



UNIVERSIDAD DE CORDOBA

**Escuela Internacional de Doctorado en Agroalimentación e idA3
Programa de Ingeniería Agraria, Alimentaria, Forestal y de
Desarrollo Rural Sostenible**

TESIS DOCTORAL

POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES

**Detección presintomática y no destructiva de enfermedades
causadas por patógenos de suelo en maíz (Marchitez tardía) y
en girasol (Jopo) mediante medidas térmicas y de fluorescencia
multicolor**

Autora: **Carmen M^a Ortiz Bustos**

Directora: **Dra. Leire Molinero Ruiz**

Instituto de Agricultura Sostenible

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Córdoba, Mayo 2017

TITULO: *Detección presintomática y no destructiva de enfermedades causadas por patógenos de suelo en maíz (Marchitez Tardía) y en girasol (Jopo) mediante medidas térmicas y de fluorescencia multicolor.*

AUTOR: *Carmen María Ortiz Bustos*

© Edita: UCOPress. 2017
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

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



UNIVERSIDAD DE CORDOBA

**Escuela Internacional de Doctorado en Agroalimentación eidA3
Programa de Ingeniería Agraria, Alimentaria, Forestal y de
Desarrollo Rural Sostenible**

TESIS DOCTORAL

**Detección presintomática y no destructiva de enfermedades causadas
por patógenos de suelo en maíz (Marchitez tardía) y en girasol (Jopo)
mediante medidas térmicas y de fluorescencia multicolor**

presentada por CARMEN M^a ORTIZ BUSTOS en satisfacción de los
requisitos necesarios para la obtención del grado de DOCTOR INGENIERO
AGRÓNOMO

La Directora:

Dra. Leire Molinero Ruiz

Científica Titular
Dpto. Protección de Cultivos
Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC)



INSTITUTO DE
AGRICULTURA
SOSTENIBLE

IAS



Córdoba, Mayo 2017



TÍTULO DE LA TESIS: Detección presintomática y no destructiva de enfermedades causadas por patógenos de suelo en maíz (Marchitez tardía) y en girasol (Jopo) mediante medidas térmicas y de fluorescencia multicolor.

DOCTORANDO/A: CARMEN M^a ORTIZ BUSTOS

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).

Dña. LEIRE MOLINERO RUIZ, Científico Titular del Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, directora de la presente Tesis Doctoral

INFORMA:

Que en la Tesis Doctoral titulada “**Detección presintomática y no destructiva de enfermedades causadas por patógenos de suelo en maíz (Marchitez tardía) y en girasol (Jopo) mediante medidas térmicas y de fluorescencia multicolor**” que ha llevado a cabo la Ingeniera Agrónoma por la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes de la Universidad de Córdoba D^a. **Carmen M^a Ortiz Bustos** bajo mi dirección, se han completado con éxito todos los objetivos planteados en dicho trabajo de investigación.

Que dicha Tesis Doctoral se va a presentar como compendio de publicaciones, las cuales se indican a continuación:

Artículos en revistas SCI

Ortiz-Bustos, C.M., Pérez-Bueno, M., Barón, M., and Molinero-Ruiz, L. (2016). Fluorescence imaging in the red and far-red region during growth of sunflower plantlets. Diagnosis of the early infection by the parasite *Orobanche cumana*. *Front Plant Sci.* 7:884. doi:10.3389/fpls.2016.00884

Ortiz-Bustos, C.M., Testi, L., García-Carneros, A.B., and Molinero-Ruiz, L. (2016). Geographic distribution and aggressiveness of *Harpophora maydis* in the Iberian Peninsula, and thermal detection of maize late wilt. *Eur J Plant Pathol.* 144,383-397. doi: 10.1007/s10658-015-0775-8

Ortiz-Bustos, C.M., Pérez-Bueno, M., Barón, M., and Molinero-Ruiz, L. (2017). Use of blue-green fluorescence and thermal imaging in the early detection of sunflower infection by the root parasitic weed *Orobanche cumana* Wallr. *Front in Plant Sci.* (accepted). doi: 10.3389/fpls.2017.00833

Artículos en revistas internacionales con proceso de revisión por pares e indexadas en otras bases de datos

Ortiz-Bustos, C. M., García-Carneros, A. B., and Molinero-Ruiz, L. (2015). La marchitez tardía del maíz (*Zea mays* L.) causada por *Cephalosporium maydis* en la Península Ibérica, y otros hongos asociados. *Summa Phytopathologica* 41,107-114. doi: 10.1590/0100-5405/1998.

Otras aportaciones destacables que han surgido de la presente Tesis Doctoral son dos contribuciones a congresos:

Ortiz-Bustos, C.M., López-Bernal, A. , Testi, L. , Alcántara, E. and Molinero-Ruiz, L. (2016) . Late wilt of maize as affected by irrigation management, and tissue effect of the causal fungus *Harpophora maydis*. Tipo de participación: Póster. Congreso: **XVIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología** Palencia, España, Septiembre 20-23, 2016. Publicación: Libro de Resúmenes pp. 169.

Ortiz-Bustos, C.M., Pérez-Bueno, M.L., Barón, M., and Molinero-Ruiz, L. (2016). Blue and green fluorescence and thermal imaging in the early detection of sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.). Tipo de participación: Comunicación Oral. Congreso: **XVIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología** Palencia, España, Septiembre 20-23, 2016. Publicación: Libro de Resúmenes pp. 119.

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

Córdoba, __12__ de _____ MAYO _____ de __2017_____

Firma del/de los director/es



Fdo: LEIRE MOLINERO RUIZ

Vº Bº TUTOR



Fdo: ENRIQUE QUESADA MORAGA



TÍTULO DE LA TESIS: Detección presintomática y no destructiva de enfermedades causadas por patógenos de suelo en maíz (Marchitez tardía) y en girasol (Jopo) mediante medidas térmicas y de fluorescencia multicolor.

DOCTORANDO/A: CARMEN M^a ORTIZ BUSTOS

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).

D. ANTONIO TRAPERO CASAS, Catedrático de Producción Vegetal de la Universidad de Córdoba, como responsable de la línea de investigación con título "Protección Vegetal"

INFORMA:

Que el trabajo de investigación titulado "**Detección presintomática y no destructiva de enfermedades causadas por patógenos de suelo en maíz (Marchitez tardía) y en girasol (Jopo) mediante medidas térmicas y de fluorescencia multicolor**" realizado por la doctoranda D^a. **Carmen M^a Ortiz Bustos** bajo la dirección de la Dra. **Leire Molinero Ruiz**, puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en la Universidad de Córdoba y ratifico la consideración favorable emitida por la Directora de la Tesis Doctoral a tal efecto.

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

Córdoba, __8__ de _____ Mayo _____ de __2017_____

Firma del responsable de línea de investigación

Fdo.: _____ ANTONIO TRAPERO CASAS _____

Tesis por compendio de artículos

Esta Tesis Doctoral cumple el requisito establecido por la Universidad de Córdoba para su presentación como compendio de artículos, consistente en un mínimo de 3 artículos publicados o aceptados en revistas incluidas en los tres primeros cuartiles de la relación de revistas del ámbito de la especialidad y referenciadas en la última relación publicada por el Journal Citations Report (SCI):

1. **Ortiz-Bustos, C.M.**, Testi, L., García-Carneros, A.B., and L. Molinero-Ruiz. (2016). Geographic distribution and aggressiveness of *Harpophora maydis* in the Iberian peninsula, and thermal detection of maize late wilt. *Eur. J. Plant Pathol.* 144, 383-397. DOI: 10.1007/s10658-015-0775-8

Datos de 2015 (JCR): índice de impacto 1.494, índice de impacto de los últimos 5 años 1.698, posición 27/83 y 2º cuartil en el área temática de *Agronomy*, 9/34 y 2º cuartil en el área temática de *Horticulture* y 91/209 y 2º cuartil en el área temática de *Plant Sciences*.

2. **Ortiz-Bustos, C.M.**, Pérez-Bueno, M., Barón, M., and L. Molinero-Ruiz. (2016). Fluorescence imaging in the red and far-red region during growth of sunflower plantlets. Diagnosis of the early infection by the parasite *Orobanche cumana*. *Front. Plant Sci.* 7, 884. DOI:10.3389/fpls.2016.00884

Datos de 2015 (JCR): índice de impacto 4.495, índice de impacto de los últimos 5 años 4.461, posición 15/209 y 1º cuartil en el área temática de *Plant Sciences*.

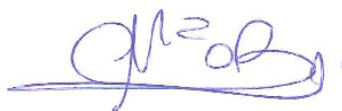
3. **Ortiz-Bustos, C.M.**, Pérez-Bueno, M., Barón, M., and L. Molinero-Ruiz. (2017). Use of blue-green fluorescence and thermal imaging in the early detection of sunflower infection by the root parasitic weed *Orobanche cumana* Wallr. aceptado para su publicación en *Frontiers in Plant Science*. DOI: 10.3389/fpls.2017.00833

Datos de 2015 (JCR): índice de impacto 4.495, índice de impacto de los últimos 5 años 4.461, posición 15/209 y 1º cuartil en el área temática de *Plant Sciences*.

Además, en la Tesis Doctoral se incluye un capítulo correspondiente a un artículo publicado en una revista internacional con proceso de revisión por pares y referenciada en las bases de datos: Scielo on-line, SCImago (SJR) y Elsevier – SCOPUS y Google Scholar:

4. **Ortiz-Bustos, C.M.**, García-Carneros, A.B. y L. Molinero-Ruiz. (2015). La marchitez tardía del maíz (*Zea mays* L.) causada por *Cephusporium maydis* en la Península Ibérica, y otros hongos asociados. *Summa Phytopathol.* 41 (2), 107-114. DOI: 10.1590/0100-5405/1998.

La Doctoranda



Fdo.: Carmen Mª Ortiz Bustos

A los valientes que deciden con el corazón

AGRADECIMIENTOS

Siempre he pensado que de todas y cada una de las personas que se cruzan en tu vida se aprende algo, que todo el mundo te aporta y, como también pienso que es de bien nacidos ser agradecidos, quiero agradecer a toda la gente maravillosa que ha hecho posible que esté escribiendo estas líneas. Espero no dejarme nadie atrás, pero si así fuera, por favor perdonadme, es producto del despiste y no de la falta de cariño.

En primer lugar, me gustaría agradecer a Leire, mi directora de tesis. Gracias por ser la primera persona que confió laboralmente en mí. Nunca lo olvidaré. Gracias por enseñarme tanto y por hacerlo siempre con tanta paciencia y cariño. Agradecerte el empeño que siempre has puesto para que este trabajo saliera adelante. Contigo he aprendido muchísimo de fitopatología, estadística..., pero sobre todo me has demostrado con tu energía y tesón que, como dice Antoine de Saint-Exupery, *“El mundo entero se aparta cuando ve pasar a un hombre que sabe a dónde va”*.

Gracias a Luca, a mi “jefe” enrollado, por estar siempre dispuesto a ayudarme y por tratarme siempre con tanto cariño. Si como científico eres excelente, como persona lo eres aún más.

También quiero agradecer a Matilde Barón por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme desarrollar parte del trabajo recogido en esta Tesis. Gracias también a sus chicas: Marisa, Vanesa y Mónica por hacerme tan fácil mi estancia en la capital granadina. Por el tiempo que habéis dedicado a introducirme en el mundo de la fluorescencia multicolor y por todos los buenos ratos que hemos pasado juntas. Sois encantadoras, un placer haber colaborado con vosotras.

Gracias a mi tutor Enrique Quesada, por ayudarme con la burocracia de esta tesis y, sobre todo, por acogerme en su grupo de investigación como una más.

Y también muchas gracias a mis compañeros de laboratorio: a Ana, por enseñarme a desenvolverme entre pipetas y probetas, a Carlos, por ayudarme y transmitirme tanta calma, a Yerutí, por tener siempre una sonrisa y una palabra de aliento, a Rabeb porque logramos entendernos con sólo una mirada, a Pedro, por resolver mis dudas informáticas y ser tan divertido y a Sandra, por ser tan buena compañera. Al resto de gente que ha pasado por el laboratorio 2 del Anexo, muchas gracias.

Merecen también mi enorme gratitud los técnicos de agronomía, gracias a Rafa, J. Luis e Ignacio, por ayudarme y cuidar tan bien de mi maíz. Y gracias por tener vuestra particular “ferretería” siempre abierta para mí.

Gracias a los doctores Omar y Álvaro, por vuestras geniales ideas y por dejar aparcado vuestro trabajo para resolver mis dudas científicas. He aprendido mucho con vosotros, mil gracias.

A mis compañer@s y amig@s de la UCO, porque el tiempo que he compartido con vosotr@s ha sido, sin lugar a duda, el mejor de este viaje. Gracias por enseñarme y por demostrarme tantísimo cariño, sois unos compañeros ejemplares. Gracias a Meelad, Natalia, Álex, Silvia, MV, Gloria, María e Inma por hacerme sentir tan querida, a veces diría que incluso como una princesa ;)!! Gracias también a mis edafólogos favoritos Galle y Valen por sus consejos, ánimos y por recordarme que un día sin sonreír, es un día perdido.

A mis compañeros de desayuno, a los del principio: Pepe Melero, Carlos López y al resto de Carlos, Maite, Isabel, Almudena, Toñi, Juanma... por esos ratos tan agradables que hemos compartido y por contar con vuestra ayuda siempre que la he necesitado, de corazón, gracias. Y también a mis nuevos compis de desayunos saludables: Carlos, Alberto y Rosa, gracias por ser tan geniales, he aprendido y he reído mucho con los tres.

A todos los becari@s del IAS, por compartir los buenos y no tan buenos momentos de esta aventura, porque entre los consejos, ánimos y conocimientos de unos y otros hemos conseguido hacerlo todo mucho más fácil.

A mis Usainas, por los buenos momentos que hemos pasado juntas, porque en esta recta final de la carrera me habéis animado y sacado multitud de sonrisas, habéis conseguido que desconectara totalmente y, conociéndome, eso no está pagado.

Hay cuatro personas que han jugado un papel muy importante en distintas fases de esta tesis. Ellos son: Maite, Vanesa, Meelad y Natalia. Aunque tendría que deciros mucho, simplemente GRACIAS.

Gracias a mis amig@s por recordarme que por muy larga que sea la noche siempre llega la mañana.

Y sobre todo quiero agradecer a mi familia, porque no sé qué ni cómo lo hice, pero me tocó la mejor ;)!!! Gracias a mis padres, por estar siempre ahí y darme todo lo mejor que unos padres pueden darle a una hija. Sois mi ejemplo a seguir y luchó a diario para no defraudaros. Y, como no, GRACIAS mis a herman@s porque, aunque no soy la pequeña, siempre me cuidáis y mimáis como si lo fuera. Gracias por ser tan generos@s conmigo y quererme tanto, incluso cuando no me lo merezco. Esta tesis es de tod@s!!

A todos, gracias.

RESUMEN

Algunas enfermedades de cultivos originadas por patógenos de suelo se caracterizan por la tardía aparición de síntomas. Este es el caso de la Marchitez tardía del maíz (causada por el hongo *Harpophora maydis*) y del Jopo del girasol (causado por la planta parásita de raíz *Orobancha cumana*). *Harpophora maydis* se refirió por vez primera en la Península Ibérica en 2010 y durante los últimos años se ha convertido en una preocupación importante para los productores de maíz. Por el contrario, los ataques de *O. cumana* son frecuentes en los cultivos españoles de girasol desde los años 80. Esta parásita es actualmente el principal limitante biótico de la producción de aceite de girasol en el mundo. Tanto *H. maydis* como *O. cumana* infectan la planta hospedante durante las primeras semanas después de la siembra, aunque los síntomas no se hacen visibles hasta la floración del cultivo o poco después de que ésta tenga lugar. También ambas enfermedades se controlan mediante la incorporación de genes de resistencia en las variedades cultivadas. El progreso y el éxito de los programas de mejora para resistencia a enfermedades dependen enormemente de un acertado y eficaz diagnóstico de la reacción de la planta hospedante al patógeno. Por otro lado, en la actualidad son frecuentes las técnicas basadas en el uso de sensores lejanos y/o de proximidad utilizadas en agronomía. Como alternativa a la inspección visual y al análisis de ADN destructivo, y debido a su sensibilidad a desórdenes fisiológicos en las plantas asociados al ataque de patógenos, estas técnicas pueden ser eficaces herramientas de detección en fitopatología. En el caso de proximidad, la monitorización indirecta de las plantas se efectúa principalmente mediante termometría, termografía, medidas de fluorescencia y técnicas espectrales. En el **Capítulo 1** de esta Tesis Doctoral se desarrolla el estado del arte de la Marchitez tardía del maíz y del Jopo del girasol. También se presenta información científica actualizada sobre las técnicas de sensores lejanos y/o de proximidad utilizadas más comúnmente en fitopatología. Los objetivos se presentan en el **Capítulo 2**. En primer lugar, se estudió la distribución de *H. maydis* en la Península Ibérica, se caracterizó su patogenicidad y también se determinaron otras especies de hongos presentes en maíz afectado por marchitez. Además, se evaluó el potencial de la termometría infrarroja para detectar las infecciones por *H. maydis*. En segundo lugar se detectó la presencia de *O. cumana* en girasol durante las fases de crecimiento subterráneo de la planta parásita utilizando para ello imágenes de fluorescencia multicolor (FMC). También se consideraron las posibles alteraciones fisiológicas en el girasol como consecuencia de la infección por *O. cumana*.

En el **Capítulo 3** se estudió la distribución geográfica de *H. maydis* en las principales zonas de cultivo de maíz en España y el sur de Portugal, prospectando 59 campos entre 2009 y 2013. La identidad de 14 de entre todos los aislados de *H. maydis* obtenidos se confirmó mediante amplificación ITS y estos mismos aislados se caracterizaron por su agresividad mediante inoculación y crecimiento de maíz susceptible crecido en condiciones de umbráculo durante todo el ciclo del cultivo.

Uno de los aislados del hongo fue muy agresivo, causando síntomas severos en las plantas y reducciones significativas de peso de sus raíces y partes aéreas. Los aislados moderadamente agresivos causaron valores de enfermedad significativos, pero no todos ellos se asociaron a reducciones de peso de las plantas. En 2012 y 2013 se monitorizó la infección por *H. maydis* en maceta al aire libre y mediante medidas de temperatura de cubierta y del índice de estrés hídrico del cultivo en plantas control y en plantas inoculadas con el aislado más agresivo. Ambos índices respondieron a la infección por el hongo en los dos años, pudiendo detectarse dicha infección hasta 17 días antes de que los síntomas fueran visibles. Este estudio ha revelado la amplia distribución de *H. maydis*, que se localiza en los valles de todos los ríos de la Península Ibérica excepto el del Ebro y pone de relieve la importancia de la resistencia genética para controlar este patógeno en el sur de Europa. Además, la detección térmica de la infección previa al desarrollo de síntomas podría resultar en aplicaciones útiles para el diagnóstico presintomático y no destructivo de la enfermedad.

En el **Capítulo 4** se determinaron las especies de hongos asociadas a *H. maydis* como agente causal de marchitez de maíz. Para ello, se muestrearon 19 campos con síntomas de marchitez en las principales zonas de cultivo de la Península Ibérica entre 2011 y 2012. En el 47% de ellos no se identificó *H. maydis* sino otras especies: *Fusarium graminearum*, *F. verticillioides*, *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* y *Trichoderma harzianum*. En los campos restantes, junto a *H. maydis* se identificaron otros hongos de suelo en porcentajes apreciables: *F. verticillioides* (19%), *F. proliferatum* (19%), *F. equiseti* (9%), *F. oxysporum* (9%) y *Pythium oligandrum* (9%). El crecimiento vascular de *H. maydis* y de otras especies de hongos en maíz se confirmó analizando plantas con marchitez procedentes de tres campos diferentes. Tanto *H. maydis* como *F. graminearum*, *F. equiseti*, *F. proliferatum* y *T. harzianum* se recuperaron de la inserción entre la raíz y tallo y a 10 cm de altura en el tallo de las plantas. El efecto de la infección por *H. maydis* sobre la producción de las plantas de maíz se cuantificó en macetas y condiciones seminaturales en 2011. El peso de las mazorcas de plantas inoculadas se redujo en un 54%. Estas plantas también tuvieron pesos de raíz y de parte aérea (tallo y hojas) significativamente menores que los de las plantas control. Estos resultados apuntan al gran impacto que puede tener la Marchitez tardía sobre la producción de maíz en campo. Además, y aunque la patogenicidad de los hongos de suelo identificados en maíz debería ser confirmada, los resultados de este trabajo sugieren que la Marchitez tardía del maíz puede tener una etiología compleja.

En cuanto al **Capítulo 5**, en él se analizó por primera vez la fluorescencia emitida por la clorofila de girasol en las bandas espectrales con máximos en el rojo (F680) y en el rojo lejano (F740). Se incubaron plantas sanas de girasol en macetas y condiciones de invernadero y, entre la segunda y la quinta semana de crecimiento se compararon los patrones de emisión de fluorescencia de los cuatro primeros pares de hojas (PHs) tanto en la superficie de la hoja como entre PHs. Los PHs de

plantas sanas de girasol presentaron similares patrones de fluorescencia, tanto en el rojo como en el rojo lejano, que variaron dependiendo del grado de desarrollo de la hoja. La utilidad de F680 y F740 como indicadores de la infección de girasol por *O. cumana* durante las fases de desarrollo subterráneo de la plana parásita se evaluó en condiciones experimentales similares. En plantas infectadas por *O. cumana* se detectaron aumentos tempranos de F680 y F740, así como aumentos del ratio F680/F740. Por otro lado, la significación de las diferencias de fluorescencia emitida por plantas control y plantas inoculadas dependió del PH que se considerara en cada momento. Las medidas de contenido clorofílico y de contenido de clorofila total apoyaron los resultados de la FMC, aunque fueron menos sensibles en la discriminación de plantas control y plantas inoculadas. Al final del experimento se confirmó la infección del girasol por la presencia de nódulos en las raíces de las plantas. Este trabajo revela el potencial de la fluorescencia en las regiones del rojo y el rojo-lejano para detectar de forma temprana la infección de girasol por *O. cumana*, lo que podría ser especialmente interesante para llevar a cabo un fenotipado temprano de material de programas de mejora. Más aún, y hasta donde hemos podido conocer, este es el primer trabajo donde se analiza el efecto de una planta parásita sobre su hospedante utilizando imágenes de fluorescencia en el rojo y en el rojo lejano.

En el **Capítulo 6** se analizó la emisión de fluorescencia azul y verde (FAV) en hojas de plántulas sanas de girasol. Además, se aplicaron tanto la FAV como la técnica de termografía para detectar la infección del girasol por *O. cumana* durante el desarrollo subterráneo de la planta parásita. En ambos experimentos se incubaron las plantas de girasol en macetas en invernadero y las medidas se tomaron tras el traslado temporal a cámara de condiciones controladas. En el primer experimento se observó que la FAV emitida por hojas de girasol sano aumentaba a lo largo de su desarrollo. En el caso de girasol parasitado, las hojas presentaban emisiones de FAV menores, y esta diferencia respecto a las hojas de las plantas control fue consistente a lo largo de todo su desarrollo. Al final del experimento se obtuvieron menores concentraciones de pigmentos, lo que sugiere que en las hojas de girasol ocurre un descenso de metabolitos secundarios tras la infección por *O. cumana*. Por otro lado, a lo largo de todo el experimento se detectaron mayores temperaturas de hoja en girasol inoculado con *O. cumana* en comparación con la temperatura de hojas de plantas control. Esto podría indicar que el ataque de la planta parásita induce un cierre estomático y una reducción de la transpiración del girasol. En el trabajo de nuevo se ha demostrado que es posible efectuar una monitorización no destructiva de la infección de girasol por *O. cumana*, en este caso utilizando FAV y termografía, y que dicha monitorización podría aplicarse al fenotipado rápido de girasol. Además, ambas técnicas se han revelado como útiles aproximaciones para estudiar los procesos mediante los cuales *O. cumana* altera la fisiología de su hospedante (metabolismo secundario y fotosíntesis).

Por último, la discusión general de todos los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral y las conclusiones derivadas se presentan en los **Capítulos 7 y 8** respectivamente.

SUMMARY

Some crop diseases caused by soilborne pathogens are characterised by very late symptoms appearance. This is the case of Late wilt of maize (caused by the fungus *Harpophora maydis*) and that of Broomrape of sunflower (caused by the root parasitic plant *Orobancha cumana*). *Harpophora maydis* was first reported in the Iberian Peninsula in 2010, and during the last years it has become a major concern to maize growers. On the contrary, attacks of *O. cumana* are frequent in sunflower growing areas of Spain since the 1980's. Currently, the parasite is the first biotic constraint to sunflower oil production worldwide. Both *H. maydis* and *O. cumana* infect the host plant during the first weeks after sowing but symptoms are not observed until flowering or shortly after it. Also, they are controlled through the incorporation of genes of resistance into the crop varieties. The advancement and success of breeding programmes is highly dependent on an accurate and fast screening of the reaction of the host plant to the pathogen. On the other hand, techniques based on the use of remote and/or proximal sensors are frequently used with agronomical purposes. As an alternative to visual inspection and to destructive analyses of DNA, and because its sensitivity to physiological disorders in plants associated with pathogen attack, these techniques can constitute efficient detection tools in phytopathology. In the case of near distance, indirect monitoring of plants is majorly conducted by means of thermometry, thermography, fluorescence measurements and spectral techniques. In **Chapter 1** of this Ph.D. Thesis, the state of the art of maize late wilt and sunflower broomrape is presented, as well as updated scientific information about the remote and proximal sensing techniques that are most commonly used in plant pathology. The objectives are presented in **Chapter 2**. First, the distribution of *H. maydis* in the Iberian Peninsula and its pathogenic characterization were addressed as well as the identification of other fungal species found in symptomatic maize. Also, the utility of infrared thermometry on the detection of maize infections by *H. maydis* was assessed. Second, the presence of *O. cumana* in sunflower was analysed during underground development stages by means of multicolour fluorescence (MCF). Possible physiological disorders in sunflower as a consequence of *O. cumana* infection were also considered.

In Chapter 3 the geographical distribution of *H. maydis* in the main maize growing areas in the South of Portugal and Spain was determined by prospecting 59 fields from 2009 to 2013. Fourteen out of all the isolates of *H. maydis* were molecularly confirmed by ITS amplification, and their aggressiveness was analysed by inoculation and growth of susceptible maize under shadehouse conditions for the whole growing season. One of the isolates was highly aggressive, causing severe symptoms as well as significant weight reductions of both aboveground parts and roots of the inoculated plants. Moderately aggressive isolates caused significantly high symptoms severity, but not all of them were related to reductions in plant weight. In 2012 and 2013, the infection by *H. maydis* was monitored outdoors by

means of measurements of canopy temperature and crop water stress index of potted control plants and plants inoculated with the most aggressive isolate. Both indices responded to the presence of fungal infection in both years, this infection being detected up to 17 days before symptoms in the plants were visible. This study shows the distribution of *H. maydis* in all the river valleys of the Iberian Peninsula, except that of the Ebro River, and highlights the importance of genetic resistance for controlling the pathogen in southern Europe. In addition, the thermal detection of the infection prior to symptoms development was possible, what might be further applied to the non-destructive pre-symptomatic diagnosis of Late wilt of maize.

The species of fungi that are associated to *H. maydis* as the causal agent of maize wilt were identified in **Chapter 4**. Surveys were conducted in 2011 and 2012 in 19 fields where symptomatic plants were collected. The fields were located in the main maize growing areas of the Iberian Peninsula. In 47% of them the fungus infecting diseased plants was not *H. maydis* but *Fusarium graminearum*, *F. verticillioides*, *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* and/or *Trichoderma harzianum*. In the remaining fields *H. maydis* was identified together with other soilborne fungi that were also frequently isolated from diseased plants: *F. verticillioides* (19%), *F. proliferatum* (19%), *F. equiseti* (9%), *F. oxysporum* (9%) and *Pythium oligandrum* (9%). The vascular growth of *H. maydis* and other fungi into the host was confirmed by means of tissue analyses of diseased plants collected at three different locations. *Harpophora maydis*, as well as *F. graminearum*, *F. equiseti*, *F. proliferatum* and *T. harzianum* were recovered from the root-stem insertion, and from stem tissues up to 10 cm high. The effect of the infection by *H. maydis* on maize yield was assessed in inoculated potted plants that were grown in shadehouse in 2011. Cob production was reduced in 54% upon fungal infection. In addition, significantly low weights of roots and aboveground parts (stems and leaves) were obtained. These results point to the great economic impact that Late wilt can have on the yield of maize under field conditions. Likewise, this work suggests that it can be a disease of a complex etiology. Further work should address the pathogenicity of fungal species other than *H. maydis* on maize, so that the role they may play on disease incidence and on symptoms severity can be determined.

Concerning **Chapter 5**, the fluorescence emitted by chlorophyll (Chl) of sunflower leaves in the spectral bands with peaks near red (F680) and far-red (F740) was analysed for the first time. Healthy sunflowers were grown in pots under greenhouse conditions. Fluorescence emission patterns across the leaf surface and throughout the plant were compared for the first four leaf pairs (LPs) and between the second and fifth weeks of growth. Similar fluorescence patterns, with a delay of three or four days between them, were obtained for LPs of healthy sunflower, showing that red and far-red fluorescence varied with the developmental stage of the leaves. The use of F680 and F740 as indicators of the infection of sunflower by *O. cumana* during underground development stages of the parasite was also

evaluated under similar experimental conditions. Early increases in F680 and F740 as well as increases in F680/F740 were detected upon infection, significant differences between inoculated and control plants being dependent on the LP that was considered at any time. Measurements of Chl contents and final total Chl content supported the results of MCFI, although they were less sensitive in differentiating healthy from inoculated plants. The infection of sunflowers was confirmed by the presence of broomrape nodules in the roots at the end of the experiment. This work revealed the potential of MCFI in the red and far-red regions for early detecting *O. cumana* in sunflower, what might be particularly interesting for early phenotyping in sunflower breeding programmes. Furthermore, and to the best of our knowledge, this is the first time that the effect of a parasitic plant in its host is analysed by means of MCFI.

In **Chapter 6** we analysed the blue-green fluorescence (BGF) emission of leaves of healthy sunflower plantlets, and we implemented BGF and thermal imaging in the detection of the infection by *O. cumana* during underground parasite development. In both experiments sunflowers were grown in pots and under greenhouse conditions and measurements were made after temporary movement to chamber of controlled conditions. Increases in BGF emission were observed in leaf pairs of healthy sunflowers during their development. Besides, lower BGF emission was consistently detected in parasitised plants throughout leaf expansion, and low pigment concentration was obtained at final time, supporting the interpretation of a decrease in secondary metabolites upon parasite infection. Also, parasite-induced stomatal closure and transpiration reduction were suggested by warmer leaves of inoculated sunflowers throughout the experiment. Techniques of BGF and thermal imaging allowed the non-destructive monitoring of sunflower broomrape, and they could be implemented for fast screening of sunflower genotypes. Additionally, these techniques were shown as valuable approaches to assess the processes by which *O. cumana* alters physiology (secondary metabolism and photosynthesis) of sunflower.

Finally, the general discussion of all the results from the work included in this Ph.D. Thesis and the conclusions drawn from them are presented in **Chapters 7 and 8** respectively.

ÍNDICES

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL CULTIVO DE MAÍZ	4
1.2. LA MARCHITEZ TARDÍA DE MAÍZ	7
1.3. EL CULTIVO DE GIRASOL	14
1.4. JOPO EN GIRASOL	17
1.5. DETECCIÓN NO DESTRUCTIVA DE ENFERMEDADES EN PLANTAS	27
1.5.1. Termometría y termografía	27
1.5.2. Fluorescencia	30
1.5.3. Reflectancia	35
1.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	61
CAPÍTULO 3: Geographic distribution and aggressiveness of <i>Harpophora maydis</i> in the Iberian Peninsula, and thermal detection of maize late wilt	65
ABSTRACT	69
CAPÍTULO 4: La marchitez tardía del maíz (<i>Zea mays</i> L.) causada por <i>Cephalosporium maydis</i> en la Península Ibérica, y otros hongos asociados	71
RESUMEN	75
4.1. INTRODUCCIÓN	77
4.2. MATERIAL Y MÉTODOS	78
4.2.1. Identificación de especies de hongos de suelo asociadas a <i>C. maydis</i> como agente causal de la marchitez tardía	78

Índices

4.2.2.	Efecto de la infección de <i>C. maydis</i> sobre la producción de maíz en condiciones seminaturales	81
4.3.	RESULTADOS	82
4.3.1.	Identificación de especies de hongos de suelo asociadas a <i>C. maydis</i> como agente causal de la marchitez tardía	82
4.3.2.	Efecto de la infección de <i>C. maydis</i> sobre la producción de maíz en condiciones seminaturales	88
4.4.	DISCUSIÓN	89
4.5.	AGRADECIMIENTOS	91
4.6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
CAPÍTULO 5: Fluorescence imaging in the red and far-red region during growth of sunflower plantlets. Diagnosis of the early infection by the parasite <i>Orobanche cumana</i>		95
	ABSTRACT	99
5.1.	INTRODUCTION	101
5.2.	MATERIALS AND METHODS	103
5.2.1.	Distribution of red and far-red fluorescence emission in healthy sunflower plantlets	103
5.2.1.1.	Healthy plant material	103
5.2.1.2.	Multicolor fluorescence imaging	103
5.2.1.3.	Statistical analyses	104
5.2.2.	Red and far-red fluorescence emission, and leaf Chl content in sunflower plantlets upon inoculation with <i>O. cumana</i>	104
5.2.2.1.	<i>Orobanche cumana</i> inoculation and sunflower plant growth	104
5.2.2.2.	Measurements of the total leaf chlorophyll content	105
5.2.2.3.	Spectrophotometric chlorophyll quantification	105

5.2.2.4.	Statistical analyses	106
5.3.	RESULTS	106
5.3.1.	MCFI distribution pattern on healthy sunflower plants	106
5.3.2.	Alterations in MCFI distribution pattern on sunflower plants upon infection with <i>O. cumana</i>	107
5.3.3.	Chlorophyll content in sunflower plants upon infection with <i>O. cumana</i>	111
5.3.4.	Determination of final degree of sunflower infection by <i>O. cumana</i>	114
5.4.	DISCUSSION	115
5.5.	ACKNOWLEDGMENTS	118
5.6.	REFERENCES	118
CAPÍTULO 6: Use of blue-green fluorescence and thermal imaging in the early detection of sunflower infection by the root parasitic weed <i>Orobanche cumana</i> Wallr.		123
	ABSTRACT	127
6.1.	INTRODUCTION	129
6.2.	MATERIALS AND METHODS	132
6.2.1.	Growth of healthy sunflower	132
6.2.2.	Inoculation with <i>O. cumana</i> , growth conditions and disease development	132
6.2.3.	Blue-green fluorescence imaging	133
6.2.4.	Spectrophotometrical determination of pigments concentration in leaves	133
6.2.5.	Thermal imaging	134
6.2.6.	Data processing and statistics	135

Índices

6.3. RESULTS	135
6.3.1. Blue-green fluorescence emission in healthy sunflower plants	135
6.3.2. Effect of <i>O. cumana</i> on BGF emission of sunflower	137
6.3.3. Carotenoids and total chlorophyll contents in sunflower leaves upon infection by <i>O. cumana</i>	139
6.3.4. Effect of <i>O. cumana</i> on the temperature of sunflower leaf	140
6.3.5. Assessment of the infection of <i>O. cumana</i> in sunflower	141
6.4. DISCUSSION	141
6.5. ACKNOWLEDGMENTS	145
6.6. REFERENCES	145
CAPÍTULO 7: DISCUSIÓN GENERAL	153
7.1. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157
CAPÍTULO 8: CONCLUSIONES GENERALES	161

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Razas de <i>Orobanche cumana</i> identificadas, en el pasado y en el presente, en varios países productores de girasol	22
Tabla 4.1. Localización geográfica (valle, localidad y finca) de campos de maíz afectados por marchitez tardía prospectados en 2011 y 2012, y nº de plantas (muestras) analizadas en cada campo	79
Tabla 4.2. Procedencia de plantas de maíz con síntomas de marchitez tardía seleccionadas para la identificación de la co-infección de <i>Cephalosporium maydis</i> y otras especies fúngicas en ellas	81
Tabla 4.3. Frecuencia (%) de identificación de <i>C. maydis</i> y otras especies fúngicas en los 19 campos de maíz prospectados en la Península Ibérica en los años 2011 y 2012	83
Tabla 4.4. Especies fúngicas identificadas y porcentaje (%) de similitud entre la secuencia analizada y las secuencias almacenadas en la base de datos de GenBank	84
Table 6.1. Measurements of pigments concentration (chlorophyll content, carotenoids content and chlorophyll/carotenoids ratio) for the second, third and fourth LP of sunflower plants inoculated with <i>Orobanche cumana</i> (I) and control plants (C) at 5 weeks after inoculation. Chlorophyll and carotenoids (xanthophylls and carotenes) content is expressed as content of chlorophyll <i>a</i> and <i>b</i> [Chl (<i>a+b</i>)], and [Car (<i>x+c</i>)] respectively, and chlorophyll/carotenoids ratio is expressed as Chl (<i>a+b</i>)/Car (<i>x+c</i>)	139
Table 6.2. Effect of <i>Orobanche cumana</i> infection on roots of sunflower and on the development of parasite tubercles 5 weeks after inoculation	141

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Ciclo del maíz	4
Figura 1.2. Evolución de la superficie cultivada (miles de hectáreas) y de la producción (miles de toneladas) de maíz en España	6
Figura 1.3. Síntomas de la marchitez tardía en maíz. A) Avance de la marchitez dentro una hoja; B) Progreso de la enfermedad desde las hojas inferiores hasta las superiores de la planta; C) Estriado en entrenudos basales del tallo; D) Secado y ahuecado en tallo de maíz; E) Plantas de variedad susceptible a <i>H. maydis</i> (izquierda) y de otra resistente (derecha) F) Mazorcas de plantas infectadas por <i>H. maydis</i> (arriba) y de plantas sanas (abajo)	9
Figura 1.4. Ciclo de patogénesis de <i>H. maydis</i> en una planta de maíz	10
Figura 1.5. A) Evolución de la producción mundial de girasol expresada en porcentaje entre 2009-2014, junto al nombre de cada aérea productora entre paréntesis se indica el valor de producción en el año 2014. B) Evolución de la producción (expresada en porcentaje) de girasol en la Unión Europea entre 2009-2014. Junto al nombre de cada aérea productora entre paréntesis se indica el valor de producción media en 2014. C) Producción de girasol en España y en Andalucía en el año 2014	15
Figura 1.6. Ciclo de patogénesis de <i>Orobanche</i> spp	19
Figura 4.1. Frecuencia (%) de identificación de distintas especies fúngicas en los aislamientos realizados a partir de plantas de maíz con síntomas de marchitez tardía en las que no se detectó a <i>Cephalosporium maydis</i> (A) y en las que si se recuperó <i>C. maydis</i> (B)	86
Figura 4.2. Esquema de una planta de maíz con la distribución de especies fúngicas aisladas en el tallo y en la inserción raíz-tallo; y frecuencia de aislamiento de cada una de las especies expresada como número de plantas donde se ha aislado la especie respecto al total de plantas analizadas en cada finca	87
Figura 4.3. Valores medios de síntomas aéreos y en raíces (A) y de los pesos de raíces, parte aérea (hojas y tallos) y mazorcas (B) de plantas de maíz inoculadas con <i>C. maydis</i> en comparación con plantas control no inoculadas	89
Figure 5.1. Progress of chlorophyll fluorescence emission on the first, second, third and fourth pair of true leaves of a healthy sunflower plant. Error bars represent the standard error of the mean of 8-12 replications. Time is expressed as weeks after transplanting	107
Figure 5.2. Mean measurements of F680 of the first (A), second (B), third (C) and fourth (D) leaf pair of sunflower plants inoculated with <i>Orobanche cumana</i> and control plants. Vertical bars represent the standard error of	108

the mean of 14-20 replications. Analyses of variance were conducted and asterisks indicate significant differences (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$)

Figure 5.3. Mean measurements of F740 of the first (A), second (B), third (C) and fourth (D) leaf pair of sunflower plants inoculated with *Orobanche cumana* and control plants. Vertical bars represent the standard error of the mean of 14-20 replications. Analyses of variance were conducted and asterisks indicate significant differences (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$) 109

Figure 5.4. Red fluorescence (F680) and far- red fluorescence (F740) images of the two first leaf pair (LP) of sunflower plants inoculated with *Orobanche cumana* and control plants at 2 and 2.5 growth weeks respectively. First LPs are marked with an arrow 110

Figure 5.5. Mean measurements of the F680/F740 ratio of the first (A), second (B), third (C) and fourth (D) leaf pair of sunflower plants inoculated with *Orobanche cumana* and control plants. Vertical bars represent the standard error of the mean of 14-20 replications. Analyses of variance were conducted and asterisks indicate significant differences (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$) 111

Figure 5.6. Total chlorophyll content of the first (A), second(B), third (C) and fourth (D) leaf pair of control plants and plants inoculated with *Orobanche cumana*. Vertical bars represent the mean of 12-20 independent measurements with their standard error. Analyses of variance were conducted at $P < 0.05$ and asterisks indicate significant differences (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$) 112

Supplementary Figure S1: Total chlorophyll content for the second, third and fourth LP sunflower plants inoculated with *Orobanche cumana* and control plants. Vertical bars represent the average of 8 independent measurements with their standard error. Analyses of variance at $P < 0.05$ between inoculated and control plants were conducted and asterisks indicate significant differences (* $P < 0.05$; **** $P < 0.001$) 114

Figure 6.1. Progress of blue-green fluorescence emission of the first, second, third and fourth pair of true leaves of a healthy sunflower plant. Error bars represent the standard error of the mean of 8 replications. Time is expressed as weeks after transplanting 136

Figure 6.2. Time-course of multicolor fluorescence emission of *Orobanche cumana*-inoculated sunflower plants and non-inoculated (control) plants throughout leaf development. Mean measurements of F440 (A), F520 (B), F440/F520 (C) and F440/F680 (D) of leaves and representative fluorescence images of 8 day-old leaves. Vertical bars represent the standard error of means of 14-48 replications. Analyses of variance at $P < 0.05$ between inoculated and control plants were conducted and values of significance are shown 138

Figure 6.3. Temperature progress of leaves of *Orobanche cumana*-inoculated sunflower plants and non-inoculated (control) plants. (A) Mean measurements of leaf temperature of both treatments. Vertical bars represent the standard error of means of 16-45 replications. Time is expressed as weeks after inoculation. (B) RGB and thermal images of the first two leaf pairs of inoculated and control plants 2.5 weeks after inoculation

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La aparición de enfermedades ha constituido durante siglos uno de los principales limitantes de la producción agrícola en todo el mundo. En el último siglo, el escenario de este problema se ha visto perturbado por el fenómeno del cambio climático y el impacto del mismo en los tres vértices del triángulo de la enfermedad (Gautam et al., 2013). Por otro lado, la necesidad de modelos agrícolas altamente productivos y sostenibles medioambientalmente aumenta la complejidad del manejo de enfermedades de los cultivos (Savary et al., 2012)

En este sentido, la búsqueda de estrategias de control que minimicen las pérdidas en producción por el agente patógeno pero que a la vez garanticen la sostenibilidad agraria resulta imprescindible en la actualidad (Mehta, 2014). Asimismo, identificar la enfermedad en etapas tempranas es fundamental en la eficacia de su manejo. De especial interés resulta la detección precoz en el caso de enfermedades sistémicas causadas por patógenos de suelo y caracterizadas por una sintomatología inespecífica y observable en estados avanzados de desarrollo del cultivo como ocurre con la Marchitez tardía del maíz. Igualmente ventajoso sería, por ejemplo, detectar la presencia de plantas parásitas de raíz durante la fase subterránea, previamente a la producción y diseminación de semillas, evitándose de esta forma la dispersión de la enfermedad. Este es el caso del jopo de girasol.

1.1. EL CULTIVO DE MAÍZ

El maíz (*Zea mays* L.) pertenece a la familia *Poaceae* (*Gramineae*). Aunque su origen es aún motivo de controversia, los últimos estudios lo sitúan en la región mesoamericana, probablemente en las tierras altas mexicanas. Los registros arqueológicos y el análisis filogenético sugieren que la domesticación comenzó hace al menos 6.000 años a partir de una gramínea silvestre del género *Zea* llamada *Zea mexicana* (teosinte) (Piperno y Flannery, 2001; Matsuoka et al., 2002). El maíz fue introducido en España y en Europa tras el descubrimiento de América y desde entonces se extendió por todo el mundo, particularmente en las zonas templadas (Paliwal, 2000; Farnham et al., 2003).

Durante su desarrollo se distinguen dos fases fisiológicas: la fase vegetativa, que finaliza con la formación de la inflorescencia masculina (VT), y la fase reproductiva, que se inicia con la inflorescencia femenina extendiéndose hasta la maduración de la misma (R6) (Ritchie y Hanway, 1982) (Fig.1.1).

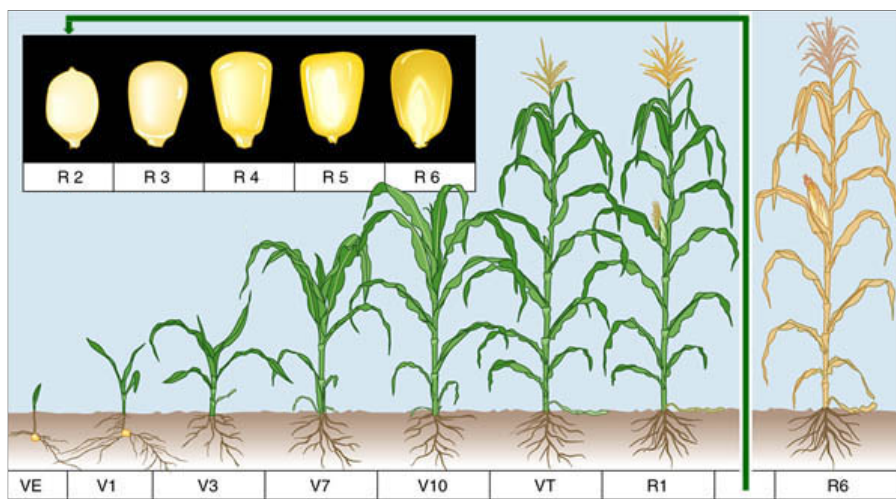


Figura 1.1. Ciclo del maíz. Fuente: (University of Illinois Extension, (http://corn.ucanr.edu/Crop_Development/)).

