orobanche cumana*. - *Weed Res.* **50**: 515-518, 2010.
- Rodríguez-Ojeda, M.I., Velasco, L., Alonso, L.C., Fernández-Escobar, J., Pérez-Vich, B.: Inheritance of the unpigmented plant trait in *Orobanche cumana*. - *Weed Res.* **51**: 151-156, 2011.
- Satovic, Z., Joel, D.M., Rubiales, D., Cubero, J.I., Román, B.: Population genetics in weedy species of *Orobanche*. - *Aust. Plant Pathol.* **38**: 228-234, 2009.
- Škorić, D., Păcureanu-Joița, M., Sava, E. Sunflower breeding for resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.). - *An. INCDA Fundulea* **78**: 63-79, 2010.
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H.: *Principles and Procedures of Statistics: a Biometrical Approach*. - McGraw-Hill, New York, 1980.
- Suso, M.J., Moreno, M.T.: Variation in outcrossing rate and genetic structure on six cultivars of *Vicia faba* L. as affected by geographic location and year. - *Plant Breed.* **118**: 347-350, 1999.



A dominant avirulence gene in *Orobanche cumana* triggers *Or5* resistance in sunflower

M I RODRÍGUEZ-OJEDA*, R PINEDA-MARTOS†, L C ALONSO*,
J FERNÁNDEZ-ESCOBAR*, J M FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ†, B PÉREZ-VICH†
& L VELASCO†

**Koipesol Semillas S.A., Sevilla, Spain, and †Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), Córdoba, Spain*

Received 23 January 2013

Revised version accepted 13 May 2013

Subject Editor: Maurizio Vurro, CNR, Bari, Italy

Summary

Orobanche cumana is a weed that grows as a root parasite on sunflower. In general, the *O. cumana*–sunflower parasitic system is regarded to follow the gene-for-gene model, although this has never been demonstrated at the genetic level in *O. cumana*. The *Or5* dominant gene in sunflower confers resistance to *O. cumana* race E, but not to race F. The objective of this research was to study the inheritance of avirulence/virulence in crosses between plants of *O. cumana* lines classified as races E and F. Four race E and three race F lines were developed, from which four race E × race F cross-combinations were made, in three cases including reciprocals. In all cases, F₁ seeds did not have the ability to parasitise sunflower line P-1380 carrying the *Or5* gene, indicating dominance of race E

avirulence allele(s). Five F₂ populations comprising a total of 387 F_{2,3} families were evaluated on sunflower line P-1380. In all cases, one-fourth of the F_{2,3} families did not possess the ability to parasitise P-1380 plants, suggesting that race E avirulence and race F virulence on P-1380 are allelic and controlled by a single locus. This study demonstrated the gene-for-gene interaction in the *O. cumana*–sunflower parasite system and provided useful information to identify genes involved in *O. cumana* virulence. The approach followed in this research can contribute to define precisely races of the parasite on the basis of the presence of avirulence genes.

Keywords: avirulence, virulence, parasitic weed, genetic study, hybridisation, inheritance, race E, race F, sunflower broomrape.

RODRÍGUEZ-OJEDA MI, PINEDA-MARTOS R, ALONSO LC, FERNÁNDEZ-ESCOBAR J, FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ JM, PÉREZ-VICH B & VELASCO L (2013). A dominant avirulence gene in *Orobanche cumana* triggers *Or5* resistance in sunflower. *Weed Research* **53**, 322–327.

Introduction

The gene-for-gene theory describes plant–pathogen interactions in which resistance reactions are governed by the interaction of host genes for resistance and the corresponding pathogen genes for avirulence (Flor, 1971). This theory has been well demonstrated in cases of qualitative or vertical resistance, which in general

show race specificity and a hypersensitive resistance response. Genes for resistance in the host and genes for avirulence (inability to infect) in the pathogen are most frequently dominant (Agrios, 2004). In the case of *Orobanche* and *Phelipanche* spp. parasitisation, resistance in the host plant is, in most cases, under polygenic, non-race specific genetic control, for example, in legumes (Rubiales & Fernández-Aparicio,

2012), tomato (Qasem & Kasrawi, 1995), tobacco (Buschmann *et al.*, 2005), rapeseed (Zehhar *et al.*, 2003) and parsley (Goldwasser & Kleifeld, 2002). Conversely, the *O. cumana*–sunflower parasitic system generally follows the gene-for-gene model (Fernández-Martínez *et al.*, 2012).

