



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DETECCIÓN MOLECULAR DE ASCOSPORAS DE  
*Sclerotinia sclerotiorum* DISPERSAS EN LA ATMÓSFERA  
DE CULTIVOS AGRÍCOLAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I O L O G A**

**P R E S E N T A:**

**HILDA ADRIANA GUERRERO PARRA**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. MARÍA DEL CARMEN LETICIA  
CALDERÓN EZQUERRO**

**2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

*“...Y entonces, un día, llegó una criatura cuyo material genético no era muy diferente de las estructuras moleculares reproductoras de cualquier otra clase de organismos del planeta, que dicha criatura llamó Tierra. Pero era capaz de reflexionar sobre el misterio de su origen, de estudiar el extraño y tortuoso sendero por el cual había surgido desde la materia estelar. Era el material del Cosmos contemplándose a sí mismo... Se llamó a sí mismo humano. Y ansió regresar a las estrellas”.*

*Carl Sagan*

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Guerrero

Parra

Hilda Adriana

5524189688

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

300117321

2. Datos del tutor

Dr

María del Carmen Leticia

Calderón

Ezquerro

3. Datos del sinodal 1

Dr

Joaquín

Cifuentes

Blanco

4. Datos del sinodal 2

M en C

Alfonso José

Vilchis

Peluyera

5. Datos del sinodal 3

Dra

Concepción

Toriello

Nájera

6. Datos del sinodal 4

Dra

María del Rocío

Reyes

Montes

7. Datos del trabajo escrito

Detección molecular de ascosporas de *Sclerotinia sclerotiorum* dispersas en la atmósfera de cultivos agrícolas

66 p

2009

## DEDICATORIAS

A Dios, cualquiera que sea su concepción, ya que entre más conozco la complejidad de la vida, mas se me hace imposible no que exista algo más allá.

A mis papás, por todo el amor, esfuerzo y dedicación que tuvieron para mí. Por apoyarme en todo momento y ser la luz que ilumina mi camino. No me alcanzaría la vida para expresarles mi agradecimiento y el amor que les tengo.

Gracias mamá por procurarme siempre, por tu comprensión y amor. Porque día a día ofreciste tu vida por mi bienestar.

Gracias papá por todo tu apoyo y el ánimo que me das para seguir adelante día con día buscando ser siempre alguien mejor, por impulsarme siempre.

A Gaby, gracias por apoyarme y estar siempre conmigo, por tantos momentos divertidos, por ser mi amiga... Te quiero muchísimo hermanita!

A Alberto, por este tiempo juntos, por tu amor, apoyo y compañía, gracias por compartir bellos e inolvidables momentos. M.C.V.H!

A mi madrina Leda (q.e.p.d.) yo se que desde el cielo estás observando este logro...

A mi directora de tesis, Ma. Del Carmen, por ser ejemplo de una mujer exitosa, de tenacidad, con eternas ganas de superación y sobre todo llena de amor. Gracias por todo!

A mi toda mi familia, a pesar de que no podamos vernos tan seguido...  
Miriam, tía Elena, Lupita, Ale, ...,

A mis amigos de la Facultad de Ciencias, por su amistad, compañerismo y compartir prácticas de campo, alegrías, tristezas, fiestas, exámenes, fin de semestre, trabajos...

Karla, Rosario, Karen. Gracias Amigas!!! saben que su amistad y tantas cosas que compartimos juntas son muy importantes para mí ...

Jaime, Miguel. Por su amistad, apoyo y consejos.

Claudia, Cata, Ale, Marisol, Laura, Vero, Vania, ...,

A mis amigos y compañeros del laboratorio:

César. Por resolverme tantas dudas y apoyarme durante el trabajo...  
GRACIAS!!!

Tania. Por tu amistad, apoyo y por hacer agradables esas horas de trabajo que compartimos.

Ivonn. Por apoyarme en el inicio del trabajo, pero sobre todo por escucharme y brindarme tu amistad.

Emmanuel, Adriana, Fidel.

A toda la banda Bio y compañeros de Universum

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

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más profundos agradecimientos a todas aquellas personas e instituciones que permitieron la realización del presente trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma mater, y a la Facultad de Ciencias donde realicé mi formación tanto académica como personal, permitiendo alcanzar este logro.

Al Centro de Ciencias de la Atmósfera (CCA, UNAM). Por permitirme el uso de sus instalaciones.

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

Al Laboratorio de Bioindicadores Moleculares de Contaminación Ambiental del CCA por el uso del espacio y el material y equipo necesario para la realización de este trabajo.

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

Dra. Concepción Toriello Nájera  
Dra. Rocío Reyes Montes.  
Dr. Joaquín Cifuentes Blanco  
M. en C. Alfonso José Vilchis Peluyera

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por la beca financiamiento otorgado para la realización de este trabajo con el proyecto IN229707-2.

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

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

Al Área de Instrumentación Meteorológica del Centro de Ciencias de la Atmósfera por permitirnos el acceso a las bases de datos climatológicos de la zona de estudio:

Ing. Wilfrido Gutiérrez López, además por su apoyo técnico durante el proyecto.

Ing. Manuel García Espinosa  
Pas. Ing. Miguel Ángel Robles Roldan  
Ing. Josué Vázquez Téllez

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) por facilitar los cultivos de frijol para el monitoreo en campo.

Al Laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina por facilitarnos la incubadora para desarrollar parte del trabajo experimental.

Al Laboratorio de Citogenética Ambiental del CCA.



## ÍNDICE

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Introducción</b>	<b>2</b>
<b>Marco Teórico</b>	<b>4</b>
<b>Antecedentes</b>	<b>30</b>
<b>Objetivo General</b>	<b>33</b>
<b>Objetivos particulares</b>	<b>34</b>
<b>Justificación</b>	<b>35</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>36</b>
<b>Actividades a desarrollar</b>	<b>37</b>
<b>Área de Estudio</b>	<b>38</b>
<b>Método</b>	<b>40</b>
<b>Resultados</b>	<b>47</b>
<b>Discusión</b>	<b>53</b>
<b>Referencias</b>	<b>58</b>

## RESUMEN

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary es un hongo ascomicete necrotrófico, fitopatógeno y cosmopolita. Ataca una gran variedad de cultivos económicamente importantes, causando pérdidas que pueden alcanzar el 100% de la cosecha. El impacto de *S. sclerotiorum* sobre los cultivos depende de la susceptibilidad de la planta hospedera y de las condiciones ambientales, por lo que puede variar significativamente año tras año. Asimismo, la dispersión de las ascosporas en la atmósfera es la principal fuente de infección de la enfermedad; por ello, el monitoreo continuo de esporas dispersas en el aire ofrece una medida directa del riesgo de infección antes de que ésta ocurra. El uso de la trampa de esporas Hirst, junto con la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) han sido utilizadas con éxito para el monitoreo y la identificación de ascosporas de *S. sclerotiorum* en el Reino Unido (Freeman *et al.* 2002). 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 ascosporas de *S. sclerotiorum* dispersas en la atmósfera de cultivos agrícolas. A partir de esclerocios colectados en cultivos de col infectados con *S. sclerotiorum*, se desarrollaron sus apotecios, los cuales produjeron ascosporas que fueron liberadas al aire y colectadas con la trampa de esporas Hirst en experimentos realizados dentro de un mini-túnel de viento. Posteriormente, se realizó la purificación del ADN de las ascosporas y su detección por PCR; de esta manera, se verificó la especificidad y sensibilidad de las sondas SSFWD y SSREV (Freeman *et al.*, 2002). El monitoreo y detección en campo con la trampa de esporas Hirst se llevó a cabo en cultivos de frijol en riesgo de infección. Los resultados mostraron que la detección molecular de *S. sclerotiorum* fue positiva, determinándose la presencia de las ascosporas en el aire cuatro semanas antes de que se observaran síntomas visibles de la enfermedad en los cultivos de frijol.

## INTRODUCCIÓN

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary es un hongo ascomicete necrotrófico, fitopatógeno y destructivo de diversos cultivos económicamente importantes. Presenta poca especificidad por lo que ataca a más de 400 especies de plantas, principalmente dicotiledóneas; causando pérdidas que alcanzan hasta el 100% de la cosecha (Purdy, 1979; Boland y Hall, 1994).

Este hongo es geográficamente cosmopolita y tiene una amplia distribución, desde regiones frías y húmedas hasta zonas cálidas y secas, aunque se localiza principalmente en zonas templadas (Duncan *et al.*, 2006). Los brotes de esta enfermedad en zonas muy secas se producen durante el verano en campos irrigados, ya que éstos proveen condiciones microclimáticas favorables para el desarrollo de la enfermedad incluso cuando el clima de la zona es desfavorable (Saharan y Mehta, 2008) .

Entre los cultivos que resultan afectados por esta enfermedad destacan la lechuga, col, brócoli, frijol, papa, tomate, apio, garbanzos, cártamo, soya, girasol, berenjena, chícharo, calabaza, canola, alfalfa, jitomate, pepino, zanahoria, plantas de ornato y medicinales (Ferreira y Boley, 1992; Duncan *et al.*, 2006; Saharan y Mehta, 2008).

El impacto de *S. sclerotiorum* sobre los cultivos depende de la susceptibilidad de la planta hospedera y de las condiciones ambientales, por lo que puede variar significativamente año tras año. Es por ello que es necesario el desarrollo de un método para el monitoreo y evaluación temprana del riesgo de infección como una estrategia para la planeación de un control oportuno o, en su caso, evitar gastos innecesarios en la

aplicación de fungicidas y otros tratamientos para combatir esta enfermedad (Mac Neil *et al.*, 1995; McCartney *et al.*, 1997; Martin, 2000).

El monitoreo de esporas dispersas en el aire ofrece una medida directa del riesgo de infección antes de que ésta ocurra. El uso de muestreadores de aeropartículas en conjunción con técnicas moleculares específicas, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) han sido utilizados con éxito para la identificación y monitoreo de especies de hongos fitopatógenas, como las ascosporas de *S. sclerotiorum* en Reino Unido (Freeman *et al.*, 2002). Debido a la importancia de este hongo como patógeno que ataca cultivos agrícolas en diversos estados de la República Mexicana, en este estudio se ha pretendido adaptar y adecuar este método de detección molecular para las ascosporas de *S. sclerotiorum* dispersas en la atmósfera de campos potencialmente en riesgo, con el propósito de aplicar medidas de control antes de que las plantas presenten los primeros síntomas de la enfermedad.

## MARCO TEÓRICO

*S. sclerotiorum* es un hongo perteneciente a la familia Sclerotiniaceae (Tabla 1), ubicada dentro del orden Helotiales del filum Ascomycota (Hibbet *et al.*, 2007). La familia Sclerotiniaceae presenta como carácter común el desarrollo de una estructura de resistencia denominada esclerocio, el cual es un agregado hifal melanizado (Saharan y Mehta, 2008).

Tabla 1: Clasificación de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	
Reino:	Fungi
Filo:	Ascomycota
Clase:	Leotiomycetes
Orden:	Helotiales
Familia:	Sclerotiniaceae
Género:	<i>Sclerotinia</i>
Especie:	<b><i>S. sclerotiorum</i></b>

Las especies del género *Sclerotinia* se caracterizan por la formación de esclerocios en tejidos vivos o muertos de la planta hospedante además del desarrollo de apotecios a partir de los esclerocios. Los apotecios tienen forma de copa o de urna con largos pedicelos; dentro de los cuales se forman ascas cilíndricas o claviformes donde se desarrollan generalmente ocho ascosporas elipsoidales, unicelulares y hialinas (Herrera y Ulloa, 1998).

Actualmente, se reconoce a *S. sclerotiorum* como un fitopatógeno de gran importancia mundial debida a su amplia distribución, diversidad de

hospederos y pérdidas económicas (Saharan y Mehta, 2008). Es un hongo homotálico, presenta hifas hialinas, septadas, ramificadas y multinucleadas. El micelio puede ser de color blanco a canela en cultivo o *in planta* (Bolton *et al.*, 2006). Afecta a las plantas en cualquier etapa de su desarrollo, incluyendo plántulas, plantas maduras y órganos cosechados durante su transporte y almacenamiento (Agrios, 2004).

### **Enfermedad y síntomas**

La enfermedad producida por *S. sclerotiorum* es conocida con una gran variedad de nombres dependiendo de la zona geográfica en donde se desarrolle o el tipo de cultivo afectado. Los principales nombres que recibe la enfermedad son: esclerotiniosis, pudrición húmeda del tallo, moho blanco, podredumbre blanda, podredumbre húmeda y podredumbre del tallo, entre otros.

Los síntomas causados por *S. sclerotiorum* varían dependiendo del hospedero o de la parte del hospedero afectada y de las condiciones ambientales. El síntoma temprano más evidente y típico de enfermedades de *S. sclerotiorum* es la aparición y crecimiento de micelio algodonoso de color blanco sobre la planta infectada sobre la que se desarrollan, poco después, estructuras de resistencia conocidas como esclerocios (Figura 1). Los esclerocios son de color blanco al inicio de su desarrollo pero posteriormente adquieren una coloración negra. Pueden variar en tamaño desde dos a diez o más milímetros de diámetro, y suelen ser alargados y aplanados (Saharan y Mehta, 2008).

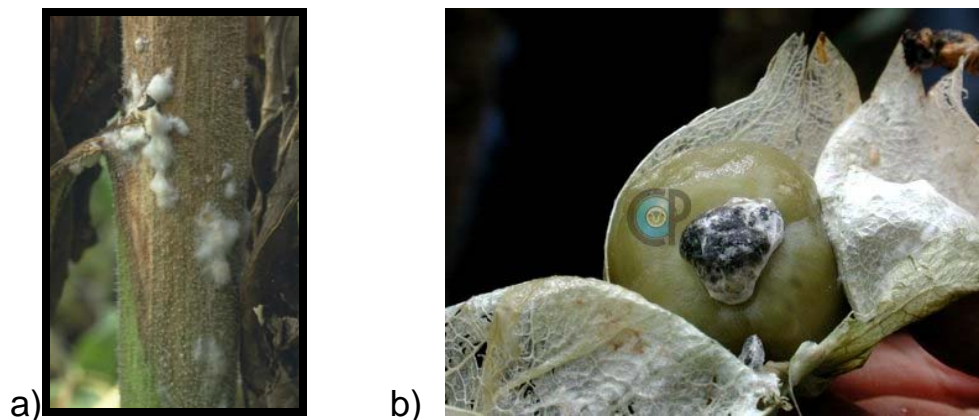


Figura 1: Lesiones de *S. sclerotiorum* en cultivos. a) Tallo de frijol con micelio de *S. sclerotiorum*. b) Esclerocio de *S. sclerotiorum* formado en tomate.