Este cultivo se caracteriza por una elevada demanda de nutrientes y por hacer un uso muy eficiente del agua medido en términos de producción de materia seca total, lo que lo sitúa como el cereal de grano de mayor rendimiento (FAO, 1993). Actualmente, el maíz es además el cereal de grano más producido a nivel mundial con 1.037,8 millones de toneladas en el año 2014, sobrepasando al trigo y al arroz. Aunque se encuentra ampliamente distribuido, la mayoría de la producción se concentra en las zonas templadas de los países desarrollados (FAOSTAT, 2016). EEUU es el primer productor a nivel mundial, con un notable aumento de la superficie cultivada en los últimos 20 años (USDA, 2016). Le siguen en orden de importancia China, Brasil, Unión Europea, Argentina, Ucrania e India. La Unión Europea concentra respectivamente el 60,1 y el 51,2% de la producción y superficie de Europa dedicada a este cultivo. Dentro de los países miembros de UE destacan Francia, Rumanía, Hungría, Italia, Alemania y España (FAOSTAT, 2016). En el caso de España el maíz es el cereal de grano con mayor extensión en regadío (MAPAMA, 2015b).

Como se puede apreciar en la Figura 1.2, la producción y superficie en nuestro país ha experimentado un ligero aumento en los últimos años. Esta tendencia en alza es extrapolable a lo ocurrido en el conjunto de la Península Ibérica en el mismo período (FAOSTAT, 2016). Castilla-León, Extremadura y Aragón concentran el 63,8% de la superficie española de maíz, mientras que Andalucía, con 31.346 ha (7%) en el año 2015, tiene la mayor parte del cultivo localizada en Sevilla y Córdoba (MAPAMA, 2015b).

Introducción

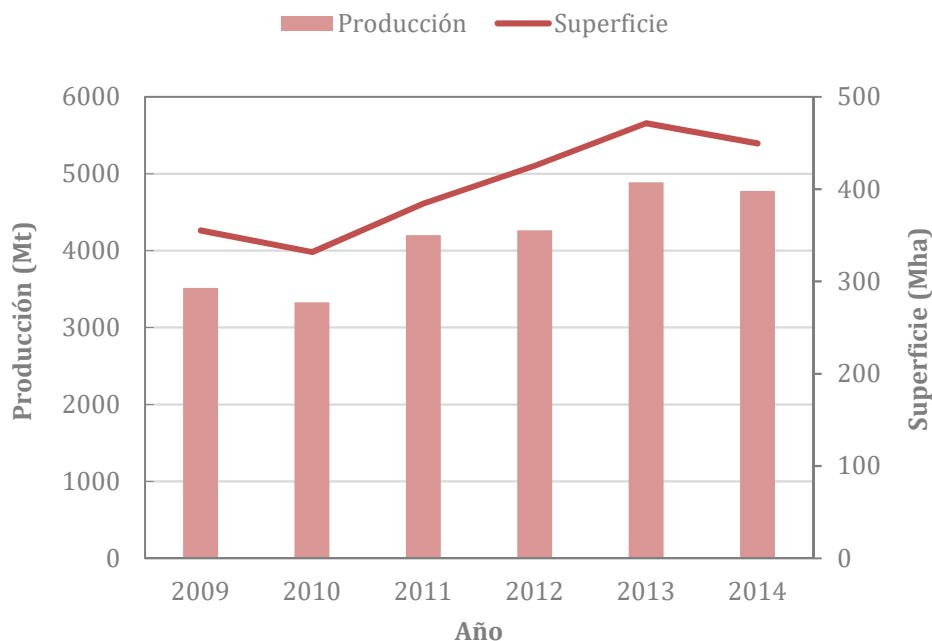


Figura 1.2. Evolución de la superficie cultivada (miles de hectáreas) y de la producción (miles de toneladas) de maíz en España. Fuente: Elaboración propia (FAOSTAT, 2016; MAPAMA, 2015b).

Los principales usos de este cereal son la alimentación humana, alimentación animal y el uso industrial. Dentro de este último, destaca en las últimas décadas la elaboración de etanol como combustible alternativo al petróleo. Así, elevadas cantidades de maíz son destinadas a la fabricación de este biocombustible principalmente en EEUU, hecho que ha provocado una subida de los precios de maíz y un aumento de la demanda (Ranum et al., 2014; USDA, 2016). A este incremento de la demanda, hay que añadirle el estimado por la FAO para el 2050 por el crecimiento de la población de 7.4 billones actuales a 9.3 billones (Shiferaw et al., 2011).

Para dar respuesta a estas necesidades, se ha incentivado el aumento de superficie dedicada al cultivo de maíz (Ranum et al., 2014). No obstante, sería también necesario incrementar el rendimiento del cereal a nivel mundial, hecho que precisa minimizar los efectos de los principales factores bióticos y abióticos limitantes de la producción (Shiferaw et al., 2011). En este sentido, especial

atención requieren las pérdidas en las cosechas en el mundo debido a plagas y enfermedades que se cifran en un 31% de la producción (Oerke et al., 2006).

En España no se dispone de datos publicados de las pérdidas debidas a la incidencia de patógenos en maíz, aunque sí se han descrito las principales enfermedades causadas por hongos y virus (Achón-Samá y Molinero-Ruiz, 2014). La Marchitez tardía en maíz (Molinero-Ruiz et al., 2010), la pudrición de tallo y “seedling blight” causadas por *Fusarium temperatum* J. Scauflaire et F. Munaut (Varela et al., 2015) y el virus del mosaico clorótico del maíz (Achón et al., 2017) forman parte de la lista de enfermedades de mayor repercusión económica en nuestro país.

1.2. LA MARCHITEZ TARDÍA DEL MAÍZ

La Marchitez tardía del maíz es una enfermedad vascular causada por el hongo de suelo *Magnaporthiopsis maydis* (Samra, Sabet & Hing.) Klaubauf, Lebrun & Craus [sinónimos *Harpophora maydis* (Samra, Sabet & Hing.) W. Gams y *Cephalosporium maydis* (Samra, Sabet & Hing.)]. Si bien Klaubauf et al. (2014) proponen al género *Magnaporthiopsis* para clasificar al agente causal de la marchitez tardía, en el texto nos referiremos como *H. maydis* por ser el nombre más extendido en la literatura científica en la actualidad.

La enfermedad fue descrita por primera vez en 1960 en Egipto (Samra et al., 1963), siendo posteriormente detectada también en India (Payak et al., 1970), Israel (Drori et al., 2013), Hungría (Pecsi y Nemeth, 1998) y España y Portugal (Molinero-Ruiz et al., 2010). Aunque no confirmada, también se ha sugerido su presencia en Italia, Rumania y Kenia (Bergstrom et al., 2008).

No se conocen cifras exactas de pérdidas de producción asociadas a la Marchitez tardía. No obstante, en campos de Egipto e India con elevada incidencia de la misma las pérdidas económicas superan el 51% (Johal et al., 2004). A su vez, Molinero-Ruiz et al. (2010) estiman unas pérdidas del rendimiento de grano del 50% en variedades susceptibles en campos de la Península Ibérica.

Introducción

Harpophora maydis no es un patógeno específico de maíz, habiéndose descrito también como agente causal de damping-off en preemergencia en altramuz blanco (*Lupinus albus* L.) en Egipto (Sahab et al., 1985). Además, *H. maydis* se ha descrito como un colonizador oportunista en raíces de algodón egipcio (*Gossypium barbadense* L.) causante de lesiones en el hipocótilo, pero no como agente patógeno de la especie (Sabet et al., 1966a; 1966b).

Varios trabajos previos han asociado a los hongos *Helminthosporium acremonium*, *Sclerotium bataticola* Taubenh., *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg y a bacterias de raíz con la infección causada por *H. maydis* en maíz (El-Shafey y Claflin, 1999). Sin embargo, se desconoce el papel que juegan estas especies fúngicas en el desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, Faizalla et al. (1994) observaron diferencias en la virulencia de aislados de *H. maydis* en función de su procedencia. Posteriormente, estudios de Zeller et al. (2000, 2002) y Saleh et al. (2003) obtuvieron diversidad en la capacidad colonizadora y virulencia de distintos aislados de *H. maydis* en Egipto.

Como su nombre indica, la Marchitez tardía aparece en fases avanzadas de desarrollo, en concreto los síntomas de marchitez se aprecian visualmente en torno al período de floración (anthesis masculina) extendiéndose hasta el final del ciclo (Samra et al., 1963). Como buen ejemplo de marchitez vascular, los síntomas son bastantes inespecíficos y se suelen distribuir en forma de rodales en los campos afectados.

Inicialmente, las hojas inferiores comienzan a secarse desde el borde a la nervadura central y estos síntomas ascienden rápidamente hasta las hojas superiores. Con el progreso de la infección, se visualiza también un estriado color marrón rojizo en los entrenudos basales del tallo, que comienza a secarse, encogerse y, en consecuencia, a quebrarse. Además, las mazorcas desarrolladas presentan menor número de granos por hilera e incluso, en infecciones severas, no llegan a desarrollarse (Samra et al., 1963) (Fig. 1.3).

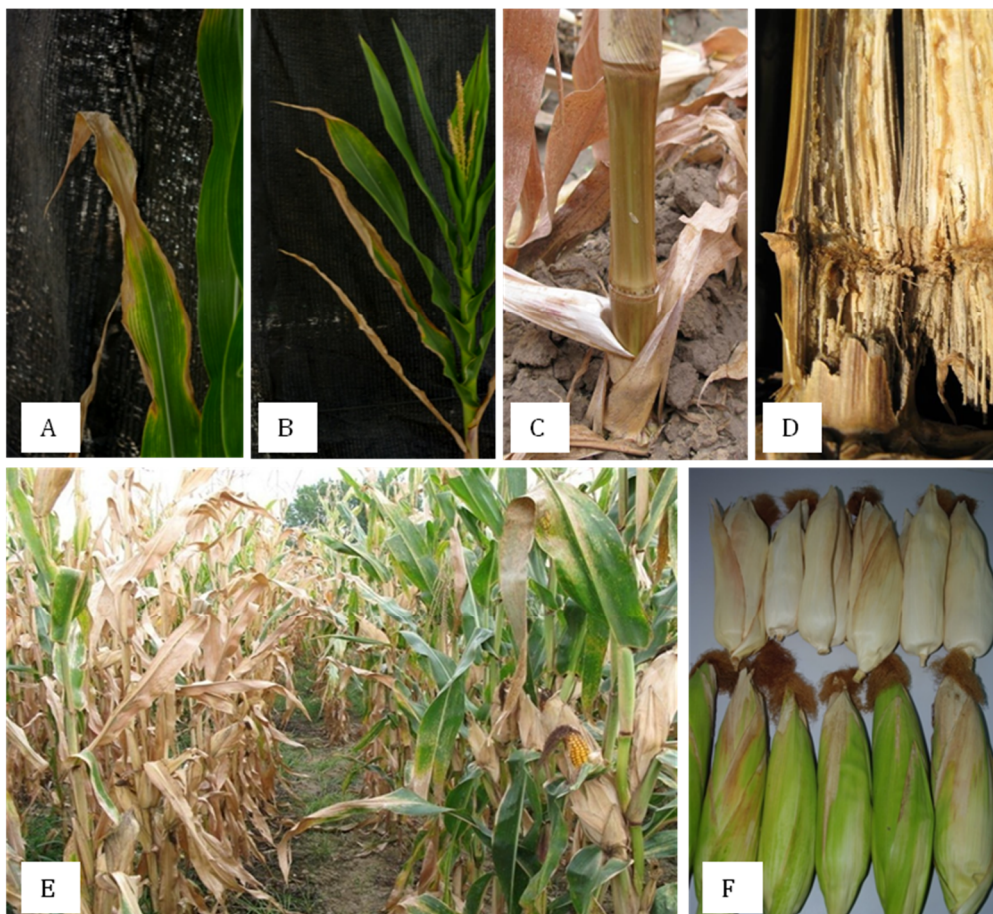


Figura 1.3. Síntomas de la marchitez tardía en maíz. A) Avance de la marchitez en la superficie de una hoja; B) Progreso de la enfermedad desde las hojas inferiores hasta las superiores de la planta; C) Estriado en entrenudos basales del tallo; D) Secado y ahuecado en tallo de maíz; E) Plantas de una variedad susceptible a *H. maydis* (izquierda) y de otra resistente (derecha); F) Mazorcas de plantas infectadas por *H. maydis* (arriba) y de plantas sanas (abajo).

El hongo infecta las plántulas de maíz durante el primer mes de crecimiento, y no se han detectado infecciones en plantas de más de 50 días (Sabet et al., 1970a). La infección ocurre a través del mesocótilo y de las raíces, no aconteciendo nunca a través del ápice de las mismas, como ocurre en otros hongos de suelo, ni a través de las hojas, ni aun siendo éstas dañadas previamente (Degani y Cernica, 2014). Una vez en la planta, *H. maydis* penetra en el xilema avanzando rápidamente en altura, especialmente tras la quinta semana desde la siembra

Introducción

(Sabet et al., 1970a). Cuando la infección es severa, el hongo puede colonizar las mazorcas, originando en algunos casos su pudrición (Khokhar et al., 2014).

En la Figura 1.4 se muestra el ciclo de patogénesis de *H. maydis* en una planta de maíz. Como puede observarse, este patógeno monocíclico puede diseminarse mediante semilla infectada, restos vegetales infectados presentes en el suelo y el propio suelo. En el suelo, las principales estructuras de supervivencia de *H. maydis*, los esclerocios, pueden permanecer viables hasta 10 meses a altas temperaturas (Singh y Siradhana, 1987a). En los restos vegetales los esclerocios pueden mantener su viabilidad entre 12 y 15 meses (Singh y Siradhana, 1987b). Además, la persistencia del inóculo se localiza en los 20 primeros centímetros de suelo (Sabet et al., 1970b).

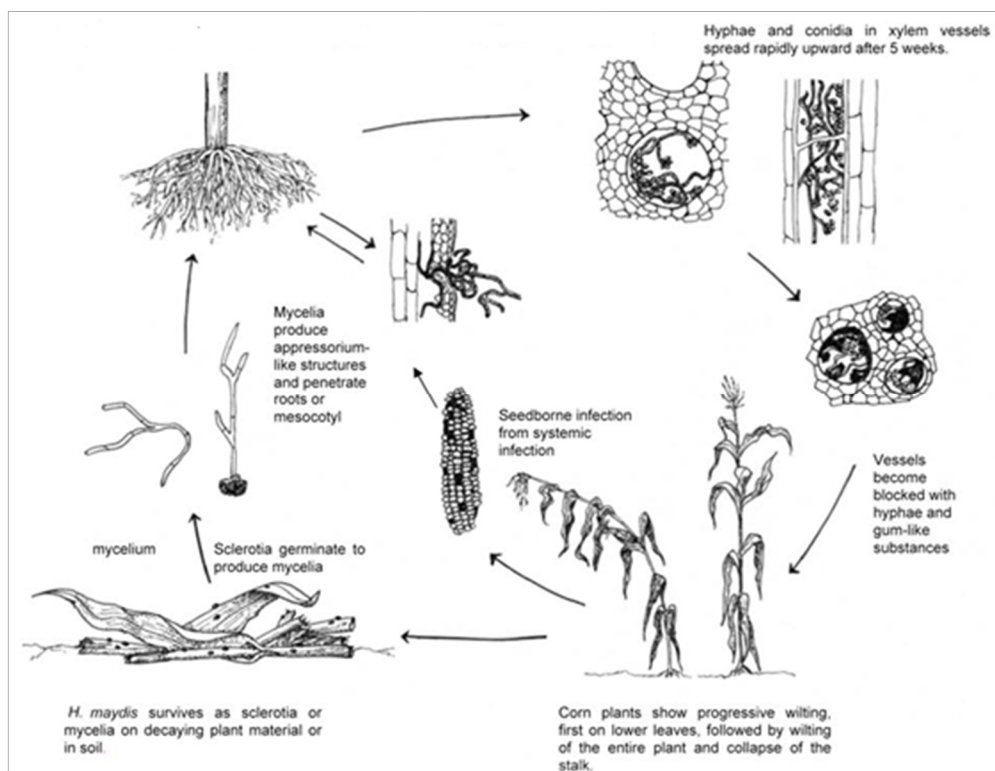


Figura 1.4. Ciclo de patogénesis de *H. maydis* en una planta de maíz (Johal et al., 2004).

La incidencia y el desarrollo de la enfermedad se ven altamente influidos por factores abióticos tales como el riego. Así, en plantas sometidas a estrés hídrico se intensifica la severidad de la enfermedad (Abd El Rahim et al., 1998). Por el contrario, no existen diferencias en severidad si se aplica el riego por goteo o a manta, aunque sí se observan retrasos en el momento de aparición de síntomas e incrementos en el rendimiento con riego localizado (Degani et al., 2014). La modificación de la fecha de siembra también supone una ventaja en la manifestación cuantitativa de los síntomas, obteniéndose buenos resultados en Egipto con siembras tempranas (El- Shafey et al., 1988) mientras que en la India se consiguen con siembras tardías (Singh and Siradhana, 1988). Por otro parte, a diferencia de otros hongos de suelo como *Fusarium oxysporum* Schltdl., el encharcamiento es muy perjudicial para *H. maydis* (Nigh, 1990; Samra et al., 1966). Otros factores que predisponen la infección son la temperatura y pH del suelo. Así, valores de temperatura y pH fuera del rango 20-32°C y 4-8 respectivamente, dificultan la infección (Degani y Goldblat, 2014).

Desde la aparición de la enfermedad han sido numerosos los estudios encaminados a desarrollar estrategias eficaces para su control. De esta forma, Faizalla et al. (1994) obtuvieron buenos resultados utilizando la solarización, siendo mayor la eficacia del tratamiento cuanto mayor fue el tiempo de duración de ésta; no obstante, esta medida de control fitopatológico resulta impracticable en cultivos extensivos. Paralelamente, Singh y Siradhana (1990) demostraron que altas dosis de nitrógeno reducían la severidad de los síntomas en las plantas, que mantenían elevados rendimientos. De forma similar, aplicando sulfato ferroso, sulfato de manganeso, sulfato de zinc y sulfato de cobre se redujo la severidad de la enfermedad (Singh y Siradhana, 1990). En contraste con estos resultados, el efecto del potasio no es consistente (Samra et al., 1966; 1972; Singh y Siradhana, 1990).

Otra alternativa ensayada en algunas ocasiones por su eficacia en el control de patógenos de suelo, es la adición de enmiendas orgánicas (Borrego-Benjumea et al., 2014). En este caso, la aplicación de enmiendas ricas en nitrógeno, preparadas con restos vegetales de cultivo de haba (*Vicia faba* L.) y bersín

Introducción

(*Trifolium alexandrinum* L.) también redujo la severidad de la enfermedad en condiciones experimentales (Dawood y Sabet, 1979).

Respecto al control biológico de la Marchitez tardía, varios organismos han demostrado ser prometedores como agentes de control. Así, seis actinomicetos (*Streptomyces graminofaciens* Charney; *S. gibsonii* Erikson, Waksman and Henrici; *S. lydicus* De Boer; *S. nogalater* Bhuyan and Dietz; *S. rochei* Berger et al.; y *S. anulatus*, Beijerinck, Waksman, emend. Lanoot et al.) y cinco levaduras (*Candida maltosa* Komag., Nakase & Katsuya; *C. glabrata* (H.W. Anderson) S.A. Mey. & Yarrow *C. slooffii* Uden & Carmo Souza; *Rhodotorula rubra* (Schimon) F.C. Harrison; *Trichosporon cutaneum* (Beurm., Gougerot & Vaucher bis) M. Ota) aislados de la rizosfera de plantas de maíz en Egipto redujeron significativamente la incidencia de *H. maydis* tanto *in vitro* como en el invernadero cuando se aplicaron mediante tratamiento de la semilla (El-Mehalawy et al., 2004).

La lucha química, por su parte, únicamente ha demostrado ser eficaz en el control de la enfermedad en condiciones experimentales. De este modo, Sabet et al. (1972) demostraron que varias materias activas fungicidas (benomilo, 2,6-Dicloro-4-nitroanilina, pentacloronitrobenzoceno y 5 - Amino - 1 - bis (dimetilamino) fosforil - 3 - fenil triazol - 1,2,4) inhiben el crecimiento *in vitro* de *H. maydis* , siendo el benomilo el tratamiento que mostró una mayor efectividad. No obstante, cuando estas materias activas se aplicaron al suelo durante la siembra en experimentos en maceta únicamente el benomilo redujó la severidad de la enfermedad (Sabet et al., 1972; Dawood y Sabet, 1979). No obstante, cuando el tratamiento con benomilo se realizó a la semilla no se consiguieron buenos resultados (Sabet et al., 1972). De manera similar, el efecto inhibitor del benomilo no se manifestó en condiciones de campo, independientemente del número de aplicaciones y momento de éstas (Sabet et al., 1972). Actualmente, Degani y Cernica (2014) han mostrado la eficacia de nuevas materias activas (azoxystrobin, flutriafol, prochloraz, boscalida (26.7%)-pyraclostrobin (6,7%)) en experimentos *in vitro*. Además, en el caso del azoxystrobin, la eficacia también es notoria en campo cuando el fungicida se aplica en repetidas ocasiones a lo largo del ciclo de cultivo. No obstante, efectuar varias aplicaciones encarece en exceso esta medida de control (Degani et al., 2014).

Por otro lado, experimentos *in vitro* llevados a cabo por Degani et al. (2015), han demostrado una reducción significativa del crecimiento micelial de *H. maydis* cuando se aplica auxina. Sin embargo, el efecto inhibitorio de la fitohormona no se ha mantenido en condiciones de campo, observándose similar severidad de síntomas en plantas regadas con una auxina sintética (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y en plantas control.

Pese a que el método de control más efectivo para la enfermedad hasta la fecha es el uso de variedades resistentes (El-Shafey et al., 1988; Zeller et al., 2000), la información sobre la herencia de la resistencia es escasa. Por un lado, algunos estudios genéticos sugieren el control poligénico de la misma, mientras que otros la consideran como una característica controlada por un único gen dominante (Bergstrom et al., 2008). Se han identificado hasta cinco *loci* parcialmente dominantes y con efecto aditivo sobre al menos otros tres *loci* que controlan la resistencia, o que implican tres genes principales. Dominancia y epistasia, y con menor frecuencia la aditividad, se han sugerido como los principales efectos en la resistencia. En base a lo anterior, resulta evidente la necesidad del desarrollo de marcadores genéticos específicos para la resistencia que faciliten la incorporación de esta característica genética en los híbridos comerciales (Bergstrom et al., 2008).

Basándose también en técnicas moleculares y con el objetivo de evitar la dispersión de la enfermedad a través de semillas, Drori et al. (2013) han puesto a punto un método para testar el estado sanitario de las mismas. Asimismo, la Marchitez tardía ha sido diagnosticada molecularmente 50 días después de la siembra y previamente a la aparición de síntomas tanto en variedades susceptibles como en otras parcialmente resistentes (Drori et al., 2013). No obstante, no hay constancia en la literatura actual de estudios que permitan la detección rápida, temprana y no destructiva de la enfermedad y que puedan aplicarse para el diseño de estrategias de control efectivas.

1.3. EL CULTIVO DE GIRASOL

El girasol (*Helianthus annuus* L.) pertenece a la familia Asteraceae (plantas compuestas). El cultivo es originario del oeste de América del Norte y se cree que su domesticación tuvo lugar alrededor del año 1000 a. C. Los exploradores españoles trajeron el girasol como una especie ornamental a Europa en 1510. Sin embargo, no fue sino hasta finales de 1800 cuando la flor fue introducida en Rusia y se mejoró genéticamente para incrementar el contenido de aceite en sus semillas. Actualmente el girasol es un cultivo oleaginoso de importancia mundial, y la principal fuente de aceite vegetal en el este de Europa (Moliner-Ruiz et al., 2015).

Aunque puede ser consumida directamente o usada en confitería, en la actualidad el principal aprovechamiento de la semilla de girasol es la extracción de aceite. El girasol, ocupa la cuarta posición a nivel mundial en producción de aceite, por detrás de la palma, soja y colza (FAOSTAT, 2016).

En general, los principales productores de aceite de girasol a nivel mundial coinciden con los principales productores de semilla, salvo Turquía, que ocupa un cuarto lugar en el ranking mundial de la producción de aceite de girasol sin tener una producción destacada de semilla (FAO, 2010). El cultivo de girasol ha tenido recientemente un creciente auge a nivel mundial, aumentando 17% de la superficie en la última década. Como se aprecia en la Figura 1.5A, países como Ucrania han triplicado su producción entre 2004 y 2014. Actualmente Ucrania es el primer productor mundial de aceite de girasol. La producción de girasol tiene en el este europeo a su máximo representante. Según datos estadísticos de la FAO del año 2014, la UE es el tercer productor mundial de esta oleaginosa, detrás de Ucrania y Rusia. Rumanía es el primer productor comunitario seguido de Bulgaria, Hungría y Francia. Fuera de la UE, destacan China y Argentina (FAOSTAT, 2016) (Fig. 1.5A).

Por su parte España, donde el girasol es la principal oleaginosa anual, sobre todo en el secano y como alternativa al cereal (ocupó una superficie de 792,382 ha en el año 2014), es el quinto país en importancia en producción a nivel comunitario y el tercero en superficie cultivada (FAOSTAT, 2016; MAPAMA,

2015a). Castilla- León, Castilla- la Mancha y Andalucía concentran el 93% de la producción destinada al girasol en nuestro país (Fig. 1.5, B y C)

La producción de girasol cultivada en Andalucía se concentra fundamentalmente en la parte occidental la misma, siendo Sevilla, Cádiz y Córdoba las principales provincias productoras (92% de la producción total de la comunidad andaluza). La única provincia donde no se cultiva girasol es Almería (MAPAMA, 2015a) (Fig. 1.5C).

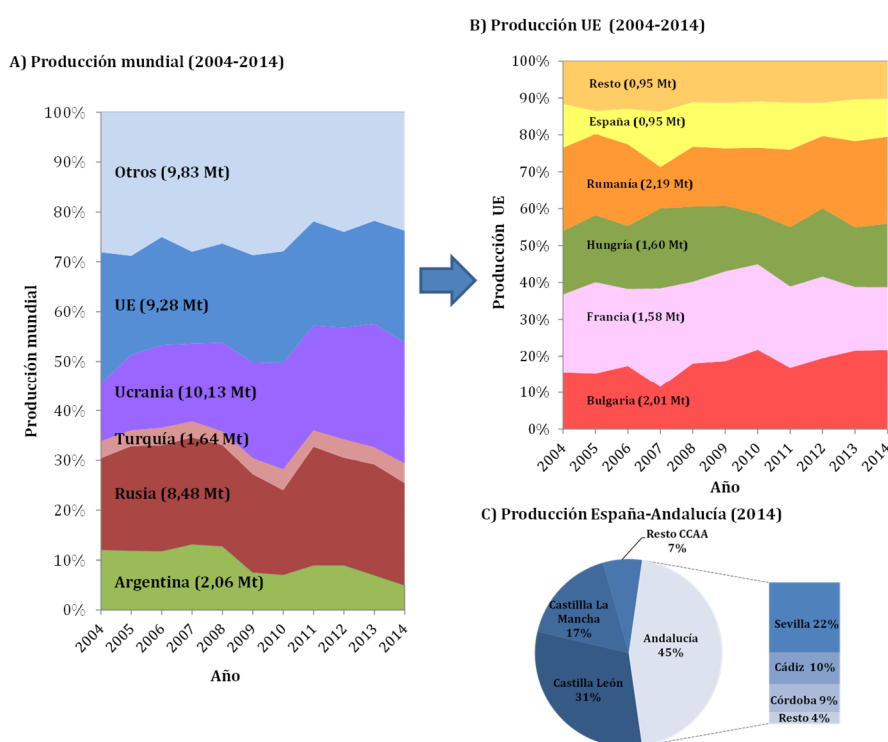


Figura 1.5. A) Evolución de la producción mundial de girasol expresada en porcentaje entre 2009-2014, junto al nombre de cada aérea productora entre paréntesis se indica el valor de producción en el año 2014. B) Evolución de la producción (expresada en porcentaje) de girasol en la Unión Europea entre 2009-2014. Junto al nombre de cada aérea productora entre paréntesis se indica el valor de producción media en 2014. C) Producción de girasol en España y en Andalucía en el año 2014. Elaboración propia (FAOSTAT, 2016; MAPAMA, 2015a).

Introducción

Las etapas fenológicas durante el ciclo del girasol pueden clasificarse en reproductivas y vegetativas (Schneider y Miller, 1981). Dentro de la fase vegetativa, la germinación de la semilla y la emergencia (que ocurre cuando los cotiledones están completamente expandidos) son las etapas más críticas para el rendimiento del cultivo. La fase reproductiva comienza con la aparición del botón floral y termina con la madurez fisiológica cuando las brácteas que conforman el capítulo adquieren un tono marrón (Alberio et al., 2015).

Si bien la estructura de los principales órganos vegetativos del girasol le permite crecer en suelos marginales, siendo más resistente a los estreses abióticos que otros cultivos (Škorić, 2009), la falta de estabilidad observada en la producción tanto mundial como europea a lo largo del tiempo (Fig. 1.5, A y B) tiene en la notable sensibilidad del cultivo a la sequía su principal causa, especialmente en Europa del Este. No obstante, la mejora genética ha avanzado mucho en este sentido y aprovechando el carácter stay-green (senescencia foliar demorada) se han conseguido variedades con buena adaptación al estrés hídrico (Škorić 2009; 2016). Igualmente, aunque con menor éxito que en el caso de la sequía, se ha progresado en la adaptación de diferente material genético a salinidad, estrés térmico y deficiencias nutritivas (Škorić 2009; 2016).

Respecto a la reacción del girasol a estreses de tipo biótico, como son las enfermedades, ha constituido un gran desafío para los mejoradores desde que se establecieron los primeros programas de mejora en Rusia (Vear et al, 2016; Velasco et al., 2016). Aquellos programas tuvieron como objetivo, junto con el incremento en contenido de aceite de la semilla, la incorporación de la resistencia genética al jopo (*Orobancha cumana* Wallr.) y al mildiu (*Plasmopara halstedii* Farl. Berl. and de Toni). Aunque el control de estas enfermedades y de otras, como la verticilosis causada por el hongo *Verticillium dahliae* Kleb., es posible por la vía genética, la aparición de nuevas razas de estos patógenos (Molinero-Ruiz et al., 2002; García-Ruiz et al., 2014; Molinero-Ruiz et al., 2015) obliga a la continua búsqueda e incorporación de fuentes de resistencia y hace que el control genético sea un proceso dinámico a lo largo del tiempo.

1.4. JOPO EN GIRASOL

Globalmente, el principal limitante de tipo biótico de la producción de girasol es el jopo (*Orobanche cumana* Wallr.), planta holoparásita de raíz que, al carecer de clorofila, necesita de la planta hospedante todo lo necesario para completar su ciclo de vida. *Orobanche cumana* fue descrita por primera vez como parásita de girasol en Rusia por Wallroth (1825) donde, hasta ese momento, su patogenicidad se había restringido a plantas silvestres del género *Artemisia* (Antonova et al., 2014). Desde entonces, se ha ido extendiendo por las principales zonas productoras de girasol encontrándose en la actualidad presente en todas las regiones donde se cultiva la oleaginosa excepto en el Norte y Sur de América (Molinero-Ruiz et al., 2015).

En España esta enfermedad fue detectada por primera vez en 1958 en Cuenca en girasol para consumo directo, pero no fue hasta los años 70 cuando adquirió importancia coincidiendo con la llegada a España de cultivares de girasol oleaginoso. Además de en Cuenca, el jopo en España se localiza principalmente en el Valle de Guadalquivir y en provincias de Castilla-León como Soria, Valladolid y Burgos (Molinero-Ruiz y Domínguez, 2014).

Aunque no se conocen las cifras exactas acerca de la incidencia de la enfermedad a nivel mundial, Fernández- Martínez et al. (2015) estiman que en la actualidad entre 15-20% de la superficie total cultivada de girasol está infestada por jopo. Las pérdidas económicas asociadas a la infección oscilan en torno al 50% en el caso de híbridos susceptibles y pueden alcanzar el 100% en suelos con elevado grado de infestación. Otros factores que condicionan las pérdidas causadas por el jopo de girasol son la agresividad de la planta parásita, el momento de emergencia del cultivo y las condiciones ambientales (Domínguez et al., 1996; Molinero-Ruiz et al., 2009; Jestin et al., 2014).

Orobanche cumana pertenece al género *Orobanche*, 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. (syn. *Phelipanche*)

Introducción

perteneciendo las especies de mayor importancia agronómica y económica a las secciones *Trionychon* y *Osproleon* (Gevezova et al., 2012). En cuanto a la gama de huéspedes, a diferencia de otras holoparásitas del género *Orobanche*, como son *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel y *P. aegyptiaca* (Pers.) Pomel, que parasitan a un gran número de especies, *O. cumana* encuentra en el girasol a su único hospedante (Parker et al., 2013). El cultivo también puede ser parasitado en menor escala por otras especies del género como *P. aegyptiaca* (Fernández- Martínez et al., 2015).

El proceso de infección de *O. cumana* en girasol comienza cuando, tras un periodo de acondicionamiento que varía en función de la temperatura, humedad y características del suelo (Lechat et al., 2015), las semillas de jopo de girasol se activan y germinan en respuesta a sustancias químicas (estrigolactonas, sesquiterpeno lactonas y heliolactonas) producidas y exudadas por las raíces (Joel et al., 2011; Yoneyama et al., 2011; Raupp y Spring, 2013; Ueno et al., 2014). En caso de no darse las condiciones favorables en el medioambiente de la semilla, ésta entra en una segunda fase de dormancia que se extiende hasta que exista un escenario propicio para la germinación (Matusova et al., 2004).

Durante la germinación, la semilla produce un tubo germinativo conocido como procauloma que crece hacia la planta hospedante por quimiotropismo positivo, alcanza el tejido radical y se adhiere a él (Joel y Losner-Goshen, 1994). Seguidamente, el ápice del procauloma se engrosa formando una estructura llamada apresorio que, a su vez, forma unas células intrusivas. Estas penetran en la endodermis mediante procesos enzimáticos y mecánicos y sin destruir células del hospedante, y finalmente se convierten en un órgano especializado llamado haustorio que alcanza el cilindro central mediante conexiones vasculares con la planta hospedante, quedando así integrada fisiológicamente con ella (Hibberd y Jeschke et al. 2001; Vérenosi et al., 2007). Este momento supone el inicio de la fase parasítica, pues hasta entonces la semilla se ha mantenido a expensas de las sustancias de reserva acumuladas en su interior (Joel et al., 1995). Una vez establecidas las conexiones vasculares, el haustorio crece y se convierte en un órgano de almacenamiento llamado nódulo. El nódulo produce unas falsas raíces adventicias carentes de pelos absorbentes y que origina, a partir de uno de sus

meristemos apicales, un tallo erecto con brácteas y flores que tras la fecundación generan nuevas semillas (Westwood et al., 2013; Delavault et al., 2014) (Fig. 1.6).

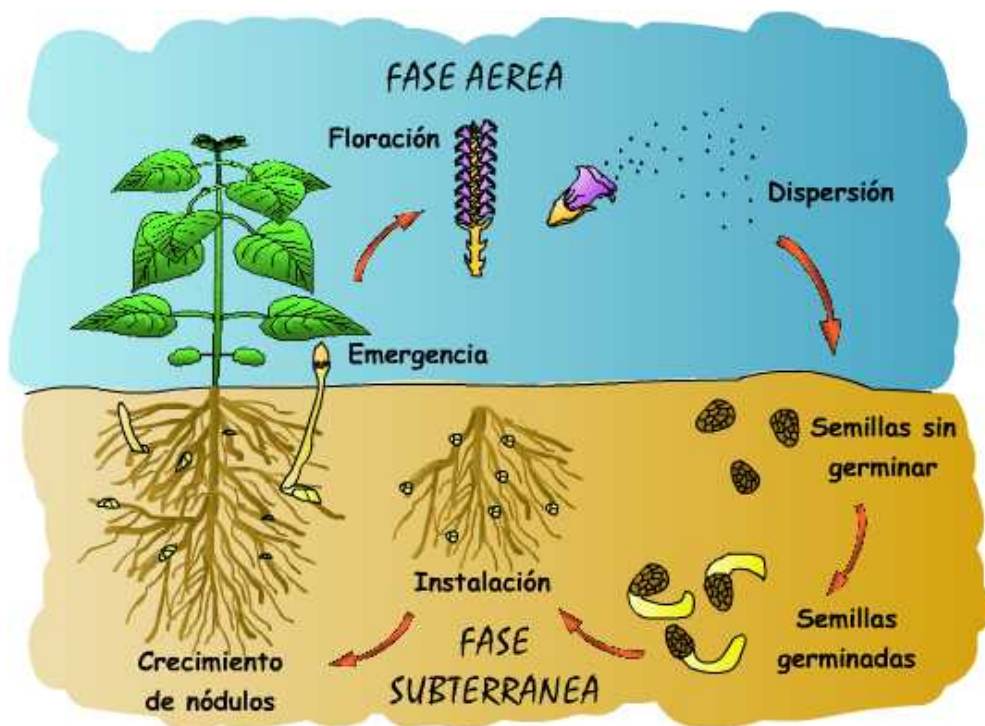


Figura 1.6. Ciclo de patogénesis de *Orobanche* spp. (Rispaíl et al., 2007).

Cada tallo de jopo puede originar entre 50.000- 500.000 semillas (Gevezova et al., 2012) que diseminan con notable facilidad a través del agua, viento, personas, maquinaria agrícola o animales entre otros (Castejón et al., 1991) infestando nuevas áreas. Estas semillas se caracterizan por sus diminutas dimensiones (Joel et al., 1987) y su elevada persistencia en el suelo, donde pueden permanecer viable en dormancia durante décadas mientras no exista un hospedante adecuado (Prider et al., 2013). En este sentido, trabajos previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que la viabilidad de semillas de *O. cumana* se mantiene al menos tras 17 años de almacenamiento en condiciones de laboratorio (Molinero-Ruiz et al., 2008).

Introducción

Los síntomas de la infección por *O. cumana* suelen hacerse evidentes con la emergencia de los tallos de la planta parásita en la base de la planta girasol, hecho que suele coincidir con la formación del botón floral de ésta y que comprende los estados fenológicos R1-R5 (Schneider y Miller, 1981). Desde entonces, se observa un retraso en el crecimiento del girasol (Alcántara et al., 2006) que se hace más evidente alrededor del momento de la floración, cuando se observan plantas con menor altura, capítulos florales de reducido tamaño o con menor número de semillas, síntomas de marchitez e incluso, cuando las infecciones son graves, las plantas pueden morir (Molinero-Ruiz et al., 2015).

Una de las particularidades del patosistema *O. cumana* - girasol que lo diferencia de aquellos de los que forman parte otras especies de *Orobancha* es la existencia de razas fisiológicas como resultado de los mecanismos de resistencia de la planta al patógeno (principalmente de tipo cualitativo o vertical) (Vrânceanu et al., 1980; Molinero-Ruiz et al., 2009). Las primeras razas de jopo de girasol fueron identificadas en Rusia a principios del siglo 20 (Vrânceanu, 1977). Varias décadas más tarde, en los años 80, Vrânceanu et al. (1980) identificaron en Rumanía hasta cinco razas de *O. cumana* distintas (A-E) así como los cinco genes dominantes de girasol que conferían resistencia a cada una de ellas (*Or₁-Or₅*). Desde entonces se han detectado en diversos países nuevas poblaciones capaces de sobrepasar la resistencia del gen *Or₅* y que se han caracterizado por tanto como raza F. En España la raza F se identificó hace unos 20 años distribuyéndose desde entonces ampliamente en el sur (Molinero-Ruiz et al., 2006; 2009) y en el centro y norte del país (Fernández-Escobar et al., 2008; Molinero-Ruiz y Dominguez, 2014). En el caso de la raza F de *O. cumana*, la resistencia del girasol está controlada por dos alelos en *loci* recesivos (Akhtouch et al., 2002) o por dos genes: *Or₆*, con dominancia incompleta, y *Or₇*, cuya expresión depende de las condiciones medioambientales (Velasco et al., 2007). Más aún, se han identificado diversos *loci* de caracteres cuantitativos (QTL) relacionados mayormente con la resistencia del girasol a la raza F de *O. cumana* y asociados con una reducción del número de tallos de jopo por planta de girasol (Pérez-Vich et al., 2004) o incluso con la necrosis de nódulos de la planta parásita (Labrousse et al., 2001).

En los últimos años se han identificado poblaciones de *O. cumana* que superan la resistencia a la raza F y que se han denominado razas G y/o H. Estas poblaciones se localizan en Bulgaria, China, Kazakstán, Rumania, Rusia, Turquía y Ucrania, pero no se han identificado en España, donde las razas de *O. cumana* predominantes siguen siendo la E y la F (Tabla 1.1). En cualquier caso, los esfuerzos por buscar fuentes de resistencia efectiva frente a las razas G y/o H de *O. cumana* han resultado en la identificación de material de *Helianthus* resistente en Bulgaria (Christov, 2012), España (Velasco et al., 2012), Rumanía (Pacureanu-Joita et al., 2008) y Serbia (Cvejić et al., 2014).

Aunque, como se observa en la Tabla 1.1, en la actualidad las razas de *O. cumana* presentes en España son la E y la F, recientemente Martín-Sanz et al. (2016) han sugerido la existencia de nuevas poblaciones de la planta parásita localizadas en el Valle del Guadalquivir que superan la resistencia de algunas líneas de girasol a la raza F pero que no llegan a ser tan virulentas como la raza G de otros países, de ahí que se hayan caracterizado como G_{GV} (raza G, Guadalquivir Valley) para distinguirlas de dichas razas G.

Introducción

Tabla 1.1. Razas de *Orobanche cumana* identificadas, en el pasado y en el presente, en varios países productores de girasol

País	Razas de <i>O. cumana</i> identificadas ^a		Referencias
	Pasado	Presente	
Bulgaria	A, B, C, D, E	E, F, G	Shindrova, 2006; Batchvarova, 2014
China	A	A, B, C, D, E, F, G	Ma & Jan, 2014; Shi <i>et al.</i> , 2015
Francia	No presente	NC ^b	Jestin, 2012; Jestin <i>et al.</i> , 2014
Hungría	A, B, C, D	E, F	Zoltán, 2001; Hargitay, 2014; Molinero-Ruiz <i>et al.</i> , 2014
Kazajstán	NC	C, G	Antonova, 2014
Moldavia	B, C	E, F	Gisca <i>et al.</i> , 2013; Duca, 2014
Rumanía	A, B, C, D, E	F, G	Vrânceanu <i>et al.</i> , 1980; Pacureanu-Joita <i>et al.</i> , 2008; Pacureanu, 2014
Rusia	A, B, C, D	D, E, F, G, H	Tolmachyov, 1990; Antonova <i>et al.</i> , 2009; 2013; Antonova, 2014
Serbia	B, E	E	Mihaljčević, 1996; Miladinovic <i>et al.</i> , 2014
España	B, C, D, E	E, F	González-Torres <i>et al.</i> , 1982; Melero-Vara <i>et al.</i> , 1989; Saavedra Del Río <i>et al.</i> , 1994; Alonso <i>et al.</i> , 1996; Molinero-Ruiz <i>et al.</i> , 2006; Fernández-Escobar <i>et al.</i> , 2008; Molinero-Ruiz <i>et al.</i> , 2009; Molinero-Ruiz y Dominguez, 2014
Turquía	NC	F, G	Kaya <i>et al.</i> , 2004; 2012; Molinero-Ruiz <i>et al.</i> , 2014
Ucrania	A, B, C, D	E, F, G	Tolmachyov, 1990; Pototskyi, 2014

^a "Presente" se refiere al año 2014 y "Pasado" a décadas anteriores.

^b NC= no conocido; Se identificó al parásito, pero no se conoce la raza/s (adaptado de Molinero-Ruiz *et al.*, 2015)

Ante este complejo escenario de continua aparición de nuevas razas de *O. cumana* que superan la resistencia genética del cultivo, han sido numerosos los estudios para buscar métodos de control de la enfermedad más allá del control genético. De hecho, distintas prácticas agronómicas como el tipo de laboreo, la elección fecha de siembra o un adecuado programa de fertilización pueden repercutir en la incidencia de jopo en diversos cultivos (Rubiales *et al.*, 2009;

Akhtouch et al., 2013; Zhang et al., 2015). Apostar por el mínimo laboreo como alternativa al laboreo convencional permite disminuir el banco de semillas de *Orobancha* spp. y de *Phelipanche* spp. del suelo (Rubiales et al., 2009). Por otro lado, retrasar la fecha de siembra puede reducir el número de jopos por planta de girasol en híbridos moderadamente resistentes bajo riego (Akhtouch et al., 2013). Igualmente, Sugimoto et al. (2014) y Zhang et al. (2015) han demostrado que el aumento de macronutrientes (N y P) disminuye la exudación de estimulantes de la germinación de semillas de *O. cumana* por parte del girasol y del tabaco respectivamente. Este hecho coincide con lo observado recientemente por Trabelsi et al. (2017) en haba (*Vicia faba* L.) como consecuencia de la infección por *O. foetida* Poir. y por *O. crenata* Forsk y podría tener relación con que la presencia de jopo en este cultivo haya estado siempre asociada a suelos con baja fertilidad (Parker et al., 2013).

Otra práctica cultural muy recomendable para reducir el banco de semillas en el suelo es la rotación con cultivos trampa, esto es, especies vegetales que poseen la capacidad de estimular la germinación de las semillas de la planta parásita sin resultar parasitadas. En este sentido, Fernández-Aparicio et al. (2009) describieron el algodón (*Gossypium hirsutum* L.) como cultivo trampa de jopo de girasol. Posteriormente se ha observado esta capacidad también en maíz (Ma et al., 2013), soja (*Glycine max* L. Merr.) (Zhang et al., 2013), pasto varilla (*Panicum virgatum* L.) (An et al., 2015) y otras especies vegetales (Antonova et al., 2015; Ye et al., 2017). Esta germinación suicida de semillas de *O. cumana* también puede conseguirse mediante la aplicación de estimulantes de origen natural o sintéticos (Fernández-Aparicio, 2011; Lachia et al. 2015; Cala et al., 2016; Lumbroso et al., 2016). En general, los estimulantes naturales de la germinación de plantas parásitas (*Orobancha* spp., *Phelipanche* spp. y *Striga* spp.) son muy costosos de sintetizar, por lo que se está priorizando la investigación en los sintéticos (Screpanti et al., 2016). Otras de las limitaciones de esta alternativa, tanto en versión natural como sintética, son, entre otras, la limitada persistencia de los estimulantes en el suelo, su difícil movilidad en el perfil del suelo, y el requerimiento de un riego previamente a su aplicación (Screpanti et al., 2016; Vurro et al., 2016).

