

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA  
COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**



Universidad Autónoma  
de Sinaloa  
**FACULTAD DE AGRONOMIA**  
Coordinación de Posgrado  
Culiacán, Sinaloa, México.

**TESIS**

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE RAZAS FISIOLÓGICAS DE  
*FUSARIUM OXYSPOURUM* F. SP. *LYCOPERSICI* EN EL ESTADO  
DE SINALOA, MÉXICO**

**QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**PRESENTA  
MENDIVIL TRUJILLO HÉCTOR RAMIRO**

**DIRECTOR DE TESIS  
DR. PEDRO SÁNCHEZ PEÑA**

**CO-DIRECTOR DE TESIS  
DR. IGNACIO EDUARDO MALDONADO MENDOZA**

**CULIACÁN DE ROSALES SINALOA, MARZO DE 2013**

Esta tesis fue realizada por **Héctor Ramiro Mendivil Trujillo**, bajo la dirección del Consejo Particular que se indica, ha sido aprobada por el mismo, y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

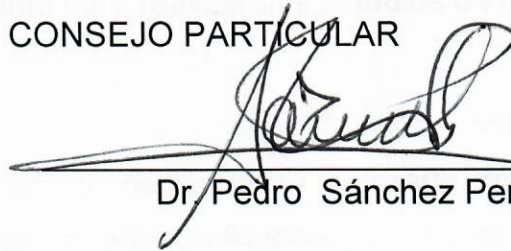
**MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**




Universidad Autónoma  
de Sinaloa  
**FACULTAD DE AGRONOMIA**  
Coordinación de Posgrado  
Culiacán, Sinaloa, México.

CONSEJO PARTICULAR


DIRECTOR

  
Dr. Pedro Sánchez Peña

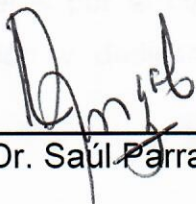
DIRECTOR

  
Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza

ASESOR

  
MC. Rey David Núñez Cebreros

ASESOR

  
Dr. Saúl Parra Terraza

ASESOR

Dr. Manuel Villareal Romero

Culiacán Sinaloa, Marzo de 2013

## **AGRADECIMIENTO**

### **A la Universidad Autónoma de Sinaloa:**

Con la cual estoy eternamente agradecido, sintiendo una gran deuda con ella. En la cual he permanecido tanto tiempo bajo su techo adquiriendo sus conocimientos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme el financiamiento para realizar mis estudios de maestría.

### **A mis maestros:**

Por brindarme el apoyo, dedicación y compartir sus conocimientos y experiencias adquiridas en su vida profesional, las cuales me sirvieron para culminar con mis estudios.

Al Dr. Pedro Sánchez Peña y al Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza por la confianza brindada, además por la enorme paciencia que siempre me demostraron y por estar al pendiente en la solución de los problemas que se me presentaron en la investigación.

Al MC. Rey David Núñez Cebreros por la confianza, amistad, su apoyo incondicional, colaboración, participación y dedicación que me brindó en la realización de esta investigación.



**Universidad Autónoma  
de Sinaloa  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
Coordinación de Posgrado  
Culiacán, Sinaloa, México.**

## DEDICATORIAS

### A DIOS

Porque gracias a él yo tengo vida. Y porque sin él, nada fuera posible.

### A MIS PADRES:

María Elvia Trujillo López y Jesús Mendivil Balderrama quienes me han dado su apoyo incondicional en los mejores y peores momentos de mi vida por ser mis ejemplos en la vida. Sabiendo que jamás existirá una forma de agradecer en esta vida de lucha y superación constante, deseo expresarles que mis esfuerzos y logros han sido también suyos, y constituyen el legado más grande que pudiera recibir con cariño, admiración y respeto. Los quiero mucho, nunca lo olviden.

### A MI ESPOSA:

Ofelia Fonseca Placencia por el amor que me ha demostrado, sus consejos, su apoyo incondicional que me han dado, lo cual me ha impulsado a salir adelante.