A comprehensive characterisation of *Orobanche cumana* Wallr. (sunflower broomrape) races parasitising sunflower was conducted by Vrânceanu *et al.* (1980), who identified five races of *O. cumana* in Romania, designated as A to E, with a set of five sunflower differential lines carrying the dominant resistance genes *Or1* to *Or5* respectively. In Spain, race E was predominant till the end of the 20th century when a new race, named race F that overcame resistance conferred by the *Or5* gene, appeared and rapidly spread throughout the main cultivation areas (Alonso *et al.*, 1996; Molinero-Ruiz & Melero-Vara, 2004). The situation was similar in the main areas of *O. cumana* distribution on cultivated sunflower (Škorić *et al.*, 2010). Molecular mapping studies revealed that the *Or5* gene conferring resistance to race E is located on a telomeric region of linkage group (LG) 3 of the sunflower genetic map (Lu *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2003; Pérez-Vich *et al.*, 2004). Lu *et al.* (2000) hypothesised that *Or5* might be a cluster of recognition-dependent resistance genes encoding proteins characterised by the presence of leucine-rich repeat (LRR) motifs and a nucleotide binding site (NBS) N-terminal to the LRR domain. This was supported by the mapping of three NBS-LRR loci in the telomeric region of LG 3 where *Or5* was mapped (Radwan *et al.*, 2008).

As stated previously, genetic studies have demonstrated that resistance to *O. cumana* race E in sunflower is governed by a major dominant gene *Or5*. Demonstration of the gene-for-gene interaction system requires studying the inheritance of the avirulence/virulence reaction in *O. cumana*. Accordingly, the objective of the present research was to study the inheritance of avirulence/virulence in crosses between plants of *O. cumana* races E and F.

Materials and methods

Orobanche cumana populations

Orobanche cumana race E line EK-12 was developed from a population collected in Sevilla, Spain, in 1994. Race E line EK-57 was developed from a population collected in Córdoba, Spain, in 1993. Race E line EK-07 was developed from a population collected in Cuenca, Spain, in 1993. Race E line OC-94 was developed from a population collected in Sevilla, Spain,

in 1994. The corresponding lines were developed by selfing for three generations single plants (Rodríguez-Ojeda *et al.*, 2010) grown on sunflower cultivars Ritmo (EK-12, EK-57, and EK-07) or S-1358 (OC-94), both of them resistant to races A through D and susceptible to race E. Race E classification of the four race E lines was confirmed because they showed virulence on plants of cultivars Ritmo (EK-12, EK-57 and EK-07) or S-1358 (OC-94) and avirulence on plants of cultivar P-1380, carrying the *Or5* gene that confers resistance to race E (Vrânceanu *et al.*, 1980).

Orobanche cumana race F lines EK-23 and EK-28 were developed from two different populations collected in Córdoba, Spain, in 1995 and 1996 respectively. Both lines were developed by selfing for three generations single plants grown on sunflower cultivar Kasol, resistant to race E. Race F line SP was developed from a population collected in Sevilla, Spain, in 2004. The line was developed by selfing for three generations single plants grown on sunflower cultivar P-1380. Race F classification of lines EK-23, EK-28 and SP was confirmed because they showed virulence on plants of cultivars P-1380 and avirulence on plants of cultivars I371B (EK-23 and EK-28) or P96 (SP), both of them resistant to race F (Fernández-Martínez *et al.*, 2004).

Genetic study

Fifty mg of seeds of *O. cumana* race E lines EK-12, EK-57, EK-07 and OC-94, and race F lines EK-23, EK-28 and SP were used to inoculate 24 small pots 7 × 7 × 7 cm filled with a mixture of sand and peat (1:1 by vol). The soil mixture containing the inoculum was carefully mixed to obtain a homogeneously infested substrate. Sunflower seeds of cultivars Ritmo, S-1358, Kasol and P-1380 (Vrânceanu *et al.*, 1980) were germinated on moistened filter paper in Petri dishes, and 2-day-old seedlings were planted in the pots inoculated with EK-12, EK-57 and EK-07 (Ritmo), OC-94 (S-1358), EK-23 and EK-28 (Kasol), and SP (P-1380). The plants were maintained in a growth chamber for 21 days at 25°C/20°C (day/night) with a 16-h photoperiod for incubation. After this time, the plants were transplanted to pots containing 3 L of an uninfested sand/silt/peat (2:1:1 by vol) soil mixture and maintained under open air conditions. The following reciprocal crosses between *O. cumana* plants from race E and race F lines were made: EK-57 × EK-28, EK-12 × EK-23, EK-07 × EK-23 and OC-94 × SP. For each cross-combination, six plants of each line were emasculated daily and pollinated with pollen of plants of the other line, as described by

Rodríguez-Ojeda *et al.* (2010, 2011). Crosses EK-07 × EK-23 and EK-57 × EK-28 and subsequent genetic studies were conducted in the experimental station of Koipesol Semillas S.A. (Koipesol) in Carmona (Sevilla, Spain) from 2004 to 2009. Crosses OC-94 × SP and subsequent genetic studies were conducted at the Institute for Sustainable Agriculture (IAS-CSIC) in Córdoba (Spain) from 2005 to 2010. Crosses EK-12 × EK-23 and subsequent genetic studies were conducted at both locations in the same period of time as for the other lines. In all cases, the plants were grown in pots under open air conditions, and *O. cumana* plants were bagged before flowering as described by Rodríguez-Ojeda *et al.* (2010).

