



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Geología

ESTUDIO AEROBIOLÓGICO Y DETECCIÓN MOLECULAR
DE UREDOSPORAS DE *Phakopsora pachyrhizi*
CAUSANTE DE LA ROYA ASIÁTICA EN CULTIVOS DE
SOYA EN MÉXICO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)

P R E S E N T A

GUERRERO PARRA HILDA ADRIANA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

Dra. María del Carmen Leticia Calderón Ezquerro

COMITÉ TUTOR:

Dra. María del Rocío Reyes Montes

Dra. Concepción Toriello Nájera

TUTOR INVITADO: Dr. Antonio Palemón Terán Vargas

MÉXICO, D.F.

Marzo, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

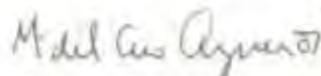
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 5 de marzo del presente, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** de la alumna **GUERRERO PARRA HILDA ADRIANA** con número de cuenta 300117321 con la tesis titulada **"ESTUDIO AEROBIOLÓGICO Y DETECCIÓN MOLECULAR DE UREDOSPORAS DE *Phakopsora pachyrhizi* CAUSANTE DE LA ROYA ASIÁTICA EN CULTIVOS DE SOYA EN MÉXICO"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA DEL CARMEN LETICIA CALDERÓN EZQUERRO**:

Presidente: DR. MIGUEL ARMANDO ULLDA SOSA
Vocal: DRA. MARÍA DEL ROCIO REYES MONTES
Secretario: DRA. MARÍA HILDA FLORES OLVERA
Suplente: DRA. MA. GRACIELA GARCÍA GUZMÁN
Suplente: DRA. CONCEPCION TORIELLO NÁJERA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 9 de abril de 2012



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente de la interesada.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM, por todo el apoyo recibido durante mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo recibido mediante la beca 240254, durante el período de febrero de 2010 a enero de 2012.

A los miembros de mi Comité Tutor: Dra. María del Carmen Calderón Ezquerro, Dra. María del Rocío Reyes Montes, Dra. Concepción Toriello Nájera y Dr. Antonio Palemón Terán Vargas por su apoyo y asesoría durante el desarrollo del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma mater.

Al Centro de Ciencias de la Atmósfera, donde desarrollé mi trabajo de investigación durante estos años, por el apoyo recibido, así como por el uso de sus instalaciones y el apoyo invaluable tanto del personal académico como administrativo.

Al Laboratorio de Bioindicadores Moleculares de Contaminación Ambiental, CCA, donde me he desarrollado académica y personalmente, donde la convivencia día a día me permitió desarrollar valores como el trabajo en equipo, el respeto y la tolerancia.

A la Dirección General de Sanidad Vegetal SENASICA-SAGARPA por apoyo del Dr. Francisco Javier Trujillo Arriaga.

Al Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario (CONACOFI) y al Dr. Hussein Sánchez Arroyo por el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

Al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (SINAVEF) y a la Dra. María Guadalupe Galindo Mendoza por el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Campo Experimental “Las Huastecas” y al Dr. Terán Vargas Antonio Palemón por permitirnos el uso de sus instalaciones para el desarrollo del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi directora de tesis Dra. María del Carmen Calderón Ezquerro, por su asesoría, apoyo incondicional y por permitirme trabajar en su proyecto de investigación.

A los distinguidos miembros del jurado, por brindarme su tiempo y por la valiosa revisión a este trabajo:

Dr. Miguel Armando Ulloa Sosa

Dra. María Hilda Flores Olvera

Dra. María del Rocío Reyes Montes

Dra. María Graciela García Guzmán

Dra. Concepción Toriello Nájera

Al Dr. Antonio Palemón Terán Vargas por su apoyo y asesoría constante para el monitoreo de cultivos de soya, por el envío de muestras y obtención de variables climatológicas de la zona de estudio.

A la Dra. María del Rocío Reyes Montes por su apoyo incondicional, sus recomendaciones y asesoría para realizar el procedimiento de extracción y detección de ADN; permitiéndome trabajar dos meses en el Laboratorio de Micología Molecular de la Facultad de Medicina, UNAM.

A la Dra. Concepción Toriello Nájera por su apoyo constante y sus invaluable aportaciones al desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Miguel Armando Ulloa Sosa por su exhaustiva revisión al presente trabajo, por sus comentarios y valiosas aportaciones.

A la Dras. María Hilda Flores Olvera y María Graciela García Guzmán por el tiempo e invaluable apoyo brindado para la revisión del presente trabajo.

Al Dr. César Guerrero Guerra por su asesoría durante el desarrollo de este trabajo y por la revisión al trabajo escrito.

Al QBP. Juan Mario Solis Paredes por su colaboración en el diseño de los oligonucleótidos Ppa1-aF y Ppa2-aR.

Al Biól. Miguel Ángel Meneses Pérez por su apoyo técnico y por la elaboración del minitúnel de viento utilizado para el trabajo experimental.

Al Área de Instrumentación Metereológica del Centro de Ciencias de la Atmósfera por colaborar siempre con apoyo técnico y en el mantenimiento del equipo utilizado:

Ing. Wilfrido Gutiérrez López

Ing. Manuel García Espinosa

Pas. Ing. Miguel Ángel Robles Roldan

Ing. Josué Vázquez Téllez



*Un poco de ciencia aleja de Dios,
pero mucha ciencia devuelve a Él...*

Louis Pasteur

DEDICATORIAS

A Dios, principio y fin, tiempo y espacio, por la complejidad y belleza de la vida ☺

A mis papás Hilda y Reynaldo, por su apoyo, comprensión y amor incondicional, por ser mi luz, mi guía y mi ejemplo. Gracias por procurar siempre mi bienestar, por impulsarme a seguir adelante, a ustedes debo mi vida. ¡Los amo muchísimo!

A Gaby, mi hermanita querida. Gracias por todo el apoyo, el ánimo y los buenos deseos, por compartir tantos momentos, por ser mi amiga incondicional. ¡Te quiero mucho!

A Alberto, por todo tu amor, apoyo y compañía, por permitirme formar parte de tu vida, por salir adelante siempre juntos. ¡Te amo!

A mi directora de tesis, Ma. Del Carmen, por ser un gran ejemplo de superación y esfuerzo, por su apoyo constante, pero sobre todo por su amistad... ¡Muchas gracias!

A toda mi familia, que siempre está con nosotros, aunque no podamos vernos tan seguido... Miriam, tía Elena, Lupita, Ale.

Karla, Rosario, Karen. Gracias por su amistad incondicional a pesar, muchas veces, de la distancia.

A mis amigos y compañeros, por su apoyo y amistad, por tanto momentos alegres Alberto, Irazú, Ale, Marisol, Laura, Vero, Vania, Ana, Gaby, Rosa, Paty, Miguel, Paola, Romano, Claudia, Jaime, Cata, Itzel, Lupita, Caro, Laura, Hortencia.

A mis amigos y compañeros del laboratorio:

Tania. Por tu amistad, por tu apoyo invaluable en mis momentos de estrés, por la plática amena y momentos agradables en el laboratorio. ¡Gracias!

César. Por resolver siempre mis dudas y apoyarme durante el trabajo... ¡Muchas gracias!

Ivonn. Por tu atención, por brindarme tu amistad y apoyo.

A todos los que de alguna manera compartieron conmigo amistad, tiempo, circunstancias, vida... ¡GRACIAS!

ÍNDICE

Índice	1
Resumen	2
Abstract	4
Introducción	6
Marco Teórico	8
• Descripción taxonómica de <i>P. pachyrhizi</i>	9
• Ciclo de vida	10
• Epidemiología	13
• Hospederos	15
• Historia de distribución	18
• Importancia económica en México	20
• Medidas de control	20
• Métodos de detección y predicción de <i>P. pachyrhizi</i>	21
• Aerobiología	24
• Aerobiología y propiedades de la atmósfera	25
• Muestreadores de aeropartículas utilizados en Aerobiología	27
Antecedentes	30
Objetivo general	32
Objetivos particulares	32
Hipótesis	33
Justificación	34
Material y métodos	35
• Monitoreo en cultivo de soya	36
• Trabajo experimental en laboratorio	39
Resultados	46
Discusión	64
Conclusiones	71
Perspectivas	73
Referencias	75

RESUMEN

La roya asiática es una enfermedad que ataca los cultivos de soya (*Glycine max* (L.) Merr.), además de otras leguminosas como jícama (*Pachyrhizus erosus* (L.) Urb.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), las cuales son de gran importancia económica en México. Esta enfermedad es causada por el hongo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd, el cual se ha diseminado principalmente por el viento a través de los continentes de Asia, África y América (Pivonia y Yang, 2004), incluyendo México.

Bajo condiciones ambientales óptimas para el desarrollo del hongo (18 a 25 °C y humedad relativa de 75-80%), la enfermedad progresa causando la defoliación severa de las plantas en tres semanas. Las pérdidas ocasionadas dependen del momento de la ocurrencia de la enfermedad y del progreso o grado en que ésta avance. La importancia de esta enfermedad radica en su alta capacidad de dispersión y el monto de las pérdidas que puede ocasionar (Terán *et al.*, 2007).

En estudios epidemiológicos, el monitoreo del inóculo de este tipo de patógenos en el aire a través del ciclo de los cultivos, así como el conocimiento de sus procesos aerobiológicos, son básicos para planificar las diferentes estrategias de manejo de la enfermedad causada por ellos. La detección temprana y la diagnosis del hongo *P. pachyrhizi* permite predecir con mayor exactitud en tiempo y espacio su presencia en el ambiente. Este patógeno ataca cultivos agrícolas en diversos estados de la República Mexicana, por lo que en este estudio se evaluó el método de monitoreo y detección por PCR del ADN de urediniosporas de *P. pachyrhizi* dispersas en la atmósfera de cultivos agrícolas. Se verificó la viabilidad de la obtención de muestras aerobiológicas de urediniosporas del hongo con la trampa de esporas tipo Hirst (Burkard Manufacturing Co.). Se estandarizó la técnica para la obtención de ADN de urediniosporas de *P. pachyrhizi* y su detección por PCR con las sondas específicas Ppa1 y Ppa2 (Frederick *et al.*,

2002). Además se diseñaron los oligonucleótidos específicos Ppa1-aF y Ppa2-aR para mejorar la sensibilidad de detección mediante una PCR anidada.

El monitoreo y detección en campo con la trampa de esporas Hirst se llevó a cabo en cultivos de soya en riesgo de infección durante el período de mayo de 2010 a noviembre de 2011 en el Municipio de Altamira, Tamaulipas. Los resultados mostraron que la detección molecular de *P. pachyrhizi* fue positiva para el período de septiembre a diciembre de 2010, y en enero, febrero y abril de 2011. Se logró oportunamente la detección de urediniosporas en el aire cinco semanas antes de que se observaran signos visibles de la enfermedad en los cultivos de soya.

ABSTRACT

Asian rust is a disease that attacks soybean crops (*Glycine max* (L.) Merr.), besides other legumes such as jicama (*Pachyrhizus erosus* (L.) Urb.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L.), that are of great economic importance in Mexico. This disease is caused by the fungus *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd, which has spread mainly by wind through Asia, Africa and America (Pivonia and Yang, 2004), including Mexico.

When the fungus grows in optimal environmental conditions (18°C to 25°C and relative humidity of 75-80%), the disease progresses and causes severe defoliation of plants in three weeks. Losses depend on the time of the disease occurrence and the progress or advance of it. The importance of this disease lies in its high capacity for dispersion, and the amount of losses that may result from it (Terán *et al.*, 2007).

In epidemiological studies, monitoring of inocula from these pathogens in the air through the crop cycle, as well as knowledge of aerobiological processes, are essential for planning different management strategies of the diseases, caused by them. Early detection and diagnosis of the fungus *P. pachyrhizi* provide us the information to predict more accurately in time and space their presence in the environment. This pathogen attacks crops in various States of Mexico, so the method of monitoring and detection of DNA by PCR from urediniospores of *P. pachyrhizi* dispersed in the atmosphere of agricultural crops was evaluated in the present study.

The reliability of aerobiological sampling of urediniospores of the fungus was tested with Hirst type spore trap. This technique was standardized for DNA purification of the urediniospores of *P. pachyrhizi* and its detection by PCR with specific primers Ppa1 y Ppa2. New primers Ppa1-aF and Ppa2-aR were designed to improve the sensitivity of detection by nested PCR.

The monitoring and detection in-field with Hirst type spore trap (Burkard Manufacturing Co.) was carried out in soybean fields with the risk of infection

during the period from May 2010 to November 2011 in the municipality of Altamira, State of Tamaulipas, Mexico. The results showed that the molecular detection of *P. pachyrhizi* was positive for the period from September to December 2010 and January, February and April 2011. The detection of airborne urediniospores was achieved five weeks before visible signs of the disease were observed in the soybean crops.

INTRODUCCIÓN

La roya asiática es una enfermedad que afecta a más de 90 especies de leguminosas (Tadashi, 2006), destacando el cultivo de la soya (*Glycine max* (L.) Merr.), además de otras leguminosas como jícama (*Pachyrhizus erosus* (L.) Urb.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Es causada por el hongo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd, y se reportó por primera vez en Japón en 1902. Se ha diseminado a través del tiempo en Asia, África y América (Bromfield, 1984; Yeh, 1989).

En México se detectó por primera vez en 2005, dañando cultivos de soya en los Municipios de Altamira (Tamaulipas), Ébano y Tamuín (San Luis Potosí), así como en las áreas productoras de la Planicie Huasteca (sur de Tamaulipas, oriente de San Luis Potosí y norte de Veracruz). En esta planicie se siembra un promedio de 60 mil hectáreas de soya, que constituyen el 76% de la superficie nacional cultivada con 78,222 toneladas, que representan el 66% de la producción nacional de este cultivo. Esta importante región productora de soya se encuentra en alerta ante la amenaza de esta enfermedad (Terán, 2005). En febrero de 2007, el hongo se detectó en Papantla, Veracruz, en cultivos de jícama, reduciendo la calidad de sus bulbos y su rendimiento. A la fecha se han tenido reportes en toda la región productora de soya de San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz, Campeche y Chiapas.

El daño ocasionado por el ataque de la roya asiática puede ocasionar pérdidas de hasta el 100%, y varía con el estado de desarrollo de la planta. Una defoliación temprana afecta el número de vainas por planta y granos por vaina, así como el tamaño de las semillas. Un daño moderado de la enfermedad reduce el número de semillas por vaina y el peso de las semillas (Terán, 2005).

El viento es el principal factor que disemina la enfermedad causada por *P. pachyrhizi* (Terán, 2005; Ávila, 2006). Nubes de urediniosporas son liberadas si las plantas infectadas son movidas por el viento o por personas caminando a través de áreas infectadas por roya. Personas que están muestreando la roya de la soya pueden transportar urediniosporas desde un área hacia otra en la ropa, por

lo que se deben tomar precauciones para prevenir la dispersión de la roya de la soya en áreas no infectadas (USDA, 2004; Isard *et al.*, 2005; Hartman y Haudenshield, 2009).

La detección temprana de patógenos de plantas puede predecir con mayor exactitud la enfermedad y mejorar la precisión en la aplicación de fungicidas. Por lo tanto, es de primordial importancia desarrollar estrategias de control basadas en monitoreos ambientales y en valoración de riesgo de la enfermedad (Sweet *et al.*, 1992).

El monitoreo de esporas dispersas en el aire proporciona una medida directa del riesgo de infección del cultivo. Por lo anterior, en el presente trabajo se pretende aplicar este método de vanguardia, para detectar ADN específico de urediniosporas de *P. pachyrhizi* colectadas de la atmósfera de parcelas centinelas o cultivos de soya en el estado de Tamaulipas. Esto permitirá estimar la cantidad de urediniosporas en el aire a través de un ciclo agrícola, con el fin de evaluar su presencia en el ambiente antes de que infecten a los cultivos, o antes de que éstos presenten síntomas de la enfermedad.

Los datos obtenidos servirán para contribuir con la vigilancia epidemiológica del hongo causante de la roya asiática y para su prevención y control mediante el uso de fungicidas de manera apropiada en cantidad y en tiempo, evitando su aplicación cuando ésta no sea requerida, lo que contribuirá al fortalecimiento de una agricultura moderna, que no contamine a la vegetación, a la salud del hombre, de los animales, y la calidad del ambiente, como ocurre con la aplicación indiscriminada de los fungicidas.

MARCO TEÓRICO

La roya de la soya es causada por dos especies de hongos del género *Phakopsora*: *P. meibomiae* (Arthur) Arthur y *P. pachyrhizi* Syd. & P. Syd, las cuales fueron separadas taxonómicamente por Ono *et al.*, (1992) mediante un estudio con base en caracteres morfológicos y confirmadas posteriormente por Frederick *et al.*, (2002) mediante el análisis de secuencias de nucleótidos. Ambas especies poseen estructuras morfológicas muy parecidas (Figura 1) y causan en las plantas una sintomatología similar. Sin embargo, difieren fundamentalmente en la intensidad de los daños que provocan en el cultivo (Ploper y Devani, 2002).

La roya americana de la soya es causada por *P. meibomiae*, y no provoca daños de consideración ya que es menos agresiva (Ono *et al.*, 1992; Bonde *et al.*, 2006). Fue encontrada por primera vez en Puerto Rico en 1974 (Ploper, 2004). Está presente en forma natural en el continente Americano (Yorinori *et al.*, 2004), desde Puerto Rico, el Caribe, hasta el sur de Brasil, incluyendo México (Bromfield, 1984, citado por Terán *et al.*, 2007). Se puede encontrar en zonas con temperaturas menores a 25 °C y humedad relativa alta. Rara vez ocasiona pérdidas en el cultivo (Hartman *et al.*, 2004; Terán *et al.*, 2007).

La roya asiática de la soya es causada por *P. pachyrhizi* y es causante de pérdidas importantes en cultivos de leguminosas, principalmente de soya, las cuales pueden llegar a ser mayores del 90% (Terán *et al.*, 2007).

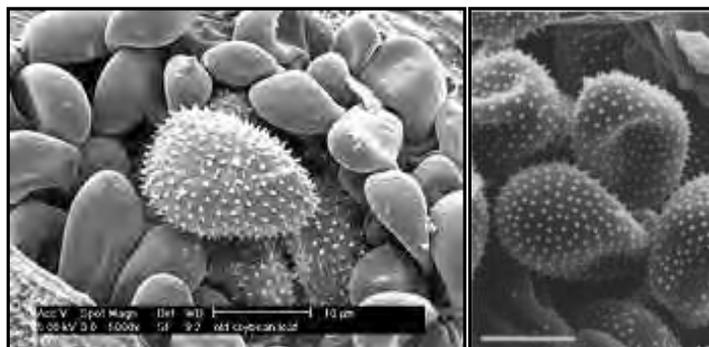


Figura 1: Urediniosporas de *P. pachyrhizi* (izquierda) y *P. meibomiae* (derecha) (escala 10 μ m). Ambas especies son morfológicamente similares, sin embargo, la intensidad de los daños que producen en los cultivos es diferente.

Descripción taxonómica de *P. pachyrhizi*

P. pachyrhizi (anamorfo: *Malupa sojae*) es un hongo perteneciente a la familia Phakopsoraceae, ubicada dentro del orden Pucciniales del phylum Basidiomycota (Cummins y Hiratsuka, 2003) (Tabla 1):

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>P. pachyrhizi</i> .
Dominio: Eukaryota
Reino: Fungi
Phylum: Basidiomycota
Subphylum: Pucciniomycotina
Clase: Pucciniomycetes
Orden: Pucciniales
Familia: Phakopsoraceae
Género: <i>Phakopsora</i>
Especie: <i>Phakopsora pachyrhizi</i>

P. pachyrhizi presenta uredinios subepidermales en la base, los cuales están rodeados de paráfisis que surgen del pseudoparénquima. Los uredinios se agrupan en uredosoros (pústulas), las cuales tienen apariencia polvosa, con coloración café canela pálido (Ono *et al.*, 1992). Las urediniosporas son de forma ovoide a elipsoidal y su color varía de hialino a café pálido, con una pared celular delgada y minuciosamente equinulada (Schneider *et al.*, 2005); miden de 18 a 37 μm x 15 a 24 μm (Figura 2).



Figura 2. Urediniosporas de *P. pachyrhizi* observadas en microscopio de campo claro (40x)

Los telios tienen capas de 2 a 7 teliosporas. Se encuentran frecuentemente mezclados con los uredinios. Los telios subepidermales son hipófilos, costrosos y varían de color café medio a café oscuro. Las teliosporas son unicelulares, de 15 a 26 x 6 a 12 μm , de oblongas a elipsoidales; son hialinas o color café pálido (Ono *et al.*, 1992).

Los telios y las teliosporas han sido reportados en sólo 6 de 87 hospederos en la naturaleza (Yeh *et al.*, 1981; Sinclair, 1982). Las teliosporas no se consideran como la fuente principal de infección y no son observadas frecuentemente en el campo. Son estructuras de resistencia y se ha reportado su germinación para producir basidios con basidiosporas únicamente bajo condiciones de laboratorio (Ono, *et al.*, 1992; Saksirirat y Hoppe, 1991b; USDA, 2004).

Ciclo de vida

El ciclo de vida de las royas tiende a ser complejo, involucra diferentes tipos de esporas con especialización para determinados hospederos. La reproducción sexual de las royas dicarióticas involucra la formación de teliosporas, cariogamia y división reduccional, terminando con la formación de basidiosporas haploides que infectan al hospedero sobre las cuales se formaron, o en el caso de royas heteroicas, los hospederos alternativos.

En el caso de *P. pachyrhizi*, existe poca información acerca de su reproducción sexual (Goellner *et al.*, 2010). Aunque se han observado teliosporas en algunos hospederos, incluyendo la soya, su germinación nunca ha sido reportada bajo condiciones naturales (Bromfield, 1984; citado por Goellner *et al.*, 2010); no se tiene conocimiento sobre el proceso de infección basidial o si *P. pachyrhizi* es una roya autoica o heteroica. No se han observado espermacios ni eciosporas, los cuales son estructuras que se forman en los hospederos alternativos (Bromfield, 1984; citado por Goellner *et al.*, 2010).

P. pachyrhizi forma urediniosporas asexuales en pedúnculos cortos dentro de un uredinio de 5 a 8 días después de la colonización en las hojas del hospedero (Figura 3). Las urediniosporas son liberadas de los uredinios a través de un ostiolo y dispersadas por el viento. Las primeras urediniosporas pueden producirse a los nueve días después de la infección, dando inicio a un nuevo ciclo del hongo en la misma planta, en plantas adyacentes, o pueden ser transportadas por el viento a grandes distancias. El uredinio puede producir esporas durante unas tres semanas, de tal manera que a partir de la infección inicial, e infecciones subsecuentes, se puede mantener la esporulación por cerca de 15 semanas (Miles *et al.*, 2004, citado por Terán *et al.*, 2007).

