

La resistencia a la planta parásita *Orobanche cumana* en girasol: selección genotípica de plantas resistentes y confirmación del fenotipo

ALUMNADO

Carmen Aguilar-Martínez¹, Hugo Arteaga-Moya¹,
Rubén Gavilán-Román², Beatriz Gómez-León²

INVESTIGADORES

Belén Fernández-Melero³, Marcos Mateo-Fernández², María Reyes-Amil², Lidia del Moral-Navarrete³, Leonardo Velasco-Varo³, Begoña Pérez-Vich³.

CENTROS

1. *IES Fidiana, Córdoba (1º Bachillerato).*
2. *CES Lope de Vega SCA, Córdoba (1º Bachillerato).*
3. *Mejora Genética Vegetal por Resistencia a Enfermedades. Instituto de Agricultura Sostenible (IAS)*

Investigador Principal: Begoña Pérez-Vich
Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC)

Profesor/Tutor: Dr. Marcos Mateo-Fernández
CES Lope de Vega SCA, Córdoba

Curso 2022/23

Abril de 2023

FIDiciencia



ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	3
2.1. Cultivos girasol.....	3
2.2. Inoculación.....	4
2.3. Enfermedades en girasol	4
2.3.1. Jopo del girasol	5
2.4. Mejora genética	7
2.4.1. Resistencia del girasol al jopo	7
2.4.2. Marcador molecular	8
2.5. Ensayos	8
2.5.1. PCR.....	8
2.5.2. Electroforesis.....	10
2.5.3. Extracción de ADN	11
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	12
4. PLANIFICACIÓN DE LAS SESIONES	12
5. MATERIALES Y MÉTODOS	13
5.1. Plantas usadas	13
5.2. Inoculación.....	13
Materiales:.....	13
5.3. Identificación molecular de la resistencia.	14
5.4. Identificación fisiológica de la resistencia. Mediante observación del jopo	14
5.5. Diseño experimental.	14
6. RESULTADOS.....	15
7. CONCLUSIÓN	16
8. AGRADECIMIENTOS	16
9. BIBLIOGRAFÍA	16

La resistencia a la planta parásita *Orobanche cumana* en girasol: Selección genotípica de plantas resistentes y confirmación del fenotipo

Carmen Aguilar-Martínez¹, Hugo Arteaga-Moya¹, Rubén Gavilán-Román², Beatriz Gómez-León², Belén Fernández-Melero³, Marcos Mateo-Fernández², María Reyes-Amil², Lidia del Moral-Navarrete³, Leonardo Velasco-Varo³, Begoña Pérez-Vich³.

RESUMEN

El jopo del girasol (*Orobanche cumana* Wallr.) es una planta parásita que puede causar grandes pérdidas de rendimiento en el cultivo del girasol (*Helianthus annuus* L.). El método más sostenible de control del jopo es mediante el uso de cultivares de girasol que poseen resistencia genética a esta planta parásita. El objetivo de esta investigación es desarrollar cultivares de girasol resistentes a jopo mediante la introgresión de genes de resistencia presentes en especies silvestres de girasol. Para ello, vamos a estudiar en qué consiste esta resistencia genética, la cual permite al girasol reconocer al jopo como un patógeno y en consecuencia desencadenar los mecanismos de defensa que impiden su parasitismo. Este estudio se realizará tanto a nivel molecular (determinar qué genes hacen al girasol que sea resistente) como a nivel fisiológico (qué mecanismos de defensa impiden al jopo desarrollarse). Para el estudio de qué genes determinan que el girasol sea resistente hemos realizado una PCR y para el nivel fisiológico hemos plantado los girasoles en una base transparente y le hemos añadido semillas de jopo, observando los rizotrones hemos comprobado cuales han sido resistentes al jopo y cuáles no han sido resistentes a este. Gracias a esto, pudimos determinar que las muestras fidi 5,8,10,12,13,17,19,21 y 23 eran resistentes ya que hay presencia del gen.

PALABRAS CLAVE: girasol, jopo, resistencia, rizotrón, PCR, introgresión.

ABSTRACT

The sunflower jopo (*Orobanche cumana* Wallr.) is a parasitic plant that can cause great yield losses in the cultivation of sunflower (*Helianthus annuus* L.). The most sustainable method of controlling the jopo is through the use of sunflower crops that have genetic resistance to this parasite plant. In this research, it was developed sunflower crops resistant to jopo by progressive resistance genes present in wild sunflower species. The objective of this project is to study what this genetic resistance

consists of, which allows the sunflower to recognize the as a pathogen and consequently trigger the defense mechanisms that prevent its parasitism. This study was carried out both at the molecular level (which genes determine that the sunflower is resistant) and at the physiological level (which defense mechanisms prevent the jopo from developing). For the study of which genes determine the sunflower is resistant, we have performed a PCR and for the physiological level we have planted the sunflower in a transparent base and we have added jopo seeds, observing the rhizotrons we have verified which have been resistant to jopo and which they have not been resistant to it. Our results determined that samples number 5, 8, 10, 12, 13, 17, 19, 21 and 23 showed to be resistant to the sunflowers jopo due to a band of DNA was amplified in PCR validating the presence of a resistant gen.