Introducción

Si bien sólo demostrada en condiciones experimentales, una reciente y prometedora estrategia para reducir el nivel de inóculo en un suelo infestado por especies parásitas de los géneros *Orobanche*, *Phelipanche* y *Striga* es disminuir la cantidad de estrigolactonas exudadas por la raíz del hospedante mediante el uso de hongos degradadores de las mismas, entre los que destacan *Trichoderma harzianum* Rifai y *Fusarium oxysporum* Schltdl. (Boari et al., 2016). También se ha demostrado el potencial de las larvas del insecto *Phytomyza orobanchia* Kalt. (Diptera, Agromyzidae) en el control de jopo de girasol (Klein y Kroschel, 2002). Además, es notable el éxito de bioherbicidas formulados a partir del hongo de suelo *F. oxysporum* f.sp. *orthoceras* (Appel & Wollenw.) Bilai tanto en condiciones de laboratorio como de campo (Shabana et al., 2003; Müller-Stöver et al., 2004).

Hace pocos años, Lourn et al. (2012) han evidenciado el efecto negativo de micorrizas arbusculares [*Rhizophagus irregularis* (Blaszk., Wubet, Renker & Buscot) C. Walker & A. Schüßler y *Gigaspora rosea* T.H. Nicolson & N.C. Schenck] en la germinación de *O. cumana*. De forma similar, Maširević et al. (2014) han observado la eficacia, en condiciones de laboratorio, de un preparado comercial, Trifender basado en *T. asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg para reducir la germinación de semillas de *O. cumana* así como la longitud del tubo germinativo de las semillas germinadas. En experimentos en macetas, *Streptomyces enissocaesilis* Sveshnikova también ha reducido significativamente el número de nódulos de *O. cumana* en raíces de girasol, a la vez que se ha incrementado su actividad polifenol oxidasa y se ha mejorado la microflora beneficiosa en el suelo de la rizosfera (Chen et al., 2016). Este último hecho resulta muy interesante, ya que se ha comprobado que la infección de *O. cumana* disminuye las poblaciones de los principales grupos tróficos de la comunidad de microorganismos presentes en el suelo, teniendo mayor impacto en los hongos microscópicos (Hristeva y Denev, 2017). No obstante, para utilizar esta herramienta de biocontrol en condiciones de campo sería necesaria la puesta a punto de un método de aplicación que garantizara una máxima viabilidad en el suelo (Chen et al., 2016). Recientemente, Yang et al. (2016), en experimentos en macetas, también han observado una reducción en el número de nódulos de *O. cumana* establecidos en la raíz posteriormente al tratamiento de las semillas con ácido salicílico. En cualquier caso, los anteriores métodos o bien sólo han sido evaluados en condiciones de invernadero o los que han sido

evaluados en campo son pocos rentables o no han alcanzado aún una eficacia comparable a la obtenida con el uso de variedades de girasol resistentes a *O. cumana* o variedades resistentes a herbicidas selectivos (Molinero-Ruiz et al., 2015; Fernández-Martínez et al., 2016; Fernández-Aparicio et al., 2016).

Respecto a resistencia genética a *O. cumana*, inicialmente este carácter fue desarrollado a partir de girasol cultivado mediante selección individual y siempre en base a la naturaleza vertical de la resistencia regulada de forma monogénica, dominante y específica de cada raza (Pérez-Vich et al., 2013). Sin embargo, la aparición de nuevas razas más virulentas hizo necesaria la búsqueda de nuevas fuentes de resistencia (Gulya et al., 1994), en muchos casos procedente de *Helianthus* spp. silvestres. Con el uso de estas especies, tanto anuales como perennes, para la obtención de material genético resistentes a nuevas razas de jopo (incluida la raza G) mediante hibridación interespecífica o introgresión, se han conseguido resultados muy satisfactorios tanto en variedades anuales como perennes (Christov et al., 2009, 2012; Velasco et al., 2012; Christov et al., 2013; Seiler et al., 2017). Por otra parte, numerosos autores sugieren la utilidad de la piramidación de genes y la combinación de mecanismos de resistencia verticales y horizontales como nuevas estrategias para conseguir una resistencia genética durable y estable a esta planta parásita (Molinero- Ruiz et al., 2009; 2015; Fernández-Martínez et al., 2015; Lourn et al., 2016; Velasco et al., 2016).

Compatible con la resistencia genética a jopo, la resistencia genética a herbicidas selectivos unida a la aplicación de dichos herbicidas en post-emergencia es el otro método de control de *O. cumana* más eficaz en la actualidad. A finales de los años 90, las aplicaciones en post-emergencia de dos herbicidas del grupo de las imidazolininas (Imazapyr e Imazethapyr) permitieron controlar *O. cumana* debido a la aparición de resistencia en poblaciones silvestres de *H. annuus* de forma espontánea (García-Torres et al., 1995; Alonso et al, 1998; Al-Khatib et al, 1998). Al poco tiempo, a través de la introgresión en girasol cultivado de alelos de resistencia a imidazolinonas derivados de las poblaciones silvestres de girasol (Al-Khatib et al, 1998) o desarrollados por mutagénesis (Sala et al., 2008), se obtuvieron híbridos tolerantes a estos herbicidas que se denominaron Imisun. De forma similar, desde entonces se han desarrollado híbridos de girasol tolerantes a herbicidas de la

Introducción

familia de las sulfonilureas (Tan et al., 2005) que también permiten el control de *O. cumana* mediante la aplicación de estos herbicidas (Demirci y Kaya, 2009). Actualmente hay tres tecnologías diferentes de tolerancia a herbicidas en girasol disponibles: la tecnología Clearfield y la tecnología Clearfield Plus, basadas en la resistencia del girasol a imidazolinas, y la tecnología asociada a la resistencia a herbicidas de la familia de las sulfonilureas, que engloba a girasoles SU tolerantes y ExpressSun (Sala et al., 2012). No obstante, la formulación de nuevos herbicidas y el desarrollo de variedades de girasol con resistencia a ellos está en continuo desarrollo (Molinero-Ruiz et al., 2015).

Por último, es necesario mencionar que Eizenberg et al. (2012) han diseñado un modelo predictivo basado en la relación entre la temperatura del suelo y la infección por *O. cumana* que permite conocer el estado de desarrollo de la planta parásita previamente a su emergencia. Aparte de este modelo predictivo, no se conoce hasta la fecha ninguna tecnología que permita la detección no destructiva de la planta parásita durante la fase subterránea. Respecto a la detección de especies después de que emerjan, trabajos realizados por Gutiérrez et al. (2008), Peña et al. (2014) y López-Granados et al. (2016) mediante el uso de drones han permitido detectar la presencia de malas hierbas que afectan al girasol, como *Ridolfia segetum* (L.) Moris, *Amaranthus blitoides* S. Wats, *Sinapis arvensis* L., *Convolvulus arvensis* L. y *Chenopodium album* L. en estadios tempranos de desarrollo de las mismas. Sin embargo, la detección de especies localizadas dentro de la línea de cultivo, como es el caso de *O. cumana*, no se ha conseguido hasta el momento.

1.5. DETECCIÓN NO DESTRUCTIVA DE ENFERMEDADES EN PLANTAS

Numerosas son las pérdidas económicas en la agricultura asociadas a la presencia de enfermedades (Strange y Scott, 2005). La detección precoz de patógenos es fundamental para reducir su propagación y facilitar su control. Tradicionalmente, la detección estaba basada en la exploración visual de síntomas y confirmación del diagnóstico mediante métodos microbiológicos y/o basados en el análisis del ADN, pero dichos métodos, además de lentos son costosos y destructivos y pocos efectivos en la identificación presintomática de patógenos sistémicos (Fang y Ramasamy, 2015; Martinelli et al., 2015). Como alternativa, existen métodos indirectos como las técnicas espectroscópicas (aplicadas fundamentalmente a medidas en hoja) y técnicas de imagen (usadas tanto nivel de hoja como de planta) basadas en el infrarrojo térmico, en la fluorescencia y en la reflectancia en el rango visible y en el infrarrojo cercano que superan los inconvenientes anteriores facilitando una detección rápida y no destructiva. Existen otras técnicas novedosas en la detección no destructiva de patógenos, como la detección de compuestos volátiles (Becker et al., 2014; Niederbacher et al., 2015), pero en este apartado nos centraremos en los más extendidos en la actualidad: termografía-termometría, fluorescencia y reflectancia (Oerke et al., 2014; Raji et al., 2015; Mahlein et al., 2016; Simko et al., 2016).

1.5.1. Termometría y termografía

Además de ser una vía de entrada de algunos patógenos en las plantas, los estomas juegan un papel importante durante el desarrollo de enfermedad ya que su apertura y/o cierre son activados como mecanismo de respuesta a la infección (Gómez-Gómez y Boller, 2002; Jones y Dangl, 2006). Estas alteraciones en la conductancia estomática, y por ende en la transpiración, provocan cambios en la temperatura de la hoja debido a la inversa correlación entre ambas variables, lo que convierte a la temperatura foliar en un buen indicador tanto de la fotosíntesis como del estado hídrico de la planta (Jones et al. 1998).

Introducción

Las medidas térmicas foliares pueden adquirirse bien mediante termometría bien mediante termografía infrarroja, aunque ambas técnicas están basadas en la medición de la radiación infrarroja (región comprendida entre 8-14 μm) emitida por todos los cuerpos a temperatura mayor de 0 grados Kelvin. Mientras que en la termometría se obtiene un valor, en la termografía de imagen la radiación se transforma en imágenes, donde la temperatura viene dada en una falsa escala de color (Chaerle y Van Der Straeten, 2000; 2001).

La rapidez de estas técnicas, unida a su carácter no invasivo, hace que sean poderosas herramientas en la detección de estreses de origen biótico y abiótico en numerosos cultivos (Vadivambal y Jayas, 2011; Ishimwe et al., 2014; Grant et al., 2016). En este sentido, en los últimos años se han conseguido muy buenos resultados en el caso de la detección de enfermedades fúngicas. Por ejemplo, la infección causada por *Plasmopara viticola* (Berk & Curt) Berl. & de Toni en uva (*Vitis vinifera* L. cv. *Riesling*) ha sido monitorizada en condiciones de invernadero y bajo diferentes tratamientos de riego demostrándose que el ataque por el patógeno puede ser detectado hasta 3 días antes de la aparición de síntomas visibles. En dicha monitorización se han detectado incrementos térmicos en hojas de plantas inoculadas sometidas a condiciones óptimas de riego y descensos de la temperatura de hojas sometidas a condiciones hídricas sub-óptimas (Stoll et al, 2008). En el caso de la sarna del manzano causada por *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wint, Oerke et al. (2011) han demostrado que la termografía es una excelente herramienta para diferenciar aislados de *V. inaequalis* según su agresividad. De forma similar, Awad et al. (2015) han registrado descensos térmicos horas después de la inoculación artificial de trigo (*Triticum aestivum* L.) con *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* É.J. Marchal, agente causal del oidio. Recientemente, la roña o tizón de la espiga de trigo causado por *Fusarium graminearum* Schwabe and *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc. ha sido evaluada en condiciones controladas observándose aumentos térmicos en las espigas en las primeras fases de infección (6 días post-inoculación) (Al Masri et al., 2016).

En el caso de patógenos de suelo, la termografía ha proporcionado buenos resultados en la detección presintomática de la infección por *Fusarium oxysporum* ff. spp. Así, se ha monitorizado la presencia de *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* J.H.

Owen en pepino (*Cucumis sativus* L.) en fases tempranas de la infección (Wang et al., 2012). Del mismo modo, el análisis termográfico ha permitido registrar incrementos térmicos significativos en líneas susceptibles de guisante (*Pisum sativum* L.) afectadas por la marchitez vascular causada por *F. oxysporum* f. sp. *pisi* (Linford) W.C. Snyder & H.N. Hansen (Rispaíl y Rubiales, 2015). Por el contrario, el incremento térmico en plantas de aguacate (*Persea americana* Mill.) afectadas por *Rosellinia necatrix* Berl. ex Prill. sólo se ha podido observar tras la aparición de síntomas (Granum et al., 2015) a pesar de haberse analizado por termografía.

Aunque su uso no está tan extendido como en el caso de enfermedades fúngicas, la termografía también se ha utilizado en estudios de infecciones por diversas bacterias y virus de los principales géneros fitopatógenos. Así, se han observado incrementos térmicos a nivel de hoja y también de copa como consecuencia del ataque de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* en kiwi (*Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C. F. Liang et A.R. Ferguson) (Maes et al., 2014). También se han observado diferencias térmicas entre dos patovares (compatible e incompatible) de *Pseudomonas syringae* Van Hall durante su interacción con judía (*Phaseolus vulgaris* L.) (Pérez-Bueno et al., 2015). De forma similar, la infección por *Dickeya dadantii* sp. nov., causante de pudrición blanda en numerosos cultivos agrícolas y ornamentales (Czajkowski et al., 2011; Reverchon y Nasser, 2013), se ha podido detectar mediante el análisis térmico de imagen tanto en la planta modelo *Nicotiana benthamiana* Domin (Pérez-Bueno et al., 2016a) como en calabacín (*Cucurbita pepo* L.) (Pérez-Bueno et al., 2016b). Respecto a las infecciones víricas, la captura de imágenes térmicas ha permitido describir el patrón de temperatura durante la respuesta hipersensible en plantas de tabaco (*N. tabacum* L.) como respuesta al ataque virus del mosaico del tabaco (TMV) (Chaerle et al., 2007a) y en plantas de *N. benthamiana* durante la invasión de virus del moteado suave del pimiento (PMMoV) (Chaerle et al. 2006).

Sin embargo, la temperatura de la hoja no sólo depende del estado hídrico de la planta, sino que también está afectada por otros factores ambientales, tales como el viento, la humedad relativa o la radiación. Por lo tanto, para ser usada como indicador de estrés hídrico en condiciones de campo, se utiliza un índice normalizado denominado Crop Water Stress Index (CWSI) que tiene en cuenta

Introducción

estos factores. Este índice relaciona la diferencia de temperaturas entre la vegetación y el aire (T_c y T_a , respectivamente) con la diferencia $T_c - T_a$ para una línea base sin estrés o *lower limit* y $T_c - T_a$ para un *upper limit* con estrés, siendo los dos límites función del déficit de presión de vapor atmosférico. El CWSI toma valores entre 0 y 1, donde 0 corresponde a una planta sin estrés hídrico y 1 a una planta estresada (Idso et al. 1981).

1.5.2. Fluorescencia

Por otro lado, numerosos estudios han demostrado el efecto de cualquier tipo de estrés biótico y/o abiótico sobre la emisión de fluorescencia de las plantas como consecuencia de la alteración de su actividad fotosintética o de otras reacciones metabólicas (Baker, 2008; Rolfe y Scholes, 2010; Barón et al., 2012; Guidi y Degl'Innocenti, 2012). Aunque este tipo de energía ha sido registrada tradicionalmente mediante fluorímetros, que proporcionan medidas puntuales, en la actualidad, y en especial en el estudio de estreses bióticos, se suele optar por técnicas basadas en la captura de imágenes de fluorescencia ya que éstas facilitan más información sobre el desarrollo de la infección (Gorbe y Calatayud, 2012). En función del tipo de luz (visible o ultravioleta) empleada para la emisión de fluorescencia, las imágenes se clasifican en imágenes de la cinética de la fluorescencia de la clorofila e imágenes de fluorescencia multiespectral o fluorescencia multicolor inducida por luz ultravioleta (UV) (Chaerle y Van Der Straeten, 2001).

El análisis de la cinética de fluorescencia de clorofila proporciona información acerca de la eficiencia del fotosistema II (PSII), es decir, del rendimiento fotosintético en las plantas e, indirectamente, de la asimilación de CO_2 en ellas. La cinética de la fluorescencia se mide a través de varios parámetros relacionadas con procesos fotoquímicos (F_v/F_m y Φ_{PSII}) y no-fotoquímicos como la emisión de calor o fluorescencia (qP y NPQ) (Baker et al., 2008). Estos parámetros se derivan con frecuencia de evaluaciones realizadas después de un período de adaptación oscura que resulta necesario para obtener un punto de referencia no estresado (Maxwell y Johnson, 2000). A partir de las imágenes de fluorescencia se obtienen valores numéricos de estos parámetros que permiten discriminar entre

plantas sanas y estresadas (Baker, 2008; Rolfe y Scholes, 2010; Murchie y Lawson, 2013).

Las aplicaciones de esta técnica en el estudio de estreses en cultivos son numerosas, entre ellas la detección temprana y el seguimiento de infecciones bacterianas, víricas y fúngicas (Guidi y Degl'Innocenti, 2012; Gorbe y Calatayud, 2012; Murchie y Lawson, 2013). En el caso de la detección de enfermedades de origen bacteriano, la determinación de diversos parámetros de la fluorescencia ha permitido, tanto en la especie modelo *N. benthamiana* (Iqbal et al., 2012; Pérez-Bueno et al., 2016b) como en cultivos como el calabacín o la judía (Rodríguez-Moreno et al., 2008; Rousseau et al., 2013; Pérez-Bueno et al., 2015; Pérez-Bueno et al., 2016b), identificar la infección por bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Dickeya* y *Xanthomonas*. De forma análoga, diversas infecciones víricas han sido analizadas con esta técnica (Chaerle et al., 2006; Pérez-Bueno et al., 2006; Pineda et al., 2008b; Montero et al., 2016).

En cuanto a las interacciones patogénicas hongo-planta, la fluorescencia de la clorofila ha sido bastante aplicada tanto en el caso de hongos aéreos como en el de hongos de suelo. De esta forma, Csefalvay et al. (2009) propusieron el uso de los índices F_v/F_m y Φ_{PSII} para la identificación temprana del mildiu de la vid (*P. viticola*) en condiciones controladas y, varios años después, Latouche et al. (2015) han detectado y monitorizado al patógeno en viñedos. Por otro lado, Kuckenberget al. (2009) observaron cambios en la emisión de fluorescencia de la clorofila en hojas de trigo infectadas por hongos causantes de mildius (*Puccinia recondita* Roberge ex Desm. y *Blumeria graminis* (DC.) Speer). Los notables descensos de F_v/F_m registrados en una línea de lechuga (*Lactuca sativa* L.) susceptible a mildiu, como consecuencia de la inoculación con *Bremia lactucae* Regel, Bot. Ztg permitieron a Bauriegel et al. (2014) diferenciar dicha línea de otra resistente a la enfermedad. Moradi et al. (2017) también han diferenciado cultivares de pepino (*Cucumis sativus* L.) susceptibles a *Sphaerotheca fuliginea* (Schltld.) Pollacci de otros resistentes mediante experimentos en condiciones controladas y con imágenes de los parámetros de la clorofila F_v/F_m y F_v/F_0 . Descensos en F_v/F_m y F_v/F_0 han permitido la detección presintomática de la roña o tizón de la espiga de trigo causado por *F. graminearum* (Bauriegel y Herppich, 2014). Asimismo,

Introducción

imágenes de F_v/F_m han resultado efectivas para la identificación presintomática de alteraciones en el aparato fotosintético de plántulas de anacardo (*Anacardium occidentale* L.) inoculadas artificialmente con micelio de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl dos semanas antes de la visualización de los síntomas (Muniz et al., 2014). El parámetro F_v/F_m también ha mostrado la alteración en la capacidad fotosintética de plantas de café arábica (*Coffea arabica* L.) como consecuencia de la infección por *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome (Horonato Júnior et al., 2015).

Dentro de las enfermedades causadas por patógenos de suelo, se han obtenido resultados prometedores en la monitorización de la fluorescencia clorofílica durante la infección de la planta holoparásita *P. ramosa* (L.) Pomel en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. in Holl & Heynh (Rousseau et al., 2015). Por su parte, Granum et al. (2015) y Martínez-Ferri et al. (2016) identificaron varios parámetros de fluorescencia de la clorofila como buenos indicadores tempranos de la infección de aguacate por *R. necatrix*. Igualmente, Ivanov y Bernards (2016) han demostrado la eficacia del parámetro Φ_{NO} (relacionado con la pérdida de energía no fotoquímica en L PSII) para el seguimiento de la infección de *Pythium irregulare* Buisman en ginseng (*Panax quinquefolius* L.). A diferencia del parámetro F_v/F_m , que requiere de un tiempo de preadaptación de las plantas en oscuridad antes de tomar las medidas, Φ_{NO} , puede medirse bajo amplias intensidades de la luz, incluida la luz natural, lo que resulta de gran interés para su uso en campo.

Cuando la excitación de una hoja tiene lugar en el rango de la luz UV ($\lambda=320-380$ nm) ésta emite fluorescencia con máximos en las longitudes de onda del azul (440 nm), verde (520 nm), rojo (690 nm) y rojo lejano (740 nm) conocidos como F440, F520, F690 y F740, respectivamente. El máximo en el verde a veces no está bien definido y suele asociarse con la fluorescencia azul, hablándose en este caso de fluorescencia azul-verde (Buschmann y Lichtenthaler, 1998; Buschmann et al., 2000). Los máximos en F680 y F740 son consecuencia únicamente de la emisión de fluorescencia por la clorofila *a* de las plantas ya que la clorofila *b*, si bien también puede emitir fluorescencia, transfiere toda su energía de excitación a la clorofila *a* *in vivo* (Buschmann et al., 2000). A diferencia de las fluorescencias en el rojo y el rojo lejano, la fluorescencia azul-verde de las plantas combina las emisiones de varios fluoróforos que son generalmente metabolitos secundarios como fenoles,

polifenoles y fenilpropanoides relacionados con la ruta del shikimato (Cerovic et al., 1999; Buschmann et al., 2000). Dentro de los principales fluoróforos destacan los ácidos hidroxicinámicos, como el ferúlico, el cumárico y el clorogénico (Lichtenthaler y Schweiger, 1998; Morales et al., 1996; Cerovic et al., 1999). Algunas nicotinamidas, (NAD, NADH), flavinas (FMN, FAD, riboflavina) y coenzimas (piridoxal-5'-fosfato) también emiten fluorescencia en el verde y en el azul, pero esta emisión está enmascarada por la del resto de fluoróforos y necesita de fluorímetros altamente sensibles para su detección (Cerovic et al., 1999).

La fluorescencia presenta distintos orígenes de emisión, por lo que la respuesta a factores fisiológicos y ambientales suele representarse mejor utilizando cocientes de fluorescencia (F690/740, F440/520, F440/690, F440/740, F520/690, F520/740) en lugar de valores de fluorescencia absolutos. En este sentido, varios autores incluidos en la revisión sobre fluorescencia multicolor de Buschmann y Lichtenthaler (1998) sugieren que los cocientes de fluorescencia F440/690, F440/740 son buenos indicadores de estrés temprano, mientras que F440/520 es útil en el seguimiento de estreses prolongados. Todos ellos son además relativamente estables en situaciones estrés puntual. También es una potente herramienta de estudio del cociente F690/740, ya que está inversamente correlacionado con el contenido total de clorofila (clorofila *a* y *b*) (Buschmann y Lichtenthaler, 1998; Cerovic et al., 1999; Buschmann et al., 2000; Sziget, 2008). También se han encontrado múltiples aplicaciones de la fluorescencia multiespectral inducida por la luz UV para la identificación de especies mono y dicotiledóneas (Chapelle et al., 1985) y seguimiento del desarrollo fenológico de plantas (Meyer et al., 2003).

Dentro del campo de la fitopatología, la fluorescencia multiespectral ha demostrado ser muy sensible en detectar respuestas de las plantas a patógenos. En este sentido, se ha demostrado un incremento de fluorescencia azul y verde como consecuencia de la infección por PMMoV en *N. benthamiana* (Pineda et al., 2008a) y por TMV en plantas de tabaco (Chaerle et al. 2007b). En todos los casos este aumento de autofluorescencia en la zona de infección se ha asociado al aumento en ella del contenido de compuestos fenólicos y/o deposición de callosa durante la respuesta de defensa y muerte celular por el ataque del virus. Además de estos

Introducción

incrementos de fluorescencia, Montero et al. (2016) han observado que la interacción entre la uva *Vitis vinifera* y el virus GLRaV-3 origina alteraciones en varios cocientes de fluorescencia (F440/F680, F440/F740, F520/F680, F520/F740 y F680/F740). Aumentos de los cocientes F440/F680, F440/F740, y F680/F740 también han sido observados con anterioridad por Szigeti et al. (2002) en hojas de col china (*Brassica pekinensis* cv. *Pach Choi*) al ser infectadas con el virus de mosaico amarillo del nabo (TYMV).

Referente a infecciones bacterianas, se han registrado aumentos de fluorescencia azul y verde debidos a la interacción *Dickeya dadantii* – *Nicotiana benthamiana* con anterioridad a la aparición de síntomas (Pérez-Bueno et al. 2016a). Sin embargo, cuando se analizó la emisión del mismo tipo de fluorescencia en hojas de calabacín infectadas por dicha bacteria, los aumentos se observaron después de que aparecieran los síntomas. Sí se detectaron variaciones en los cocientes de fluorescencia F440/F740, F520/F740 y particularmente de F440/F520 previos a la manifestación de síntomas (Pérez-Bueno et al. 2016b). Igualmente, el análisis de imágenes de F520 han permitido diferenciar entre dos patovares de la bacteria *Pseudomonas syringae* en judía en fases tempranas y con anterioridad a la aparición de los síntomas de la enfermedad (Pérez-Bueno et al., 2015).

Por su parte, Leufen et al. (2014) observaron alteraciones significativas en el ratio F440/F740 en plantas de remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.) sometidas a varias situaciones de estrés hídrico, nutricional (deficiencias de nitrógeno) y biótico como consecuencia de oidio. (Para la diferenciar la respuesta a los distintos estreses los autores sugieren la combinación de la fluorescencia multicolor con otros parámetros de fluorescencia. Por otra parte, Burling et al. (2011) han conseguido la detección temprana de infecciones aéreas en trigo causadas por *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* y *Puccinia triticina* Oerst. utilizando varios ratios de fluorescencia. Para diferenciar, en infecciones por alguno de los anteriores patógenos, la existencia o no de carencias nutricionales, Burling et al. (2011) proponen el uso combinado de los ratios F440/F520 y F680/F740. Del mismo modo, Konanz et al (2014) han conseguido diferenciar los síntomas de dos infecciones de origen fúngico: la mancha de la hoja en remolacha azucarera y la podredumbre negra de la vid [*Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala & Ravaz]], mediante

un avanzado sistema de imagen multicolor combinado. Por el contrario, la alteración en el metabolismo secundario del aguacate por el hongo de suelo *R. necatrix* tan sólo ha sido detectada mediante modificaciones de la emisión de fluorescencia azul y verde en estados avanzados de la infección (Granum et al., 2015).

1.5.3. Reflectancia

Otra técnica que permite inferir cambios en el metabolismo primario y secundario de las plantas como consecuencia de la interacción patogénica es la reflectancia espectral. La reflectancia de una planta es la radiación electromagnética reflejada por la misma, resultado de múltiples interacciones entre la radiación solar incidente y de características físico-químicas de la misma como la superficie foliar, el contenido de agua y de pigmentos entre otras (Jacquemoud y Ustin, 2001; Gitelson et al 2003; Blackburn et al. 2007) Así, alteraciones en algunas de las tres regiones que componen el espectro visible (400-700 nm), infrarrojo (700-1000 nm) e infrarrojo de onda corta (1000-2500 nm) son excelentes indicadores de diferentes tipos de estrés en plantas (Jacquemoud y Ustin, 2001). La reflectancia en el rango del visible está fundamentalmente influenciada por el contenido de pigmentos, mientras que la composición química de la hoja y el contenido de agua afectan a la reflectancia asociada a la región del infrarrojo cercano (Mahlein et al., 2016).

La reflectancia se obtiene mediante espectroscopía (espectroradiómetros) o a través de imágenes multiespectrales y/o hiperespectrales; en el segundo caso la adquisición de todas las bandas espectrales se traduce un importante aumento de coste de la tecnología (Simko et al., 2016). Las imágenes pueden ser analizadas al detalle, es decir, de forma completa mediante algoritmos que permitan la comparación de las distintas longitudes de onda que componen el patrón espectral de la planta, o mediante el uso de índices de reflectancia, producto de la combinación de distintas bandas espectrales como el Índice de Vegetación Normalizada (en inglés NDVI) (Gilabert et al., 1997), indicador de cambios estructurales de la vegetación, o el Índice de Reflectancia Fotoquímica (en inglés PRI), relacionado con el contenido de carotenoides (Gamón et al., 1992).

Introducción

Tanto las imágenes multiespectrales como las hiperespectrales han resultado muy útiles en la detección de infecciones en numerosos cultivos en las últimas décadas, como queda recogido en revisiones realizadas por Mahlein et al. (2016) y Simko et al. (2016). A modo de ejemplo, diremos que los valores de PRI se han empleado para la detección del Virus del mosaico de la mandioca (CMD) (Raji et al., 2016) y del virus del mosaico del tabaco en estadios tempranos de la enfermedad (Zhu et al., 2016). En cuanto a enfermedades fúngicas, el análisis de este tipo de imágenes ha permitido detectar el tizón temprano (*Alternaria solani* Sorauer) en berenjena (*Solanum melongena* L.) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Xie et al., 2015; Xie y He, 2016). En el caso del tomate también se ha podido detectar el tizón tardío (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) (Xie et al., 2015). Asimismo, se han detectado en colza varias especies fitopatógenas del género *Alternaria* Nees han podido detectarse en colza (Baranowski et al., 2015), y la misma técnica se ha aplicado recientemente en la detección del hongo de suelo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary en soja (*Glycine max* L.) (Zhao et al., 2016).

En resumen, la aplicación de las anteriores técnicas en el estudio de las infecciones por patógenos en las plantas en condiciones controladas pone de manifiesto el enorme potencial de las mismas como herramientas rápidas y no destructivas para detectar de manera presintomática las infecciones por numerosos patógenos, mayoritariamente aéreos. No obstante, la mayoría de los autores anteriormente citados recomiendan que tanto para la detección de estreses como para la discriminación entre ellos las técnicas disponibles se utilicen de manera combinada, lo que permitirá obtener mejores resultados. Además, también se ha sugerido recientemente el uso de nuevas fórmulas estadísticas para el análisis de datos, las cuales pueden agilizar el proceso de detección (Konanz et al., 2014; Rousseau et al., 2015; Pérez-Bueno et al., 2016b).

Respecto a la aplicación de estas técnicas para la detección de enfermedades en campo, así como respecto a su uso como herramientas para fenotipado, es ampliamente conocida la eficacia de las imágenes térmicas y multi-hiperespectrales para la detección de patógenos tanto aéreos (Calderón et al., 2014; Maes et al., 2014; López-López et al., 2016) como de suelo (Calderón et al., 2013; Calderón et al., 2015; Abdulridha et al., 2016), pero el uso de la fluorescencia

no está tan extendido a gran escala por sus requerimientos de preadaptación a oscuridad y uso de pulsos de luz saturante (Murchie y Lawson, 2013). No obstante, estas limitaciones podrían obviarse mediante el uso de fluorescencia de clorofila inducida por el sol o fluorescencia transitoria inducida por laser (Raji et al., 2015; Baron et al., 2016; Mahlein et al., 2016; Simko et al., 2016).

1.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abd El-Rahim, M. F., Fahmy, G. M., and Fahmy, Z. M. (1998). Alterations in transpiration and stem vascular tissues of two maize cultivars under conditions of water stress and late wilt disease. *Plant Pathol.* 47, 216-223. doi: 10.1046/j.1365-3059.1998.00211.x

Abdulridha, J., Ehsani, R., and de Castro, A. (2016). Detection and differentiation between laurel wilt disease, *Phytophthora* disease, and salinity damage using a hyperspectral sensing technique. *Agriculture* 6, 56. doi: 10.3390/agriculture6040056

Achón-Samá, M.A., and Molinero-Ruiz, L. (2014). Enfermedades de mayor repercusión económica en el cultivo del maíz. *Tierras de Castilla y León* 216, 6-14.

Achon, M. A., Serrano, L., Clemente-Orta, G., and Sossai, S. (2017). First report of *Maize chlorotic mottle virus* on a perennial host, *Sorghum mihalepense*, and maize in Spain. *Plant Dis.* 101, 393. doi: 10.1094/PDIS-09-16-1261-PDN

Akhtouch, B., Muñoz-Ruz, J., Melero-Vara, J.M., Fernández- Martínez, J.M., and Dominguez, J. (2002). Inheritance of resistance to race F of broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in sunflower lines of different origin. *Plant Breed.* 121, 266-268. doi: 10.1046/j.1439-0523.2002.00701.x

Akhtouch, B., Molinero-Ruiz, L., Dominguez, J., Melero-Vara, J. M., and Fernández-Martínez, J.M. (2013). Using sowing date modification and genetic resistance to manage sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.). *Helia* 36, 17-34. doi: 10.2298/HEL1359017A

Alberio, C., Izquierdo, N.G., and Aguirrezábal, L.A.N. (2015). "Sunflower Crop Physiology and Agronomy", in: *Sunflower Oilseed: Chemistry, Production, Processing and Utilization*, eds. E. Martínez-Force, N.T. Dunford, J.J.Salas (Champaign, IL: AOCS Press), 129-156. doi: 10.1016/B978-1-893997-94-3.50009-X

Introducción

Alcántara, E., Morales-García, M., and Díaz-Sánchez, J. (2006). Effects of broomrape parasitism on sunflower plants: growth, development, and mineral nutrition. *J. Plant Nutr.* 29, 1199-1206. doi: 10.1080/01904160600767351

Al-Khatib, K., Baumgartner, J. R., Peterson, D. E., and Currie, R. S. (1998). Imazethapyr resistance common sunflower (*Helianthus annuus*). *Weed Sci.* 46, 403-407.

Al-Masri, A., Hau, B., Dehne, H. W., Mahlein, A. K., and Oerke, E. C. (2017). Impact of primary infection site of *Fusarium* species on head blight development in wheat ears evaluated by IR-thermography. *Eur. J. Plant Pathol.* 147, 855-868. doi: 10.1007/s10658-016-1051-2

Alonso, L. C., Rodríguez-Ojeda, M. I., Fernández-Escobar, J., and López-Calero, G. (1998). Chemical control of broomrape (*Orobanche cernua* Loefl.) in sunflower (*Helianthus annuus* L.) resistant to Imazethapyr herbicide. *Helia* 29, 45-54.

An, Y., Ma, Y., Shui, J., and Zhong, W. (2015). Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) has ability to induce germination of *Orobanche cumana*. *J. Plant Interact.* 10, 142-151. doi: 10.1080/17429145.2015.1039614

Antonova T. (2014). The history of interconnected evolution of *Orobanche cumana* Wallr. and sunflower in the Russian Federation and Kazakhstan. *Helia* 37, 215-225. doi 10.1515/helia-2014-0017

Antonova, T. S., Alonso, L. C., Strel'nikov, E. A., and Araslanova, N. M. (2015). Stimulating effect of the root exudates of sorghum, millet, and Sudan grass on the seed germination of broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) infesting sunflowers in Russia. *Russian Agricultural Sciences* 41, 347-351. doi: 10.3103/S1068367415050031

Awad, Y. M., Abdullah, A. A., Bayoumi, T. Y., Abd-Elsalam, K., and Hassanien, A. E. (2015). "Early detection of powdery mildew disease in wheat (*Triticum aestivum* L.) using thermal imaging technique", in: *Proceedings of the 7th IEEE International Conference Intelligent Systems IS'201*. eds. D. Filev et al. (Switzerland: Springer), 755-765. doi: 0.1007/978-3-319-11310-4_66

Baker, N. R. (2008). Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 89-113. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759

Blackburn, G.A. (2007). Hyperspectral remote sensing of plant pigments. *J. Exp. Bot.* 58, 844-867. doi: 10.1093/jxb/erl123

Baranowski, P., Jedryczka, M., Mazurek, W., Babula-Skowronska, D., Siedliska, A., and Kaczmarek, J. (2015). Hyperspectral and thermal imaging of oilseed rape

(*Brassica napus*) response to fungal species of the genus *Alternaria*. *PLoS One* 10:e0122913. doi: 10.1371/journal.pone.0122913

Barón, M., Flexas, J., and Delucía, E.H. (2012). "Photosynthetic responses to biotic stress", in: *Terrestrial photosynthesis in a changing environment: molecular, physiological and ecological approach*, eds. J. Flexas, F. Loreto, H. Medrano (Cambridge: Cambridge University Press), 331-350.

Barón, M., Pineda, M., and Pérez-Bueno, M. L. (2016). Picturing pathogen infection in plants. *Z. Naturforsch.* 71, 355-368. doi: 10.1515/znc-2016-0134

Bauriegel, E., Brabandt, H., Gärber, U., and Herppich, W. B. (2014). Chlorophyll fluorescence imaging to facilitate breeding of *Bremia lactucae*-resistant lettuce cultivars. *Comput. Electron. Agric.* 105, 74-82. doi: 10.1016/j.compag.2014.04.010

Bauriegel, E., and Herppich, W.B., (2014). Hyperspectral and chlorophyll fluorescence imaging for early detection of plant diseases, with special reference to *Fusarium* spec. infections on wheat. *Agriculture* 4, 32-57. doi:10.3390/agriculture4010032.

Becker, E.-M., Herrfurth, C., Irmisch, S., Köllner, T. G., Feussner, I., Karlovsky, P., and Splivallo, R. (2014). Infection of corn ears by *Fusarium* spp. induces the emission of volatile sesquiterpenes. *J. Agric. Food Chem.* 62:, 5226-5236. doi: 10.1021/jf500560f

Bergstrom, G., Leslie, J., Huber, D., Lipps, P., Warren, H., Esker, P., et al. (2008). *Recovery plan for late wilt of corn caused by Harpophora maydis syn. Cephalosporium maydis*. Washington, DC: National Plant Disease Recovery System.

Boari, A., Ciasca, B., Pineda-Martos, R., Lattanzio, V. M., Yoneyama, K., and Vurro, M. (2016). Parasitic weed management by using strigolactone-degrading fungi. *Pest Manag. Sci.* 72, 2043 -2047. doi: 10.1002/ps.4226

Borrego-Benjumea, A., Basallote-Ureba, M.J., Abbasi, P.A., Lazarovits, G. and Melero-Vara, J.M. (2014). Effects of incubation temperature on the organic amendment-mediated control of *Fusarium* wilt of tomato. *Ann. Appl. Biol.* 164, 453-463. doi: 10.1111/aab.12116

Bürling, K., Hunsche, M., and Noga, G. (2011). Use of blue-green and chlorophyll fluorescence measurements for differentiation between nitrogen deficiency and pathogen infection in winter wheat. *J. Plant Physiol.* 168, 1641-1648. doi: 10.1016/j.jplph.2011.03.016

Buschmann, C., and Lichtenthaler, H.K. (1998). Principles and characteristics of multicolour fluorescence imaging of plants. *J. Plant Physiol.* 152, 297-314. doi: 10.1016/S0176-1617(98)80144-2

Introducción

Buschmann, C., Langsdorf, G., and Lichtenthaler, H.K. (2000). Imaging of the blue, green, and red fluorescence emission of plants: An overview. *Photosynthetica* 38, 483-491. doi: 10.1023/A:1012440903014

Cala, A., Ghooray, K., Fernández-Aparicio, M., Molinillo, J. M., Galindo, J. C., Rubiales, D., et al. (2016). Phthalimide-derived strigolactone mimics as germinating agents for seeds of parasitic weeds. *Pest Manag. Sci.* 72, 2069-2081. doi:10.1002/ps.4323

Calderón, R., Navas-Cortés, J.A., Lucena, C., and Zarco-Tejada, P.J. (2013). High-resolution airborne hyperspectral and thermal imagery for early detection of *Verticillium* wilt of olive using fluorescence, temperature and narrow-band spectral indices. *Remote Sens. Environ.* 139, 231-245. doi: 10.1016/j.rse.2013.07.031

Calderón, R., Montes-Borrego, M., Landa, B. B., Navas-Cortés, J. A., and Zarco-Tejada, P. J. (2014). Detection of downy mildew of opium poppy using high-resolution multi-spectral and thermal imagery acquired with an unmanned aerial vehicle. *Precis. Agric.* 15, 639-661. doi: 10.1007/s11119-014-9360-y

Calderón, R., Navas-Cortés, J.A., and Zarco-Tejada, P.J. (2015). Early detection and quantification of *Verticillium* wilt in olive using hyperspectral and thermal imagery over large areas. *Remote Sens.* 7, 5584-5610. doi: 10.3390/rs70505584

Castejon, M., Romero-Munoz, F., and Garcia-Torres, L. (1991). *Orobanche cernua* seed dispersal through sunflower achenes. *Helia* 14, 51-54.

Cerovic, Z.G., Samson, G., Morales, F., Tremblay, N., and Moya, I. (1999). Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. *Agronomie* 19, 543-578. doi: 10.1051/agro:19990701

Chaerle, L., and Van Der Straeten, D. (2000). Imaging techniques and the early detection of plant stress. *Trends Plant Sci.* 5, 495-501. doi: 10.1016/S1360-1385(00)01781-7

Chaerle, L., and Van Der Straeten, D. (2001). Seeing is believing: imaging techniques to monitor plant health. *Biochim. Biophys. Acta-Gene Struct. Expression* 1519, 153-166. doi: 10.1016/S0167-4781(01)00238-X

Chaerle, L., Pineda, M., Romero-Aranda, R., Van Der Straeten, D., and Baron, M. (2006). Robotized thermal and chlorophyll fluorescence imaging of pepper mild mottle virus infection in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell Physiol.* 47, 1323-1336. doi: 10.1093/pcp/pcj102

Chaerle, L., Leinonen, I., Jones, H. G., and Van Der Straeten, D. (2007a). Monitoring and screening plant populations with combined thermal and chlorophyll fluorescence imaging. *J. Exp. Bot.* 58, 773-784. doi: 10.1093/jxb/erl257

- Chaerle, L., Lenk, S., Hagenbeek, D., Buschmann, C., and Van Der Straeten, D. (2007b). Multicolor fluorescence imaging for early detection of the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *J. Plant Physiol.* 164, 253-262. doi: 10.1016/j.jplph.2006.01.011
- Chappelle, E. W., Wood, F. M., Newcomb, W. W., and McMurtrey, J. E. (1985). Laser-induced fluorescence of green plants. 3: LIF spectral signatures of five major plant types. *Applied Optics* 24, 74-80. doi: 10.1364/AO.24.000074
- Chen, J., Xue, Q. H., McErlean, C. S. P., Zhi, J. H., Ma, Y. Q., Jia, X. T., et al. (2016). Biocontrol potential of the antagonistic microorganism *Streptomyces enissocaesilis* against *Orobanche cumana*. *Biocontrol* 61, 781-791. doi: 10.1007/s10526-016-9738-z
- Christov, M., Batchvarova, R., and Hristova-Cherbadzhi, M., (2009). Wild species of *Helianthus* L.-Sources of resistance to the parasite *Orobanche cumana* Wallr. *Helia* 32, 65-74. doi: 10.2298/HEL0951065C
- Christov, M. (2012). Contribution of interspecific hybridization to sunflower breeding. *Helia* 35, 37-46. doi: 10.2298/HEL1257037C
- Christov, M. (2013). Contribution of interspecific and intergeneric hybridization to sunflower breeding. *Helia* 36, 1-18. doi: 10.2298/HEL1358001A
- Csefalvay, L., Di Gaspero, G., Matous, K., Bellin, D., Ruperti, B., and Olejnickova, J. (2009). Pre-symptomatic detection of *Plasmopara viticola* infection in grapevine leaves using chlorophyll fluorescence imaging. *Eur. J. Plant Pathol.* 125, 291-302. doi: 10.1007/s10658-009-9482-7
- Cvejić, S., Jocić, S., Dedić, B., Radeka, I., Imerovski, I., and Miladinović, D., (2014). "Determination of resistance to broomrape in newly developed sunflower inbred lines", in: *Current situation of sunflower broomrape around the world, Proceedings of the Third International Symposium on Broomrape (Orobanche spp.) in Sunflower*. ed. International Sunflower Association (Paris: International Sunflower Association Sunflower), 184-188.
- Czajkowski, R., Pérombelon, M.C.M., van Veen, J.A., and van der Wolf, J.M. (2011). Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathol* 60, 999-1013. doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02470.x
- Dawood, N. A., and Sabet, K. A. (1979). Effect of organic amendment and fungicidal application on the population of soil microflora and infection with the late-wilt disease of maize. *Ann. Agric. Sci., Moshtohor* 11, 217-226.

Introducción

Degani, O., and Cernica, G. (2014). Diagnosis and control of *Harpophora maydis*, the cause of late wilt in maize. *Advances in Microbiology* 4, 94-105. doi: 10.4236/aim.2014.42014

Degani, O., and Goldblat, Y. (2014). Ambient stresses regulate the development of the maize late wilt causing agent, *Harpophora maydis*. *Agricultural Sciences* 5, 571-582. doi: 10.4236/as.2014.57060

Degani, O., Weinberg, T., and Graph, S. (2014). Chemical control of maize late wilt in the field. *Phytoparasitica* 42, 559-570. doi: 10.1007/s12600-014-0394-5

Degani, O., Drori, R., and Goldblat, Y. (2015). Plant growth hormones suppress the development of *Harpophora maydis*, the cause of late wilt in maize. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 21, 137-149. doi: 10.1007/s12298-014-0265-z

Delavault, P. (2014). "Knowing the parasite: Biology and genetics of Orobanche", in: *Current situation of sunflower broomrape around the world, Proceedings of the Third International Symposium on Broomrape (Orobanche spp.) in Sunflower*, ed. International Sunflower Association (Paris: International Sunflower Association Sunflower), 19-27.

Demirci, M. and Kaya, Y. (2009). Status of *Orobanche cernua* Loeff. and weeds in sunflower production in Turkey. *Helia* 51, 153-160. doi: 10.2298/HEL0951153D

Domínguez, J., Melero-Vara, J. M., Ruso, J., Miller, J., and Fernández-Martínez, J. M. (1996). Screening for resistance to broomrape (*Orobanche cernua*) in cultivated sunflower. *Plant Breed.* 115, 201-202. doi: 10.1111/j.1439-0523.1996.tb00903.x

Drori, R., Sharon, A., Goldberg, D., Rabinovitz, O., Levy, M., and Degani, O. (2013). Molecular diagnosis for *Harpophora maydis*, the cause of maize late wilt in Israel. *Phytopathol. Mediterr.* 52, 16-29. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-10824

Eizenberg, H., Hershenhorn, J., Achdari, G., and Ephrath, J. E. (2012). A thermal time model for predicting parasitism of *Orobanche cumana* in irrigated sunflower—field validation. *Field Crop. Res.* 137, 49-55. doi: 10.1016/j.fcr.2012.07.020

El-Mehalawy, A.A., Hassanein, N.M., Khater, H.M., Karam El Din, E.A., and Youssef, Y.A. (2004). Influence of maize root colonization by the rhizosphere actinomycetes and yeast fungi on plant growth and on the biological control of late wilt disease. *Int. J. Agric. Biol.* 6, 599-605.