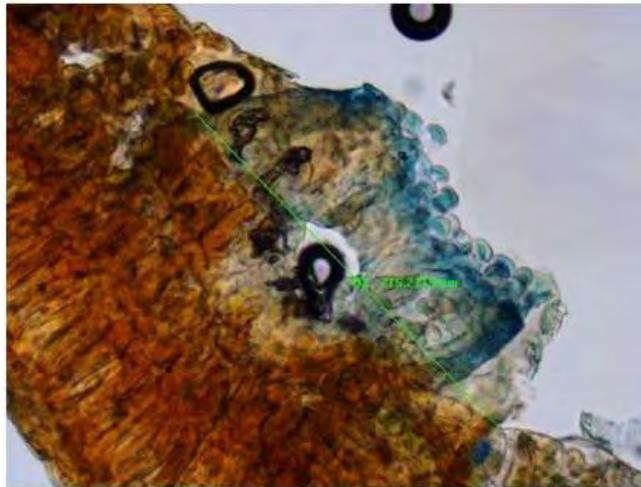


Figura 3. Uredinio de *P. pachyrhizi* observado en microscopio de campo claro (20x).

Las urediniosporas germinan mediante la formación de un tubo germinativo, el cual forma un apresorio globoso no ornamentado, que es del mismo tamaño de una urediniospora. Debido a que se ha observado la formación de los apresorios en membranas artificiales de celulosa y nitrato, se sugiere que su desarrollo se deba a reacciones de tigmotropismo principalmente (Goellner *et al.*, 2010).

En contraste con las infecciones derivadas de urediniosporas por la mayoría de las royas, *P. pachyrhizi* penetra directamente en las hojas, en vez de utilizar los estomas como vía de entrada. La penetración de *P. pachyrhizi* a través de los

estomas ha sido observada ocasionalmente en plantas no hospederas, como la cebada, en la cual el hongo fue capaz de colonizar el mesófilo pero no logró esporular (Hoefle, *et al.*, 2009). La penetración por *P. pachyrhizi* comienza por la formación de una estructura con forma de embudo llamada como apresorio dentro del apresorio (Koch *et al.*, 1983). En la penetración, el colapso de las células de la epidermis del hospedero llega a ser desorganizada y muestran signos de muerte celular. Después de la penetración, la hifa crece a través de las células de la epidermis y alcanza el espacio intercelular; se forma un septo, el cual la separa de la hifa primaria o hifa invasora (Bromfield, 1984).

La hifa primaria se puede ramificar para formar hifas secundarias y, finalmente, las células madres del haustorio se diferencian cuando entran en contacto con las células del mesófilo. La formación del primer haustorio se observa de 24 a 48 horas después del contacto inicial entre las urediniosporas y un hospedero susceptible. A partir de ese momento, ocurre una colonización intensa del tejido del mesófilo y los espacios intercelulares de la hoja se llenan con micelio. La reproducción asexual de *P. pachyrhizi* se completa cuando se originan nuevos uredinios (Koch *et al.*, 1983) (Figura 4).

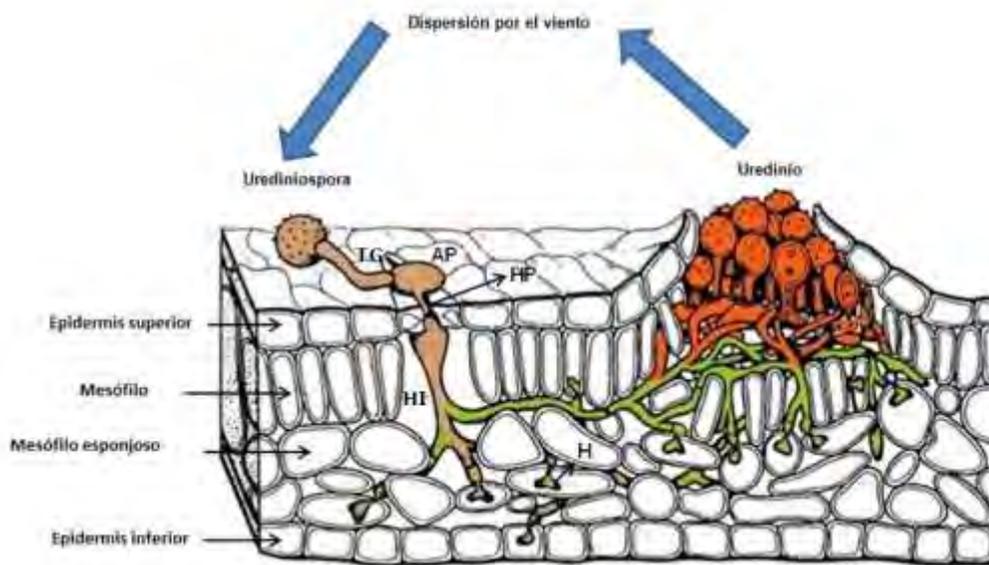


Fig. 4. Ciclo de vida: estructura interna de una hoja de un hospedero infectado con *P. pachyrhizi*: TG, Tubo germinativo; AP, apresorio; HP, hifa de penetración o invasora ; HI, Hifa infectiva; H, haustorio. Modificado de Hahn (2000).

Epidemiología

P. pachyrhizi es un patógeno que no sobrevive en los residuos de cosecha infectados, pero sí lo puede hacer en plantas voluntarias (las que nacen después de la cosecha) (Terán *et al.*, 2007). Las urediniosporas, que pueden sobrevivir hasta 50 días, principalmente en presencia de alta nubosidad (Isard *et al.*, 2006), son dispersadas con facilidad por el viento. Esta característica posibilita que la enfermedad pueda ser diseminada a grandes distancias (Plopper y Devaní, 2002).

Nubes de urediniosporas son liberadas si las plantas infectadas son movidas por el viento o por personas caminando a través de áreas infectadas por roya. Personas que están muestreando la roya de la soya pueden transportar urediniosporas desde un área hacia otra en la ropa, por lo que se deben tomar precauciones para prevenir la dispersión de la roya de la soya en áreas no infectadas (USDA, 2004; Isard *et al.*, 2005; Hartman y Haudenschild, 2009).

Las condiciones favorables de la enfermedad son principalmente temperaturas entre 18 y 25 °C y humedad relativa de 75 a 80 %, las cuales permiten presencia de punto de rocío en la planta (Plopper y Devani, 2002; Terán *et al.*, 2007). En condiciones óptimas, las urediniosporas germinan de una a cuatro horas después de la deposición en la superficie de la hoja, y la penetración de la hoja ocurre en seis horas a temperaturas de 20 a 25 °C.

La mayor tasa de infección se presenta con períodos de 10 a 12 horas de rocío; la interrupción del rocío produce bajas tasas de infección (Hartman *et al.*, 2004). Temperaturas debajo de los 15 °C y arriba de 28 °C, reducen el número de lesiones y hacen más lento el desarrollo de la enfermedad (Ploper y Devani, 2002; Hartman *et al.*, 2004).

Se ha observado que el desarrollo de la enfermedad es afectado por el patrón de precipitación; el mayor desarrollo ocurre cuando la precipitación está bien distribuida a través de la estación de crecimiento, por lo que la severidad de

la roya está positivamente correlacionada con el número de días con lluvia durante el llenado de vaina (Tschanz, 1982; Hartman, 1995, Terán *et al.*, 2007).

Es importante considerar que se trata de un patógeno policíclico, es decir que durante el ciclo del cultivo se producen varias generaciones del patógeno. Si a esto se le suma el hecho de que cada uredinosoro (pústula) produce numerosas urediniosporas, resulta evidente que la enfermedad puede llegar a desarrollarse muy rápidamente si se presentan condiciones ambientales favorables. Además, el patógeno penetra en forma directa a través de la cutícula y la epidermis del hospedante, lo que hace que la infección sea rápida y fácil (Plopper y Devani, 2002; Terán *et al.*, 2007).

Los primeros síntomas o lesiones se presentan en toda la parte aérea de la planta, poco antes o durante la floración y llenado de grano, conforme avanza la enfermedad hacia el tercio medio y superior de la planta, las hojas se tornan amarillentas y las lesiones se manifiestan como pústulas pequeñas de color marrón-amarillento a marrón-rojizo u oscuro (Figura 5).



Figura 5. Hojas de soja con pústulas de *P. pachyrhizi*.

Las lesiones se presentan en el tercio inferior como consecuencia a mayor humedad y baja luminosidad. Bajo condiciones ambientales óptimas, la infección progresa con rapidez hacia las hojas medias y superiores de la planta causando defoliación severa (Terán, *et al.*, 2007).

Los síntomas de la roya pueden ser confundidos con otras enfermedades de la soya, como la mancha marrón causada por el hongo *Septoria* sp., pústula bacteriana causada por *Xanthomonas* sp., y mildiú vellosa causado por *Peronospora manshurica*, principalmente; sin embargo, en ningún caso se observa la formación de pústulas en el envés de la hoja (Terán *et al.*, 2007).

Hospederos

P. pachyrhizi infecta de forma natural 31 especies de leguminosas agrupadas en 17 géneros de la familia Fabaceae (Goellner, *et al.*, 2010), muchas de ellas presentes en México (Tabla 2). En ausencia de soya, sirven como hospederos alternantes y son importantes fuentes de inóculo en la estación de crecimiento. Sin embargo, se ha reportado que *P. pachyrhizi* tiene la capacidad de infectar y esporular, aunque en menor grado, en 60 especies adicionales de plantas (26 géneros) cuando son inoculadas artificialmente (Ono *et al.*, 1992), muchas de ellas de uso comercial como algunos forrajes utilizados en la producción ganadera, tanto locales como introducidos (Terán *et al.*, 2007) (Tabla 3).

La mayor parte de los hospederos alternantes de *P. pachyrhizi* registrados en el mundo se encuentran en el continente americano, desde Canadá hasta Argentina (Terán *et al.*, 2007). En Canadá se han encontrado cuando menos siete especies de plantas silvestres que están consignadas como hospederas, mientras que en Argentina se registraron 91 especies que potencialmente pueden ser atacadas por el hongo que provoca la enfermedad (Lacroix, 2004; Terán *et al.*, 2007).

Tabla 2. Hospederos alternantes más comunes de la roya de la soya (*P. pachyrhizi*) en América (Yorinori, 2006). Tomado de Terán et al., 2007

Nombre científico	Nombre común
<i>Alyscarpus glumaceus</i>	Trébol
<i>Cajanus cajan</i>	Guandú o chícharo silvestre
<i>Centrosema pubescens</i>	Centrosema o chícharo mariposa
<i>Crotalaria anagyroides</i> *	Manduvira
<i>Delonix regia</i> *	Flamboyán
<i>Desmodium sp.</i> *	Carrapiceo
<i>Glycine clandestina</i> *	Soya
<i>Glycine tabacina</i>	Soya
<i>Glycine falcata</i>	Soya
<i>Glycine tabacina var. Latifolia</i>	Soya
<i>Lablab purpureus</i>	Frijol jacinto
<i>Lotus americana</i>	Trébol
<i>Lupinus hirsutus</i>	Lupino azul
<i>Macroptilium atropurpureum</i>	Siratro o frijol morado
<i>Maocrotyloma axillare</i>	Macrotiloma
<i>Medicago arborea</i>	Alfalfa gigante
<i>Melilotus officinalis</i> *	Trébol
<i>M. spaciosus</i>	Especie de trébol
<i>Mucura cochinchinesis</i>	Mucura o frijol terciopelo
<i>Neonatonia wightii</i>	Soya perenne
<i>Pachyrhizus erosus</i> *	Jícama
<i>Phaseolus lunatus</i> *	Frijol lima
<i>Phaseolus vulgaris</i> *	Frijol común
<i>Pueraria lobata</i> *	Kudzu
<i>P. phaseoloides</i>	Kudzu tropical
<i>Rhynchosia minima</i>	Least snoutbean
<i>Sesbania exaltata</i> *	Sesbania
<i>Sesbania vesicaria</i> *	Sesbania
<i>Trigonella foenumgrasecum</i>	Fenugreco
<i>Vicia dasycarpa</i>	Vaina morada
<i>Vigna unguiculata</i> *	Caupí o sarabando
<i>Vigna radiata</i>	Frijol mungo
*Especies presentes en México	

Tabla 3. Plantas que desarrollan síntomas de *P. pachyrhizi* y que son potenciales hospederas de la enfermedad (Terán et al., 2007)

Nombre científico	Nombre común	Nombre científico	Nombre común	Nombre científico	Nombre común
<i>Alysicarpus glumaceus</i> *	Trébol	<i>Glycine latrobeana</i>	Soya	<i>Medicago arborea</i>	Frijol gigante
<i>Alysicarpus vaginalis</i> *	Trébol	<i>Glycine max</i> ✓	Soya	<i>Melilotus officinalis</i> ✓	Trébol dulce
<i>Cajanus cajan</i> ✓	Chícharo silvestre	<i>Glycine microphylla</i>	Soya	<i>Melilotus speciosus</i>	Trébol dulce
<i>Cajanus sp.</i> ✓	Gandú	<i>Glycine soja</i>	Soya	<i>Mucuna cochinchinensis</i>	Frijol terciopelo
<i>Calopogonium ucunoides</i>		<i>Glycine spp.</i>	Soya	<i>Neonotonia wrightii</i> *	Soya perenne
<i>Canavalia gladiata</i>	Frijolillo	<i>Glycine tabacina</i>	Soya	<i>Pachyrhizus erosus</i>	Jícama
<i>Canavalia maritima</i>	Frijolillo	<i>Glycine tomentella</i>	Soya	<i>Phaseolus coccineus</i>	Ayocote
<i>Cassia occidentales</i>	Septiweed	<i>Hardenbergi violacea</i>		<i>Phaseolus lunatus</i> ✓	Frijol lima
<i>Centrosema pubescens</i> ✓	Chícharo mariposa	<i>Kennedia coccinea</i>	Trébol de vaca	<i>Phaseolus spp.</i>	Frijolillo
<i>Clitoria ternatea</i>	Asian pigeonwings	<i>Kennedia prostrata</i>	Trébol de vaca	<i>Phaseolus vulgaris</i> ✓	Frijol común
<i>Coronilla varia</i>	Purple crownycht	<i>Kennedia rubicunda</i>	Trébol de vaca	<i>Pisum sativum</i> ✓	Chícharo
<i>Crotalaria anagyroides</i> * ✓	Manduvira o cascabelillo	<i>Kennedia spp.</i>	Trébol de vaca	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	Frijol alado
<i>Crotalaria dissaromoensis</i>	Manduvira o cascabelillo	<i>Kummerowia stipulacea</i>	Trébol coreano	<i>Psoralea tenax</i>	
<i>Crotalaria linifolia</i>	<i>Crotalaria</i> o cascabelillo	<i>Kummerowia striata</i>	Trébol japonés	<i>Pueraria phaseoloides</i> * ✓	Kudzu tropical
<i>Crotalaria pallida</i>	<i>Crotalaria lisa</i>	<i>Lablab purpureus</i> *	Frijol jacinto	<i>Pueraria lobata</i> ✓	Kudzu
<i>Crotalaria spp.</i> ✓	Cascabelillo	<i>Lespedeza bicolor</i>	Shrubry lespedeza	<i>Rhynchosia minima</i>	Least snoutbean
<i>Crotalaria spectabilis</i>	<i>Crotalaria vistosa</i>	<i>Lespedeza juncea</i>	Chinese lespedeza	<i>Sesbania exaltata</i> ✓	Sesbania
<i>Delonis regia</i> *	Flamboyán	<i>Lotus americana</i>	Trébol	<i>Sesbania sericea</i>	Papagayo
<i>Desmodium discolor</i>	Carrapiceo	<i>Lotus major</i>	Trébol	<i>Sesbania vesicaria</i> ✓	Sesbania
<i>Desmodium hytidophyllum</i>	Carrapiceo	<i>Lotus purshianus</i>	Trébol	<i>Teramnus uncinatus</i>	Cresta de gallo
<i>Desmodium spp.</i> ✓	Carrapiceo	<i>Lupinus albus</i>	Lupino blanco	<i>Trifolium incamatum</i>	Trébol
<i>Desmodium triflorum</i> *	Carrapiceo	<i>Lupinus angustifolius</i>	Lupino morado	<i>Trifolium repens</i> ✓	Trébol blanco
<i>Desmodium varians</i>	Carrapiceo	<i>Lupinus hirsutus</i>	Lupino azul	<i>Trigonella foenumgraecum</i>	Fenugreco
<i>Dolichos axillarisis</i>		<i>Lupinus luteus</i>	Lupino amarillo	<i>Vicia desycarpa</i>	Vaina morada
<i>Glycine argyrea</i>	Soya	<i>Lupinus spp.</i> ✓	Lupino o mazorquilla	<i>Vicia faba</i>	Haba
<i>Glycine canascens</i>	Soya	<i>Macroptilium atropurpureum</i>	Frijol morado	<i>Vigna luteola</i>	Hairy pod cowpea
<i>Glycine clandestina</i> ✓	Soya	<i>Macroptilium bracteatum</i>	Frijol arbustivo	<i>Vigna mungo</i>	Black gran
<i>Glycine curvata</i>	Soya	<i>Macroptilium lathyroides</i>	Frijol arbustivo	<i>Vigna radiata</i>	Frijol mungo
<i>Glycine cyrtoloba</i>	Soya	<i>Macroptilium spp.</i>	Frijol silvestre	<i>Vigna spp.</i>	Frijol silvestre
<i>Glycine falcata</i>	Soya	<i>Macrotyloma axillare</i>		<i>Vigna unguiculata</i> ✓	Caupí o sarabando
<i>Glycine latifolia</i>	Soya				

*Especies utilizadas comercialmente como forraje

✓ Especies presentes en México

Historia de distribución

P. pachyrhizi fue identificada por primera vez en Japón en 1902; luego fue detectada en India (1906), Australia (1934), China (1940), sudeste de Asia (1950) y Rusia (1957). Durante muchos años permaneció restringida a Asia y Australia, hasta ser reportada en Hawaii en 1994; luego en el continente africano (desde Uganda hasta Sudáfrica) a partir de 1996, y en Sudamérica a partir de 2001 (Ploper y Devani, 2002). En 2004 se reportó por primera vez en Estados Unidos de América (Figura 6).

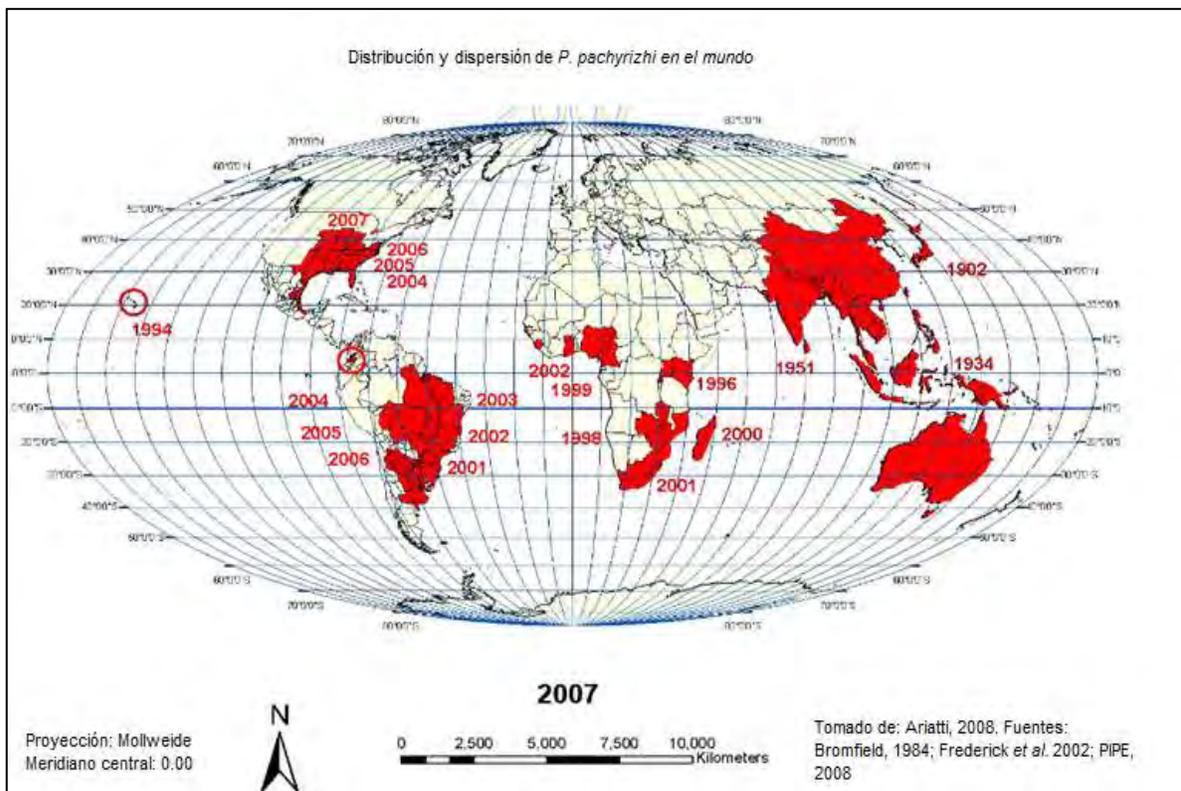


Figura 6. Distribución y dispersión de *P. pachyrhizi* en el mundo (Ariatti, 2008).

En México la enfermedad se detectó en noviembre de 2005, en siembras comerciales de soya en los municipios de Ébano y Tamuín, San Luis Potosí y Altamira, Tamaulipas; en este último municipio se detectó en un lote comercial en el Ejido “3 de Mayo”, sembrado el 4 y 13 de agosto de 2005 con la variedad Huasteca 200 y confirmada el 16 de febrero de 2006 en el portal de alerta fitosanitaria de la Organización Norteamericana de Protección a las Plantas

(Cárcamo y Aguilar, 2006; NAPPO, 2006). En febrero y marzo del 2006 se presentó en la región de las Huastecas en siembras de soya de otoño-invierno y plantas voluntarias de soya (nacencias) dentro de los cultivos de cártamo, sorgo y maíz, principalmente. Durante el ciclo primavera-verano 2006 la enfermedad no se detectó en la Planicie Huasteca, debido a la escasa precipitación que se presentó (Terán *et al.*, 2007). En otras regiones productoras del trópico húmedo de México como Campeche y Chiapas, tampoco se detectó, aunque existieron condiciones propicias. A finales del 2006 se detectó y confirmó su presencia, afectando el cultivo de jícama en el municipio de Papantla, Ver., donde causó severas pérdidas en 1,800 ha. Desde esa fecha, se ha reportado en zonas de San Luis Potosí, Veracruz, Tamaulipas, Chiapas y Campeche (Tabla 4).