KEYWORDS: sunflowers jopo, sunflower, PCR, resistance, rhizotron, introgression.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de girasoles se remonta según estudios arqueológicos hacia el 3.000 A.C en Arizona y Nuevo México. Gracias al cultivo de girasoles, podemos obtener el famoso aceite de girasol. De este aceite se superaron los 155 millones de litros en el año 2021 en España siendo esta la cifra más baja en los últimos 5 años (siendo consumidos 2, 98 litros por persona al año).

Las semillas de girasol se caracterizan por ser ricas en vitamina E (antioxidante, y efectos antiinflamatorios, además, esta vitamina disminuye el riesgo de desarrollar cáncer de colon, así como de complicaciones en personas con diabetes mellitus. En mujeres en etapa de menopausia se ha visto que disminuye la severidad y la frecuencia de los bochornos. Son ricas en minerales que promueven la salud ósea. El tipo de grasas que contiene es de las más saludables, además de ser ricas en fibra y con un alto contenido calórico (pero de calidad).

Hoy en día, existen 6 tipos de girasoles que se dividen en dos grandes categorías, siendo el Big Smile el más popular y el más utilizado, ya sea para decorar, para consumo propio de las semillas que produce, etc.

En este proyecto, hemos infectado una cantidad desconocida de girasoles con el “jopo del girasol” (*Orobanche cumana Wallr.*), sin saber cuáles de ellos están infectados. Siendo esta la incógnita que debemos resolver en el experimento.

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. Cultivos girasol

Los cultivos oleaginosos son aquellos cultivos en los que el principal valor económico de sus semillas o frutos es el aceite extraído de ellos. Un ejemplo sería el olivo o el girasol. El girasol es un cultivo oleaginoso anual predominante en España desde mediados de los años 70. La superficie de girasol está distribuida por toda la geografía del país. Es un cultivo cada vez más frecuente en las explotaciones agrícolas.

La semilla de girasol (botánicamente es un fruto denominado aquenio), es un fruto seco con pericarpio (cáscara) separado de la verdadera semilla (pepita). Para que esta semilla origine una planta deben ocurrir numerosos procesos. En una primera etapa el fruto debe embeberse en agua, movilizar sus reservas y la radícula debe crecer hasta atravesar las cubiertas seminales y el pericarpio, finalizando así, en sentido estricto, el proceso de germinación. El hipocótilo del embrión debe luego alargarse y sacar los cotiledones a la superficie del suelo (emergencia de la plántula). Hasta dicho estadio, el crecimiento es soportado por la energía proveniente de la degradación de las reservas seminales. Luego, la plántula debe convertirse en organismo autótrofo, obteniendo a partir de la energía lumínica y mediante la fotosíntesis, la energía química para mantenerse y crecer.

Si el fruto está vivo, la germinación, comienza inmediatamente después de la imbibición cuando la temperatura del suelo es menor a 20°C e incluso antes, a temperaturas superiores a 20°C. En este último caso, la “incorporación” de agua es determinada también, a medida que continúa el proceso, por la degradación de las sustancias de reserva (de elevado peso molecular) que resultan en un aumento de sustancias de mayor actividad osmótica (por ejemplo, hidratos de carbono de bajo peso molecular). Esta degradación es un proceso biológico, lo que explica por qué sólo los frutos “vivos” pueden completar el proceso de germinación. A temperaturas inferiores a 8°C prácticamente no se produce la emergencia radicular. Entre los 8 y 12°C la emisión de la radícula se produce lentamente e inclusive puede que muchas de las “semillas” de un lote no germinen. Entre 12 y 15°C se generaliza la germinación, pero recién a temperaturas superiores a 15°C, ésta es más uniforme y rápida (Hernández y Orioli, 1994; Aguirrezábal et al., 1998).

La presencia de los cultivos de girasoles ha modificado el paisaje agrícola estival en numerosas regiones españolas y su aceite, muy apreciado, se ha introducido con fuerza en nuestros hábitos culinarios. Se trata de un aceite con una favorable composición en ácidos grasos, ya que posee un alto contenido de ácidos insaturados, concretamente ácido oléico y ácido linoléico. La superficie de cultivo en España se sitúa en el entorno de 1.000.000 ha, la mayor parte de ellas en condiciones de secano en la región biogeográfica mediterránea (Vesperinas et al., 2001).

