

SUCROSE APPLICATION SUPPRESSES INFECTION OF THE PARASITIC PLANT *Orobancha ramosa* IN TOMATO (*Lycopersicon esculentum*)

LA APLICACIÓN DE SACAROSA SUPRIME LA INFECCIÓN DE LA PLANTA PARÁSITA *Orobancha ramosa* EN TOMATE (*Lycopersicon esculentum*)

Clara I. González-Verdejo^{1*}, Miguel A. Dita², Salvador Nadal¹, M. Teresa Moreno¹ and Belen Román¹

¹IFAPA, Centro Alameda del Obispo, Área de Mejora y Biotecnología, Apdo. 3092, 14080 Córdoba, Spain (clara.gonzalez.ext@juntadeandalucia.es). ²EMBRAPA, Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz Das Almas, 44380-000. Bahia, Brasil.

ABSTRACT

Orobancha ramosa is an achlorophyllous holoparasitic weed that causes devastating losses in many commercial crops. An experiment was made using sucrose to evaluate its effect on the early growth stages of the parasite. Although *O. ramosa* germination was not statistically affected by sucrose, the radicle length, the number of attachments sites and the nodules formed decreased significantly.

Keywords: *Lycopersicon sculentum*, growth regulation, parasitism, sugar.

INTRODUCTION

Soluble sugars like glucose and sucrose are important regulators of various plant processes (Graham, 1996; Gibson, 2004). In *O. ramosa*, the addition of sucrose (30 g L⁻¹) to *in vitro* germinating seeds in the absence of the host, results in dramatic changes in radicle growth pattern (González-Verdejo *et al.*, 2006). This sugar mimics the later stages of infection when the parasite is connected to the host vascular system and obtains its carbohydrate nutrients mostly as sucrose (Aber, 1984). This prompted us to investigate if development alterations caused by exogenous sucrose application takes place when *Orobancha* grows directly on tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. In this study, tomato plants infected with *O. ramosa* were watered with a solution of sucrose (0, 15, 30 and 60 g L⁻¹). Possible alterations could influence the infection process and could lead to control this parasitic plant.

MATERIALS AND METHODS

Tomato seeds (*Lycopersicon sculentum* cv. *Money Maker*) were sterilized in 3.5% sodium hypochlorite for 10 min, then rinsed three times with sterile distilled water. *O. ramosa* seeds were collected

* Author for correspondence. ♦ Autor responsable.

Received: July, 2007. Approved: June, 2008.

Published as NOTE in *Agrociencia* 42: 513-517. 2008.

RESUMEN

Orobancha ramosa es una maleza aclorófila haloparásita que ocasiona pérdidas devastadoras en muchos cultivos comerciales. Se realizó un experimento con sacarosa para evaluar su efecto en las etapas tempranas de crecimiento del parásito. Aunque la germinación de *O. Ramosa* no fue estadísticamente afectada por la sacarosa, la longitud radicular, el número de sitios de adhesión y los nódulos desarrollados disminuyeron significativamente.

Palabras clave: *Lycopersicon sculentum*, regulación del crecimiento, parasitismo, azúcar.

INTRODUCCIÓN

Los azúcares solubles como la glucosa y la sacarosa son reguladores importantes de diversos procesos de plantas (Graham, 1996; Gibson, 2004). En *O. Ramosa*, la adición de sacarosa (30 g L⁻¹) a semillas en proceso de germinación *in vitro* en ausencia de la hospedera, produce cambios notables en el patrón de crecimiento radicular (González-Verdejo *et al.*, 2006). Este azúcar imita las etapas tardías de infección cuando el parásito está conectado al sistema vascular huésped y obtiene sus carbohidratos principalmente como sacarosa (Aber, 1984). Esto nos llevó a investigar si las alteraciones del desarrollo causadas por la aplicación exógena de sacarosa ocurren cuando el *Orobancha* crece directamente en las raíces del tomate (*Lycopersicon esculentum*). En este estudio las plantas de tomate infectadas con *O. ramosa* fueron regadas con una solución de sacarosa (0, 15, 30 y 60 g L⁻¹). Posibles alteraciones podrían influenciar el proceso de infección y ayudar a controlar esta planta parásita.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas de tomate (*Lycopersicon sculentum* cv. *Money Maker*) fueron esterilizadas en 3.5% de hipoclorito sódico por 10 min, y luego enjuagadas tres veces con agua destilada estéril. Las semillas de *O. ramosa* se recolectaron de plantas que parasitaban campos de