Tabla 4. Distribución de <i>P. pachyrhizi</i> en México 2005-2011 (SINAVEF, 2011)				
Año	Mes	Localidad	Estado	Cultivo
2005	Octubre, Noviembre	Las Huastecas (Ébano, Tamuín y Altamira)	San Luis Potosí y Tamaulipas	Soya
2006	Febrero, Marzo	Las Huastecas (Ébano, Tamuín y Altamira)	San Luis Potosí, Veracruz y Tamaulipas	Soya
2006	Noviembre	Altamira	Tamaulipas	Soya
2007	Febrero	Puxtla, Papantla	Veracruz	Jícama
2007	Febrero, Marzo	Las Huastecas (Ébano, Tamuín y Altamira)	San Luis Potosí, Veracruz y Tamaulipas	Soya
2007	Noviembre	Las Huastecas (Ébano, Tamuín y Altamira)	San Luis Potosí, Veracruz y Tamaulipas	Soya, jícama
2008	Junio	Mastepec	Chiapas	Jícama
2008	Septiembre	Las Huastecas (Ébano, Tamuín y Altamira)	San Luis Potosí, Veracruz y Tamaulipas	Soya
2008	Noviembre	Campeche	Campeche	Soya
2009	Octubre	Tapachula	Chiapas	Soya
2009	Noviembre	Río Bravo, Valle Hermoso y González; Puxtla, Papantla	Tamaulipas, Veracruz	Soya, jícama
2010	Abril	González, El Mante, Altamira y Aldama	Tamaulipas	Soya
2011	Agosto	Escárcega, Hopelchén, Tapachula, Ébano, Aldama, Xicoténcatl, Papantla	San Luis Potosí, Veracruz, Tamaulipas, Campeche y Chiapas	Soya
2011	Octubre	El Mante	Tamaulipas	Soya
2011	Noviembre	El Mante, Pánuco, Ébano y Ciudad Fernández	San Luis Potosí, Veracruz y Tamaulipas	Soya

Importancia económica en México

Esta enfermedad se ha presentado durante los últimos años en cultivos de soya del país; en Veracruz se reportaron grandes pérdidas en jícama. También puede llegar a atacar frijol (*Phaseolus vulgaris*), haba (*Vicia fabae*) y chícharo (*Pisum sativum*) (SINAVEF, 2009). Las pérdidas económicas, tan sólo en tres hospederos, soya, frijol y jícama, cultivos de importancia económica para el país, representan cerca de 1.4 millones de toneladas, equivalentes a 11 mil millones de pesos (SINAVEF, 2010) (Tabla 5).

Tabla 5. Cultivos afectados por la roya asiática y su importancia representada en superficie y valor de la producción			
Cultivo	Superficie cultivada (Ha)	Producción (Ton)	Valor de la producción (Miles de pesos)
Soya	88,093.00	153,022.20	\$ 696,763.63
Frijol	1,626,021.82	1,111,087.37	\$ 10,179,369.77
Jícama	6,884.85	180,045.85	\$ 479,422.51
Total	1,720,999.67	1,444,155.42	\$ 11,355,555.91

Medidas de Control

El control de la enfermedad se puede conseguir mediante un manejo que incluye control cultural, control legal y control químico, principalmente. El control mediante variedades resistentes, que es lo ideal, no se ha conseguido hasta la fecha, aunque se tienen identificados algunos genes que pueden conferirle a la planta esa característica, los cuales han sido denominados como Rpp 2 y Rpp 4 (Tadashi, 2006).

Dentro de las estrategias de tipo cultural está la eliminación de hospederos alternantes, incluyendo la “nacencia” de soya en otros cultivos; las fechas de siembra tempranas que permiten a la planta escapar al período favorable climáticamente para el desarrollo de la enfermedad; la utilización de variedades precoces, cuya exposición a la infección sea menor, y el monitoreo constante de la enfermedad a través de cultivos centinela y en cultivos establecidos en las fechas

de siembra recomendadas, intensificándose cuando las condiciones climáticas sean favorables para la enfermedad (Ávila, 2006).

Dentro de las acciones legales se recomienda respetar las fechas de siembra determinadas para cada región; la restricción o incluso la eliminación de siembras de invierno para destruir el “puente verde” entre un ciclo y otro, y también se considera la eliminación obligada de nacencias de soya en otros cultivos o en terrenos abandonados, considerando que el hongo sobrevive más allá de 50 días (Ávila, 2006).

Para realizar el control químico, existen en el mercado dos grandes grupos de productos que deben utilizarse tomando en cuenta las características de cada uno. Los triazoles son productos curativos que tienen una residualidad de 14 días y las estrobilurinas, que son productos preventivos, tienen una residualidad de 21 días. Para cualquiera de los casos, es muy importante conocer el estado de los síntomas en la planta, su estado de desarrollo y las condiciones climáticas prevalecientes, lo que será muy útil para la toma de decisiones al momento de escoger el producto que garantice un control más eficiente (Ávila 2006).

Métodos de detección y predicción de *P. pachyrhizi*

P. pachyrhizi es un hongo fitopatógeno de fácil diseminación y distribución mundial. La problemática que enfrenta la producción de cultivos económicamente importantes a causa de este patógeno, ha derivado en la búsqueda y desarrollo de métodos que permitan su detección y predicción oportunas, para llevar a cabo acciones que permitan contrarrestar o evitar los daños ocasionados por la enfermedad:

- Métodos de muestreo en cultivos. Para determinar la presencia de *P. pachyrhizi* directamente en las hojas de los cultivos de soya, se realizan recorridos de muestreo en la parcela. Para ello se muestrea en un patrón X o W (cada 50 a 100 metros), el cual debe iniciarse antes de la floración o al

presentarse las condiciones de temperatura y humedad propicias para el desarrollo de la enfermedad. Se examinan las hojas en el tercio inferior de la planta tratando de encontrar un manchado amarillento y pústulas en el envés de las hojas. Además se observan las áreas del cultivo que presenten color amarillento o café y las zonas con mayor densidad de plantas, aun si no se encuentran dentro del trazo del recorrido de muestreo (Terán *et al.*, 2007). Por otra parte, se han desarrollado métodos para la detección de la roya asiática mediante el análisis de imágenes multiespectrales de las áreas de cultivo (Cui, *et al.*, 2010).

- Métodos de diagnóstico. La presencia de roya en campo se puede determinar mediante el uso de tiras inmunocromatográficas, las cuales son capaces de detectar la presencia del patógeno en los estadios iniciales de la infección; son diseñadas para usarse en tejido foliar (Enviro Logix, 2007). Asimismo, se puede utilizar en laboratorio la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de *P. pachyrhizi* con oligonucleótidos específicos (Frederick *et al.*, 2002; Lamour *et al.*, 2006).
- Métodos de predicción. Debido a que la dispersión de la roya asiática se da principalmente por la liberación y transporte de urediniosporas a través del viento, Isard *et al.* (2005) propusieron un Sistema de Modelado Aerobiológico (IAMS, por sus siglas en inglés) el cual fue diseñado para pronosticar la incursión y dispersión del patógeno en Estados Unidos de América. Para ello se utilizan variables meteorológicas, de distribución y abundancia del patógeno, así como de su biología y capacidad de sobrevivencia. La información de su distribución se determina por medio del monitoreo en parcelas de cultivo y en parcelas centinelas, siendo estas últimas diseñadas especialmente para la vigilancia del hongo. En ellas se realiza la detección de *P. pachyrhizi* directamente en las plantas, o de urediniosporas por medio de su colecta en trampas colectoras de lluvia (Isard, *et al.*, 2011) o en trampas de esporas pasivas (Steinlage *et al.*,

2006), las cuales colectan directamente las urediniosporas del aire por impacto sobre un portaobjetos con vaselina. Tanto el pronóstico obtenido por el IAMS, como la información de la distribución de enfermedad en Estados Unidos y México se reporta en la página web de la Plataforma de Información para la Educación y Extensión (PIPE, 2012), la cual se creó para brindar información a los productores de E.U. para la prevención y manejo oportuno de la enfermedad.

Aerobiología

La Aerobiología es considerada como un campo científico multidisciplinario, que abarca grandes áreas de las ciencias básicas y aplicadas. Se encarga del estudio de la liberación, dispersión y transporte, suspensión en el aire y la deposición de partículas de origen biológico y su impacto en los organismos vivos y su ambiente, comprendiendo los factores meteorológicos y biológicos que influyen en el movimiento de la biota en la atmósfera (Frenquelli, 1998; Red Española de Aerobiología, 2002; Lacey y West, 2007). Actualmente, se incluye también dentro de esta disciplina a las partículas o los gases abióticos que afectan a los organismos vivos, como el mercurio, plomo, asbestos, cadmio, monóxido de carbono, dióxido sulfúrico, ozono, entre otros (Pathirane, 1975; Edmonds, 1979; Lacey y West, 2007).

El principal incentivo para el desarrollo de la Aerobiología como disciplina científica ha sido la necesidad de entender la dispersión de las enfermedades del hombre, los animales y las plantas para tratar de prevenirlos; por ello, la dispersión de polen y esporas han sido de principal interés. La Aerobiología no sólo requiere una comprensión de la diversidad biológica de las partículas que son movidas por el aire, sino también de la física, para explicar la dinámica atmosférica con la que se mueven en el aire (Frenquelli, 1998; Lacey y West, 2007).

Las aeropartículas de origen biológico varían en tamaño desde 1 a >200 µm. Son transportadas por el aire de forma pasiva y pueden incluir virus, bacterias,

hongos y fragmentos de hongos, esporas, fragmentos de líquenes y sus esporas, protistas (protozoos, algas y diatomeas), esporas de las plantas (por ejemplo, de musgos y helechos), polen, plantas y pequeños fragmentos de semillas, invertebrados (nematodos, ácaros, arañas e insectos) y sus fragmentos, la materia fecal, además de la piel, pelo, moco y excrementos secos de animales más grandes. Por otra parte, se pueden encontrar sustancias químicas volátiles en el aire, que pueden proceder de fuentes biológicas, como son los metabolitos de procesos tales como la descomposición, fermentación o la producción de toxinas (Lacey y West, 2007).

Se ha estimado que más del 25% de las aeropartículas suspendidas en la atmósfera están conformadas por material biológico. Algunos hongos, bacterias y virus que se encuentran suspendidos en la atmósfera son los agentes causales de enfermedades de humanos, plantas y animales, los cuales pueden tener graves consecuencias económicas, de salud y ecológicas (Peccia y Hernández, 2006).

Aerobiología y propiedades de la atmósfera

Para comprender el movimiento de las aeropartículas, es necesario conocer las propiedades de la atmósfera terrestre: la presión barométrica, la densidad del aire y la temperatura; ésta última disminuye conforme se incrementa la altura sobre la superficie de la Tierra. En la Figura 7 se muestra un perfil con las capas de la atmósfera en una escala de altitud logarítmica. Se observan variaciones considerables en los límites de las capas dependiendo del clima: a) día soleado, b) día nublado con aumento de viento, o c) noche clara. La capa límite laminar es una capa microscópicamente delgada que rodea la superficie terrestre y todos los objetos que están sobre ella. El grosor de esta capa varía con la velocidad del viento y la rugosidad de la superficie; puede ser menor a un milímetro o hasta de diez centímetros en un día nublado y con viento, o incluso de diez metros en una noche clara y en calma. Las pequeñas aeropartículas biológicas deben atravesar esta capa para lograr su dispersión por corrientes de aire más altas. Por arriba de

ella, se encuentra la capa límite turbulenta a través de la cual ocurre la mayor dispersión de partículas, en donde la velocidad del viento aumenta linealmente con la altura. El grosor de esta capa aumenta al incrementarse el viento y puede alcanzar hasta 150 metros en días soleados. El dinamismo de las corrientes de esta capa cambia constantemente con la ubicación, el clima, la estación y la hora del día. La capa de turbulencia exterior es el límite hasta el cual los organismos pueden ser acarreados por la turbulencia mecánica. Estos factores tienen diferentes efectos sobre la producción, el transporte y la deposición de las aeropartículas, incluyendo las de origen biológico (Gregory, 1973; Lacey y West, 2007).

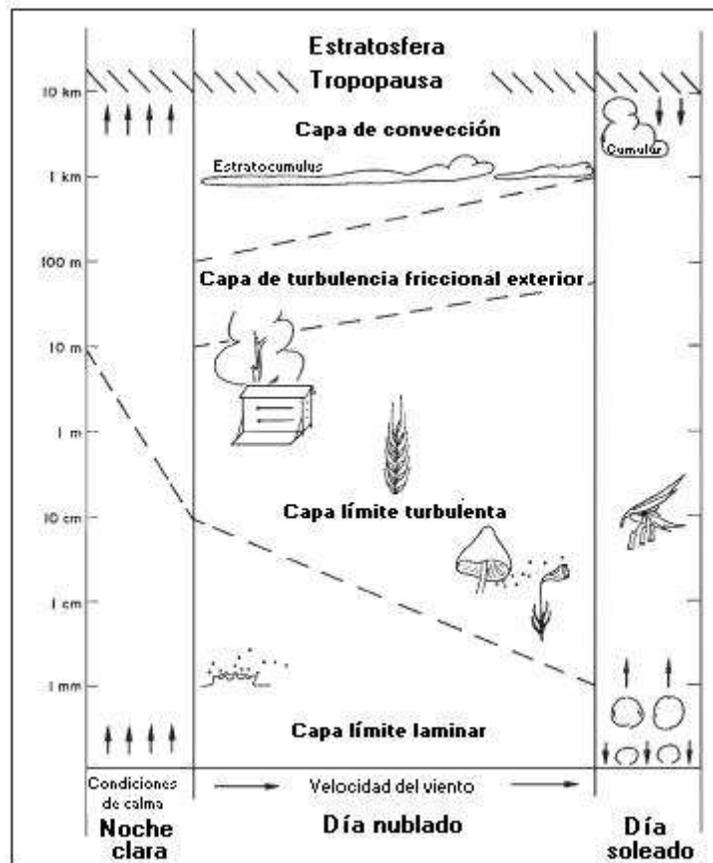


Figura 7: Representación de un perfil de las capas de la atmósfera en una escala de altitud logarítmica.

Edmonds y Benninghoff (1973) publicaron el concepto de la Ruta Aerobiológica como un método sencillo para explicar las diferentes etapas del transporte de los organismos a través del aire. Este concepto fue establecido y expuesto por Edmonds (1979) y Cox (1987). Los procesos implicados son la producción y liberación de las partículas biológicas, su dispersión a través del aire y el impacto de su deposición sobre el sustrato.

Isard y Gage (2001) proponen el concepto de “Proceso Aerobiológico” basándose en el trabajo de Edmonds y Benninghoff (1973). Este modelo conceptual se compone de cinco componentes o etapas: preconditionamiento en un área de fuente, liberación y ascenso, transporte horizontal, descenso y deposición, e impacto en el área de destino (Figura 8). Estas etapas pueden ser aplicadas para todo tipo de aerobiota, desde microorganismos hasta aves.

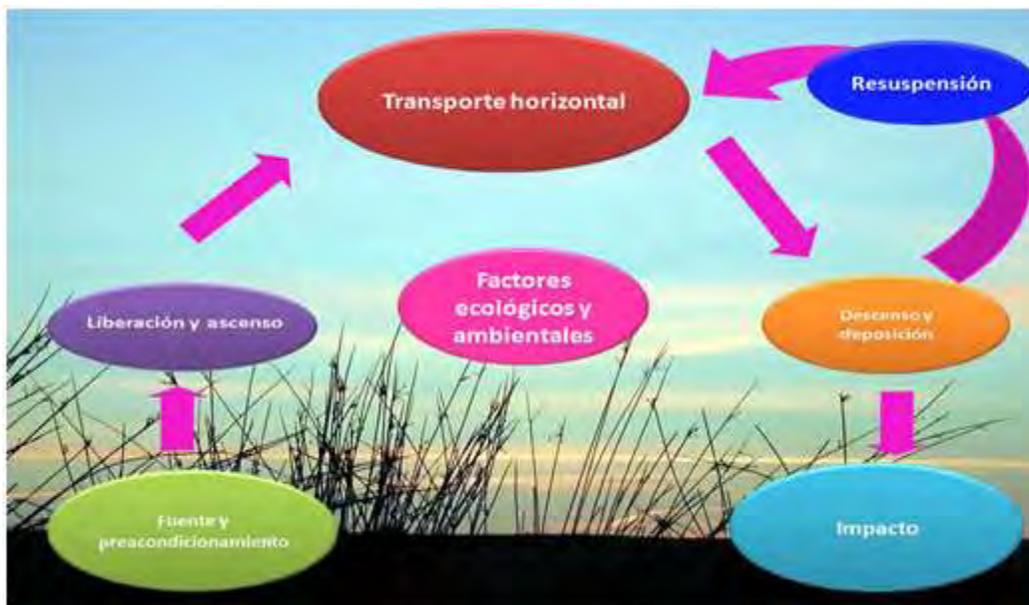


Figura 8: El Proceso aerobiológico (Isard y Gage, 2001).

El sistema provee una forma útil de conceptualizar las complicadas interacciones biológicas y meteorológicas que gobiernan el movimiento de las biopartículas y organismos en la atmósfera. Esto involucra al sistema en el cual los organismos viven, incluyendo las ecorregiones de fuente y destino, así como el

ambiente atmosférico durante su transporte y el conocimiento sobre la estructura del sistema y su comportamiento (Isard y Gage, 2001).

Gran parte de los primeros trabajos de Aerobiología se hicieron al aire libre (ambientes extramuros), pero con énfasis en la salud de plantas, animales, el hombre y su seguridad; sin embargo, parte de la investigación actualmente está centrada en ambientes interiores (Flannigan *et al.*, 2001; West, *et al.*, 2008).

Muestreadores de aeropartículas utilizados en Aerobiología

Se han diseñado diversos tipos de muestreadores para coleccionar las partículas biológicas presentes en el aire. Sus diseños son diferentes y su uso depende del objetivo de la investigación:

- A) Muestreadores de brazo giratorio (Rotorod). Funcionan con una tasa de muestreo de 50 a 200 L / min (dependiendo de las dimensiones de los brazos) y coleccionan partículas por impactación en el filo de los brazos verticales que rotan a 50 km / h, los cuales están recubiertos con cinta adhesiva (Figura 9a).

- B) Impregnador en líquido de varias fases. Muestra aire a 10 L / min sobre una superficie de vidrio que se mantiene húmeda con un amortiguador líquido para la colección de aeropartículas (Figura 9b).

- C) Muestreadores de partículas viables (Andersen). La muestra de aire pasa a través de una serie de etapas que coleccionan progresivamente partículas más pequeñas de forma selectiva. Éstas son depositadas sobre cajas Petri conteniendo agar específico para coleccionar hongos o bacterias y medirlas como unidades formadoras de colonias (UFC por m³ de aire muestreado) (Figura 9c).

D) Muestreador ciclón de superficie. Aspira partículas adheridas a superficies.

Funciona a 16.5 L/min y es de alta eficiencia para la toma de muestras de partículas desde 1 μm de diámetro. La toma de aire es perpendicular al cilindro de metal que dirige el flujo de aire tangencialmente hacia la parte superior del cilindro, mientras que la parte inferior del cilindro tiene un vial desmontable de 1.5 ml en el que las esporas se depositan debido a que la dirección del aire cambia cuando el flujo de aire deja el cilindro a través de su eje central (Figura 9d).



Figura 9: Muestreadores utilizados en Aerobiología: a) muestreador de brazo giratorio (Rotorod), b) impregnador en líquido de varias fases, c) muestreador de partículas viables (Andersen), d) muestreador ciclón de superficie (Burkard).

E) Trampa de esporas tipo Hirst de 7 días. La trampa de esporas tipo Hirst (Burkard Manufacturing Co., Ltd. UK.) succiona el aire a través de una boquilla a una tasa de 10 L/min, impactando las aeropartículas en una cinta de celofán (Melinex, Manufacturing Co., Rickmansworth, UK) impregnada con una ligera capa de vaselina con hexano 1g:5ml. Ésta se monta sobre un tambor que se mueve a través de la toma de aire a dos milímetros por hora, para proporcionar un registro continuo de las esporas del aire durante 7 días. Este equipo tiene una veleta que permite dirigir la boquilla hacia la corriente de aire (Figura 10).

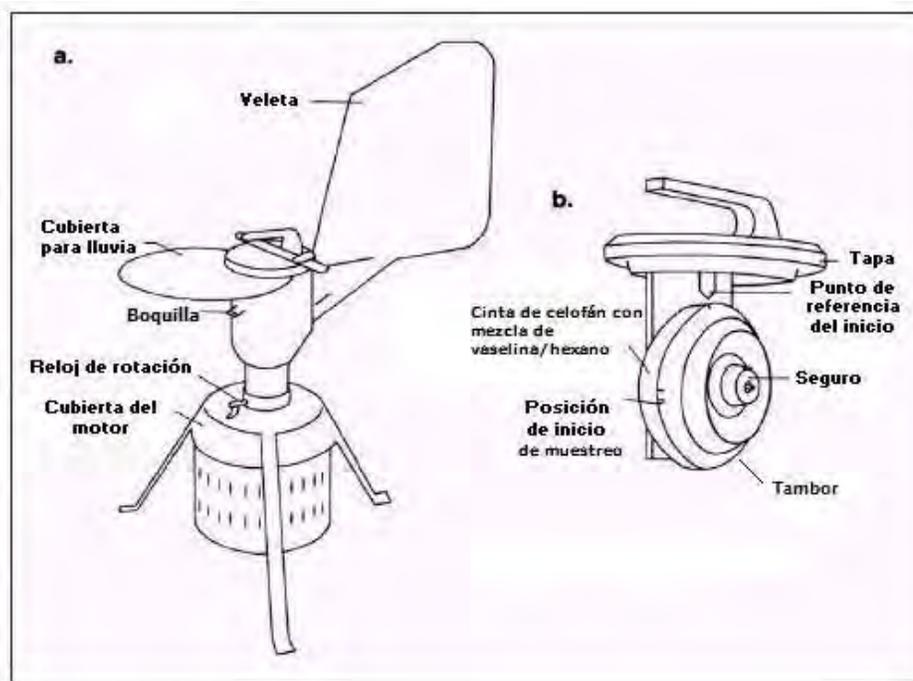


Figura 10: Trampa de esporas Hirst de 7 días (Lacey y West, 2007).

Los nuevos avances en Aerobiología han reducido el énfasis en la identificación visual de aeropartículas, y han implementado métodos automatizados de detección y cuantificación. Las técnicas de colecta de aeropartículas son similares, sin embargo, los métodos de identificación se han diversificado (Williams *et al.*, 2001; Calderón *et al.*, 2002). El uso de inmunoensayos para la detección de aeropartículas biológicas ha sido desarrollado, sin embargo, la aplicación de estos métodos es restringida por la dificultad de obtener anticuerpos con la especificidad requerida. No obstante, los métodos de detección basados en ADN ofrecen un gran potencial para una detección altamente sensible y específica (Williams *et al.*, 2001).

Recientemente, se ha utilizado como método alternativo de identificación la detección de aeropartículas biológicas mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Mac Neil *et al.*, 1995; Putnam, 1995; McCartney *et al.*, 1997; Martin, 2000; Williams *et al.*, 2001; Calderón *et al.*, 2002; Freeman *et al.*, 2002) y por PCR en tiempo real (QPCR) (Schweigkofler *et al.*, 2004; Walsh *et al.*, 2005; Luo, *et al.*, 2007; Falacy *et al.*, 2007; Rogers *et al.*, 2009).

ANTECEDENTES

El monitoreo de esporas de hongos proporciona información sobre la presencia de patógenos en la atmósfera y puede indicar cuando su concentración está por encima de los límites de riesgo (Frenguelli, 2008). Para entender y dar un manejo adecuado de las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, es necesario conocer la relación entre la exposición a propágulos fúngicos y los efectos que ésta produce. El monitoreo de esporas del aire ofrece una medida directa para determinar el riesgo de infección, antes de que se presenten los primeros síntomas de la enfermedad.