F₁ seeds from three to six female plants of each cross-combination, depending of the amount of F₁ seeds produced, were used to inoculate soil in 10–24 small pots as described previously, with the objective of producing F₁ plants and F₂ seed. Seeds of sunflower cultivars AD-66 or B-117 susceptible to all *O. cumana* races were used. AD-66 was used in the research conducted at Koipesol, whereas B-117 was used in the research conducted at IAS-CSIC. The remaining F₁ seed was used to evaluate virulence reaction on 10–24 plants of cultivar P-1380, resistant to race E and susceptible to race F.

The genetic study could not be based on evaluation of the F₂ generation on the differential line P-1380, as avirulent genotypes would remain undetected. Accordingly, F₂ plants from the crosses EK-12 × EK-23, EK-07 × EK-23 and OC-94 × SP were grown on plants of the susceptible lines AD-66 or B-117 to produce F₃ seeds, and the genetic study was based on the evaluation of F_{2,3} families, that is, F₃ seeds derived from individual self-fertilised F₂ plants. They were evaluated on 6–20 plants of cultivars AD-66 or B-117 and P-1380. Evaluation on AD-66 or B-117 provided information on the viability of F₃ seeds so that any family not virulent on these lines was removed from the study. Evaluation on the differential cultivar P-1380, carrying the *Or5* resistance gene, provided information on the presence of alleles overcoming *Or5* resistance. Evaluations of virulence of F₁ and F₃ seeds in Sevilla were conducted in 330 cm³ pots in a growth chamber, as described by Rodríguez-Ojeda *et al.* (2001). *Orobanche cumana* tubercles on sunflower roots were counted 45 days after sowing. Evaluations of virulence in Córdoba were carried out in 3-L pots as described previously, based on emerged shoots. Evaluation of F_{2,3} families showing avirulent reaction on P-1380 was repeated in those cases in which additional seed was available. The cross EK-57 × EK-28 was only used for evaluation of the F₁ generation.

Statistical analysis

Inheritance of avirulence/virulence in *O. cumana* populations was assessed by the chi-square goodness-of-fit between expected and observed phenotypic ratios for avirulence/virulence of F₂ genotypes, determined through the evaluation of their corresponding F₃ progenies, as described previously. Tests for heterogeneity of the data of F₂ populations within each cross were conducted (Sánchez-Monge & Jouve, 1989).

Results

F₁ seeds from four different crosses between *O. cumana* plants of races E and F, three of them made in both ways, were evaluated on the differential line P-1380, which carries the dominant resistance gene *Or5* that confers resistance to race E, but not to race F. In all cases, F₁ seeds did not possess the ability to parasitise P-1380 plants (Table 1). All the F₁ seed families were also tested on susceptible lines AD-66 or B-117 to disprove the hypothesis that the lack of parasitisation on P-1380 plants might be caused by problems associated with F₁ seeds, such as low viability, low vigour or dormancy. Except for a few cases observed in the experiments conducted in large pots, probably due to low seed quality, all the F₁ populations showed virulence on the susceptible lines, with average numbers of root attachments per plant between 17.4 and 20.2 in the evaluations conducted in small pots and average numbers

Table 1 Number of resistant (R) and susceptible (S) plants of sunflower cultivars AD-66 or B-117, both of them susceptible to all *Orobanche cumana* races, and P-1380, resistant to race E and susceptible to race F, inoculated with F₁ seeds from crosses between plants of *O. cumana* races E and F

Cross	Location*	AD-66/B-117†		P-1380	
		R	S (DA)‡	R	S
EK-57 (E) × EK-28 (F)	Sevilla	0	20 (17.5)	20	0
EK-28 (F) × EK-57 (E)	Sevilla	0	20 (18.6)	20	0
EK-12 (E) × EK-23 (F)	Sevilla	0	10 (20.2)	10	0
EK-23 (F) × EK-12 (E)	Córdoba	2	22 (4.3)	24	0
EK-23 (F) × EK-07 (E)	Sevilla	0	15 (17.4)	15	0
OC-94 (E) × SP (F)	Córdoba	3	21 (4.0)	24	0
SP (F) × OC-94 (E)	Córdoba	1	9 (2.7)	10	0

*Experiments in Sevilla were conducted on small pots, and the evaluation was based on the number of root tubercles at 45 days after sowing. Experiments in Córdoba were carried out on larger pots, and the evaluation was based on the number of emerged shoots.

†Line AD-66 was used in the experiments conducted in Sevilla; line B117 was used in the experiments made in Córdoba.

‡DA= degree of attack, that is, average number of tubercles or emerged shoots per sunflower plant.

of emerged shoots between 2.7 and 4.3 in the evaluations carried out in large pots. The results suggested dominance of *O. cumana* race E avirulence allele(s).