2.2. Inoculación

La inoculación consiste en introducir en un organismo una sustancia que contiene los gérmenes de una enfermedad. En nuestro caso, se ha inoculado la planta de girasol con jopo y evaluar los efectos del jopo en el girasol. Esta inoculación se realiza para estudiar los mecanismos de defensa del girasol frente al jopo y así intentar detener el avance del jopo o bien, para cuando el girasol se contamine del jopo encontrar la forma de pararlo para que no haga muchos daños en el girasol.

2.3. Enfermedades en girasol

El control de plagas y enfermedades del girasol es fundamental para obtener una buena productividad. Al igual que sucede con otras plantas, la falta de atención a las plagas y enfermedades, pueden provocar pérdidas irreparables. El girasol no es un cultivo que presenta serios problemas fitosanitarios pero pueden tener diferentes enfermedades como:

Podredumbre Húmeda (*Sclerotinia sclerotiorum*). Destruye los tejidos conectores y provoca la muerte de la planta. Los nutrientes y fotoasimilados no pueden llegar a la parte aérea del girasol y acaba secándose.



Imagen 1. Podredumbre Húmeda

Verticilosis (*Verticillium dahliae* Kleb). Es muy importante, afecta a los vasos conductores, impidiendo la circulación de savia y frenando el avance de la parte aérea.



Imagen 2. Verticilosis

Tizón del tallo (*Sclerotium rolfsii*). Provoca la muerte del girasol sea el estado fenológico que sea.



Imagen 3. Tizón del tallo

Alternaria (*Alternaria helianthi*). Se da cuando hay elevadas condiciones húmedas. Afecta a las hojas, reduciendo su capacidad fotosintética y ocasiona la caída prematura.



Imagen 4. Alternaria

2.3.1. Jopo del girasol

Es el riesgo más importante de este cultivo, ya que puede provocar pérdida de hasta el 100% de la cosecha. Se trata de una planta parásita, que no tiene clorofila y necesita un huésped, el girasol, del que se alimenta extrayendo agua y nutrientes.

Está presente en el suelo, germina en condiciones favorables y su radícula penetra en la raíz del girasol. Emite uno o más tallos y florece, produciendo de 30.000 a 50.000 semillas por cada planta de jopo. En resumen, primero existe una fase aérea en la que se produce la floración y donde crecen las semillas del jopo para después ser esparcidas por el suelo. Emite uno o más tallos y florece, produciendo de 30.000 a 50.000 semillas por cada planta de jopo. Entre germinación y producción de semilla, la duración es de 3-5 meses dependiendo de las condiciones ambientales. La germinación se favorece con humedad en el suelo y temperatura de 12-20°C. Después la semilla se une a la raíz del girasol. Allí se desarrollan hasta que crecen y salen hasta la superficie donde perjudican al girasol. Tras la emergencia, se observa la presencia de uno o varios jopos en la base del girasol, el cual presentará menor desarrollo, incluso deteniendo el crecimiento, pudiendo cursar con amarillentos, marchitez e incluso la muerte de la planta.

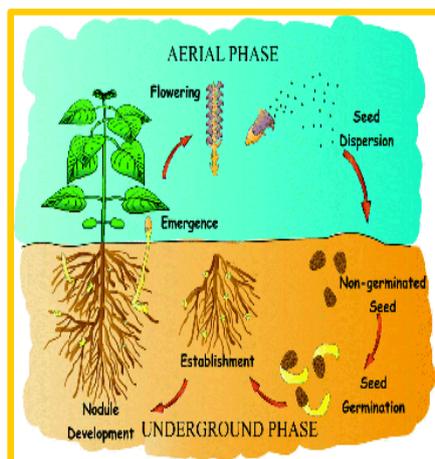


Imagen 5. Fases del desarrollo del jopo.

Existen diversas maneras para prevenir la infección de los cultivos:

- Profilaxi:
 - Usar únicamente semilla certificada.
 - Cosechar primero los campos no infectados.
 - Limpiar la maquinaria.
- Rotaciones:
 - Mantener diversos cultivos en rotación e incluir “Cultivos Trampa” como maíz, algodón y sorgo que produzcan germinación suicida en las semillas de jopo en rotación cuando sea posible.
- Medidas preventivas:
 - Usar soluciones de control en los campos cercanos para evitar el desarrollo del área infectada.
 - El no laboreo previene las nuevas infecciones.
 - Evitar la propagación de campos ya infectados
- Diagnosticar.
 - Mapeo para conocer la dispersión del parásito y determinación racial en cada lugar.
- Buenas Prácticas.
 - Limpiar la maquinaria y cosechar los campos contaminados en último lugar.
- Racionalizar las rotaciones:
 - Diseñar rotaciones sostenibles.
 - Incluir, cuando sea posible “Cultivos Trampa”.
- Evitar la incorporación de la semilla del jopo mediante el no laboreo.