Recientemente, se han desarrollado métodos moleculares para el diagnóstico de una gran variedad de hongos, principalmente patógenos involucrados en enfermedades de plantas (Ward, 1994, 1995; Ward y Adams, 1998), y el potencial de estas técnicas para la detección de esporas anemófilas (colectadas del aire) ha sido reconocido por MacNeil *et al.*, (1995) y McCartney *et al.*, (1997). Estudios recientes han desarrollado las técnicas de extracción de ADN y los métodos basados en PCR y QPCR para la detección de esporas de hongos fitopatógenos dispersos en la atmósfera. La PCR es un método con diversas aplicaciones en biología molecular, que ha sido utilizada con éxito para la detección de diversas especies fitopatógenas en plantas hospederas, sin el aislamiento previo del hongo (Edel, 1998; Ma y Michailides, 2006). Esta técnica, en conjunción con trampas de esporas convencionales, ha sido utilizada con éxito para la detección molecular de algunas especies de hongos en muestras colectadas del aire, como *Pneumocystis carinii* (Olsson *et al.*, 1996; Wakefield, 1996), *Stachybotrys chartarum* (Haugland *et al.*, 1999; Vesper *et al.*, 2000), *Penicillium roqueforti* (Williams *et al.*, 2001; Calderon *et al.*, 2002a), *Leptosphaeria maculans* y *Pyrenopeziza brassicae* (Calderón *et al.*, 2002b); y mediante QPCR para *Fusarium circinatum* (Schweigkofler *et al.*, 2004), *Oculimacula yallundae* y *O. acuformis* (Walsh *et al.*, 2005), *Monilinia fructicola* (Luo, *et al.*, 2007), *Erysiphe necator* (Falacy *et al.*, 2007) y *Sclerotinia sclerotiorum* (Freeman *et al.*, 2002; Rogers *et al.*, 2009), los cuales fueron detectados mediante el uso de

oligonucleótidos específicos. Para el caso de la roya asiática, la única referencia publicada es la de Steinlage *et al.*, (2006), quienes utilizan las sondas específicas de QPCR para la detección de ADN de *P. pachyrhizi* colectado en trampas de esporas pasivas en Estados Unidos; sin embargo, hasta el momento no se ha realizado un seguimiento aerobiológico del hongo en cultivos en el mundo.

México cuenta con 28 parcelas centinelas distribuidas en 7 estados: Tamaulipas cuenta con ocho, Veracruz con siete, San Luis Potosí con tres, Guanajuato con cuatro, Estado de México con dos, Chiapas con uno y Campeche con tres. (SINAVEF, 2010). Sin embargo, el monitoreo que se realiza se basa en métodos de muestreo en campo y de diagnóstico por inmunoensayos o por PCR en plantas que ya tienen síntomas de la enfermedad. Por ello, en el presente trabajo se pretende adaptar y utilizar la técnica para la detección molecular de urediniosporas de *P. pachyrhizi* dispersas en la atmósfera de cultivos de soya en México, con el fin de determinar su sensibilidad, viabilidad y eficiencia para la prevención, manejo oportuno y toma correcta de decisiones en la aplicación de fungicidas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial de detección del ADN específico de urediniosporas de *P. pachyrhizi* de muestras colectadas del aire de cultivos de soya (*Glycine max*) o parcelas centinelas, mediante la prueba de PCR y estimar su concentración en el aire durante un ciclo agrícola.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Desarrollar y evaluar el método para la detección molecular de urediniosporas del hongo *P. pachyrhizi*.
- Monitoreo de urediniosporas de *P. pachyrhizi* del aire con la trampa de esporas tipo Hirst en cultivos de soya de parcelas centinela o en riesgo de infección durante un ciclo agrícola.
- Establecer recomendaciones para el seguimiento, prevención o control *P. pachyrhizi* en campos agrícolas de México.

HIPÓTESIS

Si las urediniosporas de *P. pachyrhizi* se encuentran dispersas en la atmósfera de parcelas centinelas y/o cultivos de soya, éstas serán colectadas del aire y su ADN será detectado mediante el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con sondas de ADN específicas.

JUSTIFICACIÓN

La roya asiática es una enfermedad que ataca los cultivos de soya y otras leguminosas que son de gran importancia económica en México. Esta enfermedad, causada por el hongo *P. pachyrhizi*, se disemina principalmente por el viento. Bajo condiciones ambientales óptimas para el desarrollo del hongo, la enfermedad progresa causando la defoliación severa de las plantas en tres semanas. Las pérdidas ocasionadas dependen del momento del desarrollo de la enfermedad y del grado en que ésta avance. La importancia de la enfermedad radica en su alta capacidad de dispersión y el monto de las pérdidas que puede ocasionar, las cuales pueden ser de hasta el 90% (Terán *et al.*, 2007).

En estudios epidemiológicos, el monitoreo del inóculo de este tipo de patógenos en el aire a través del ciclo de los cultivos, así como el conocimiento de sus procesos aerobiológicos, son básicos para planificar las diferentes estrategias de manejo de la enfermedad causada por estos patógenos. La detección temprana del hongo *P. pachyrhizi* mediante la prueba de PCR puede ser utilizada para determinar con mayor exactitud en tiempo y espacio su presencia en el ambiente. Los datos obtenidos servirán para contribuir con la vigilancia epidemiológica del hongo causante de la roya asiática y para su prevención y control mediante el uso de fungicidas de manera apropiada en cantidad y en tiempo, evitando su aplicación cuando ésta no sea requerida, lo que contribuirá al fortalecimiento de una agricultura moderna, que no contamine a la vegetación, a la salud del hombre, de los animales, y la calidad del ambiente, como ocurre con la aplicación indiscriminada de los fungicidas.

MATERIAL Y MÉTODOS

El método constó de dos partes: el monitoreo aerobiológico de urediniosporas de *P. pachyrhizi* en cultivos de soya y el trabajo experimental en laboratorio (Figura 11):

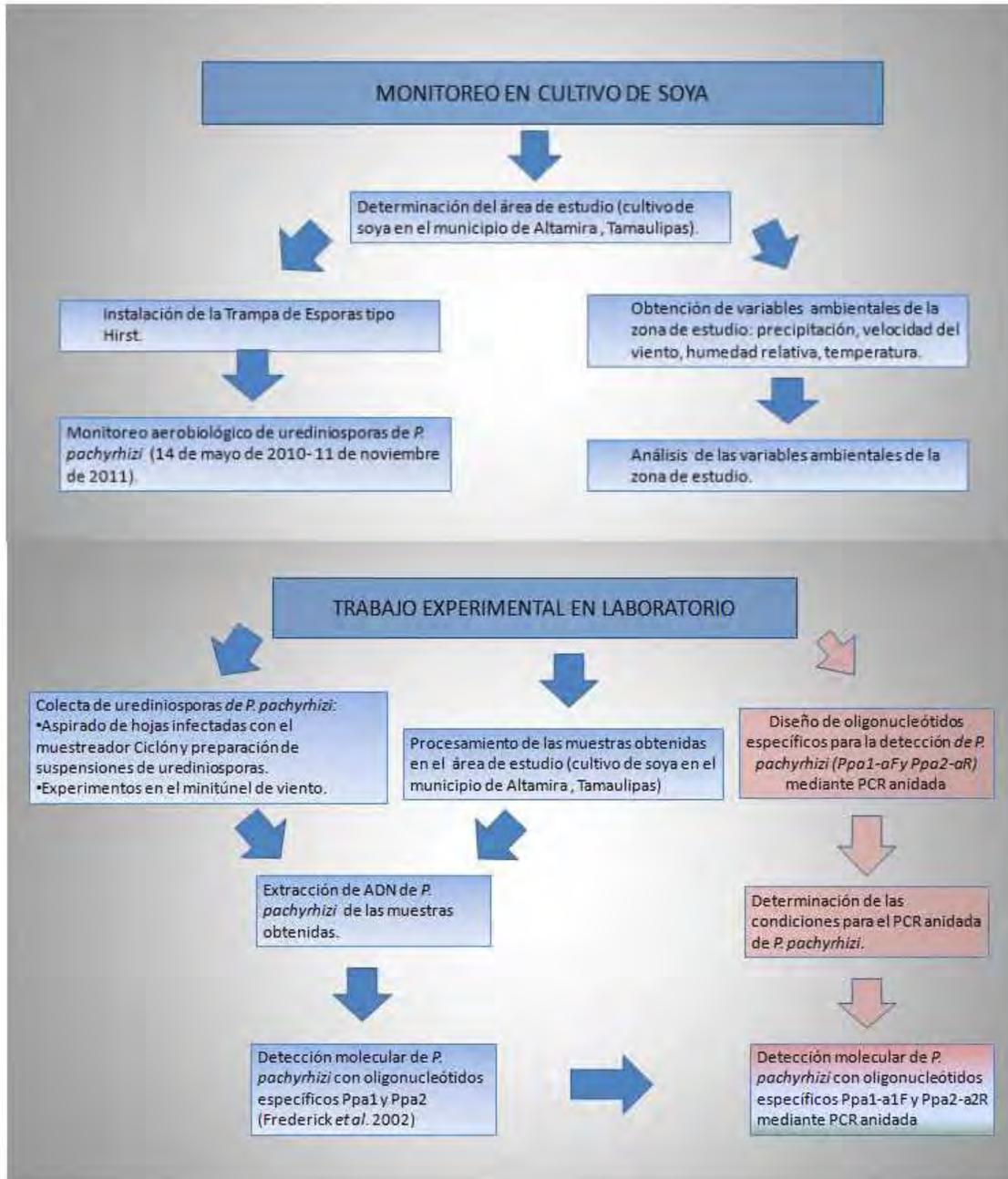


Figura 11. Método del monitoreo en cultivos de soya y trabajo experimental en laboratorio para la detección molecular de *P. pachyrhizi*.

Monitoreo en cultivo de soya

- **Determinación del área de estudio**

Para llevar a cabo el muestreo de urediniosporas de *P. pachyrhizi*, se instaló la trampa de esporas tipo Hirst en un campo de cultivo de soya con reportes previos de infección de roya asiática, dentro de las instalaciones del campo experimental “Las Huastecas”, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). El campo experimental se encuentra en el kilómetro 55 de la Carretera Tampico-Mante, en el municipio de Altamira, Tamaulipas (Figura 12). La zona está ubicada en las coordenadas 22°33' N y 98°09' O, a una altura de 18 msnm



Figura 12. Ubicación del municipio de Altamira, Tamaulipas.

El clima de la zona es tropical húmedo semicálido, con régimen de lluvia de junio a septiembre, y con la dirección del viento predominante de sureste a noreste (Gobierno Municipal de Altamira, 2012). La temperatura media anual es de 24.5 °C y la precipitación media anual es de 842 mm (INIFAP, 2011). Los principales

cultivos que se producen en la zona son: soya, maíz, sorgo, cártamo, chile serrano, cebolla, tomate, jitomate y melón (Gobierno Municipal de Altamira, 2012).

Él área destinada al cultivo de soya en el municipio es de alrededor de 33,000 ha (Gobierno Municipal de Altamira, 2012), sin embargo, se ha reportado la presencia de la roya asiática en la zona desde el mes de octubre de 2005, ocasionando pérdidas de hasta el 50% (Terán *et al.*, 2007).

- **Instalación de la trampa de esporas Hirst en la zona de estudio**

Se colocó la trampa de esporas tipo Hirst (Burkard Manufacturing Co., Ltd. UK.) en el cultivo de soya, ubicado dentro de las instalaciones del Campo Experimental “Las Huastecas” del INIFAP. El monitoreo del aire se llevó a cabo durante las 24 horas del día, a partir del 14 de mayo de 2010, hasta el 11 de noviembre de 2011 (Figura 13). Debido a que el monitoreo con la trampa de esporas tipo Hirst es semanal, cada ocho días se cambió la cinta de celofán Melinex impregnada con vaselina con hexano 5:1, en donde se impactaron las partículas durante el período de muestreo. Las cintas obtenidas fueron enviadas al laboratorio para realizar la extracción de ADN y detección molecular de *P. pachyrhizi*, para determinar su presencia o ausencia en el ambiente.



Figura 13: Trampa de esporas tipo Hirst en cultivo de soya en las instalaciones del INIFAP, Altamira, Tamaulipas.

- **Obtención de variables ambientales del Campo Experimental “Las Huastecas del INIFAP”.**

Se dio seguimiento a los principales parámetros ambientales en el área de estudio, desde del mes de enero de 2010 hasta el mes de diciembre de 2011. Los registros fueron obtenidos con la estación meteorológica del Campo Experimental “Las Huastecas”, y proporcionados por el Dr. Antonio Palemón Terán Vargas, de la misma institución. Se registraron temperatura máxima, temperatura mínima, temperatura media y precipitación. Además, se obtuvieron los valores de humedad relativa del período de mayo de 2010 a mayo de 2011, debido a que la estación meteorológica dejó de registrar esos datos a partir de junio de 2011.

- **Análisis de las variables ambientales del Campo Experimental “Las Huastecas del INIFAP”.**

Se realizó un análisis estadístico para analizar las variables de temperatura observadas en 2010, en comparación con las variables de temperatura observadas en 2011. Para ello, utilizando el programa GraphPad Prism 5, se realizó una prueba de T ($P < 0.05$) evaluando los valores obtenidos diariamente para determinar si existieron diferencias significativas de cada una de las 3 variables para el mismo mes durante los dos años. Los valores de precipitación se analizaron cuantificando la precipitación acumulada para cada mes y comparándose entre los dos años. En el caso de humedad relativa, únicamente se registraron los datos y fueron comparados con la presencia o ausencia de la enfermedad en el cultivo.

Trabajo experimental en laboratorio

- **Colecta de urediniosporas de *P. pachyrhizi***

A partir de hojas de soya infectadas con el hongo *P. pachyrhizi* provenientes de campos de cultivos de soya del Estado de Tamaulipas, México, se colectaron las urediniosporas del hongo de dos maneras:

- a) Aspirado de hojas infectadas con un muestreador Ciclón de superficie.
Se colectaron las urediniosporas de *P. pachyrhizi*, mediante el aspirado directo de las hojas de soya infectadas, con un muestreador Ciclón de superficie (Burkard Manufacturing Co. Ltd. UK). El polvo aspirado fue colectado dentro de tubos el Eppendorf de 1.5 ml, los cuales se almacenaron a 4°C hasta su uso para la extracción y detección de su ADN por PCR (Figura 14).



Figura 14. Colecta de urediniosporas de la roya asiática con el muestreador Ciclón de superficie.

b) Experimentos en el minitúnel de viento. Se colocaron hojas de soya infectadas con *P. pachyrhizi* dentro de un minitúnel de viento acoplado al orificio de succión de la trampa de esporas tipo Hirst (Burkard Manufacturing Co. Ltd. UK) (Figura 15). El minitúnel origina una corriente de aire con una velocidad de 4m/s. Las urediniosporas liberadas por el viento fueron colectadas por impacto sobre la cinta de celofán integrada al tambor del muestreador tipo Hirst. El ensayo se realizó por duplicado y la duración de cada experimento fue de dos días. Después del período de muestreo, la cinta de celofán Melinex fue retirada de la trampa de esporas Hirst y almacenada a 4°C hasta ser procesada para la extracción del ADN de las urediniosporas impactadas.



Figura 15. Minitúnel de viento con hojas infectadas con roya asiática. Las urediniosporas liberadas por la corriente de aire fueron colectadas con la trampa de esporas tipo Hirst.

Tanto el aspirado de las hojas infectadas, como los experimentos en el minitúnel de viento se llevaron a cabo dentro de un invernadero para evitar la diseminación de *P. pachyrhizi* por el escape de urediniosporas.

- **Procesamiento de las muestras colectadas.**

A) Procesamiento de las urediniosporas aspiradas de las hojas de soya infectadas con el muestreador Ciclón de superficie. Se agregó 1 ml de agua MiliQ (Millipore) al tubo Eppendorf de 1.5 ml que contenía el polvo aspirado de las hojas de soya infectadas. La suspensión resultante se agitó ligeramente en un vórtex por 60s. Se tomaron 40 μ l para observar la presencia de urediniosporas. Posteriormente, se realizó la cuantificación de las mismas en la cámara de Neubauer utilizando un microscopio de campo claro (Olympus). Se ajustó la suspensión a una concentración de 2×10^4 urediniosporas ml^{-1} , de la que se realizó una curva de diluciones seriadas \log_{10} equivalentes a 0, 0.2, 2, 20, 200 y 1000 urediniosporas/ μ l, las cuales fueron utilizadas para dos propósitos.

1. Determinación de la sensibilidad y límites de detección en la prueba de PCR de urediniosporas de *P. pachyrhizi*. Se tomaron directamente 300 μ l de cada una de las diluciones de urediniosporas y fueron transferidos a tubos (Sarstedt) de 1.5 ml para la extracción de ADN.
2. Determinación de la sensibilidad y límites de detección en la prueba de PCR de urediniosporas de *P. pachyrhizi*, impactadas en cinta de celofán Melinex. Se adicionaron artificialmente 300 μ l de cada una de las diluciones de urediniosporas a cintas de celofán de 14 mm de ancho x 48 mm de largo, impregnadas con una capa delgada de la mezcla de vaselina con hexano 5:1. Las cintas fueron secadas al aire y transferidas a tubos (Sarstedt) de 1.5 ml para la extracción de ADN.

- B) Procesamiento de cintas con urediniosporas de *P. pachyrhizi* colectadas en los experimentos con el minitúnel de viento con la trampa de esporas tipo Hirst. Las cintas obtenidas en los experimentos con el túnel de viento (14 mm de ancho x 336 mm de largo) fueron cortadas en segmentos de 7 x 48 mm, equivalentes a un día de muestreo, de los cuales fueron colocados dos en cada tubo de 1.5 ml (Sarstedt) para la extracción de ADN. Se procesaron un total de 8 tubos. La detección molecular de estas muestras tiene como finalidad verificar la viabilidad de la colecta de urediniosporas del aire con la trampa de esporas tipo Hirst y la detección por PCR.
- C) Procesamiento de cintas con aeropartículas colectadas con la trampa de esporas tipo Hirst en el cultivo de soya en Tamaulipas. Las cintas obtenidas en campo (14 mm de ancho x 336 mm de largo), fueron cortadas transversalmente para obtener dos fragmentos de 7 mm de ancho x 336 mm de largo, las cuales fueron utilizadas para dos propósitos:
1. Determinación de la presencia o ausencia de urediniosporas de *P. pachyrhizi* dispersas en la atmósfera del cultivo de soya por medio de la detección molecular en la prueba de PCR. Las cintas fueron cortadas en piezas de 7 x 48 mm (equivalentes a un día), colocándose dos segmentos en un tubo de 1.5 ml (Sarstedt) para la extracción de ADN. Para cada semana de muestreo se procesaron dos tubos.
 2. Corroboración de la ausencia de urediniosporas de *P. pachyrhizi* en caso de resultar negativa la detección molecular. El segmento de cinta complementario al utilizado para la detección molecular fue montado en un portaobjetos para su revisión al microscopio de campo claro (Olympus).

- **Extracción de DNA**

La extracción de DNA se realizó con el DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). A los tubos de 1.5 µl (Sartstedt) que contenían las muestras tanto de suspensiones como de cintas, se le agregaron 400 µl del amortiguador (buffer) de lisis AP1 (DNeasy Plant Minikit, Qiagen) y 0.2 g de perlas de vidrio (Jencons-PLS, Leighton Buzzard, UK). Los tubos fueron agitados en el equipo FastPrep (Thermo Savant Instruments, Holbrook, Nueva York, EUA) para remover las aeropartículas impactadas sobre la cinta de celofán Melinex y romper la pared de las esporas. Las condiciones fueron: 2 períodos de 40 s, a 6 ms^{-1} , con 2 min de enfriamiento en hielo entre cada período. A partir del lisado resultante, se purificó el ADN siguiendo el protocolo establecido por el DNeasy Plant Minikit (Figura 16), como se describe a continuación:

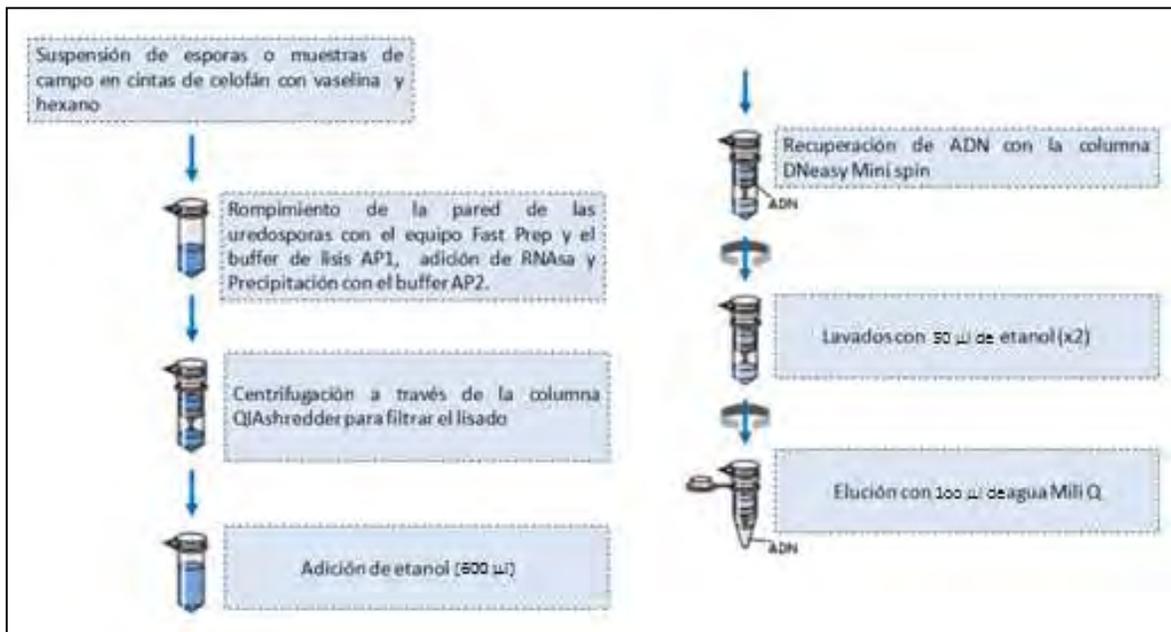


Figura 16: Procedimiento para la extracción y purificación del ADN de *P. pachyrrhizi* con el DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN).

A cada tubo (Sarstedt) de 1.5 ml conteniendo el lisado de urediniosporas, se le agregaron 4 µl de RNAsa (DNeasy Plant Minikit, Qiagen), se agitó en vórtex y se incubó por 10 min a 65°C, ya que es la temperatura óptima en la que actúa la enzima. Posteriormente, se les agregaron 130 µl del amortiguador para precipitación AP2 (DNeasy Plant Minikit, Qiagen), dejándolos reposar por 5 minutos en hielo. Los tubos fueron centrifugados por 5 minutos a 14,000 rpm.

El sobrenadante de cada tubo se transfirió a una columna QIAshredder Mini spin (DNeasy Plant Minikit, Qiagen), centrifugándose durante 2 min a 14000 rpm. En este paso se filtró el lisado para eliminar los restos celulares y otros precipitados.

El lisado resultante se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se midió y se adicionaron 1.5 volúmenes del amortiguador AP3 (DNeasy Plant Minikit, Qiagen), el cual contenía etanol, para iniciar los lavados. La mezcla se vertió en una columna DNeasy Mini spin (DNeasy Plant Minikit, Qiagen), cuya función fue recuperar el ADN. Las columnas se centrifugaron por 1 min a 8,000 rpm, retirándose el sobrenadante depositado en el tubo colector.

Se agregaron 500 µl del amortiguador AW (DNeasy Plant Minikit, Qiagen), el cual contenía etanol para continuar los lavados, y se centrifugó durante 2 min a 14,000 rpm para secar la membrana que contenía el ADN. Este paso se realizó por duplicado.