Los tallos de plantas herbáceas y suculentas desarrollan primero lesiones de color marrón pálido u oscuro en su base. Las lesiones son a menudo cubiertas rápidamente por manchas de micelio blanco algodonoso. En las primeras etapas de desarrollo de la lesión en el tallo, las hojas pueden mostrar pocos signos de ataque del hongo y son fácilmente desapercibidas hasta que el hongo crece completamente a través de la raíz y el tallo se pudre. A continuación, el follaje por encima de la lesión se marchita y muere rápidamente. En algunos casos, la infección puede empezar en una hoja y luego pasar a la raíz a través de la hoja. Los esclerocios del hongo pueden ser formados internamente en la médula del tallo, y no mostrar signos de su presencia o pueden ser formados en el exterior de la raíz donde son muy evidentes (Saharan y Mehta, 2008).

Las hojas y pecíolos de las plantas como la lechuga, apio y remolacha, colapsan repentinamente y mueren conforme el hongo infecta a la base del tallo y las hojas inferiores. Rápidamente el hongo invade y se propaga a través del tallo, y la totalidad de la planta muere y se colapsa. Los frutos carnosos, como el pepino, la calabacita, berenjena y vainas de diversas semillas, entre otras, son atacados también por *S. sclerotiorum* ya

sea a través de su punto más cercano al suelo, en el punto de contacto con el suelo o por medio de sus flores senescentes. El hongo provoca una pudrición húmeda que se extiende desde la punta de la fruta o la vaina con el resto del órgano que se pudre y finalmente se desintegra totalmente. El micelio es de color blanco y los esclerocios normalmente pueden observarse al exterior y en el interior de la vaina y frutas (Saharan y Mehta, 2008).

### **Ciclo de la enfermedad (ciclo de vida)**

El ciclo de vida de *S. sclerotiorum* es relativamente simple comparado a otros hongos como las royas (Figura 2). Su sobrevivencia a largo plazo está mediada a través de esclerocios, los cuales son estructuras multi hifales que pueden permanecer en estado viable por periodos largos de tiempo bajo condiciones desfavorables para su crecimiento; tienen una zona interna de color claro llamada médula y una cubierta exterior de color negro llamada corteza, la cual contiene pigmentos de melanina que lo hacen altamente resistente a la degradación, mientras que la médula está formada por células ricas en  $\beta$ -glucanos y proteínas. Su tamaño depende del lugar de formación ya sea dentro o sobre la planta (Bolton *et al.*, 2006). Su sobrevivencia es afectada por suelos con temperatura elevada y humedad, además de la actividad microbiana. Los esclerocios que permanecen a una profundidad de cinco a veinte centímetros en el suelo son viables y producen apotecios después de tres a cinco años, asegurando la disponibilidad del patógeno cuando un cultivo hospedero es sembrado, mientras que los que están más cerca de la superficie del suelo se desintegran más rápidamente. Sin embargo, los esclerocios no forman apotecios a profundidades mayores de cinco centímetros y la cantidad de éstos disminuye con la profundidad (Saharan y Mehta, 2008).



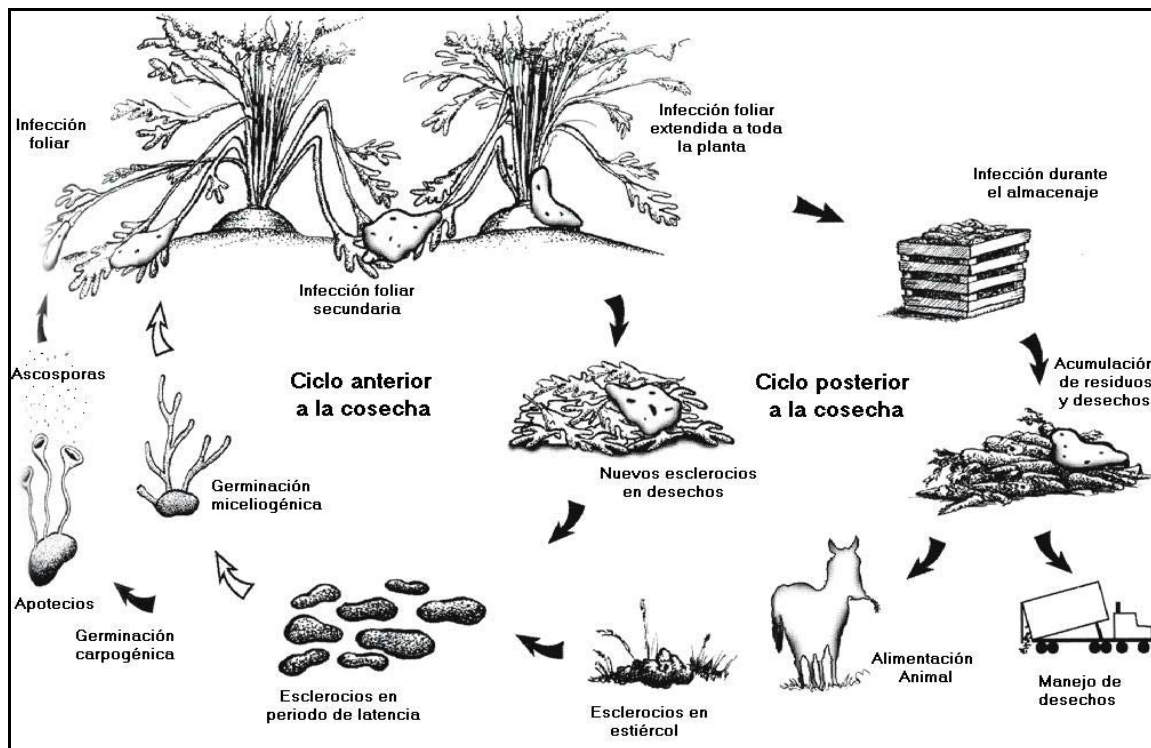


Figura 2: Ciclo de vida de *S. sclerotiorum* (Saharan y Mehta, 2008)

Cuando las condiciones son favorables, los esclerocios germinan para formar micelio o apotecios con ascosporas. Sin embargo, el potencial infectivo del micelio esclerocial es bajo en comparación al de las ascosporas, ya que es poco probable que infecte plantas localizadas a más de dos centímetros del esclerocio del cual se originó. Cuando los esclerocios están situados en un sustrato bajo en nutrientes y bajo ciertas condiciones, pueden producir apotecios. Solo los esclerocios precondicionados y funcionalmente maduros son capaces de producir apotecios. Este precondicionamiento o maduración fisiológica sucede durante el invierno, cuando hay humedad constante y las temperaturas son frías (4-20°C). Los esclerocios pueden germinar para producir micelio o apotecios dependiendo de las condiciones ambientales. Los apotecios producen ascosporas, las cuales son la principal fuente de infección en la

mayoría de las plantas hospederas (Bolton *et al.*, 2006; Hao *et al.*, 2003; Nelson, 1998). Para que la germinación carpogénica ocurra, los esclerocios deben estar en la superficie o hasta cinco centímetros de profundidad del suelo. Cuando los esclerocios comienzan a germinar, se forman los estípites del apotecio, los cuales pueden formarse en presencia o ausencia de luz. Sin embargo, la luz es indispensable para estimular la formación de los discos que contienen esporas en la parte terminal de los estípites. Debido a que éstos no llegan a medir más de cinco centímetros, solo los esclerocios ubicados dentro de los cinco centímetros próximos a la superficie logran completar la producción de ascosporas (Saharan y Mehta, 2008).

Las ascosporas requieren de energía exógena para poder infectar tejidos sanos como hojas, vainas o tallos. Las estructuras senescentes o dañadas de la planta, así como las flores, pueden proveer la energía exógena necesaria para iniciar la germinación del micelio y posterior infección. La infección ocurre cuando las ascosporas germinan sobre plantas muertas, tejidos vegetales senescentes o pétalos de flores (Tu, 1997). Esto se debe a que las ascosporas no son capaces de infectar tejidos sanos. Al infectar tejidos senescentes, el hongo obtiene una base de nutrientes que requiere para sintetizar ácido oxálico y enzimas degradantes de la pared celular de las plantas como la poligalacturonasa (SSPG1) y la proteasa (ASPS), los cuales matan las zonas adyacentes de tejido sano dentro del cual el patógeno puede desarrollarse facilitando el esparcimiento del hongo después de 72 horas. Las ascosporas pueden sobrevivir por más de siete meses bajo condiciones de poca humedad y pueden germinar a –91 bars, con un intervalo de temperatura de 10 a 30°C. (Hegeus y Rimmer, 2005; Saharan y Mehta, 2008).

El micelio ascospórico produce un apresorio cuando se encuentra en contacto con tejido sano susceptible. La penetración ocurre por la ruptura mecánica de la cutícula del hospedero por medio de una hifa pequeña llamada “hifa de infección”; aunque también puede darse a través de los estomas (Lumsden, 1979). Después de penetrar en la planta hospedera, el hongo crece en sus tejidos causando la muerte de las células conforme avanzan las hifas invasoras. La infección secundaria se produce al contacto de una planta afectada con una sana. Las plantas más suculentas son claramente más afectadas y de una manera más rápida que aquellas que tienen una pared celular lignificada (Saharan y Mehta, 2008).

Las infecciones iniciales severas tienden a ser autolimitantes, ya que la planta pierde el dosel para proveer el microclima necesario para continuar la infección. Sin embargo, la germinación continua de los esclerocios y las descargas continuas de ascosporas de cada apotecio asegura un potencial de infección adecuado por un periodo de tres a cuatro semanas (Steadman, 1983).

Después de desarrollarse dentro de los tejidos del hospedero, el micelio produce esclerocios de manera externa en las diferentes partes afectadas de la planta o internamente dentro de la corteza del tallo, en cavidades, cavidades frutales o entre los tejidos de la planta (Purdy, 1979).

### **Dispersión de ascosporas**

Las ascosporas de *S. sclerotiorum* se forman dentro de los apotecios durante su proceso de maduración. Los apotecios inmaduros tienen pocas ascosporas, pero se ha estimado que un apotecio maduro puede descargar hasta  $2.3 \times 10^6$  ascosporas durante una semana o más bajo condiciones favorables. Cuando los apotecios alcanzan su desarrollo completo ocurre su

liberación, en donde la tasa de descarga de ascosporas se incrementa a un máximo que se mantiene brevemente y luego declina gradualmente. Las ascas individuales continúan liberando las ascosporas muchos segundos después de la descarga principal (Figura 3) (Schwartz y Steadman, 1978; Saharan y Mehta 2008).

Las ascas maduras descargan las ascosporas en el aire a una distancia de un centímetro o más, habilitando a las ascosporas a escapar de



la capa límite laminar del aire, ubicada cerca de la superficie del suelo, para poder alcanzar el aire más turbulento de la capa de arriba. Las ascosporas son liberadas continuamente en ráfagas de 0.1 s de duración, formando columnas elongadas de ascosporas en el aire sobre el apotecio; estas descargas masivas aseguran que al menos algunas ascosporas sean llevadas lejos por cualquier corriente de aire presente (Saharan y Mehta, 2008).

Figura 3. Liberación de ascosporas de *S. sclerotiorum*

Los experimentos realizados en campo han mostrado que se liberan más ascosporas cuando prevalece un clima cálido y ventoso mientras los apotecios permanecen turgentes; en cambio, se liberan pocas ascosporas en un clima lluvioso y húmedo. La lluvia evita que las ascosporas sean descargadas en el aire, de hecho, las ascosporas se difunden dentro de las películas de agua presentes en los apotecios durante los baños de lluvia y son eventualmente depositadas en el suelo (Kruger, 1975; Saharan y Mehta, 2008).

Después de ser descargadas por los apotecios, las ascosporas pueden ser acarreadas por el aire en condición viable a lo largo de varios kilómetros. Además, estudios realizados con trampas de esporas han mostrado que las ascosporas se pueden encontrar a más de 150 centímetros de la superficie del suelo lo que proporciona suficiente evidencia de que éstas pueden ser transportadas a grandes distancias por el viento (Williams y Stelfox, 1979). Como resultado, la dispersión de ascosporas está dada por dos factores principales: en primer lugar, debe haber al menos un poco de viento para llevar las ascosporas a hospederos susceptibles; en segundo lugar, el dosel del cultivo por si mismo, puede evitar que las ascosporas ingresen en las corrientes de aire entrantes sobre el cultivo, por lo que diferentes cultivos tienen diversas habilidades para restringir el movimiento de las ascosporas (Saharan y Mehta, 2008).

### **Sobrevivencia de ascosporas**

Las ascosporas sobreviven más cuando están secas, indicando que su sobrevivencia está determinada por una estrecha relación entre la temperatura y la humedad. Las ascosporas pueden sobrevivir hasta 12 días en el campo; sin embargo, éstas permanecen viables de dos a cinco meses bajo condiciones de invernadero. En general, la mortalidad de las ascosporas aumenta conforme se incrementa la temperatura y la humedad relativa (Caesar y Pearson, 1983; Saharan y Mehta, 2008).

### **Epidemiología**

La epidemiología de *S. sclerotiorum* obedece a varios factores: la cantidad de inóculo en el suelo, susceptibilidad del cultivo, lluvia, humedad del suelo, ancho de las hileras de cultivo y su densidad (Tu, 1997). Por otro lado, su impacto depende de la planta hospedera, de las condiciones climáticas y del

tiempo de liberación de las ascosporas, las cuales pueden variar significativamente año con año (Freeman, *et al.* 2002).