- Soluciones de control:
 - Usar la resistencia genética apropiada.
 - Usar la tecnología Clearfield.
 - Usar la combinación de las dos anteriores.



Imagen 6. Jopo en el girasol

2.4. Mejora genética

Consiste en manipular genéticamente una especie para mejorar alguna característica de esta, como puede ser aumentar la productividad, el tamaño o adquirir resistencia frente a alguna molécula o patógeno. Se lleva realizando durante varias decenas de años, principalmente en países del este europeo, si bien ha despertado interés en las compañías privadas productoras de semillas desde hace pocos años con el descubrimiento de la macho-esterilidad genético-citoplasmático que hizo posible la producción a escala comercial de híbridos de girasol (Berreta, 1991).

En lo que respecta al mejoramiento genético en sí, como en toda especie, es imprescindible disponer de suficiente variabilidad a los efectos de asegurar resultados prometedores y sostenidos.

2.4.1. Resistencia del girasol al jopo

De forma general, las plantas poseen diversos mecanismos de defensas naturales como pueden ser: barreras bioquímicas (produciendo compuestos con actividad microbiana que se liberan en respuesta al daño en tejidos), barreras mecánicas (como puede ser el grosor de la epidermis de las hojas o la calidad de la cutícula de las mismas); y defensas inducidas por la presencia del patógeno activando un

mecanismos de respuesta por transducción de la señal iniciada por el reconocimiento del patógeno o del daño que causa.

En el IAS se ha puesto en marcha una línea de investigación consistente en el desarrollo de cultivares de girasol resistentes a jopo mediante la introducción de genes de resistencia presentes en especies silvestres de girasol (Fernández-Aparicio *et al.*, 2021).



Imagen 7. *H. maximiliani*; *H. giganteus*; *H. debilis*

2.4.2. Marcador molecular

Los marcadores moleculares son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético. Las biomoléculas que pueden ser marcadores moleculares son las proteínas y el ADN.

Un marcador molecular monomórfico es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando presentan diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura o sitios de restricción, se dice que es polimórfico.

Las aplicaciones de los marcadores moleculares son muy diversas y es de esperar que cada vez se encuentren nuevos usos. Por ahora, se vienen empleando en la diferenciación de individuos, discriminación entre clones, análisis filogenéticos y taxonómicos, mapeo de genomas, cuantificación de variabilidad genética intra y interespecífica, detección de infecciones o propensión a sufrirlas, mejoras genéticas, localización de resistencias a enfermedades y dispersión de especies.

2.5. Ensayos

En este apartado vamos a hablar de las PCR, la extracción del ADN y la electroforesis.

2.5.1. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica de laboratorio común utilizada para hacer muchas copias de una región particular de ADN. Esta región de ADN puede ser cualquiera que le interese al experimentador. Por ejemplo, podría ser un gen cuya función quiere entender un investigador o un marcador genético usado por

científicos forenses para relacionar el ADN de la escena del crimen con los sospechosos.

Por lo general, el objetivo de la PCR es producir suficiente ADN de la región diana para que pueda analizarse o usarse de alguna otra manera. Por ejemplo, el ADN amplificado por PCR se puede secuenciar, visualizar por electroforesis en gel o clonar en plásmido para otros experimentos.

Pasos de la PCR

Los ingredientes clave para una reacción de PCR son: *Taq* polimerasa, ADN molde y nucleótidos. Los ingredientes se colocan en un tubo, junto con los cofactores que necesite la enzima, y se someten a ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento que permiten la síntesis de ADN.

Los pasos básicos son (ver imagen 8):

1. **Desnaturalización** (94-96°C). La reacción se calienta bastante para separar, o desnaturalizar, las cadenas de ADN. Esto proporciona los moldes de cadena sencilla para el siguiente paso.

2. **Templado**. La reacción se enfría para que los cebadores puedan unirse a sus secuencias complementarias en el molde de ADN de cadena sencilla.

3. **Extensión** (72°C). La temperatura de la reacción se eleva para que la *Taq* polimerasa extienda los cebadores y sintetice así nuevas cadenas de ADN.

