

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. El cultivo de papa	3
1.1.1. Características del cultivo de papa en Uruguay	3
1.1.2. Recursos genéticos asociados al cultivo de papa	4
1.1.3. Especies tuberosas silvestres del género <i>Solanum</i>	6
1.1.4. Características citogenéticas y cruzabilidad	7
1.2. Aplicación de marcadores moleculares en el mejoramiento de cultivos	9
1.2.1. Marcadores RAPD (<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i>)	10
1.2.2. Marcadores AFLP (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>)	12
1.2.3. Marcadores SSR (<i>Simple Sequence Repeats</i>)	15
1.3. Mejoramiento genético enfocado a la introducción de resistencia a enfermedades	17
1.3.1. El marchitamiento bacteriano de la papa causado por <i>Ralstonia solanacearum</i>	17
1.3.2. Características del patógeno <i>R. solanacearum</i>	19
1.3.3. Variabilidad dentro de la especie <i>R. solanacearum</i>	22
1.3.4. Importancia de <i>R. solanacearum</i> en Uruguay y medidas de control	25
1.4. Mecanismos de resistencia a patógenos vegetales	26
1.4.1. Resistencia Vertical	27
1.4.2. Resistencia Horizontal	28
1.4.3. Fuentes de resistencia frente a <i>R. solanacearum</i>	29
1.4.4. Base genética de la resistencia a <i>R. solanacearum</i>	30
1.4.5. Proteínas que intervienen en las interacciones planta-patógeno	31
1.4.5.1. Las lectinas como proteínas de reconocimiento	32
2. OBJETIVOS	36
3. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1. Material vegetal	37
3.2. Métodos microbiológicos	39
3.2.1. Aislamiento de cepas locales de <i>Ralstonia solanacearum</i>	39
3.2.2. Identificación primaria	40
3.2.2.1. Ensayo de óxido/fermentación de glucosa	40
3.2.2.2. Crecimiento a partir de asparragina	40
3.2.3. Determinación del BIOVAR	40
3.2.4. Conservación de la colección de cepas de <i>R. solanacearum</i>	41
3.2.4.1. Congelamiento a -70°C	42

3.2.4.2.	Mantenimiento a temperatura ambiente.....	42
3.2.5.	Extracción de exopolisacáridos (EPS).....	43
3.2.6.	Ensayo de actividad antimicrobiana.....	43
3.2.7.	Ensayos de resistencia en invernadero.	44
3.3.	Métodos moleculares.....	45
3.3.1.	Extracción de ADN genómico vegetal.	45
3.3.2.	Extracción de ADN genómico bacteriano.....	46
3.3.3.	Visualización y cuantificación de ADN.....	47
3.3.4.	Estudio de la diversidad genética de <i>S. commersonii</i>	47
3.3.4.1.	Marcadores RAPD.	47
3.3.4.2.	Marcadores AFLP.	48
3.3.4.3.	Marcadores SSR.....	52
3.3.4.4.	Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	52
3.3.4.5.	Análisis de datos.....	53
3.3.5.	Búsqueda de marcadores moleculares vinculados con la resistencia en la interacción <i>S. commersonii</i> - <i>R. solanacearum</i>	55
3.3.5.1.	Purificación del marcador R6-800.....	55
3.3.5.2.	Clonado del marcador R6-800.....	55
3.3.5.3.	Análisis de transformantes.....	56
3.3.5.4.	Secuenciado del marcador R6-800.	57
3.3.5.5.	Análisis del marcador R6-800 mediante restricción.....	58
3.3.5.6.	Diseño de <i>primers</i> para la amplificación del marcador R6-800.	59
3.3.6.	Identificación molecular de <i>R. solanacearum</i>	59
3.3.6.1.	Amplificación con <i>primers</i> específicos para <i>R. solanacearum</i>	60
3.3.6.2.	Amplificación y secuenciación del gen del ARNr 16S.....	61
3.3.7.	Caracterización genética de las cepas de <i>R. solanacearum</i>	62
3.3.7.1.	ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis).....	63
3.3.7.2.	rep-PCR (Repetitive Extragenic Polymorphic PCR).....	63
3.4.	Caracterización bioquímica de extractos acuosos de tubérculos de <i>S. commersonii</i>	64
3.4.1.	Preparación de extractos vegetales.	64
3.4.2.	Determinación de la concentración de proteínas solubles.....	65
3.4.3.	Electroforesis en gel de poliacrilamida.	65
3.4.4.	Ensayo de actividad hemaglutinante.....	66
3.4.5.	Ensayo de inhibición de la hemaglutinación por carbohidratos.	67
3.5.	Aislamiento y purificación de las lectinas de tubérculos de <i>S. commersonii</i> y <i>S. tuberosum</i> mediante cromatografías de afinidad.....	67
3.5.1.	Preparación de adsorbentes de afinidad.	67
3.5.2.	Cromatografías de afinidad.....	69
3.5.3.	Evaluación de la actividad biológica de las lectinas de tubérculos de <i>S. tuberosum</i> y <i>S. commersonii</i>	69
4.	RESULTADOS	71
4.1.	Estudio de la diversidad genética de <i>S. commersonii</i>	71
4.1.1.	Análisis de reproducibilidad.....	71