El-Shafey, H. A., El-Shorbagy, F. A., Khalil, I. I., and El-Assiut, E.M. (1988). Additional sources of resistance to the late-wilt disease of maize caused by *Cephalosporium maydis*. *Agric. Res. Rev.* 66, 221-230.

- El-Shafey, H. A., and Claflin, L. E. (1999). "Late Wilt", in: *Compendium of Corn Diseases*, ed. D. G. White (Saint Paul: American Phytopathological Society Press), 43-44.
- Fang, Y., and Ramasamy, R. P. (2015). Current and prospective methods for plant disease detection. *Biosensors* 5, 537-561. doi: 10.3390/bios5030537
- FAO. (1993). El maíz en la nutrición humana. Colección FAO Alimentación y Nutrición N°25, Roma Italia. Available at: <http://www.fao.org/docrep/T0395S/T0395S00.htm>, accessed December 14, 2016.
- FAO. (2010). Agribusiness handbook. Sunflower Crude and Refined Oils. Available in: <http://www.fao.org/docrep/012/al375e/al375e.pdf>, accessed December 19, 2016
- FAOSTAT. (2016). Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, accessed December 14, 2016.
- Farnham, D.E., Benson, G.O., and Pearce, R.B. (2003). "Corn perspective and culture. Chapter 1", in: *Corn: chemistry and technology, Edition 2nd*, eds. P.J. White, L.A. Johnson (Saint Paul: American Association of Cereal Chemicals, Inc.), 1-33.
- Fayzalla, E. A., Sadik, E. A., Elwakil, M. A., and Gomah, A. A. (1994). Soil solarization for controlling *Cephalosporium maydis*, the cause of late wilt disease of maize in Egypt. *Egypt. J. Phytopathol.* 22, 171-178.
- Fernández-Aparicio, M., Flores, F., and Rubiales, D. (2009). Recognition of root exudates by seeds of broomrape (*Orobanche* and *Phelipanche*) species. *Ann. Bot.* 103, 423-431. doi: 10.1093/aob/mcn236
- Fernández-Aparicio, M., Yoneyama, K., and Rubiales, D. (2011). The role of strigolactones in host specificity of *Orobanche* and *Phelipanche* seed germination. *Seed Sci. Res.* 21, 55-61. doi:10.1017/S0960258510000371
- Fernández-Aparicio, M., Reboud, X., and Gibot-Leclerc, S. (2016). Broomrape weeds. Underground mechanisms of parasitism and associated strategies for their control: a review. *Front. Plant Sci.* 7:135. doi: 10.3389/fpls.2016.00135
- Fernández-Escobar, J., Rodríguez-Ojeda, M.I., Fernández-Martínez, J.M., and Alonso, L.C. (2008). "Sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in Castilla-León, a traditionally non broomrape infested area in Northern Spain", in: *International Symposium on Broomrape (Orobanche spp.) in Sunflower*, ed. Trakya Agricultural Research Institute (Edirne: Trakya Agricultural Research Institute), 18.

Introducción

Fernández-Martínez, J.M., Pérez-Vich, B., and Velasco, L. (2015). "Sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.)", in: *Sunflower Oilseed. Chemistry, Production, Processing and Utilization*. Eds. E. Martínez-Force, N.T. Dunford, J.J. Salas (Champaign, IL (USA): AOCS Press), 129-156.

Gamon, J.A., Peñuelas, J., and Field, C.B. (1992). A narrow-waveband spectral index that tracks diurnal changes in photosynthetic efficiency. *Remote Sens. Environ.* 41, 35-44. doi: 10.1016/0034-4257(92)90059-S

García-Ruiz, R., García-Carneros, A. B., and Molinero-Ruiz, L. (2014). A new race of *Verticillium dahliae* causing leaf mottle of sunflower in Europe. *Plant Dis.* 98, 1435. doi: 10.1094/PDIS-04-14-0360-PDN

García-Torres, L., Castejón-Munoz, M., López-Granados, F., and Jurado-Expósito, M. (1995). Imazapyr applied postemergence in sunflower (*Helianthus annuus*) for broomrape (*Orobanche cernua*) control. *Weed Technol.* 9, 819-824.

Gautam, H. R., Bhardwaj, M. L., and Kumar, R. (2013). Climate change and its impact on plant diseases. *Curr. Sci.*, 105, 1685-1691.

Gevezova, M., Dekalska, T., Stoyanov, K., Hristeva, T., Kostov, K., Batchvarova, R., and Denev, I. (2012). Recent advances in broomrapes research. *Journal of Biosciences and Biotechnology* 1, 91-105.

Gilabert, M. A, Gonzalez-Piqueras, J., and García-Haro, J. (1997). Acerca de los índices de vegetación. *Revista de Teledetección* 8, 35-45.

Gitelson, A.A., Gritz, Y, and Merzylak, M.N. (2003). Relationships between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves. *J. Plant Physiol.* 160, 271-282. doi: 10.1078/0176-1617-00887

Gomez-Gomez, L., and Boller, T. (2002). Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* 7, 251-256. doi: 10.1016/S1360-1385(02)02261-6

Gorbe, E., and Calatayud, A. (2012). Applications of chlorophyll fluorescence imaging technique in horticultural research: a review. *Sci. Hortic.* 138, 24-35. doi: 10.1016/j.scienta.2012.02.002

Granum, E., Pérez-Bueno, M.L., Calderón, C.E., Ramos, C., de Vicente, A., Cazorla, F.M., et al. (2015). Metabolic responses of avocado plants to stress induced by *Rosellinia necatrix* analysed by fluorescence and thermal imaging. *Eur. J. Plant Pathol.* 142, 625-632. doi: 10.1007/s10658-015-0640-9

Grant, O.M., Ochagavía, H., Baluja, J., Diago, M., and Tardáguila, J. (2016). Thermal imaging to detect spatial and temporal variation in the water status of grapevine

(*Vitis vinifera* L.). *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 91, 43-54. doi: 10.1080/14620316.2015.1110991

Guidi, L., and Degl'Innocenti, E. (2012). "Chlorophyll *a* fluorescence in abiotic stress", in: *Crop Stress and its Management: Perspectives and Strategies*, eds. B. Venkateswarlu, A. K. Shanker, C. Shanker, M. Maheswari (Netherlands: Springer), 359-398. doi: 10.1007/978-94-007-2220-0_10

Gulya, T.J., Aydin, A. and Brothers, M., (1994). "Evaluation of broomrape (*Orobanche cumana*) resistance in sunflower germplasm of the USDA Plant Introduction collection", in: *Proceedings of the 16th Sunflower Research Workshop*, ed. National Sunflower Association (Bismarck: National Sunflower Association), 53-55.

Gutiérrez, P. A., López-Granados, F., Peña-Barragán, J. M., Jurado-Expósito, M., Gómez-Casero, M. T., and Hervás-Martínez, C. (2008). Mapping sunflower yield as affected by *Ridolfia segetum* patches and elevation by applying Evolutionary Product Unit Neural Networks to remote sensed data, *Comput. Electron. Agric.* 60, 122–132. doi:10.1016/j.compag.2007.07.011

Hibberd, J. M., and Jeschke, W. D. (2001). Solute flux into parasitic plants. *J. Exp. Bot.* 52, 2043-2049. doi: 10.1093/jexbot/52.363.2043

Hristeva, T. H., and Denev, I. Y. (2017). Changes at the rhizosphere microbiota of the sunflower - *Orobanche cumana* Wallr pathosystem. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 6, 733-746. doi: 10.20546/ijcmas.2017.601.087

Honorato Júnior, J., Zambolim, L., Duarte, H. S. S., Aucique-Pérez, C. E., and Rodrigues, F. Á. (2015). Effects of epoxiconazole and pyraclostrobin fungicides in the infection process of *Hemileia vastatrix* on coffee leaves as determined by chlorophyll *a* fluorescence imaging. *J. Phytopathol.* 163, 968-977. doi: 10.1111/jph.12399

Idso, S. B., Jackson, R. D., Pinter, P. J., Reginato, R. J., and Hatfield, J. L. (1981). Normalizing the stress-degree-day parameter for environmental variability. *Agricultural Meteorology* 24, 45-55. doi: 10.1016/0002-1571(81)90032-7

Ishimwe, R., Abutaleb, K., and Ahmed, F. (2014). Applications of thermal imaging in agriculture—A review. *Advances in Remote Sensing* 3, 128-140. doi: 10.4236/ars.2014.33011

Iqbal, M. J., Goodwin, P. H., Leonardos, E. D., and Grodzinski, B. (2012). Spatial and temporal changes in chlorophyll fluorescence images of *Nicotiana benthamiana* leaves following inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Plant Pathol.* 61, 1052-1062. doi: 10.1111/j.1365-3059.2012.02592.x

Introducción

Ivanov, D. A., and Bernards, M. A. (2016). Chlorophyll fluorescence imaging as a tool to monitor the progress of a root pathogen in a perennial plant. *Planta* 243, 263-279. doi: 10.1007/s00425-015-2427-9

Jacquemoud, S., and Ustin, S.L. (2001). "Leaf optical properties: a state of the art", in: *Proceedings 8th International Symposium Physical Measurements & Signatures in Remote Sensing*. 223-232. Available at: www.ipgp.fr/~jacquemoud/publications/jacquemoud2001a.pdf

Jestin, C., Lecomte, V., and Duroueix, F. (2014). "Current situation of sunflower broomrape in France", in: *Current situation of sunflower broomrape around the world, Proceedings of the Third International Symposium on Broomrape (Orobancha spp.) in Sunflower*, ed. International Sunflower Association (Paris: International Sunflower Association Sunflower), 28-31.

Joel, D. M. (1987). "Identification of *Orobancha* Seeds", in: *Proceedings of the 4th International Symposium on Parasitic Flowering Plants*, eds. H.C Weber, W.L. Forstreuter (Marburg: Philipps-Universität), 437-444.

Joel, D. M., and Losner-Goshen, D. (1994). The attachment organ of the parasitic angiosperms *Orobancha cumana* and *O. aegyptiaca* and its development. *Can J. Bot.* 72, 564-574. doi:10.1139/b94-075

Joel D. M., Steffens J. C., and Matthews, D. E. (1995). "Germination of weedy root parasites", in: *Seed Development and Germination*, eds. J. Kigel, G. Galili (New York: Marcel Dekker Inc.), 567-597.

Joel, D. M., Chaudhuri, S. K., Plakhine, D., Ziadna, H., Steffens, J. C. (2011). Dehydrocostus lactone is exuded from sunflower roots and stimulates germination of the root parasite *Orobancha cumana*. *Phytochemistry* 72, 624-634. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.01.037

Johal, L., Huber, D.M., and Martyn, R. (2004). "Late wilt of corn (maize) pathway analysis: intentional introduction of *Cephalosporium maydis*", in: *Pathways Analysis for the Introduction to the U.S. of Plant Pathogens of Economic Importance*. USDA-APHIS Technical Report No. 503025.

Jones, H.G. (1998). Stomatal control of photosynthesis and transpiration. *J. Exp. Bot.* 49 (Special_Issue), 387-398. doi: 10.1093/jxb/49.Special_Issue.387

Jones, J.D.G, and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323-329. doi: 10.1038/nature05286

Klaubauf, S., Tharreau, D., Fournier, E., Groenewald, J.Z., Crous, P.W., de Vries, R.P., et al. (2014). Resolving the polyphyletic nature of *Pyricularia* (*Pyriculariaceae*). *Stud. Mycol.* 79, 85-120. doi: 10.1016/j.simyco.2014.09.004

- Klein, O., and Kroschel, J. (2002). Biological control of *Orobanche* spp. with *Phytomyza orobanchia*, a review. *Biocontrol* 47, 245-277. doi: 10.1023/A:1014862302818
- Khokhar, M. K., Hooda, K. S., Sharma, S. S., and Singh, V. (2014). Post flowering stalk rot complex of maize-present status and future prospects. *Maydica* 59, 226-242
- Konanz, S., Kocsányi, L., and Buschmann, C. (2014). Advanced multi-color fluorescence imaging system for detection of biotic and abiotic stresses in leaves. *Agriculture* 4, 79-95. doi: 10.3390/agriculture4020079
- Kuckenbergh, J., Tartachnyk, I., and Noga, G. (2009). Temporal and spatial changes of chlorophyll fluorescence as a basis for early and precise detection of leaf rust and powdery mildew infections in wheat leaves. *Precis. Agric.* 10, 34-44. doi: 10.1007/s11119-008-9082-0
- Labrousse, P., Arnaud, M. C., Serieys, H., Bervillé, A., and Thalouarn, P. (2001). Several mechanisms are involved in resistance of *Helianthus* to *Orobanche cumana* Wallr. *Ann. Bot.* 88, 859-868. doi: 10.1006/anbo.2001.1520
- Lachia, M., Wolf, A. C., Jung, P. J. M., Screpanti, C., and De Mesmaeker, A. (2015). Strigolactam: New potent strigolactone analogues for the germination of *Orobanche cumana*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25, 2184-2188. doi: 10.1016/j.bmcl.2015.03.056
- Latouche, G., Debord, C., Raynal, M., Milhade, C., and Cerovic, Z. G. (2015). First detection of the presence of naturally occurring grapevine downy mildew in the field by a fluorescence-based method. *Photochem. Photobiol. Sci.* 14, 1807-1813. doi: 10.1039/c5pp00121
- Lechat, M. M., Brun, G., Montiel, G., Véronési, C., Simier, P., Thoiron, S., et al. (2015). Seed response to strigolactone is controlled by abscisic acid-independent DNA methylation in the obligate root parasitic plant, *Phelipanche ramosa* L. Pomel. *J. Exp. Bot.* 66, 3129-3140. doi: 10.1093/jxb/erv119
- Leufen, G., Noga, G., and Hunsche, M. (2014). Fluorescence indices for the proximal sensing of powdery mildew, nitrogen supply and water deficit in sugar beet leaves. *Agriculture* 4, 58-78. doi: 10.3390/agriculture402005
- Lichtenthaler, H.K. and Schweiger, J. (1998). Cell wall bound ferulic acid, the major substance of the blue-green fluorescence emission of plants. *J. Plant Physiol.* 152, 272-282. doi: 10.1016/S0176-1617(98)80142-9
- López-Granados, F., Torres-Sánchez, J., Serrano-Pérez, A., de Castro, A. I., Mesas-Carrascosa, F. J., and Peña, J. M. (2016). Early season weed mapping in sunflower

Introducción

using UAV technology: variability of herbicide treatment maps against weed thresholds. *Precis. Agri.* 17, 183-199. doi: 10.1007/s11119-015-9415-8

López-López, M., Calderón, R., González-Dugo, V., Zarco-Tejada, P. J., and Fereres, E. (2016). Early detection and quantification of almond red leaf blotch using high-resolution hyperspectral and thermal imagery. *Remote Sens.* 8, 276. doi: 10.3390/rs8040276

Louarn, J., Carbonne, F., Delavault, P., Becard, G., and Rochange, S. (2012). Reduced germination of *Orobanche cumana* seeds in the presence of arbuscular mycorrhizal fungi or their exudates. *PLoS One* 7(11): e49273. doi: 10.1371/journal.pone.0049273

Louarn, J., Boniface, M. C., Pouilly, N, Velasco, L., Pérez-Vich, B., Vincourt, P. and Muños, S. (2016). Sunflower resistance to broomrape (*Orobanche cumana*) is controlled by specific QTLs for different parasitism stages. *Front. Plant Sci.* 7:590. doi: 10.3389/fpls.2016.00590

Lumbroso, A., Villedieu-Percheron, E., Zurwerra, D., Screpanti, C., Lachia, M., Dakas, P. Y., et al. (2016). Simplified strigolactams as potent analogues of strigolactones for the seed germination induction of *Orobanche cumana* Wallr. *Pest. Manag. Sci.* 72, 2054-2068. doi: 10.1002/ps.4268

Ma, Y., Jia, J., An, Y., Wang, Z., and Mao, J. (2013). Potential of some hybrid maize lines to induce germination of sunflower broomrape. *Crop Sci.* 53, 260-270. doi: 10.2135/cropsci2012.03.0197

Maes, W.H., Minchin, P.E., Snelgar, W.P., and Steppe K. (2014). Early detection of *Psa* infection in kiwifruit by means of infrared thermography at leaf and orchard scale. *Funct. Plant Biol.* 41, 1207-1220. doi: 10.1071/FP14021

Mahlein, A.K. (2016). Plant disease detection by imaging sensors – parallels and specific demands for precision agriculture and plant phenotyping. *Plant Dis.* 100, 241-251. doi: 10.1094/PDIS-03-15-0340-FE

Martín-Sanz, A., Malek, J., Fernández-Martínez, J. M., Pérez-Vich, B. and Velasco, L. (2016). Increased virulence in sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) Populations from Southern Spain is associated with greater genetic diversity. *Front. Plant Sci.* 7:589. doi: 10.3389/fpls.2016.00589

Martinelli, F., Scalenghe, R., Davino, S., Panno, S., Scuderi, G., Ruisi, P., et al. (2015). Advanced methods of plant disease detection. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 35, 1-25. doi: 10.1007/s13593-014-0246-1

- Martínez-Ferri, E., Zumaquero, A., Ariza, M. T., Barceló, A., and Pliego, C. (2016). Nondestructive detection of white root rot disease in avocado rootstocks by leaf chlorophyll fluorescence. *Plant Dis.* 100, 49-58. doi: 10.1094/PDIS-01-15-0062-RE
- Maširević, S., Medić-Pap, S., Škorić, D., and Terzić, A. (2014). "Effect of roots of different sunflower hybrids and bio agent based on *Trichoderma asperellum* on broomrape germination", in: *Current situation of sunflower broomrape around the world, Proceedings of the Third International Symposium on Broomrape (Orobancha spp.) in Sunflower*, ed. International Sunflower Association (Paris: International Sunflower Association Sunflower), 89-94.
- Matsuoka, Y., Vigouroux, Y., Goodman, M.M., Sanchez G., J., Buckler, E., and Doebley, J. (2002). A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 6080-6084. doi: 10.1073/pnas.052125199
- Matusova, R., Van Mourika, T., and Bouwmeester, H.J. (2004). Changes in the sensitivity of parasitic weed seeds to germination stimulants. *Seed Sci. Res.* 14, 335-344. doi:10.1079/SSR2004187
- Maxwell, K., and Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659-668. doi: 10.1093/jexbot/51.345.659
- Mehta, Y.R. (2014). "Pillars of Integrated Disease Management", in: *Wheat Diseases and Their Management*, ed. Y.R. Mehta (Switzerland: Springer International Publishing), 17-63. doi: 10.1007/978-3-319-06465-9_2
- Meyer S, Cartelat A, Moya I, and Cerovic ZG. (2003). UV-induced blue-green and far-red fluorescence along wheat leaves: a potential signature of leaf ageing. *J. Exp. Bot.* 54, 757-769. doi: 10.1093/jxb/erg063
- Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente MAPAMA. (2015a). Anuario de Estadística Agraria. Año 2015. Available at: <http://www.mapama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2015/AE15.pdf>, accessed: March 29, 2016.
- Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, MAPAMA. (2015b). Encuesta sobre Superficies y Rendimientos de Cultivo (ESYRCE) Año 2015. Available at: http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/boletin2015_tcm7-424015.pdf, accessed: March 15, 2016.
- Molinero-Ruiz, M.L., Domínguez, J., and Melero-Vara, J.M. (2002). Races of isolates of *Plasmopara halstedii* from Spain and studies on their virulence. *Plant Dis.* 86, 736-740. doi: 10.1094/PDIS.2002.86.7.736

Introducción

Molinero-Ruiz, M. L., Melero-Vara, J. M., García-Ruiz, R., and Domínguez, J. (2006). Pathogenic diversity within field populations of *Orobanche cumana* and different reactions on sunflower genotypes. *Weed Res.* 46, 262-469. doi: 10.1111/j.1365-3180.2006.00517.x

Molinero-Ruiz, M. L., Pérez-Vich, B., Pineda-Martos, R., and Melero-Vara, J. M. (2008). Indigenous highly virulent accessions of the sunflower root parasitic weed *Orobanche cumana*. *Weed Res.* 48, 169-178. doi: 10.1111/j.1365-3180.2007.00611.x

Molinero-Ruiz, M. L., García-Ruiz, R., Melero-Vara, J. M., and Domínguez, J., (2009). *Orobanche cumana* race F: performance of resistant sunflower hybrids and aggressiveness of populations of the parasitic weed. *Weed Res.* 49, 469-478. doi: 10.1111/j.1365-3180.2009.00708.x

Molinero-Ruiz, M. L., Melero-Vara, J. M., and Mateos, A. (2010). *Cephalosporium maydis*, the cause of late wilt in maize, a pathogen new to Portugal and Spain. *Plant Dis.* 94, 379. doi: 10.1094/PDIS-94-3-0379A

Molinero-Ruiz, L., and Domínguez, J. (2014). "Current situation of sunflower broomrape in Spain", in: *Current situation of sunflower broomrape around the world, Proceedings of the Third International Symposium on Broomrape (Orobanche spp.) in Sunflower*, ed. International Sunflower Association (Paris: International Sunflower Association Sunflower), 19-27.

Molinero-Ruiz, L., Delavault, P., Pérez-Vich, B., Pacureanu-Joita, M., Bulos, M., Altieri, E., et al. (2015). History of the race structure of *Orobanche cumana* and the breeding of sunflower for resistance to this parasitic weed: A review. *Span. J. Agric. Res.* 13: 4. doi: 10.5424/sjar/2015134-8080

Montero, R., Pérez-Bueno, M. L., Barón, M., Florez-Sarasa, I., Tohge, T., Fernie, A. R., et al. (2016). Alterations in primary and secondary metabolism in *Vitis vinifera* 'Malvasía de Banyalbufar' upon infection with Grapevine leafroll-associated virus 3. *Physiol. Plant.* 157, 442-452. doi: 10.1111/ppl.12440

Moradi, N., Rahimian, H., Dehestani, A., and Babaeizad, V. (2017). Comparative study of selected cucumber cultivars resistant to Powdery mildew caused by *Sphaerotheca fuliginea*. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology* 18, 30-38.

Morales, F., Cerovic, Z.G., and Moya, I. (1996). Time resolved blue-green fluorescence of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves: Spectroscopic evidence for the presence of ferulic acid as the main fluorophore in the epidermis. *BBA Bioenergetics* 1273, 251-262. doi: 10.1016/0005-2728(95)00153-0

- Müller-Stöver, D., Thomas, H., Sauerborn, J., and Kroschel, J. (2004). Two granular formulations of *F. oxysporum* f. sp. *orthoceras* to mitigate sunflower broomrape *Orobancha cumana*. *Biocontrol* 49, 595-602. doi: 10.1023/B:BICO.0000036438.66150.21
- Muniz, C. R., Freire, F. C. O., Viana, F. M. P., Cardoso, J. E., Sousa, C. A. F., Guedes, M. I. F., et al. (2014). Monitoring cashew seedlings during interactions with the fungus *Lasiodiplodia theobromae* using chlorophyll fluorescence imaging. *Photosynthetica* 52, 529-537. doi: 10.1007/s11099-014-0061-6
- Murchie, E. H., and Lawson, T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *J. Exp. Bot.* 64, 3983-3998. doi: 10.1093/jxb/ert208
- Niederbacher, B., Winkler, J., and Schnitzler, J. (2015). Volatile organic compounds as non-invasive markers for plant phenotyping. *J. Exp. Bot.* 66, 5403-5416. doi: 10.1093/jxb/erv219
- Nigh, E.L. (1990). Stress factors influencing *Fusarium* infection in asparagus. *Acta Horticulturae* 271, 315-322.
- Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pest. *J. Agric. Sci.* 144, 31-43. doi:10.1017/S0021859605005708
- Oerke, E.C., Fröhling, P., and Steiner, U. (2011). Thermographic assessment of scab disease on apple leaves. *Precis. Agric.* 12, 699-715. doi: 10.1007/s11119-010-9212-3
- Oerke, E. C., Mahlein, A. K., and Steiner, U. (2014). "Proximal sensing of plant diseases", in: *Detection and Diagnostics of Plant Pathogens*, eds. M.L. Gullino, P.J.M. Bonants. (Utrecht: Springer), 55-68. doi: 10.1007/978-94-017-9020-8_4
- Pacureunu-Joita, M., Raranciuc, S., Procopovici, E., Sava, E., and Nastase, D. (2008). "The impact of the new races of broomrape (*Orobancha cumana* Wallr.) parasite in sunflower crop in Romania", in: *Proceedings of the 17th International Sunflower Conference*, ed. International Sunflower Association (Paris: International Sunflower Association Sunflower), 225-231.
- Paliwal, R.L. (2000). "Origin, evolution and spread of maize", in: *Tropical Maize: Improvement and Production*. eds. R.L. Paliwal, G. Granados, H.R. Lafitte, A.D. Vlollic (Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations), 5-11.
- Parker, C. (2013). "The parasitic weeds of the *Orobanchaceae*", in: *Parasitic Orobanchaceae*, eds. D.M. Joel, J. Gressel, L.J. Musselman (Berlin: Springer), 319-344. doi: 10.1007/978-3-642-38146-1_18

Introducción

Payak, M.M., Lal, S., Lilaramani, J., and Renfro, B.L. (1970). *Cephalosporium maydis* a new threat to maize in India. *Indian Phytopathol.* 23, 562-569.

Pecsi, S., and Nemeth, L. (1998). Appearance of *Cephalosporium maydis* Samra, Sabet and Hingorani in Hungary. *Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent* 63,873-877.

Peña, J. M., Torres-Sánchez, J., Serrano-Pérez, A., and López-Granados, F. (2014). Weed mapping in early-season sunflower fields using images from an unmanned aerial vehicle (UAV). *Revista de Teledetección* 42, 39-48. doi: 10.4995/raet.2014.3148

Pérez-Bueno, M. L., Ciscato, M., García-Luque, I., Valcke, R., and Barón, M. (2006). Imaging viral infection: studies on *Nicotiana benthamiana* plants infected with the pepper mild mottle tobamovirus. *Photosynth. Res.* 90:111. doi: 10.1007/s11120-006-9098-0

Pérez-Bueno, M.L., Pineda, M., Díaz-Casado, E., and Barón M. (2015) Spatial and temporal dynamics of primary and secondary metabolism in *Phaseolus vulgaris* challenged by *Pseudomonas syringae*. *Physiol. Plant.* 153, 161-174. doi: 10.1111/ppl.12237

Pérez-Bueno, M.L., Granum, E., Pineda, M., Flors, V., Rodríguez-Palenzuela, P., López-Solanilla, E., et al. (2016a) Temporal and spatial resolution of activated plant defense responses in leaves of *Nicotiana benthamiana* infected with *Dickeya dadantii*. *Front. Plant Sci.* 6:1209. doi: 10.3389/fpls.2015.01209

Pérez-Bueno, M.L., Pineda, M., Cabeza, F. M., and Barón, M. (2016b). Multicolor fluorescence imaging as a candidate for disease detection in plant phenotyping. *Front. Plant Sci.* 7:1790. doi: 10.3389/fpls.2016.01790

Pérez-Vich, B., Akhtouch, B., Knapp, S.J., Leon, A.J., Velasco, L., Fernández-Martínez, J.M., et al. (2004). Quantitative trait loci for broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) resistance in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 109, 92-102. doi: 10.1007/s00122-004-1599-7

Pérez-Vich, B., Velasco, L., Rich, P. J., and Ejeta, G. (2013). "Marker assisted and physiology-based breeding for resistance to *Orobanchaceae*", in: *Parasitic Orobanchaceae*, eds. D.M. Joel, J. Gressel, L.J. Musselman (Berlin: Springer), 369-391. doi: 10.1007/978-3-642-38146-1_21

Pineda M, Gaspar L, Morales F, Szigeti Z, and Barón M. (2008a). Multicolor fluorescence imaging of leaves-a useful tool for visualizing systemic viral infections in plants. *Photochem. Photobiol.* 84, 1048-1060. doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00357.x

- Pineda, M., Soukupová, J., Matouš, K., Nedbal, L., and Barón, M. (2008b). Conventional and combinatorial chlorophyll fluorescence imaging of tobamovirus-infected plants. *Photosynthetica* 46, 441-451. doi: 10.1007/s11099-008-0076-y
- Piperno, D. R., and Flannery, K. V. (2001). The earliest archaeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: new accelerator mass spectrometry dates and their implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 2101-2103. doi: 10.1073/pnas.98.4.2101
- Prashar, A., and Jones, H. G. (2014). Infra-red thermography as a high-throughput tool for field phenotyping. *Agronomy* 4, 397-417. doi: 10.3390/agronomy4030397
- Prider, J., Craig, A., Matthew, J., and Correll, R. (2013). "Natural seed bank decline of *Phelipanche mutellii* in South Australia", in: *Proceedings of the 12th World Congress on Parasitic Plants* 59.
- Raji, S. N., Subhash, N., Ravi, V., Saravanan, R., Mohanan, C. N., Nita, S., and Makesh Kumar, T. (2015). Detection of mosaic virus disease in cassava plants by sunlight-induced fluorescence imaging: a pilot study for proximal sensing. *Int. J. Remote Sens.* 36, 2880-2897. doi: 10.1080/01431161.2015.1049382
- Raji, S. N., Subhash, N., Ravi, V., Saravanan, R., Mohanan, C. N., Makesh Kumar, T., et al. (2016). Detection and classification of mosaic virus disease in cassava plants by proximal sensing of photochemical reflectance index. *J. Indian Soc. Remote Sens.* 44, 875-883. doi: 10.1007/s12524-016-0565-6
- Ranum, P., Peña-Rosas, J.P., and García-Casal, M.N. (2014). Global maize production, utilization, and consumption. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1312, 105-112. doi: 10.1111/nyas.12396
- Raupp, F. M., and Spring, O. (2013). New sesquiterpene lactones from sunflower root exudate as germination stimulants for *Orobanche cumana*. *J. Agric. Food Chem.* 61, 10481-10487. doi: 10.1021/jf402392e
- Reverchon, S., and Nasser, W. (2013). Dickeya ecology, environment sensing and regulation of virulence programme. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 622-636. doi: 10.1111/1758-2229.12073
- Rispail, N., Dita, M. A., González-Verdejo, C., Pérez-de-Luque, A., Castillejo, M. A., Prats, E., et al. (2007). Plant resistance to parasitic plants: molecular approaches to an old foe. *New Phytol.* 173, 703-712. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.01980.x
- Rispail, N., and Rubiales, D. (2015). Rapid and efficient estimation of pea resistance to the soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum* by infrared imaging. *Sensors* 15, 3988-4000. doi: 10.3390/s150203988

Introducción

Ritchie, S. and Hanway, J. (1982). "How a corn plant develops". Iowa State University of Science and Technology Coop.Ext. Services. Ames. Special Report 48, 24.

Rodríguez-Moreno, L., Pineda, M., Soukupová, J., Macho, A. P., Beuzón, C. R., Barón, M., et al. (2008). Early detection of bean infection by *Pseudomonas syringae* in asymptomatic leaf areas using chlorophyll fluorescence imaging. *Photosynth. Res.* 96, 27-35. doi: 10.1007/s11120-007-9278-6

Rolfe, S. A., and Scholes, J. D. (2010). Chlorophyll fluorescence imaging of plant-pathogen interactions. *Protoplasma* 247, 163-175. doi: 10.1007/s00709-010-0203-z

Rousseau, C., Belin, E., Bove, E., Rousseau, D., Fabre, F., Berruyer, R., et al. (2013). High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. *Plant Methods* 9:17. doi: 10.1186/1746-4811-9-17

Rousseau, C., Hunault, G., Gaillard, S., Bourbeillon, J., Montiel, G., Simier, P., et al. (2015). Phenoplant: a web resource for the exploration of large chlorophyll fluorescence image datasets. *Plant Methods* 11:24. doi: 10.1186/s13007-015-0068-4

Rubiales, D., Fernández-Aparicio, M., Wegmann, K., and Joel, D. M. (2009). Revisiting strategies for reducing the seedbank of *Orobanche* and *Phelipanche* spp. *Weed Res.* 49, 23-33. doi: 10.1111/j.1365-3180.2009.00742.x

Sabet, K. A., Samra, A. S., and Mansour, I. M. (1966a). "Late wilt disease of maize and a study of the causal organism", in: *Investigations of stalk rot disease of maize*. U.A.R. Tech. Bull. Min. Agric., 45.

Sabet, K.A., Samra, A.S., and Mansour, I.S. (1966b). Interaction between *Fusarium oxysporum*, *F. vasinfectum*, and *Cephalosporium maydis* on cotton and maize. *Ann. Appl. Biol.* 58, 93-101. doi: 10.1111/j.1744-7348.1966.tb05074.x

Sabet, K. A., A. M. Zaher, A. S. Samra, and I. M. Mansour. (1970a). Pathogenic behavior of *Cephalosporium maydis* and *C. acremonium*. *Ann. Appl. Biol.* 66, 257-263.

Sabet, K. A., A. S. Samra, and I. M. Mansour. (1970b). Saprophytic behavior of *Cephalosporium maydis* and *C. acremonium*. *Ann. Appl. Biol.* 66, 265-271.

Sabet, K.A., Samra, A.S., and Abdel-Rahim, M.F. (1972). Systemic action of benomyl against late-wilt disease of maize. *Ann. Appl. Biol.* 71, 211-218. doi: 10.1111/j.1744-7348.1972.tb05084.x

- Sahab, A. F., Osman, A. R., Soleman, N. K., and Mikhail, M. S. (1985). Studies on root-rot of lupin in Egypt and its control. *Egypt. J. Phytopathol.* 17, 23-35.
- Sala, C. A., Bulos, M., and Echarte, M. (2008). Genetic analysis of an induced mutation conferring Imidazolinone esistance in sunflower. *Crop Sci.* 48, 1917-1922. doi: 10.2135/cropsci2007.11.0625
- Sala, C. A., Bulos, M., Altieri, E., and Ramos, M. L., (2012). Genetics and breeding of herbicide tolerance in sunflower. *Helia* 35, 57-70. doi: 10.2298/HEL1257057S
- Saleh, A. A., Zeller, K. A., Ismael, A. M., Fahmy, Z. M., El-Assiuty, E. M., and Leslie, J. F. (2003). Amplified fragment length polymorphism diversity in *Cephalosporium maydis* from Egypt. *Phytopathology* 93, 853-859. doi: 10.1094/PHYTO.2003.93.7.853.
- Samra, A. S., Sabet, K. A., and Hingorani, M. K. (1963). Late wilt disease of maize caused by *Cephalosporium maydis*. *Phytopathology* 53, 402-406.
- Samra, A.S., Sabet, K.A., and Abdel-Rahim, M.F. (1966). "Effect of soil conditions and cultural practices on infection with stalk rots" in: *Investigations on stalk-rot disease of maize.* eds. A.S. Samra, K.A. Sabet (Cairo: U.A.R. Ministry of Agric. Government Printing Offices), 117-164.
- Samra, A.S., Sabet, K.A., Kamel, M. and Abdel-Rahim, M.F. (1972). Further studies on the effect of field conditions and cultural practices on infection with stalk-rot complex of maize. Min. Agr. Pl. Prot. Dept. Tech. Bull. 2.
- Savary, S., Ficke, A., Aubertot, J. N., and Hollier, C. (2012). Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Security* 4, 519-537. doi: 10.1007/s12571-012-0200-5
- Screpanti, C., Yoneyama, K. and Bouwmeester, H. J. (2016). Strigolactones and parasitic weed management 50 years after the discovery of the first natural strigolactone *strigol*: status and outlook. *Pest. Manag. Sci.* 72, 2013-2015. doi: 10.1002/ps.4436
- Schneiter, A.A., and Miller, J.F. (1981). Description of sunflower growth stages. *Crop Sci.* 21, 901-903. doi:10.2135/cropsci1981.0011183X002100060024x
- Seiler, G.J., Qi, L.L., and Marek, L.F. (2017). Utilization of sunflower crop wild relatives for cultivated sunflower improvement. *Crop Sci.* 57, 1-19. doi: 10.2135/cropsci2016.10.0856.
- Shabana, Y. M., Müller-Stöver, D., and Sauerborn, J. (2003). Granular Pesta formulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras* for biological control of

Introducción

sunflower broomrape: efficacy and shelf-life. *Biol. Control* 26, 189-201. doi: 10.1016/S1049-9644(02)00130-5

Shiferaw, B., Prasanna, B.M., Hellin, J, and Bänziger, M. (2011). Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. *Food Sec.* 3, 307-327. doi: 10.1007/s12571-011-0140-5

Simko, I., Jimenez-Berni, J. A., and Sirault, X. R. (2016). Phenomic approaches and tools for phytopathologists. *Phytopathology* 107, 6-17. doi: 10.1094/PHYTO-02-16-0082-RVW

Singh, S. D., and Siradhana, B. S. (1987a). Influence of some environmental conditions on the development of late wilt of maize induced by *Cephalosporium maydis*. *Indian J. Mycol. Pl. Path.* 17, 1-5.

Singh, S. D., and Siradhana, B. S. (1987b). Survival of *Cephalosporium maydis*, incitant of late wilt of maize. *Indian J. Mycol. Pl. Pathol.* 17, 83-85.

Singh, S.D. and Siradhana, B.S. (1988). Date of sowing in relation to late wilt disease of maize. *Indian Phytopath.* 41, 489-491.

Singh, S.D. and Siradhana, B.S. (1990). Effect of macro and micronutrients on the development of late wilt of maize induced by *Cephalosporium maydis*. *Summa Phytopathol.* 16, 140-145.

Škorić, D. (2009). Sunflower breeding for resistance to abiotic stresses. *Helia* 32, 1-16. doi: 10.2298/HEL0950001S

Škorić, D. (2016). "Sunflower breeding for resistance to abiotic and biotic stresses", in: *Abiotic and biotic stress in plants - Recent advances and future perspectives*. eds. Shanker, A., Shanker, C., (InTech). doi: 10.5772/62159.

Stoll, M., Schultz, H.R., and Berkelmann-Loehnertz, B. (2008) Exploring the sensitivity of thermal imaging for *Plasmopara viticola* pathogen detection in grapevines under different water status. *Funct. Plant Biol.* 35, 281-288. doi: 10.1071/FP07204

Strange, R.N., and Scott, P.R. (2005). Plant disease: a threat to global food security. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 83-116. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.113004.133839

Sugimoto, Y., Ueno, K., Umeda, S., Furumoto, T., Mizutani, M., Takikawa, H., et al. (2014). "SU-01, a novel germination stimulant for root parasitic weeds from sunflower", in: *Current situation of sunflower broomrape around the world, Proceedings of the Third International Symposium on Broomrape (Orobanchae spp.)*

in *Sunflower*, ed. International Sunflower Association (Paris: International Sunflower Association Sunflower), 95-99.

Szigeti, Z., Almási, A., and Sárvári, E. (2002). Changes in the photosynthetic functions in leaves of Chinese cabbage infected with Turnip yellow mosaic virus. *Acta Biologica Szegediensis* 46, 137-138.

Szigeti, Z. (2008). Physiological status of cultivated plants characterised by multi-wavelength fluorescence imaging. *Acta Biol. Hung.* 56, 223-234. doi: 10.1556/AAgr.56.2008.2.11

Tan, S., Evans, R. R., Dahmer, M. L., Singh, B. K., and Shaner D. L., (2005). Imidazolinone tolerant crops: history, current status and future. *Pest Manag. Sci.* 61, 246-257. doi: 10.1002/ps.99

Trabelsi, I., Yoneyama, I., Abbas, Z., Amri, M., Xie, X., Kisugi, T., et al. (2017). Characterization of strigolactones produced by *Orobanche foetida* and *Orobanche crenata* resistant faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes and effects of phosphorous, nitrogen, and potassium deficiencies on strigolactone production. *S. Afr. J. Bot.* 108, 15-22. doi: 10.1016/j.sajb.2016.09.00

Ueno, K., Furumoto, T., Umeda, S., Mizutani, M., Takikawa, H., Batchvarova, R., et al. (2014). Heliolactone, a non-sesquiterpene lactone germination stimulant for root parasitic weeds from sunflower. *Phytochemistry* 108, 122-128. doi: 10.1021/jf2024193

USDA. (2016). Corn-based ethanol production in the United States has plateaued in recent years. Available at: <https://www.ers.usda.gov/data-products/chart-gallery/gallery/chart-detail/?chartId=58346>, accessed August 12, 2016.

Vadivambal, R. and Jayas, D.S. (2011). Applications of thermal imaging in agriculture and food industry—A review. *Food Bioprocess Technol.* 4, 186-199. doi: 10.1007/s11947-010-0333-5

Varela, C. P., Casal, O. A., Padin, M. C., Martinez, V. F., Osés, M. S., Scauflaire, J., et al. (2015). First report of *Fusarium temperatum* causing seedling blight and stalk rot on maize in Spain. *Can. J. Plant Pathol.* 37, 495-505. doi: 10.1094/PDIS-02-13-0167-PDN

Vear, F. (2016). Changes in sunflower breeding over the last fifty years. *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, 23 (2) D202. doi: 10.1051/ocl/2016006

Velasco, L., Pérez-Vich, B., Jan, C.C., and 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 Breed.* 126, 67-71. doi: 10.1111/j.1439-0523.2006.01278.x

Introducción

Velasco, L., Pérez-Vich, B., Yassein, A. A. M., Jan, C. C., and Fernández- Martínez, J. M. (2012). Inheritance of resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in a interspecific cross between *Helianthus annuus* and *Helianthus debilis* subsp. tardiflorus. *Plant Breed.* 131, 220-221. doi: 10.1111/j.1439-0523.2011.01915.x

Velasco, L., Pérez-Vich, B., and Fernández-Martínez, J. M. (2016). Research on resistance to sunflower broomrape: an integrated vision. *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids* 23 (2) D203. doi: 10.1051/ocl/2016002

Véronési, C., Bonnin, E., Calvez, S., Thalouarn, P., and Simier, P., (2007). Activity of secreted cell wall modifying enzymes and expression of peroxidase-encoding gene following germination of *Orobanche ramosa*. *Biol. Plantarum* 51, 391-394. doi: 10.1007/s10535-007-0084-y

Vrânceanu, A. V. (1977). *El Girasol*. Madrid: Mundi Prensa.

Vrânceanu, A. V., Tudor, V. A., Stoenescu, F. M., and 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*, ed. International Sunflower Association (Paris: International Sunflower Association Sunflower), 74-82.

Vurro, M., Prandi, C., and Baroccio, F. (2016). Strigolactones: how far is their commercial use for agricultural purposes?. *Pest. Manag. Sci.* 72, 2026-2034. doi: 10.1002/ps.4254

Wang, M., Ling, N., Dong, X., Zhu, Y., Shen, Q., and Guo, S. (2012). Thermographic visualization of leaf response in cucumber plants infected with the soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Plant Physiol. Biochem.* 61, 153-161. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.09.01

Westwood, J.H. (2013). "The physiology of the established parasite-host association", in: *Parasitic Orobanchaceae*, eds. D.M. Joel, J. Gressel, L.J. Musselman (Berlin: Springer), 87-114. doi: 10.1007/978-3-642-38146-1_6

Xie, C., Shao, Y., Li, X., and He, Y. (2015). Detection of early blight and late blight diseases on tomato leaves using hyperspectral imaging. *Sci Rep* 5: 16564. doi: 10.1038/srep16564

Xie, C., and He, Y. (2016). Spectrum and image texture features analysis for early blight disease detection on eggplant leaves. *Sensors* 16, 676. doi: 10.3390/s16050676

Yang, C., Hu, L. Y., Ali, B., Islam, F., Bai, Q. J., Yun, X. P., et al. (2016). Seed treatment with salicylic acid invokes defence mechanism of *Helianthus annuus* against *Orobanche cumana*. *Ann. Appl. Biol.* 169, 408-422. doi: 10.1111/aab.12311

- Ye, X., Chen, J., McErlean, C. S., Zhang, M., Yu, R., and Ma, Y. (2017). The potential of foxtail millet as a trap crop for sunflower broomrape. *Acta Physiol. Plant.* 39, 1. doi: 10.1007/s11738-016-2300-x
- Yoneyama, K., Xie, X. N., Kisugi, T., Nomura, T., Sekimoto, H., Yokota, T., et al. (2011). Characterization of strigolactones exuded by Asteraceae plants. *Plant Growth Regul.* 65, 495-504. doi: 10.1007/s10725-011-9620-z
- Zeller, K. A., Jurgenson, J. E., El-Assiuty, Z. M., and Leslie, J. F. (2000). Isozyme and amplified fragment length polymorphisms from *Cephalosporium maydis* in Egypt. *Phytoparasitica* 28, 121-130. doi: 10.1007/BF02981741
- Zeller, K. A., Ismael, A. M., El-Assiuty, E. M., Fahmy, Z. M., and Bekheet, F. M. (2002). Relative competitiveness and virulence of four clonal lineages of *Cephalosporium maydis* from Egypt toward greenhouse-grown maize. *Plant Dis.* 86, 373-378. doi: 10.1094/PDIS.2002.86.4.373
- Zhang, W., Ma, Y., Wang, Z., Ye, X., and Shui, J. (2013). Some soybean cultivars have ability to induce germination of sunflower broomrape. *PLoS One* 8(3):e59715. doi: 10.1371/journal.pone.0059715
- Zhang, M., Ma, Y., Zhong, W., Jia, X., Wu, D., Yu, R., et al. (2015). N-P-K ratio affects exudation of germination stimulants and resistance of tobacco seedlings to broomrapes. *Plant Growth Regul.* 76, 281-288. doi: 10.1007/s10725-014-9999-4
- Zhao, Y. R., Yu, K. Q., Li, X., and He, Y. (2016). Detection of fungus infection on petals of rapeseed (*Brassica napus* L.) using NIR hyperspectral imaging. *Sci Rep* 6:38878. doi: 10.1038/srep38878
- Zhu, H., Cen, H., Zhang, C., and He, Y. (2016). Early detection and classification of tobacco leaves inoculated with tobacco mosaic virus based on hyperspectral imaging technique, in: *2016 ASABE Annual International Meeting* (p. 1). (St. Joseph: American Society of Agricultural and Biological Engineer). doi: 10.13031/aim.201624604

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta lo expuesto en el capítulo anterior, el objetivo general de esta Tesis Doctoral es poner a punto metodologías que permitan la identificación temprana (pre-sintomática) y no destructiva de la marchitez tardía del maíz (enfermedad descrita en los últimos años en la Península Ibérica) y del jopo del girasol.