Posteriormente, se realizó la elución de DNA, agregando a la columna 100 µl de Agua MilliQ (Millipore), incubando durante 5 min a temperatura ambiente y centrifugando durante 1 min a 8,000 rpm.

Las suspensiones resultantes fueron almacenadas a 4 °C hasta su uso para PCR.

- **Detección molecular de *P. pachyrhizi* mediante la prueba de PCR de las muestras purificadas con los oligonucleótidos específicos Ppa1 y Ppa2 (Frederick *et al.*, 2002).**

Se realizó la detección de ADN específico de *P. pachyrhizi* utilizando la sonda Ppa1 y Ppa2 (Frederick *et al.*, 2002). Las reacciones de PCR se amplificaron en un termociclador Mastercycler Eppendorf. La prueba de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl, conteniendo 10 mM TRIS-HCL, 50 mM KCL (pH 8.3); 2.5 mM MgCl₂; 200 µM de dNTPs, 10 picomoles de cada oligonucleótido (Ppa1 y Ppa2 (Frederick *et al.*, 2002), 1U de Taq DNA Polimerasa (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc.) y 2 µl de DNA. Las condiciones del ciclo fueron 94 °C por 1 min, seguidos por 30 ciclos de temperatura de desnaturalización de 94 °C por 30 s, temperatura de apareamiento de 55 °C por 30 s, temperatura de polimerización de 72 °C por 30 s y una extensión final de 72 °C por 10 min. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2 % y el ADN teñido con bromuro de etidio (0.2 µg/ml).

- **Diseño de oligonucleótidos específicos para la detección de *P. pachyrhizi* (Ppa1-aF y Ppa2-aR) mediante PCR anidado**

Para mejorar la sensibilidad de la detección de *P. pachyrhizi*, y en colaboración con el QBP. Mario Solís Paredes y la Dra. María del Carmen Calderón Ezquerro, se diseñaron los oligonucleótidos específicos Ppa1-aF y Ppa2-aR, con el fin amplificar una zona dentro de la región amplificada por Ppa1 y Ppa2 (Frederick *et al.*, 2002) mediante PCR anidada. Los oligonucleótidos fueron diseñados con el programa Primer 3 Plus (Rozen y Skaletsky, 2000). Asimismo, se comparó la secuencia resultante con las existentes en la base de datos de GENBANK para descartar homologías utilizando el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997). Una vez estandarizada la reacción de PCR, se realizó la detección molecular de *P. pachyrhizi* para todas las muestras mediante la prueba de PCR anidada.

RESULTADOS

- **Diseño de oligonucleótidos específicos para la detección de *P. pachyrhizi* (Ppa1-aF y Ppa2-aR) mediante PCR anidada.**

Se diseñaron los oligonucleótidos específicos para PCR anidada **Ppa1-aF (5'TCT TTG GGC AAT GGT AGC)** y **Ppa2-aR (5' ACC AAA AGG TGC AAG GTG)**, generándose un amplificado de 237 pb dentro de la región amplificada por Ppa1 y Ppa2 (Frederick *et al.*, 2002) (Figura 17). Asimismo, se descartaron homologías con secuencias de nucleótidos de otras especies.

```
1 ggaagtaaaa gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cgaaggatc attaataaaa
61 agctaaagag tgcactttat tgtggctcaa aactaaactt ttaataaac ccatttaatt
121 ggctcattga ttgataagat ctttgggcaa tggtagcttt gaaaaaagct gcaaccacc
181 tattaatcat aatctttttt tttttaactc aaagtcaaat agaatgtttt ataaatttaa
241 atatatatat ataactttta acaatggatc tctaggctct catatcgatg aagaacacag
301 tgaaatgtga taattaatgt gaattgcaga attcagtgaa tcatcaagtt tttgaacgca
361 ccttgcacct tttggtatc caaaaggtag acctgtttga gtgtcatgaa atcttctcaa
421 cattatttct tttttttaa gggaaattgt tggatttga gtgttgctgt tgctttttt
481 gcagctcact ttaataaat aaatatatat agtttcagt atattttgat gtaataataa
541 aatcatttca tcaaaaaaat aaatatatgt gagatttatt ataacattaa ttgaatgtaa
601 atttttttt aagacctcaa atcaggtgag actaccact gaacttaagc atatcaataa
661 gcggagga
```

Figura 17: Secuencia específica para identificar *P. pachyrhizi*. Se señala la región que se amplifica por la PCR anidada con los oligonucleótidos Ppa1-aF y Ppa2-aR.

La reacción de PCR se estandarizó en un volumen total de 25 µl, conteniendo 10 mM TRIS-HCL, 50 mM KCL (pH 8.3); 2.5 mM MgCl₂; dNTPs, a una concentración de 200 µM; se utilizaron 10 picomoles de los primers Ppa1-aF y Ppa2-aR y 1U de Taq DNA Polimerasa (Fermentas). A cada reacción se agregaron 0.5 µl de DNA del producto de PCR, con los oligonucleótidos Ppa1 y Ppa2 (Frederick *et al.*, 2002). Las condiciones del ciclo se establecieron en 95 °C por 3 min, seguidos por 30 ciclos de temperatura de desnaturalización de 95 °C por 30 s, temperatura de apareamiento de 52 °C por 30 s, temperatura de polimerización de 72°C por 30 s, y una extensión final de 72 °C por 6 min.

- **Determinación de la sensibilidad y límites de detección en la prueba de PCR de urediniosporas de *P. pachyrhizi***

Se realizó la detección molecular mediante PCR de la curva de suspensiones de urediniosporas con los oligonucleótidos específicos Ppa1 y Ppa2. Se logró la detección de 0.4 - 2000 urediniosporas (Figura 18).



Figura 18. Detección molecular de curva de suspensiones de urediniosporas de *P. pachyrhizi* con los oligonucleótidos Ppa1 y Ppa2. Carriles: 1) Marcador: escalera de ADN 100 pb, 2) Testigo positivo, 3) Testigo negativo, 4) 0 urediniosporas, 5) 0.4 urediniosporas, 6) 4 urediniosporas, 7) 40 urediniosporas, 8) 400 urediniosporas, 9) 2000 urediniosporas.

En la figura 19 se observa la detección molecular de la curva de suspensiones de urediniosporas con los oligonucleótidos específicos Ppa1-aF y Ppa2-aR mediante PCR anidada, para determinar los límites de detección de *P. pachyrhizi* en suspensión. Se logró la detección de 0.4 - 2000 urediniosporas.

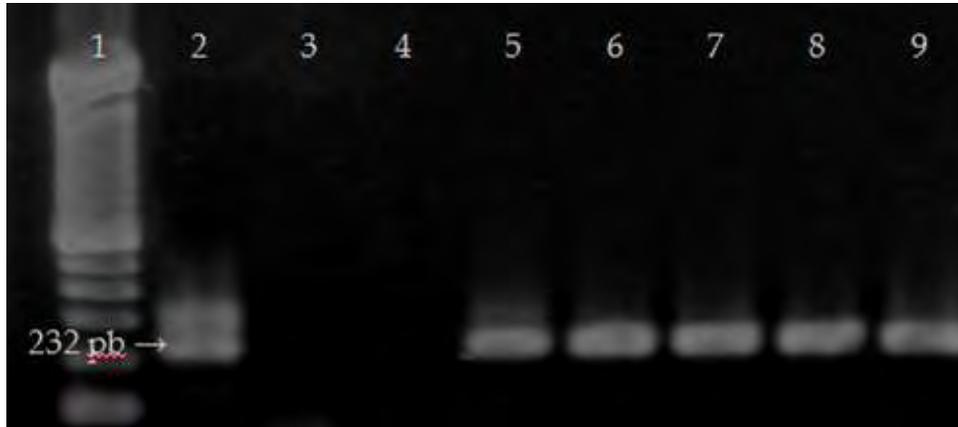


Figura 19. Detección molecular de curva de suspensiones de urediniosporas de *P. pachyrhizi* con los oligonucleótidos Ppa1-aF y Ppa2. Carriles: 1) Marcador: escalera de ADN 100 pb, 2) Testigo positivo, 3) Testigo negativo, 4) 0 urediniosporas, 5) 0.4 urediniosporas, 6) 4 urediniosporas, 7) 40 urediniosporas, 8) 400 urediniosporas, 9) 2000 urediniosporas.

- **Determinación de la sensibilidad y límites de detección en la prueba de PCR de urediniosporas de *P. pachyrhizi*, impactadas en cinta de celofán Melinex**

En la figura 20 se observa la detección de la curva de urediniosporas adheridas artificialmente a cintas de celofán Melinex con la mezcla de vaselina-hexano 1gr:5ml. Se realizó la detección molecular con los oligonucleótidos específicos Ppa1 y Ppa2 de 4 a 2000 urediniosporas.

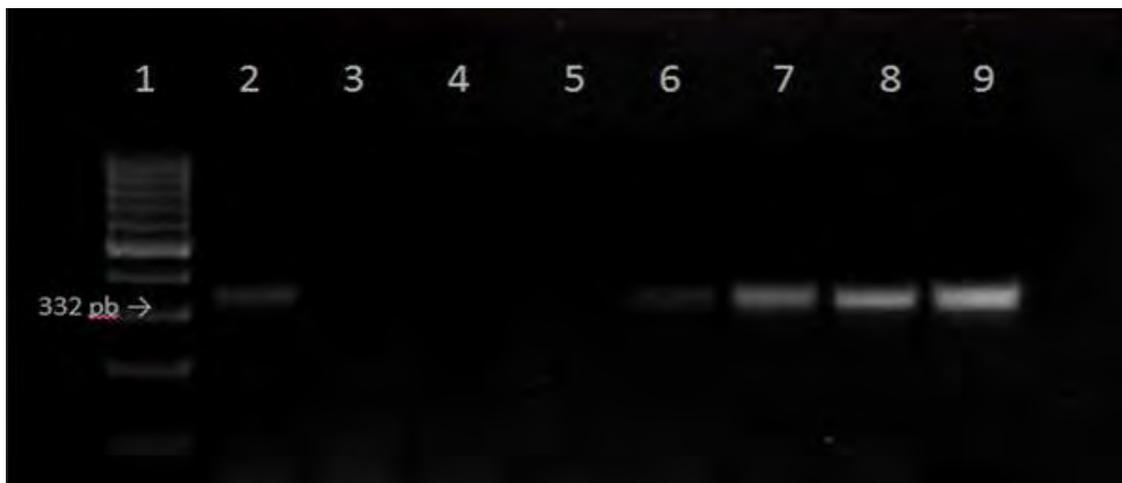


Figura 20. Detección molecular de curva de urediniosporas de *P. pachyrhizi* adheridas artificialmente a cintas de celofán con los oligonucleótidos específicos Ppa1 y Ppa2. Carriles: 1) Marcador: escalera de ADN 100 pb, 2) Testigo positivo, 3) Testigo negativo, 4) 0 urediniosporas, 5) 0.4 urediniosporas, 6) 4 urediniosporas, 7) 40 urediniosporas, 8) 400 urediniosporas, 9) 2000 urediniosporas.

Asimismo, con el amplificado obtenido, se llevó a cabo la prueba de PCR anidada con los oligonucleótidos específicos Ppa1-aF y Ppa2-aR. Se realizó la detección de 0.4 a 2000 urediniosporas (Figura 21).

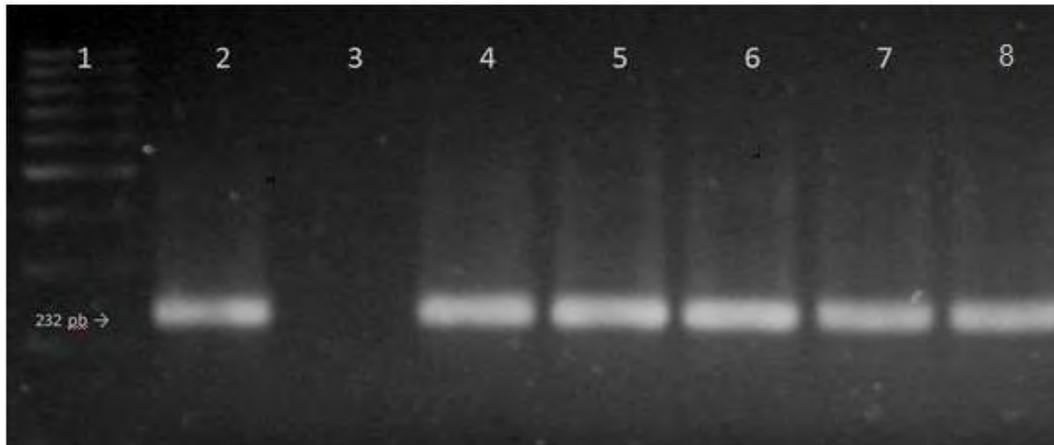


Figura 21. Detección molecular de curva de suspensiones de urediniosporas de *P. pachyrhizi* adheridas artificialmente a cintas de celofán, con los oligonucleótidos Ppa1-aF y Ppa2-aR. Carriles: 1) Marcador: escalera de ADN 100 pb, 2) Testigo positivo, 3) Testigo negativo (0 uredosporas), 4) 0.4 urediniosporas, 5) 4 urediniosporas, 6) 40 urediniosporas. 7) 400 urediniosporas, 8) 2000 urediniosporas.

- **Experimentos con el minitúnel de viento.**

En la Figura 22 se muestra el ADN de las urediniosporas colectadas en las cintas de la trampa de esporas tipo Hirst durante los experimentos en el minitúnel de viento, observándose que fue posible colectarlas y detectar su presencia en el aire en las ocho muestras evaluadas con los oligonucleótidos específicos Ppa1 y Ppa2.

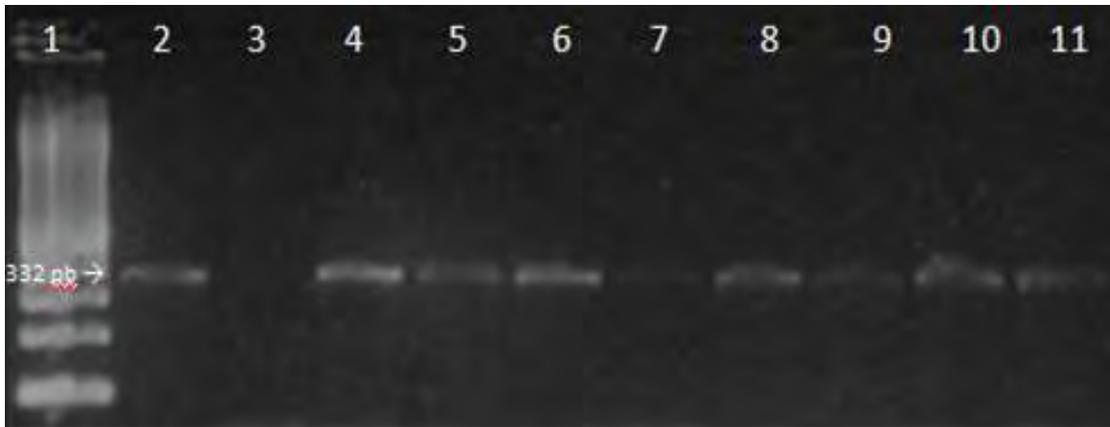


Figura 22. Detección molecular con los oligonucleótidos específicos Ppa1 y Ppa2 de urediniosporas de *P. pachyrhizi* colectadas durante los experimentos con el minitúnel de viento. Carriles: 1) Marcador: escalera de ADN 100 pb, 2) Testigo positivo, 3) Testigo negativo, 4-11) Urediniosporas colectadas del aire con la trampa de esporas tipo Hirst.

En la Figura 23 se muestra la PCR anidada utilizando los oligonucleótidos Ppa1-aF y Ppa2-aR para la detección de las urediniosporas colectadas en las cintas de la trampa de esporas tipo Hirst durante los experimentos en el minitúnel de viento. Se observa claramente la detección molecular de *P. pachyrhizi* en todas las muestras.

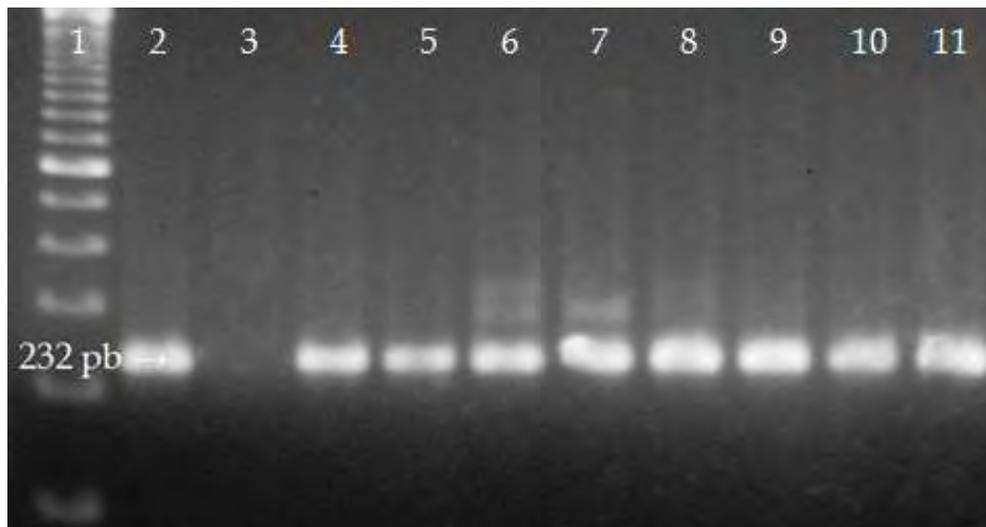


Figura 23. Detección molecular con los oligonucleótidos específicos Ppa1-aF y Ppa2-aR de urediniosporas de *P. pachyrhizi* colectadas durante los experimentos con el minitúnel de viento. Carriles: 1) Marcador: escalera de ADN 100 pb, 2) Testigo positivo, 3) Testigo negativo, 4-11) Urediniosporas colectadas del aire con la trampa de esporas tipo Hirst.

- **Detección molecular con los oligonucleótidos específicos Ppa1 y Ppa2 y mediante PCR anidada con los oligonucleótidos Ppa1-aF y Ppa2-aR de las muestras obtenidas en el cultivo de soya con la trampa de esporas tipo Hirst.**

Se realizó la detección molecular con los oligonucleótidos específicos Ppa1 y Ppa2 y mediante PCR anidada con los oligonucleótidos Ppa1-aF y Ppa2-aR, de las muestras de aeropartículas obtenidas en el cultivo de soya con la trampa de esporas tipo Hirst. El período de muestreo fue de 18 meses, a partir del 14 de mayo de 2010 al 11 de noviembre de 2011. Los resultados obtenidos se resumen en las tablas 6 y 7.

Tabla 6. Detección molecular de urediniosporas de <i>P. pachyrhizi</i> dispersas en la atmósfera de cultivo de soya durante 2010			
Período		Detección molecular mediante PCR con oligonucleótidos Ppa1 y Ppa2	Detección molecular mediante PCR anidada con oligonucleótidos específicos Ppa1-aF y Ppa2-aR
14-may-10-	-21-may-10	-	-
21-may-10-	-28-may-10	-	-
28-may-10-	-04-jun-10	-	-
04-jun-10-	-11-jun-10	-	-
11-jun-10-	-18-jun-10	-	-
18-jun-10-	-25-jun-10	-	-
25-jun-10-	-02-jul-10	-	-
02-jul-10-	-09-jul-10	-	-
09-jul-10-	-16-jul-10	-	-
16-jul-10-	-23-jul-10	-	-
23-jul-10-	-30-jul-10	-	-
30-jul-10-	-06-ago-10	-	-
06-ago-10-	-13-ago-10	-	-
13-ago-10-	-20-ago-10	-	-
20-ago-10-	-27-ago-10	-	-
27-ago-10-	-03-sep-10	-	-
03-sep-10-	-10-sep-10	-	-
10-sep-10-	-17-sep-10	+	+
17-sep-10-	-24-sep-10	+	+
24-sep-10-	-01-oct-10	+	+
01-oct-10-	-08-oct-10	+	+
08-oct-10-	-15-oct-10	+	+

15-oct-10-	-22-oct-10	+	+
22-oct-10-	-29-oct-10	+	+
29-oct-10-	-05-nov-10	+	+
05-nov-10-	-12-nov-10	-	-
12-nov-10-	-19-nov-10	-	-
19-nov-10-	-26-nov-10	+	+
26-nov-10-	-03-dic-10	+	+
03-dic-10-	-10-dic-10	+	+
10-dic-10-	-17-dic-10	+	+
17-dic-10-	-24-dic-10	-	-
24-dic-10-	-31-dic-10	-	-

+ Detecciones positivas; - Detecciones negativas

Tabla 7. Detección molecular de urediniosporas de <i>P. pachyrhizi</i> dispersas en la atmósfera de cultivo de soya durante 2011			
Período		Detección molecular mediante PCR con oligonucleótidos Ppa1 y Ppa2	Detección molecular mediante PCR anidada con oligonucleótidos específicos Ppa1-aF y Ppa2-aR
31-dic-10-	-07-ene-11	-	+
07-ene-11-	-14-ene-11	-	+
14-ene-11-	-21-ene-11	-	+
21-ene-11-	-28-ene-11	-	+
28-ene-11-	-04-feb-11	-	+
04-feb-11-	-11-feb-11	-	+
11-feb-11-	-18-feb-11	-	-
18-feb-11-	-25-feb-11	-	-
25-feb-11-	-04-mar-11	-	-
04-mar-11-	-11-mar-11	-	-
11-mar-11-	-18-mar-11	-	-
18-mar-11-	-25-mar-11	-	-
25-mar-11-	-01-abr-11	-	-
01-abr-11-	-08-abr-11	-	-
08-abr-11-	-15-abr-11	-	+
15-abr-11-	-22-abr-11	-	+
22-abr-11-	-29-abr-11	-	+
29-abr-11-	-06-may-11	-	+
06-may-11-	-13-may-11	-	-
13-may-11-	-20-may-11	-	-
20-may-11-	-27-may-11	-	-
27-may-11-	-03-jun-11	-	-

03-jun-11-	-10-jun-11	-	-
10-jun-11-	-17-jun-11	-	-
17-jun-11-	-24-jun-11	-	-
24-jun-11-	-01-jul-11	-	-
01-jul-11-	-08-jul-11	-	-
08-jul-11-	-15-jul-11	-	-
15-jul-11-	-22-jul-11	-	-
22-jul-11-	-29-jul-11	-	-
29-jul-11-	-05-ago-11	-	-
05-ago-11-	12-ago-11	-	-
12-ago-11-	-19-ago-11	-	-
19-ago-11-	-26-ago-11	-	-
26-ago-11-	-02-sep-11	-	-
02-sep-11-	-09-sep-11	-	-
09-sep-11-	-16-sep-11	-	-
16-sep-11-	-23-sep-11	-	-
23-sep-11-	-30-sep-11	-	-
30-sep-11-	-07-oct-11	-	-
07-oct-11-	-14-oct-11	-	-
14-oct-11-	-21-oct-11	-	-
21-oct-11-	-28-oct-11	-	-
28-oct-11-	-04-nov-11	-	-
04-nov-11-	-11-nov-11	-	-

+ Detecciones positivas; - Detecciones negativas

En la figura 24 se observa la detección molecular de *P. pachyrhizi* utilizando oligonucleótidos específicos Ppa1 y Ppa2 para el período del 14 de mayo al 16 de julio de 2010. No se encontró la presencia de urediniosporas de *P. pachyrhizi* para ese período.