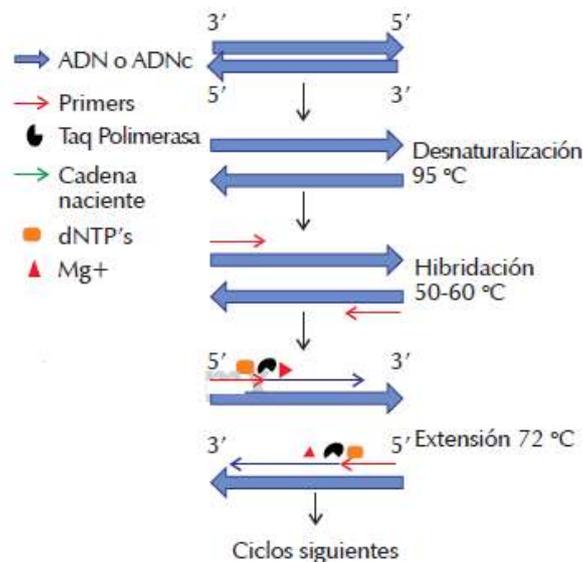


Imagen 8. Pasos de la PCR (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

2.5.2. Electroforesis

Es una técnica de laboratorio que se usa para separar moléculas de ADN, ARN o proteínas en función de su tamaño y carga eléctrica. Se usa una corriente eléctrica para mover las moléculas a través de un gel o de otra matriz. Los poros del gel o la matriz actúan como un tamiz, lo cual permite que las moléculas más pequeñas se muevan más rápido que las moléculas más grandes. Para determinar el tamaño de las moléculas de una muestra, se usan estándares de tamaños conocidos que se separan en el mismo gel y luego se comparan con la muestra (genome.gov).

Se utiliza en una gran variedad de aplicaciones como en medicina forense para determinar la identidad de las personas que puedan haber participado en un delito, mediante la vinculación de su patrón de ADN a uno que esté en una base de datos.

En este caso se ha usado para ver la calidad del ADN por electroforesis de agarosa.

La electroforesis en gel de agarosa permite la valoración de la integridad o calidad de la muestra de ADN. Se considera que una muestra de ADN es íntegra cuando su perfil en una electroforesis en gel de agarosa corresponde a una banda discreta. El nivel de degradación de una muestra está determinado por la pérdida de definición de la banda predominante y el acompañamiento de una estela o *smear* a lo largo del gel.

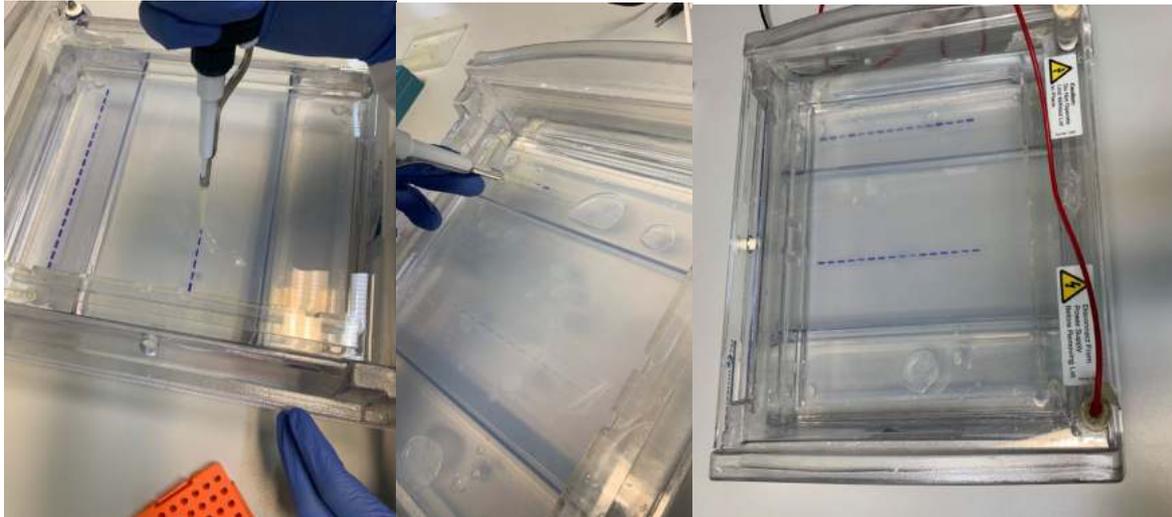


Imagen 9. Electroforesis

2.5.3. Extracción de ADN

Protocolo para la extracción de ADN:

1. En viales de 2 ml pesar 30 mg de tejido liofilizado y molido previamente.

En la campana:

2. Añadir 500 microlitros de buffer al tejido y voltear hasta que quede bien mezclado.

3. Incubar a 60° durante 30 min (durante este tiempo de vez en cuando voltear las muestras). Transcurrido el tiempo dejamos brevemente enfriar las muestras a T. ambiente.