Estimation of the number of genes involved was conducted through the evaluation of $F_{2:3}$ families. In the five F_2 populations evaluated, $F_{2:3}$ families segregated in a 1:3 (avirulence on P-1380 : virulence on P-1380) ratio (Table 2). This indicated that broomrape race E avirulence and race F virulence on P-1380 are allelic and determined by a single gene. It is important to note that the virulent class included $F_{2:3}$ families derived from both F_2 recessive homozygotes, as well as F_2 heterozygotes, which were expected to segregate in the F_3 into three avirulent to one virulent genotypes, in the case of dominant monogenic inheritance of avirulence. If the avirulence gene is named *Avr_{Or5}*, the expected allelic configurations are *Avr_{Or5}Avr_{Or5}* for avirulent homozygotes, *avr_{Or5}avr_{Or5}* for virulent homozygotes and *Avr_{Or5}avr_{Or5}* for avirulent heterozygotes (Table 3). For 26% of the avirulent $F_{2:3}$ families, there was seed available to repeat the evaluation, which confirmed in all cases the lack of virulence of these families on P-1380. The average number of root attachments or emerged shoots per sunflower plant in $F_{2:3}$ families showing virulence is shown in Table 2. On average, the number of attachments/shoots on plants of line P-1380 was reduced by 37% compared with lines AD-66 and B-117. This can be largely explained by the presence of virulent $F_{2:3}$ families derived from heterozygote *Avr_{Or5}avr_{Or5}* F_2 plants, in which only *avr_{Or5}avr_{Or5}* genotypes are expected to overcome *Or5* resistance mechanisms.

Discussion

Initial studies by Vrânceanu *et al.* (1980), further confirmed by other authors (Ish-Shalom-Gordon *et al.*,

Table 3 Virulence of *Orobanche cumana* genotypes on sunflower lines AD-66 or B117 (homozygous recessive for resistance gene *Or₅*) and P-1380 (homozygous dominant for *Or₅*) depending on allelic configuration at *O. cumana* avirulence locus *Avr_{Or5}*

	Sunflower lines	
	B-117 or AD-66 (<i>or₅or₅</i>)	P-1380 (<i>Or₅Or₅</i>)
<i>O. cumana</i> genotype		
<i>Avr_{Or5} Avr_{Or5}</i> (race E)	Virulence	Avirulence
<i>Avr_{Or5} avr_{Or5}</i>	Virulence	Avirulence
<i>avr_{Or5} avr_{Or5}</i> (race F)	Virulence	Virulence

1993; Sukno *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2003; Pérez-Vich *et al.*, 2004), demonstrated that genetic resistance of sunflower to races A to E of the parasitic weed *O. cumana* is monogenic dominant, controlled by resistance genes *Or1* to *Or5* respectively, which points to a gene-for-gene relationship between sunflower and its parasite (Höniges *et al.*, 2008). The present research illustrated that *O. cumana* race E avirulence and race F virulence on sunflower genotypes carrying the dominant resistance gene *Or5* are allelic and determined by a single gene named *Avr_{Or5}*, with race E avirulence allele being dominant over race F virulence allele, as described for other avirulence genes (Agrios, 2004; Sharma, 2004). As it has been reported that genomic organisation of some avirulence genes might be in clusters (Rep & Kistler, 2010), it is also conceivable that these race E and race F alleles might represent two tightly linked genes within a particular chromosomal region or locus in a molecular analysis.

The gene-for-gene interaction, in which alleles of a single locus in the pathogen condition virulence or avirulence on the differential host cultivar carrying a single resistance gene, has been confirmed in the *O. cumana*–sunflower parasitic system for races E/F

Table 2 Number of avirulent (AVR) and virulent (VR) $F_{2:3}$ families from crosses between plants of *Orobanche cumana* races E and F, inoculated to plants of sunflower cultivars AD-66 or B-117, both of them susceptible to all *O. cumana* races, and P-1380, resistant to race E and susceptible to race F

Cross	Location*	AD-66/B-117†		P-1380		χ^2 (1:3)	<i>P</i>
		AVR	VR (DA)‡	AVR	VR (DA)‡		
EK-12 (E) × EK-23 (F)	Sevilla	0	62 (17.2)	17	45 (12.5)	0.19	0.66
EK-23 (F) × EK-12 (E)	Córdoba	0	97 (9.9)	30	67 (6.2)	1.82	0.18
EK-23 (F) × EK-07 (E)	Sevilla	0	51 (15.6)	12	39 (11.3)	0.06	0.81
OC-94 (E) × SP (F)	Córdoba	0	38 (17.0)	11	27 (9.8)	0.32	0.57
SP (F) × OC-94 (E)	Córdoba	0	139 (14.8)	36	103 (7.5)	0.06	0.81
Pooled F_3				106	281	1.18	0.28
Chi squared of heterogeneity for F_3 (d.f. = 4)						1.27	0.87

*Experiments in Sevilla were conducted on small pots, and the evaluation was based on the number of root tubercles at 45 days after sowing. Experiments in Córdoba were carried out on larger pots, and the evaluation was based on the number of emerged shoots.

†Line AD-66 was used in the experiments conducted in Sevilla; line B117 was used in the experiments made in Córdoba.