### A MIS HIJAS:

María Emily Mendivil Fonseca, Melany Glidden Mendivil Fonseca, Keyren Ofelia Mendivil Fonseca Y Mía Isabella Mendivil Fonseca que han sido el motor para seguir adelante.

### A MIS HERMANOS

Saúl Mendivil Trujillo, Jesús Armando Mendivil Trujillo y Efraín Mendivil Trujillo; por el gran cariño y confianza que me brindan y me hacen sentir, el cual me ha servido para superar los momentos difíciles de mi vida.



Universidad Autónoma  
de Sinaloa  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
Coordinación de Posgrado  
Culiacán, Sinaloa, México.

## CONTENIDO

Páginas

AGRADECIMIENTOS-----	i
DEDICATORIA-----	ii
CONTENIDO-----	iii
ÍNDICE DE CUADROS-----	v
ÍNDICE DE FIGURAS-----	vi
RESUMEN-----	vii
ABSTRACT-----	ix
I. INTRODUCCIÓN-----	1
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS-----	2
2.1. Hipótesis-----	2
2.2. Objetivos-----	2
2.2.1. Objetivos generales-----	2
2.2.2. Objetivos particulares-----	2
III. REVISIÓN DE LITERATURA-----	3
3.1. Generalidades del cultivo de tomate-----	3
3.2. Principales países productores de tomate-----	3
3.3. Panorama nacional de la producción de tomate-----	5
3.4. Revisión histórica del género <i>Fusarium</i> -----	7
3.5. Principales taxónomos del género <i>Fusarium</i> -----	11
3.6. <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> (Forl)-----	14
3.7. <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol)-----	14
3.7.1. Síntomas-----	17
3.7.2. Ciclo de vida de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol)-----	18
3.8. Estructura de <i>Fol</i> -----	21
3.9. Clasificación taxonómica del <i>Fusarium</i> -----	24
3.10. Distribución mundial de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol)-----	25
3.11. Panorama nacional de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol)-----	25
3.12. Panorama estatal de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol)-----	26
3.13. ADN ribosomal-----	27
IV. MATERIALES Y MÉTODOS-----	31
4.1. Área de estudio y muestreo-----	31
4.2. Reactivación de las cepas de <i>Fol</i> -----	31
4.2.1. Elaboración de medio de cultivo (PDA)-----	31
4.2.2. Siembra de cepas de <i>Fol</i> -----	33
4.2.2.1. Purificación de las cepas de <i>Fol</i> -----	33
4.2.2.2. Procedimiento de la elaboración de Caldo de Papa Dextrosa (CPD) para la reproducción de esporas de <i>Fol</i> -----	34
4.2.3. Cultivos pre-monospóricos de <i>Fol</i> por diluciones-----	35
4.2.4. Verificación de la consistencia de conidios-----	36
4.2.5. Cultivos monospóricos-----	37
4.2.6. Creación de un banco de germoplasma de <i>Fol</i> por criopreservación-----	37
4.3. Identificación molecular de <i>Fol</i> -----	38
4.3.1. Extracción de ADN-----	38
4.3.2. Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)-----	39

4.2.3. Electroforesis-----	40
4.2.4. Purificación de los productos de PCR-----	41
4.2.5. Cuantificación de los productos de PCR-----	41
4.2.6. Secuenciación de ADN-----	42
4.2.7. Análisis de la secuencias-----	42
4.3. Análisis molecular de razas de <i>Fol</i> -----	44
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----	47
5.1. Obtención de los aislados de <i>Fol</i> -----	47
5.2. Obtención de cultivos monospóricos-----	48
5.3. Identificación molecular de <i>Fusarium</i> -----	49
5.3.1. Amplificación del ADN ribosomal de <i>Fol</i> por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)-----	49
5.3.2. Identificación molecular de <i>Fusarium</i> -----	50
5.3.3. Identificación molecular de razas de <i>Fol</i> -----	54
VI. CONCLUSIONES-----	57
VII. LITERATURA CITADA-----	58
VIII. GLOSARIO-----	67



Universidad Autónoma  
 de Sinaloa  
**FACULTAD DE AGRONOMIA**  
 Coordinación de Posgrado  
 Culiacán, Sinaloa, México.