Estos objetivos generales se descomponen en los siguientes objetivos específicos:

- 1) Determinar si la infección del maíz por *Harpophora maydis* puede detectarse antes del desarrollo de los síntomas de marchitez mediante termometría infrarroja de cubierta.
- 2) Identificar y caracterizar aislados de *H. maydis* y de otras especies de hongos de suelo asociadas a la marchitez tardía en zonas productoras de maíz de la Península Ibérica. Determinar su capacidad patogénica.
- 3) Evaluar el potencial de la emisión de fluorescencia multiespectral de hojas de girasol inducida por luz UV para identificar la infección por *Orobanche cumana* durante el periodo de crecimiento subterráneo de la planta parásita.
- 4) Determinar la eficacia del uso de imágenes térmicas de hojas de girasol como indicadores de la infección por *O. cumana* durante el periodo de crecimiento subterráneo de la planta parásita.

Los resultados relativos al primer objetivo se recogen en el capítulo 3, que comprende el manuscrito **“Geographic distribution and aggressiveness of *Harpophora maydis* in the Iberian peninsula, and thermal detection of maize late wilt”** publicado en European Journal of Plant Pathology (2016) doi: 10.1007/s10658-015-0775-8. Los resultados del segundo objetivo se presentan en el mismo capítulo 3 y en el capítulo 4, correspondiente al manuscrito **“The late wilt of corn (*Zea mays* L.) caused by *Cephalosporium maydis* and other fungi associated at the Iberian Peninsula”** publicado en Summa Phytopathologica (2015) doi: 10.1590/0100-5405/1998.

Objetivos

El tercer objetivo queda contemplado en los capítulos 5 y 6 que recogen, respectivamente, el manuscrito “**Fluorescence imaging in the red and far-red region during growth of sunflower plantlets. Diagnosis of the early infection by the parasite *Orobanche cumana***” publicado en *Frontiers in Plant Science* (2016) doi: 10.3389/fpls.2016.00884 y el manuscrito “**Use of blue-green fluorescence and thermal imaging in the early detection of sunflower infection by the root parasitic weed *Orobanche cumana* Wallr.**” aceptado para su publicación en *Frontiers in Plant Science* (2017). doi: 10.3389/fpls.2017.00833. Este último artículo también presenta los resultados correspondientes al cuarto objetivo de esta Tesis Doctoral.

CAPÍTULO 3

**GEOGRAPHIC DISTRIBUTION AND AGGRESSIVENESS OF
HARPOPHORA MAYDIS IN THE IBERIAN PENINSULA, AND
THERMAL DETECTION OF MAIZE LATE WILT**

Geographic distribution and aggressiveness of *Harpophora maydis* in the Iberian peninsula, and thermal detection of maize late wilt

C. M. Ortiz-Bustos · L. Testi · A. B. García-Carneros ·
L. Molinero-Ruiz

Accepted: 21 September 2015 / Published online: 30 September 2015
© Koninklijke Nederlandse Plantenziektenkundige Vereniging 2015

Abstract Late wilt (causal agent *Harpophora maydis*), with initial symptoms appearing around flowering, has become frequent in maize fields of the Iberian Peninsula. The geographical distribution of the pathogen in the main maize - growing areas in the South of Portugal and Spain was determined by prospecting 59 fields from 2009 to 2013. Among all the isolates of *H. maydis* identified, 14 isolates were molecularly confirmed by ITS amplification, and their pathogenic traits (i.e. aggressiveness) were analyzed by inoculation of the maize susceptible cultivar PR32W86 grown in pots under shade-house conditions for the whole growing season. One of the isolates was highly aggressive, causing intense symptoms as well as significant reductions in weight of both aboveground parts and roots. Moderately aggressive isolates caused significantly high disease values but not all of them were related to reductions in plant weight. The infection by *H. maydis* was monitored by measurements of canopy temperature and crop water stress index of maize. Canopy temperature was assessed in potted control plants and in plants inoculated with the most aggressive isolate in two experiments conducted outdoors in 2012 and 2013. Both indices responded to the presence of fungal

infection in both years, which was detected up to 17 days before development of symptoms in the plants. This study shows the wide distribution of *H. maydis* in the Iberian Peninsula and highlights the importance of genetic resistance for controlling the pathogen in southern Europe. In addition, the thermal detection of the infection prior to symptom development might lead to useful applications of non-destructive pre-symptomatic disease diagnosis in controlling late wilt disease in maize.

Keywords Corn · *Cephalosporium maydis* · Early diagnosis · Soilborne pathogen · Vascular wilt · *Zea mays* L.

Introduction

In recent years, late wilt caused by the fungus *Harpophora maydis* (synonym *Cephalosporium maydis* Samra, Sabet & Hingorani), which is morphologically and molecularly closely related to *Gaeumannomyces-Harpophora* species complex (Gams 2000; Saleh and Leslie 2004) has emerged as an important disease of maize (*Zea mays* L.) in the Iberian Peninsula (Molinero-Ruiz et al. 2010). In addition to Spain and Portugal, late wilt of maize has also been reported in India (Payak et al. 1970), Israel (Drori et al. 2013) and Hungary (Pecsi and Nemeth 1998). In infested fields, incidences up to 60 % in susceptible varieties can cause 50 % grain yield losses (Molinero-Ruiz et al. 2010). Research about population structure of *H. maydis* has been mainly focused on genetic analyses (Zeller et al. 2000; Saleh et al.

C. M. Ortiz-Bustos · A. B. García-Carneros ·
L. Molinero-Ruiz (✉)
Department of Crop Protection, Institute for Sustainable
Agriculture, CSIC, PO BOX. 4084, 14080 Córdoba, Spain
e-mail: lmolinero@ias.csic.es

L. Testi
Department of Agronomy, Institute for Sustainable Agriculture,
CSIC, PO BOX. 4084, 14080 Córdoba, Spain

Geographic distribution and aggressiveness of *Harpophora maydis* in the Iberian Peninsula, and thermal detection of maize late wilt

ABSTRACT

Late wilt caused by the fungus *Harpophora maydis*, with initial symptoms appearing around flowering, has become frequent in maize fields of the Iberian Peninsula since the first observations of the disease in 2003 (Molinero-Ruiz et al., 2010). The geographical distribution of the pathogen in the main maize-growing areas in the South of Portugal and Spain was determined by prospecting 59 fields from 2009 to 2013, and from flowering to the end of the crop. All the colonies of *H. maydis* were morphologically identified and, 14 of them were also amplified by ITS and pathogenically characterized. The aggressiveness of the isolates was studied by inoculation of the maize susceptible cultivar PR32W86 grown in pots under shade-house conditions for the whole growing season. One of the isolates was highly aggressive, causing intense symptoms as well as significant reductions of weight of both aboveground parts and roots. Moderately aggressive isolates caused significantly high disease values but not all of them were related to reductions of plant weight. The infection by *H. maydis* was monitored by measurements of canopy temperature and crop water stress index of maize. Canopy temperature was assessed in potted control plants and in plants inoculated with the most aggressive isolate in two experiments conducted outdoors in 2012 and 2013. Both indices responded to the presence of fungal infection in both years, which was detected up to 17 days before development of symptoms in the plants. This study shows the wide distribution of *H. maydis* in the Iberian Peninsula and, by extension, in maize growing areas of southern Europe, and highlights the importance of genetic resistance for controlling the pathogen in these areas. In addition, the thermal detection of the infection prior to symptom development might result in useful applications such as qualitative and quantitative phenotyping of susceptibility and/or resistance of entries within maize breeding programmes.

References:

Molinero-Ruiz, M. L., Melero-Vara, J. M., and Mateos, A. (2010). *Cephalosporium maydis*, the cause of late wilt in maize, a pathogen new to Portugal and Spain. *Plant Dis.* 94, 379. doi: 10.1094/PDIS-94-3-0379A

CAPÍTULO 4

LA MARCHITEZ TARDÍA DEL MAÍZ (*ZEAMAYS* L.)
CAUSADA POR *CEPHALOSPORIUM MAYDIS* EN LA
PENÍNSULA IBÉRICA, Y OTROS HONGOS ASOCIADOS

Este capítulo es una versión adaptada del artículo

La marchitez tardía del maíz (*Zea mays* L.) causada por *Cephalosporium maydis* en la Península Ibérica, y otros hongos asociados

Carmen Maria Ortiz-Bustos¹, Ana B. García-Carneros¹, Leire Molinero-Ruiz¹

¹Departamento de Protección de Cultivos. Instituto de Agricultura Sostenible- CSIC, Apdo. de Correos 4084, C.P.14080 Córdoba, España.
Autor para correspondencia: Leire Molinero-Ruiz (lmolinero@ias.csic.es)
Data de chegada: 15/04/2014. Aceito para publicação em: 23/04/2015.

10.1590/0100-5405/1998

RESUMEN

Ortiz-Bustos, C.M.; García-Carneros, A.B.; Molinero-Ruiz, L. La marchitez tardía del maíz (*Zea mays* L.) causada por *Cephalosporium maydis* en la Península Ibérica, y otros hongos asociados. *Summa Phytopathologica*, v.41, n.2, p.107-114, 2015.

Las especies de hongos de suelo asociadas a *Cephalosporium maydis* como agente causal de la marchitez tardía del maíz en la Península Ibérica se identificaron muestreando 19 campos con síntomas de marchitez en las principales zonas de cultivo entre 2011 y 2012. En el 47% de los campos no se identificó *C. maydis*, pero sí *Fusarium graminearum*, *F. verticillioides*, *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* y *Trichoderma harzianum* infectando las plantas de maíz. En los campos restantes, junto a *C. maydis* se identificaron otros hongos de suelo en porcentajes apreciables: *F. verticillioides* (19%), *F. proliferatum* (19%), *F. equiseti* (9%), *F. oxysporum* (9%) y *Pythium oligandrum* (9%). El crecimiento vascular de *C. maydis* y de otras especies fúngicas en plantas de maíz se confirmó analizando plantas con marchitez procedentes de tres campos diferentes. Tanto *C. maydis* como *F. graminearum*, *F. equiseti*, *F.*

proliferatum y *T. harzianum* se aislaron de la inserción entre la raíz y tallo y a 10 cm de altura en el tallo de las plantas. El efecto de la infección por *C. maydis* sobre la producción de las plantas de maíz se cuantificó en macetas y condiciones seminaturales en el 2011. En plantas inoculadas se obtuvo una reducción del peso de las mazorcas del 54%, además de pesos de raíz y de parte aérea (tallo y hojas) significativamente menores en comparación con el control no inoculado, lo que sugiere el gran impacto económico que puede tener la marchitez tardía en condiciones naturales. Asimismo este trabajo pone de manifiesto el grado de complejidad de la etiología de la marchitez tardía, que debería ser estudiado mediante la confirmación de la patogenicidad de los hongos de suelo identificados en maíz, con el fin de determinar el papel que puede jugar cada una de estas especies en el desarrollo de la enfermedad y/o severidad de los síntomas.

Palabras claves: Etiología, *Fusarium graminearum* Schwabe, *Fusarium proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg, *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, hongos de suelo.

RESUMO

Ortiz-Bustos, C.M.; García-Carneros, A.B.; Molinero-Ruiz, L. Marchitez tardía do milho (*Zea mays* L.) causada por *Cephalosporium maydis* e outros fungos associados na Península Ibérica. *Summa Phytopathologica*, v.41, n.2, p.107-114, 2015.

As espécies de fungos de solo associadas ao *Cephalosporium maydis* como agente causal da marcha tardia do milho na Península Ibérica, foram identificadas rastreando 19 campos com sintomas de marcha nas principais zonas de cultivo entre 2011 e 2012. Em 47% dos campos não foi identificado *C. maydis*, mas sim *Fusarium graminearum*, *F. verticillioides*, *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Trichoderma harzianum* que infetaram as plantas de milho. Nos restantes campos, além do *C. maydis* foram identificados outros fungos de solo em percentagens apreciáveis: *F. verticillioides* (19%), *F. proliferatum* (19%), *F. equiseti* (9%), *F. oxysporum* (9%) e *Pythium oligandrum* (9%). O crescimento vascular do *C. maydis* e de outras espécies fúngicas em plantas de milho foi confirmado através de análises de plantas com marcha procedente de três campos diferentes. Tanto *C. maydis* como *F. graminearum*, *F. equiseti*, *F. proliferatum* y *T.*

harzianum foram isolados na inserção entre a raiz e o caule e a 10 cm de altura no caule das plantas. O efeito da infecção por *C. maydis* sobre a produção das plantas de milho, quantificou-se em vasos e condições semi-naturais em 2011. Em plantas inoculadas, obteve-se uma redução do peso das mazorcas de 54%, além da redução dos pesos da raiz e parte aérea (folhas e caule) que foram significativamente menores em comparação com o controle não inoculado, o que sugere o grande impacto económico que pode ter o emurchecimento tardio em condições naturais. De igual forma, este trabalho realça o grau de complexidade da etiologia do emurchecimento tardio, que deveria ser estudado mediante a confirmação da patogenicidade dos fungos de solo identificados no milho, com o objetivo de determinar o papel de cada uma destas espécies no desenvolvimento da doença e/ou severidade dos sintomas.

Palavras-chave: Etiologia, *Fusarium graminearum* Schwabe, *Fusarium proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg, *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, fungos de solo.

La marchitez tardía del maíz (*Zea mays* L.) causada por *Cephalosporium maydis* en la Península Ibérica, y otros hongos asociados

Carmen M^a Ortiz-Bustos, Ana B. García-Carneros, Leire Molinero-Ruiz

Departamento de Protección de Cultivos. Instituto de Agricultura Sostenible- CSIC, Apdo. de Correos 4084, C.P.14080 Córdoba, España.

Autor para correspondencia: L. Molinero-Ruiz, E-mail: lmolinero@ias.csic.es

RESUMEN

Las especies de hongos de suelo asociadas a *Cephalosporium maydis* como agente causal de la marchitez tardía del maíz en la Península Ibérica se identificaron muestreando 19 campos con síntomas de marchitez en las principales zonas de cultivo entre 2011 y 2012. En el 47% de los campos no se identificó *C. maydis*, pero sí *Fusarium graminearum*, *F. verticillioides*, *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* y *Trichoderma harzianum* infectando las plantas de maíz. En los campos restantes, junto a *C. maydis* se identificaron otros hongos de suelo en porcentajes apreciables: *F. verticillioides* (19%), *F. proliferatum* (19%), *F. equiseti* (9%), *F. oxysporum* (9%) y *Pythium oligandrum* (9%). El crecimiento vascular de *C. maydis* y de otras especies fúngicas en plantas de maíz se confirmó analizando plantas con marchitez procedentes de tres campos diferentes. Tanto *C. maydis* como *F. graminearum*, *F. equiseti*, *F. proliferatum* y *T. harzianum* se aislaron de la inserción entre la raíz y tallo y a 10 cm de altura en el tallo de las plantas. El efecto de la infección por *C. maydis* sobre la producción de las plantas de maíz se cuantificó en macetas y condiciones seminaturales en el 2011. En plantas inoculadas se obtuvo una reducción del peso de las mazorcas del 54%, además de pesos de raíz y de parte aérea (tallos y hojas) significativamente menores en comparación con el control no inoculado, lo que sugiere el gran impacto económico que puede tener la marchitez tardía en condiciones naturales. Asimismo este trabajo pone de manifiesto el grado de complejidad de la etiología de la marchitez tardía, que debería ser estudiado mediante la confirmación de la patogenicidad de los hongos de suelo identificados en maíz, con el fin de determinar el papel que puede jugar cada una de estas especies en el desarrollo de la enfermedad y/o severidad de los síntomas.

Palabras clave: Etiología, *Fusarium graminearum* Schwabe, *Fusarium proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg, *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, hongos de suelo.

4.1. INTRODUCCIÓN

La Península Ibérica representa el 5.1% de la superficie total de maíz cultivada en la Unión Europea (UE) y concentra el 6.6% de la producción total. Estos porcentajes la sitúan dentro de los ocho primeros países de la UE con mayores cifras de producción y superficie en el año 2011 (FAOSTAT, 2011). Las condiciones climáticas predominantes en la Península Ibérica hacen que más del 90% de la superficie corresponda al cultivo de regadío, concentrándose éste mayoritariamente en los valles de los principales ríos. El maíz se cultiva en secano en Galicia en España (MAGRAMA, 2011) y en el Alentejo en Portugal (MADRP, 2007).

En 2003, se detectaron por primera vez en la Península Ibérica síntomas prematuros de marchitez en algunos campos de maíz. Investigaciones realizadas en los años posteriores permitieron asociar estos síntomas con una enfermedad vascular, la marchitez tardía, causada por *Cephalosporium maydis* Samra, Sabet & Hing. (Molinero-Ruiz et al., 2010). La marchitez tardía sólo había sido detectada con anterioridad en Egipto (Samra et al., 1963), India (Payak et al., 1970) y Hungría (Pecsi y Nemeth, 1998).

Cephalosporium maydis infecta a la planta a través de las raíces y asciende por el xilema colonizándola sistémicamente. El síntoma inicial de la enfermedad es la marchitez en hojas desde el borde hacia la nervadura central, comenzando por las hojas inferiores y ascendiendo hacia las superiores. Los síntomas aparecen en momentos próximos a la floración y van agravándose hasta poco antes de alcanzar la madurez. A medida que la marchitez de las hojas se intensifica, aparecen estrías amarillas o marrón-rojizas en los entrenudos basales del tallo. Al cabo de unos días los tallos se secan y se quiebran (Molinero-Ruiz et al., 2010). Existen otros hongos habitantes del suelo que pueden penetrar a través de las raíces de la planta e instalarse en ella causando síntomas que suelen confundirse con los causados por *C. maydis*. Entre ellos cabe mencionar *Fusarium moniliforme* J. Sheld. (sin. *F. verticillioides*) y *F. graminearum*, causantes de pudriciones del tallo en maíz (Christensen y Wilcoxson, 1966 ; Kucharek y Kommedalh, 1966). Trabajos previos han puesto de manifiesto la interacción patogénica entre *C. maydis* y otras especies fúngicas como *Fusarium oxysporum* Schltdl. Se ha comprobado que *C. maydis*

Marchitez tardía del maíz: *C. maydis* y otros hongos asociados

aumenta la tolerancia a la marchitez en algodón causada por *F. oxysporum* cuando ambos hongos actúan de forma conjunta (Sabet et al., 1966).

En el presente estudio se identifican las especies de hongos de suelo asociadas a *C. maydis* como agente causal de la marchitez tardía del maíz en la Península Ibérica, en algunos casos co-infectando las plantas. También es cuantificada la pérdida de producción debido a la infección por *C. maydis* en condiciones seminaturales.

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1. Identificación de especies de hongos de suelo asociadas a *C. maydis* como agente causal de la marchitez tardía

Se realizaron prospecciones en los años 2011 y 2012 en un total de 19 campos de maíz de la Península Ibérica donde se observaron plantas que presentaban síntomas de marchitez. Los campos se localizaban en las cuencas de los ríos Guadalquivir, Guadiana, Tajo y Ebro, concretamente en las provincias de Sevilla, Badajoz, Toledo, Zaragoza, Huesca y Madrid, y en el distrito portugués de Santarem. (Tabla 4.1)

Tabla 4.1. Localización geográfica (valle, localidad y finca) de campos de maíz afectados por marchitez tardía prospectados en 2011 y 2012, y nº de plantas (muestras) analizadas en cada campo

Muestra	Valle	Localidad ^a	Finca	Año	Nº plantas procesadas
1	Tajo	Santarem, Santarem, PO	-	2011	2
2	Guadalquivir	Las Cabezas de San Juan, Sevilla, ES	Don Bartolomé	2012	5
3	Tajo	Talavera de la Reina, Toledo, ES	-	2012	3
4	Guadiana	Guareña, Badajoz, ES	-	2012	4
5	Tajo	Añover del Tajo, Toledo, ES	Los Huertos	2012	6
6	Tajo	Mocejón, Toledo, ES	-	2012	4
7	Tajo	Mocejón, Toledo, ES	-	2012	4
8	Tajo	Coruche, Santarem, PO	Corte Loulé	2012	3
9	Tajo	Salvaterra de Magos, Santarem, PO	Lecas Raposo	2012	2
10	Ebro	Torres de Alcanadre, Huesca, ES	-	2012	6
11	Tajo	Golega, Santarem, PO	Labruja	2012	3
12	Tajo	Almeirim, Santarem, PO		2012	3
13	Tajo	Alpiarca, Santarem, PO	Alameda	2012	3
14	Guadalquivir	Sevilla, Sevilla, ES	-	2012	3
15	Ebro	Alagon, Zaragoza, ES	-	2012	4
16	Tajo	Villamejor, Madrid, ES	-	2012	4
17	Tajo	San Martin de la Vega, Madrid, ES	-	2012	2
18	Tajo	Salvaterra de Magos, Santarem, PO	Hnos Raposo	2012	3
19	Tajo	Tomar, Santarem, PO	Agroramilo	2012	5

^a Se indican localidad, provincia/distrito y país (ES: España y PO: Portugal) de las muestras analizadas.

^b = nombre de la finca desconocido.

Marchitez tardía del maíz: *C. maydis* y otros hongos asociados

Las prospecciones se realizaron entre los meses de julio y octubre y las muestras consistieron en 2-6 plantas por parcela. Se tomaron muestras de la parte basal de cada planta, incluyendo 10-20 cm de tallo, cuello y raíces. Se desinfectaron secciones transversales de la inserción entre el tallo y la raíz con hipoclorito sódico al 20% durante 3-4 minutos y se lavaron durante 3-4 minutos en agua destilada. Después de secarlas al aire, se sembraron en placas Petri con medio CMA_s (Corn-Meal-Agar, 17g de harina de maíz-agar y 0,3g de sulfato de estreptomicina por litro de agua destilada). Una vez sembradas, las placas se incubaron en oscuridad a 28°C. Transcurridas 72 h, de las colonias fúngicas observadas en la superficie del medio de cultivo se tomaron extremos hifales que se sembraron de nuevo en CMA_s para ser identificados morfológicamente. La identificación de los aislados de *C. maydis* se llevó a cabo a partir de las características descritas por Samra et al. (1963) en medio PDA, que coinciden con las que se observan en medio CMA (Molinero-Ruiz et al., 2010). Al procesar las muestras de plantas sintomáticas se recuperaron consistentemente otras colonias fúngicas diferentes a *C. maydis*. Extremos hifales de estas colonias se transfirieron a placas con PDA_s (39g de patata dextrosa-agar, 0,3g de sulfato de estreptomicina por litro de agua destilada) y se incubaron en oscuridad a 25°C durante 72h. La identificación se realizó mediante observaciones de hifas, conidias y conidióforos en el microscopio y según Ainsworth et al. (1973), Barnett y Hunter (1998), Leslie y Summerell (2006) y Nelson et al. (1983), y se confirmó molecularmente mediante la amplificación de la región ITS del ADN ribosómico con los primers ITS-4 e ITS-5. La región amplificada se secuenció y comparó con la base de datos del NCBI utilizando la aplicación BLAST.

La co-infección vascular de *C. maydis* y otras especies fúngicas en plantas de maíz se estudió seleccionando tres parcelas de distinto ámbito geográfico (dos en España y una en Portugal) y tomando muestras de 2-5 plantas en cada una de ellas. (Tabla 4.2). En cada planta se tomaron secciones transversales de la inserción entre la raíz y el tallo, y del tallo, a una distancia de 10 cm de la inserción de éste con la raíz, las cuales se procesaron siguiendo el procedimiento anteriormente descrito. Las colonias de *C. maydis* se identificaron morfológicamente y las restantes especies fúngicas se identificaron tanto morfológicamente como molecularmente según las metodologías descritas previamente.

Tabla 4.2. Procedencia de plantas de maíz con síntomas de marchitez tardía seleccionadas para la identificación de la co-infección de *Cephalosporium maydis* y otras especies fúngicas en ellas

Origen geográfico			Nº plantas sintomáticas muestreadas
Valle	Localidad ^a	Finca	
Tajo	Tomar, Santarem, PO	Agroramilo	5
Guadalquivir	Posadas, Córdoba, ES	Mingahover	3
Guadalquivir	Posadas, Córdoba, ES	La Estrella	2

^a Se indican localidad, provincia/distrito y país (ES: España y PO: Portugal) de las muestras analizadas.

Una vez identificadas, todas las colonias fúngicas, incluidas las de *C. maydis*, se conservaron en la colección mantenida en el Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Córdoba (España).

4.2.2. Efecto de la infección de *C. maydis* sobre la producción de maíz en condiciones seminaturales

Para determinar el efecto de la enfermedad en la producción de maíz se realizó un experimento en condiciones seminaturales (umbráculo) entre los meses de marzo y julio del año 2011 en Córdoba. Se eligió un aislado de *C. maydis* seleccionado en prospecciones anteriores realizadas en el año 2009. Se inocularon 6 plantas (repeticiones) de la variedad susceptible de maíz V1 (Monsanto Agricultura España, S.L.). Como control se utilizaron 6 plantas no inoculadas de la misma variedad.

La inoculación de las plantas se realizó mediante la adición de 200 gramos de granos de trigo colonizados por *C. maydis* a un sustrato estéril (1 arena: 1 limo, v/v) en macetas de 5 litros, donde se sembraban las semillas de maíz previamente germinadas y con una longitud de raíz de 5-10 mm. En el caso de las plantas control, se emplearon granos de trigo sin el hongo.

Marchitez tardía del maíz: *C. maydis* y otros hongos asociados

El trigo se esterilizó en autoclave, se infestó con discos (9 mm de diámetro) de 10 días de edad de *C. maydis* en PDA (8 discos por cada 250 g de trigo). Los frascos se incubaron a temperatura ambiente durante 4 semanas.

Las plantas se regaron a demanda durante el experimento, se abonaron con 2.3g de urea por maceta tres veces durante el primer mes tras la siembra y con una solución nutritiva completa (Hoogland y Arnon, 1950) dos veces por semana desde la siembra hasta el levantamiento del experimento.

Transcurridas 15 semanas de la inoculación, se evaluaron los síntomas aéreos de las plantas siguiendo una escala del 1 al 9 siendo 1 el valor correspondiente a una planta sana y 9 a una planta con toda la parte aérea marchita. También se observaron los síntomas en las raíces asignando a cada planta un valor de 0 a 4 donde el valor 0 representa a raíces con aspecto normal y el valor 4 a raíces completamente necrosadas. Además se pesaron la raíz y la parte aérea (tallos, hojas y mazorcas) de cada planta.

El diseño experimental usado fue completamente aleatorizado. Los datos de los síntomas finales en la raíz (previa transformación $\sqrt{[(\text{valor escala} + 0.5)]}$) y en la parte aérea, y los pesos finales de ambas partes de la planta se procesaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA). Cuando existían diferencias significativas se aplicó el test de mínima diferencia significativa protegida de Fisher al nivel de probabilidad de 5%.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Identificación de especies de hongos de suelo asociadas a *C. maydis* como agente causal de la marchitez tardía

Se aisló *C. maydis* en el 53% de los campos prospectados (Tabla 4.3), encontrándose éstos localizados en los valles de los ríos Guadalquivir, Guadiana y Tajo. Por otro lado, *C. maydis* se identificó en los dos años de muestreo y tanto en España como en Portugal. Todos los aislados mostraron la morfología descrita por

Samra et al. (1963) y su patogenicidad se ha confirmado en trabajos previos (García-Carneros et al., 2012; Ortiz-Bustos et al., 2016).

Tabla 4.3. Frecuencia (%) de identificación de *C. maydis* y otras especies fúngicas en los 19 campos de maíz prospectados en la Península Ibérica en los años 2011 y 2012

Hongos identificados	Total de campos	%
Sólo otras especies fúngicas	9	47
<i>C. maydis</i> y otras especies fúngicas	10	53

La frecuencia con que se identificaron otras especies fúngicas en los mismos o en diferentes campos de maíz en los que se identificó *C. maydis* se muestra en la Tabla 4.3.

Todos los análisis moleculares dieron valores de similitud del 92-100% entre la secuencia de ADN y las secuencias depositadas en la base de datos de GenBank. (Tabla 4.4)

Marchitez tardía del maíz: *C. maydis* y otros hongos asociados

Tabla 4.4. Especies fúngicas identificadas y porcentaje (%) de similitud entre la secuencia analizada y las secuencias almacenadas en la base de datos de GenBank

Muestra	Especies fúngicas identificada ^a	Referencia GenBank (% Similitud)
1	<i>Cephalosporium maydis</i>	--- ^b
	<i>Fusarium proliferatum</i>	EU821492.1 (100)
2	<i>Rhizoctonia solani</i>	---
3	<i>Fusarium</i> sp.	---
	<i>F. proliferatum</i>	EU821492.1 (100)
4	<i>Gibberella moniliformis</i>	HQ176445.1 (100)
	<i>Pythium acanthophoron</i>	AB355644.1 (99)
	<i>C. maydis</i>	---
	<i>Fusarium equiseti</i>	GQ505694.1 (100)
5	<i>G. moniliformis</i>	HQ176445.1 (100)
	<i>Gibberella sacchari</i>	AF455450.1 (100)
	<i>Phaeocystroma ambiguum</i>	FR748043.1 (100)
	<i>C. maydis</i>	---
6	<i>G. moniliformis</i>	EU364864.1(100)
	<i>Pythium oligandrum</i>	HQ832778.1 (100)
7	<i>C. maydis</i>	---
	<i>G. moniliformis</i>	HQ176445.1 (100)
8	<i>Coprinopsis urticicola</i>	HQ847015.1 (92)
	<i>Hypocrea lixii</i>	JQ040357 (100)
	<i>C. maydis</i>	---
9	<i>F. equiseti</i>	EU326202.1 (100)
	<i>P. oligandrum</i>	HQ832778.1 (99)
10	<i>Gibberella zeae</i>	HQ832817.1 (100)
	<i>Stenocarpella maydis</i>	FR748057.1 (99)
11	<i>C. maydis</i>	---
	<i>F. proliferatum</i>	EU821492.1 (100)
12	<i>F. equiseti</i>	JQ936260.1 (99)
	<i>G. moniliformis</i>	HQ176445.1 (100)
	<i>C. maydis</i>	---
13	<i>Ceratobasidium</i> sp.	HM623632.1 (92)
	<i>Fusarium oxysporum</i>	JF731234.1 (100)
	<i>R. solani</i>	JQ946295.1 (100)
14	<i>Macrophomina phaseolina</i>	GU046905.1 (99)
	<i>F. equiseti</i>	AY147362.1 (100)
15	<i>G. zeae</i>	---
	<i>M. phaseolina</i>	GU046905.1 (99)
	<i>C. maydis</i>	---
16	<i>Gibberella intermedia</i>	JX241655.1 (99)
	<i>H. lixii</i>	---
	<i>G. moniliformis</i>	---
17	<i>G. zeae</i>	---
	<i>H. lixii</i>	---
	<i>Pythium periplocum</i>	GU811234.1 (99)
18	<i>C. maydis</i>	---
	<i>F. oxysporum</i>	KC254035.1 (99)
	<i>Gibberella fujikuroi</i>	HM776427.1 (100)
	<i>G. zeae</i>	---
19	<i>C. maydis</i>	---
	<i>F. proliferatum</i>	---
	<i>G. moniliformis</i>	JF499676.1 (99)

^a Se presenta anamorfo/ teleomorfo de cada especie según la referencia de GenBank.

^b --- = la especie fúngica se identificó morfológicamente.

En 9 de las 19 prospecciones efectuadas no se consiguió aislar *C. maydis* en plantas con síntomas de marchitez tardía, sin embargo fue posible recuperar otros hongos. En la Figura 4.1 se muestran las especies fúngicas halladas y el porcentaje de aparición de las mismas. Como se muestra en la Figura 4.1A, el género que se aisló con mayor frecuencia en las plantas de estas parcelas (53%) fue *Fusarium* Link. si bien el 5% de los aislados de este género no se pudieron identificar a nivel de especie. Las especies infectivas de maíz más representativas en estos campos fueron *F. graminearum* y *F. verticillioides* que aparecieron, en ambos casos, en un 16% de los aislamientos, seguidas por *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc., *Trichoderma harzianum* Rifai y *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., ambas en un 11%. Otros hongos de suelo importantes que se identificaron infectando maíz en estos campos fueron *F. proliferatum* y *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn.

Paralelamente, en los campos prospectados donde se identificó *C. maydis*, se aislaron otras especies fúngicas que infectaban las plantas de maíz (Tabla 4.3). La frecuencia de aparición de estos hongos en los aislamientos se muestra en la Figura 4.1B. Además del género *Ceratobasidium* D.P. Rogers se aislaron 11 especies diferentes, perteneciendo 7 de ellas al género *Fusarium*, que representó el 71 % del total de especies fúngicas aisladas. Las especies fúngicas más frecuentemente aisladas de las plantas junto con *C. maydis* fueron *F. proliferatum* y *F. verticillioides*, constituyendo un 19% en ambos casos. El resto de hongos recuperados correspondieron a las especies *Pythium oligandrum* Drechsler, *R. solani*, *T. harzianum* y *Phaeocytostroma ambiguum* (Mont.) Petr.

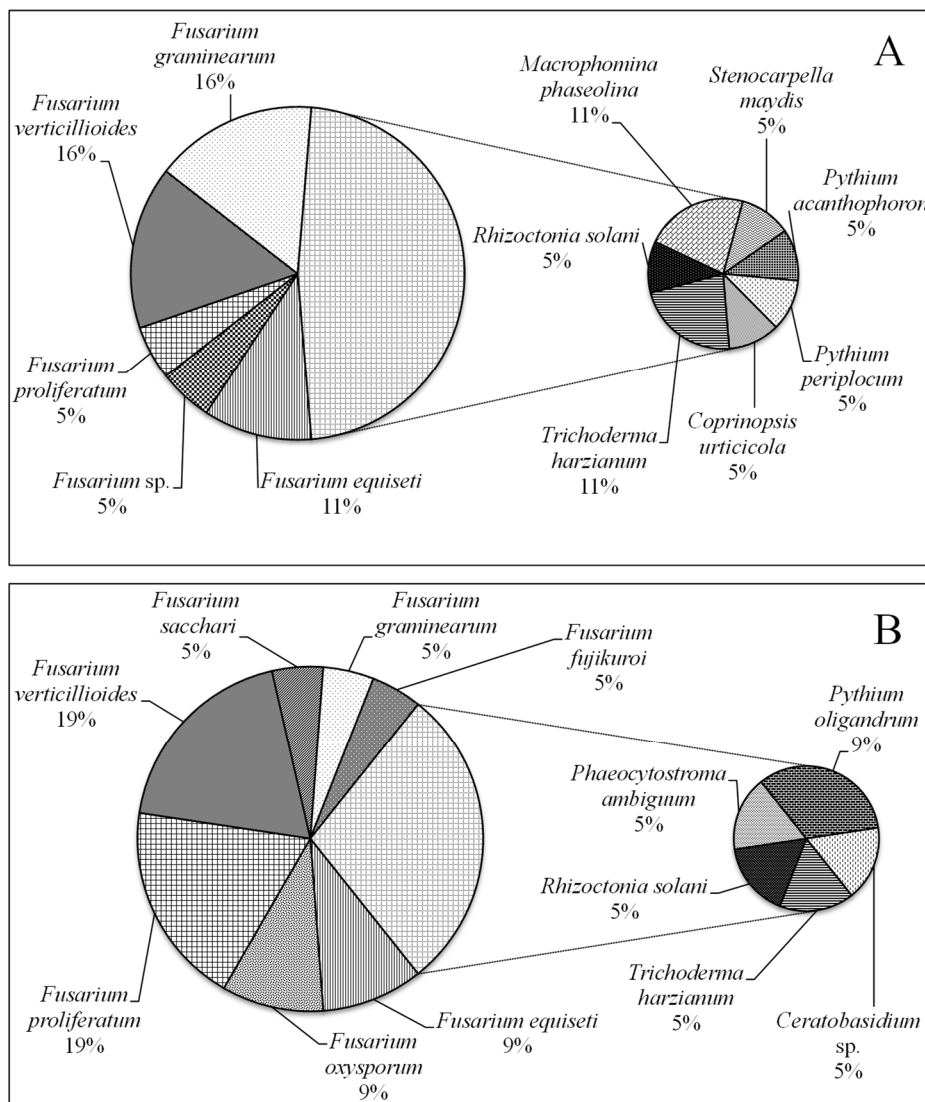


Figura 4.1. Frecuencia (%) de identificación de distintas especies fúngicas en los aislamientos realizados a partir de plantas de maíz con síntomas de marchitez tardía en las que no se detectó a *Cephalosporium maydis* (A) y en las que si se recuperó *C. maydis* (B).

En la Figura 4.2 se muestran de forma esquemática las especies fúngicas aisladas en el tallo y en la inserción raíz-tallo en plantas enfermas procedentes de las tres fincas evaluadas. La frecuencia de aislamiento de cada una de las especies

se expresa, en cada finca, como número de plantas donde se ha aislado la especie respecto al total de plantas analizadas.

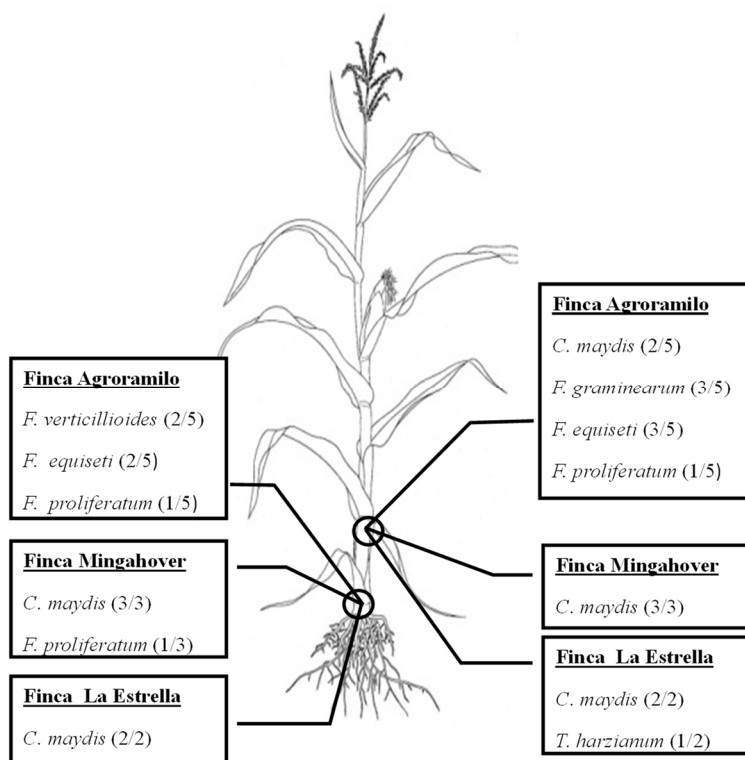


Figura 4.2. Esquema de una planta de maíz con la distribución de especies fúngicas aisladas en el tallo y en la inserción raíz-tallo; y frecuencia de aislamiento de cada una de las especies expresada como número de plantas donde se ha aislado la especie respecto al total de plantas analizadas en cada finca.

Cephalosporium maydis fue recuperado en todas las plantas analizadas en las fincas cordobesas y en 2 de las 5 plantas procedentes de la finca de origen portugués. En plantas de las tres fincas fue posible aislar *C. maydis* en el tallo. Sin embargo, del material vegetal seccionado de la inserción raíz-tallo, sólo se recuperó *C. maydis* en las plantas procedentes de las fincas de Córdoba.

Junto con *C. maydis*, en las plantas sintomáticas se hallaron otras 5 especies fúngicas distintas pertenecientes a los géneros *Fusarium* y *Trichoderma* Pers. De ellas, sólo *F. proliferatum* fue aislada en plantas de fincas distintas.

Marchitez tardía del maíz: *C. maydis* y otros hongos asociados

En la finca Agroramilo únicamente se identificaron especies de *Fusarium* en co-infección con *C. maydis*. Sólo *F. equiseti* y *F. proliferatum* se recuperaron de las dos zonas analizadas de las plantas sintomáticas. Las otras especies infectivas de maíz halladas en esta finca, *F. graminearum* y *F. verticillioides*, aparecieron exclusivamente en el tallo y en la inserción de éste con la raíz respectivamente.

En cada una de las dos fincas cordobesas (Mingahover y La Estrella), se detectó sólo un hongo distinto a *C. maydis* y en una sola planta del total de plantas analizadas en cada una. De este modo, se aisló *F. proliferatum* en la finca Mingahover y *T. harzianum* en La Estrella.

Por último, y respecto a la distribución de especies en las plantas, tanto *F. equiseti* como *F. proliferatum* se aislaron en las dos partes analizadas (finca Agroramilo). En la inserción de la raíz con el tallo pero no más arriba en la planta se recuperaron *F. verticillioides* (finca Agroramilo) y *F. proliferatum* (finca Mingahover). Por el contrario, los hongos *F. graminearum* (finca Agroramilo) y *T. harzianum* (finca La Estrella) se aislaron del tallo pero no de su inserción con la raíz.

4.3.2. Efecto de la infección de *C. maydis* sobre la producción de maíz en condiciones seminaturales

El análisis estadístico ANOVA estableció diferencias significativas entre las plantas inoculadas y las plantas control tanto de los síntomas aéreos como de los de raíz ($p < 0.0001$ en ambos casos). Al comparar los valores medios de ambas variables de la enfermedad se observó que, mientras las plantas inoculadas alcanzaron valores de 8.5 y 3.5 en la escala de síntomas aéreos y de raíz respectivamente, las no inoculadas tuvieron los valores mínimos de ambas escalas, es decir, 1 en la escala de síntomas aéreos y 0 en la de raíz (Figura 4.3A).

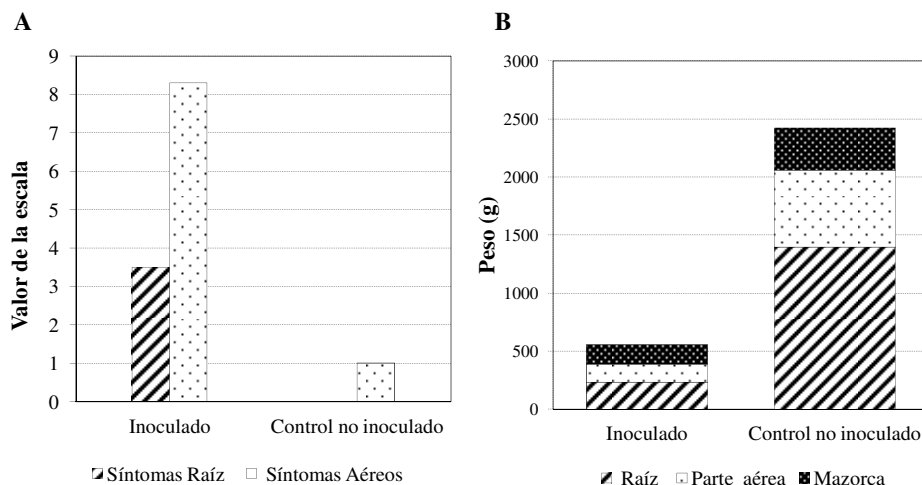


Figura 4.3. Valores medios de síntomas aéreos y en raíces (A) y de los pesos de raíces, parte aérea (hojas y tallos) y mazorcas (B) de plantas de maíz inoculadas con *C. maydis* en comparación con plantas control no inoculadas.

Respecto al análisis entre los pesos de las plantas inoculadas y no inoculadas, el ANOVA arrojó diferencias significativas en peso de parte aérea (tallo más hojas) ($p < 0.0001$), peso de raíz ($p = 0.0002$) y peso de mazorca ($p = 0.0001$). Las plantas inoculadas redujeron el peso de su parte aérea en un 77% respecto a las plantas control y el peso de la raíz de las plantas inoculadas disminuyó en un 83% respecto al de las plantas sin inocular. En cuanto a la producción, se detectó un efecto similar al descrito anteriormente. Las plantas inoculadas experimentaron una reducción del peso de mazorca del 54% respecto a las plantas control (Figura 4.3B).

4.4. DISCUSION

La presencia de *C. maydis* en los valles de los ríos Tajo, Guadiana y Guadalquivir ha sido referida recientemente (Ortiz-Bustos et al., 2016), pero por el momento los síntomas de marchitez observados en las muestras procedentes del valle del río Ebro no han podido asociarse a infecciones por el mismo hongo. Este hecho podría estar relacionado con las diferentes condiciones medioambientales de la zona en comparación con las del centro-sur de la Península. De hecho, la

Marchitez tardía del maíz: *C. maydis* y otros hongos asociados

climatología del centro-sur, con menor disponibilidad de agua y elevada temperatura, es más parecida a la referida por otros autores como favorable para la infección del maíz en Egipto e India (Singh y Siradhana, 1987). No obstante, la ausencia de infecciones por *C. maydis* en el valle del Ebro debería ser investigada en futuros trabajos.

Respecto a la identificación en algunas plantas con síntomas de *F. graminearum* y *F. verticillioides* pero no de *C. maydis*, no resulta inesperado, ya que estos hongos de suelo también son patógenos de maíz y los síntomas que originan en las plantas son similares (Leslie et al., 1990; White, 1999). Otras especies identificadas en las muestras, en ausencia de *C. maydis*, fueron *F. proliferatum*, *M. phaseolina* y *Stenocarpella maydis* (Berk.) B. Sutton, hongos de suelo que también son patógenos de maíz y cuya presencia en las plantas está asociada a pudriciones de tallo (White, 1999; Programa del Maíz de CIMMYT, 2004; Molinero-Ruiz et al. 2011). No obstante, la patogenicidad de los aislados de *M. phaseolina* y *S. maydis*, pero, sobre todo, de los de las diferentes especies de *Fusarium* identificadas en este trabajo, debería confirmarse en futuros experimentos *ad hoc*. Por último, otros hongos de suelo más frecuentemente identificados junto con *C. maydis* fueron *F. verticillioides* y *F. proliferatum*. También se identificaron *F. graminearum*, *R. solani*, *F. equiseti* y *T. harzianum*. Excepto *T. harzianum*, que por otro lado tiene una amplia capacidad colonizadora (Mukherjee et al., 2013) todas las demás especies pueden infectar maíz y en algunos casos se han observado junto con *C. maydis* al realizar aislamientos de tejidos (Saleh et al., 2003; Programa del Maíz de CIMMYT, 2004). Los resultados del análisis en distintas partes de plantas de maíz enfermas confirmaron el comportamiento vascular de *C. maydis*, pero también permitieron identificar otros hongos tanto en la raíz como en el tallo de las plantas. Estos resultados sugieren que la marchitez tardía puede estar asociada a la presencia de más de un agente fúngico infectivo. Así, la enfermedad podría tener una etiología compleja, pues la infección y el establecimiento de *C. maydis* en las plantas pueden estar acompañados de la penetración de especies como *F. proliferatum* o *F. graminearum*. Estos hongos podrían actuar como patógenos *per se*, o ser meros oportunistas que se instalan en la planta tras la penetración previa por *C. maydis*. En cualquier caso, resulta de interés la investigación de la patogenicidad de las especies identificadas en este trabajo, especialmente *F. proliferatum* o *F.*

graminearum, en combinación con *C. maydis*, con el fin de determinar qué papel puede jugar cada una de ellas en el desarrollo de la enfermedad en las plantas de maíz.