‡DA= degree of attack, that is, average number of tubercles or emerged shoots per sunflower plant in virulent $F_{2:3}$ families.

and dominant sunflower gene *Or5*. Even though this vertical resistance is the most frequently reported resistance mechanism for the *O. cumana*–sunflower interaction, more complex resistance has been described as well, for example, resistance controlled by two recessive genes (Rodríguez-Ojeda *et al.*, 2001; Akhtouch *et al.*, 2002), presence of modifying genes affecting vertical resistance (Velasco *et al.*, 2007) or genetic control by horizontal mechanisms (Pérez-Vich *et al.*, 2004, 2006).

As the molecular basis of the *O. cumana*–sunflower gene-for-gene interaction remains poorly understood, in this study, the term ‘avirulence gene’ has been used in a broad sense (Lee *et al.*, 2009). This indicates a gene that encodes any determinant of the specificity of the interaction with the host, regardless of its function or role in parasitism. Assuming that parasitic plant–host interactions are governed by the same rules as in other plant pathogen–host interactions, the *Avr_{Or5}* gene might be related to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), pathogen effectors or any other gene underlying variation in the activity of these molecules (Bent & Mackey, 2007).

Most of the race E and race F lines used in this study derived from populations collected in the Guadalquivir Valley in Southern Spain. Molinero-Ruiz *et al.* (2008) found that populations collected in the Guadalquivir Valley before 1990, when race E resistant hybrids had not been introduced yet, already contained individuals with ability to parasitise sunflower plants carrying the *Or5* gene. The authors suggested that introduction of race E resistant hybrids caused a selection pressure that determined population changes leading to predominance of the genotypes with ability to overcome *Or5* resistance. We have conducted an evaluation of genetic similarity between race E and race F populations from the Guadalquivir Valley using microsatellite markers and found that they were genetically uniform (Pineda-Martos *et al.*, 2013). This suggests that the change in virulence to overcome the *Or5* resistance gene was caused by a recessive mutation in the avirulence gene *Avr_{Or5}* within the local gene pool, and not by the introduction of seeds with enhanced virulence from another area. Also, as *avr_{Or5}* mutation overcoming *Or5* is recessive, it required initially sunflower plants without the *Or5* gene to spread, which is in line with the results of Molinero-Ruiz *et al.* (2008).

Proper race identification is one of the main bottlenecks in *O. cumana* research, particularly for populations overcoming *Or5* resistance (Fernández-Martínez *et al.*, 2012). For example, differences for virulence have been reported for populations classified as race F in several geographical areas (Molinero-Ruiz *et al.*, 2008; Păcureanu-Joița *et al.*, 2009), which suggests

that there are no solid bases to classify them under the same race. Race classification in *O. cumana* parasitising sunflower is conducted on the basis of reaction against sets of differential lines. A set of sunflower differential lines was reported by Vrânceanu *et al.* (1980) for races A to E, but there are no public sets of differential lines for races overcoming the *Or5* gene. The present study demonstrated that classic genetic studies based on the evaluation of avirulence/virulence of F₁ and F₃ generations derived from crosses between *O. cumana* lines can provide useful information to identify genes involved in *O. cumana* virulence and, accordingly, to define precisely races of the parasite on the basis of the presence of avirulence genes.

Acknowledgements

The research was partially funded by Fundación Ramón Areces. Madrid. R. Pineda-Martos was the recipient of a PhD fellowship from the Spanish National Research Council (CSIC) (JAEPRe_08_00370). Technical support by Alberto Merino and Plácida Nieto is acknowledged.

References

- AGRIOS GN (2004) *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press, Burlington, MA, USA.
- AKHTOUCH B, MUÑOZ-RUZ J, MELERO-VARA J, FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ J & DOMÍNGUEZ J (2002) Inheritance of resistance to race F of broomrape in sunflower lines of different origins. *Plant Breeding* **121**, 266–268.
- ALONSO LC, FERNÁNDEZ-ESCOBAR J, LÓPEZ G, RODRÍGUEZ-OJEDA MI & SALLAGO F (1996) New highly virulent sunflower broomrape (*Orobancha cernua* Loeffl.) pathotypes in Spain. In: *Proceedings of the 6th International Symposium in Parasitic Weeds* (Eds MT Moreno, JI Cubero, D Berner, LJ Musselman & C Parker) 639–644. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Córdoba, Spain.
- BENT AF & MACKAY D (2007) Elicitors, effectors, and *R* genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annual Review of Phytopathology* **45**, 399–436.
- BUSCHMANN H, GONSIOR G & SAUERBORN J (2005) Pathogenicity of branched broomrape (*Orobancha ramosa*) populations on tobacco cultivars. *Plant Pathology* **54**, 650–656.
- FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ JM, PÉREZ-VICH B, AKHTOUCH B *et al.* (2004) Registration of four sunflower germplasm lines resistant to race F of broomrape. *Crop Science* **44**, 1033–1034.
- FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ JM, VELASCO L & PÉREZ-VICH B (2012) Progress in research on breeding for resistance to broomrape. In: *Proceedings of the 18th International Sunflower Conference* Available at: http://www.asagir.org.ar/asagir2008/buscar_congreso.asp (last accessed 23 July 2012).