4.1.2. Nivel de polimorfismo detectado.	73
4.1.3. Evaluación de los niveles de similitud genética (GS).	83
4.1.3.1. Análisis de agrupamiento UPGMA.	83
4.1.3.2. Correspondencia entre los diferentes sistemas de marcadores.	85
4.1.3.3. Análisis de similitud genética según el origen de las accesiones.	85
4.2. Creación de una colección caracterizada de cepas locales de <i>R. solanacearum</i>	88
4.2.1. Aislamiento e identificación.	88
4.2.2. Caracterización bioquímica.	92
4.2.3. Caracterización genética.	92
4.2.3.1. ARDRA.	92
4.2.3.2. rep-PCR.	94
4.2.4. Mantenimiento de la colección de cepas de <i>R. solanacearum</i>	96
4.3. Evaluación de la resistencia de <i>S. commersonii</i> frente a <i>R. solanacearum</i>	96
4.4. Búsqueda de marcadores moleculares vinculados con la resistencia en la interacción <i>S. commersonii</i> - <i>R. solanacearum</i>	99
4.5. Caracterización bioquímica de extractos acuosos de <i>S. commersonii</i> y evaluación de la actividad antimicrobiana frente a <i>R. solanacearum</i>	105
4.6. Purificación y evaluación de la actividad biológica de la lectina de tubérculos de <i>S. commersonii</i>	110
4.6.1. Preparación de adsorbentes para cromatografía de afinidad.	110
4.6.2. Purificación de la lectina de <i>S. tuberosum</i>	113
4.6.3. Purificación de la lectina de <i>S. commersonii</i>	114
4.6.4. Evaluación de la actividad biológica de las lectinas de tubérculos de <i>S.</i> <i>tuberosum</i> y <i>S. commersonii</i>	116
5. DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS	118
5.1. Estudio de la diversidad genética de <i>S. commersonii</i>	118
5.1.1. Estudio comparativo de marcadores RAPD, AFLP y SSR.	118
5.1.2. Correspondencia entre los distintos sistemas de marcadores.	122
5.1.3. Relación entre distancia genética y el origen de las accesiones. ..	122
5.2. Creación de una colección caracterizada de cepas locales de <i>R.</i> <i>solanacearum</i>	124
5.3. Evaluación de la resistencia de <i>S. commersonii</i> frente a <i>R. solanacearum</i>	128
5.4. Búsqueda de marcadores moleculares vinculados con la resistencia en la interacción <i>S. commersonii</i> - <i>R. solanacearum</i>	130
5.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a <i>R. solanacearum</i> en extractos acuosos de <i>S. commersonii</i>	132
5.6. Caracterización bioquímica de extractos acuosos de <i>S. commersonii</i> . ..	133
5.6.1. Purificación de la lectina de tubérculos de <i>S. commersonii</i>	133
5.6.2. Evaluación de la actividad biológica de la lectina de tubérculos de <i>S.</i> <i>commersonii</i>	135

6. CONCLUSIONES.....	137
7. BIBLIOGRAFÍA.....	140
APÉNDICE 1: Medios de cultivo.....	149
APÉNDICE 2: Optimización de un ensayo para la evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos vegetales.....	152
APÉNDICE 3: Evaluación de distintos métodos de extracción de ADN vegetal.....	154
APÉNDICE 4: Estudio de estabilidad de la lectina de tubérculos de <i>S. commersonii</i>.....	157