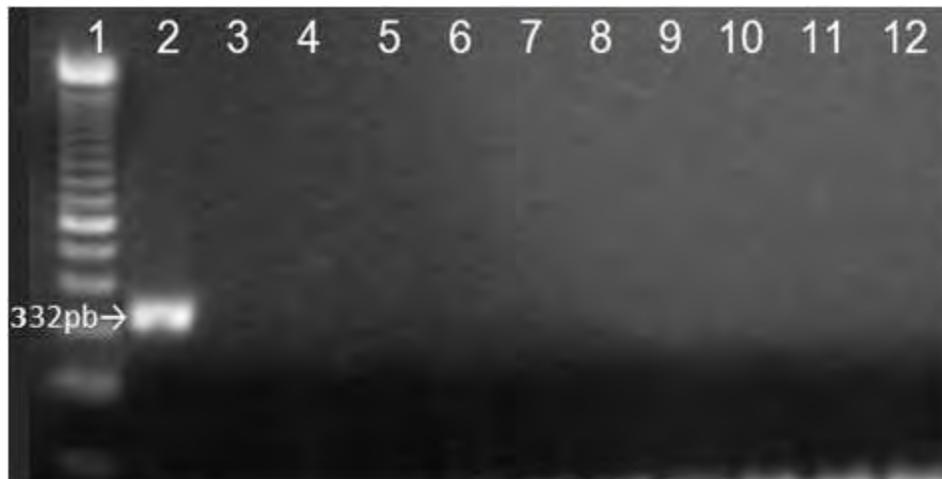


Figura 24. Detección molecular de urediniosporas de *P. pachyrhizi* con oligonucleótidos específicos Ppa1 y Ppa2 del 14 de mayo al 16 de julio 2010. Carriles: 1) Marcador molecular 100 pb, 2) Testigo positivo, 3) Testigo negativo, 4) 16 al 21 mayo, 5) 21 al 28 de mayo, 6) 28 mayo al 4 junio, 7) 4 al 11 de junio, 8) 11 al 18 de junio, 9) 18 al 25 de junio, 10) 25 de junio al 2 de julio, 11) 2 al 9 de julio, 12) 9 al 16 de julio.

Asimismo, se realizó la PCR anidada con los oligonucleótidos Ppa1-aF y Ppa2-aR para mejorar el límite de detección de urediniosporas de *P. pachyrhizi*. En la figura 25 se confirma la ausencia del hongo en el período del 14 de mayo al 16 de julio de 2010.



Figura 25. Detección molecular de urediniosporas de *P. pachyrhizi* con oligonucleótidos específicos Ppa1-aF y Ppa2-aR del 14 de mayo al 16 de julio 2010. Carriles: 1) Marcador molecular 100 pb, 2) Testigo positivo, 3) Testigo negativo, 4) 16 al 21 mayo, 5) 21 al 28 de mayo, 6) 28 mayo al 4 junio, 7) 4 al 11 de junio, 8) 11 al 18 de junio, 9) 18 al 25 de junio, 10) 25 de junio al 2 de julio, 11) 2 al 9 de julio, 12) 9 al 16 de julio.

En la figura 26 se observa la detección molecular con oligonucleótidos específicos Ppa1 y Ppa2 para el período del 16 de julio al 31 de diciembre de 2010, encontrando la presencia del hongo en el período del 10 de septiembre al 17 de diciembre de 2010, excepto en la semana del 5 al 19 de noviembre.



Figura 26. Detección molecular de urediniosporas de *P. pachyrhizi* con oligonucleótidos específicos Ppa1 y Ppa2 del 16 de julio al 31 de diciembre de 2010. Carriles: 1) Marcador molecular 100 pb, 2) Testigo positivo, 3) Testigo negativo PCR, 4) Testigo negativo extracción, 5) 16 al 30 de julio, 6) 30 de julio al 13 de agosto, 7) 13 al 27 de agosto, 8) 27 de agosto al 10 de septiembre, 9) 10 al 24 de septiembre, 10) 24 de septiembre al 8 de octubre, 11) 8 al 22 de octubre, 12) 22 de octubre al 5 de noviembre, 13) 5 al 19 de noviembre, 14) 19 de noviembre al 3 de diciembre, 15) 3 al 17 de diciembre, 16) 17 al 31 de diciembre.

Mediante la prueba de PCR anidada, se confirmó la presencia del hongo en el período del 10 de septiembre al 17 de diciembre de 2010, excepto en la semana del 5 al 19 de noviembre (Figura 27).

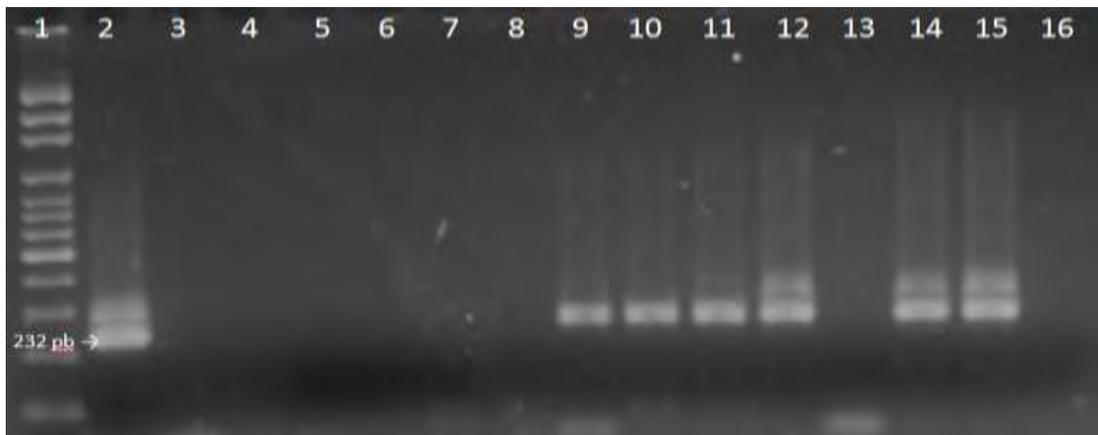


Figura 27. Detección molecular de urediniosporas de *P. pachyrhizi* con oligonucleótidos específicos Ppa1-aF y Ppa2-aR del 16 de julio al 31 de diciembre de 2010. Carriles: 1) Marcador molecular 100 pb, 2) Testigo positivo, 3) Testigo negativo PCR, 4) Testigo negativo extracción, 5) 16 al 30 de julio, 6) 30 de julio al 13 de agosto, 7) 13 al 27 de agosto, 8) 27 de agosto al 10 de septiembre, 9) 10 al 24 de septiembre, 10) 24 de septiembre al 8 de octubre, 11) 8 al 22 de octubre, 12) 22 de octubre al 5 de noviembre, 13) 5 al 19 de noviembre, 14) 19 de noviembre al 3 de diciembre, 15) 3 al 17 de diciembre, 16) 17 al 31 de diciembre.

Para el período del 31 de diciembre de 2010 al 17 de junio de 2011, no se encontró la presencia de *P. pachyrhizi* con los oligonucleótidos Ppa1 y Ppa2 (Figura 28).

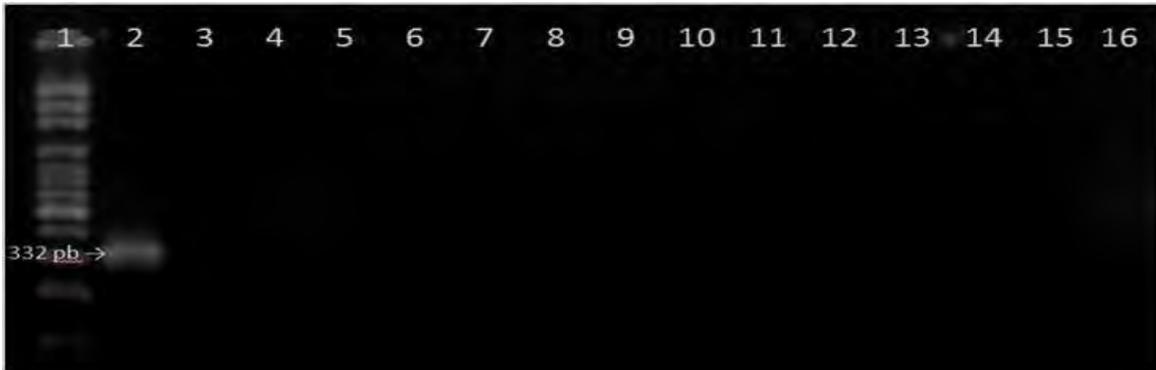


Figura 28. Detección molecular de urediniosporas de *P. pachyrhizi* con oligonucleótidos específicos Ppa1 y Ppa2 del 31 de diciembre de 2010 al 17 de junio de 2011. Carriles: 1) Marcador molecular 100 pb, 2) Testigo positivo, 3) Testigo negativo PCR, 4) Testigo negativo extracción, 5) 31 de diciembre al 14 de enero, 6) 14 al 28 de enero, 7) 28 de enero al 11 de febrero, 8) 11 al 25 de febrero, 9) 25 de febrero al 11 de marzo, 10) 11 al 25 de marzo, 11) 25 de marzo al 8 de abril, 12) 8 al 22 de abril, 13) 22 de abril al 6 de mayo, 14) 6 al 20 de mayo, 15) 20 de mayo al 3 de junio, 16) 3 al 17 de junio.

Sin embargo, con la prueba de PCR anidada se detectó la presencia de *P. pachyrhizi* para el período del 31 de diciembre de 2010 al 7 de febrero de 2011; así como del 8 de abril al 6 de mayo de 2011 (Figura 29).

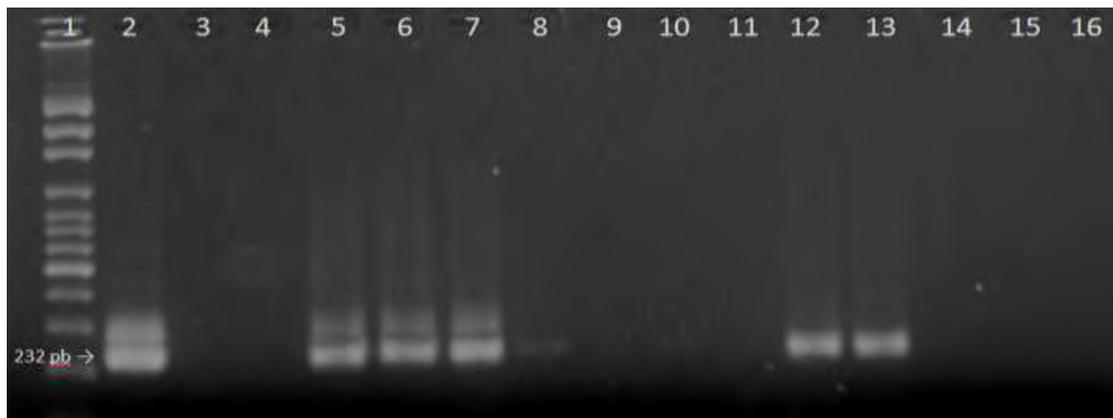


Figura 29. Detección molecular de urediniosporas de *P. pachyrhizi* con oligonucleótidos específicos Ppa1-aF y Ppa2-aR del 31 de diciembre de 2010 al 17 de junio de 2011. Carriles: 1) Marcador molecular 100 pb, 2) Testigo positivo, 3) Testigo negativo PCR, 4) Testigo negativo extracción, 5) 31 de diciembre al 14 de enero, 6) 14 al 28 de enero, 7) 28 de enero al 11 de febrero, 8) 11 al 25 de febrero, 9) 25 de febrero al 11 de marzo, 10) 11 al 25 de marzo, 11) 25 de marzo al 8 de abril, 12) 8 al 22 de abril, 13) 22 de abril al 6 de mayo, 14) 6 al 20 de mayo, 15) 20 de mayo al 3 de junio, 16) 3 al 17 de junio.

Por otra parte, se realizó la prueba de PCR con los oligonucleótidos Ppa1 y Ppa2 sin encontrar la presencia del hongo del 15 de abril al 1 de julio de 2011 (Figura 30), ni del 1 de julio al 2 de septiembre de 2011 (Figura 31):

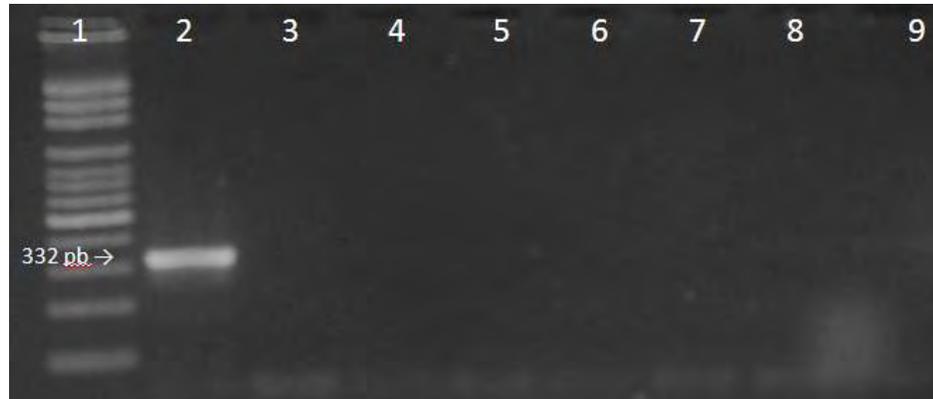


Figura 30. Detección molecular de urediniosporas de *P. pachyrhizi* con oligonucleótidos específicos Ppa1 y Ppa2 del 15 de abril al 1 de julio de 2011. Carriles: 1) Marcador molecular 100 pb, 2) Testigo positivo, 3) Testigo negativo 4) 15 al 29 de abril, 5) 29 de abril al 6 de mayo, 6) 6 al 20 de mayo, 7) 20 de mayo al 3 de junio, 8) 3 al 17 de junio, 9) 17 de junio al 1 de julio.

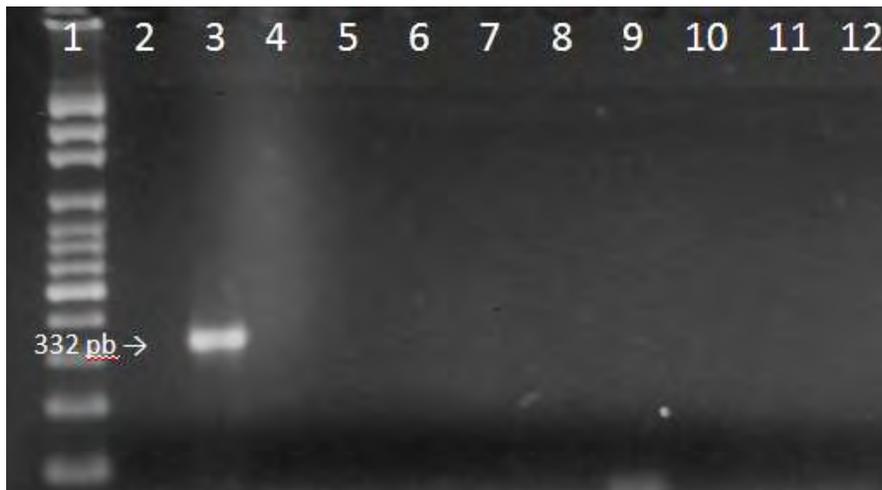


Figura 31. Detección molecular de urediniosporas de *P. pachyrhizi* con oligonucleótidos específicos Ppa1 y Ppa2 del 1 de julio al 2 de septiembre de 2011. Carriles: 1) Marcador molecular 100 pb, 2) vacío, 3) Testigo positivo, 4) Testigo negativo, 5) 1 al 15 de julio, 6) 15 al 22 de julio, 7) 22 al 29 de julio, 8) 29 de julio al 5 de agosto, 9) 5 al 12 de agosto, 10) 12 al 19 de agosto, 11) 19 al 26 de agosto, 12) 26 de agosto al 2 de septiembre.

En la figura 32 se muestra que no fue detectada la presencia de *P. pachyrhizi* con los oligonucleótidos Ppa1 y Ppa2 en el período del 2 de septiembre al 11 de noviembre de 2011, contrario a lo sucedido en 2010 para el mismo período.



Figura 32. Detección molecular de urediniosporas de *P. pachyrhizi* con oligonucleótidos específicos Ppa1 y Ppa2 del 2 de septiembre al 11 de noviembre de 2011. Carriles: 1) Marcador molecular 100 pb, 2) Testigo positivo, 3) Testigo negativo, 4) 2 al 9 de septiembre, 5) 9 al 16 de septiembre, 6) 16 al 23 de septiembre, 7) 23 al 30 de septiembre, 8) 30 de septiembre al 7 de octubre, 9) 7 al 14 de octubre, 10) 14 al 21 de octubre, 11) 21 al 28 de octubre, 12) 28 de octubre al 4 de noviembre, 13) 4 al 11 de noviembre, 14) Testigo negativo extracción.

Asimismo, se realizó la PCR anidada con los oligonucleótidos Ppa1-aF y Ppa2-aR para la detección de *P. pachyrhizi* del período del 17 de junio al 11 de noviembre de 2011, sin encontrar su presencia, como se muestra en la figura 33:



Figura 33. Detección molecular de urediniosporas de *P. pachyrhizi* con oligonucleótidos específicos Ppa1-aF y Ppa2-aR del 17 de junio al 11 de noviembre de 2011. Carriles: 1) Marcador molecular 100 pb, 2) Testigo positivo, 3) Testigo negativo, 4) 17 de junio al 1 de julio, 5) 1 al 15 de julio, 6) 15 al 29 de julio, 7) 29 al 12 de agosto, 8) 12 al 19 de agosto, 9) 19 al 26 de agosto, 10) 26 de agosto al 2 de septiembre, 11) 2 al 9 de septiembre, 12) 9 al 16 de septiembre, 13) 16 al 23 de septiembre, 14) 23 al 30 de septiembre, 15) 30 de septiembre al 7 de octubre, 16) 7 al 14 de octubre, 17) 14 al 21 de octubre, 18) 21 al 28 de octubre, 19) 28 de octubre al 4 de noviembre, 20) 4 al 11 de noviembre.

- **Revisión de las cintas para corroborar la ausencia de urediniosporas de *P. pachyrhizi*.**

La parte complementaria de las cintas procesadas, en los casos de detección molecular negativa, fue observada al microscopio (Figura 34). No se encontró en ningún caso la presencia de urediniosporas de *P. pachyrhizi* impactadas en la cinta de celofán.

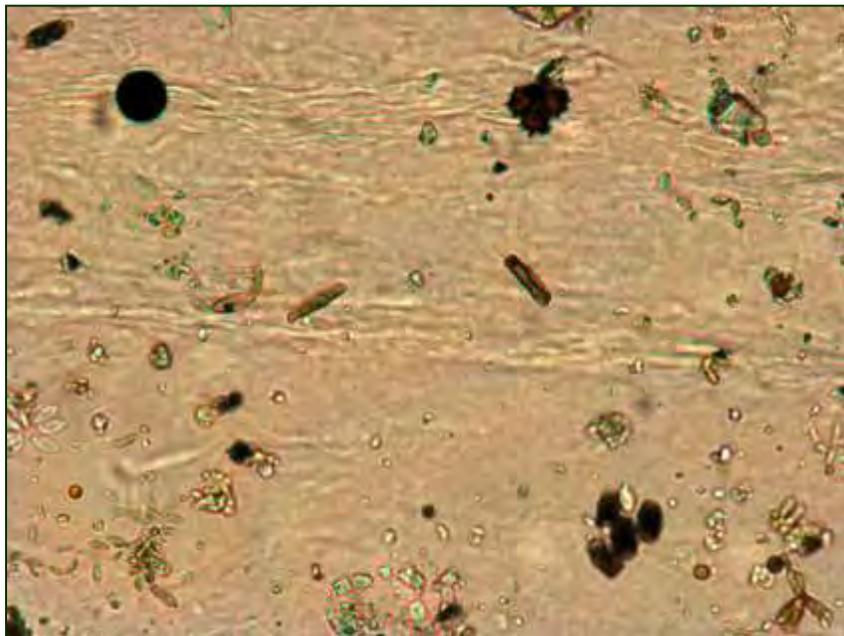


Figura 34. Observación al microscopio de las cintas muestreadas en campo 40x.

- **Obtención de variables ambientales del Campo Experimental “Las Huastecas del INIFAP”.**

Se registraron los parámetros ambientales de la zona de estudio: temperatura máxima (Figura 35), temperatura media (Figura 36), temperatura mínima (Figura 37) y precipitación (Figura 38), a partir del mes de enero de 2010 hasta el mes de diciembre de 2011.

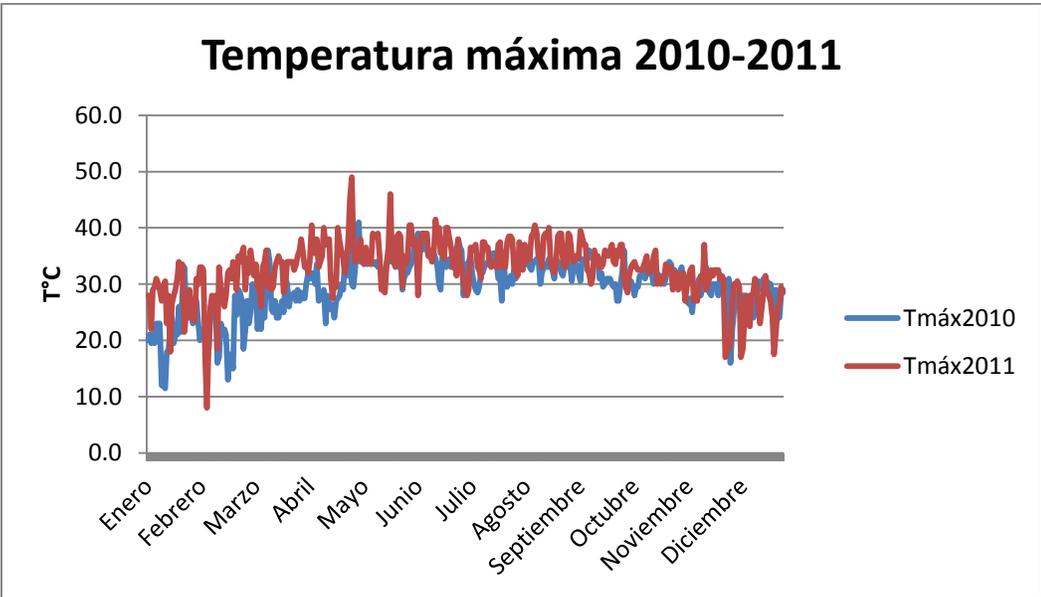


Figura 35. Temperatura máxima durante 2010-2011, en la estación del Campo Experimental Las Huastecas del INIFAP.