4. Añadimos 500 microlitros de cloroformo y mezclamos (por inversión o vortex). Hay que tener cuidado los viales pueden abrirse por la presión del interior!

5. Centrifugar a máxima velocidad (13000 r.p.m) durante 5 min. Sacar la fase acuosa con pipeta sin agarrar restos y echarla en viales con 600 microlitros de 1% CTAB+ARNasa. Volteamos y dejamos a T. ambiente 15 min.

6. Centrifugar a máxima velocidad (13000 r.p.m) durante 5 min. Una vez formado el pellet desechamos el sobrenadante con cuidado de no perder el pellet. Centrifugamos 20 segundos para eliminar los restos de sobrenadante (con pipeta) que pueden quedar.

7. Sobre el pellet (que es ya el ADN) añadimos 500 microlitros de TE High e incubamos a 60° con agitación durante 15 min para disolverlo (agitar suavemente hasta que el pellet quede despegado del vial).

8. Una vez disuelto el pellet, añadir 1 ml de etanol 100% y mezclar por inversión.

9. Centrifugar a máxima velocidad 5 min. Una vez formado el pellet desechamos el sobrenadante con cuidado de no perder el pellet. Centrifugamos 20 segundos para eliminar los restos de sobrenadante (con pipeta) que puedan quedar.

10. Resuspender el ADN en 100 microlitros de TE y dejar a T. ambiente hasta que se disuelva. Las muestras se pueden guardar a 4°C durante unos días y para larga conservación congelarlas a -20°C o -80°C.

NOTA: A veces según el material que usemos de partida, el pellet puede salir más grande o más pequeño y por lo tanto la cantidad de TE que hay que añadir al final es variable, generalmente de girasol se obtiene bastante cantidad de ADN y mínimo hay que añadir 100 microlitros de TE pero para el caso de jopo, donde la extracción de ADN es muy complicada y se obtienen pellet muy pequeños la cantidad de TE puede variar de 30 a 50 microlitros.

11. Medir la concentración con el nanodrop.

12. Poner todas las muestras a la misma concentración 500, 100, 50 o 10 ng (que son posibles soluciones de trabajo).



Imagen 10. Pasos para la extracción de ADN

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El objetivo de este proyecto es realizar un estudio sobre esta resistencia genética, la cual permite al girasol reconocer al jopo como un patógeno y en consecuencia desencadenar los mecanismos de defensa que impiden su parasitismo. En concreto, se van a emplear marcadores moleculares asociados a un gen de resistencia para seleccionar genotípicamente (a partir del ADN) plantas resistentes y susceptibles, y confirmar su fenotipo.

4. PLANIFICACIÓN DE LAS SESIONES

Primera sesión: Conceptos básicos acerca del sistema y mecanismos de defensa de las plantas y de cómo son capaces de detectar a un patógeno y de desencadenar como consecuencia respuestas de defensa, y acerca del sistema huésped- planta parásita en el caso específico de la relación girasol- jopo del girasol. La práctica en esta primera sesión consistirá en la extracción de ADN de plantas de girasol resistentes (líneas DEB2) y susceptibles (línea B117), con el objetivo de, en posteriores sesiones, llevar a cabo una selección genotípica con marcadores moleculares de aquellas que sean resistentes y las que son susceptibles.

Segunda sesión: En esta sesión cuantificamos el ADN que habíamos extraído la sesión anterior, después de la cuantificación se analiza la calidad del ADN por electroforesis de agarosa, también nos explicaron que era y como se hacía una PCR. En esta sesión con otra de las investigadoras hicimos un ensayo de minirrizotróf, en el cual nos explicaron sus materiales vegetales, sus materiales y las fases por las que iba a pasar en los días 0 y 1

Tercera sesión: En la última sesión, se hicieron los últimos pasos al ADN, al ponerlo otra vez en la electroforesis de agarosa para dar los últimos resultados.