Existen cuatro formas principales de propagación del hongo. La más común es la infección en cultivos susceptibles al ataque de ascosporas provenientes de campos adyacentes infestados; el hongo produce entonces esclerocios en esas plantas y algunos son vertidos al suelo en el momento de la cosecha. Se sabe también que restos o partículas de suelo y plantas infectadas que son transportadas por el aire contaminan los cultivos contiguos. Asimismo, la maquinaria contaminada, el removimiento de suelo como el barbecho, así como la lluvia e irrigación de agua, pueden introducir y transportar los esclerocios a campos no infectados. Otra forma de diseminación del hongo en cultivos es a través de semillas contaminadas (Nelson, 1998; Saharan y Mehta, 2008).

### **Gama de hospederos**

*S. sclerotiorum* se encuentra entre los patógenos de plantas más inespecíficos, omnívoros y exitosos. El índice de hospederos más reciente para este patógeno elaborado por Boland y Hall (1994) contiene 75 familias de plantas, 278 géneros, 408 especies y 42 subespecies o variedades, aunque se han reportado nuevas especies de hospederos desde 1990 a la fecha. La determinación de la gama de hospederos de este patógeno es esencial para identificar el potencial de resistencia de enfermedad, consolidar el conocimiento de la especificidad del patógeno y su evolución. Excepto por una especie de la División Pteridophyta, todos los hospederos de *S. sclerotiorum* se presentan en las clases Gymnospermae y Angiospermae de la División Spermatophyta. La mayoría de los hospederos son plantas herbáceas de la subclase Dicotyledoneae de la clase

Angiospermae, aunque también se presentan en la subclase Monocotyledonae.

### Distribución geográfica

La distribución de este fitopatógeno es cosmopolita, debido a la amplia gama de hospederos que presenta y de la facilidad de adaptación a diversos climas. Se puede localizar en todos los continentes, excepto Antártida (Figura 4).

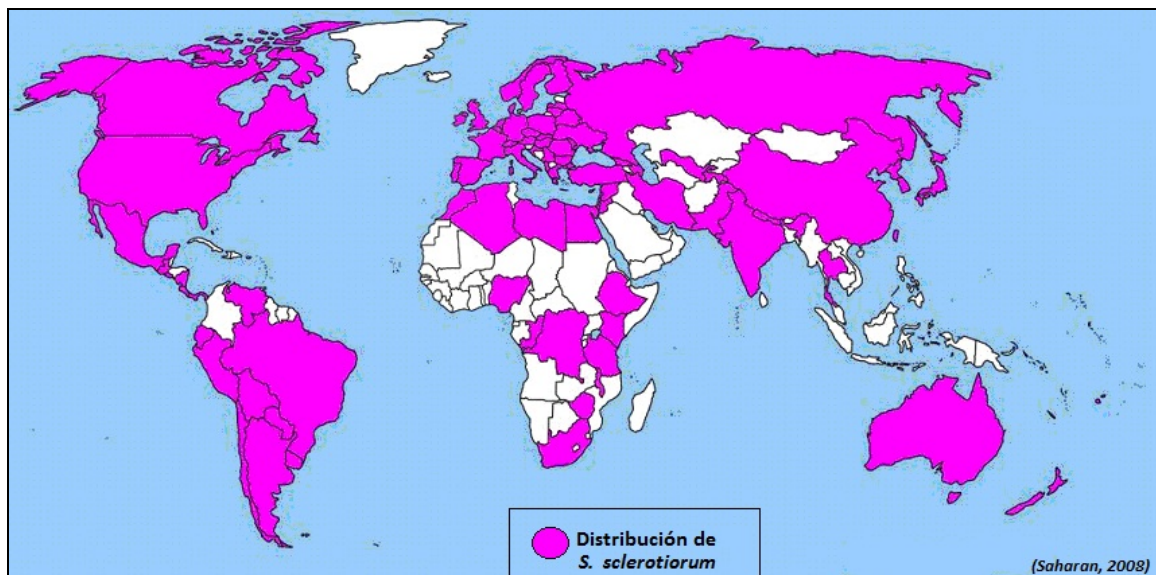


Figura 4: Mapa de distribución mundial de *S. sclerotiorum* basado en Saharan y Mehta, 2008.

En México se tienen reportes de infección por *S. sclerotiorum* en cultivos de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en el norte de Sinaloa (Expo Agro Sinaloa, 2003), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el sureste del Estado de México (Cruz-Alcalá, 2000), lechuga (*Lactuca sativa* L.) en Tenango del Valle, Edo. de México (Osorio, *et al.* 2005) y en el Distrito Federal (SAGARPA, 2008); así como de maní forrajero (*Arachis pintoii*) y girasol (*Helianthus annuus*) en diversas regiones del país (Romero, 1993; Fucikovsky, 1975).

## **Pérdidas económicas**

Las pérdidas en la producción ocasionadas por *S. sclerotiorum* en cultivos susceptibles pueden variar y alcanzar el 100% (Purdy, 1979). En cultivos vegetales y frutales, las pérdidas son debidas al daño por pudrición en el campo antes de la cosecha y por la pudrición en las bodegas cuando el producto ya ha sido cosechado. En cultivos de semillas, la producción se reduce debido a la reducción en el tamaño de la semilla por la afección temprana de la enfermedad en los cultivos y por el reemplazo de las semillas por esclerocios o la mezcla de éstos en bodega (Saharan y Mehta, 2008).

Las pérdidas en cultivos causadas por *S. sclerotiorum* alcanzan varios millones de dólares anuales. Éstas son directas por la pérdida de la producción e indirectas por la mala calidad, sin contar con el abandono de los campos de cultivo. En México se tienen referencias de pérdidas de hasta 20% en girasol (Fucikovsky, 1975), 60% en frijol (Verdugo, 1978), 30% en lechuga (Gutierrez, 1980) y del 20 al 95% en tomate de cáscara (Cortés, 1995).

El impacto ecológico, económico y social que ocasiona esta enfermedad hace necesaria la toma de medidas para su vigilancia y tratamiento oportuno. Una herramienta importante para su control, debido a su enorme capacidad de diseminación a través del aire, es el monitoreo de ascosporas dispersas en la atmósfera, ya que permite conocer el impacto potencial de infección de este hongo para tratar la enfermedad a tiempo. Los métodos empleados para la realización de este tipo de observaciones son parte del campo de estudio de una ciencia multidisciplinaria: la Aerobiología.



## **Aerobiología**

La Aerobiología es considerada como un campo científico multidisciplinario, que abarca grandes áreas de las ciencias básicas y aplicadas. La Aerobiología se encarga del estudio de la liberación, dispersión, 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 las biopartículas en la atmósfera (Lacey y West, 2007; Frenguelli, 1998; Red Española de Aerobiología, 2002). Esta rama de la Biología se encarga de estudiar las partículas biológicas presentes en el aire, tanto al aire libre (extramuros) y el interior (intramuros). Algunos organismos están adaptados para el transporte a través del viento; sin embargo, algunos viajan incidentalmente. 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 lo tanto, 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 las partículas suspendidas en el aire (Lacey y West, 2007; Frenguelli, 1998).

Las aeropartículas de origen biológico varían en tamaño desde 1 a >200 micras, 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 5 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 la 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. Encima de esta capa 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, transporte y deposición de las aeropartículas, incluyendo las de origen biológico (Gregory, 1973; Lacey y West, 2007).

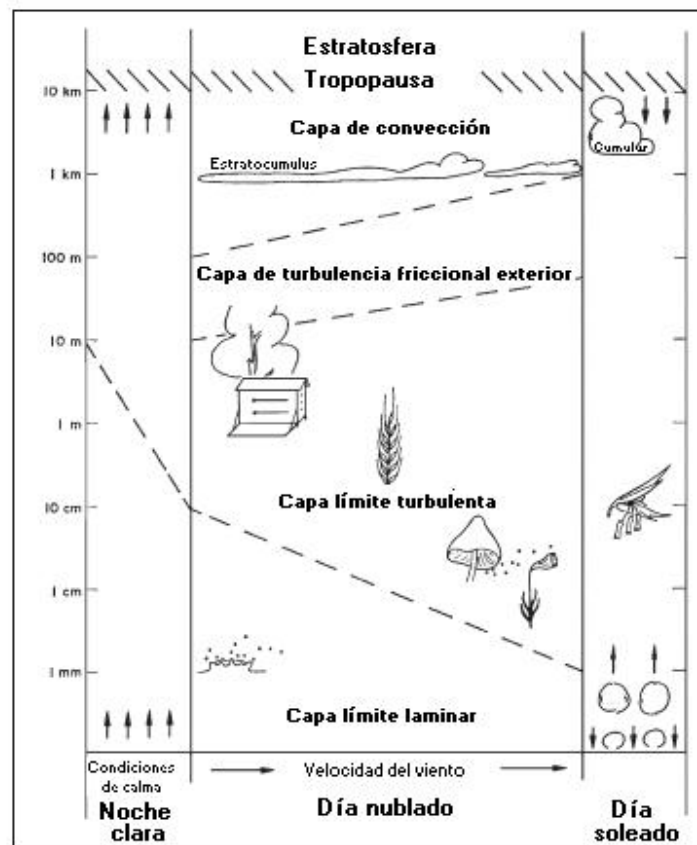


Figura 5: Representación de un perfil de las capas de la atmósfera en una escala de altitud logarítmica

## **Antecedentes Históricos de la Aerobiología**

Para poder alcanzar el conocimiento actual de los procesos aerobiológicos, fue necesario el trabajo de muchos científicos a través del tiempo. Los antecedentes de esta disciplina se remontan a Hipócrates (460-377 a.C.) quien sostuvo que los hombres eran atacados por fiebres epidémicas cuando ellos inhalaban “aquellos contaminantes que eran hostiles a la raza humana”. Por su parte, Lucrecio en 55 a.C. observó polvo a través de un rayo de sol, lo que le permitió deducir que había partículas moviéndose en el aire, las cuales podrían ser agentes causales de pestes y otras epidemias. Sin embargo, a pesar de las primeras observaciones, tuvieron que pasar más de 1500 años para que los científicos comenzaran a darse cuenta de la diversidad de partículas biológicas presentes en el aire (Gregory, 1973).

Leeuwenhoek reportó en 1680 la observación de organismos microscópicos, los cuales “podrían ser acarreados por el viento junto con las partículas de polvo que flotan en el aire”. Asimismo Micheli, sembrando esporas de mohos en trozos de fruta, observó que algunas muestras control se contaminaban. De esta manera, en 1729, concluyó que las esporas de los mohos se dispersan a través del aire (Gregory, 1973).

Koelrueter fue el primero en reconocer la importancia de la polinización de algunas plantas por la acción del viento en 1766. Sprengel, por su parte concluyó en 1773 que las flores que carecen de corola son polinizadas de manera mecánica por la acción del viento, ya que producen grandes cantidades de polen, el cual es muy ligero y fácilmente transportable. Knight reportó en 1799 que el viento podía transportar el polen a grandes distancias (Gregory, 1973).

Para los inicios del siglo XIX se reconoció que el polen de diversas especies de plantas y las esporas microscópicas de helechos, musgos, hongos y protistas eran liberados comúnmente en el aire y transportados por el viento (Lacey y West, 2007).

Ehrenberg, en sus memorias publicadas de 1822 a 1858, acumuló evidencia de que partículas microscópicas pueden ser acarreadas por el viento en estado viable. Encontró 65 clases de organismos en el polvo colectado por Charles Darwin durante su viaje en el Beagle (Gregory, 1973).

Louis Pasteur (1862) descartó la teoría de la Generación Espontánea, mostrando que la infección es causada por gérmenes. Desarrolló un filtro de algodón para extraer polvo suspendido en el aire para su observación al microscopio. Demostró visualmente la existencia de esporas en el aire, puntualizando que su concentración debe ser medida mientras se encuentra en suspensión y no después de su deposición en superficies.

Durante la segunda mitad del siglo XIX, el trabajo bacteriológico en laboratorios permitió identificar las causas de las enfermedades en humanos (Lacey y West, 2007).

Koch, identificó en 1883 la causa del ántrax, tuberculosis y cólera. Sus postulados proporcionaron un método para confirmar que una enfermedad es causada por un solo organismo en particular (Gregory, 1973).

Asimismo, en 1870, Maddox inventó el “aeroconoscopio”, un muestreador de aeropartículas, el cual consistía en un embudo cónico con la boca dirigida hacia el viento por una veleta y terminando en una boquilla,

detrás de la cual, el polvo del aire era impactado en una cubierta microscópica de cristal pegajoso. Tres años más tarde, Cunningham desarrolló el uso del aeroconoscopio en dos cárceles de Calcuta donde persistían epidemias de cólera y fiebres. A pesar de no encontrar una correlación entre los resultados del muestreo y las enfermedades, se pudieron observar numerosas esporas de hongos y polen (Gregory, 1973).

Sin embargo, en 1871, Miquel fue el primero en hacer una investigación a largo plazo de los microorganismos presentes en la atmósfera por medio de métodos volumétricos. Utilizó una bomba de agua para producir una succión de 20 litros de aire por hora a través de un orificio donde finalmente se impactaba en un portaobjetos cubierto de glicerina. Observó que la cantidad de bacterias medidas en el centro de París fueron mucho más altas que en el parque; sin embargo, fueron aún mayores en la zona de viviendas y en los hospitales. De esta manera, demostró que diversas enfermedades epidémicas son causadas por bacterias (Lacey y West, 2007)

En 1884, Hesse diseñó un sistema para contar microorganismos, el cual consistía en un tubo estrecho recubierto en su interior de gelatina nutritiva que permitía su crecimiento. Tras sus observaciones en cuanto a la relación de abundancia de mohos y bacterias, logró determinar que las esporas de hongos se encuentran usualmente en el aire como partículas individuales, mientras que las bacterias se encuentran como grandes agregados o adheridas a las partículas de polvo (Gregory, 1973).

## **La Aerobiología como disciplina**

En la década de los treinta, Meier utilizó por primera vez la palabra Aerobiología para definir a la disciplina que estudia los organismos y partículas biológicas presentes en el aire (Lacey y West, 2007).