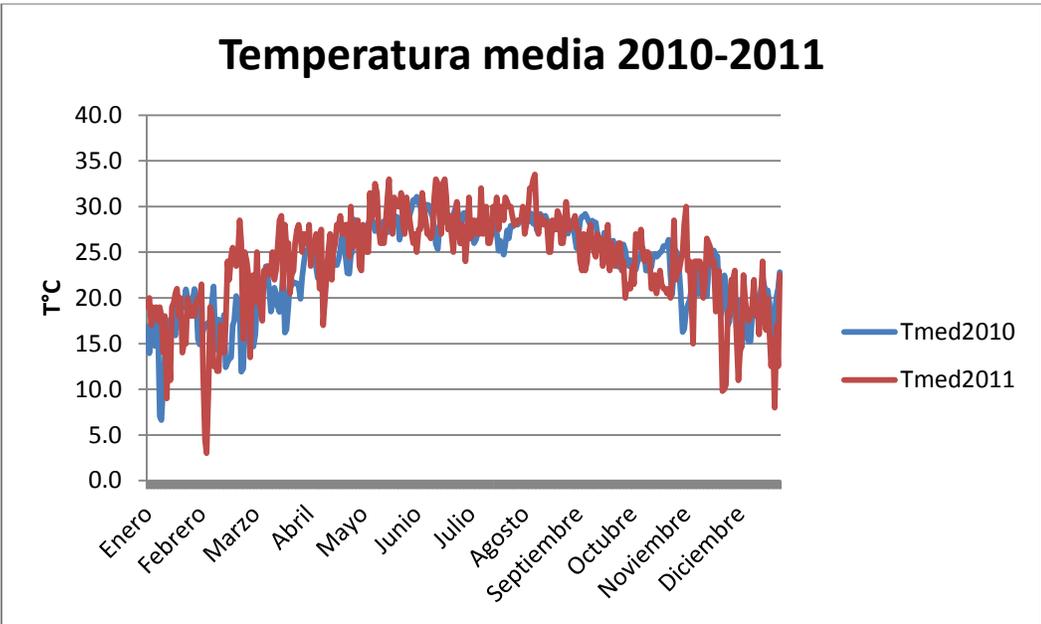


Figura 36. Temperatura media durante 2010-2011, en la estación del Campo Experimental Las Huastecas del INIFAP.

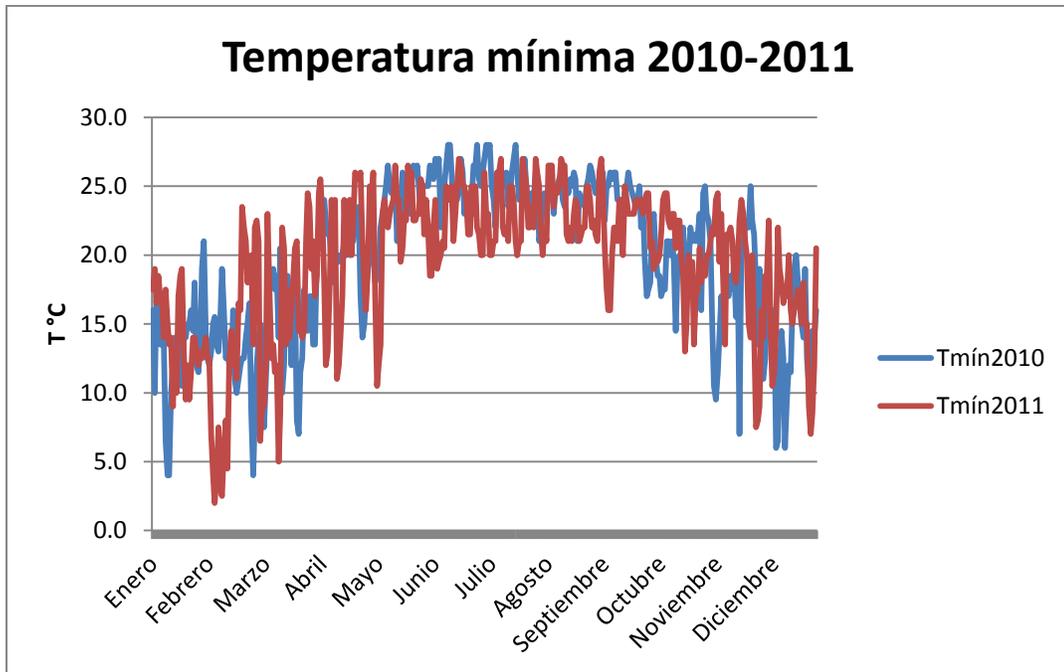


Figura 37. Temperatura mínima durante 2010-2011, en la estación del Campo Experimental Las Huastecas del INIFAP.

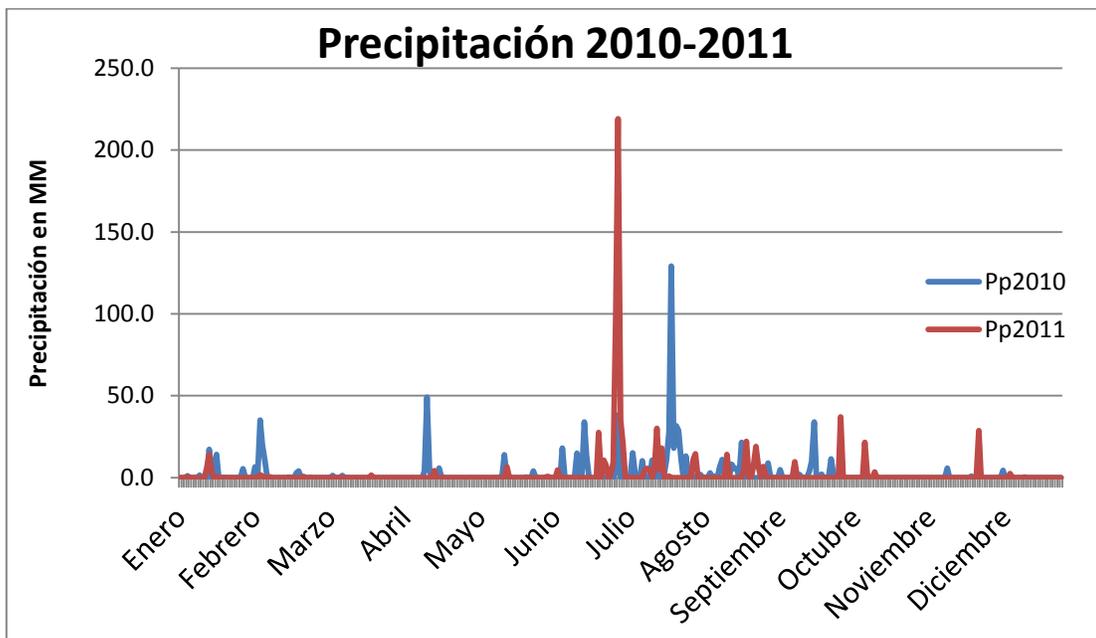


Figura 38. Precipitación durante 2010-2011, en la estación del Campo Experimental Las Huastecas del INIFAP.

Asimismo, se registró la humedad relativa de enero de 2010 a junio de 2011, debido a que la estación meteorológica dejó de funcionar (Figura 39).

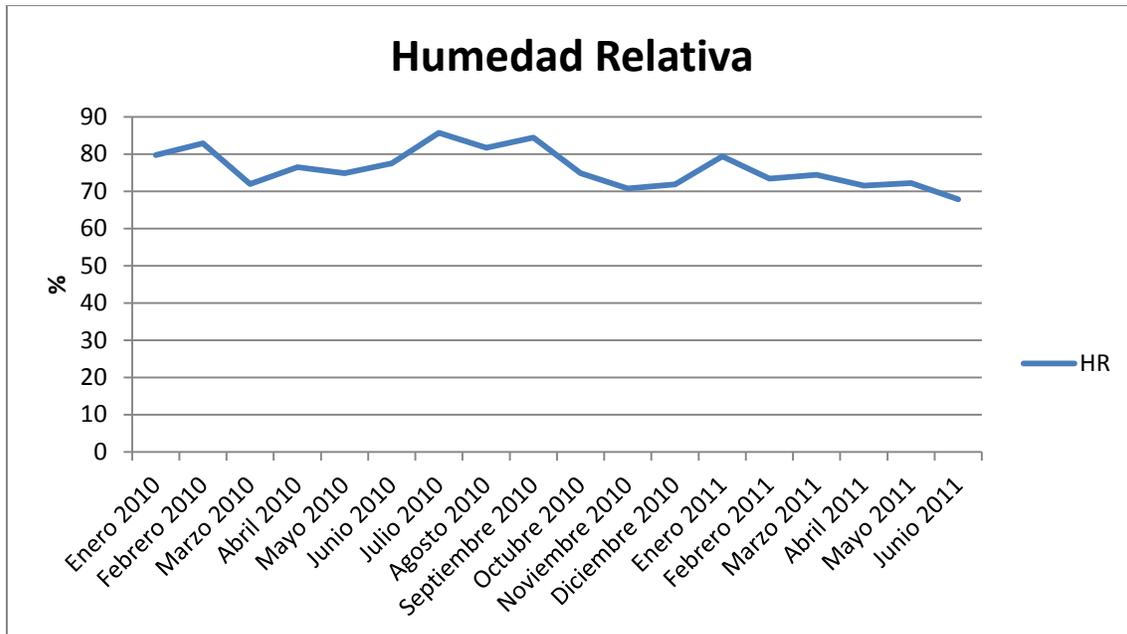


Figura 39. Humedad relativa durante el período de enero 2010-junio 2011, en la estación del Campo Experimental Las Huastecas del INIFAP.

- **Análisis de las variables ambientales del Campo Experimental “Las Huastecas” del INIFAP.**

Se realizó el análisis estadístico con la prueba de T de las variables de temperatura de 2010 y 2011. Los valores de temperatura máxima anual varían significativamente ($p < 0.05$) durante el año 2010, respecto a lo observado en 2011, con una media de 29.5 y 32.5°C, respectivamente. Sin embargo, los valores de temperatura media y mínima anual, no presentan diferencias significativas entre ambos años.

Los únicos meses que presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) para las tres variables de temperatura (máxima, media y mínima) entre los dos años, fueron los meses de septiembre y octubre, donde la diferencia en la media mensual fue de 1 a 2°C, en promedio.

En el caso de la precipitación para ambos años, el valor de la precipitación acumulada anual para 2010 fue de 823 mm y para 2011 de 763.1. La distribución de la precipitación durante ambos años fue diferente; en el año 2010 se registraron precipitaciones acumuladas mensuales superiores a 45 mm en los meses de enero, febrero, abril y mayo, mientras que para 2011 las lluvias se registraron casi en su totalidad a partir del mes de junio (Figura 40).

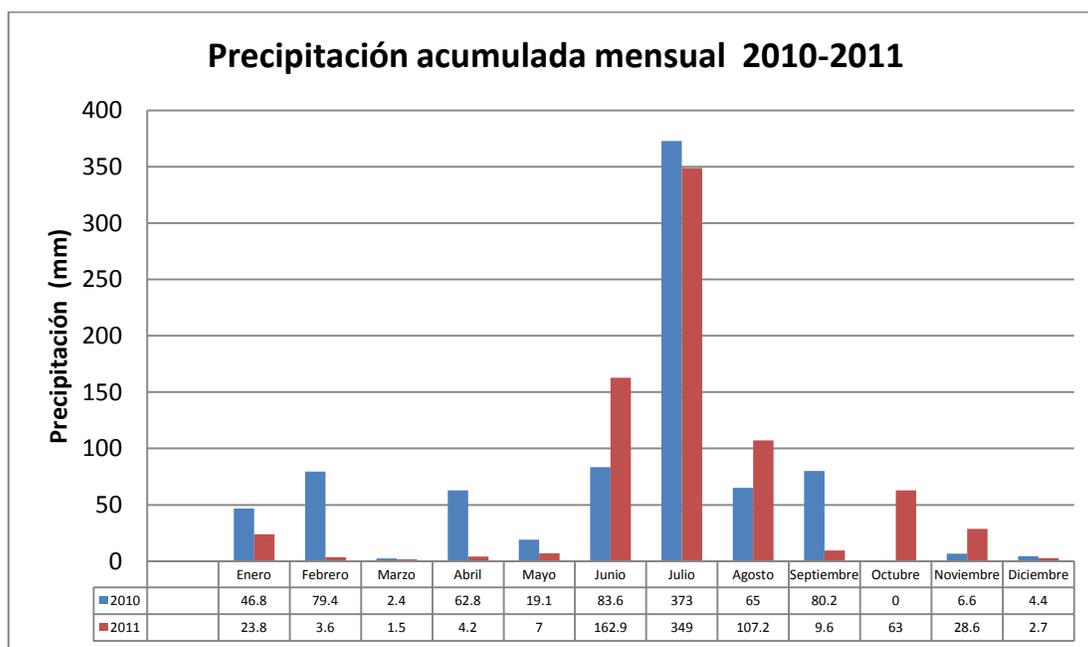


Figura 40. Precipitación acumulada mensual durante el período de enero 2010- diciembre 2011, en la estación del Campo Experimental Las Huastecas del INIFAP.

DISCUSIÓN

La roya asiática causada por *P. pachyrhizi* es reconocida por ser la enfermedad foliar más destructiva de los cultivos de soya (Terán 2007, Isard *et al.*, 2011). El daño ocasionado puede causar pérdidas de hasta el 100% de los cultivos, dependiendo del momento de inicio de la enfermedad, logrando bajo condiciones óptimas una defoliación severa en tres semanas (Terán *et al.*, 2007). Según lo reportado por SINAVEF para 2010, las pérdidas económicas en México pueden alcanzar los 11 mil millones de pesos (SINAVEF, 2010).

En México se han desarrollado métodos para muestreo y diagnóstico de la enfermedad en parcelas, mediante inspecciones continuas en busca de signos de la enfermedad, con el uso de tiras inmunocromatográficas que permiten un diagnóstico rápido y preciso de la presencia de la enfermedad en las plantas (SENASICA, 2012), o incluso a través de la detección específica de *P. pachyrhizi* por PCR en hojas sospechosas de infección. Sin embargo, estas pruebas se realizan cuando el hongo ya inició la infección en el cultivo. Por ello, es de primordial importancia realizar la detección o diagnóstico del hongo antes de que aparezcan los primeros signos de la enfermedad en las plantas. De esta manera, es posible proponer acciones oportunas de prevención y control, que permitan contrarrestar el avance de la enfermedad y los daños que ésta produce.

Se han diseñado modelos para pronosticar la dispersión y distribución potencial de *P. pachyrhizi*, los cuales utilizan variables tanto meteorológicas, como de distribución y de abundancia del patógeno. Éstas proporcionan información precisa sobre las zonas con mayor riesgo de infección (SINAVEF, 2011). Debido a que la diversidad de condiciones climáticas en las que se desarrollan los hongos es muy amplia, aunado a las variaciones microclimáticas (humedad por riego, radiación solar, cambios de temperatura) que se presentan dentro de los cultivos, se pueden modificar las condiciones y el tiempo estimados para la maduración y liberación de las esporas de hongos (Rogers *et al.*, 2009). Para esto, es importante evaluar en campo la presencia de urediniosporas de *P. pachyrhizi* para

aceptar o descartar de manera oportuna la presencia del patógeno en áreas determinadas.

En este estudio fue posible realizar por primera vez, con éxito y de manera eficiente, la detección molecular de urediniosporas de *P. pachyrhizi* dispersas en la atmósfera de cultivos de soya en México. La detección por PCR fue realizada en muestras de laboratorio y de campo, ofreciendo una detección confiable y específica de este agente patógeno. Se verificó la sensibilidad de los oligonucleótidos específicos Ppa1 y Ppa2 (Frederick, *et al.*, 2002), detectando la presencia mínima de 4 urediniosporas/ μ l de muestra. Debido a que las concentraciones de urediniosporas en la atmósfera pueden ser muy bajas, se decidió realizar el diseño y estandarización de la PCR anidada mediante los oligonucleótidos Ppa1-aF y Ppa2-aR, con el fin de mejorar la sensibilidad de la prueba, logrando la detección de 0.4 urediniosporas/ μ l de muestra. Asimismo, se demostró la viabilidad de esta prueba en laboratorio y en campo, mediante la detección del ADN de urediniosporas del aire colectadas en los experimentos realizados tanto en el minitúnel de viento, como en los cultivos de soya. El método utilizado para el monitoreo de urediniosporas de *P. pachyrhizi*, permitió detectarlas aun cuando estaban mezcladas con otras partículas, tanto orgánicas como inorgánicas, presentes en la atmósfera. Lo que concuerda con los resultados obtenidos por Calderón *et al.*, (2002), quienes siguieron el mismo método, detectando el ADN de esporas fúngicas de muestras que tenían una mezcla de otras partículas colectadas del aire de la Ciudad de México.

La detección molecular de *P. pachyrhizi* en cultivos de soya mostró un resultado positivo para determinar la presencia de las urediniosporas del hongo en el aire, antes de que se desarrollara la enfermedad. El patógeno fue detectado a partir del período del 10 al 24 de septiembre de 2010, **cinco semanas antes** de que fueran reportados los primeros signos de la enfermedad, los cuales fueron observados hasta el 20 de octubre de 2010. Esto demuestra el potencial del método para la detección temprana del agente patógeno.

El monitoreo aerobiológico y la detección del ADN de urediniosporas de *P. pachyrhizi* utilizando los oligonucleótidos Ppa1 y Ppa2, así como su PCR anidada (Ppa1-aF y Ppa2-aR), permitió la detección del hongo en el período del 10 de septiembre al 17 de diciembre de 2010, excepto en el período del 5 al 19 de noviembre, en el cual no se encontraron urediniosporas en las muestras. Asimismo, con la PCR anidada, se obtuvieron detecciones positivas durante el período del 31 de diciembre de 2010 al 25 de febrero de 2011 y del 8 de abril al 6 de mayo de 2011. Lo anterior coincide con los reportes de roya asiática registrados durante 2011 por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Tamaulipas, para el municipio de Altamira (comunicación personal con el Dr. Terán, experto nacional en roya asiática de la soya). Contrario a lo sucedido en 2010, para el período de septiembre a noviembre de 2011, la detección de urediniosporas de *P. pachyrhizi* del aire fue negativa, lo que coincidió con informes proporcionados por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Tamaulipas, sobre la ausencia del patógeno en el área de Altamira durante ese período (SINAVEF, 2011 y comunicación personal con el Dr. Terán).

La presencia de las urediniosporas de *P. pachyrhizi* en el aire del cultivo se presentó en condiciones de precipitación de 0-10 mm diarios, humedad relativa 70-85% y temperatura media de 12-26°C, siendo estas dos últimas favorables para el desarrollo óptimo de la enfermedad, según lo reportado por Terán (2007).

De acuerdo con el análisis de variables ambientales, los valores de temperatura máxima, media y mínima fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) para los meses de septiembre a octubre de 2010 (cuando se realizó la primera detección del hongo en el aire), con respecto al mismo período de 2011. La temperatura media reportada para 2010 fue de 23 a 25°C, en comparación con la registrada en 2011 que varió entre los 24 y 27°C, alcanzando una máxima de 32 a 34 °C para ese período. Las temperaturas máximas registradas en abril y mayo de 2010 alcanzaron entre los 38 y 41°C, no reportándose el hongo en la zona; mientras que las temperaturas máximas registradas en 2011 alcanzaron entre los 40 a 49°C, sin embargo, la detección del hongo fue positiva. Esto demuestra de

que pesar de que la temperatura óptima para el desarrollo de *P. pachyrhizi* es entre los 18 y 25°C, éste es capaz de crecer a temperaturas elevadas. Lo anterior ha sido corroborado directamente por los productores de soya de la zona (comunicación personal con el Dr. Terán).

Otro aspecto importante a considerar es que de enero a mayo de 2010 sólo se presentó una precipitación acumulada de 210 mm, con una HR que fluctuó entre 71 y 83%, mientras que para ese mismo período en 2011 se registró menor precipitación acumulada (40 mm) y con una HR entre 70 y 80%. Aunque de enero a mayo de ambos años el porcentaje de HR fue similar; sólo en 2011 se obtuvieron algunas detecciones positivas en el período del 8 de abril al 6 de mayo.

Debido a la discrepancia de los resultados anteriores, tanto meteorológicos como de la presencia del hongo en el aire y en las plantas, entre lo registrado en 2010 y 2011, es necesario continuar la vigilancia epidemiológica de la presencia del hongo, tanto en la zona de estudio como en el Estado de Tamaulipas de manera permanente, así como contar con estaciones meteorológicas funcionales y que sean validadas por un Sistema Meteorológico Estatal y Nacional, que registre parámetros ambientales como temperatura, HR, precipitación, dirección y velocidad del viento, radiación solar y punto de rocío, entre otros, que permitan correlacionar adecuadamente y corroborar aquellos factores ambientales que favorezcan el desarrollo del hongo, su dispersión en la atmósfera y el riesgo de infección de los cultivos.

De acuerdo con información proporcionada por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Tamaulipas, los registros positivos de *P. pachyrhizi* en cultivos (en las plantas) del estado se presentaron desde agosto de 2010 en localidades situadas entre 11 y 109 Km de distancia del Campo Experimental “Las Huastecas”, INIFAP, en donde la primera detección en el aire se presentó hasta el 10 de septiembre de 2010 (Figura 41, Tabla 9). Lo anterior sugiere que las urediniosporas de *P. pachyrhizi* probablemente fueron transportadas por el viento desde las localidades infectadas hasta la zona de estudio.

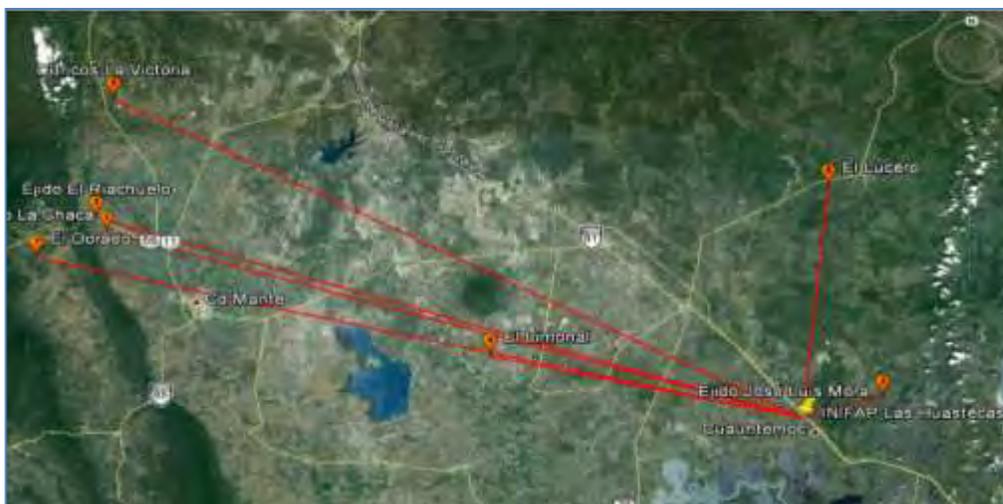


Figura 41. Detecciones positivas (1-9) en el estado de Tamaulipas, proporcionadas por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal, para el período de agosto a septiembre de 2010.