- FLOR HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**, 275–296.
- GOLDWASSER Y & KLEIFELD Y (2002) Tolerance of parsley varieties to *Orobanche*. *Crop Protection* **21**, 1101–1107.
- HÖNIGES A, WEGMANN K & ARDELEAN A (2008) *Orobanche* resistance in sunflower. *Helia* **49**, 1–12.
- ISH-SHALOM-GORDON N, JACOBSON R & COHEN Y (1993) Inheritance of resistance to *Orobanche cumana* in sunflower. *Phytopathology* **83**, 1250–1252.
- LEE SW, HAN SW, SRIRIYANUM M, PARK CJ, SEO YS & RONALD PC (2009) A type I-secreted, sulfated peptide triggers XA21-mediated innate immunity. *Science* **326**, 850–853.
- LU YH, MELERO-VARA JM, GARCÍA-TEJADA JA & BLANCHARD P (2000) Development of SCAR markers linked to the gene *Or5* conferring resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* **100**, 625–632.
- MOLINERO-RUIZ ML & MELERO-VARA JM (2004) Virulence and aggressiveness of sunflower broomrape (*Orobanche cumana*) populations overcoming the *Or5* gene. In: *Proceedings of the 16th International Sunflower Conference* (Ed. G Seiler) 165–169. International Sunflower Association, Fargo, ND, USA.
- MOLINERO-RUIZ ML, PÉREZ-VICH B, PINEDA-MARTOS R & MELERO-VARA JM (2008) Indigenous highly virulent accessions of the sunflower root parasitic weed *Orobanche cumana*. *Weed Research* **48**, 169–178.
- PĂCUREANU-JOIȚA M, FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ JM, SAVA E & RARANCIUC S (2009) Broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.), the most important parasite in sunflower. *Analele INCDA Fundulea* **77**, 49–56.
- PÉREZ-VICH B, AKHTOUCH B, KNAPP SJ *et al.* (2004) Quantitative trait loci for broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) resistance in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* **109**, 92–102.
- PÉREZ-VICH B, VELASCO L, MUÑOZ-RUZ J, DOMÍNGUEZ J & FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ JM (2006) Registration of three sunflower germplasms with quantitative resistance to race F of broomrape. *Crop Science* **46**, 1406–1407.
- PINEDA-MARTOS R, VELASCO L, FERNÁNDEZ-ESCOBAR J, FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ JM & PÉREZ-VICH B (2013) Genetic diversity of *Orobanche cumana* populations from Spain assessed using SSR markers. *Weed Research* **54**, 279–289.
- QASEM JR & KASRAWI MA (1995) Variation of resistance to broomrape (*Orobanche ramosa*) in tomatoes. *Euphytica* **81**, 109–114.
- RADWAN O, GANDHI S, HEESACKER A *et al.* (2008) Genetic diversity and genomic distribution of homologs encoding NBS-LRR disease resistance proteins in sunflower. *Molecular Genetics and Genomics* **280**, 111–125.
- REP M & KISTLER HC (2010) The genomic organization of plant pathogenicity in *Fusarium* species. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 420–426.
- RODRÍGUEZ-OJEDA MI, FERNÁNDEZ-ESCOBAR J & ALONSO LC (2001) Sunflower inbred line (KI-374) carrying two recessive genes for resistance against a highly virulent Spanish population of *Orobanche cernua* Loeffl./*O. cumana* Wallr. race F. In: *Proceedings of the 7th International Parasitic Weed Symposium* (Eds. A Fer, P Thalouarn, DM Joel, LJ Musselman, C Parker & JAC Verkleij) 208–211. Faculté des Sciences, Université de Nantes, Nantes, France.
- RODRÍGUEZ-OJEDA MI, PÉREZ-VICH B, ALONSO LC & FERNÁNDEZ-ESCOBAR J (2010) The influence of flowering plant isolation on seed production and seed quality in *Orobanche cumana*. *Weed Research* **50**, 515–518.
- RODRÍGUEZ-OJEDA MI, VELASCO L, ALONSO LC, FERNÁNDEZ-ESCOBAR J & PÉREZ-VICH B (2011) Inheritance of the unpigmented plant trait in *Orobanche cumana* Wallr. *Weed Research* **51**, 151–156.
- RUBIALES D & FERNÁNDEZ-APARICIO M (2012) Innovations in parasitic weeds management in legume crops. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **32**, 433–449.
- SÁNCHEZ-MONGE E & JOUVE N (1989) *Genética*. Omega, Barcelona, Spain.
- SHARMA PD (2004) *Plant Pathology*. Rastogi Publications, New Delhi, India.
- ŠKORIĆ D, PĂCUREANU-JOIȚA M & SAVA E (2010) Sunflower breeding for resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.). *Analele INCDA Fundulea* **78**, 63–79.
- SUKNO S, MELERO-VARA JM & FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ JM (1999) Inheritance of resistance to *Orobanche cernua* Loeffl. in six sunflower lines. *Crop Science* **39**, 674–678.
- TANG S, HEESACHER A, KISHORE VK *et al.* (2003) Genetic mapping of the *Or5* gene for resistance to *Orobanche* race E in sunflower. *Crop Science* **43**, 1021–1028.
- VELASCO L, PÉREZ-VICH B, JAN CC & FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ JM (2007) Inheritance of resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) race F in a sunflower line derived from wild sunflower species. *Plant Breeding* **126**, 67–71.
- VRĂNCEANU AV, TUDOR VA, STOENESCU F & PIRVU N (1980) Virulence groups of *Orobanche cumana* Wallr., differential hosts and resistance source genes in sunflower. In: *Proceedings of the 9th International Sunflower Conference* 74–82. International Sunflower Association, Torremolinos, Spain.
- ZEHAR N, LABROUSSE P, ARNAUD MC, BOULET C, BOUYA D & FER A (2003) Study of resistance to *Orobanche ramosa* in host (oilseed rape and carrot) and non-host (maize) plants. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 75–82.