También terminamos el otro ensayo de minirrizotróf, en él vimos a cuáles le habían salido jopo y a cuáles no y por tanto también vimos a los que eran los resistentes al jopo y los que no eran.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Plantas usadas

Girasol: el girasol (*helianthus annuus*) ha sido la planta seleccionada para comprobar cuál es el gen de resistencia contra el jopo

Jopo del girasol: el jopo del girasol (*orobanche cumana*) es la planta seleccionada como parásito y para poder observar si le afecta o no al girasol

5.2. Inoculación

Primero preparamos la base donde pondremos nuestra planta de girasol y donde podremos ver si hay jopo o no hay jopo. Como base vamos a utilizar una placa de plexiglás, lana de cristal, papel de filtro y nuestro girasol en crecimiento. Primero ponemos la lana de cristal en otra base y cortamos algunas por la mitad y les añadimos agua. En la base que vamos a utilizar comenzamos poniendo una lana de cristal y media. Encima de esta pondremos un papel de filtro y una etiqueta encima del papel filtro (esta debe de estar en el lado liso del papel de filtro, ya que este tiene dos caras una lisa y otra irregular). Luego sacaremos la planta de la maceta con una espátula sin que su raíz se rompa, para poner la planta antes debemos de limpiar su raíz hasta que se quede sin ningún resto de piedras. Cuando hayamos puesto nuestra planta encima de la base, echamos las semillas de jopo las cuales están en una disolución de lejía y agua y las repartimos por toda la raíz del girasol con ayuda de una pipeta. Cerramos la base y hacemos lo mismo con todas las muestras. Por último, cubrimos todas nuestras muestras con papel de aluminio. Después de varios días, los girasoles han crecido y podemos ver que algunos en los que el jopo no se ha manifestado y otros en los que sí se ha manifestado.

Materiales:

- Semillas y plantas de girasol y de la planta parásita *Orobanche cumana*.
- Buffer
- ARNasa
- 1% CTAB
- TE High
- TE
- Tris HCL
- NaCl

- EDTA
- Ácido ascórbico
- DIECA
- B-mercaptoetanol
- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol
- Rizotrones
- Lana de cristal
- Papel de filtro
- Medidor de ph
- Placas de petri

5.3. Identificación molecular de la resistencia.

La prueba utilizada en nuestra investigación es la PCR, que su función es ampliar el ADN del girasol hasta encontrar el gen de resistencia contra el jopo de girasol, para poder averiguar cuáles de las muestras que poseemos son resistentes y cuales son susceptibles (Fernández-Aparicio *et al.*, 2021).

5.4. Identificación fisiológica de la resistencia. Mediante observación del jopo

Para comprobar si el jopo ha afectado o no al girasol, lo que hemos hecho ha sido plantar los girasoles en rizotrones y le hemos echado semillas de jopo en sus raíces para después comprobar cuáles son susceptibles y cuáles no lo son (Fernández-Aparicio *et al.*, 2021).

5.5. Diseño experimental.

Comenzamos convirtiendo en polvo unas hojas de girasol utilizando unas pequeñas bolas de titanio, para más tarde poder extraer el ADN de dicha planta. les añadimos cloroformo con una pipeta y las centrifugamos utilizando una pequeña máquina centrifugadora, ya que nosotros con nuestras manos no somos capaces de centrifugar a la velocidad necesaria. cuando pase el tiempo necesitado, extraemos los eppendorf, que son los envases donde tenemos dicho ADN. Al extraerlos observamos una pequeña capa sólida donde se encuentra el ADN. Debemos extraerla y repetir el proceso hasta que el ADN sea visible. Una vez ocurra esto. Después comprobaremos la calidad del ADN utilizando un espectrofotómetro Nanodrop, que comprobará la calidad y cantidad de ADN de cada muestra. Después, debemos de realizar la PCR para observar los resistentes y los susceptibles junto a una prueba de electroforesis para corroborar la información. Por último debemos plantar algunos ejemplares de

girasol a los que les inoculamos semillas del jopo para corroborar que las pruebas anteriores han salido correctas. para acabar comprobamos las tres pruebas y podemos observar que han sido realizadas con éxito y que no hay fallos en nuestras teorías.

6. RESULTADOS

Como pudimos comprobar, gracias a los rizotrones y al estudio mediante el gel pudimos determinar que las muestras fidi 5, 8, 10, 12, 13, 17, 19, 21 y 23 eran resistentes ya que hay presencia del gen. una vez realizado el estudio por gel, lo comprobamos plantando algunas plantas que coinciden con las pruebas anteriores y pudimos verificar los resultados visualmente.