En cuanto al efecto de *C. maydis* sobre la producción de maíz, nuestros resultados, obtenidos en condiciones seminaturales de umbráculo y crecimiento de las plantas en maceta, mostraron que las plantas inoculadas tuvieron una reducción del peso de las mazorcas del 54%, además de pesos de raíz y de parte aérea (tallo y hojas) significativamente menores. Estos resultados guardan similitud con los obtenidos en trabajos previos (Ortiz-Bustos et al., 2016) y muestran el elevado impacto económico que puede tener la marchitez tardía del maíz en el campo.

4.5. AGRADECIMIENTOS

Trabajo parcialmente financiado por el proyecto PIE2009401120 (CSIC, MICINN). Los autores agradecen a las empresas Pioneer Hi-Bred Agro Servicios España, S.L. y Monsanto Agricultura España, S.L. la cesión de semillas de maíz así como la colaboración en la obtención de algunas de las muestras analizadas. Los autores también expresan su agradecimiento a S. Benquerena por la traducción del resumen al portugués.

4.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ainsworth, G.C. (1973). "Introduction and keys to higher taxa", in: *The Fungi: an advanced treatise v. IVA*, eds. G.C. Ainsworth, F.K. Sparrow, A.S. Sussman (Nueva York: Academic Press), 1-7.

Barnett, H.L., and Hunter, B.B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. Saint Paul: American Phytopathological Society Press.

Christensen, J.J., and Wilcoxson, R.D. (1966). *Stalk rot of corn*. Saint Paul: American Phytopathological Society Press.

FAOSTAT. (2011). Maize harvested areas and production quantity in 2011. Available at: <<http://faostat.fao.org/>>, accessed March 11, 2013.

Marchitez tardía del maíz: *C. maydis* y otros hongos asociados

García-Carneros, A. B., Girón, I., and Molinero-Ruiz, L. (2012). Aggressiveness of *Cephalosporium maydis* causing late wilt of maize in Spain. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences Commun Agric Appl Biol Sci* 77, 173-179.

Hoagland, D.R., and Arnon, D.I. (1950). *The water culture method for growing plants without soil. Circular 347*. Berkeley: California Agricultural Experiment Station.

Kucharek, T.A., and Kommedalh, T. (1966). Kernel infection and corn stalk rot caused by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 56, 983-984.

Leslie, J.F., Pearson, C.A.S., Nelson, P.E., and Toussoun, T.A. (1990). *Fusarium* species from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology* 80, 343-350. doi:10.1094/Phyto-80-343

Leslie, J. F., and Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Ames: Blackwell Publishing Professional.

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente MAGRAMA. (2011). Anuario de Estadística 2011. Available at: < <http://www.magrama.gob.es/es/> > , accessed March 10, 2013.

Ministerio da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e Das Pescas MADRP.Cultura Arvenses. (2007). Diagnóstico Sectorial. Gabinete de Planeamento e Políticas. Lisboa. 2007. Available at: < <http://www.gpp.pt/> > , accessed March 3, 2013.

Molinero-Ruiz, M. L., Melero-Vara, J. M., and Mateos, A. (2010). *Cephalosporium maydis*, the cause of late wilt in maize, a pathogen new to Portugal and Spain. *Plant Dis.* 94, 379. doi: 10.1094/PDIS-94-3-0379A

Molinero-Ruiz, L., Rubio-Pérez, E., González-Domínguez, E., and Basallote-Ureba, M.J. (2011). Alternative hosts for *Fusarium* spp. causing crown and root rot of asparagus in Spain. *J. Phytopathol.* 159, 114-116. doi: 10.1111/j.1439-0434.2010.01723.x

Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., and Kenerley, C.M. (2013). *Trichoderma* Research in the Genome Era. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51, 105-129. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102353

Nelson, P.E., Toussoun, T., and Marasas, W. (1983). *Fusarium species: an illustrated manual for identification*. Stage College: Pennsylvania State University Press.

Ortiz-Bustos, C.M., Testi, L., García-Carneros, A.B., and Molinero-Ruiz, L. (2016). Geographic distribution and aggressiveness of *Harpophora maydis* in the Iberian Peninsula, and thermal detection of maize late wilt. *Eur J Plant Pathol.* 144, 383-397. doi: 10.1007/s10658-015-0775-8

Payak, M.M., Lal, S., Lilaramani, J., and Renfro, B.L. (1970). *Cephalosporium maydis* a new threat to maize in India. *Indian Phytopathol.* 23, 562-569.

Pecsi, S., and Nemeth, L. (1998). Appearance of *Cephalosporium maydis* Samra, Sabet and Hingorani in Hungary. Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent 63, 873-877.

Programa de Maíz del CIMMYT. (2004). *Enfermedades del Maíz: una guía para su identificación en el campo. Cuarta edición.* México, D.F.: CIMMYT.

Sabet, K.A., Samra, A.S., and Mansour, I.S. (1966). Interaction between *Fusarium oxysporum*, *F. vasinfectum*, and *Cephalosporium maydis* on cotton and maize. *Ann. Appl. Biol.* 58, 93-101. doi: 10.1111/j.1744-7348.1966.tb05074.x

Saleh, A. A., Zeller, K. A., Ismael, A. M., Fahmy, Z. M., El-Assiuty, E. M., and Leslie, J. F. (2003). Amplified fragment length polymorphism diversity in *Cephalosporium maydis* from Egypt. *Phytopathology* 93, 853-859. doi: 10.1094/PHYTO.2003.93.7.853.

Samra, A. S., Sabet, K. A., and Hingorani, M. K. (1963). Late wilt disease of maize caused by *Cephalosporium maydis*. *Phytopathology* 53, 402-406.

Singh, S. D., and Siradhana, B. S. (1987). Influence of some environmental conditions on the development of late wilt of maize induced by *Cephalosporium maydis*. *Indian J. Mycol. Pl. Path.* 17, 1-5.

White, D.G. (1999). *Compendium of corn diseases 3rd ed.* Saint Paul: American Phytopathological Society Press

CAPÍTULO 5

**FLUORESCENCE IMAGING IN THE RED AND FAR-RED
REGION DURING GROWTH OF SUNFLOWER PLANTLETS.
DIAGNOSIS OF THE EARLY INFECTION BY THE PARASITE
*OROBANCHE CUMANA.***



Fluorescence Imaging in the Red and Far-Red Region during Growth of Sunflower Plantlets. Diagnosis of the Early Infection by the Parasite *Orobanche cumana*

Carmen M. Ortiz-Bustos¹, María L. Pérez-Bueno², Matilde Barón² and Leire Molinero-Ruiz^{1*}

¹ Department of Crop Protection, Institute for Sustainable Agriculture – Spanish National Research Council, Cordoba, Spain, ² Estación Experimental del Zaidín, Spanish National Research Council, Granada, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Maurizio Vurro,
National Research Council – Institute
of Sciences of Food Production, Italy

Reviewed by:

Grama Nanjappa Dhanapal,
University of Agricultural Sciences
Bangalore, India
Dragana Miladinović,
Institute of Field and Vegetable Crops,
Serbia

*Correspondence:

Leire Molinero-Ruiz
leire.molinero@cscic.es

Specialty section:

This article was submitted to
Crop Science and Horticulture,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 28 December 2015

Accepted: 06 June 2016

Published: 22 June 2016

Citation:

Ortiz-Bustos CM, Pérez-Bueno ML,
Barón M and Molinero-Ruiz L (2016)
Fluorescence Imaging in the Red
and Far-Red Region during Growth
of Sunflower Plantlets. Diagnosis
of the Early Infection by the Parasite
Orobanche cumana.
Front. Plant Sci. 7:884.
doi: 10.3389/fpls.2016.00884

Broomrape, caused by the root holoparasite *Orobanche cumana*, is the main biotic constraint to sunflower oil production worldwide. By the time broomrape emerges, most of the metabolic imbalance has been produced by *O. cumana* to sunflower plants. UV-induced multicolor fluorescence imaging (MCFI) provides information on the fluorescence emitted by chlorophyll (Chl) a of plants in the spectral bands with peaks near 680 nm (red, F680) and 740 nm (far-red, F740). In this work MCFI was extensively applied to sunflowers, either healthy or parasitized plants, for the first time. The distribution of red and far-red fluorescence was analyzed in healthy sunflower grown in pots under greenhouse conditions. Fluorescence patterns were analyzed across the leaf surface and throughout the plant by comparing the first four leaf pairs (LPs) between the second and fifth week of growth. Similar fluorescence patterns, with a delay of 3 or 4 days between them, were obtained for LPs of healthy sunflower, showing that red and far-red fluorescence varied with the developmental stage of the leaf. The use of F680 and F740 as indicators of sunflower infection by *O. cumana* during underground development stages of the parasite was also evaluated under similar experimental conditions. Early increases in F680 and F740 as well as decreases in F680/F740 were detected upon infection by *O. cumana*. Significant differences between inoculated and control plants depended on the LP that was considered at any time. Measurements of Chl contents and final total Chl content supported the results of MCFI, but they were less sensitive in differentiating healthy from inoculated plants. Sunflower infection was confirmed by the presence of broomrape nodules in the roots at the end of the experiment. The potential of MCFI in the red and far-red region for an early detection of *O. cumana* infection in sunflower was revealed. This technique might have a particular interest for early phenotyping in sunflower breeding programs. To our knowledge, this is the first work where the effect of a parasitic plant in its host is analyzed by means of fluorescence imaging in the red and far-red spectral regions.

Keywords: broomrape, chlorophyll content, *Helianthus annuus* L., leaf pair, pre-symptomatic detection

Fluorescence imaging in the red and far-red region during growth of sunflower plantlets. Diagnosis of the early infection by the parasite *Orobanche cumana*.

Ortiz-Bustos, C.M.¹, Pérez-Bueno, M.L.², Barón, M.² and L. Molinero-Ruiz¹.

¹ Department of Crop Protection, Institute for Sustainable Agriculture, CSIC, Alameda del Obispo s/n, 14004 Cordoba, Spain.

² Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain.

ABSTRACT

Broomrape, caused by the root holoparasite *Orobanche cumana*, is the main biotic constraint to sunflower oil production worldwide. By the time broomrape emerges, most of the metabolic imbalance has been produced by *O. cumana* to sunflower plants. UV-induced multicolor fluorescence imaging (MCFI) provides information on the fluorescence emitted by chlorophyll (Chl) *a* of plants in the spectral bands with peaks near 680 nm (red, F680) and 740 nm (far-red, F740). In this work MCFI was extensively applied to sunflowers, either healthy or parasitized plants, for the first time. The distribution of red and far-red fluorescence was analysed in healthy sunflower grown in pots under greenhouse conditions. Fluorescence patterns were analysed across the leaf surface and throughout the plant by comparing the first four leaf pairs (LPs) between the second and fifth week of growth. Similar fluorescence patterns, with a delay of three or four days between them, were obtained for LPs of healthy sunflower, showing that red and far-red fluorescence varied with the developmental stage of the leaf. The use of F680 and F740 as indicators of sunflower infection by *O. cumana* during underground development stages of the parasite was also evaluated under similar experimental conditions. Early increases in F680 and F740 as well as increases in F680/F740 were detected upon infection by *O. cumana*. Significant differences between inoculated and control plants depended on the LP that was considered at any time. Measurements of Chl contents and final total Chl content supported the results of MCFI, but they were less sensitive in differentiating healthy from inoculated plants. Sunflower infection was confirmed by the presence of broomrape nodules in the roots at the end of the experiment. The potential of MCFI in the red and far-red region for an early detection of *O. cumana* infection in sunflower was revealed. This technique might have a particular interest for early phenotyping in sunflower breeding programmes. To our knowledge, this is the first work where the effect of a parasitic plant in its host is analysed by means of fluorescence imaging in the red and far-red spectral regions.

Keywords: broomrape, chlorophyll content, *Helianthus annuus* L., leaf pair, pre-symptomatic detection

5.1. INTRODUCTION

Orobancha cumana Wallr. is a holoparasitic plant that parasitizes sunflower (*Helianthus annuus* L.) and limits crop yield in all the countries of Southern Europe and areas around the Black Sea where sunflowers are grown, as well as in North Africa, Israel and China (Molinero-Ruiz et al., 2015). On average, sunflower seed losses caused by *O. cumana* (broomrape) can be quantified as being above 50% when susceptible hybrids are grown, and they frequently reach 100% in heavily infested fields (Domínguez, 1996; Jestin et al., 2014). Crop yield reductions due to infection by *O. cumana* depend on several factors, such as aggressiveness of the parasite, sunflower genotype, earliness of broomrape emergence, soil depth and, particularly, the soil infestation level or seed-bank in the soil (Molinero-Ruiz et al., 2009; Jestin et al., 2014). Germination of *O. cumana* seeds in the soil is stimulated by chemical compounds exuded in the rhizosphere by surrounding sunflower roots (Joel et al., 2011; Yoneyama et al., 2011; Raupp and Spring, 2013; Ueno et al., 2014). The seed produces a radicle that grows towards the host root, reaches it, and adheres to the host plant. *Orobancha* spp. obtain water and inorganic compounds from the host through a xylem to xylem contact, and, unlike the vast majority of parasitic plants, they also utilise the carbon fixed by the host plants, which is transferred through phloem continuity between host and parasite (Molinero-Ruiz et al., 2015). Penetration of the intrusive cells into the xylem triggers their division, leading to the formation of a tubercle, a callus-shaped bulge of parasite cells outside the root (Molinero-Ruiz et al., 2015). In *O. cumana*-sunflower interaction, the utilization of host photoassimilates by the parasite results in depletion of resources which are necessary for the growth of sunflower and for the optimal development of the seeds.

The complete disruption of the host vascular system of sunflower forced by the parasitism of *O. cumana*, begins during the initial weeks of the crop. In fact, and as early as three weeks after inoculation, a decrease in secondary metabolites is observed in the host upon infection by the parasite (Pérez-Bueno et al., 2014). After underground development of tubercles parasite stems emerge aboveground at around flowering-time of sunflower plants (Melero-Vara and Alonso-, 1988). By that time most of the metabolic imbalance has been produced irreversibly by the

Sunflower broomrape detection by red and far red fluorescence imaging

parasite to sunflower. From that moment onwards, the impact of *O. cumana* on the crop yield is evident through absent or small sized capitula, their low number and small seeds, and even plant death (Moliner-Ruiz et al., 2015). Because the parasite establishes itself in the host plant in underground stages, non-destructive methods for diagnosing that establishment are greatly needed. Additionally, diagnosis tools used as early as possible after plant sowing and parasite infection will have a wide range of applications in the search for efficient control approaches, such as genetic resistance or treatments with potential biocontrol agents.

Multicolor fluorescence imaging (MCFI) is a technique based on induction of fluorescence emission through UV excitation. It provides leaf images of the autofluorescence emitted by plants in four spectral bands peaking at around 440 nm (blue, F440), 520 nm (green, F520), 690 nm (red, F690) and 740 nm (far-red, F740) (Buschmann and Lichtenthaler, 1998; Buschmann et al., 2000). The first two fluorescence signals (F440 and F520) are related to secondary metabolites (Harris and Hartley, 1976; Morales et al., 1996) while the other two (F680 and F740) are emitted by Chl *a* (Buschmann et al., 2000). Also of particular interest are the fluorescence ratios; the red/far-red (F680/F740) ratio was found to be a good indicator of stress-induced decreases in Chl content (Hák et al., 1990; Buschmann, 2007). Therefore, MCFI is considered to be a powerful tool for the research on plant physiology related to development (Lang et al., 1994; Cerovic et al., 1999; Subhash et al., 1999). Moreover, this imaging technique is especially valuable for detecting early symptoms in leaves as those caused by *Tobacco mosaic virus* in tobacco plants (Chaerle et al., 2007) and *Pseudomonas syringae* in bean plants (Pérez-Bueno et al., 2015).

On the other hand, the use of Chl meters for quantifying leaf Chl levels has become common in recent years. Unlike traditional leaf Chl content estimation techniques consisting mainly of pigments extraction by organic solvents followed by *in vitro* measurements with a spectrophotometer, Chl content meters allow to assess this leaf parameter in a fast and non-destructive way. Furthermore, previous studies using Chl meters have shown that they provide good estimates of leaf Chl content (Brito et al., 2011; Fanniza et al., 1991). Other useful applications of Chl

meters are the estimation of foliar N concentration (Chang and Robison, 2003; Liu et al., 2012) and crop disease detection (Calderón et al., 2014).

The objectives of this study were to: a) analyse the distribution of red and far-red fluorescence emission during early growth stages of healthy sunflower plants, b) evaluate the use of fluorescence imaging in the red and far-red region as an indicator of sunflower infection by *O. cumana* during underground development stages of the parasite, and c) compare fluorescence imaging in the red and far-red region with measurements of total leaf Chl content as indicator of early infection by *O. cumana*.

5.2. MATERIALS AND METHODS

5.2.1. Distribution of red and far-red fluorescence emission in healthy sunflower plantlets

5.2.1.1. Healthy plant material

Four sunflower seeds of the inbred line NR5 were surface-disinfected by soaking them in 20% household bleach (50 g of active chlorine per liter) for 5 min, then seeds were rinsed in deionised water for 5 min and kept in a dark incubator at 25°C at saturation humidity until radicles were 2–5 mm long. After germination, seeds were individually transplanted into small pots with 250 g of a soil mixture (sand:silt:peat moss 2:1:1, V). Plants were grown in a glasshouse at 12–22°C without additional lighting for 5 weeks and watered as needed. When plants were 2-week-old and once a week for the next two weeks of growth, they were fertilized with 15ml/pot of a nutrient solution with N:P:K (7:5:6).

5.2.1.2. Multicolor fluorescence imaging

Multicolour fluorescence imaging was carried out using an Open FluorCamFC 800-O and analysed using the Fluorcam7 software (Photon Systems Instruments, Brno, Czech Republic) according to Pérez-Bueno et al. (2015). Fluorescence images in red (F680) and far-red (F740) regions of the spectrum

Sunflower broomrape detection by red and far red fluorescence imaging

(which are emitted by chlorophyll *a*) were acquired sequentially after excitation with UV light (360 nm). Images corresponding to the F680/F740 ratio were calculated by the mentioned software. Fully developed leaf pairs (LPs) were measured from 2 weeks after transplanting. Thereafter, they were measured twice a week for three weeks until the end of the experiment. Measurements were always taken at the same time of day on attached and unshaded leaves.

The F680 and F740 emission by the leaf of healthy sunflower plants was studied by defining three different leaf areas (base, apex and a region in the middle of the leaf). In addition, progress of chlorophyll fluorescence emission on the first four LPs of the plants was analysed.

5.2.1.3. Statistical analyses

The F680 and F740 emission in leaf areas of healthy sunflower was analysed in a completely randomised design. Eight replicates were considered and one blade of an LP was regarded as a replicate. Significant differences in the intensity of F680 and F740 between leaf areas was calculated using analysis of variance (ANOVA). If significant effects were obtained, Fisher's protected LSD tests ($P = 0.05$) were used as the comparison procedure. In the case of the time course of the F680 and F740 in LP, means and standard errors of eight to twelve replicates were considered. Both experiments were repeated twice and ANOVA analysis was conducted to determine significant differences between the whole set of data. As no significant differences were found, data were pooled.

5.2.2. Red and far-red fluorescence emission, and leaf Chl content in sunflower plantlets upon inoculation with *O. cumana*

5.2.2.1. *Orobancha cumana* inoculation and sunflower plant growth

Five sunflower seeds (replications) of the inbred line NR5, which is the differential for race F (Molinero-Ruiz et al., 2015), were grown in the greenhouse for 5 weeks under the same conditions as those previously described and used as controls. In the case of inoculated plants, five NR5 seedlings were individually

transplanted into a soil mixture uniformly infested with 10 mg of *O. cumana* seeds of LPA13 population previously characterized as race F (García-Carneros et al., 2014). From then on, the experiment was carried out under the same conditions described in the section on healthy sunflower plantlets.

At the end of the experiment, sunflower plants were uprooted and their roots carefully cleaned to remove soil, washed and air-dried. Nodules of *O. cumana* in each plant were counted using a stereo microscope and weighed with a precision balance.

5.2.2.2. Measurements of the total leaf chlorophyll content

The total content on Chl was determined by an Chl content meter (CL-01 Hansatech Instruments Ltd, Kings Lynn, UK), which provides a rapid and direct way to determine the relative content of Chl in leaves. Measurements were taken twice a week, from 2 and until 5 wai, in control and in inoculated plants. In each plant, one measurement (replicate) was made in the middle of all fully developed leaves, avoiding the main vein. For each time point, all LPs were individually analysed. Between 12 and 20 replicates (measurements) were considered for each LP.

5.2.2.3. Spectrophotometric chlorophyll quantification

At the end of the experiment (5 wai), and before plants were uprooted, Chl *a* and Chl *b* content were determined spectrophotometrically for the second, third and fourth LP of four control and four inoculated plants. Two 1 cm diameter leaf disks were collected from each LP, weighted and immediately placed in vials and frozen in liquid nitrogen. Each sample was ground, the total pigments extracted with 4 ml of a solution of 80% acetone (v/v). The absorbance was measured was measured at 470, 647 and 663 nm with a Shimadzu UV-1800 spectrophotometer (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan). Total Chl content and the Chl *a/b* ratio were calculated according to Lichtenthaler and Buschmann (2001).

5.2.2.4. Statistical analyses

Sunflower plants were inoculated in two experiments which were set up as a factorial on a completely randomised design. Since ANOVA analysis did not detect any significant difference of data between them, the data were pooled. For each time point and LP, data of MCFI and Chl content included a maximum of 20 measurements. Sometimes, MCFI measurements were not taken on completely horizontal leaves resulting in a reduction to 14 replications for that particular time point. Similarly, if Chl content was determined on leaves that were too small to be clamped or had a very irregular surface, measurements were omitted and the replication number was reduced to 12. In any case, and for each time point, the same number of replications of control and inoculated plants was used in the statistical analyses. Significant differences in fluorescence parameters, broomrape incidence, total Chl content and Chl *a/b* ratio between inoculated and control plants were analysed using the same statistical procedures as explained for the healthy sunflowers.

5.3. RESULTS

5.3.1. MCFI distribution pattern on healthy sunflower plants

Figure 5.1 shows the average values of F680, F740 and their ratio for the first four LPs of healthy sunflower plants from the second to the fifth week of growth. Values of F680 and F740 of the first LP were significantly higher in the third week as compared to those recorded one week earlier. However, the F680/F740 ratio of the same LP showed a slight decrease in the third week. Concerning the second LP, no significant changes were detected in any of the fluorescence parameters analysed. The third LP showed a significant increase in the F680/F740 ratio during the measurement period. Conversely, the other two variables decreased slightly throughout the same period. The three fluorescence parameters of the fourth LP remained constant during the measuring week. (Fig. 5.1)

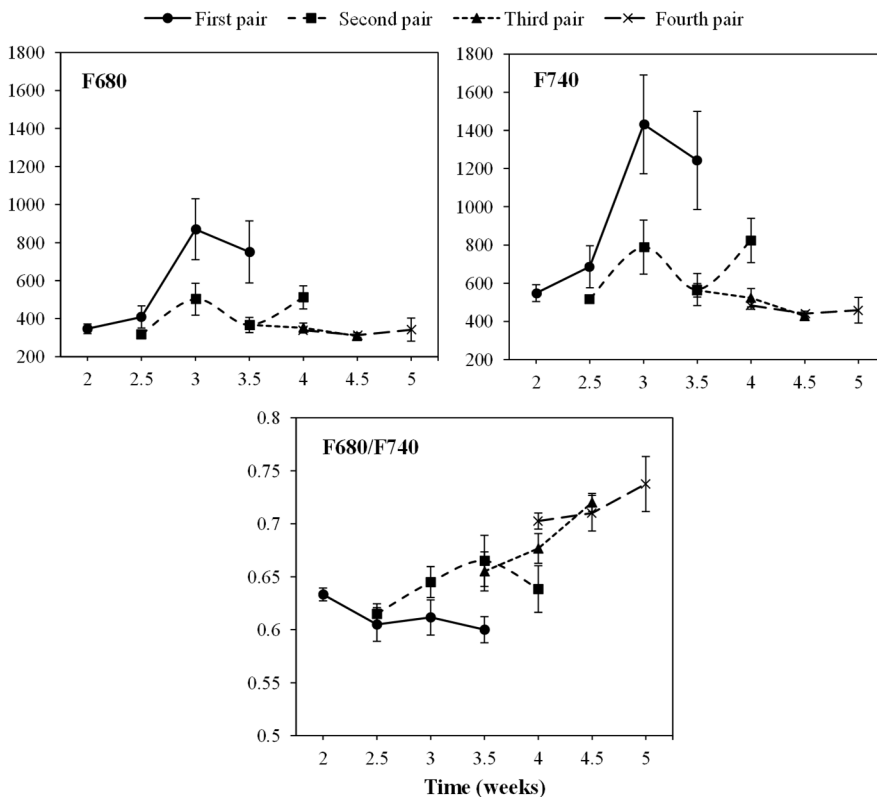


Figure 5.1. Progress of chlorophyll fluorescence emission on the first, second, third and fourth pair of true leaves of an healthy sunflower plant. Error bars represent the standard error of the mean of 8-12 replications. Time is expressed as weeks after transplanting.

The pattern of fluorescence across the leaves was found to be very homogeneous and therefore not dependent on measurement location on the leaf (data not shown). Consequently, a similar size area was selected in the middle of the leaf for the subsequent image analysis of healthy *vs* *O. cumana* infected plants.

5.3.2. Alterations in MCFI distribution pattern on sunflower plants upon infection with *O. cumana*

Figure 5.2 and Figure 5.3 show the progress of F680 and F740, respectively in the first four LPs of sunflower plants inoculated with *O. cumana* compared with that of control plants.

Sunflower broomrape detection by red and far red fluorescence imaging

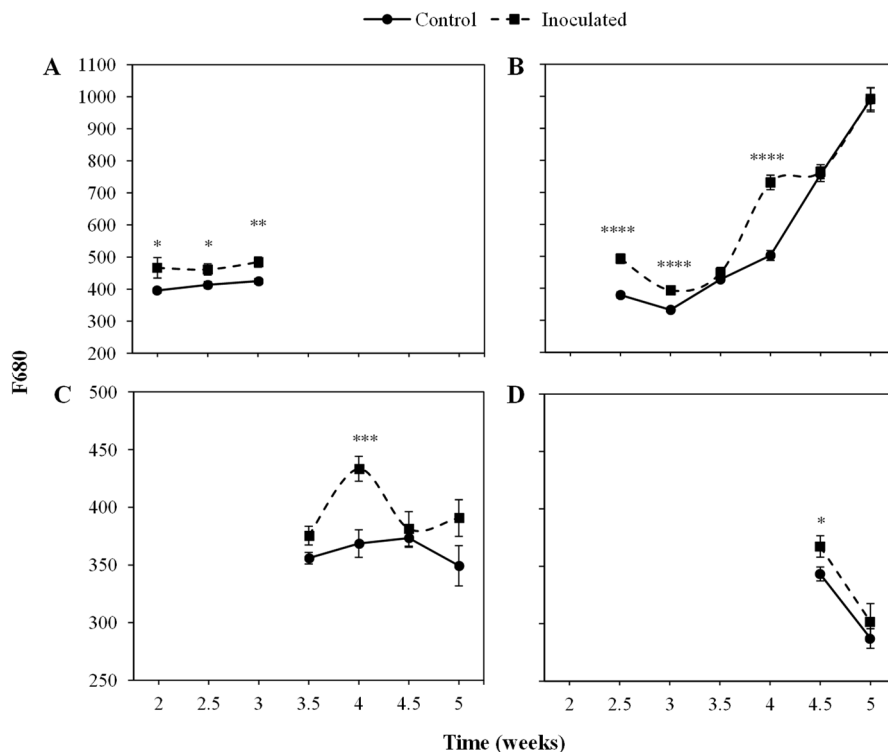


Figure 5.2. Mean measurements of F680 of the first (A), second (B), third (C) and fourth (D) leaf pair of sunflower plants inoculated with *Orobanche cumana* and control plants. Vertical bars represent the standard error of the mean of 14-20 replications. Analyses of variance were conducted and asterisks indicate significant differences (*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001).

The most informative parameters were those of the first LP from the second to the third week of growth and the second LP from the fourth week on. Between 2 and 3 wai, F680 and F740 of the first LP was significantly higher ($P < 0.05$) in the inoculated sunflowers as compared to the controls. In the same period of time, F680 and F740 signals in the second LP of inoculated plants were significantly higher than those of the controls ($P < 0.05$), as well as at 4 wai ($P < 0.05$). F680 and F740 signals of the third and fourth LP of inoculated plants were significantly higher than those of the controls at 4 wai in the third LP ($P < 0.05$) and half a week later in the fourth LP ($P < 0.05$).

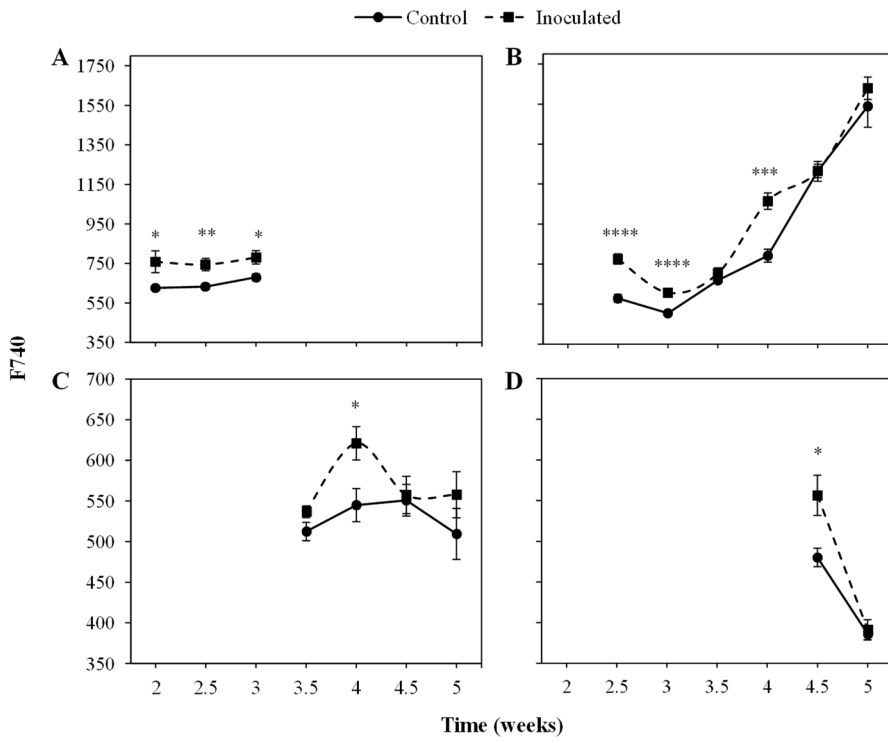


Figure 5.3. Mean measurements of F740 of the first (A), second (B), third (C) and fourth (D) leaf pair of sunflower plants inoculated with *Orobanche cumana* and control plants. Vertical bars represent the standard error of the mean of 7-10 replications. Analyses of variance were conducted and asterisks indicate significant differences (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$)

Sunflower broomrape detection by red and far red fluorescence imaging

Representative images of the two first LPs from control and inoculated sunflower are shown in Figure 5.4.

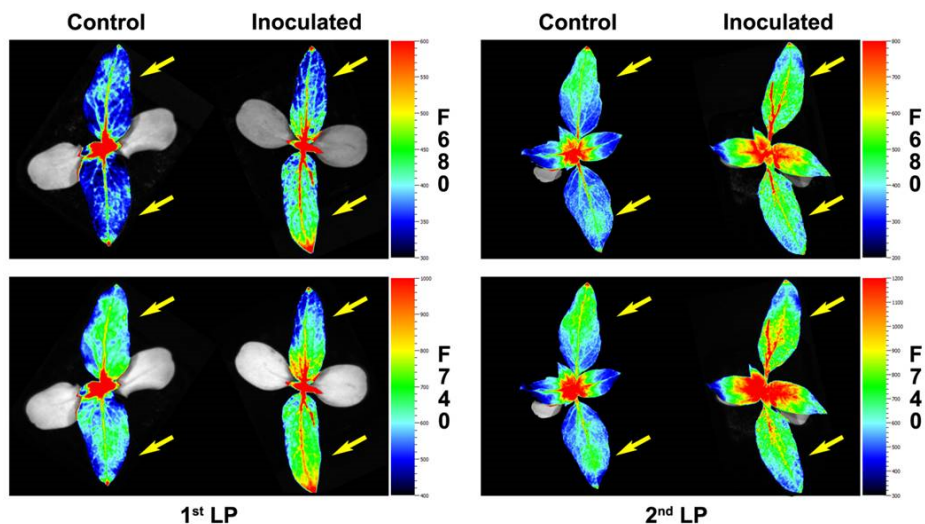


Figure 5.4. Red fluorescence (F680) and far-red fluorescence (F740) images of the two first LPs of sunflower plants inoculated with *Orobancha cumana* and control plants at 2 and 2.5 growth weeks respectively. First LPs are marked with an arrow.

Figure 5.5 displays the values of the F680/F740 ratio in inoculated and control sunflower plants in the first four LPs as well as significant differences between treatments. A significant effect ($P < 0.05$) of the inoculation by *O. cumana* was observed in F680/F740 of the second LP, being lower in inoculated plants at 2.5 and 3 wai ($P < 0.05$), and higher during the rest of the measurements ($P < 0.05$). Significant differences ($P < 0.05$) of F680/F740 between treatments were obtained in the fourth LP (averages 0.73 and 0.71 for inoculated and control plants, respectively). Although no significant differences ($P > 0.05$) were obtained between inoculated and control plants when the F680/F740 ratio of the third LP was analysed, similar trends were observed.

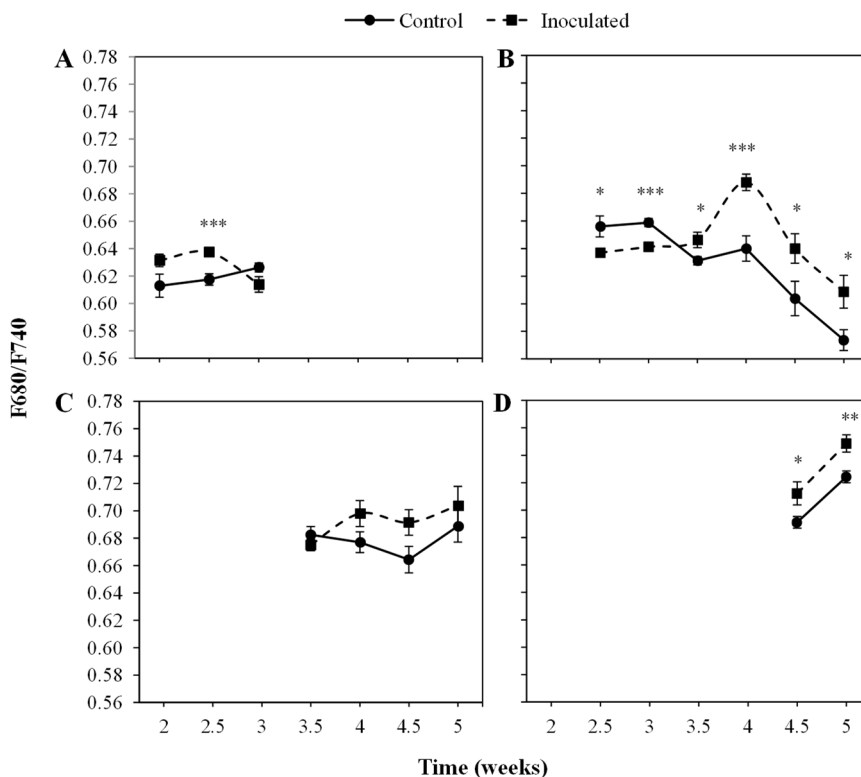


Figure 5.5. Mean measurements of the F680/F740 ratio of the first (A), second (B), third (C) and fourth (D) leaf pair of sunflower plants inoculated with *Orobanche cumana* and control plants. Vertical bars represent the standard error of the mean of 14-20 replications. Analyses of variance were conducted and asterisks indicate significant differences (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

5.3.3. Chlorophyll content in sunflower plants upon infection with *O. cumana*

The time course of the total Chl content of the first four LPs (A to D) is presented in Figure 5.6. Differences between the Chl content of inoculated and control plants depended on the LP analysed, being significantly low ($P < 0.05$) in the second LP of inoculated plants at nearly all time points (7.70 arbitrary units as compared to 8.94 in the controls).

Sunflower broomrape detection by red and far red fluorescence imaging

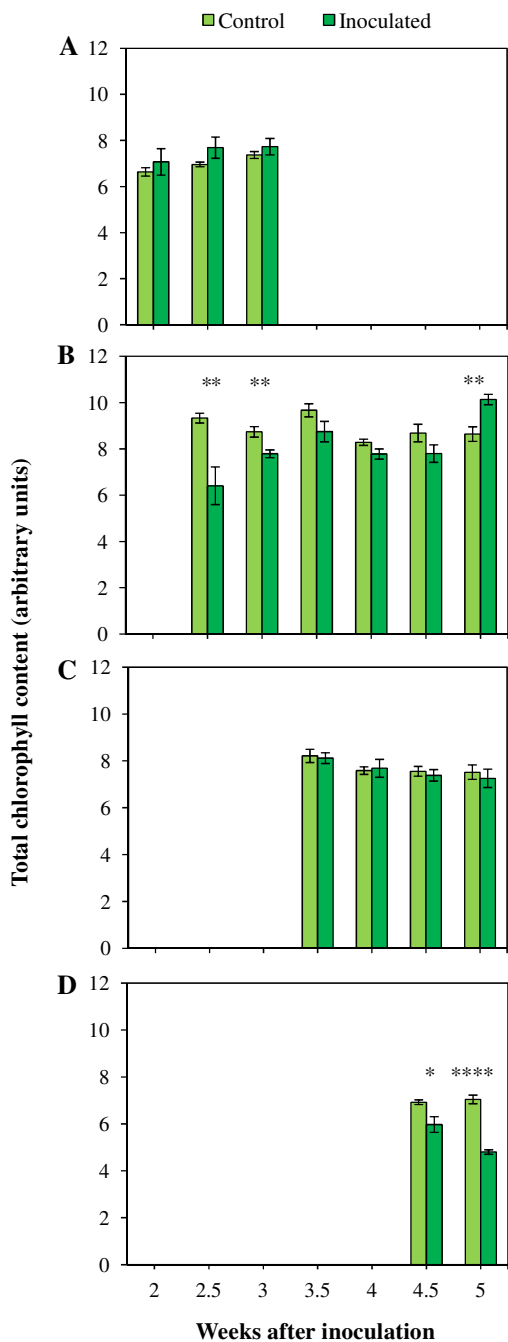
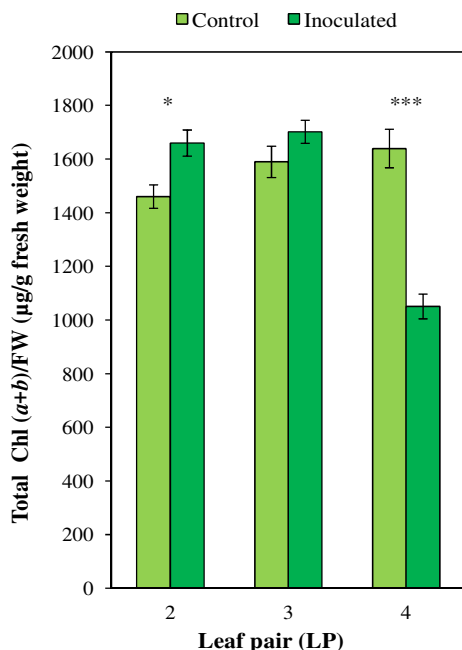


Figure 5.6. Chlorophyll content (expressed as Chl- meter readings) of the first (A), second (B), third (C) and fourth (D) pair of true leaves of control plants and plants inoculated with *Orobanche cumana*. Vertical bars represent the mean of 12-20 independent measurements with their standard error. Analyses of variance were conducted and asterisks indicate significant differences (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$).

The measurements conducted on the fourth LP resulted also in significantly ($P < 0.05$) lower values of inoculated plants as compared to the controls (5.38 and 6.98 arbitrary units respectively). In the case of the first and the third LP, no significant ($P > 0.05$) differences in total Chl content were detected between inoculated and control plants.

Spectrophotometric measurements of Chl content are presented in Supplementary Figure S1, which shows the differences in the total Chl content of each LP between control and inoculated plants. A significant ($P < 0.05$) increase in the total Chl content of the second LP (Supplementary Figure S1) was observed in inoculated plants as compared to the controls (1659.90 and 1460.19 $\mu\text{g/g}$ fresh weight, respectively). On the contrary, measurements of the fourth LP resulted in significantly ($P < 0.05$) lower total Chl content in inoculated plants than in control plants (1050.9 and 1639.31 $\mu\text{g/g}$ fresh weight, respectively). No significant ($P > 0.05$) differences of total Chl content were detected in the third LP. Neither differences in the Chl a/b ratio of LPs were observed between inoculated and control plants (data not shown).

Sunflower broomrape detection by red and far red fluorescence imaging



Supplementary Figure S1. Mean measurements of Chl content for the second, third and fourth LP sunflower plants inoculated with *Orobancha cumana* and control plants. Vertical bars represent the average of 8 independent measurements with their standard error. Analyses of variance were conducted and asterisks indicate significant differences (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$).

5.3.4. Determination of final degree of sunflower infection by *O. cumana*

When sunflower plants were inoculated with *O. cumana*, both inoculated and control plants developed four LPs at the end of the experiment (5 wai). No symptoms of parasite infection were observed in the inoculated plants throughout the experiment. Nevertheless, the presence of the parasitic plant in inoculated sunflowers was confirmed by the existence of tubercles in the roots at the end of the experiment. While no tubercles were observed in the controls, means of 24.4 tubercles/plant and 0.46 g tubercles/plant were obtained in inoculated sunflowers (data not shown).

5.4. DISCUSSION

During our study, the emission of red and far-red fluorescence in healthy sunflower depended on the LP analysed. F680 nm and F740 nm showed the same trend in all the LPs analysed, with higher F740 values compared to those of F680, probably due to the partial reabsorption of the red fluorescence emitted by leaf Chl α (Gitelson et al., 1998). Since F680/F740 was inversely correlated with the Chl content of leaves (Hák et al., 1990; Buschmann and Lichtenthaler, 1998), low values found in the first LP during early stages of the growth of sunflower, compared with the other three LPs under study, were indicative of higher Chl contents. A similar trend of low F680/F740 was observed in the case of the second LP, although with some delay in the time. In our study, the role of an LP as leader in Chl content was sequentially acquired by the one immediately above, and this happened approximately every 1-2 weeks. A different physiological activity between cotyledons and the first LP of sunflower, in terms of photosynthesis, has been reported by Jucknischke and Kutschera (1998). Also, differences in Chl content and photosynthesis have been reported as being dependent on leaf position in sunflower (Connor and Sadras, 1992; Subrahmanyam and Rathore, 2004). The correlation between photosynthetic activity and Chl content in individual LPs upon infection with *O. cumana* should be investigated in the future.

Increases in both F680 and F740 upon infection of *O. cumana* were observed in all LPs analysed compared to that of the healthy controls in agreement with previous results by our group (Pérez-Bueno et al., 2014). The evolution of F680/F740 throughout the time was similar to that of F680 and F740 in the same LP. Values of F680/F740 increased for the second to fourth LPs upon infection by *O. cumana* and at different times in each LP, which could be indicative of a decrease in the Chl content upon infection assuming a similarity in the results reported by Gitelson et al. (1999), where the ratio F700/F730 was presented as an indicator of Chl content. Similarly to those observed in F680 and F740 of LP from healthy sunflowers, the decreases were detected in different LPs sequentially in the time. In inoculated plants, higher values of F680/F740 in the first LP until the third week after inoculation indicated lower Chl contents. From the third week on, a decrease in Chl content as compared to that of the controls occurred in the second LP of the

Sunflower broomrape detection by red and far red fluorescence imaging

plants. The same trend was observed in the third and fourth LPs when measurements of inoculated and control plants were compared later on in the time. The alteration in F680 and F740 due to *O. cumana* infection shows the usefulness of the MCFI as an early indicator of parasite infection, as was suggested in a previous work (Pérez-Bueno et al., 2014). Furthermore, our results showed that the best indicators of parasite infection were the measurements of F680, F740 and F680/F740 in the first and second LPs from the second to the third week of plant growth. These findings confirm previous results by our research group about early detection of parasite infection by means of fluorescence emission of the first LP of sunflower. Even 3 wai proposed by Pérez-Bueno et al. (2014) as the earliest time for discriminating infected from uninfected plants, was reduced in this work to 2 wai. Therefore, the non-destructive pre-symptomatic disease diagnosis might be feasible as early as 15 days after sunflower inoculation.

Low Chl contents in LP from infected plants at certain times were also shown by outputs of the portable Chl-meter, which showed significantly low Chl contents in the second LP 4.5 weeks after inoculation and in the fourth LP from that moment on. Our results also reveal the greater sensitivity and accuracy of MCFI in diagnosing sunflower infection by *O. cumana* as compared to the direct measurements of Chl in intact leaves, because trends observed when using the hand-held Chl-meter were statistically significant according to red and far-red Chl fluorescence emissions. The positive correlation between outputs of portable Chl-meters and Chl fluorescence measurements has been reported by other authors (Netto et al., 2002; Netto et al., 2005; Nyi et al., 2012; Hu and Fang, 2013). In our work, F680 and F740 in parasitized plants were in agreement with direct measurements of Chl, particularly when the second and fourth LPs were considered. In addition, the spectrophotometric measurements of Chl content at 5 wai provided further evidence that, upon parasite infection, the Chl content in sunflower leaves decreased. The positive correlation between outputs of portable Chl-meters and photosynthetic pigments extracted from leaves has been reported by many authors (Fanniza et al., 1991; Netto et al., 2005, Brito et al., 2011). Finally, the greater sensitivity of MCFI compared to measurements of Chl content might be related to the fact that fluorescence intensity is not only dependent on the Chl content, but also on other factors such as leaf architecture or chloroplast

organization (Cerovic et al., 1999). The effect of parasite infection on them might be explored in the future.