CONCLUSIONES

ARTÍCULO 1

Rodríguez-Ojeda, M. I., Pérez-Vich, B., Alonso, L.C., Fernández-Escobar, J. **2010**. The influence of flowering plant isolation on seed production and seed quality in *Orobanche cumana*. *Weed Research* 50: 515-518.

1.- *Orobanche cumana* Wallr. tolera bien la autofecundación mediante embolsado de plantas antes de la floración.

2.- El tipo de bolsa empleada para el aislamiento tiene efectos significativos sobre el desarrollo de las plantas y sobre la cantidad, calidad y capacidad infectiva de las semillas producidas. De los tres tratamientos de embolsado empleados (bolsas de papel de color blanco o marrón y bolsas de plástico micro-perforado), únicamente el embolsado con plástico micro-perforado no presentó diferencias significativas en comparación con las plantas control no embolsadas. Esto indica que la luz y unas buenas condiciones de aireación son clave para la producción de semillas de buena calidad en esta especie.

3.- En experimentos de emasculación manual, las bolsas de papel blanco o de plástico micro-perforado resultaron ser un aislamiento eficaz frente al polen externo de jopo, ya que plantas aisladas y emasculadas no produjeron semilla. Las plantas control emasculadas y no embolsadas produjeron un 6.5% de ovarios fertilizados, lo que sugirió la existencia de polinización cruzada en esta especie.

4.- Los experimentos de hibridación controlada de plantas de jopo producen semillas viables, lo que indica que los órganos reproductores femeninos no resultan alterados al manipularse las flores durante la emasculación y fertilización manual. Además, el tipo de bolsa empleada para el aislamiento de plantas afecta el porcentaje de ovarios fertilizados, siendo éste significativamente mayor cuando se emplean bolsas de plástico micro-perforado.

ARTÍCULO 2

Rodríguez-Ojeda, M. I.; Velasco, L.; Alonso, L. C.; Fernández-Escobar, J.; Pérez-Vich, B. 2011. Inheritance of the Unpigmented Plant Trait in *Orobanche cumana*. *Weed Research* 51: 151-156.

5.- Se ha aislado un mutante natural de *O. cumana* con ausencia de pigmentación antocianica, que presenta color amarillo del tallo y flores blancas. Mediante cruzamiento con una línea de plantas pigmentadas y estudio de las generaciones F₁, F₂ y F₃, se ha concluido que la ausencia de pigmentación es un carácter parcialmente recesivo determinado por un único gen, denominado P_g. Las plantas heterocigotas para este gen presentan un fenotipo intermedio fácilmente reconocible visualmente.

6.- El grado de virulencia de familias F₃ procedentes de plantas F₂ homocigotas dominantes o recesivas para el gen P_g no fue significativamente diferente, indicando que la ausencia de pigmentación no tiene efecto alguno sobre la capacidad infectiva del jopo.

7.- La herencia simple del carácter ausencia de pigmentación y la fácil identificación visual de los tres genotipos para el gen P_g posibilita su uso como marcador visual en diversos tipos de estudios.

8.- Se ha demostrado por primera vez en *O. cumana* la utilidad del uso de las técnicas de hibridación controlada para el desarrollo de poblaciones segregantes en esta especie, necesarias para futuros estudios genéticos y moleculares.

ARTÍCULO 3

Rodríguez-Ojeda, M. I.; Fernández-Martínez, J. M.; Velasco, L.; Pérez-Vich, B. 2013. Extent of Cross Fertilization in *Orobanche cumana* Wallr. *Biologia Plantarum* 57: 559-562.

9.- Se ha estimado la tasa de polinización cruzada en *O. cumana* en experimentos realizados en condiciones de campo y en macetas en los que plantas individuales de jopo no pigmentado se desarrollaron rodeadas de jopos pigmentados. El estudio de la progenie de las plantas no

pigmentadas permitió identificar la presencia de plantas híbridas, que promediaron un 28.8% del total de la progeñe en condiciones de campo y un 21.5% en macetas.

10.- En el transcurso de los experimentos de polinización cruzada, se observó la presencia de insectos polinizadores de la familia Halictidae (Hymenoptera) en el interior de flores de plantas no pigmentadas, lo que sugiere su posible papel en la polinización cruzada de esta especie.