Esta rama de la Biología ha recibido grandes contribuciones durante los últimos 60 años. Los científicos de Rothamsted Research (Estación Agrícola Experimental) del Reino Unido, han hecho una importante contribución a la Aerobiología principalmente con respecto al estudio epidemiológico de las enfermedades de las plantas. Gregory, quien ha sido llamado “el padre de la Aerobiología moderna”, observó la dispersión de hongos patógenos de plantas y los factores que la afectan. Estudió la velocidad terminal de las esporas, su difusión, dispersión, transporte por el viento y deposición. Los múltiples factores involucrados en el muestreo en campo, llevó a Gregory a construir un túnel de viento para poder controlar variables como la velocidad, y así probar la eficiencia del muestreo de trampas de esporas como el impactador en cascada, el cual era un aparato que está diseñado para muestrear y separar las aeropartículas dependiendo de su diámetro (Lacey y West, 2007; Madelin, 1994). Su trabajo fue retomado por Stedman, Hirst y Last, estableciendo la unidad estándar para la medición de esporas del aire en: número de esporas/metro cúbico de aire (Lacey y West, 2007).

Hirst (1952) advirtió que las esporas colectadas en las trampas como el impactador en cascada se sobrecargaban rápidamente con las muestras, lo que dificultaba el trabajo de conteo. Resolvió este problema con una nueva trampa en la que a través de un solo orificio se succionaba el aire, impactando las partículas del aire sobre una superficie pegajosa, la cual se

movía utilizando un reloj mecánico. El depósito de partículas resultante pudo ser medido, además de que se logró calcular la hora aproximada de muestreo, su periodicidad y su relación con eventos meteorológicos. La velocidad de succión se estableció en 10 litros de aire por minuto para facilitar el muestreo; además se le colocó una veleta, la cual orienta la boquilla de succión en la dirección contraria del viento.

El gran potencial de la trampa de esporas Hirst llegó a ser ampliamente apreciado, el diseño fue mejorado y en 1966, Burkard Manufacturing Co. UK, comenzó a producir la trampa de esporas de muestreo volumétrico de siete días, a la que llamó trampa de esporas Hirst (Figura 6) (Lacey y West, 2007).

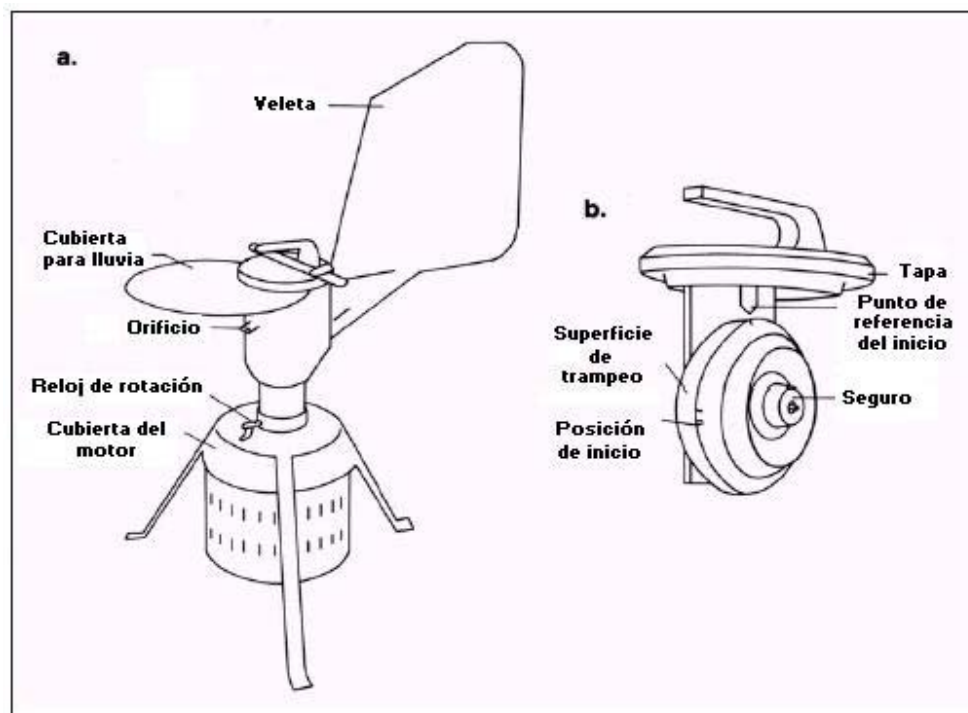


Figura 6: Trampa de esporas Hirst de 7 días (Lacey y West, 2007)



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 el 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: acondicionamiento en un área de fuente, liberación y ascenso, transporte horizontal, descenso y deposición, e impacto en el área de destino (Figura 7). Estas etapas pueden ser aplicadas para todo tipo de aerobiota, desde microorganismos hasta aves. 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.

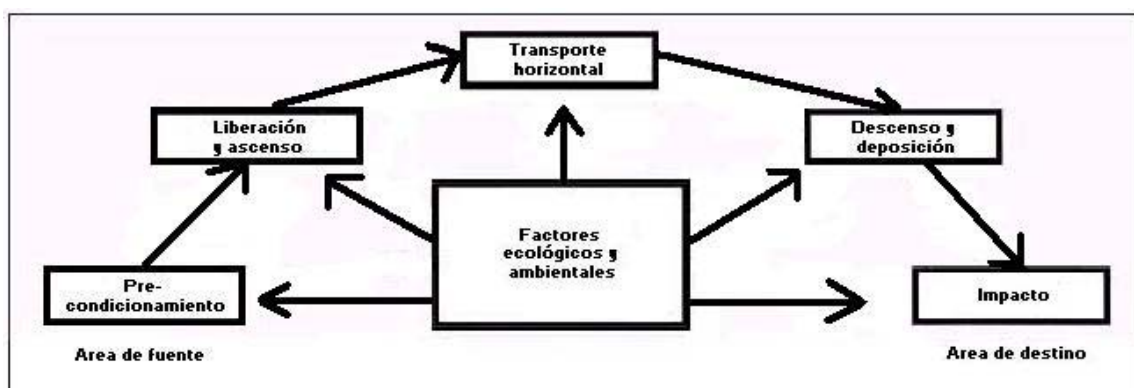


Figura 7: El proceso aerobiológica (Isard y Gage, 2001)

Gran parte de los primeros trabajos de Aerobiología se hicieron al aire libre, pero con énfasis en la salud y la seguridad, sin embargo, parte de la investigación está actualmente centrada en los ambientes interiores (Flannigan et al., 2001) y realizándose también diversos estudios para el monitoreo de enfermedades en plantas (West, *et al.* 2008)

### **Muestreadores de aeropartículas utilizados en Aerobiología**

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

- Trampa de esporas Hirst de 7 días. Muestra aeropartículas a una tasa de 10 l/min por impactación en una cinta adhesiva, la cual se mueve a través de la toma de aire a dos milímetros por hora, para proporcionar un registro continuo de las esporas del aire (Figura 8a)
- 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 colectan partículas por impactación en el filo de los brazos verticales que rotan a 50 km / h, los cuales están recubiertos con cinta adhesiva: (Figura 8b)
- 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 8c).
- Muestreadores de ciclón en seco sencillo y multi-viales Burkard. Funcionan a 16,5 l / min y son de alta eficiencia para la toma de

muestras partículas desde 1  $\mu\text{m}$  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 8d).

- Muestreadores de partículas viables (Andersen). La muestra de aire pasa a través de una serie de etapas que colectan progresivamente partículas más pequeñas de forma selectiva. Éstas son depositadas sobre cajas Petri conteniendo agar específico para colectar hongos o bacterias y medirlas como unidades formadoras de colonias (UFC por  $\text{m}^3$  de aire muestreado) Alternativamente, se pueden utilizar las cintas adhesivas entre las etapas para colectar esporas para su identificación visual (Figura 8e).

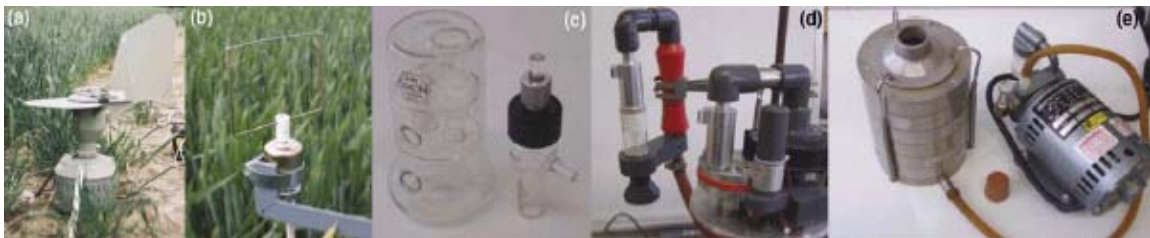


Figura 8: Muestreadores utilizados en Aerobiología: a) Trampa de esporas Hirst de 7 días b) Muestreador de brazo giratorio (Rotorod) c) Impregnador en líquido de varias fases d) Muestreadores de ciclón en seco sencillo y multi-viales (Burkard) e) Muestreadores de partículas viables (Andersen).

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; Fraanije *et al.*, 2005)

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 desarrollar 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).

#### -Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En los últimos quince años, las técnicas utilizadas para estudiar microorganismos en el ambiente se han expandido notablemente, debido a la habilidad de detectar e identificar microorganismos y virus por la comparación de secuencias de ADN y ARN. Estos avances han sido posibles gracias a la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en Inglés), la cual es una reacción enzimática en la que una secuencia de ADN (usualmente un gen específico o una porción de gen) es seleccionada y se amplifican múltiples copias (Peccia y Hernández, 2006).

El segmento de ADN que sirve de molde no requiere necesariamente, encontrarse en estado puro, sino que puede ser parte de mezclas complejas, como ADN de muestras aéreas (Satz y Kornblihtt, 1993).

El método se basa en la realización de tres reacciones sucesivas llevadas a cabo a distintas temperaturas. Estas reacciones se repiten cíclicamente entre veinte y cuarenta veces. En el primer paso, la muestra se calienta, hasta lograr la separación de las dos cadenas que constituyen el ADN, hecho que se conoce como desnaturalización. En el segundo paso, la temperatura se reduce para permitir el apareamiento de cada una de las cadenas cortas de nucleótidos denominadas oligonucleótidos con cada una de las hebras separadas del ADN molde. Los oligonucleótidos, conocidos también como "iniciadores", son segmentos de ADN de cadena simple, sintetizados en el laboratorio y diseñados de manera tal que permiten definir los límites de la secuencia de ADN que se desea amplificar. Para que se pueda producir el apareamiento, cada uno de los oligonucleótidos deben ser complementarios de la secuencia al que tienen que unirse en las cadenas separadas del ADN molde. En la tercera reacción, una enzima ADN polimerasa extiende los *iniciadores*, en el espacio comprendido entre ambos, sintetizando las secuencias complementarias de las hebras del ADN molde. Para ello, la ADN polimerasa usa desoxidonucleósidos trifosfato (dNTPs) agregados a la mezcla de reacción. La temperatura a la que se realiza el tercer paso está condicionada por aquella a la cual "trabaja" la enzima ADN polimerasa. Al cabo del primer ciclo de tres reacciones (desnaturalización, apareamiento, extensión) el tramo de ADN elegido se ha duplicado y el doble de su cantidad original se encuentra disponible para ser nuevamente replicado en un segundo ciclo. El resultado de la aplicación de numerosos ciclos "en cadena" da lugar a la amplificación geométrica del

segmento de ADN delimitado por los *iniciadores* (Satz y Kornblihtt, 1993; Alberts *et al.* 2008).

Para obtener productos más específicos se puede realizar una PCR anidada, en la cual el producto de una amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con cebadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada (Satz y Kornblihtt, 1993).

Actualmente es utilizada también una variante de la PCR, la PCR cuantitativa (qPCR). Esta técnica es utilizada para amplificar y cuantificar simultáneamente de forma absoluta el producto de la amplificación del ADN. Para ello emplea, del mismo modo que la PCR convencional, un molde de ADN, iniciadores específicos, dNTPs, un buffer de reacción y ADN polimerasa; a dicha mezcla se le adiciona una sonda complementaria a una parte intermedia del ADN que queremos amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia, de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa, la molécula fluorescente se libera de la acción del "inhibidor" y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando, por ello también se le denomina PCR en tiempo real (Watson, 2004).

## ANTECEDENTES

### Pronóstico y detección de *S. sclerotiorum*

*S. sclerotiorum* es un hongo fitopatógeno inespecífico 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.

Turkington *et al.* (1991a, b) y Nordin *et al.* (1992) desarrollaron proyectos para la predicción de *S. sclerotiorum* basados en las condiciones climáticas que conducen a la liberación de las ascosporas en coincidencia con la caída de pétalos y su adhesión a las hojas inferiores. Por su parte, Twengström *et al.* (1998) desarrollaron un método para predecir la aparición de *S. sclerotiorum* y determinar la necesidad de la aplicación de fungicidas en función de la precipitación y en 6 factores climáticos que favorecen su desarrollo (incidencia en años previos, tipo de cultivo, densidad del cultivo, lluvia durante 2 semanas anteriores de la floración, pronóstico del tiempo, riesgo regional de producción de apotecios). Las determinaciones para la aplicación de fungicidas mostraron una eficacia del 75% para cultivos que presentaron la enfermedad y 16% de los cultivos que no lo requerían.

Por otra parte, los avances generados en Biología han permitido el desarrollo de técnicas para la detección del hongo. Se ha desarrollado el uso de inmunoensayos para la detección de *S. sclerotiorum* en pétalos de flores de canola (*Brassica napus*) inoculadas natural y artificialmente con el patógeno, gracias al diseño de anticuerpos específicos (Jamaux y Spire, 1994; Bom y Boland, 2000; Yajima *et al.* 2008). Asimismo, Yin *et al.* (2009)

diseñaron un método para la detección de *S. sclerotiorum* en pétalos de canola infectados mediante la prueba de PCR en tiempo real.

### Aplicaciones de la Aerobiología para el monitoreo y detección molecular de ascosporas de *S. sclerotiorum*

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.

La PCR es un método con diversas aplicaciones en Biología Molecular. 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: *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), *Fusarium circinatum*, (Schweigkofler et al., 2004) y diversas especies de hongos potencialmente patógenos (Angenent et al., 2005). Sin embargo, han sido pocos los estudios realizados para la detección molecular de



ascosporas de *S. sclerotiorum* colectadas del aire (Freeman *et al.* 2002, Rogers *et al.*, 2009).