from plants which were parasitizing tobacco fields in Granada (Spain) and sterilized 2 h with 0.5% formaldehyde, followed by a 20 min incubation at 50 °C. Finally, seeds were rinsed three times with sterile distilled water (González-Verdejo *et al.* 2005).

Assays were performed following the methodology described by Pérez de Luque *et al.* (2004) with slight modifications: tomato seeds were pre-germinated in vermiculite and then transferred to Petri dishes containing perlite covered by a sheet of glass-fibre filter (Whatman International, Kent, UK); plates had a hole in its upper part to allow for free growth of the aerial part of the plant. Approximately 6 mg of *O. ramosa* seeds were sown on each sheet of glass-fibre filter with the tomato roots; then the plates were wrapped in aluminium foil to maintain *O. ramosa* seeds in the dark. Plates were watered and vertically stored in a growth chamber (21 °C; 16 h light). After 10 d of conditioning period, sucrose (Merk 141621) was added to the water (0, 15, 30, and 60 g L⁻¹; treatments): plates without sucrose were used as negative controls.

Four independent plates (each a randomized block), were set for each of the treatments. Percentages of seed germination were determined based on 400 seeds per plate (100 seeds in each section of the four analysis fields established per plate). The relationship between the germination data to root length (germination rate per root, m) was determined by the intercept method of Tennant (1975). The radicle length was determined in 40 seeds per plate (10 seeds in each of the four analysis fields) per treatment. All experiments were repeated three times with similar results.

The experimental design was randomized complete blocks with four treatments. Means were compared using the Tukey test ($p \leq 0.05$). Percentages of broomrape germination data were transformed with arcsin ($\sqrt{x/100}$) before analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

O. ramosa seed germination in presence of sucrose

Low and intermediate sucrose concentrations (15 and 30 g L⁻¹) did not reduce the number of germinating *O. ramosa* seeds, and only the highest concentration (60 g L⁻¹) caused a moderate reduction on the germination rate (Table 1). This has been also observed in *Arabidopsis*, where 90-100% of seeds treated with high glucose or sucrose showed similar results (Laby *et al.*, 2000).

Effect of sucrose on early seedling development of *O. ramosa*

Radicle length was reduced by sucrose (30 and 60 g L⁻¹); with 60 g L⁻¹ reduction was approximately 60% (Table 1). In our study, differences on seed morphology were also observed (data not shown). The sucrose treatment seemed to increase the number of seedlings with no radicle development showing an apicorium

tabaco en Granada (España) y se esterilizaron por 2 h con formaldehído al 0.5% e incubadas 20 min a 50 °C. Finalmente, las semillas fueron enjuagadas tres veces con agua destilada (González-Verdejo *et al.*, 2005).

Los ensayos se hicieron de acuerdo con la metodología descrita por Pérez de Luque *et al.* (2004) con ligeras modificaciones: las semillas de tomate fueron pre-germinadas en vermiculita y después transferidas a cajas de Petri con perlita cubierta con un filtro de fibra de vidrio (Whatman Internacional, Kent, UK); las cajas tenían un orificio en la parte superior para permitir el crecimiento libre de la parte aérea de la planta. Se sembraron aproximadamente 6 mg de semillas de *O. ramosa* en cada filtro de fibra de vidrio con las raíces de tomate; luego las cajas se envolvieron en papel aluminio para mantener las semillas de *O. ramosa* en la oscuridad. Las cajas se regaron y almacenaron verticalmente en una cámara de crecimiento (21 °C; 16 h luz). Después de un periodo de acondicionamiento de 10 d, se agregó sacarosa (Merk 141621) al agua (0, 15, 30, y 60 g L⁻¹; tratamientos): se usaron las cajas sin sacarosa como testigos negativos.