Tabla 9. Detecciones positivas para <i>P. pachyrhizi</i> en el estado de Tamaulipas, proporcionadas por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal, para el período de agosto a septiembre de 2010					
Municipio	Predio	Fecha de detección	Latitud	Longitud	Distancia a trampa de esporas tipo Hirst
El Mante	Ejido La Chaca	2010-08-09	22.84938	-99.09464	101 km
Altamira	Ejido José M. Luis Mora	2010-08-13	22.59431	-98.05669	11 km
Gómez Farías	Ejido El Riachuelo	2010-09-08	22.86996	-99.10839	103 km
González	El Limonal	2010-09-13	22.66171	-98.58205	44 km
Xicoténcatl	Cítricos La Victoria	2010-09-20	23.04453	-99.08292	108 km
Aldama	El Lucero	2010-09-24	22.90427	-98.12453	40 km
Ocampo	El Dorado	2010-09-27	22.81211	-99.18928	109 km

Para llevar a cabo la vigilancia continua de la presencia de las urediniosporas de *P. pachyrhizi* en el aire del Estado de Tamaulipas, con la que será posible realizar la detección temprana y oportuna del hongo en el aire de los cultivos, antes de que las plantas sean infectadas y se desarrolle la enfermedad, se propone la creación de una red aerobiológica de vigilancia epidemiológica

fitosanitaria, mediante la colocación de diversas trampas de esporas ubicadas en zonas determinadas mediante mapas de riesgo, los cuales serán desarrollados con base en: detecciones positivas registradas en los cultivos, dirección de los vientos y otras variables ambientales, así como por modelos de dispersión y distribución potencial, como el modelo de Hysplit (Hybrid Single-Particle Lagrangian Integrated Trajectory Model), el cual fue desarrollado por Roland Draxler de la Administración Nacional de Océanos y Atmósfera (NOAA, 2012), con el que se puede modelar el transporte y dispersión de las aeropartículas que se originan en diversas fuentes, calculándolo tanto a partir de los movimientos de difusión y advección del aire, como de la concentración de partículas en el sistema. Así como, utilizando el Sistema de Modelado Aerobiológico, IAMS (Isard *et al.*, 2005) el cual fue diseñado para pronosticar la incursión y dispersión de *P. pachyrhizi*, causante de la roya asiática de la soya en Estados Unidos de América. Lo anterior permitiría que la red aerobiológica lleve a cabo el monitoreo integral y de amplia cobertura de los cultivos de soya y de otras leguminosas en peligro de infección.

Los resultados obtenidos con la red pueden ser desplegados en plataformas de información de vigilancia epidemiológica, como el sistema SCOPE y sistemas de alerta directa a los productores. El éxito de este tipo de monitoreo ya ha sido demostrado en Estados Unidos, donde se han tomado medidas oportunas para el manejo adecuado de la roya asiática, creando la plataforma de información ipmPIPE por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) (PIPE, 2012), la cual proporciona el registro en tiempo real de la dispersión del patógeno en Norteamérica, así como de probables escenarios de distribución potencial y manejo adecuado de la enfermedad. Esta plataforma beneficia a miles de productores (Isard *et al.* 2011). De esta manera, los agricultores podrán tomar medidas de prevención y control en tiempo y espacio para evitar el desarrollo de la enfermedad, protegiendo al cultivo con la aplicación de fungicidas químicos, como los triazoles o las estrobilurinas para su control. En el caso de no encontrarse el patógeno en el aire, se retrasaría o evitaría la aplicación del fungicida, por lo que se reducirían los gastos en el manejo del

cultivo. Por otro lado, el monitoreo continuo no sólo de las urediniosporas de *P. pachyrhizi*, sino de diversas especies de hongos patógenos de importancia nacional en zonas estratégicas del país, permitirá dar un seguimiento a la diseminación de las enfermedades y brindará una vigilancia epidemiológica fitosanitaria, tanto para las zonas que presenten la enfermedad, como para aquellas que se encuentren en riesgo o aun no la presenten.

CONCLUSIONES

- Se realizó por primera vez en México, con éxito y de manera eficiente la detección molecular de urediniosporas de *P. pachyrhizi* colectadas del aire mediante la prueba de PCR, demostrándose la viabilidad de esta prueba en laboratorio y en campo, mediante la detección del ADN de urediniosporas del aire colectadas en los experimentos realizados tanto en el minitúnel de viento, como en los cultivos de soya.
- Se verificó la sensibilidad de los oligonucleótidos específicos Ppa1 y Ppa2 (Frederick, *et al.*, 2002) detectando la presencia mínima de 4 urediniosporas/ μ l de muestra.
- Se realizó el diseño y estandarización de la PCR anidada mediante los oligonucleótidos Ppa1-aF y Ppa2-aR, la cual permitió mejorar la sensibilidad de la prueba, logrando la detección de 0.4 urediniosporas/ μ l de muestra.
- Se determinó la presencia de *P. pachyrhizi* con los oligonucleótidos Ppa1 y Ppa2 (Frederick, *et al.* 2002) en los cultivos de soya en el período del 10 de septiembre al 17 de diciembre de 2010.
- Se determinó la presencia de *P. pachyrhizi* en los cultivos de soya mediante la PCR anidada con los oligonucleótidos Ppa1-aF y Ppa2-aR en el período del 10 de septiembre al 17 de diciembre de 2010, del 31 de diciembre de 2010 al 25 de febrero de 2011 y del 8 de abril al 6 de mayo.
- La presencia de las urediniosporas de *P. pachyrhizi* en el aire del cultivo se presentó en condiciones de precipitación de 0-10 mm diarios, humedad relativa 70-85% y temperatura media de 12-26°C, siendo estas dos últimas favorables para el desarrollo óptimo de la enfermedad, según lo reportado por Terán (2007).
- Las urediniosporas de *P. pachyrhizi* fueron detectadas del aire aun cuando se registraron temperaturas máximas entre 38 y 49°C.
- La detección de urediniosporas de *P. packyrhizi* del aire fue negativa para el período de septiembre a noviembre de 2011, contrario a lo sucedido en 2010; lo que coincide con informes de la zona en donde se determinó la

ausencia del patógeno en el área de Altamira durante ese período (SINAVEF, 2011).

- La falta de estaciones meteorológicas funcionales y continuas no permitieron contar con el registro de variables tan importantes como dirección y velocidad del viento y radiación solar entre otras, las cuales son necesarias para realizar un análisis completo y adecuado entre las condiciones ambientales y el desarrollo y presencia del hongo en los cultivos a lo largo del año.
- Se propone la creación de una red aerobiológica de vigilancia epidemiológica fitosanitaria (REMAVEF-Tamaulipas), mediante la colocación de diversas trampas de esporas, ubicadas en zonas determinadas mediante mapas de riesgo, para llevar a cabo el monitoreo integral y de amplia cobertura de los cultivos de soya y de otras leguminosas en peligro de infección. De esta manera, se podrán tomar medidas de prevención y control en tiempo y espacio para evitar el desarrollo de la enfermedad.

PERSPECTIVAS

- Continuar con el monitoreo aerobiológico, mediante la creación de la red aerobiológica de vigilancia epidemiológica fitosanitaria para Tamaulipas (REMAVEF-Tamaulipas) para la detección de roya asiática, mediante el empleo de diversos tipos de trampas de esporas, ubicadas en zonas seleccionadas mediante mapas de riesgo y modelos de dispersión.
- Diseñar estudios aerobiológicos en los que se considere el monitoreo de urediniosporas de *P. pachyrhizi* a diferentes alturas dentro del cultivo, con el fin de determinar si la fuente de inóculo se encuentra dentro del cultivo o proviene de otras localidades.
- Complementar el monitoreo aerobiológico con la instalación de colectores de lluvia, con el fin de determinar la presencia de urediniosporas de *P. pachyrhizi* transportadas a través de la atmósfera, lo cual complementará la vigilancia epidemiológica de la roya asiática, como se ha realizado con éxito en Estados Unidos (Isard *et al.*, 2011).
- Desarrollar el método para realizar la detección molecular de urediniosporas de *P. pachyrhizi* colectadas del aire y del agua de lluvia mediante QPCR (PCR en tiempo real), mediante el cual se cuantificará el ADN de las urediniosporas determinando con exactitud su concentración. Esta técnica ha sido empleada exitosamente para la detección de patógenos en bioaerosoles (Schweigkofler *et al.*, 2004; Walsh *et al.*, 2005; Fountaine *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2007; Viljanen-Rollinson *et al.*, 2007; Falacy *et al.*, 2007 y Rogers *et al.*, 2009).
- Contar con estaciones meteorológicas funcionales y que sean validadas por un Sistema Meteorológico Estatal y Nacional, que registren parámetros ambientales como temperatura, HR, precipitación, dirección y velocidad del viento, radiación solar, punto de rocío, entre otros. Lo que permitirá mostrar la relación entre los factores ambientales y el desarrollo del hongo, con el fin de

predecir mediante modelos como el de Hysplit, su dispersión en la atmósfera y el riesgo de infección de los cultivos.

REFERENCIAS

- Altschul, S., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J. Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Ariatti, A. 2008. Global expansion of soybean rust. En: http://www.ceal.psu.edu/SBR_expansion.pdf
- Ávila, J. 2006. La roya asiática de la soya. *Tu Revista UAT*. Universidad Autónoma de Tamaulipas. Dirección General de Investigación y Posgrado. En: <http://www.turevista.uat.edu.mx/artsoya.html>
- Bonde, M.R., Nester, S.E., Austin, C.N., Stone, C.L., Frederick, R.D., Hartman, G.L. y Miles, M.R. 2006. Evaluation of virulence of *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia* isolates. *Plant Dis.* 90:708–716.
- Bromfield, K.R. 1984. Soybean Rust. Monograph No. 11. St. Paul, MN: American Phytopathological Society.
- Calderón, C., Ward, E., Freeman, J. y McCartney, A. (2002a). Detection of airborne fungal spores sampled by rotating-arm and Hirst-type spore traps using polymerase chain reaction assays. *J Aerosol Sci.* 33:283–296.
- Calderón, C., Ward, E., Freeman, J., Foster, J.S. y McCartney, H.A. (2002b). Detection of airborne inoculum of *Leptosphaeria maculans* and *Pyrenopeziza brassicae* in oilseed rape crops by polymerase chain reaction (PCR) assays. *Plant Pathol.* 51:303-310.
- Cárcamo, R.A. y Aguilar, R.J. 2006. First report of Asian soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* from Mexico. *Plant Dis.* 90:1260.
- Cox, C.S. 1987. *The aerobiological pathway of the microorganisms*. John Wiley & Sons, Nueva York, 293 pp.
- Cui, D., Zhang, Q., Li, M., Hartman, G.L. y Zhao, Y. 2010. Image processing methods for quantitatively detecting soybean rust from multispectral images. *Biosystems Eng.*, 107:186-193.
- Cummins, G. y Hiratsuka, Y. 2003. *Illustrated Genera of Rust Fungi*. American Phytopathological Society, St. Paul.

- Edel, V. 1998. Polymerase chain reaction in mycology: an overview. En: Bridge, P.D., Arora, D.K., Reddy, C.A. y Elander, R.P. (Ed.) *Applications of PCR in Mycology*. Cambridge University Press, pp.1-20.
- EnviroLogix. 2007. QuickStix Kit para la roya de la soja. Catálogo AS 107 LT, 5 pp.
- Edmonds, R.L. y Benninghoff, W.S. 1973. Ecological systems approaches to aerobiology. III. Further model development. Proc. of Workshop/Conf III US/IBP Aerobiology. Program Handbook No 4. Univ. of Michigan, Ann Arbor, USA.
- Edmonds R.L. 1979. *Aerobiology: The Ecological Systems Approach*. Straudsborg (PA): Dowden, Hutchinson and Ross.
- Falacy, J.S., Grove, G.S., Mahaffee, W.F., Galloway, H., Glawe, D.A., Larsen, R.C. y Vandemark, G.J. 2007. Detection of *Erysiphe necator* in air samples using the polymerase chain reaction and species-specific primers. *Phytopathology* 97:1290-1297.
- Flannigan, B., Samson, R.A. y Miller, J.D. 2001. *Microorganisms in home and indoor work environments: diversity, health impacts, investigation and control*. Taylor & Francis, Londres, 490 pp.
- Frederick, R.D., Christine, L., Sinder, G. y Peterson, L. 2002. Polymerase chain reaction assays for the detection and discrimination of the soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*. *Phytopathology* 92:217-227.
- Freeman, J., Ward, E., Calderón, C. y McCartney, H.A. 2002. A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 108:877-886.
- Frenguelli G. 1998. The contribution of aerobiology to agriculture. *Aerobiologia* 14:95-100.
- Goellner, K., Loehrer, M., Cangenbach, L., Conrath, U., Koch, E. y Schaffrath, U. 2010. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. *Mol Plant Pathol.* 11:169-177.
- Gobierno Municipal de Altamira 2011-2013. En: altamira.tamaulipas.gob.mx

- Gregory, P.H. 1973. *Microbiology of the Atmosphere*. Leonard Hill, Londres, 377 pp.
- Hartman, G.L., Miles, M.R. y Frederick, R.D. 2004. Epidemiology and spread of soybean rust. American Seed Trade Association Conference Proceedings 2004.
- Hartman, G.L. y Haudenschild J.S. 2009. Movement of *Phakopsora pachyrhizi* (soybean rust) spores by non-conventional means. *Eur. J. Plant Pathol.* 123:225-228.
- Haugland, R.A., Vesper, S.J. y Wymer, L. 1999. Quantitative measurement of *Stachybotrys chartarum* conidia using real time detection of PCR products with the Taqman™ fluorogenic probe system. *Mol. Cell. Probes.* 13: 329-340.
- Hoefle, C., Loehrer, M., Schaffrath, U., Frank, M., Schultheiss, H. y Hüchelhoven R. 2009. Transgenic suppression of cell death limits penetration success of the soybean rust fungus *Phakopsora pachyrhizi* into epidermal cells of barley. *Phytopathology* 99:220-226.
- Isard, S.A. y Gage, S.H. 2001. *Flow of Life in the Atmosphere: An Airscape Approach to Understanding Invasive Organisms*. Michigan State University Press, 240 pp.
- Isard, S.A., Gage, S.H., Comtois, P. y Russo, J.M. 2005. Principles of the atmospheric pathway for invasive species applied to soybean rust. *Bioscience* 55:85-861.
- Isard, S.A., Dufault, N.S., Miles, M.R., Hartman, G.L., Russo, J.M., De Wolf, E.D. y Morel, W. 2006. The effect of solar irradiance on the mortality of *Phakopsora pachyrhizi* urediniospores. *Plant Dis.* 90:941-945.
- Isard, S.A., Barnes, C.W., Hambleton, S., Ariatti, A., Russo, J.M., Tenuta, A., Gay, D.A. y Szabo L.J. 2011. Predicting seasonal soybean rust incursions into the North American continental Interior using sentinel plot monitoring, spore trapping, and aerobiological modeling. *Plant Dis.* 95:1346-1357.

- Koch, E., Ebrahimnesbat, F. y Hoppe, H.H. 1983. Light and electron-microscopic studies on the development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd) in susceptible soybean leaves. *Phytopathol. Z.* 106:302-320.
- Lacey, M.E. y West, J.S. 2007. *The Air Spora. A manual for catching and identifying airborne biological particles.* Dordrecht: Springer.
- Lamour, K.H., Finley, L., Snover-Clift, K.L., Stack, J.P., Pierzynski, J., Hammerschmidt, R., Jacobs, J.L., Byrne, J.M., Harmon, P.F., Vitoreli, A.M., Wisler, G.C., Harmon, C.L., Levy, L., Zeller, K.A., Stone, C.L., Luster, D.G., y Frederick, R.D. 2006. Early detection of Asian soybean rust using PCR. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2006-0524-01-RS.
- Luo, Y., Ma, Z., Reyes, H.C., Morgan, D. y Michailides, T.J. 2007. Quantification of airborne spores of *Monilinia fructicola* in stone fruit orchards of California using real-time PCR. *Eur. J. Plant Pathol.* 118:145-154.
- Ma, Z. y Michailides T.J. 2006. Approaches for eliminating PCR inhibitors and designing PCR primers for the detection of phytopathogenic fungi. *Crop Prot.* 26:145-161.
- Martin, R., James, D. y L'evesque, C.A. 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies of plant disease management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38:207-239.
- McCartney, H.A., Fitt ,B.D.L. y Schmechel, D. 1997. Sampling bioaerosols in plant pathology. *J Aerosol Sci.* 28:349-364.
- MacNeil, L., Kauri, T. y Robertson, W. 1995. Molecular techniques and their potential application in monitoring the microbiological quality of indoor air. *Can J Microbiol.* 41:657-665.
- Miles, M.R., Levy, C. y Hartman, G.L. 2004b. Summary of the USDA fungicide efficacy trials to control soybean rust in Zimbabwe 2003-2004. Integrated Pest Management Reviews. En: <http://www.ipmcenters.org/newalerts/soybeansrust/>.

- NOAA. 2012. Hybrid Single Particle Lagrangian Integrated Trajectory Model. En: http://www.arl.noaa.gov/documents/Summaries/HYSPLIT_FINAL.pdf
- Olsson, M., Sukura, A., Lindberg, L.A. y Linder, E. 1996. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA by filtration of air. *Scand J Infect Dis.* 28:279-282.
- Ono, Y., Buriticá, P. y Hennen, J.F. 1992. Delimitation of *Phakopsora*, *Physopella* and *Cerotelium* and their species on Leguminosae. *Mycol. Res.* 96:825-850.
- Pathirane, L. 1975. Graphical determination of the main pollen season. *Pollen et Spores* 17:609-610.
- Peccia, J. y Hernandez, M. 2006. Incorporating polymerase chain reaction-based identification, population characterization, and quantification of microorganisms into aerosol science: A review. *Atmos. Environ.* 40:3941-3961.
- PIPE, Integrated Pest Management Pest Information Platform for Extension and Education. 2012. En: <http://sbr.ipmpipe.org/cgi-bin/sbr/public.cg>
- Pivonia, S. y Yang, X.B. 2004. Assessment of the potencial year-round establishment of soybean rust throughout the world. *Plant Dis.* 88:523-529.
- Ploper, L.D. y Devani, M.R. 2002. La roya de la soja: Principales aspectos de la enfermedad y consideraciones sobre su manejo. Soja en Siembra Directa, Octubre 2002, AAPRESID, pp. 51-55.
- Ploper, L.D. 2004. La roya de la soja. En: *Principales conclusiones de la Panamerican Soybean Rust Workshop*. Ploper, L.D. (ed.). Publicación especial No. 24, Tucumán, Argentina. Estación Experimental Agroindustrial, "Obispo Colombes", 24 pp.
- Putnam, M.L. 1995. Evaluation of selected methods of plant disease diagnosis. *Crop Prot.* 14:517-525.
- Rogers, S.L., Atkins, S.D. y West, J.S. 2009. Detection and quantification of airborne inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* using quantitative PCR. *Plant Pathol.* 58:324-331.
- Rozen, S. y Skaletsky, H. J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: Krawetz, S y S. Misener (eds)

Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.

- Saksirirat, W. y Hoppe, H.H. 1991b. Teliospore germination of soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd). *J. Phytopathol.* 132,339-342.
- Schneider, R.W., Hollier, C.A., Whitam, H.K., Palm, M.E., McKemy, J.M., Hernández, J.R., Levy, L. y De Vries-Paterson, R. 2005. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the continental United States. *Plant Dis.* 89:774
- Schweigkofler, W., O'Donnell, K. y Garbelotto, M. 2004. Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites by using real time PCR approach combined with simple spore trapping methods. *Appl. Environ. Micro.* 70: 3512–3520.
- SINAVEF, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria 2009. Ficha Técnica: *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow.
- SINAVEF, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. 2010. Reporte epidemiológico Roya Asiática. En: portal.sinavef.gob.mx/documentos/BoletinesVarios/4_2_7RE_Roya_asiatica_001.pdf
- SINAVEF, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria 2011. Boletín Análisis Epidemiológico Fitosanitario. En: <http://portal.sinavef.gob.mx/EpidemiologiaFitosanitariaRoyaAsiatica.html>
- SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2012. Ficha técnica *Phakopsora pachyrhizi* Sydow&Sydow, Roya asiática de la soya. En: <http://www.senasica.gob.mx>
- Sinclair, J.B. 1982. Rust. En: Sinclair, J.B. 1982. *Compendium of soybean diseases*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Steinlage, T., Miles, M., Isard, S., Marois, J., Wright, D. y Hartman, G. 2006. Detection of low numbers of *Phakopsora pachyrhizi* spores by quantitative real-time PCR. Proceedings of the 2006 National Soybean Rust Symposium.

- Sweet, J.B., Pope, S.J. y Thomas, J.E. 1992. Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in linseed, oilseed rape and sunflower cultivars, and its role in integrated control. Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases, pp.117–125.
- Tadashi, V.J. 2006. La roya de la soya en Brasil. Conferencia Magistral. IV Congreso Brasileiro de Soja. EMBRAPA, Londrina (PR) Brasil.
- Terán, A. 2005. Roya asiática *Phakopsora pachyrhizi* de la soya. Sistema Nacional Sistema Producto - Oleaginosas INIFAP-Campo Experimental Sur de Tamaulipas. En: http://www.oleaginosas.org/art_140.shtml
- Terán, A., Ascencio, G.L., Maldonado, N.M. y Ávila, V.J. 2007. La roya asiática de la soya en México. Folleto Técnico Núm. 22. Campo Experimental Sur de Tamaulipas, CIRNE-INIFAP, Altamira, Tam., México, pp. 1-48.
- USDA 2004. Pest Alert Soybean Rust. En: http://www.aphis.usda.gov/publications/plant_health/content/printable_version/Soybean_Rust_22.pdf
- Vesper, S., Dearborn, D.G., Yike, I., Allan, T., Sobolewski, J., y Hinkley, S.F. 2000. Evaluation of *Stachybotrys chartarum* in the house of an infant with pulmonary haemorrhage: Quantitative assessment before, during, and after remediation. *J. Urban Health* 77:68–85.
- Wakefield, A.E. 1996. DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f.sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f.sp. *hominis* in samples of air spora. *J Clin Microbiol.* 34:1754-1759.
- Walsh, K., Korimbocus, J., Boonham, N., Jennings, P. y Hims, M. 2005. Using real-time PCR to discriminate and quantify the closely related wheat pathogens *Oculimacula yallundae* and *Oculimacula acuformis*. *J. Phytopathol.* 153:715-721.
- Ward, E. 1994. Use of the polymerase chain reaction for identifying plant pathogens. En: Blakeman, J.P. y Williamson, B. (ed.), *Ecology of plant pathogens*. CAB International, Wallingford, UK, pp.143-160.

- Ward, E. 1995. Improved polymerase chain reaction (PCR) detection of *Gaeumannomyces graminis* including a safeguard against false negatives. *Eur. J. Plant Pathol.* 101:561-566.
- Ward, E. y Adams, M.J. 1998. Analysis of ribosomal DNA sequences of *Polymyxa* species and related fungi and the development of genus- and species-specific PCR primers. *Mycol Res.* 102:965–974.
- West, J., Atkins, S.D., Emberlin, J. y Fitt, B.D. 2008. PCR to predict risk of airborne disease. *Trends Microbiol.*16:8.
- Williams, R.H., Ward, E. y McCartney, H.A. 2001. Methods for integrated air sampling and DNA analysis for detection of airborne fungal spores. *Appl Environ Microb.* 67:2453-2459.
- Yeh, C.C., Tschanz, A.T. y Sinclair, J.B. 1981. Induced teliospore formation by *Phakopsora pachyrhizi* on soybeans and other hosts. *Phytopathology* 71:1111-1112.
- Yorinori, J.T., Nunes, J.J. y Lazzarotto J.J. 2004. Ferrugem “asiática” da soja no Brasil: evolucao importancia economica e controle. Documentos 247. EMBRAPA. Londrina.