En el presente trabajo se pretende adaptar y utilizar esta técnica para la detección molecular de ascosporas de *S. sclerotiorum* dispersas en la atmósfera de cultivos agrícolas de México, con el fin de determinar su sensibilidad, viabilidad y eficiencia.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar el potencial de detección del método para la detección del ADN específico de ascosporas de *S. sclerotiorum* (Freeman *et al.*, 2002), de muestras colectadas del aire de cultivos, mediante la prueba de PCR a través de un ciclo agrícola, para determinar su presencia en el ambiente antes de que infecten a las plantas y/o que éstas presenten síntomas de la enfermedad.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Desarrollar métodos para la producción de estructuras reproductivas y para la detección molecular de esporas del hongo *S. sclerotiorum*.
2. Monitoreo de ascosporas de *S. sclerotiorum* del aire de cultivos de frijol en riesgo de infección.
3. Establecer recomendaciones para el seguimiento, prevención y/o control de *S. sclerotiorum* en campos agrícolas de México.

## **JUSTIFICACIÓN**

•*S. sclerotiorum* es un hongo patógeno de plantas altamente destructivo y con una amplia distribución. Al no ser específico, ataca a cultivos de más de 400 especies de plantas (la mayoría de ellas de gran importancia económica), causando enfermedad y pérdidas económicas considerables en el sector agrícola. La dificultad para la predicción de la enfermedad, aunada a su fácil diseminación, ocasiona elevados costos de producción y disminución de las cosechas (Purdy, 1979; Boland y Hall, 1994; Rogers *et al.*, 2009; Freeman *et al.*, 2002).

Por lo anterior, el monitoreo y la detección molecular temprana de *S. sclerotiorum* mediante la prueba de PCR, puede ser utilizada como una estrategia para realizar la prevención oportuna y/o control del hongo (Rogers *et al.*, 2009; Freeman *et al.*, 2002); además de evitar que se apliquen fungicidas y otros tratamientos para combatir la enfermedad, contribuyendo así al cuidado del ambiente.

## **HIPÓTESIS**

Si las ascosporas de *S. sclerotiorum* se encuentran dispersas en la atmósfera de cultivos de frijol, éstas serán colectadas del aire y su ADN será detectado mediante el método de PCR con sondas de ADN específicas (Freeman *et al.*, 2002), antes de que las plantas presenten síntomas de la enfermedad.

## **ACTIVIDADES A DESARROLLAR**

- 1) Obtención de esclerocios de *S. sclerotiorum* de cultivos infectados.
- 2) Producción de esclerocios en laboratorio.
- 3) Producción de apotecios con ascosporas de *S. sclerotiorum* en laboratorio.
- 4) Colectar ascosporas de *S. sclerotiorum* liberadas de apotecios dentro de un mini-túnel de viento con la trampa de esporas Hirst.
- 5) Detección molecular por PCR del ADN de ascosporas de *S. sclerotiorum* colectadas del aire de un mini túnel de viento e impactadas en la cinta de celofán de la trampa de esporas Hirst.
- 6) Evaluación de sensibilidad en la detección del ADN de las ascosporas de *S. sclerotiorum* colectadas del aire y validación de los métodos utilizados.
- 7) Colectar del aire ascosporas de *S. sclerotiorum* en cultivos de frijol infectados.
- 8) Detección molecular por PCR del ADN de ascosporas de *S. sclerotiorum* colectadas del aire con la trampa de esporas Hirst en cultivos de frijol durante un ciclo agrícola.

## **ÁREAS DE ESTUDIO**

### **- Obtención de esclerocios**

La obtención de esclerocios para los experimentos de laboratorio, se realizó en un invernadero ubicado en la localidad de Palmarito, Municipio de Quecholac, el cual se localiza en la parte centro este del estado de Puebla. Su ubicación geográfica se encuentra entre los paralelos 18° 49´ 18" y 19° 00´ 18" de latitud norte y los meridianos 97° 34´ 42" y 97° 44´ 54" de longitud occidental. La localidad se encuentra a 2170 m.s.n.m. y presenta un clima templado subhúmedo con lluvias en verano.

La mayor parte del territorio municipal está incorporado a las actividades agrícolas; existen grandes extensiones dedicadas a la agricultura de temporal, así como zonas de regadío; siendo los principales cultivos el maíz, frijol, trigo, col, zanahoria, tomate de cáscara, lechuga y nopal. En cuanto a árboles frutales se registran aguacate, chabacano, ciruela, capulín, nogal, membrillo, durazno y manzana (Figura 9)

### **- Monitoreo de ascosporas en cultivos de frijol**

El monitoreo en cultivos de frijol se realizó dentro de las instalaciones de la Universidad Autónoma de Morelos (UAEM) Campus Oriente, ubicado en Av. Nicolás Bravo S/N, Parque Industrial Xalostoc, Municipio de Ayala, Morelos. Esta localidad se encuentra a 1295 m.s.n.m., presentando clima cálido subhúmedo, su precipitación media anual es de 800 mm y su temperatura promedio es de 24°C. El Parque Industrial Cuautla es la segunda zona industrial en el estado, cuenta con 27 empresas en operación. Sin embargo, la agricultura y la ganadería son las principales actividades del municipio. Se pueden encontrar cultivos de maíz grano, maíz elote, sorgo, cebolla, arroz, frijol grano, frijol ejote, pepino y caña de azúcar (Figura 10).

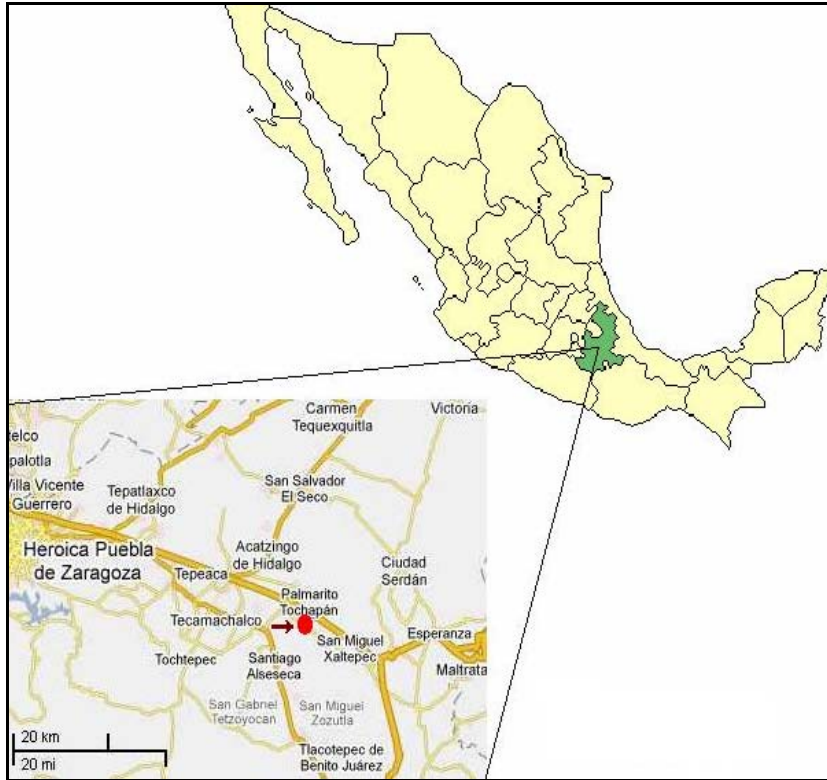


Figura 9: Ubicación de la localidad de Palmarito, Mpio. de Quecholac, Pue



Figura 10: Ubicación de la UAEM en la zona de Parque Industrial, Mpio. de Ayala, Mor.



## MÉTODO:

### ➤ EXPERIMENTOS PRELIMINARES DE LABORATORIO

#### Obtención y producción de esclerocios

Se colectaron esclerocios de coles infectadas cultivadas dentro del invernadero de Palmarito, en el municipio de Quecholac, Puebla (Figura 11a). A partir de éstos, se produjo un mayor número en el laboratorio. Para ello, los esclerocios fueron desinfectados con cloro al 4% (Mónaco et al. 1998) y secados al aire. Posteriormente, fueron colocados en cajas de Petri con medio APD (agar papa, dextrosa) en una incubadora a 20°C (Dillard et al., 1995). Al cabo de 4 días se obtuvo micelio y de dos a tres semanas después se desarrollaron nuevos esclerocios (Figura 11b).

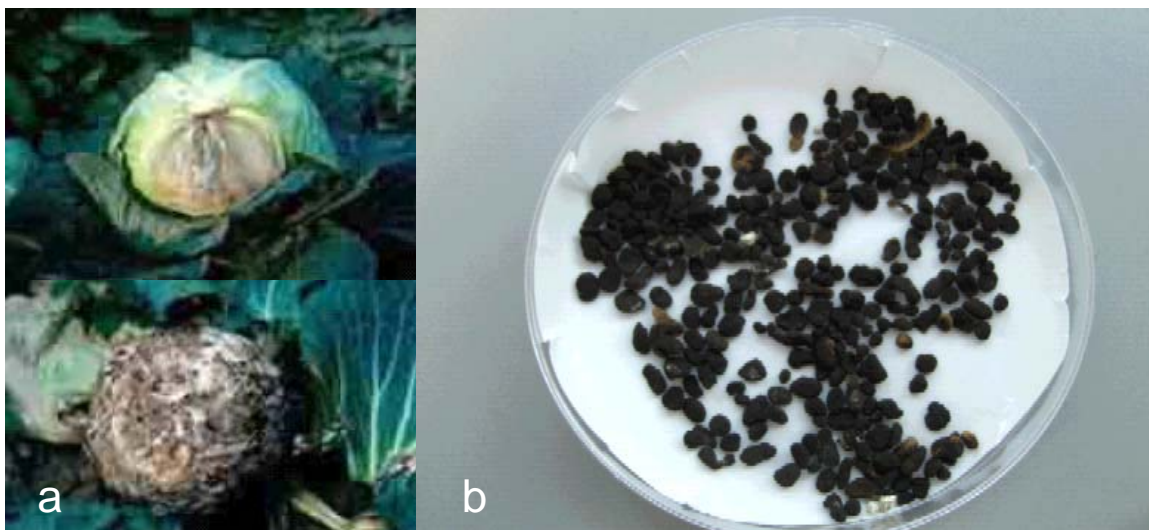


Figura 11: Obtención y producción de esclerocios. a) Coles infectadas, b) Esclerocios

#### Producción de apotecios

Para promover y lograr la germinación carpogénica, los esclerocios fueron sometidos a un acondicionamiento previo. Para ello, fueron colocados en cajas de Petri con papel filtro seco (Whatman 1) a 4°C durante un mes. Se seleccionaron los esclerocios de mayor tamaño (>0.5 cm) y fueron colocados en cajas de plástico conteniendo vermiculita húmeda (90% de

saturación). A cada tapa de las cajas de plástico le fueron colocadas cintas de celofán impregnadas con una mezcla de vaselina-hexano 1:5 para coleccionar las ascosporas que pudieran ser liberadas antes de iniciar los experimentos. Se colocaron en una incubadora a 13-16°C, con fotoperiodo 12/12 hr (Figura 12a). Al cabo de 6 semanas comenzaron a desarrollarse los apotecios (Figura 12b y c).

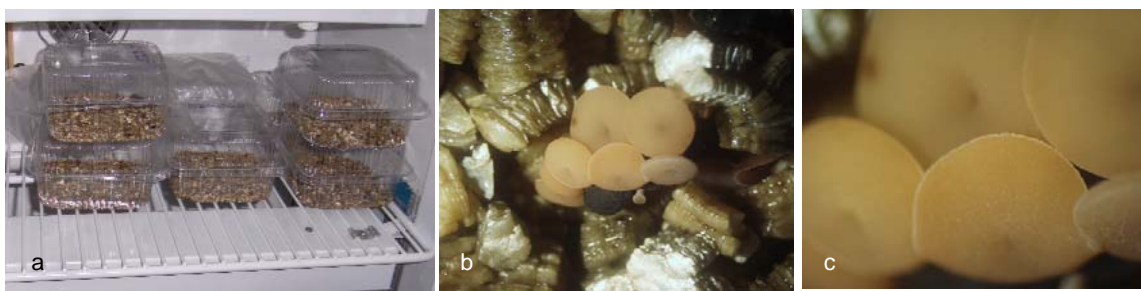


Figura 12: Producción de apotecios: a) Cajas de plástico con esclerocios y vermiculita en incubadora. b y c) Apotecios desarrollados.

### **Obtención de ascosporas de *S. sclerotiorum***

#### a) Ascosporas en suspensión

Se colocaron apotecios maduros dentro de 10 tubos Eppendorf de 1.5 ml conteniendo 500  $\mu$ l de Nonidet P40. Posteriormente, cada tubo fue agitado en vórtex por 5 s. Los apotecios fueron retirados y de la suspensión resultante se tomaron 50  $\mu$ l para realizar disoluciones seriadas de la misma. Se obtuvieron suspensiones con concentraciones equivalentes a 0.02, 0.2, 2, 20, 200 y 2000 ascosporas/ $\mu$ l. Éstas equivalen a 0.1, 1, 10, 100, 1000 y 10000 ascosporas en 5/ $\mu$ l utilizados en la PCR. Estas diluciones fueron utilizadas para determinar la sensibilidad y los límites de detección de *S. sclerotiorum* en la prueba de PCR. Por otra parte, se preparó una suspensión de conidiosporas de *Botrytis cinerea*, un hongo estrechamente relacionado, con el fin de verificar la especificidad de las sondas SSFWD y SSREV.

#### b) Ascosporas en cintas de celofán

Se colectaron y procesaron las ascosporas liberadas activamente por los apotecios e impactadas en las cintas de celofán colocadas en la tapa de las cajas de plástico (Figura 13). Esto se realizó con la finalidad de determinar si la mezcla de vaselina-hexano 1:5 (British Aerobiology Federation, 1995) tenía algún efecto en la purificación del ADN y la prueba de PCR.