Se colocaron cuatro cajas independientes (cada una un bloque aleatorizado), para cada tratamiento. Los porcentajes de germinación de las semillas se determinaron basados en 400 semillas por caja (100 semillas en cada sección de los cuatro campos de análisis establecidos por caja). La relación entre los datos de germinación y longitud de la raíz (tasa de germinación por raíz, m) se determinó por el método del intercepto de Tennant (1975). La longitud radicular se determinó en 40 semillas por caja (10 semillas en cada uno de los cuatro campos de análisis) por tratamiento. Todos los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

El diseño experimental fue en bloques completos al azar con cuatro tratamientos. Las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Los datos de los porcentajes de germinación de orobanche se transformaron con arcsin ($\sqrt{x/100}$) antes del análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación de la semilla de *O. ramosa* en presencia de sacarosa

Las concentraciones bajas e intermedias de sacarosa (15 y 30 g L⁻¹) no disminuyeron el número de semillas germinantes de *O. ramosa*, y sólo la concentración mayor (60 g L⁻¹) causó una reducción moderada en la tasa de germinación (Cuadro 1). Esto también se ha observado en *Arabidopsis*, donde 90-100% de las semillas tratadas con alta glucosa o sacarosa mostraron resultados similares (Laby *et al.*, 2000).

Efectos de la sacarosa en el desarrollo temprano de plántulas de *O. ramosa*

La sacarosa redujo la longitud radicular (30 y 60 g L⁻¹); con 60 g L⁻¹ la reducción fue aproximadamente

Table 1. Effect of sucrose concentrations on *Orobancha ramosa* germination, radicle length and nodes, as well as on the tomato root length.**Cuadro 1.** Efecto de las concentraciones de sacarosa en la germinación de *Orobancha ramosa*, longitud radicular y nódulos, así como en la longitud de la raíz de tomate.

Sucrose (g L ⁻¹)	Germination (%)	Radicle length (μm)	Nodes/root length	Root length (m)
0	59.18 a	750.75 a	0.38 a	5.90 a
15	61.25 a	713.75 a	0.001 b	5.61 a
30	59.56 a	579.25 b	0.0045 b	4.55 b
60	51.31 b	441.25 c	0.0 b	3.47 c
Mean	57.82	621.25	0.09	4.88
CV	3.69	9.23	0.24	9.23

a, b, c: Means with different letters in a column, are significantly different ($p \leq 0.05$) ♦ Los promedios con letras distintas en una columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

emerging directly from the testa. Therefore, although sucrose did not inhibit the germination, it was effective in a second stage of the seedling development.

O. ramosa infection and tubercles formation in the presence of sucrose

All treatments with sucrose effectively prevented successful seedling establishment and tubercles formation (Table 1; Figure 1). Since 15 g L⁻¹ of sucrose controlled nodules development, a wider range around this concentration should be tested.

Even when the radicle reached the host root, it was unable to infect it (Figure 1C). This finding is consistent with similar results observed by Ben-Hod *et al.* (1991) with *O. aegyptiaca* callouses developed *in vitro*. Protusions of these callii behaving like radicles of germinating seeds were unable to infect host roots when grown on media containing organic nutrients.

The results, both on seedling development and total amount of attachments, could be attributed to the modified osmotic potential of the media with the sucrose concentrations, rather than to sucrose concentration itself. In studies with the model plant *Arabidopsis thaliana*, the changes produced by 0.11 M glucose on germinating seeds were not due to osmotic stress (To *et al.*, 2002). We used 15, 30 and 60 g L⁻¹ (0.044, 0.088 and 0.18 M), concentrations lower or similar to those used for *Arabidopsis*. For this reason, it is improbable that *O. ramosa* seeds sensitivity to the sugar concentrations tested could be due to the osmotic potential of the media. Further studies should consider sorbitol treatment in the *O. ramosa*/tomato system in order to neject this hypothesis.