11.- Considerada hasta la fecha como una especie estrictamente autógena, la presencia de una cierta tasa de polinización cruzada en *O. cumana* debe ser tenida en cuenta para la obtención de líneas puras y aislamiento de genotipos. Asimismo, la existencia de polinización cruzada debe considerarse para entender aspectos como estructura de poblaciones y evolución racial en esta especie.

ARTÍCULO 4

Rodríguez-Ojeda, M. I.; Pineda-Martos, R.; Alonso, L. C.; Fernández-Escobar, J.; Fernández-Martínez, J. M.; Pérez-Vich, B.; Velasco, L. **2013**. A dominant avirulence gene in *Orobancha cumana* triggers *Or5* resistance in sunflower. *Weed Research* 53: 322-327.

12.- La herencia de la avirulencia / virulencia en *O. cumana* se ha determinado realizando cruzamientos entre líneas de jopo clasificadas raza E y raza F de jopo, respectivamente, desarrolladas por autofecundaciones sucesivas de plantas individuales durante tres generaciones.

13.- El estudio de la reacción de virulencia / avirulencia de las generaciones F₁ y F₃ de *O. cumana* procedentes de los cruzamientos entre ambas razas sobre una línea diferencial de girasol portadora del gen *Or5*, que confiere resistencia a raza E pero no a F, permitió determinar que la avirulencia en este cruzamiento es dominante y está controlada por un único gen, denominado *Avr_{Or5}*.

14.- Los resultados confirman a nivel de la planta parásita la relación gen-a-gen en la interacción girasol-*O. cumana*, en el caso particular del gen *Or5* en girasol y el gen *Avr_{Or5}* en *O. cumana*.

CONTRIBUCIONES

Publicaciones o Documentos Científico-Técnicos

Alonso,L.C., **Rodríguez-Ojeda, M.I.**, Fernández-Escobar, J. And Lopez Ruiz-Calero, G. **1998**:
Chemical control of broomrape (*Orabanche cernua* Loefl.) in sunflower (*Helianthus annuus* L.) resistant to imazethapir herbicide. HELIA, 21, nº 29, 45-54.

Fernández-Escobar, J., **Rodríguez-Ojeda, M. I.**, Fernández-Martínez, J. M., Alonso, L. C. **2009**.
Sunflower broomrape (*Orobancha cumana* Wallr.) in Castilla-León, a traditionally non-broomrape infested area in Northern Spain. HELIA 51, 57-64.

Rodríguez-Ojeda, M. I., Pineda-Martos, R., Alonso, L. C., Fernández-Martínez, J. M. Velasco, L., Fernández-Escobar, Pérez-Vich, B. **2014**. Genetic Studies in Sunflower Broomrape. HELIA; 37(61): 151-159.

Comunicaciones a congresos

Alonso,L.C., Fernández-Escobar, J., López, G, **Rodríguez-Ojeda, M.I.**, Sallago, F., **1996**. New highly virulent sunflower broomrape (*Orobancha cernua* Loefl) pathotypes in Spain. Advances in parasitic plant research. In Proceedings of the Sixth International Parasitic Weed Symposium. Córdoba (Spain). V14: 639-644

Rodríguez-Ojeda, M. I., Alonso, L.C., Fernández-Escobar, J. **2001**. Effect of different crops on the germination of *Orobancha cernua* Loef. (*O. cumana* Wallr) seeds. En: Fer, A., Thalouarn, P., Joel, D. M., Musselman, L. J., Parker, C., Verkleij, J. A. C. (eds.) Proceedings of the 7th International Parasitic Weed Symposium, 5-8 June **2001**, Nantes, France Faculté des Sciences, pp. 124.

Rodríguez-Ojeda, M. I., Fernández-Escobar, J., Alonso, L. C. **2001**. Sunflower inbred line (KI 374), carrying two recessive genes for resistance against a highly virulent Spanish population of *Orobancha cernua* Loelf / *O. cumana* Wallr race “F”. En: Fer, A., Thalouarn, P., Joel, D. M., Musselman, L. J., Parker, C., Verkleij, J. A. C. (eds.) Proceedings of the 7th International Parasitic Weed Symposium, 5-8 June 2001, Nantes, France Faculté des Sciences, pp. 208.

Fernández-Escobar, J., **Rodríguez-Ojeda, M. I.**, Alonso, L.C., **2008**. Distribution and dissemination of sunflower broomrape (*Orobancha cumana* Wallr) race F in Southern Spain. Proc. 17th International Sunflower Conference. Córdoba, Spain. 231-236.

Rodríguez-Ojeda, M. I., Pineda-Martos, R., Alonso, L. C., Fernández-Martínez, J. M. Velasco, L., Fernández-Escobar, Pérez-Vich, Begoña. **2014**. Genetic Studies in Sunflower Broomrape. Proceedings of the third Symposium on Broomrape (*Orobancha* spp.) in Sunflower. Córdoba, Spain. 116-120.