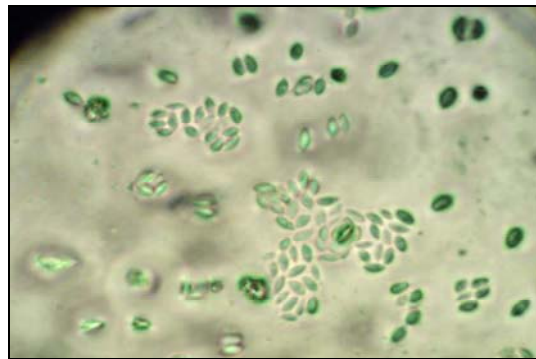


Figura 13: Cinta de celofán con ascosporas

#### b) Experimentos en el mini-túnel de viento.

Se realizaron 8 experimentos en el mini-túnel de viento para colectar las ascosporas de *S. sclerotiorum* con la trampa de esporas Hirst simulando las condiciones en campo. En cada experimento se colocaron 7 cajas con apotecios dentro del minitúnel de viento, en el cual se produce una corriente de aire a 4 m/s, provocando el desprendimiento y liberación de las ascosporas en el aire. En el extremo opuesto del minitúnel, se colocó la trampa de esporas Hirst (Burkard Manufacturing Co, UK), la cual succiona aire con una velocidad de 10 l/min impactándolo en una cinta de celofán Melinex con vaselina y hexano (5:1) (British Aerobiology Federation, 1995) (Figura 14). Esta cinta se encuentra montada en un tambor circular que se mueve a 2 mm por hora proporcionando un monitoreo continuo, en el cual, una vuelta completa corresponde a 7 días.

El mini-túnel de viento y la trampa de esporas Hirst permanecieron en funcionamiento por dos días para cada ensayo. Las cintas con ascosporas colectadas fueron almacenadas a 4° C hasta su proceso.



Figura 14: Mini-túnel de viento

#### ➤ **MONITOREO EN CULTIVOS DE FRIJOL**

Se colocó la trampa de esporas Hirst en el centro del cultivo de frijol, ubicado dentro de las instalaciones del Campus Oriente de la UAEM. El monitoreo del aire se llevó a cabo durante las 24 horas del día, a partir de la segunda semana de mayo hasta noviembre de 2008, el muestreo del aire se realizó antes, durante y después de la producción del frijol (Figura 15).



Figura 15. Muestreador Hirst en cultivo de frijol

➤ **PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE ASCOSPORAS DE *S. sclerotiorum* EN LABORATORIO.**

**Rompimiento de la pared de las ascosporas**

Para realizar la detección molecular de *S. sclerotiorum*, es necesario romper la pared de las ascosporas y liberar el ADN para que sea amplificado por PCR.

Para procesar las suspensiones de ascosporas, se transfirieron 300 µl de cada suspensión a tubos Eppendorf de 1.5 ml, conteniendo 0.2 g de perlas de vidrio estériles prelavadas con HCl.

Las cintas de celofán utilizadas en cada muestreo fueron cortadas en piezas de 0.5x3 cm, y trasferidas a tubos Eppendorf de 1.5 ml, conteniendo 0.2 g de perlas de vidrio estériles (Jencons-PLS, Leighton Buzzard, UK) y 250 µl de Nonidet P-40 (Sigma).

Los tubos con muestras tanto de cintas como de suspensiones fueron agitadas en el equipo Fast-Prep (Savant Instruments, Holbrook, Nueva York, EUA) a una velocidad de 6m/s durante 40 segundos, completando dos ciclos y colocando los tubos en hielo 2 minutos entre ambos para evitar sobrecalentamiento (Freeman et al., 2002).

**Purificación de ADN**

Para realizar la purificación del ADN de las muestras se siguió el protocolo propuesto por Freeman *et al.* (2002). Se tomaron 50 µl del sobrenadante y se le agregó 50 µl de fenol-cloroformo para lograr la separación del ADN. Se centrifugó, se tomó el sobrenadante y se precipitó con isopropanol frío y acetato de amonio 6M. Asimismo, se adicionó 1 µl de glicógeno, el cual

actúa como un acarreador de ADN durante la centrifugación (Williams et al., 2001). Se eliminó el sobrenadante y se realizó un lavado con etanol al 70%. El botón de ADN resultante fue resuspendido en 50 µl de agua estéril y almacenado en el congelador hasta su utilización en la prueba de PCR.

### **Detección por PCR**

A) Detección de ADN mediante la prueba de PCR con oligonucleótidos universales ribosomales fúngicos de las regiones ITS-4 y ITS-5 (White et al., 1990).

Se utilizó la prueba de PCR con dos tipos de oligonucleótidos universales ribosomales fúngicos de las regiones ITS-4 y ITS-5 para la detección de hongos en general, previo a la detección específica de *S. sclerotiorum*. En esta prueba se utilizaron ciclos de desnaturalización, cebado y extensión con ADN polimerasa para amplificar el número de copias de una secuencia de ADN hasta  $>10^6$  veces.

Los oligonucleótidos ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) e ITS5 (5' GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G) (White et al., 1990), amplifican ADN ribosomal (ADNr) del extremo 3' del gen 18S al extremo 5' del gen 28S, incluyendo el gen 5.8S y las dos regiones espaciadoras de transcripción (regiones ITS), los cuales son comunes a todos los hongos.

Cada 25 µl de mezcla de reacción contienen 20 mM de Tris HCl (pH 8.4), 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 µl de ADN genómico, 0.2 mM de cada dNTP, 100 pmol de cada oligonucleótido y 1 unidad de Platinum Taq polimerasa (Life Technologies). La amplificación se realiza en un

termociclador (Mastercycler, Eppendorf) con el siguiente programa: 1 ciclo de 94°C 2 min, seguidos de 35 ciclos 94°C 30seg, 60°C 45 seg, 72°C 45 seg, seguidos de 1 ciclo 72°C 10 min finalizando con 4°C (modificado de Calderón 2002).

B) Detección de ADN de *S. sclerotiorum* mediante la prueba de PCR con oligonucleótidos específicos.

La detección de ADN específico de *S. sclerotiorum* se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos SSFWD (5' GCT GCT CTT CGG GGC CTT GTA TGC) y SSREV (5' TGA CAT GGA CTC AAT ACC AAG CTG) diseñados por Freeman et al. (2002). Esta sonda amplifica una región dentro de la amplificada por los ITS que es específica para *S. sclerotiorum* mediante la prueba de PCR anidado. Cada 25 µl de mezcla de reacción contienen 20 mM de Tris HCl (pH 8.4), 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 µl de ADN genómico, 0.2 mM de cada dNTP, 100 pmol de cada oligonucleótido, 1 unidad de Platinum Taq (Life Technologies). Las condiciones del ciclo fueron: 95 °C por 10 minutos, seguidos por 30 ciclos de: 94 °C por 30 s, con un intervalo de temperatura de hibridación de 72 a 65°C disminuyendo la temperatura 1°C cada 2 ciclos, 72 °C por 1 minuto seguido de una extensión final de 72°C por 10 minutos. Todos los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. El corrimiento de la electroforesis se llevó a cabo a 80 V, en amortiguador TBE 0.5 X (Tris-Base 45 mM, ácido Bórico 45 mM y EDTA 1 mM). Se empleó un marcador estándar de tamaño molecular de 100 pb (Invitrogen) y las imágenes se capturaron en un fotodocumentador Digi-Doc- It (UVP).





## RESULTADOS:

### Experimentos con suspensiones de ascosporas

A partir del producto del PCR realizado con los ITS4/5, se realizó la detección molecular con una PCR anidada con la sonda SSFwd y SSRev, para la curva de concentración de suspensiones de ascosporas con el fin de determinar los límites de detección. Se procesaron suspensiones que representaban 0.1, 1, 10, 100, 1000 y 10000 ascosporas en PCR, encontrándose un límite de detección de 10 ascosporas. En la Figura 16, se muestra la curva de dilución del ADN de ascosporas de *S. sclerotiorum*.

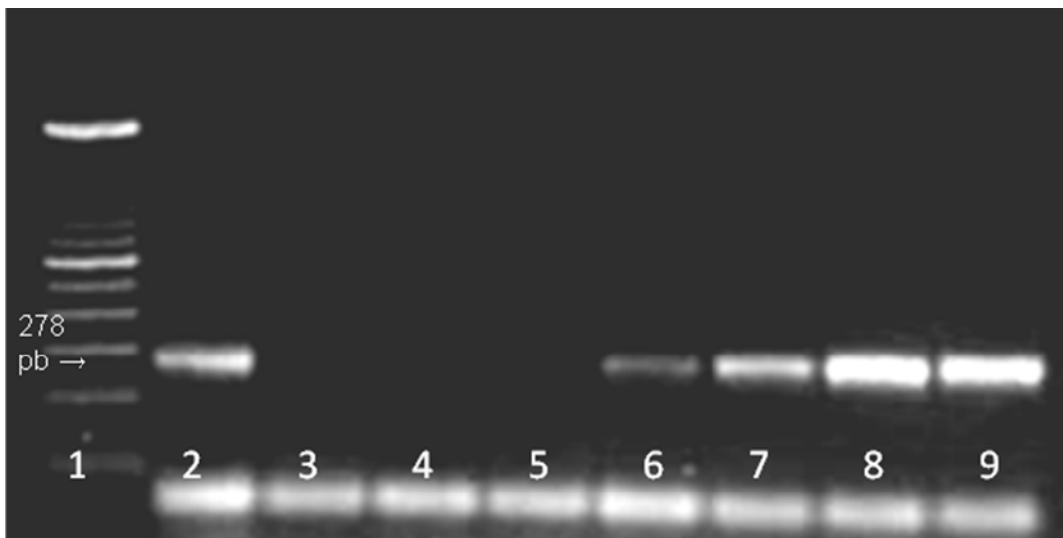


Figura 16: Curva de dilución del ADN de ascosporas de *S. sclerotiorum* Carriles: 1) Marcador: escalera de ADN 100 pb, 2) Testigo positivo, 3) Testigo negativo, 4) 0.1 ascosporas, 5) 1 ascospora, 6) 10 ascosporas, 7) 100 ascosporas, 8) 1000 ascosporas, 9) 10000 ascosporas.

Por otra parte, se verificó la especificidad de las sondas SSFWD y SSREV, al realizar una prueba con muestras de ADN de *B. cinerea*, en las cuales no se observó amplificación, coincidiendo con lo reportado por Freeman *et al.* (2002).

## Experimentos con ascosporas impactadas en cintas de celofán por liberación activa de los apotecios.

Se detectó con los ITS4/5 el ADN de las ascosporas de *S. sclerotiorum* impactadas en las cintas de celofán impregnadas con la mezcla de vaselina y hexano 5:1; observando un efecto nulo de dicha mezcla sobre el resultado del ensayo (Figura 17).

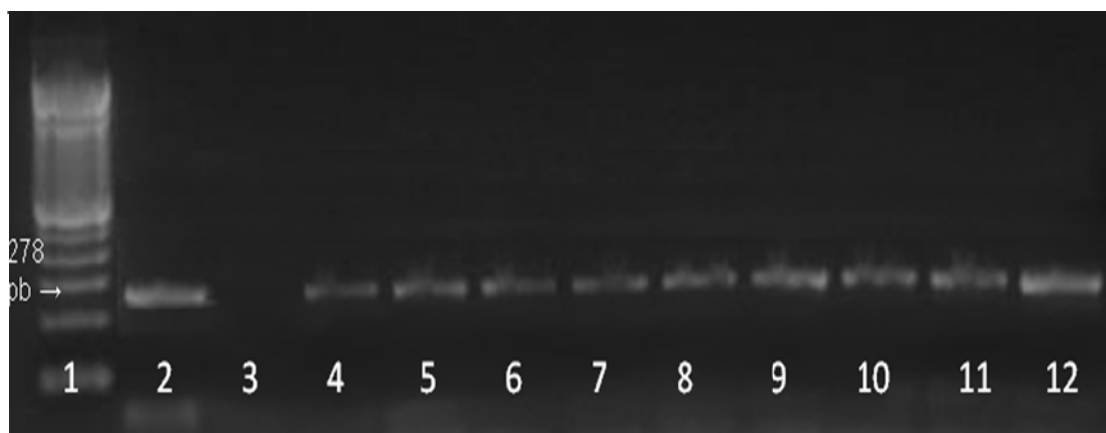


Figura 17: Detección con ITS4 e ITS5 del ADN de las ascosporas de *S. sclerotiorum* impactadas en las cintas de celofán. Carriles: 1 Marcador: escalera de ADN 100 pb, 2 testigo positivo, 3 testigo negativo, 4-12 cintas con ascosporas impactadas con el mini-tunel de viento.

Se utilizó el producto de PCR obtenido con los ITS4/5 para someterlo a una PCR anidada, utilizando las sondas específicas SSFWD y SSREV para detectar el ADN de las ascosporas de *S. sclerotiorum* en las cintas de celofán impregnadas con la mezcla de vaselina y hexano 5:1, sin encontrar un efecto adverso de dicha mezcla sobre el resultado del ensayo (Figura 18).

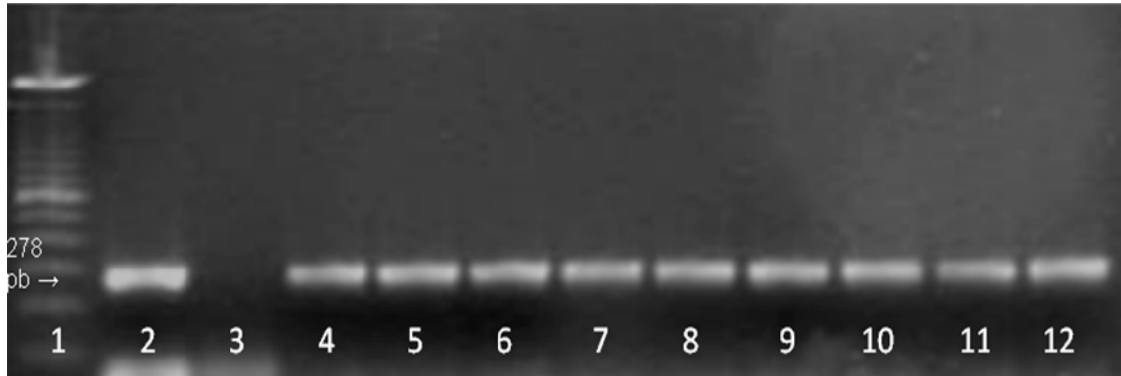


Figura 18. Detección con sondas específicas SSFWD y SSREV del ADN de las ascosporas de *S. sclerotiorum* impactadas en las cintas de celofán. Carriles: 1 Marcador: escalera de ADN 100 pb, 2 testigo positivo, 3 testigo negativo, 4-12 cintas con ascosporas impactadas el mini-túnel de viento.