Sucrose effect on host plant

The effect of sucrose on the host plant was tested by determining the root length for each treatment: 5.90,

60% (Cuadro 1). En nuestro estudio también se registraron diferencias morfológicas en las semillas (no se muestran los datos). Al parecer el tratamiento con sacarosa incrementó el número de plántulas sin desarrollo radicular, las cuales mostraron un apresorio que emergía directamente de la testa. Por tanto, aunque la sacarosa no inhibió la germinación, sí fue efectiva en una segunda etapa de desarrollo de plántulas.

Infección de *O. ramosa* y formación de tubérculos en presencia de sacarosa

Todos los tratamientos con sacarosa previnieron eficazmente el establecimiento de plántulas y la formación de tubérculos (Cuadro 1; Figura 1). Dado que 15 g L⁻¹ de sacarosa controlaron el desarrollo de nódulos, es necesario evaluar un intervalo más amplio con esta concentración.

Aunque la radícula llegó hasta la raíz huésped, no pudo infectarla (Figura 1C). Este hallazgo es consistente con resultados similares observados por Ben-Hod *et al.* (1991) con *O. aegyptiaca* callosidades desarrollada *in vitro*. Las protuberancias de estas *callii* que se comportaron como radículas de semillas germinantes no lograron infectar a las raíces huéspedes al ser cultivadas en medios connutrientes orgánicos.

Los resultados del desarrollo plantular y de la cantidad total de adhesiones podrían atribuirse al potencial osmótico modificado de los medios con las concentraciones de sacarosa, más que a la sola concentración de sacarosa. En estudios con la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, los cambios producidos por 0.11 M de glucosa en semillas germinantes no se debieron al estrés osmótico (To *et al.*, 2002). Usamos 15, 30 y 60 g L⁻¹ (0.044, 0.088 y 0.18 M), concentraciones más bajas o similares a las empleadas en *Arabidopsis*. Por esta razón, no es probable que la sensibilidad de las semillas de *O. ramosa* a las concentraciones de azúcar evaluadas

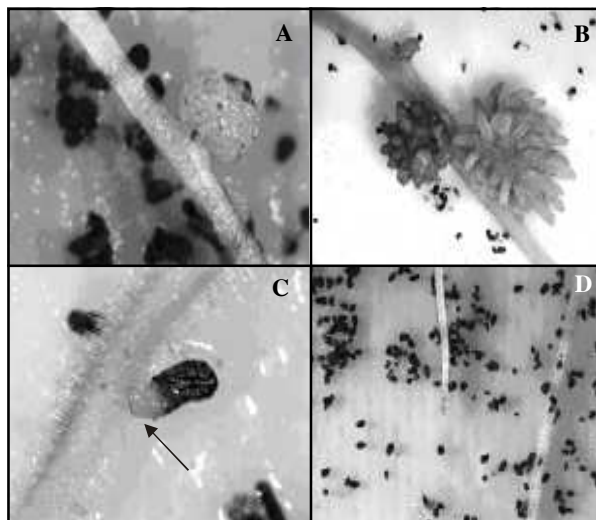


Figure 1. *Orobancha ramosa* attachment to host root and tubercles formation with (A, B) or without (C, D) exogenous sucrose (15 g L^{-1}). The impossibility of the *O. ramosa* seedling to attach the host root even if the radicle reaches it, is shown by an arrow (C).

Figura 1. Adhesión de *Orobancha ramosa* a la raíz huésped y formación de tubérculos con (A, B) o sin (C, D) sacarosa exógena (15 g L^{-1}). La imposibilidad de la plántula de *O. ramosa* de adherirse a la raíz huésped aun cuando la radícula llega a ésta, se indica con una flecha (C).

5.61, 4.55 and 3.47 m for 0, 15, 30 and 60 g L^{-1} . There were significant differences between the 60 g L^{-1} and 30 g L^{-1} as well as between the control and the 30 g L^{-1} concentration (Table 1). Thus, it is highly desirable to determinate the sucrose concentration needed to control *O. ramosa* without interfering with the host root development.