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Países con mayor producción de tomate en el mundo-----	4
Cuadro 2. Estados con mayor producción de tomate rojo en México en 2010-----	6
Cuadro 3. Eventos históricos sobre el género <i>Fusarium</i> a nivel mundial (1809-2007)-----	8
Cuadro 4. Cepa, localización, reacción de líneas diferenciales, raza y concentración de conidios de <i>Fol</i> -----	30
Cuadro 5. Ubicación de colectas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> en Sinaloa, México y su descripción de cómo se almacenan en el banco-----	32
Cuadro 6. Secuencias de referencia de la región ITS1 e ITS2 del ADNr, obtenidas de la base de datos del GenBank para el análisis filogenético	43
Cuadro 7. Primers utilizados para amplificar fragmentos de genes de poligalacturonasa-----	45
Cuadro 8. Set de primers específicos para <i>Fol1</i> y razas de <i>Fol</i> -----	46
Cuadro 9. Patrón de amplificación de los fragmentos de ADN esperado para identificar a <i>Fol1</i> y razas de <i>Fol</i> con el conjunto de oligonucleótidos de la <i>exo</i> - y <i>endo</i> -poligalacturonasa-----	46
Cuadro 10. Identificación molecular de <i>Fusarium</i> spp. de acuerdo a las comparaciones en la base de datos del Gen Bank-NCBI-----	51
Cuadro 11. Aislamientos de <i>Fol</i> que amplificaron con primers específicos-----	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Contribución mundial a la producción de tomate en 2010-----	4
Figura 2. Contribución nacional a la producción de tomate considerando la superficie sembrada en 2010-----	6
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Fusarium oxysporum</i> (Beckman, 1987)-----	19
Figura 4. Macroconidios y microconidios de <i>Fol</i> -----	22
Figura 5. Procedimiento de la elaboración del PDA-----	32
Figura 6. Procedimiento para la siembra de cepas de <i>Fol</i> -----	33
Figura 7. Procedimiento para la purificación de las cepas de <i>Fol</i> -----	34
Figura 8. Procedimiento de la elaboración de CPD para la reproducción de esporas de <i>Fol</i> -----	35
Figura 9. Procedimiento para cultivos pre-monospóricos por disoluciones-----	36
Figura 10. Verificación de la existencia de conidios de <i>Fol</i> -----	36
Figura 11. Elaboración de los cultivos monospóricos.-----	37
Figura 12. Procedimiento para la creación de un banco de germoplasma de <i>Fol</i> -----	38
Figura 13. Procedimiento para la extracción de DNA-----	39
Figura 14. Mapa de la ubicación de los oligonucleótidos ITS1- ITS4 en el ADNr de eucariotes. ITS= secuencia interna transcrita por sus siglas en inglés "internal transcribed sequence"-----	39
Figura 15. Termociclador Multigene-----	40
Figura 16. Cámara de electroforesis y fotodocumentador-----	40
Figura 17. Cuantificación del ADN en un fluorómetro (Qubit) empleando el Quant-It™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, EUA, Cat. No. Q32854)-----	42
Figura 18. Representación del alineamiento de la endo-poligalacturonasa ( <i>pg1</i> )-----	45
Figura 19. Representación del alineamiento de la exo-poligalacturonasa ( <i>pgx4</i> )-----	45
Figura 20. Distribución de razas fisiológicas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> en Sinaloa, México-----	47
Figura 21. Cepas de <i>Fol</i> en tubos de ensayos en arena-----	48
Figura 22. Colección de cepas de <i>Fol</i> criopreservada-----	48
Figura 23. Amplificación por PCR con un par de "primers" universales para hongos (ITS1 e ITS4)-----	49
Figura 24. Árbol filogenético construido con las secuencias correspondientes a la región ITS1 e ITS2 del ADNr, usando el método de Neighbor-Joining y el modelo Jukes-Cantor-----	52
Figura 25 Patrón de amplificación de los productos de PCR de los fragmentos de ADN de <i>Fol</i> 1, <i>Fol</i> r1, r2 y r3-----	55