### Experimentos en el mini-túnel de viento

En la Figura 19 se muestra el ADN detectado con los oligonucleótidos ITS4-ITS5, de las ascosporas impactadas en las cintas de celofán que se obtuvieron en los experimentos con el mini-túnel de viento. En estos ensayos se observó, principalmente, la detección de *S. sclerotiorum* (278 pb), además de otras especies de hongos que se encontraban en el ambiente.

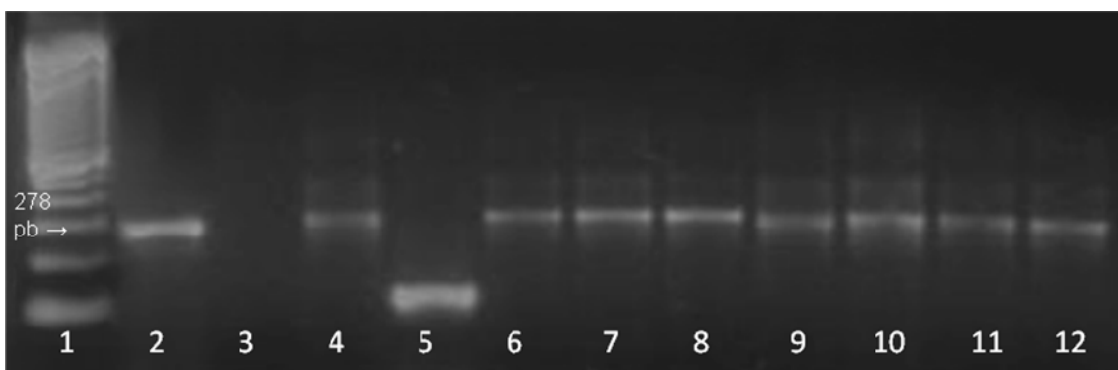


Figura 19. Detección con sondas ITS4 e ITS5 del ADN de las ascosporas de *S. sclerotiorum* impactadas en las cintas de celofán de la Trampa de esporas Hirst utilizada en el mini-túnel de viento. Carriles: 1 Marcador: escalera de ADN 100 pb, 2 testigo positivo, 3 testigo negativo, 4-12 cintas con ascosporas.

Posterior a la detección con los oligonucleótidos universales para hongos (ITS4-ITS5), se utilizó el producto de PCR obtenido para someterlo a un PCR anidado, utilizando las sondas específicas para *S. sclerotiorum* (SSFWD y SSREV). En la Figura 20 se muestra el ADN detectado de este hongo.

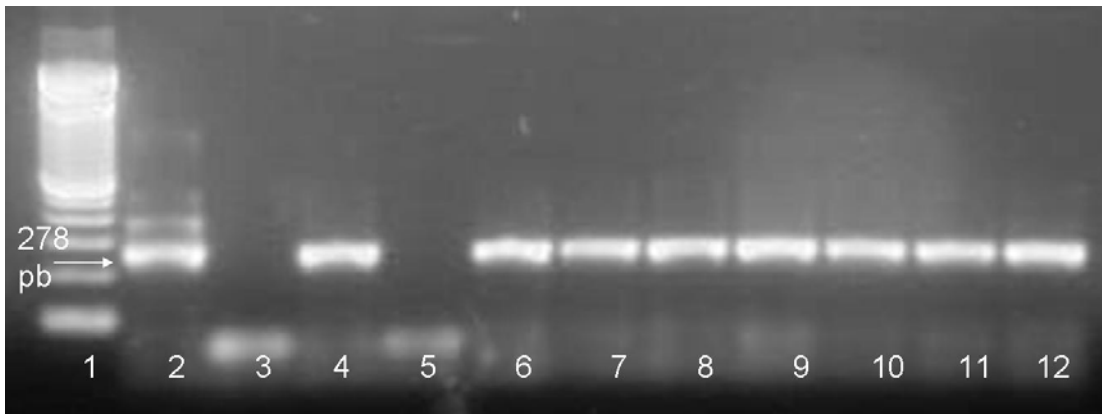


Figura 20: Detección con sondas SSFWD y SSREV del ADN de las ascosporas de *S. sclerotiorum* impactadas en las cintas de celofán de la Trampa de esporas Hirst. Carriles: 1 Marcador: escalera de ADN 100 pb, 2 testigo positivo, 3 testigo negativo, 4-12 cintas con ascosporas impactadas con el mini-tunel de viento.

### **Monitoreo en cultivo de frijol**

Se procesaron las cintas de celofán de la trampa de esporas Hirst colocada en campos de frijol. Se realizaron las pruebas de PCR con las sondas universales ITS4/5 y la PCR anidada utilizando los oligonucleótidos específicos SSFWD y SSREV para detectar el ADN de las ascosporas de *S. sclerotiorum* presentes en el aire.

La detección del ADN de ascosporas de *S. sclerotiorum* presentes en el aire del cultivo de frijol se encontró a partir del mes de junio de 2008, habiendo comenzado la época de lluvias desde abril de 2008. La presencia de este hongo fue detectada a partir de la segunda semana de junio y

durante 6 semanas, correspondientes al periodo del 11 de junio al 22 de julio de 2008, exceptuando la semana del 9 al 15 de julio de 2008. En la Figura 21 se muestra el ADN de las ascosporas de *S. sclerotiorum* que estaban presentes en el aire del cultivo de frijol durante junio y julio (época de lluvias). Las ascosporas fueron detectadas del aire 4 semanas antes de que las plantas mostraran los primeros síntomas de la enfermedad.

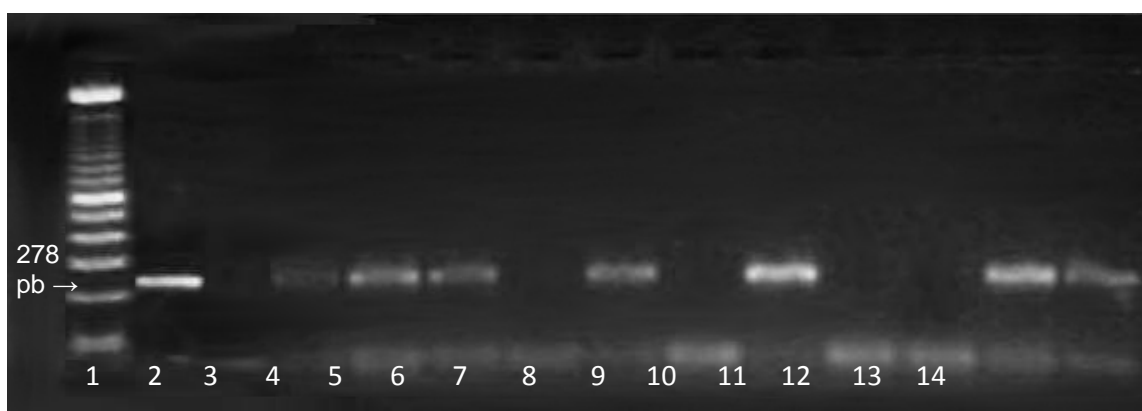


Figura 21. Detección del ADN de ascosporas del aire de *S. sclerotiorum* con las sondas específicas SSFWD y SSREV en cultivo de frijol. Carriles: 1 Marcador: escalera de ADN 100 pb, 2 testigo positivo, 3 testigo negativo, 4 y 5 semana del 11 al 17 de junio, 6 semana del 18 al 24 de junio, 7 y 8 semana del 25 de junio al 1º de julio, 9 y 10 semana del 2 al 8 de julio, 11 y 12 semana del 9 al 15 de julio, 13 y 14 semana del 16 al 22 de julio.

El monitoreo aerobiológico para detectar ascosporas de *S. sclerotiorum* se llevó a cabo antes, durante y después del cultivo del frijol, con el fin de determinar la presencia del hongo en la atmósfera. En las Figuras 22 y 23 se muestra que el ADN de las ascosporas de *S. sclerotiorum* no fue detectado antes de la siembra del frijol, así como tampoco posterior a su cosecha.

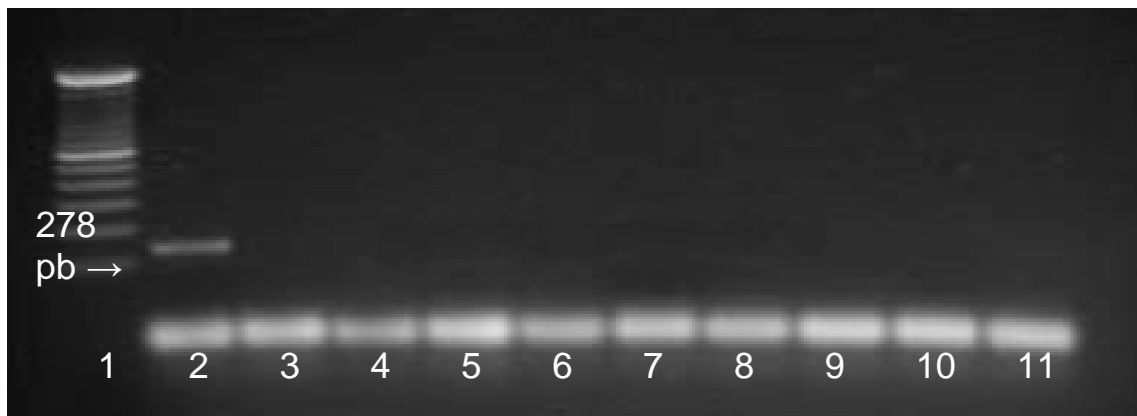


Figura 22. Detección del ADN de ascosporas del aire de *S. sclerotiorum* detectado con las sondas específicas SSFWD y SSREV en cultivo de frijol. a) Carriles: 1 Marcador: escalera de ADN 100 pb, 2 testigo positivo, 3 testigo negativo, 4 y 5: semana del 14 al 20 de mayo, 6 y 7: semana del 21 al 27 de mayo, 8 y 9: semana del 28 de mayo al 3 de junio, 10 y 11: semana del 4 al 10 de junio.

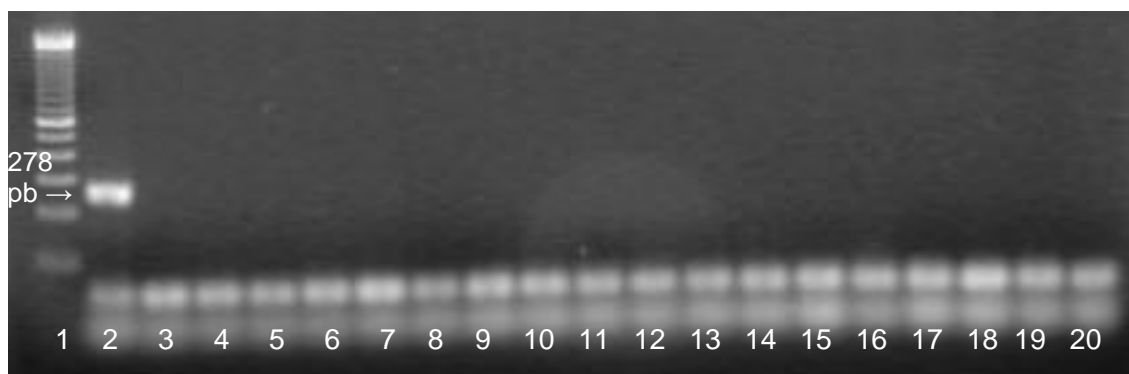


Figura 23. Detección del ADN de ascosporas del aire de *S. sclerotiorum* detectado con las sondas específicas SSFWD y SSREV en cultivo de frijol. a) Carriles: 1 Marcador: escalera de ADN 100 pb, 2 testigo positivo, 3 testigo negativo, 4 y 5: semana del 23 al 29 de julio, 6 y 7: semana del 30 de julio al 5 de agosto, 8 y 9: semana del 6 al 12 de agosto, 10 y 11: semana del 13 al 19 de agosto, 12 y 13: semana del 20 al 26 de agosto, 14 y 15: semana del 27 de agosto al 2 de septiembre, 16 y 17: semana del 3 al 9 de septiembre, 18 y 19: semana del 10 al 16 de septiembre, 20: semana del 17 al 23 de septiembre

## DISCUSIÓN:

Debido a que el control de las enfermedades en las plantas causadas por hongos depende principalmente de la aplicación de fungicidas, se han realizado estudios para pronosticar su aparición y realizar su control oportuno. Estas investigaciones se basan en determinar las condiciones climáticas de la zona que propician la producción y liberación de las esporas (Turkington *et al.* 1991a, b; Nordin *et al.*, 1992; Twengström *et al.*, 1998). Sin embargo, la diversidad de condiciones climáticas en las que se desarrollan los hongos es muy amplia, aunado a las variaciones microclimáticas (riego, radiación solar, cambios de temperatura, humedad) que se presentan dentro de los campos de cultivos, modificando las condiciones y el tiempo estimados para la liberación de las esporas (Rogers, 2009).

En el caso de la detección del patógeno *S. sclerotiorum*, se han desarrollado métodos inmunológicos en pétalos de flores después de haber iniciado la infección (Jamaux y Spire, 1994; Bom y Boland, 2000; Yajima *et al.* 2008) y moleculares mediante PCR (Freeman *et al.* 2002) y QPCR (Rogers *et al.* 2009) para la detección de las ascosporas dispersas en la atmósfera, por lo que el monitoreo y la detección de las ascosporas presentes en el aire provee una herramienta oportuna para la planeación específica del control de la enfermedad.

En este estudio fue posible realizar con éxito y de manera eficiente la detección molecular de ascosporas de *S. sclerotiorum* dispersas en el aire de campos de frijol. La técnica molecular fue aplicada en muestras de laboratorio y campo, ofreciendo una detección confiable y específica de este agente patógeno. Se realizó la purificación de ADN de las ascosporas colectadas con la trampa de esporas Hirst; y se verificó la especificidad y la

sensibilidad de las sondas SSFWD y SSREV (Freeman *et al.* 2002) para los aislamientos de México de *S. sclerotiorum* presentes en las áreas de estudio.