CONCLUSIONS

Sucrose blocks *O. ramosa* life cycle by modifying the normal germination step and preventing its attachment to the host plant. Nevertheless, the results of sucrose application could be different under field conditions, where precipitations or soil microbe interaction might alter initial concentrations or interfere with the host development. Studies about different *Orobancha* species attacking other crops (*O. crenata*-legumes or *O. cumana*/sunflower systems) could also be of utmost interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by the INIA_RTA04-067 project.

se deban al potencial osmótico de los medios. Estudios futuros deben considerar el tratamiento con sorbitol en el sistema *O. ramosa*/tomate para rechazar esta hipótesis.

Efecto de la sacarosa en la planta huésped

El efecto de la sacarosa en la planta huésped se evaluó determinando la longitud de la raíz para cada tratamiento: 5.9, 5.61, 4.55 y 3.47 m para 0, 15, 30 y 60 g L^{-1} . Hubo diferencias significativas entre 60 g L^{-1} y 30 g L^{-1} , así como entre el testigo y la concentración de 30 g L^{-1} (Cuadro 1). Por tanto, es muy deseable determinar la concentración de sacarosa requerida para controlar a *O. ramosa* sin interferir con el desarrollo de la raíz huésped.

CONCLUSIONES

La sacarosa bloquea el ciclo de vida de *O. ramosa* al modificar la fase de germinación normal y prevenir su adhesión a la planta huésped. Sin embargo, los resultados de la aplicación de sacarosa podrían ser diferentes en condiciones de campo, donde las precipitaciones o la interacción suelo-microbio podrían alterar las concentraciones iniciales o interferir con el desarrollo del huésped. Estudios sobre distintas especies de *Orobancha* que atacan otros cultivos (legumbres *O. crenata* o sistemas de *O. cumana*/girasol) también podrían ser de gran utilidad.

—Fin de la versión en Español—



LITERATURE CITED

- Aber, M. 1984. Cytophysiological aspects of *Orobancha crenata* Forsk. parasitizing *Vicia faba* L. Third International Symposium on Parasitic Weeds, Aleppo.
- Ben-Hod, G., D. Losner, D. M. Joel, and A. M. Mayer. 1991. Infection of tomato roots using callii of broomrape. *Physiologia Plantarum* 83: 353-356.
- Gibson, S. I. 2004. Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *J. Exp. Bot.* 55: 253-264.
- González-Verdejo, C. I., X. Barandiaran L., M. T. Moreno Y., J. I. Cubero S., and A. Di Pietro. 2005. An improved axenic system for studying pre-infection development of the parasitic plant *Orobancha ramosa*. *Annals Bot.* 96: 1121-1127.
- González-Verdejo, C. I., X. Barandiaran L., M. T. Moreno Y., J. I. Cubero S., and A. Di Pietro. 2006. A peroxidase gene expressed during early developmental stages of the parasitic plant *Orobancha ramosa*. *J. Exp. Bot.* 57: 185-192.
- Graham, I. A. 1996. Carbohydrate control of gene expression in higher plants. *Res. Microbiol.* 147: 572-580.

- Laby, R. J., M. S. Kincaid, D. Kim, and S. I. Gibson. 2000. The *Arabidopsis* sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *The Plant J.* 23: 587-596.
- Pérez-de-Luque A., J. V. Jorrín, and D. Rubiales. 2004. *Crenate* broomrape control in pea by foliar application of benzothiadiazole (BTH). *Phytoparasitica* 32: 21-29.
- Tennant, D. 1975. A test of a modified line intersect method of estimating root length. *J. Ecol.* 63: 955-1001
- To, J. P. C., W. D. Reiter, and S. I. Gibson. 2002. Mobilization of seed storage lipid by *Arabidopsis* seedlings is retarded in the presence of exogenous sugars. *BMC Plant Biol.* 2: 4.