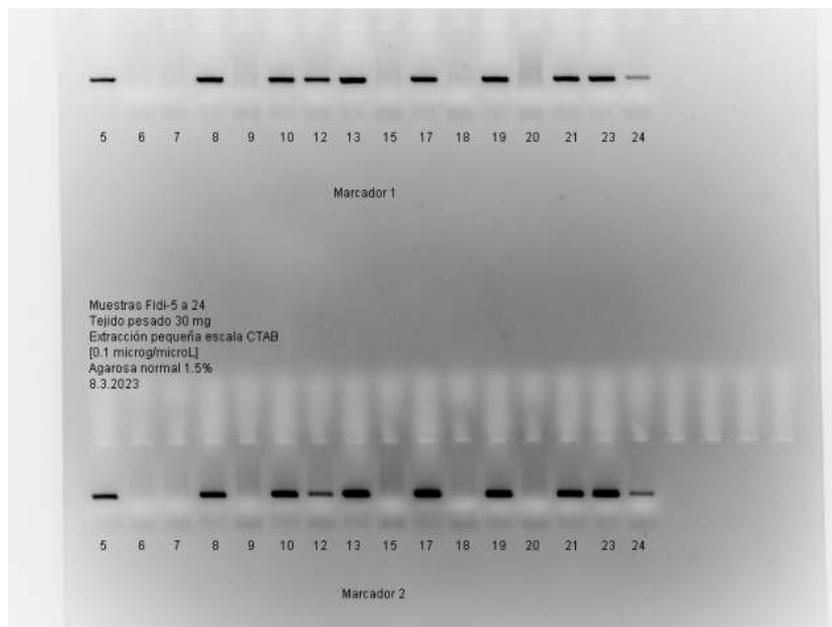


Imagen 11. Resultados de la PCR en gel de agarosa después de la electroforesis



Imagen 12. Comprobación fenotípica de la resistencia al jopo

7. CONCLUSIÓN

Observando los resultados, se puede ver cuáles girasoles son susceptibles al jopo y cuáles son los que han reconocido al jopo como un patógeno.

Como hemos dicho anteriormente, unos girasoles han sido susceptibles, los cuales son fidi 5, 8, 10, 12, 13, 17, 19, 21 y 23 (esto significa que tienen el gen que determinan que el girasol sea resistente).

Y los girasoles que han aceptado al jopo como un agente patógeno, son los restantes, siendo fidi 6, 7, 9, 15, 18, 20, 24 (esto indica que carecen del gen para ser resistentes al jopo).

8. AGRADECIMIENTOS

Este proyecto no se hubiera podido realizar sin la ayuda de la investigadora Lidia del Moral.

A Begoña Pérez y Belén Fernández, le agradecemos su empatía al entendernos desde el primer momento y hacer de todas las visitas al Centro de Investigación de Agricultura sostenible una experiencia confortable y de total aprendizaje, su interés por nuestro aprendizaje y por transmitir nuevos conocimientos que desconocíamos.

Agradecer al Instituto de Agricultura Sostenible (IAS) por cedernos sus magníficas instalaciones y poder disfrutarlas durante este proyecto, conocer materiales científicos que desconocíamos y enriquecer nuestros conocimientos científicos.

Agradecemos también a los centros CES Lope de Vega e IES Fidiana por ofrecernos dicha actividad y ayudarnos a construir nuestro futuro. A el profesor Marcos y María por ofrecernos este maravilloso proyecto y confiar en nosotros para que salga adelante.

Gracias a nuestras familias porque siempre nos apoyan y nos ofrecen su experiencia y se encargan de hacernos mejores personas y personas de provecho día a día.

9. BIBLIOGRAFÍA

Aguirrezábal, L. A. N., Orioli, G. A., Hernández, L. F., Pereyra, V. R., & Miravé, J. P. (1998). Girasol. *Calidad de productos agrícolas. Bases ecofisiológicas, genéticas y de manejo agronómico*, 139-192.

Berreta, A. (1991). Algunas consideraciones sobre mejoramiento genético de girasol. *Curso producción de maravilla, Santiago, 27-28 Jun 1991*.

Fernández-Aparicio, M., del Moral, L., Muños, S., Velasco, L., & Pérez-Vich, B. (2021). Genetic and physiological characterization of sunflower resistance provided by the wild-derived Ordeb2 gene against highly virulent races of *Orobanche cumana* Wallr. *Theoretical and Applied Genetics*, 135, 501-525.

Hernández, L. F., & Orioli, G. A. (1994). El ideotipo del girasol (*Helianthus annuus* L.). *Agriscientia*, 11, 87-98.

Vesperinas, E. S., Elorza, M. S., & Moreno, A. G (2001). El jopo del girasol, posibles medidas de control y tratamientos. *Cultivos extensivos, Vida rural*, 42-44.

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.

WEBGRAFÍA

- <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Electroforesis>
- [Cultivo del Girasol: consideraciones básicas para la siembra - Agroptima](#) (cultivo del girasol) (2.1)
- [Principales enfermedades del girasol \(y su tratamiento\) - Agromática](#) (agromatica.es) (enfermedades del girasol) (2.3)
- [Jopo en Girasol | Syngenta](#) (Jopo del girasol) (2.3.1)