Early studies detected a decrease in Chl content in leaves of *Trifolium repens* upon infection by *O. minor*, although no effect on the host photosynthesis was observed (Dale and Press, 1998). Some authors, such as Hibberd et al. (1999) and Watling and Press (2001), suggested that the high competitiveness of holoparasites as a source forces an increase in host photosynthesis. On the contrary, other authors reported low rates of photosynthetic activity of the host upon infection by the holoparasite, such as in the case of tomato plants infected by the broomrape *O. ramosa* (Mauromicale et al., 2008) or *Mikania micrantha* infected by *Cuscuta campestris* (Shen et al., 2007). It is widely known that Chl fluorescence is an excellent approach to photosynthetic efficiency, which can directly or indirectly reflect the impact of biotic and abiotic stresses on plants. Hence, a number of studies have used chlorophyll fluorescence imaging to examine the impact of plant pathogens, i.e. virus, bacteria and fungi, on host photosynthesis, as excellently reviewed by Rolfe and Scholes (2010). In future research, imaging measurements of Chl fluorescence kinetics in sunflower upon infection by *O. cumana* might explore on the plant photosynthesis alteration as a consequence of the holoparasite infection.

Generally, MCFI has been applied to the study of local symptoms in leaves caused by infections of airborne pathogens (Chaerle et al., 2007; Konanz et al., 2014; Pérez-Bueno et al., 2015). However, symptoms in leaves can as well be a consequence of an infection that occurred far beyond those organs, such as roots in the case of soilborne pathogens (Granum et al., 2015). In the latter, the responses observed in leaves clearly relates to plant defence mechanisms and the alteration of the host physiology due to the infection, since any direct damage in them can be discarded. Up to now, plant infections by soilborne pathogens have only been addressed by means of MCFI in Granum et al. (2015). Rousseau et al. (2015) have recently proved the potential of Chl fluorescence to detect the effect of *Phelipanche ramosa* on *Arabidopsis thaliana*. However, to the best of our knowledge, this is the first time that the impact of a root parasite on its plant host is examined by using fluorescence imaging in the red and far-red region. This inexpensive, non-

destructive technic has proved to be an effective diagnostic tool in the early detection of sunflower plants parasitized by *O. cumana*. Moreover, the parameters F680 and F740 detect the parasite infection as early as two weeks after inoculation, and this might have a particular interest for early phenotyping in sunflower breeding programmes.

5.5. ACKNOWLEDGMENTS

Financial support for this research was provided by “Consejería de Economía, Innovación y Ciencia” of the Andalusian Government (P12-AGR1281 to LMR and P12-AGR370 to MB) and the European Social Fund, and RECUPERA 2020 (grant number 20134R060 to MB) and FEDER Funds.

5.6. REFERENCES

- Brito, G.G., Sofiatti, V., Brandão, Z.N., Silva, V.B., Silva, F.M., and Silva, D.A. (2011). Non-destructive analysis of photosynthetic pigments in cotton plants. *Acta Scie. Agro.* 33, 671-678. doi: 10.4025/actasciagron.v33i4.10926
- Buschmann, C., and Lichtenthaler, H.K. (1998). Principles and characteristics of multicolour fluorescence imaging of plants. *J. Plant Physiol.* 152, 297-314. doi: 10.1016/S0176-1617(98)80144-2
- Buschmann, C., Langsdorf, G., and Lichtenthaler, H.K. (2000). Imaging of the blue, green, and red fluorescence emission of plants: An overview. *Photosynthetica* 38, 483-491. doi: 10.1023/A:1012440903014
- Buschmann, C. (2007). Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves. *Photosynth. Res.* 92, 261-271. doi: 10.1007/s11120-007-9187-8
- Calderón, R., Lucena, C., Trapero-Casas, J.L., Zarco-Tejada, P.J., and Navas-Cortés, J.A. (2014). Soil temperature determines the reaction of olive cultivars to *Verticillium dahliae* Pathotypes. *PLoS ONE* 9: e110664. doi:10.1371/journal.pone.0110664
- Cerovic, Z.G., Samson, G., Morales, F., Tremblay, N., and Moya, I. (1999). Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. *Agronomie* 19, 543-578. doi: 10.1051/agro:19990701

- Chaerle, L., Lenk, S., Hagenbeek, D., Buschmann, C., and Van Der Straeten, D., (2007). Multicolor fluorescence imaging for early detection of the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *J. Plant Physiol.* 164, 253-262. doi: 10.1016/j.jplph.2006.01.011
- Chang, S.X., and Robison, D.J. (2003). Nondestructive and rapid estimation of hardwood foliar nitrogen status using the SPAD-502 chlorophyll meter. *For. Ecol. Manage.* 181, 331-338. doi:10.1016/S0378-1127(03)00004-5
- Connor, D.J., and Sadras, V.O. (1992). Physiology of yield expression in sunflower. *Field Crop Res.* 30, 333-389. doi: 10.1016/0378-4290(92)90006-U
- Dale, H., and Press, M.C. (1998). Elevated atmospheric CO₂ influences the interaction between the parasitic angiosperm *Orobanche minor* and its host *Trifolium repens*. *New Phytol.* 140, 65-73. doi: 10.1046/j.1469-8137.1998.00247.x
- Dominguez, J. (1996). "Estimating effects on yield and other agronomic parameters in sunflower hybrids infested with the new races of sunflower broomrape", in: *Symposium I: Disease tolerance in Sunflower*, ed. A. Pouzet (Paris: International Sunflower Association), 118-123.
- Fanizza, G., Ricciardi, L., and Bagnulo, C. (1991). Leaf greenness measurements to evaluate water stressed genotypes in *Vitis vinifera*. *Euphytica* 55, 27-31. doi: 10.1007/BF00022556
- García-Carneros, A.B., Dedic, B., Miladinovic, D., and Molinero-Ruiz, L. (2014). "Pathogenic comparison of highly virulent *O. cumana* affecting sunflower in Moldova, the South of Russian Federation, Serbia and Spain", in: *Proceedings of the Third International Symposium of Orobanche spp. of Sunflower*, ed. International Sunflower Association (Paris: International Sunflower Association), 173-177.
- Gitelson, A.A., Buschmann, C., and Lichtenthaler, H.K. (1998). Leaf chlorophyll fluorescence corrected for re-absorption by means of absorption and reflectance measurements. *J. Plant Physiol.* 152, 283-296. doi: 10.1016/S0176-1617(98)80143-0
- Gitelson, A.A., Buschmann, C., and Lichtenthaler, H.K. (1999). The chlorophyll fluorescence ratio F735/F700 as an accurate measure of the chlorophyll content in plants. *Remote Sens. Environ.* 69, 296-302. doi: 10.1016/S0034-4257(99)00023-1
- Granum, E., Pérez-Bueno, M.L., Calderón, C.E., Ramos, C., de Vicente, A., Cazorla, F.M., et al. (2015). Metabolic responses of avocado plants to stress induced by *Rosellinia necatrix* analysed by fluorescence and thermal imaging. *Eur. J. Plant Pathol.* 142, 625-632. doi: 10.1007/s10658-015-0640-9

Sunflower broomrape detection by red and far red fluorescence imaging

Hák, R., Lichtenthaler, H.K. and Rinderle, U. (1990). Decrease of the chlorophyll fluorescence ratio F690/F730 during greening and development of leaves. *Radiat. Environ. Biophys.* 29, 329-336. doi: 10.1007/BF01210413

Harris P.J., and Hartley, R.D. (1976). Detection of bound ferulic acid in the cell walls of the Gramineae by ultraviolet fluorescence microscopy. *Nature* 259, 508-510. doi: 10.1038/259508a0

Hibberd, J.M., Quick, W.P., Press, M.C., Scholes, J.D., and Jeschke, W.D. (1999). Solute fluxes from tobacco to the parasitic angiosperm *Orobanche cernua* and the influence of infection on host carbon and nitrogen relations. *Plant Cell Environ.* 22, 937-947. doi: 10.1046/j.1365-3040.1999.00462.x

Hu, H., and Fang, S. (2013). "Relation of leaf image, chlorophyll fluorescence, reflectance and SPAD in rice and barley", in: *Proceedings of the Second International Conference on Agro-Geoinformatics (Agro-Geoinformatics)* (Rome: IEEE), 28-31.

Jestin, C., Lecomte, V., and Duroueix, F. (2014). "Current situation of sunflower broomrape in France", in: *Current Situation of Sunflower Broomrape Around the World, Proceedings of the Third International Symposium on Broomrape (Orobanche spp.) in Sunflower*, ed. International Sunflower Association (Paris: International Sunflower Association), 28-31.

Joel, D.M., Chaudhuri, S.K., Plakhine, D., Ziadna, H., and Steffens, J.C. (2011). Dehydrocostus lactone is exuded from sunflower roots and stimulates germination of the root parasite *Orobanche cumana*. *Phytochemistry* 72, 624-634. doi:10.1016/j.phytochem.2011.01.037

Jucknischke, A., and Kutschera, U. (1998). The role of the cotyledons and primary leaves during seedling establishment in sunflower. *J. Plant Physiol.* 153, 700-705. doi:10.1016/S0176-1617(98)80223-X

Konanz, S., Kocsányi, L., and Buschmann, C. (2014). Advanced multi-color fluorescence imaging system for detection of biotic and abiotic stresses in leaves. *Agriculture* 4, 79-95. doi:10.3390/agriculture4020079

Lang, M., Lichtenthaler, H.K., Sowinska, M., Summ, P. and Heisel, F. (1994). Blue, green and red fluorescence signatures and images of tobacco leaves. *Botanica Acta* 107, 230-236. doi: 10.1111/j.1438-8677.1994.tb00790.x

Lichtenthaler, H.K., and Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, (Supplement 1) F4.3.1-F4.3.8. doi: 10.1002/0471142913.faf0403s01

- Liu, Z.A, Yang, J.P, and Yang, Z.C. (2012). Using a chlorophyll meter to estimate tea leaf chlorophyll and nitrogen contents. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 12, 339-348. doi: 10.4067/S0718-95162012000200013
- Mauromicale, G., Monaco, A.L., and Longo, A.M. (2008). Effect of branched broomrape (*Orobanche ramosa*) infection on the growth and photosynthesis of tomato. *Weed Sci.* 56, 574-581. doi: 10.1614/WS-07-147.1
- Melero-Vara, J.M., and Alonso Arnedo, L.C. (1988). "Las Enfermedades del Girasol", in: *Enfermedades y Daños de Herbicidas en el Cultivo del Girasol*, ed. Koipesol (Madrid: Artes Gráficas EMA), 33-39.
- Molinero-Ruiz, M.L., García-Ruiz, R., Melero-Vara, J.M. and Domínguez, J. (2009). *Orobanche cumana* race F: performance of resistant sunflower hybrids and aggressiveness of populations of the parasitic weed. *Weed Res.* 49, 469-478. doi: 10.1111/j.1365-3180.2009.00708.x
- Molinero-Ruiz, L., Delavault, P., Pérez-Vich, B., Pacureanu-Joita, M., Bulos, M., Altieri, E., et al. (2015). History of the race structure of *Orobanche cumana* and the breeding of sunflower for resistance to this parasitic weed: A review. *Span. J. Agric. Res.* 13: 4. doi: 10.5424/sjar/2015134-8080
- Morales, F., Cerovic, Z.G., and Moya, I. (1996). Time resolved blue-green fluorescence of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves: Spectroscopic evidence for the presence of ferulic acid as the main fluorophore in the epidermis. *BBA Bioenergetics* 1273, 251-262. doi: 10.1016/0005-2728(95)00153-0
- Netto, A.T., Campostrini, E., de Oliveira, J. G., and Yamanishi, O.K. (2002). Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assessment of the photochemical process in *Carica papaya* L. *Braz. J. Plant Physiol.* 14, 203-210. doi: 10.1590/S1677-04202002000300004
- Netto, A.T., Campostrini, E., de Oliveira, J.G., and Bressan-Smith, R.E. (2005). Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll *a* fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. *Sci. Hortic.* 104, 199-209. doi: 10.1016/j.scienta.2004.08.013
- Nyi, N., Sridokchan, W., Chai-arree, W., and Srinives, P. (2012). Nondestructive measurement of photosynthetic pigments and nitrogen status in *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) by chlorophyll meter. *Philipp. Agric. Sci.* 95, 83-89.
- Pérez-Bueno, M.L., Barón, M., Garcia-Carneros, A.B., and Molinero-Ruiz, L. (2014). Diagnosis of the infection of sunflower by *Orobanche cumana* using multicolour fluorescence imaging. *Helia* 37, 161-174. doi: 10.1515/helia-2014-0015

Sunflower broomrape detection by red and far red fluorescence imaging

Pérez-Bueno, M.L., Pineda, M., Díaz-Casado, E. and Barón, M. (2015). Spatial and temporal dynamics of primary and secondary metabolism in *Phaseolus vulgaris* challenged by *Pseudomonas syringae*. *Physiol. Plantarum* 153, 161-174. doi: 10.1111/ppl.12237

Raupp, F.M., and Spring, O. (2013). New sesquiterpene lactones from sunflower root exudate as germination stimulants for *Orobancha cumana*. *J. Agric. Food Chem.* 61, 10481-10487. doi: 10.1021/jf402392e

Rolfe, S.A., and Scholes, J.D. (2010). Chlorophyll fluorescence imaging of plant-pathogen interactions. *Protoplasma* 247, 163-175. doi: 10.1007/s00709-010-0203-z

Rousseau, C., Hunault, G., Gaillard, S., Bourbeillon, J., Montiel, G., Simier, P., et al. (2015). Phenoplant: a web resource for the exploration of large chlorophyll fluorescence image datasets. *Plant Methods* 11:24. doi: 10.1186/s13007-015-0068-4

Shen, H., Hong, L., Ye, W., Cao, H., and Wang, Z. (2007). The influence of the holoparasitic plant *Cuscuta campestris* on the growth and photosynthesis of its host *Mikania micrantha*. *J. Exp. Bot.* 58, 2929-2937. doi: 10.1093/jxb/erm168

Subhash, N., Wenzel, O., and Lichtenthaler, H.K. (1999). Changes in blue-green and chlorophyll fluorescence emission and fluorescence ratios during senescence of tobacco plants. *Remote Sens. Environ.* 69, 215-223. doi: 10.1016/S0034-4257(99)00029-2

Subrahmanyam, D., and Rathore, V.S. (2004). ¹⁴C₂ assimilation and ¹⁴C-photosynthate translocation in different leaves of sunflower. *Photosynthetica* 42, 313-316. doi: 10.1023/B:PHOT.0000040607.67963.38

Ueno, K., Furumoto, T., Umeda, S., Mizutani, M., Takikawa, H., Batchvarova, R., et al. (2014). Heliolactone, a non-sesquiterpene lactone germination stimulant for root parasitic weeds from sunflower. *Phytochemistry* 108, 122-128. doi: 10.1021/jf2024193

Watling, J.R., and Press, M.C. (2001). Impacts of infection by parasitic angiosperms on host photosynthesis. *Plant Biol.* 3, 244-250. doi: 10.1055/s-2001-15195

Yoneyama, K., Xie, X.N., Kisugi, T., Nomura, T., Sekimoto, H., Yokota, T., et al. (2011). Characterization of strigolactones exuded by Asteraceae plants. *Plant Growth Regul.* 65, 495-504. doi: 10.1007/s10725-011-9620-z

CAPÍTULO 6

**USE OF BLUE-GREEN FLUORESCENCE AND THERMAL
IMAGING IN THE EARLY DETECTION OF SUNFLOWER
INFECTION BY THE ROOT PARASITIC WEED *OROBANCHE*
CUMANA WALLR.**

Este capítulo es una versión adaptada del artículo aceptado

Articles

THIS ARTICLE IS PART OF THE RESEARCH TOPIC
Advances in Oil Crops Research – Classical and New Approaches to Achieve Sustainable Productivity

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Front. Plant Sci. | doi: 10.3389/fpls.2017.00833

Use of blue-green fluorescence and thermal imaging in the early detection of sunflower infection by the root parasitic weed *Orobanche cumana* Wallr.

Carmen M. Ortiz-Bustos¹, María Luisa Pérez-Bueno¹, Matilde Barón Ayala² and Leire Molinero-Ruiz^{1*}

¹Department of Crop Protection, Institute for Sustainable Agriculture, CSIC, Spain

²Department of Biochemistry and Molecular and Cellular Biology of Plants, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Spain

Although the impact of *Orobanche cumana* on sunflower (*Helianthus annuus* L.) becomes evident with emergence of broomrape shoots aboveground, infection occurs early after sowing, the host physiology being altered during underground parasite stages. Genetic resistance is the most effective control method and one of the main goals of sunflower breeding programmes. Blue-green fluorescence (BGF) and thermal imaging allow non-destructive monitoring of plant diseases, since they are sensitive to physiological disorders in

37

TOTAL VIEWS



View Article Impact


frontiers
SPOTLIGHT AWARD

Win \$100,000 to host your own conference.

Submit your Research Topic

Like

Comments

OPEN ACCESS. DOI: 10.3389/fpls.2017.00833

Use of blue-green fluorescence and thermal imaging in the early detection of sunflower infection by the root parasitic weed *Orobanche cumana* Wallr.

Carmen M. Ortiz-Bustos¹, María L. Pérez-Bueno², Matilde Barón² and Leire Molinero-Ruiz¹.

¹Department of Crop Protection, Institute for Sustainable Agriculture, CSIC, Alameda del Obispo s/n, 14004 Cordoba, Spain.

² Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain.

Correspondence:

Dr. Leire Molinero-Ruiz, Institute for Sustainable Agriculture, CSIC. Department of Crop Protection. Alameda del Obispo s/n, 14004 Cordoba, Spain. leire.molinero@csic.es

ABSTRACT

Although the impact of *Orobanche cumana* Wallr. on sunflower (*Helianthus annuus* L.) becomes evident with emergence of broomrape shoots aboveground, infection occurs early after sowing, the host physiology being altered during underground parasite stages. Genetic resistance is the most effective control method and one of the main goals of sunflower breeding programmes. Blue-green fluorescence (BGF) and thermal imaging allow non-destructive monitoring of plant diseases, since they are sensitive to physiological disorders in plants. We analysed the BGF emission by leaves of healthy sunflower plantlets, and we implemented BGF and thermal imaging in the detection of the infection by *O. cumana* during underground parasite development. Increases in BGF emission were observed in leaf pairs of healthy sunflowers during their development. Lower BGF was consistently detected in parasitised plants throughout leaf expansion and low pigment concentration was detected at final time, supporting the interpretation of a decrease in secondary metabolites upon infection. Parasite-induced stomatal closure and transpiration reduction were suggested by warmer leaves of inoculated sunflowers throughout the experiment. BGF imaging and thermography could be implemented for fast screening of sunflower breeding material. Both techniques are valuable approaches to assess the processes by which *O. cumana* alters physiology (secondary metabolism and photosynthesis) of sunflower.

Keywords: Broomrape, carotenoids, early diagnosis, *Helianthus annuus* L., multicolour fluorescence, thermal detection

6.1. INTRODUCTION

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) oil is a major commodity in world trade mainly in Europe, where 60% of the total world production is obtained every year (FAOSTAT, 2016). The main biotic constraint for sunflower oil production in all the countries where sunflowers are grown -with the only exception of the Americas- is broomrape, caused by the achlorophyllous parasitic plant *Orobanche cumana* Wallr. Currently, *O. cumana* is present in 15 to 20% of the area cropped to sunflower in the world, causing close to 100% yield losses under high infestations (Fernández-Martínez et al., 2015). After parasite seed germination in the soil early after sowing, penetration of its intrusive cells into the host root tissues triggers their division, leading to the formation of a subterranean shoot that grows outside the root of sunflower. Then, parasite shoots emerge from the soil and form a flowering spike that rapidly produces a large amount of tiny seeds. *Orobanche cumana* parasitises sunflower all through the crop growing season, and flowering of both, host and parasite, are coincident in time (Molinero-Ruiz et al., 2015).

Vascular connections established between broomrapes (*Orobanche* spp. and *Phelipanche* spp.) and their hosts force a complete disruption of the vascular system of the latter during the initial weeks of parasitism (Westwood, 2013). As a result, strong sink strength diverts water and nutrients necessary for the growth of the host (Stewart and Press, 1990). From the emergence of *O. cumana* shoots aboveground onwards, a reduced growth of sunflower is evident (Alcántara et al., 2006) and the decrease of the yield is due to absent or smaller sized capitula, low number and small seeds, and even plant death (Molinero-Ruiz et al., 2015). Thus, most of the metabolic imbalance and water flow impairment might be produced irreversibly in sunflower during underground parasite stages. Since it is physiologically closely linked to sunflower, *O. cumana* is extremely difficult to control in its parasitic stage. Some herbicide treatments may be effective, but depend on the development of herbicide resistance in the crop (Molinero-Ruiz et al., 2015). With regard to the free-standing stage of the parasite, thousands of tiny seeds are produced each season, their longevity contributing to the build-up of populations in soils. Since soil fumigation and solarisation are not economically feasible, use of inducers of suicidal broomrape germination requires an

BGF and thermal imaging in the early detection of sunflower broomrape

appropriate application technology and agronomic practices and biological control agents have limited efficacy, the effective control of *O. cumana* relies on genetic resistance (Molinero-Ruiz et al., 2015; Fernández-Aparicio et al., 2016).

Imaging techniques, especially blue-green fluorescence and thermal imaging among others, are powerful tools for use in plant stress detection (Lichtenthaler and Miehe, 1997; Chaerle and Van Der Straeten, 2000), including determination of plant diseases (Nilsson, 1995). They are based on the assessment of optical properties of plants within different regions of the electromagnetic spectrum and are able to utilize information beyond the visible range (Chaerle and Van Der Straeten, 2000). Under UV-excitation, plants can emit a wide fluorescence spectrum ranging from about 400 to 800 nm. This spectrum is the sum of two distinct types of fluorescence: blue-green fluorescence (BGF) characterized by a peak around 440 nm (F440) and a shoulder near 520 nm (F520), and fluorescence in the red and far-red regions with two characteristic peaks at about 680 nm (F680) and 740 nm (F740), respectively. The intensity of the BGF after UV light excitation is constant on a short time scale (minutes) and it has been proven to be very sensitive to single stress factors in plants (Buschmann and Lichtenthaler, 1998; Buschmann et al., 2000). The BGF from intact leaves is emitted by cinnamic acids, mainly ferulic acid (Morales et al., 1996), covalently bound to the cell walls of the epidermis, and by other phenolic compounds (Buschmann et al., 2000). In addition, BGF can emanate also from other secondary metabolites as reviewed by Cerovic et al. (1999). Moreover, quantitative variation of plant secondary metabolites associated with BGF emission can be the consequence, among others, of leaf ageing (Morales et al., 2005), water stress (Kautz et al., 2014) or pathogen infection (Chaerle et al., 2007; Granum et al., 2015; Pérez-Bueno et al., 2015). Additionally, F680 and F740 are emitted by chlorophyll *a* (Chl *a*) and they are dependent on the pigment content and other factors such as optics of the leaf (Buschmann and Lichtenthaler, 1998; Gitelson et al., 1998).

On the other hand, radiation emitted by plants in the thermal infrared range from 8 to 12-14 μm can be detected by thermographic and infrared cameras. Infrared thermography is an indicator of transpiration and stomatal conductance (Eaton and Belden, 1929; Jackson et al., 1977; Nilsson, 1995). It has been

correlated, among others, with plant water status (Zarco-Tejada et al., 2012; Raza et al., 2014; Grant et al., 2016; Mangus et al., 2016) and canopy microclimate (Lenthe et al., 2007; Leuzinger and Korner, 2007), as well as with early infections by airborne (Lindenthal et al., 2005; Pérez-Bueno et al., 2015; Baranowski et al., 2015) and soilborne (Wang et al., 2012; Calderón et al., 2013; Granum et al., 2015) plant pathogens.

Both fluorescence and thermal imaging of whole leaves and whole plants have become essential techniques from the perspective of non-destructive monitoring of plant diseases from far (remote sensing) and from near distance, since sensors are sensitive to physiological disorders in plants associated with pathogen attack and with disease resulting from that attack (Buschmann et al., 2000; Chaerle and Van Der Straeten, 2000; Mahlein, 2016). Techniques for near distance monitoring of plant diseases can have a direct application in plant phenotyping of breeding programmes as those of sunflower. In this regard, fluorescence imaging in the red and far-red region has been recently applied in the early diagnosis of the infection of sunflower by *O. cumana* (Ortiz-Bustos et al., 2016a).

The objectives of this study were to: a) analyse the distribution of BGF emitted by sunflower leaves during early growth stages of healthy sunflower plants in order to identify the adequate areas and times for BGF imaging, b) evaluate the use of BGF imaging as an indicator of the infection of sunflower by *O. cumana* during initial underground development of the parasite and compare the BGF information with the pigments concentration in leaves, and c) analyse the effect of underground infection by *O. cumana* in early stages of sunflower growth using thermal imaging of the leaves.

6.2. MATERIALS AND METHODS

6.2.1. Growth of healthy sunflower

Four sunflower seeds of the inbred line NR5 were surface sterilized by immersion in 20% household bleach (50 g of active chlorine per liter) for 5 minutes, then thoroughly rinsed in deionised water and incubated at 25°C in the dark at saturation humidity until radicles were 2 to 5 mm long. Thereafter, individual sunflower seedlings were transplanted into pots with 250 g of a soil mixture SSP (sand:silt:peat moss 2:1:1, V). Pots were kept in a glasshouse at 12–22°C without additional lighting (15/9 h light/dark regime) for 5 weeks. Plants were watered as needed and, when they were 2 weeks old and until the end of the experiment three weeks later, they were fertilized once a week with 15ml/pot of a nutrient solution with N:P:K (7:5:6).

6.2.2. Inoculation with *O. cumana*, growth conditions and disease development

Sunflower plants were inoculated with population LPA13 of *O. cumana* (race F) (García-Carneros et al., 2014) following the methodology by Molinero-Ruiz et al. (2014). Eight sunflower seedlings (replications) of the inbred line NR5, which is the differential for the race F (Molinero-Ruiz et al., 2015), were individually transferred into pots with 250 g of SSP uniformly infested with 10 mg of parasite seeds. Eight non inoculated plants were established as controls. Plants were grown in the glasshouse under the same conditions described above for 5 weeks.

Sunflower plants were watched for development of wilting symptoms caused by the infection by *O. cumana*, but no visible differences were detected in inoculated plants as compared to the controls. At the end of the experiment, each plant was removed from the soil and its root system was washed and air dried at room temperature. Then, roots were weighed and the number and weight of *O. cumana* tubercles attached to the roots were subsequently recorded using a stereoscope and a precision balance, respectively.

6.2.3. Blue-green fluorescence imaging

Blue-green fluorescence images were acquired sequentially with an Open FluorCamFC 800-O using UV (355 nm) excitation light. Images for F440 and F520 as well as images corresponding to the F440/F520 ratio were analysed with Fluorcam7 software (Photon Systems Instruments, Brno, Czech Republic) according to Pérez-Bueno et al. (2015). Nine images were captured during 18 s in order to obtain each averaged fluorescence image. Image size was 640×480 pixels with a resolution of 96 pixels per inch. Measurements were taken on attached and unshaded leaves and always at the same time of day. Two replicates (one from each blade) were considered in each leaf pair (LP). Numerical data from a representative area in each replicate were analysed.

The time span of BGF in healthy sunflower plants was determined by capturing images of the first four LPs each every 3-4 days from 2 to 5-weeks-old. For each measurement date, LPs were independently analysed, and between 6 and 8 replicates were considered for each of them.

Concerning the effect of *O. cumana* on the BGF emission of leaves of infected sunflower, measurements of F440 and F520, as well as those of F440/F520, F440/F680 and F440/F740, were acquired in all leaves of control and inoculated plants twice a week since they were 1 cm long until their complete expansion. Measurements were made during the V1 to V4 vegetative stages of the plants (Schneiter and Miller, 1981) and, at each point in time, leaves of the same developmental stage were compared.

6.2.4. Spectrophotometrical determination of pigments concentration in leaves

Total chlorophyll [Chl ($a+b$)] and carotenoids (xanthophylls and carotenes) [Car ($x+c$)] contents of parasitised sunflower were determined by spectrophotometry, and compared to those of the controls. Extractions were carried out on the second, third and fourth LP of the plants five weeks after

BGF and thermal imaging in the early detection of sunflower broomrape

inoculation (wai). From each LP blade, a 1 cm disk was punched, weighted and placed in vials containing liquid nitrogen. Disks were ground and photosynthetic pigments were extracted by adding 4 ml of 80% acetone (v/v). Absorbance at 470, 647 and 663 nm was measured from the resulting extracts with a Shimadzu UV-1800 spectrophotometer (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan). Concentrations of Chl *a*, Chl *b* and Car (*x+c*) were calculated according to Lichtenthaler and Buschmann (2001) and expressed as µg/g fresh leaf weight:

$$Chl_a \text{ (}\mu\text{g/ml)} = 12.25 A_{663.2} - 2.79A_{646.8}$$

$$Chl_b \text{ (}\mu\text{g/ml)} = 21.50 A_{646.8} - 5.10A_{663.2}$$

$$Car_{(x+c)} \text{ (}\mu\text{g/ml)} = (1000 A_{470} - 1.82 C_a - 85.02C_b)/198$$

The Chl (*a+b*)/Car (*x+c*) ratio was calculated according to Konanz et al. (2014).

6.2.5. Thermal imaging

Infrared images of leaves of inoculated and control sunflowers were taken using a FLIR A305sc camera (FLIR Systems, Wilsonville, Oregon, USA) that operates in the 7.5–13.5 µm wavelength range and has a thermal sensitivity <0.05°C at +30°C and accuracy of ±2°C. The thermal camera was vertically positioned at approximately 0.3 m from the canopy and produced images of 320 × 240 pixels, with a viewing field of 45°. Digital video data were analysed by the Research & Development software by FLIR.

Images were taken twice a week, from 2 and until 5 wai. At each time point, all fully developed leaves in control and in inoculated plants were measured. Measurements were performed on attached and unshaded leaves at the same time of day. Two hours before each measurement time, inoculated and control plants were moved from the glasshouse to a growth chamber in order to avoid glasshouse thermal fluctuations.

Digital colour (RGB) images (2048 × 1536 pixels) were obtained simultaneous to the thermal images. One representative area in the midsection of each leaf was selected for the analysis after comparison of thermal and RGB images.

6.2.6. Data processing statistics

Data of the spatial distribution and time span of BGF on healthy sunflower were analysed as means and their corresponding standard errors. When *O. cumana* was inoculated to sunflower, BGF emission, pigments concentration, leaf temperature and broomrape incidence [BI, transformed according to $\sqrt{BI + 0.5}$] were statistically analyzed. The experiment was set up as a completely randomized design and was conducted twice. Similarity between repetitions was tested by analysis of variance (ANOVA) with repetitions as blocks. Since no significant differences were found, the data were pooled. When, after ANOVA, differences of any of the considered variables between inoculated and control plants were significant, mean values were compared by Fisher's protected Least Significant Difference tests ($P = 0.05$). STATISTIX 8.0 software (Analytical software, Tallahassee, FL, USA) was used for all the analyses.

6.3. RESULTS

6.3.1. Blue-green fluorescence emission in healthy sunflower plants

A clear increase in the intensity of F440 and F440/F520 was observed in the first LP during its expansion and development. A similar trend was also observed in the case of the second LP in both parameters from the third week onwards. Values of F440 and F440/F520 of the two upper LPs evolved similarly to those of the lower LPs along the time, although smaller increases were observed in the third and fourth LP throughout the measurement period. By contrast, and with the exception of a slight increase in the F520 signal in the first LP, that of the rest of leaves remained fairly constant throughout the experiment, and even a decrease was detected in the second LP in the last week (Fig. 6.1).

BGF and thermal imaging in the early detection of sunflower broomrape

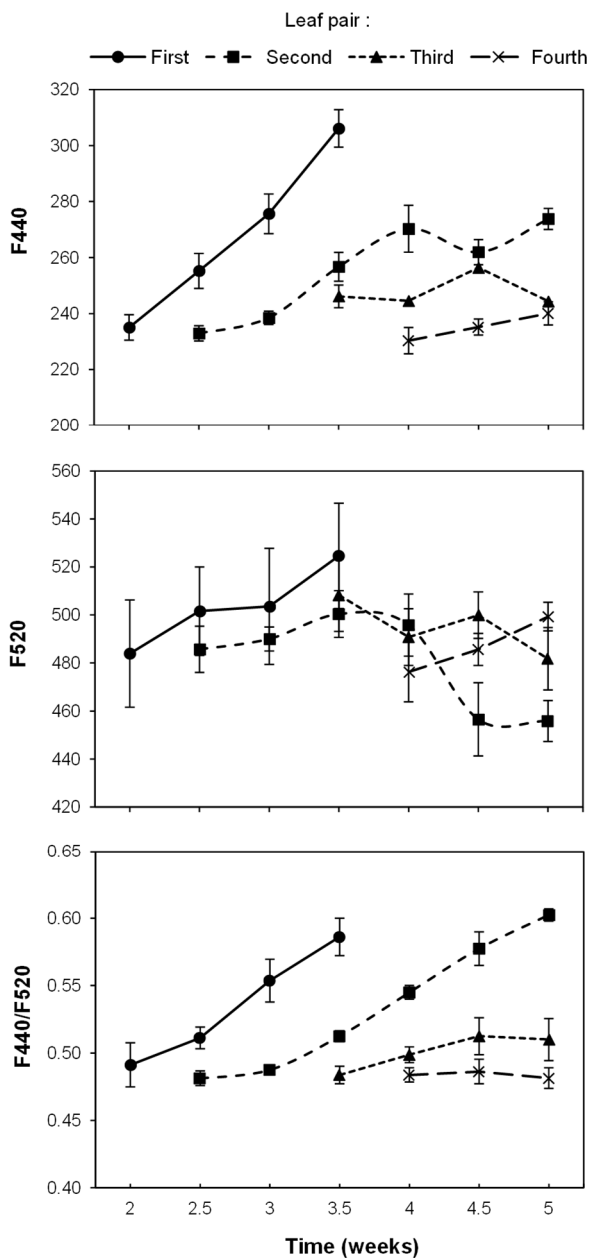


Figura 6.1. Progress of blue-green fluorescence emission of the first, second, third and fourth pair of true leaves of a healthy sunflower plant. Error bars represent the standard error of the mean of 8 replications. Time is expressed as weeks after transplanting.

6.3.2. Effect of *O. cumana* on BGF emission of sunflower

The effect of the infection of sunflower by *O. cumana* on the BGF emission of leaves was examined by comparison with that of leaves from the control plants at five moments during the 3 week period, and is presented in Figure 6.2.

A significantly lower fluorescence at 440 nm was consistently detected in parasitised plants throughout the experiment. Initially, leaves showed lower values of F440 than those at the end of the experiment, in both inoculated and control sunflowers (Fig. 6.2A). Similarly, the F520 values in young leaves were significantly decreased by the parasite attack. As with F440, leaves of inoculated plants had lower F520, although F520 of older leaves did not significantly differ from that of the controls (Fig. 6.2B).

Concerning the F440/F520 ratio, significant decreases were obtained in up to 14-day-old leaves of infected plants as compared to leaves from healthy plants. A progressive increase in F440/F520 ratio was evident in leaves of inoculated and control sunflowers throughout the experiment, although no significant differences were found between treatments in the two last measurements (Fig. 6.2C).

On the other hand, the effect of the inoculation by *O. cumana* was also observed in the F440/F680 emission, being this fluorescence variable significantly low in 8 to 14-day-old leaves of parasitised sunflowers. Higher F440/F680 ratios were obtained in older leaves of inoculated plants, although differences with those in leaves of the control plants were not significant (Fig. 6.2D). Similar results were obtained in the case of the F440/F740 ratio, young leaves of inoculated plants presenting significantly lower values than those of the control plants. When leaves were older than 14 days, the F440/F740 ratio was higher in the inoculated sunflowers, but no significant differences were found (data not shown).

BGF and thermal imaging in the early detection of sunflower broomrape

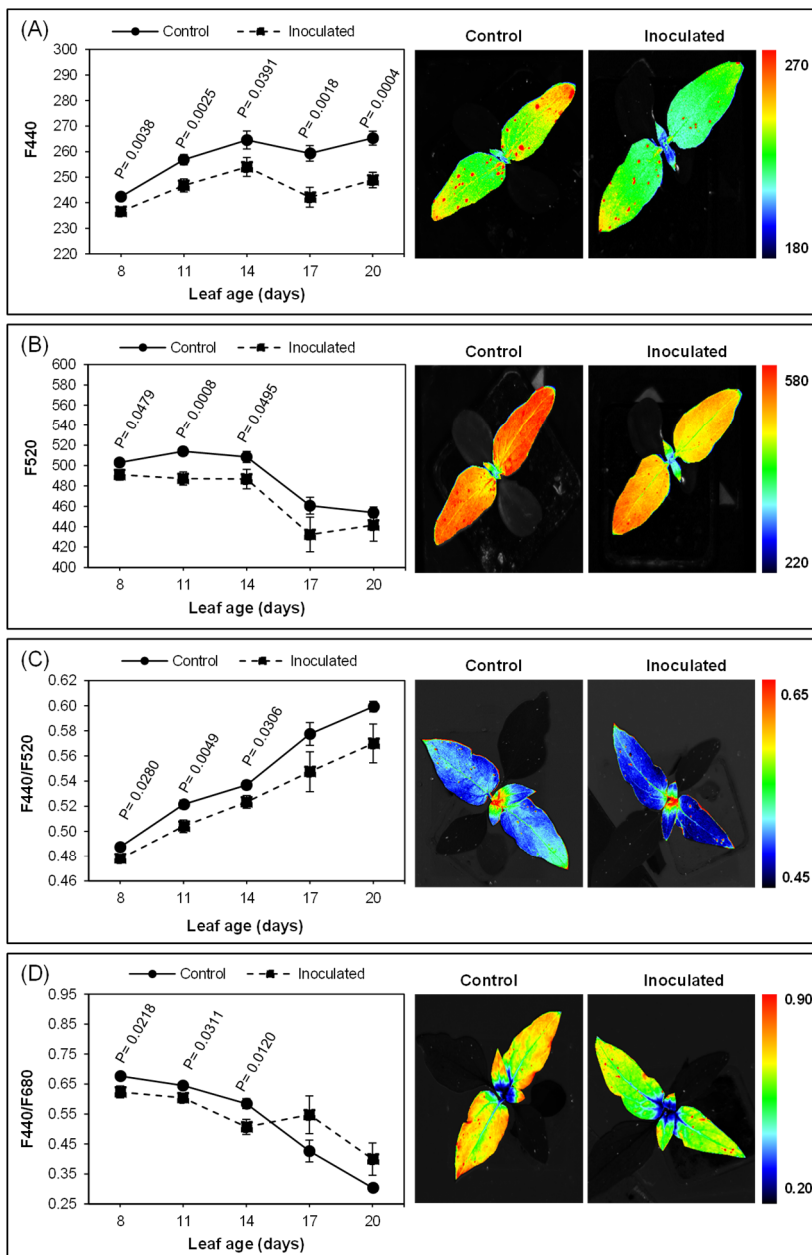


Figure 6.2. Time-course of multicolor fluorescence emission of *Orobancha cumana*-inoculated sunflower plants and non-inoculated (control) plants throughout leaf development. Mean measurements of F440 (A), F520 (B), F440/F520 (C) and F440/F680 (D) of leaves and representative fluorescence images of 8 day-old leaves. Vertical bars represent the standard error of means of 14-48 replications. Analyses of variance at $P < 0.05$ between inoculated and control plants were conducted and values of significance are shown.

6.3.3. Carotenoids and total chlorophyll contents in sunflower leaves upon infection by *O. cumana*

The effect of the inoculation by *O. cumana* on chlorophyll and carotenoids contents at the end of the experiment is presented in Table 6.1. As previously observed by our research group (Ortiz-Bustos et al., 2016a), significant differences of chlorophyll content occurred in sunflower plants upon inoculation with *O. cumana*. Conversely, on the second and third LPs, no significant differences in either the carotenoids content or the chlorophyll/carotenoids ratio were detected between inoculated and control plants. Significantly lower values of both variables were obtained in the fourth LP of inoculated plants (203.20 µg/g and 5.07 for total carotenoids and for the chlorophyll/carotenoids ratio, respectively) compared with those in the same LP of healthy plants (274.30 µg/g and 5.80 for total carotenoids and for the chlorophyll/carotenoids ratio, respectively) (Table 6.1).

Table 6.1. Measurements of pigments concentration (chlorophyll content, carotenoids content and chlorophyll/carotenoids ratio) for the second, third and fourth LP of sunflower plants inoculated with *Orobancha cumana* (I) and control plants (C) at 5 weeks after inoculation. Chlorophyll and carotenoids (xanthophylls and carotenes) content is expressed as content of chlorophyll *a* and *b* [Chl (*a+b*)], and [Car (*x+c*)] respectively, and chlorophyll/carotenoids ratio is expressed as Chl (*a+b*)/Car (*x+c*)

Pigments Concentration	Treatment	Leaf pair (LP)		
		2 nd	3 rd	4 th
Chl (<i>a+b</i>)/ Fw (µg/g fresh weight)	C	1359.50 ± 56.58 ^a	1443.90 ± 51.90	1442.00 ± 101.04
	I	1548.60 ± 63.53	1515.90 ± 94.95	1028.40 ± 67.51
	<i>P</i> ^b	0.0462	0.5184	0.0052
Car (<i>x+c</i>)/ Fw (µg/g fresh weight)	C	239.96 ± 8.24	244.74 ± 15.84	274.30 ± 19.40
	I	263.57 ± 16.01	257.71 ± 22.38	203.20 ± 12.13
	<i>P</i> ^b	0.2141	0.6434	0.0091
Chl (<i>a+b</i>)/ Car (<i>x+c</i>)	C	5.92 ± 0.11	6.00 ± 0.17	5.80 ± 0.11
	I	5.93 ± 0.16	5.75 ± 0.22	5.07 ± 0.17
	<i>P</i> ^b	0.9656	0.3897	0.0034

^a Mean ± standard error (SE), n=7-8.

^b Level of significance of differences in the variables between control and inoculated plants obtained after analyses of variance according to a completely randomized statistical design.

6.3.4. Effect of *O. cumana* on the temperature of sunflower leaf

Figure 6.3 shows the progress over time of the average leaf temperature of the inoculated and control plants.

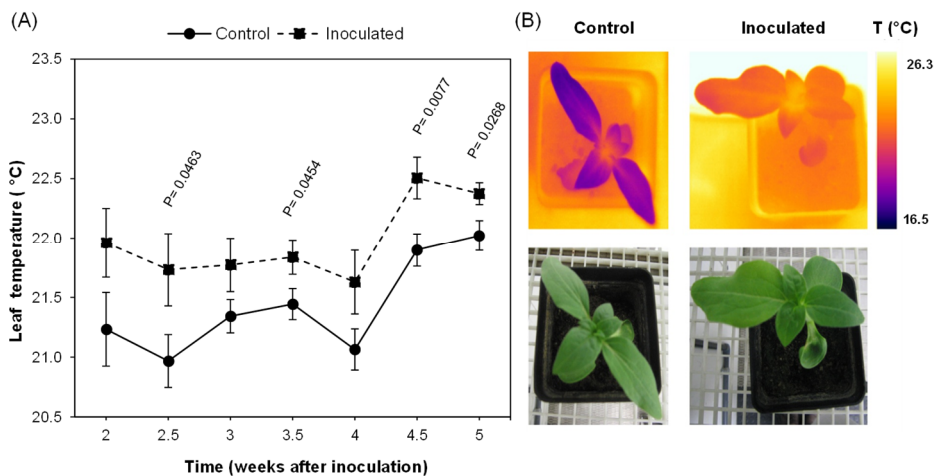


Figure 6.3. Temperature progress of leaves of *Orobancha cumana*-inoculated sunflower plants and non-inoculated (control) plants. (A) Mean measurements of leaf temperature of both treatments. Vertical bars represent the standard error of means of 16-45 replications. Time is expressed as weeks after inoculation. (B) RGB and thermal images of the first two leaf pairs of inoculated and control plants 2.5 weeks after inoculation.

Leaves of inoculated sunflowers were warmer than those of the controls at all the measurement dates. Significant temperature increases were observed 2.5 wai and persisted until the end of the experiment (5 wai) with the exception of measurements at 3 and 4 wai. Differences of leaf temperature ranged from 0.4 to 0.8 °C at 5 and 2.5 wai respectively (Fig. 6.3).

Leaf temperature showed an irregular time course irrespective whether the plants were inoculated or not, although a similar trend was observed in both situations. Thus, leaf temperature remained fairly constant during the two first weeks until 4 wai, when a clear increase was observed in the inoculated and also in the control leaves of sunflower (0.8 and 0.9°C respectively).

6.3.5. Assessment of the infection of *O. cumana* in sunflower

Parasitised sunflowers reached the same growth stage than the controls. No symptoms (i.e. wilting) due to *O. cumana* were observed in aboveground parts of the plants throughout the experiment. Nonetheless, the infection was confirmed by tubercle formation in roots of inoculated sunflowers at the end of the experiment.

Table 6.2. Effect of *Orobanche cumana* infection on roots of sunflower and on the development of parasite tubercles 5 weeks after inoculation

Treatment	Root fresh weight (g)	Tubercle fresh weight (g/plant)	No. tubercles per sunflower plant
C	1.511 ± 0.265 ^a	0 ± 0.000	0 ± 0.000
I	1.163 ± 0.176	0.2932 ± 0.115	17.38 ± 4.132
<i>P</i> ^b	0.2926		

^a Mean ± standard error, n=8.

^b Level of significance of differences of root fresh weight between control (C) and inoculated (I) plants obtained after analysis of variance according to a completely randomized statistical design.

Although no significant differences in root weight were observed between inoculated and control plants, up to 0.29 g and 17 tubercles per plant were recorded in inoculated sunflowers. Tubercles were absent in the controls (Table 6.2).

6.4. DISCUSSION

Our results showed that the BGF emission of individual LPs of healthy sunflower increases in time. Besides, the BGF emission depends on leaf development: the same pattern of the blue-green signal emitted by a LP (i.e. the first LP) until its complete expansion was presented, one week later, by the following LP (i.e. the second LP). An increase of BGF of leaves throughout their elongation was observed in wheat by Meyer et al. (2003), who proposed BGF as a signature of leaf ageing. Indeed, ageing of leaf implies transition from source to sink

BGF and thermal imaging in the early detection of sunflower broomrape

tissue by diversion of carbon from primary to secondary metabolism. On the other hand, different BGF emissions in artichoke leaves with age were also observed by Morales et al. (2005), although old leaves emitted lower BGF than young ones. Interestingly, although in most plant species ferulic acid is the major blue-green fluorophore (Morales et al., 1996), in the case of sunflower there is no ferulic acid bound to cell walls. Small amounts of caffeic acid and trichome secretions (e.g. sesquiterpenes lactones and coumarins) have been described as blue-green fluorophores in sunflower (Spring and Schilling, 1989; Olson and Roseland, 1991; Morales et al., 1996; Lichtenthaler and Schweiger, 1998; Tourvieille de Labrouhe et al., 1997; Rowe et al., 2012). These compounds could be responsible for BGF emission in our experiments. In fact, the coumarins content in sunflowers grown under optimal non-limiting conditions tends to be very low, thus their presence can be considered as a good marker of a stress event (Prats- Perez et al., 2000).

Apart from monitoring plant physiological status in response to growth, BGF has been successfully used to detect nutrient deficiencies (McMurtrey et al., 1996 ; Cadet and Samson, 2011), water and temperature stress (Lang et al., 1996; Hura et al., 2007), pathogen attack (Granum et al., 2015) and a simultaneous combination of stress events (Bürling et al., 2011). Preliminary studies by our group proved the potential of BGF to discriminate *O. cumana* infection in sunflower plants at early stages (3 wai) (Pérez-Bueno et al., 2014). The present findings allow us to distinguish infected from non-infected sunflowers one week earlier by means of decreases in F440 and F520 emissions, as well as by lower values of the F440/F520, F440/F680 and F440/F740 ratios. Spectral features of BGF and their intensity ratios have been investigated not only for their diagnosis value, but also for understanding the physiological changes that take place during stress development (Buschmann and Lichtenthaler, 1998). Our BGF imaging results suggest that *O. cumana* alters the secondary metabolism of sunflower, e.g. accumulation of caffeic acid and coumarins. Furthermore, the spectrophotometric pigment quantification provided evidence of decreased contents of carotenoids in leaves of infected plants as compared to those of the controls in agreement with the results by Shen et al. (2013) on *Mikania micrantha* infected by *Cuscuta campestris*. Many secondary metabolites are not only major contributors to specific odours, tastes, and colours of plants, but they also play a key role in defence against

herbivores and pathogens (Berger et al., 2007; Wink, 2010; Ouzounis et al., 2015). Coumarins are excreted by roots of sunflowers with resistance to the parasite (Serghini et al, 2001), as well as other toxic (Zélicourt et al. 2007) and phenolic (Echevarría-Zomeño et al., 2006) compounds, all of them having a defensive role against *O. cumana*.

Since the F440/F520 ratio is affected by chlorophyll content (Stober and Lichtenthaler, 1992; Morales et al., 1994), decreases upon infection by *O. cumana* suggest that a lower content of chlorophyll is present in leaves. Recent findings by our research group also suggested that, when sunflowers are infected by *O. cumana*, the chlorophyll content in young leaves is decreased (Ortiz-Bustos et al., 2016a). Reductions in chlorophyll content are also induced by *O. foetida* attack on chickpea (*Cicer arietinum* L.) (Nefzi et al., 2016) and by *C. australis* infection on *M. micrantha* (Le et al., 2015). Our results also support the value of the fluorescence ratios F440/F680 and F440/F740 as very early stress indicators (Lichtenthaler and Miehe, 1997; Buschmann and Lichtenthaler, 1998; Buschmann et al., 2000). Low values of these ratios during early stages of the infection of sunflower may not only be due to decreased F440 and F520 emission in leaves, but also to higher F680 and F740 signals (Ortiz-Bustos et al., 2016a). Beyond that, our findings show that BGF and its intensity ratios with chlorophyll bands could be used, in addition to directly detecting *O. cumana* in sunflower, as an indirect approach to the alteration of plant photosynthesis and to the impairment of the secondary metabolism as a result of parasite infection.

The applicability of thermal infrared imaging in determining plant temperature as an early response to biotic or abiotic stresses is widely documented and a topic of hectic research activity (Nilsson, 1995; Chaerle and Van Der Straeten, 2001; Raza et al., 2014; Baranowski et al., 2015; Grant et al., 2016; Mahlein, 2016; Mangus et al., 2016). In this work we observed increases in leaf temperature of parasite infected sunflower from 2 to 5 wai. Recently, increases in canopy temperature allowed the detection of late wilt disease caused by the soilborne fungus *Harpophora maydis* up to 17 days earlier than symptoms development in maize (Ortiz-Bustos et al., 2016b). Also, significant increases in crown temperature have allowed the differentiation of olive trees infected by *Verticillium dahliae* in the

field (Calderón et al., 2013). Leaf thermal increases are closely related to reduced transpiration rates due to either activation of stomatal closure or inhibition of stomatal opening. Previous studies revealed that *Orobancha ramosa* and *C. campestris* parasitism reduced stomatal conductance and transpiration rate and, consequently, slowed down host photosynthesis and host growth (Mauromicale et al., 2008; Chen et al., 2011). The effects of parasite-induced stomatal closure and transpiration reduction on the decreased development of sunflower (Alcántara et al., 2006) should be investigated in the future. To the best of our knowledge, this work constitutes the first approach to the diagnosis of parasite infection in crops by means of thermal imaging and could be further implemented in field conditions.

Although the damage done by broomrape species to crops is directly attributed to parasitic sink activity (Barker et al., 1996; Manschadi et al., 1996; Hibberd et al., 1998; Draie et al., 2011; Péron et al., 2012), our results have evidenced that, in the *O. cumana* – sunflower interaction, the damage might extend beyond assimilate diversion. Many parasitic angiosperms display a pathogenic nature promoting disease in the crop mainly through negative effects on the photosynthesis, physiology and hormonal balance of the host (Stewart and Press, 1990; Watling and Press, 2001; Mauromicale et al., 2008). The present work provides valuable and essential clues towards the understanding of the processes by which *O. cumana* seems not only to cause changes in sunflower secondary metabolism but also to alter its photosynthetic capacity and unbalance its carbohydrate metabolism. Nevertheless, additional research will be required to clarify how both physiological processes are affected.

Conclusion

The outstanding significance of our BGF imaging and thermography results, from a diagnosis point of view, is that the establishment of a soilborne pathogen (*O. cumana*) in a below-ground organ (root) of the plant can be detected prior to the development of visual symptoms in far distant and above-ground organs (leaves). Diagnostic fluorescence and thermal signals are related to host physiology alterations upon infection, and continuous measurements for long periods of time are possible. Therefore, these techniques enable not only the

detection of stress onset by *O. cumana*, but also the monitoring of its development in sunflower over time, providing an additional tool for basic research about holoparasite-host plant interactions. Finally, and as a useful outcome of this work, a fast phenotyping of sunflower lines could be achieved by means of the implementation of BGF imaging and thermography in breeding programmes for resistance to *O. cumana*.

6.5. ACKNOWLEDGMENTS

Financial support for this research was provided by “Consejería de Economía, Innovación y Ciencia” of the Andalusian Government (P12-AGR1281 to LM-R and P12-AGR370 to MB) and the European Social Fund, and RECUPERA 2020 (grant number 20134R060 to MB) and FEDER Funds.

6.6. REFERENCES

- Alcántara, E., Morales-García, M., and Díaz-Sánchez, J. (2006). Effects of broomrape parasitism on sunflower plants: growth, development, and mineral nutrition. *J. Plant Nutr.* 29, 1199-1206. doi: 10.1080/01904160600767351
- Baranowski, P., Jedryczka, M., Mazurek, W., Babula-Skowronska, D., Siedliska, A., and Kaczmarek, J. (2015). Hyperspectral and thermal imaging of oilseed rape (*Brassica napus*) response to fungal species of the genus *Alternaria*. *PLoS One* 10:e0122913. doi:10.1371/journal.pone.0122913
- Barker, E.R., Press, M.C., Scholes, J.D., and Quick, W.P. (1996). Interactions between the parasitic angiosperm *Orobanche aegyptiaca* and its tomato host: growth and biomass allocation. *New Phytol.* 133, 637-642. doi: 10.1111/j.1469-8137.1996.tb01932.x
- Berger, S., Sinha, A.K., and Roitsch, T. (2007). Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *J. Exp. Bot.* 58, 4019-4026. doi: 10.1093/jxb/erm298
- Bürbling, K., Hunsche, M., and Noga, G. (2011). Use of blue-green and chlorophyll fluorescence measurements for differentiation between nitrogen deficiency and pathogen infection in winter wheat. *J. Plant Physiol.* 168, 1641-1648. doi: 10.1016/j.jplph.2011.03.016

BGF and thermal imaging in the early detection of sunflower broomrape

Buschmann, C., and Lichtenthaler, H.K. (1998). Principles and characteristics of multicolour fluorescence imaging of plants. *J. Plant Physiol.* 152, 297-314. doi: 10.1016/S0176-1617(98)80144-2

Buschmann, C., Langsdorf, G., and Lichtenthaler, H.K. (2000) Imaging of the blue, green and red fluorescence emission of plants: An overview. *Photosynthetica* 38, 483-491. doi: 10.1023/A:1012440903014

Cadet, É., and Samson, G. (2011). Detection and discrimination of nutrient deficiencies in sunflower by blue-green and chlorophyll-*a* fluorescence imaging. *J. Plant Nutr.* 34, 2114-2126. doi: 10.1080/01904167.2011.618572

Calderón, R., Navas-Cortés, J.A., Lucena, C., and Zarco-Tejada, P.J. (2013). High-resolution airborne hyperspectral and thermal imagery for early detection of *Verticillium* wilt of olive using fluorescence, temperature and narrow-band spectral indices. *Remote Sens. Environ.* 139, 231-245. doi: 10.1016/j.rse.2013.07.031

Cerovic, Z.G., Samson, G., Morales, F., Tremblay, N., and Moya, I. (1999). Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. *Agronomie* 19, 543-578. doi: 10.1051/agro:19990701

Chaerle, L., and Van Der Straeten, D. (2000). Imaging techniques and the early detection of plant stress. *Trends Plant Sci.* 5, 495-501. doi: 10.1016/S1360-1385(00)01781-7

Chaerle, L., and Van Der Straeten, D. (2001). Seeing is believing: imaging techniques to monitor plant health. *Biochim. Biophys. Acta-Gene Struct. Expression* 1519, 153-166. doi: 10.1016/S0167-4781(01)00238-X

Chaerle, L., Lenk, S., Hagenbeek, D., Buschmann, C., and Van Der Straeten, D. (2007). Multicolor fluorescence imaging for early detection of the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *J. Plant Physiol.* 164, 253-262. doi: 10.1016/j.jplph.2006.01.011

Chen, H., Shen, H., Ye, W., Cao, H., and Wang, Z. (2011). Involvement of ABA in reduced photosynthesis and stomatal conductance in *Cuscuta campestris*—*Mikania micrantha* association. *Biol. Plant.* 55, 545-548. doi: 10.1007/s10535-011-0122-7

Draie, R., Péron, T., Pouvreau, J.B., Véronési, C., Jégou, S., Delavault, P., et al. (2011). Invertases involved in the development of the parasitic plant *Phelipanche ramosa*: characterization of the dominant soluble acid isoform, PrSAI1. *Mol. Plant Pathol.* 12, 638-652. doi: 10.1111/J.1364-3703.2010.00702.X

Eaton, F.M., and Belden, G.O. (1929). Leaf temperatures of cotton and their relation to transpiration, varietal differences, and yields. *U.S.D.A Technical Bulletin* 91, 1-39.

Echevarría-Zomeño, S., Pérez-de-Luque, A., Jorrín, J., and Maldonado, A.M. (2006). Pre-haustorial resistance to broomrape (*Orobanche cumana*) in sunflower (*Helianthus annuus*): cytochemical studies. *J. Exp. Bot.* 57, 4189-4200. doi:10.1093/jxb/erl195

FAOSTAT (2016). Available at:

<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#anchor>,

accessed December 3, 2016.

Fernández-Aparicio, M., Reboud, X., and Gibot-Leclerc, S. (2016). Broomrape weeds. underground mechanisms of parasitism and associated strategies for their control: a review. *Front. Plant Sci.* 7:135. doi: 10.3389/fpls.2016.00135

Fernández-Martínez, J.M., Pérez-Vich, B., and Velasco, L. (2015). “Sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.)”, in: *Sunflower Oilseed. Chemistry, Production, Processing and Utilization*, eds. E. Martínez-Force, N.T. Dunford, J.J. Salas (Champaign, IL (USA): AOCS Press), 129-156.

García-Carneros, A.B., Dedic, B., Miladinovic, D., and Molinero-Ruiz, L. (2014). “Pathogenic comparison of highly virulent *O. cumana* affecting sunflower in Moldova, the South of Russian Federation, Serbia and Spain”, in: *Proceedings of the Third International Symposium of Orobanchae spp. of Sunflower*, ed. International Sunflower Association (Paris: International Sunflower Association), 173-177.

Gitelson, A.A., Buschmann, C., and Lichtenthaler, H.K. (1998). Leaf chlorophyll fluorescence corrected for re-absorption by means of absorption and reflectance measurements. *J. Plant Physiol.* 152, 283-296. doi: 10.1016/S0176-1617(98)80143-0

Grant, O.M., Ochagavía, H., Baluja, J., Diago, M., and Tardáguila, J. (2016). Thermal imaging to detect spatial and temporal variation in the water status of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *J. Horticult. Sci. Biotechnol.* 91, 43-54. doi: 10.1080/14620316.2015.1110991

Granum, E., Pérez-Bueno, M.L., Calderón, C.E., Ramos, C., de Vicente, A., Cazorla, F.M., et al. (2015). Metabolic responses of avocado plants to stress induced by *Rosellinia necatrix* analysed by fluorescence and thermal imaging. *Eur. J. Plant Pathol.* 142, 625-632. doi: 10.1007/s10658-015-0640-9

Hibberd, J.M., Quick, W.P., Press, M.C., and Scholes, J.D. (1998). Can source-sink relations explain responses of tobacco to infection by the root holoparasitic angiosperm *Orobanche cernua*?. *Plant Cell Environ.* 21, 333-340. doi: 10.1046/j.1365-3040.1998.00272.x

BGF and thermal imaging in the early detection of sunflower broomrape

Hura, T., Hura, K., Grzesiak, M., and Rzepka, A. (2007). Effect of long-term drought stress on leaf gas exchange and fluorescence parameters in C3 and C4 plants. *Acta Physiol. Plant.* 29, 103-113. doi: 10.1007/s11738-006-0013-2

Jackson, R.D., Reginato, R.J., and Idso, S.B. (1977). Wheat canopy temperature: A practical tool for evaluating water requirements. *Water Resour. Res.* 13, 651-656. doi: 10.1029/WR013i003p00651

Kautz, B., Noga, G., and Hunsche, M. (2014). Controlled long-term water deficiency and its impact on the fluorescence emission of tomato leaves during stress and re-watering. *Eur. J. Hort. Sci.* 79, 60-69.

Konanz, S., Kocsányi, L., and Buschmann, C. (2014). Advanced multi-color fluorescence imaging system for detection of biotic and abiotic stresses in leaves. *Agriculture* 4, 79-95. doi: 10.3390/agriculture4020079

Lang, M., Lichtenthaler, H.K., Sowinska, M., Heisel, F., and Miehe, J.A. (1996). Fluorescence imaging of water and temperature stress in plant leaves. *J. Plant Physiol.* 148, 613-621. doi: 10.1016/S0176-1617(96)80082-4

Le, Q.V., Tennakoon, K.U., Metali, F., Lim, L.B., and Bolin, J.F. (2015). Impact of *Cuscuta australis* infection on the photosynthesis of the invasive host, *Mikania micrantha*, under drought condition. *Weed Biol. Manag.* 15, 138-146. doi: 10.1111/wbm.12077

Lenthe, J.H., Oerke, E.C., and Dehne, H.W. (2007). Digital infrared thermography for monitoring canopy health of wheat. *Precis. Agric.* 8, 15-26. doi: 10.1007/s11119-006-9025-6

Leuzinger, S., and Korner, C. (2007). Tree species diversity affects canopy leaf temperatures in a mature temperate forest. *Agric. For. Meteorol.* 146, 29-37. doi: 10.1016/j.agrformet.2007.05.007

Lichtenthaler, H.K., and Miehe, J.A. (1997). Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends Plant Sci.* 2, 316-320. doi: 10.1016/S1360-1385(97)89954-2

Lichtenthaler, H.K., and Schweiger, J. (1998). Cell wall bound ferulic acid, the major substance of the blue-green fluorescence emission of plants. *J. Plant Physiol.* 152, 272-282. doi: 10.1016/S0176-1617(98)80142-9

Lichtenthaler, H.K., and Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, (Supplement 1) F4.3.1-F4.3.8. doi: 10.1002/0471142913.faf0403s01

- Lindenthal, M., Steiner, U., Dehne, H. W., and Oerke, E. C. (2005). Effect of downy mildew development on transpiration of cucumber leaves visualized by digital infrared thermography. *Phytopathology* 95, 233-240. doi: 10.1094 / PHYTO-95-0233
- Mahlein, A.K. (2016). Plant disease detection by imaging sensors - parallels and specific demands for precision agriculture and plant phenotyping. *Plant Dis.* 100, 241-251. doi: 10.1016/S1360-1385(97)89954-2
- Mangus, D.L., Sharda, A., and Zhang, N. (2016). Development and evaluation of thermal infrared imaging system for high spatial and temporal resolution crop water stress monitoring of corn within a greenhouse. *Comput. Electron. Agric.* 121, 149-159. doi: 10.1016/j.compag.2015.12.007
- Manschadi, A.M., Kroschel, J., and Sauerborn, J. (1996). Dry matter production and partitioning in the host-parasite association *Vicia faba-Orobanche crenata*. *Angew Bot.* 70, 224-229.
- Mauromicale, G., Monaco, A.L., and Longo, A.M. (2008). Effect of branched broomrape (*Orobanche ramosa*) infection on the growth and photosynthesis of tomato. *Weed Sci.* 56, 574-581. doi: 10.1614/WS-07-147.1
- McMurtrey, J.E., Chappelle, E.W., Kim, M.S., Corp, L.A., and Daughtry, C.S. (1996). Blue-green fluorescence and visible-infrared reflectance of corn (*Zea mays* L.) grain for *in situ* field detection of nitrogen supply. *J. Plant Physiol.* 148, 509-514. doi: 10.1016/S0176-1617(96)80069-1
- Meyer, S., Cartelat, A., Moya, I., and Cerovic, Z.G. (2003). UV-induced blue-green and far-red fluorescence along wheat leaves: a potential signature of leaf ageing. *J. Exp. Bot.* 54, 757-769. doi: 10.1093/jxb/erg063
- Molinero-Ruiz, L., García-Carneros, A.B., Collado-Romero, M., Raranciuc, S., Domínguez, J., and Melero-Vara, J.M. (2014). Pathogenic and molecular diversity in highly virulent populations of the parasitic weed *Orobanche cumana* (sunflower broomrape) from Europe. *Weed Res.* 54, 87-96. doi: 10.1111/wre.12056
- Molinero-Ruiz, L., Delavault, P., Pérez-Vich, B., Pacureanu-Joita, M., Bulos, M., Altieri, E., et al. (2015). History of the race structure of *Orobanche cumana* and the breeding of sunflower for resistance to this parasitic weed: A review. *Span. J. Agric. Res.* 13: e10R01. doi: 10.5424/sjar/2015134-8080
- Morales, F., Cerovic, Z.G., and Moya, I. (1994). Characterization of blue-green fluorescence in the mesophyll of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves affected by iron deficiency. *Plant Physiol.* 106, 127-133. doi: 10.1104/pp.106.1.127

BGF and thermal imaging in the early detection of sunflower broomrape

Morales, F., Cerovic, Z.G., and Moya, I. (1996). Time resolved blue-green fluorescence of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves: Spectroscopic evidence for the presence of ferulic acid as the main fluorophore in the epidermis. *BBA Bioenergetics* 1273, 251-262. doi: 10.1016/0005-2728(95)00153-0

Morales, F., Cartelat, A., Alvarez-Fernández, A., Moya, I., and Cerovic, Z.G. (2005). Time-resolved spectral studies of blue-green fluorescence of artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *Scolymus*) leaves: identification of chlorogenic acid as one of the major fluorophores and age-mediated changes. *J. Agric. Food Chem.* 53, 9668-9678. doi: 10.1021/jf051842q

Nefzi, F., Trabelsi, I., Amri, M., Triki, E., Kharrat, M., and Abbes, Z. (2016). Response of some chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes to *Orobanche foetida* Poir. parasitism. *Chil. J. Agric. Res.* 76, 170-178. doi: 10.4067/S0718-58392016000200006

Nilsson, H.E. (1995). Remote sensing and image analysis in plant pathology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 15, 489-527. doi: 10.1146/annurev.py.33.090195.002421

Olson, M.M., and Roseland, C.R. (1991). Induction of the coumarins scopoletin and ayapin in sunflower by insect-feeding stress and effects of coumarins on the feeding of sunflower beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environ. Entomol.* 20, 1166-1172. doi: 10.1093/ee/20.4.1166

Ortiz-Bustos, C.M., Pérez-Bueno, M., Barón, M., and Molinero-Ruiz, L. (2016a). Fluorescence imaging in the red and far-red region during growth of sunflower plantlets. Diagnosis of the early infection by the parasite *Orobanche cumana*. *Front. Plant Sci.* 7:884. doi: 10.3389/fpls.2016.00884

Ortiz-Bustos, C.M., Testi, L., García-Carneros, A.B., and Molinero-Ruiz, L. (2016b). Geographic distribution and aggressiveness of *Harpophora maydis* in the Iberian Peninsula, and thermal detection of maize late wilt. *Eur. J. Plant Pathol.* 144, 383-397. doi: 10.1007/s10658-015-0775-8

Ouzounis, T., Rosenqvist, E., and Ottosen, C.O. (2015). Spectral effects of artificial light on plant physiology and secondary metabolism: a review. *Hortscience* 50, 1128-1135.

Pérez-Bueno, M.L., Barón, M., Garcia-Carneros, A.B., and Molinero-Ruiz, L. (2014). Diagnosis of the infection of sunflower by *Orobanche cumana* using multicolour fluorescence imaging. *Helia* 37, 161-174. doi: 10.1515/helia-2014-0015

Pérez-Bueno, M.L., Pineda, M., Díaz-Casado, E. and Barón, M. (2015). Spatial and temporal dynamics of primary and secondary metabolism in *Phaseolus vulgaris*

challenged by *Pseudomonas syringae*. *Physiol. Plantarum* 153, 161-174. doi: 10.1111/ppl.12237

Péron, T., Véronési, C., Mortreau, E., Pouvreau, J.B., Thoiron, S., Leduc, N., et al. (2012). Role of the sucrose synthase encoding PrSus1 gene in the development of the parasitic plant *Phelipanche ramosa* L. (Pomel). *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25, 402-411. doi: 10.1094/MPMI-10-11-0260

Prats-Perez, E., Bazzalo, M.E., León, A., and Jorrín-Novó, J. V. (2000). Agronomic aspects of the sunflower 7-hydroxylated simple coumarins. *Helia* 23, 105-112.

Raza, S.E.A., Smith, H.K., Clarkson, G.J.J., Taylor, G., Thompson, A.J., Clarkson, J., et al. (2014). Automatic detection of regions in spinach canopies responding to soil moisture deficit using combined visible and thermal imagery. *PLoS One* 9:e97612. doi: 10.1371/journal.pone.0097612

Rowe, H.C., Ro, D.K., and Rieseberg, L.H. (2012). Response of sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaf surface defenses to exogenous methyl jasmonate. *PLoS One* 7:e37191. doi: 10.1371/journal.pone.0037191

Schneider, A.A., and Miller, J.F. (1981). Description of sunflower growth stages. *Crop Sci.* 21, 901-903. doi: 10.2135/cropsci1981.0011183X002100060024x

Serghini, K., Pérez-de-Luque, A., 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. *J. Exp. Bot.* 52, 2227-2234. doi: 10.1093/jexbot/52.364.2227

Shen, H., Xu, S.J., Hong, L., Wang ZM, and Ye, W.H. (2013). Growth but not photosynthesis response of a host plant to infection by a holoparasitic plant depends on nitrogen supply. *PLoS One* 8: e75555. doi: 10.1371/journal.pone.0075555

Spring, O., and Schilling, E.E. (1989). Chemosystematic investigation of the annual species of *Helianthus* (Asteraceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 17, 519-528. doi: 10.1016/0305-1978(89)90094-X

Stewart, G.R., and Press, M.C. (1990). The physiology and biochemistry of parasitic angiosperms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41, 127-151. doi: 10.1146/annurev.pp.41.060190.001015

Stober, F., and Lichtenthaler, H.K. (1992). Changes of the laser-induced blue, green and red fluorescence signatures during greening of etiolated leaves of wheat. *J. Plant Physiol.* 140, 673-680. doi: 10.1016/S0176-1617(11)81022-9

Tourvieille de Labrouhe, D., Mondolot-Cosson, L., Walser, P., Andary, C., and Serieys, H. (1997). Relation entre teneurs en derives cafeoylquiniques des feuilles et la resistance de *Helianthus* spp. a *Sclerotinia sclerotiorum*. *Helia* 20, 39-50.

Wang, M., Ling, N., Dong, X., Zhu, Y., Shen, Q., and Guo, S. (2012). Thermographic visualization of leaf response in cucumber plants infected with the soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Plant Physiol. Biochem.* 61, 153-161. doi:10.1016/j.plaphy.2012.09.015.

Watling, J.R., and Press, M.C. (2001). Impacts of infection by parasitic angiosperms on host photosynthesis. *Plant Biol.* 3, 244-250. doi: 10.1055/s-2001-15195

Westwood, J.H. (2013). "The physiology of the established parasite-host association", in: *Parasitic Orobanchaceae*, eds. D.M. Joel, J. Gressel, L.J. Musselman (Berlin:Springer), 87-114. doi: 10.1007/978-3-642-38146-1_6,

Wink, M. (2010). *Annual Plant Reviews Volume 39: Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites, 2th edition*. Oxford: Wiley-Blackwell. doi: 10.1002/9781444318876.ch1

Zarco-Tejada, P.J., González-Dugo, V., and Berni, J.A. (2012). Fluorescence, temperature and narrow-band indices acquired from a UAV platform for water stress detection using a micro-hyperspectral imager and a thermal camera. *Remote Sens. Environ.* 117, 322-337. doi: 10.1016/j.rse.2011.10.007

Zélicourt, A., Letousey, P., Thoiron, S., Champion, C., Simoneau, P., Elmorjani, K., et al. (2007). Ha-DEF1, a sunflower defensin, induces cell death in *Orobanche* parasitic plants. *Planta* 22, 591-600. doi: 10.1007/s00425-007-0507-1

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN GENERAL

7. DISCUSIÓN GENERAL

En esta Tesis Doctoral se ha puesto de manifiesto el escenario actual de la Marchitez tardía del maíz en la Península Ibérica. Por un lado, resulta preocupante la rapidez con que la enfermedad se ha expandido desde su detección por primera vez en España y Portugal (Molinero-Ruiz et al., 2010) y que podría convertirla, si no se toman las medidas adecuadas, en endémica como ha ocurrido en otros países como Egipto (Degani y Cernica, 2014). Por otro lado, la elevada frecuencia con que se han identificado otras especies de hongos patógenos de maíz como *Fusarium verticillioides* y *F. proliferatum* simultáneamente a *Harpophora maydis* sugiere que en la sintomatología de las plantas podría intervenir más de un agente causal. No obstante, sería preciso realizar las pertinentes pruebas de patogenicidad para confirmar la etiología compleja de la enfermedad. Otra posibilidad, tal y como describen Khokar et al. (2014), es que la presencia de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* se explique por un proceso independiente de pudrición del tallo posterior a la floración del maíz. En cualquier caso, un estudio etiológico preciso es indispensable para el control de enfermedades donde el uso de variedades resistentes constituye el método más eficaz de control (Bertrand et al., 2000; Anaya-López et al. 2011; Wegulo et al., 2015).

Por otra parte, los aislados de *H. maydis* procedentes de distintas zonas productoras de la Península Ibérica han mostrado diferentes características patogénicas. Este hecho se encuentra en sintonía con las diferencias de virulencia y competitividad observadas por Zeller et al. (2002) en poblaciones del patógeno en Egipto. En este sentido, al igual que ocurre en la pudrición de mazorca de maíz causadas por diferentes *Fusarium* spp. y en el patosistema *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun-judía (*Phaseolus vulgaris* L.) entre otros, la búsqueda de una resistencia durable mediante los programas de mejora genética requiere tanto de una adecuada comprensión de la naturaleza genética de la resistencia en los cultivares de interés como de un profundo conocimiento de la diversidad de las poblaciones de los patógenos (Pariud et al., 2009; Cumagun et al., 2011; Mesterházy et al., 2012; Pereira et al., 2015).

Discusión General

Otro resultado de gran interés en este trabajo es la detección por primera vez de forma no destructiva de la infección causada por *H. maydis* mediante medidas térmicas foliares y en fases previas a la aparición de los síntomas. Si bien son conocidas algunas de las limitaciones del uso de la termografía en condiciones de campo (influencia de las variables ambientales durante las medidas, ángulo de medida, características aerodinámicas del cultivo, etc.) (Oerke et al., 2014; Prashar y Jones, 2014), en los últimos años estas barreras están siendo superadas mediante estrategias como la combinación de la termografía con imágenes de fluorescencia, multiespectrales, hiperespectrales, etc. (Calderón et al., 2014; Konanz et al., 2014; Baranowski et al., 2015; González-Dugo et al., 2015; López-López et al., 2016; Omran, 2016), o el uso de nuevas metodologías de calibración de las cámaras y tratamientos de los datos (Deery et al., 2016). En cualquier caso, los resultados de este trabajo podrían tener una aplicación más inmediata en la identificación y selección, en condiciones controladas, de genotipos de maíz resistentes y/o susceptibles a *H. maydis*.

Respecto al patosistema *Orobanche cumana*-girasol, la presente Tesis Doctoral pone de manifiesto el potencial que tiene el uso de imágenes de fluorescencia en la región del rojo y rojo-lejano para detectar cambios fisiológicos y/ metabólicos en la planta huésped como consecuencia de la infección tan sólo quince días después de la inoculación con *O. cumana* en condiciones controladas. Las alteraciones en el hospedante provocadas por el parasitismo de *O. cumana* en girasol también se pueden detectar mediante imágenes de fluorescencia azul y verde en hojas de tan sólo una semana de edad. Aunque la fluorescencia multicolor ha sido bastante utilizada en la detección de infecciones locales por patógenos aéreos (Konanz et al., 2014; Leufen et al., 2014; Pérez-Bueno et al., 2015), únicamente Granum et al. (2015) la han aplicado al caso de una enfermedad causada por un patógeno de suelo: la podredumbre blanca del aguacate debida a *Rosellinia necatrix*. Respecto a la detección de infecciones por plantas parásitas y hasta donde sabemos, éste constituye el primer trabajo en el que la fluorescencia multicolor se utiliza para detectar la infección durante las fases subterráneas de su desarrollo y por lo tanto con anterioridad a la aparición de síntomas en el hospedante.

Finalmente, el análisis de imágenes térmicas también ha permitido detectar significativos incrementos de la temperatura de hojas de girasol en respuesta al ataque de jopo desde los 15 días posteriores a la siembra-inoculación. Por lo tanto, dado que la emergencia de *O. cumana* coincide con la floración del girasol (Molinero-Ruiz et al., 2015), nuestro trabajo muestra que esta técnica de imagen constituye una potente herramienta para detectar de manera presintomática el jopo en girasol, y podría ser fácilmente utilizada en el fenotipado de líneas de girasol pertenecientes a programas de mejora para resistencia a este patógeno.

A diferencia de técnicas destructivas de identificación de patógenos, como las basadas en métodos moleculares, ni la termografía ni la fluorescencia permiten hacer un diagnóstico de los patógenos en condiciones naturales, ya que, por sí solas, no permiten la discriminación de enfermedades ni de diferentes tipos de estrés (Hillnhütter et al, 2012; Calderón-Madrid et al., 2013; Berdugo et al., 2014; Fang y Ramasamy, 2015; Abdulridha et al. 2016). Sin embargo, los resultados de esta Tesis Doctoral confirman su aplicación para fenotipado en condiciones controladas y de invernadero, así como su utilidad en investigación básica dirigida a estudios fisiológicos de interacciones planta-patógeno, como ha sido defendido por otros autores (Rousseau et al. 2013; Mutka y Bart, 2015; Jafari et al., 2016; Rajendran et al., 2016).

7.1. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdulridha, J., Ehsani, R., and de Castro, A. (2016). Detection and differentiation between laurel wilt disease, *Phytophthora* disease, and salinity damage using a hyperspectral sensing technique. *Agriculture* 6, 56. doi: 10.3390/agriculture6040056

Anaya-López, J. L., González-Chavira, M. M., Villordo-Pineda, E., Rodríguez-Guerra, R., Rodríguez-Martínez, R., Guevara-González, R. G., et al. (2011). Selección de genotipos de chile resistentes al complejo patogénico de la marchitez. *Rev. Mex. Cienc. Agric.* 2, 373-383.

Baranowski, P., Jedryczka, M., Mazurek, W., Babula-Skowronska, D., Siedliska, A., and Kaczmarek, J. (2015). Hyperspectral and thermal imaging of oilseed rape (*Brassica napus*) response to fungal species of the genus *Alternaria*. *PLoS One* 10:e0122913. doi: 10.1371/journal.pone.0122913

Discusión General

Berdugo, C. A., Zito, R., Paulus, S., and Mahlein, A. K. (2014). Fusion of sensor data for the detection and differentiation of plant diseases in cucumber. *Plant Pathol.* 63, 1344-1356. doi: 10.1111/ppa.12219

Bertrand, B., Nunez, C., and Sarah, J. L. (2000). Disease complex in coffee involving *Meloidogyne arabicida* and *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathol.* 49, 383-388. doi: 10.1046/j.1365-3059.2000.00456.x

Calderón, R., Navas-Cortés, J.A., Lucena, C., and Zarco-Tejada, P.J. (2013). High-resolution airborne hyperspectral and thermal imagery for early detection of *Verticillium* wilt of olive using fluorescence, temperature and narrow-band spectral indices. *Remote Sens. Environ.* 139, 231-245. doi: 10.1016/j.rse.2013.07.031

Calderón, R., Montes-Borrego, M., Landa, B. B., Navas-Cortés, J. A., and Zarco-Tejada, P. J. (2014). Detection of downy mildew of opium poppy using high-resolution multi-spectral and thermal imagery acquired with an unmanned aerial vehicle. *Precis. Agric.* 15, 639-661. doi: 10.1007/s11119-014-9360-y

Cumagun, C. J. R., Vargas, M. L. D., and Alviar, A. N. (2011). Evaluation of greenhouse and field aggressiveness of *Fusarium verticillioides* from corn in Laguna province, Philippines. *Afr. J. Agric. Res.* 6, 6586-6591. doi: 10.5897/AJAR10.1128

Degani, O., and Cernica, G. (2014). Diagnosis and control of *Harpophora maydis*, the cause of late wilt in maize. *Advances in Microbiology* 4, 94-105. doi: 10.4236/aim.2014.42014

Deery, D. M., Rebetzke, G. J., Jimenez-Berni, J. A., James, R. A., Condon, A. G., Bovill, W. D., et al. (2016). Methodology for high-throughput field phenotyping of canopy temperature using airborne thermography. *Front. Plant Sci.* 7. doi: 10.3389/fpls.2016.01808

Fang, Y., and Ramasamy, R. P. (2015). Current and prospective methods for plant disease detection. *Biosensors* 5, 537-561. doi: 10.3390/bios5030537

Granum, E., Pérez-Bueno, M.L., Calderón, C.E., Ramos, C., de Vicente, A., Cazorla, F.M., et al. (2015). Metabolic responses of avocado plants to stress induced by *Rosellinia necatrix* analysed by fluorescence and thermal imaging. *Eur. J. Plant Pathol.* 142, 625-632. doi: 10.1007/s10658-015-0640-9

Gonzalez-Dugo, V., Hernandez, P., Solis, I., and Zarco-Tejada, P. J. (2015). Using high-resolution hyperspectral and thermal airborne imagery to assess physiological condition in the context of wheat phenotyping. *Remote Sens.* 7, 13586-13605. doi: 10.3390/rs71013586

- Hillnhütter, C., Mahlein, A. K., Sikora, R. A., and Oerke, E. C. (2012). Use of imaging spectroscopy to discriminate symptoms caused by *Heterodera schachtii* and *Rhizoctonia solani* on sugar beet. *Precis. Agric.* 13, 17-32. doi: 10.1007/s11119-011-9237-2
- Jafari, M., Minaei, S., Safaie, N., and Torkamani-Azar, F. (2016). Early detection and classification of powdery mildew-infected rose leaves using ANFIS based on extracted features of thermal images. *Infrared Phys. Technol.* 76, 338-345. doi: 10.1016/j.infrared.2016.03.003
- Khokhar, M. K., Hooda, K. S., Sharma, S. S., and Singh, V. (2014). Post flowering stalk rot complex of maize-present status and future prospects. *Maydica* 59, 226-242.
- Konanz, S., Kocsányi, L., and Buschmann, C. (2014). Advanced multi-color fluorescence imaging system for detection of biotic and abiotic stresses in leaves. *Agriculture* 4, 79-95. doi: 10.3390/agriculture4020079
- Leufen, G., Noga, G., and Hunsche, M. (2014). Fluorescence indices for the proximal sensing of powdery mildew, nitrogen supply and water deficit in sugar beet leaves. *Agriculture* 4, 58-78. doi: 10.3390/agriculture402005
- López-López, M., Calderón, R., González-Dugo, V., Zarco-Tejada, P. J., and Fereres, E. (2016). Early detection and quantification of almond red leaf blotch using high-resolution hyperspectral and thermal imagery. *Remote Sens.* 8, 276. doi: 10.3390/rs8040276
- Mesterházy, Á., Lemmens, M., and Reid, L. M. (2012). Breeding for resistance to ear rots caused by *Fusarium* spp. in maize—a review. *Plant Breed.* 131, 1-19. doi: 10.1111/j.1439-0523.2011.01936.x
- Molinero-Ruiz, M. L., Melero-Vara, J. M., and Mateos, A. (2010). *Cephalosporium maydis*, the cause of late wilt in maize, a pathogen new to Portugal and Spain. *Plant Dis.* 94, 379. doi: 10.1094/PDIS-94-3-0379A
- Molinero-Ruiz, L., Delavault, P., Pérez-Vich, B., Pacureanu-Joita, M., Bulos, M., Altieri, E., et al. (2015). History of the race structure of *Orobanche cumana* and the breeding of sunflower for resistance to this parasitic weed: A review. *Span. J. Agric. Res.* 13: 4. doi: 10.5424/sjar/2015134-8080
- Mutka, A. M., and Bart, R. S. (2015). Image-based phenotyping of plant disease symptoms. *Front. Plant Sci.* 5, 734. doi: 10.3389/fpls.2014.00734
- Oerke, E. C., Mahlein, A. K., and Steiner, U. (2014). “Proximal sensing of plant diseases”, in: *Detection and Diagnostics of Plant Pathogens*, eds. M.L. Gullino, P.J.M. Bonants. (Utrecht: Springer), 55-68. doi: 10.1007/978-94-017-9020-8_4,

Discusión General

Omran, E. S. E. (2016). Early sensing of peanut leaf spot using spectroscopy and thermal imaging. *Arch. Agron. Soil Sci.* 1-14. doi: 10.1080/03650340.2016.1247952

Pariaud, B., Ravigné, V., Halkett, F., Goyeau, H., Carlier, J., and Lannou, C. (2009). Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathol.* 58, 409-424. doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02039.x

Pereira, R., Souza, E. A., Barcelos, Q. L., Abreu, A. F. B., and Librelon, S. S. (2015). Aggressiveness of *Pseudocercospora griseola* strains in common bean genotypes and implications for genetic improvement. *Genet. Mol. Res.* 14, 5044-5053. doi: 10.4238/2015.May.12.7

Pérez-Bueno, M.L., Pineda, M., Díaz-Casado, E., and Barón M. (2015) Spatial and temporal dynamics of primary and secondary metabolism in *Phaseolus vulgaris* challenged by *Pseudomonas syringae*. *Physiol. Plant.* 153, 161-174. doi: 10.1111/ppl.12237

Prashar, A., and Jones, H. G. (2014). Infra-red thermography as a high-throughput tool for field phenotyping. *Agronomy* 4, 397-417. doi: 10.3390/agronomy4030397

Rajendran, D. K., Park, E., Nagendran, R., Hung, N. B., Cho, B. K., Kim, K. H., et al. (2016). Visual analysis for detection and quantification of *Pseudomonas cichorii* disease severity in tomato plants. *Plant Pathol. J.* 32, 300-310. doi: 10.5423/PPJ.OA.01.2016.0032

Rousseau, C., Belin, E., Bove, E., Rousseau, D., Fabre, F., Berruyer, R., et al. (2013). High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. *Plant Methods* 9, 17. doi: 10.1186/1746-4811-9-17

Wegulo, S. N., Baenziger, P. S., Nopsa, J. H., Bockus, W. W., and Hallen-Adams, H. (2015). Management of *Fusarium* head blight of wheat and barley. *Crop Prot.* 73, 100-107. doi: 10.1016/j.cropro.2015.02.025

Zeller, K. A., Ismael, A. M., El-Assiuty, E. M., Fahmy, Z. M., and Bekheet, F. M. (2002). Relative competitiveness and virulence of four clonal lineages of *Cephalosporium maydis* from Egypt toward greenhouse-grown maize. *Plant Dis.* 86, 373-378. doi: 10.1094/PDIS.2002.86.4.373

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES GENERALES

8. CONCLUSIONES

A lo largo de los distintos capítulos de esta Tesis Doctoral se han obtenido una serie de conclusiones que se presentan a continuación:

- 1) En este estudio se ha demostrado el rápido avance de la marchitez tardía en maíz en las principales zonas productoras de la Península Ibérica durante los cinco primeros años desde su identificación en la misma. *Harpophora maydis* se ha extendido por los valles de los ríos Tajo, Guadalquivir y Guadiana, quedando, por el momento, los valles del río Ebro, Duero y Miño exentos de su presencia. Capítulo 3.
- 2) En algunas plantas con marchitez no se ha recuperado *H. maydis*, identificándose en su lugar otros hongos de suelo: *Fusarium graminearum* y *F. verticilloides* con mayor frecuencia, seguidos de *F. equiseti*, *Macrophomina phaseolina* y *Trichoderma harzianum* entre otras especies de aparición esporádica. Estos resultados no son sorprendentes, dadas la inespecificidad de los síntomas de la marchitez tardía, y la patogenicidad de la mayoría de estas especies fúngicas en maíz referida en la literatura. Así, es probable la implicación de alguno o varios de estos hongos, junto con *H. maydis*, en la marchitez tardía, que parece ser una enfermedad de etiología compleja. Igualmente, junto con *H. maydis* se identificaron también con elevada frecuencia a *F. verticilloides* y *F. proliferatum*, lo cual sugiere que la enfermedad esté asociada a más de un agente fúngico infectivo pasando a ser una enfermedad de etiología compleja. Capítulo 4.
- 3) Todos los aislados de *H. maydis* procedentes de campos de maíz de la Península Ibérica resultaron patogénicos en condiciones seminaturales de umbráculo. En función del grado de severidad de síntomas de marchitez tardía causados en las plantas, los aislados de *H. maydis* se clasificaron como: poco agresivos, de agresividad moderada, y muy agresivos. En las condiciones de nuestros experimentos, la marchitez tardía del maíz se manifiesta por una mayor severidad de síntomas de necrosis y secado de hojas (ABCPE), y, en el caso de aislados muy agresivos de *H. maydis*, también por reducciones significativas de peso, tanto de tallos y hojas como de mazorcas. Capítulo 3.

Conclusiones

- 4) La marchitez tardía del maíz puede detectarse de forma no destructiva a través de medidas de la temperatura de hoja en condiciones de inoculación artificial y cultivo en macetas y condiciones seminaturales de umbráculo. Cuando las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo de la enfermedad, es posible apreciar incrementos térmicos foliares en plantas inoculadas hasta 17 días antes de la aparición de los síntomas. Capítulo 3.
- 5) La fluorescencia inducida por luz UV y emitida por plantas de girasol sanas en longitudes de onda del rojo (F680) y el rojo lejano (F740) varía con el estado de desarrollo de las hojas. Capítulo 5.
- 6) En plantas de girasol infectadas por *Orobanche cumana* se registró un aumento de F680 y de F740 en el primer par de hojas desde la segunda semana posterior a la inoculación-siembra. Con el tiempo, estos incrementos en los patrones foliares de fluorescencia se extienden a los pares de hojas superiores. Los índices F680 y F740 del primer y del segundo par de hojas permiten identificar plantas de girasol infectadas por *O. cumana* a partir de dos semanas de que ocurra la infección. Capítulo 5.
- 7) Los incrementos de F680 y F740 y el aumento del cociente F680/740 en el primer par de hojas de plantas de girasol al ser inoculadas con *O. cumana* sugieren un descenso en su contenido de clorofila. Las medidas de fluorescencia multicolor son concordantes con las medidas del contenido de clorofilas y con la cuantificación espectrofotométrica de clorofilas *a* y *b*, pero muestran una mayor sensibilidad en la identificación de plantas infectadas por *O. cumana* frente a plantas control. Capítulo 5.
- 8) En plantas de girasol infectadas por *O. cumana*, las emisiones de fluorescencia de hojas de entre 8 y 14 días de edad en longitudes de onda del azul (F440) y del verde (F520) fueron significativamente menores que las de las hojas de plantas control, lo que revela la utilidad de estos índices para diagnosticar la infección de girasol por *O. cumana* a través de medidas en hojas jóvenes. Capítulo 6.
- 9) La disminución significativa de los índices F440 y F520 sugiere una alteración del metabolismo secundario del girasol como respuesta a la infección por la planta parásita. Capítulo 6.

- 10) Los cocientes F440/F680 y F440/F520 también han resultado ser parámetros sensibles a la infección del girasol por *O. cumana*, detectándose un descenso de F440/F520 en hojas de plantas inoculadas respecto a hojas de plantas control que puede estar relacionado con un descenso en el contenido de clorofila total en la hoja como consecuencia de la infección. Capítulo 6.
- 11) El análisis de imágenes térmicas de plantas de girasol puede utilizarse como herramienta de diagnóstico temprano de la infección por *O. cumana*, pues reveló un aumento significativo de la temperatura de las hojas desde la semana 2 a la semana 5 tras la inoculación-siembra. En futuros trabajos se estudiará si este incremento térmico puede estar relacionado con la reducción de la transpiración como consecuencia de la activación del cierre estomático y/o inhibición de la apertura estomática como mecanismo de defensa del girasol frente a la infección por *O. cumana*. Capítulo 6.
- 12) Finalmente, los resultados de la presente Tesis Doctoral muestran que las técnicas de termografía y de fluorescencia multiespectral inducida por luz UV (en el caso del jopo del girasol), y de termometría infrarroja (en el de la marchitez tardía en maíz), constituyen potentes herramientas rápidas, fáciles y no destructivas de utilidad en la detección temprana y pre-sintomática de sendas enfermedades en condiciones controladas. Estas técnicas pueden tener una aplicación directa en el desarrollo de plataformas que aborden el fenotipado a gran escala.