Se demostró la viabilidad de esta prueba en laboratorio y bajo condiciones de campo, con la colecta directa de ascosporas del aire en los experimentos en el mini-túnel de viento; y se verificó la efectividad de detección de la prueba utilizando la mezcla de vaselina/hexano 5:1 para la captura de aeropartículas, sin presentar problemas por daño a las ascosporas y sin afectar la purificación de ADN. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Freeman *et al.* (2002) y Rogers *et al.* (2009) para la detección de las ascosporas del mismo hongo presentes en el aire.

El método utilizado para el monitoreo de ascosporas de *S. sclerotiorum*, permitió detectarlas aun cuando estaban mezcladas con otras partículas, tanto orgánicas como inorgánicas, presentes en la atmósfera. Esto también concuerda con los resultados obtenidos por Calderón *et al.* (2002), en el cual, siguiendo el mismo método, detectaron el ADN de esporas fúngicas de muestras que tenían una mezcla de otras aeropartículas colectadas del aire de la Ciudad de México.

La prueba resultó ser altamente sensible, ya que fue capaz de detectar concentraciones mínimas de 10 ascosporas/m<sup>3</sup> de aire, coincidiendo con lo reportado por Freeman *et al.* (2002).

La detección molecular de *S. sclerotiorum* mostró un resultado positivo para determinar la presencia de las ascosporas de este hongo en el aire, cuatro semanas antes de que se observaran síntomas visibles de la enfermedad en los cultivos de frijol. Esto demuestra su potencial para la



detección temprana del agente patógeno y permite al agricultor realizar acciones oportunas de prevención y/o control del patógeno.

La presencia de ascosporas de *S. sclerotiorum* colectadas del aire, fue observada a partir de la semana del 11 al 18 de junio, 5 semanas después del inicio de las lluvias reportadas para el municipio de Ayala, Morelos, lo cual indica que los esclerocios obtuvieron las condiciones de humedad necesarias para la germinación carpogénica. La temperatura observada durante ese periodo osciló entre los 22 y 26°C, por lo que el tiempo que transcurrió entre las primeras lluvias y la detección de las esporas en el aire concuerda con el tiempo requerido para el desarrollo de los apotecios, de acuerdo a lo reportado por Sun y Yang (2000) para una temperatura de 25°C.

La infección en las plantas se manifestó hasta el retiro del cultivo, después de la última fecha de detección de las ascosporas dispersas en la atmósfera. Esto se debió a que las ascosporas germinaron e iniciaron el proceso de infección; la enfermedad se manifestó por la expansión del desarrollo micelial del hongo, lo cual fue favorecido por la presencia de precipitación, temperaturas entre 20 y 25°C y humedad relativa  $\geq 30\%$ ; las cuales son las condiciones señaladas para el desarrollo de este hongo en los estudios reportados por Saharan y Mehta (2008).

Este método demostró eficacia para su uso en campo, ya que los primeros síntomas visibles de la enfermedad aparecieron semanas después de la primera detección del hongo en el aire. De esta manera, los agricultores pueden tomar las medidas pertinentes para impedir el desarrollo de la enfermedad, protegiendo al cultivo con la aplicación de los fungicidas de manera inmediata a su detección. 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 de las ascosporas de *S. sclerotiorum* en zonas estratégicas del país permitirá dar un seguimiento a la diseminación de la enfermedad y brindaría una vigilancia epidemiológica fitosanitaria para las zonas que no presenten actualmente esta enfermedad.

El monitoreo continuo de *S. sclerotiorum*, al igual que el de esporas de diversos hongos patógenos es útil para el diseño de modelos de predicción y/o escenarios a futuro que muestren el comportamiento y las variables ambientales que afectan al patógeno en su desarrollo y dispersión, lo que también permitirá tomar medidas oportunas de prevención y/o control de la enfermedad.

La prueba de PCR para la detección de esporas de hongos ha tenido un gran desarrollo (Lee y Taylor, 1990; Williams *et al.*, 2001). Recientemente, se ha empleado la detección molecular de biopartículas del aire mediante la prueba de QPCR (PCR en tiempo real) con la cual es posible detectar las esporas del aire y cuantificar su ADN determinando con exactitud su concentración. A través de gráficos se observa la cantidad de ADN que se replica en tiempo real durante el proceso de amplificación. 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, Y. *et al.* 2007; Viljanen-Rollinson, *et al.* 2007 y Falacy *et al.* 2007) y fue utilizada recientemente para la detección molecular de ascosporas de *S. sclerotiorum* del aire de cultivos agrícolas en el Reino Unido (Rogers, *et al.* 2009).

La detección molecular de *S. sclerotiorum* por QPCR muestra un gran potencial, ya que permitiría la obtención de datos cuantitativos precisos de las ascosporas presentes en la atmósfera de cultivos agrícolas mexicanos. De esta manera, con el monitoreo de ascosporas y la adaptación de este método en México, será posible obtener información sobre la cantidad de inóculo necesaria para iniciar una infección a gran escala, su relación con la época del año y las condiciones ambientales que se presenten, además de su capacidad de dispersión para la creación de un modelo de comportamiento del patógeno, mediante el cual será posible realizar un seguimiento continuo del hongo en toda la República Mexicana, evitando así la dispersión de la enfermedad.

## REFERENCIAS:

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Walter P. 2008. *Molecular Biology of the cell*. Fifth Edition. Garland Science: New York. 545-548 pp.
- Boland G.J. y Hall R. 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Plant Pathol.* 16: 93–108.
- Bom M. y Boland G.J. 2000. Evaluation of polyclonal-antibody-based immunoassays for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola petals, and prediction of stem rot. *Can. J. Microbiol.* 46: 723–729.
- Bolton M., Thomma B. y Nelson B. 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Mol. Plant Pathol.* 7: 1–16.
- Caesar A.J. y Pearson R.C. 1983. Environmental factors affecting survival of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 73: 1024-1030.
- Calderon C., Ward E., Freeman J. y McCartney A. 2002. 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., Freeman J., Foster S., Ward E. y McCartney A. 2002. Detection of airborne inoculum of *Leptosphaeria maculans* and *Pyrenopeziza brassicae* in oilseed rape crops by polymerase chain reaction assays. *Plant Pathol.* 51: 303-310.
- Clarkson J.P., Staveley J., Phelps K., Young C.S. y Whipps J.M. 2003. Ascospores release and survival in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycol. Res.* 107: 213–222.

- Cortés B.T. 1995. Etiología y control del moho blanco en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) en Nepantla, México. Tesis profesional. Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 105 p.
- Cox C.S. 1987. The aerobiological pathway of the microorganisms. John Wiley & Sons. Nueva York. 293 pp.
- Cruz-Alcalá A., Mendoza-Zamora C. y Romero-Cova S. 2000. Identificación de hongos del suelo que causan pudriciones de raíz y cuello del tomate (*Lycopersicon esculentum* mill.) en el sureste del Estado de México, México. *Rev. Chapingo* 6:25-32.
- Dillard H.R., Ludwig J.W., y Hunter J.E. 1995. Conditioning sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* for carpogenic germination. *Plant Dis.* 79: 411-415.
- Duncan R., Dilantha W.G. y Rashid K.Y. 2006. Time and burial depth influencing the viability and bacterial colonization of sclerotia de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Soil Biol. Biochem.* 38: 275-284.
- 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.
- 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*. Straudsburg (PA): Dowden, Hutchinson and Ross.

- Expo Agro Sinaloa. 2003. Memorias. En: [http://www.fps.org.mx/divulgacion/images/stories/que\\_hacemos/divulgacion/memorias/expo\\_agro.pdf](http://www.fps.org.mx/divulgacion/images/stories/que_hacemos/divulgacion/memorias/expo_agro.pdf)
- Falacy J., Grove G., Mahaffee W., Galloway H., Glawe D., Larsen R. y Vandemark G. 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.
- Freeman J., Ward E., Calderon C, y McCartney 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.
- Fountaine J.M., Shaw M.W., Napier B., Ward E. y Fraaije B.A. 2007. Application of real-time and multiplex polymerase chain reaction assays to study leaf blotch epidemics in barley. *Phytopathology* 97: 297–303.
- Fucikovsky, L. 1975. *Enfermedades y plagas del girasol en México*. Colegio de Postgraduados, ENA. Chapingo, México.
- Gregory, P.H. 1973. *Microbiology of the Atmosphere*. Leonard Hill. Londres. 377 pp.
- Gutiérrez A. y Romero S. 1980. Etiología y control de la marchitez de la lechuga en Xochimilco, D.F. *Agrociencia*. 41:163-169.

- Hao J.J., Subbarao K.V. y Duniway J.M. 2003. Germination of *Sclerotinia minor* and *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia under various soil moisture and temperature combinations. *Phytopathology*. 93: 443-450.
- 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.
- Hegedus D.D. y Rimmer S.R. 2005. *Sclerotinia sclerotiorum*: When “to be or not to be” a pathogen. *FEMS Microbiol. Lett.* 251: 177–184.
- Hibbett D.S., Binder M., Bischoff J.F., Blackwell M., Cannon P.F., Eriksson O.E., et al. 2007. A higher level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 111: 509-547.
- Hirst J.M. 1952. An automatic volumetric spore trap. *Ann. Appl. Biol.* 39: 257-265.
- 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
- Jamaux I. y Spire D. 1994. Development of a polyclonal antibody-based immunoassay for the early detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in rapeseed petals. *Plant Pathol.* 43: 847–862.
- Kruger W. 1975. Influence of more environmental factors on the development of apothecia and ascosporas of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* 82:101-108.

- Lacey M.E. y West J.S. 2007. *The Air Spora. A manual for catching and identifying airborne biological particles*. Dordrecht: Springer.
- Lee S. y Taylor J. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. En: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. y White T.J. (Eds.). *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, USA. pp 282-287.
- Lumsden R.D. 1979. Histology y physiology of pathogenesis in plant disease caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 63: 708-715.
- 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. 2007. Approaches for eliminating PCR inhibitors and designing PCR primers for the detection of phytopathogenic fungi. *Crop Prot.* 26: 145-161.
- Madelin T.M. 1994. Fungal aerosols: a review. *J. Aerosol Sci.* 25: 1405-1412.
- 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.
- Monaco C.M., Rollán C. y Nico A.I. 1998. Efecto de micoparásitos sobre la capacidad reproductiva de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Rev. Iberoam. Micol* 15: 81-84.
- Nordin K., Sigvald R. y Svensson C. 1992. Forecasting the incidence of *Sclerotinia* stem rot on spring-sown rapeseed. *J. Plant Dis. Prot.* 99, 245-255.



- 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.
- Osorio M.A., Vazquez L.M., Salgado M.L. y González C.E. 2005. Efecto de dos enmiendas orgánicas y *Trichoderma* spp. para controlar *Sclerotinia* spp. en lechuga. *Rev. Chapingo.* 11: 203-208.
- Pasteur L. 1862. Memoire sur les corpuscles organisés qui existent dans l'atmosphère. En: Radot P.V. (ed). 1922. *Ouvres de Pasteur.* Vol. 2. Ed. Masson, Paris.
- 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.
- Purdy L.H. 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution and impact. *Phytopathology* 69: 875–880.
- Putnam M.L. 1995. Evaluation of selected methods of plant disease diagnosis. *Crop Prot.* 14: 517-525.
- Red Española de Aerobiología (REA): <http://www.rea.es>
- 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.
- Romero C.S. 1993. *Hongos Fitopatógenos.* Universidad Autónoma de Chapingo, México. 347 pp.
- SAGARPA, 2008. Programa de Trabajo de la Campaña Manejo Fitosanitario de Hortalizas, a Operar con Recursos del Componente Sanidad e Inocuidad del Programa Soporte.

- Saharan G.S. y Mehta N. 2008. *Sclerotinia Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management*. Springer Netherlands 485 pp.
- Satz M.I. y Kornbliht A.R. 1993. La reacción en cadena de la polimerasa. El método y sus aplicaciones. *Ciencia Hoy*. 4: 23.
- Schwartz H.F. y Steadman J.M. 1978. Factors affecting sclerotium population of, and apothecium production by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 68: 383-388.
- 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.
- Steadman J.R. 1983. White mold – A serious yield limiting disease of bean. *Plant Dis.* 67: 346-350.
- Sun, P. y Yang, X.B. 2000. Light, temperature, and moisture effects on apothecium production of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis.* 84: 1287-1293.
- Twengström E., Sigvald R., Svensson C. y Yuen J. 1998. Forecasting *Sclerotinia* stem rot in spring sown oilseed rape. *Crop Prot.* 17: 405-411.
- Turkington T.K., Morrall R.A. y Rude S.V. 1991a. Use of petal infestation to forecast *Sclerotinia* stem rot of canola: evaluation of early bloom sampling. *Can. J. Plant Pathol.* 13: 50-59.
- Turkington, T.K., Morrall R.A. y Rude S.V. 1991b. Use of petal infestation to forecast *Sclerotinia* stem rot of canola: the impact of diurnal and weather-related inoculum fluctuation. *Can. J. Plant Pathol.* 13: 347-355.

- Verdugo G.F. 1978. Estudio de algunos aspectos relacionados con el control de *Whetzelinia sclerotiorum* Korf y Dumont (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary), agente causal del moho blanco del frijol (*Phaseolus vulgaris*).
- Vesper S., Dearborn D.G., Yike I., Allan T., Sobolewski J., Hinkley S.F., et al. 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.
- Viljanen-Rollinson S.L.H. 2007. Monitoring long-term distance spore dispersal by wind – a review. *New Zea. Pl. Prot.* 60: 108–113.
- 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.
- Watson J.D., Baker T.A., Bell S.P., Gann A., Levine M. y Losick R. 2004. *Molecular Biology of the Gene*. Fifth edition. San Francisco: Benjamin Cummings.
- West J., Atkins S.D., Emberlin J. y Fitt B.D. 2008. PCR to predict risk of airborne disease. *Trends Microbiol.* 16: 8.
- White T.J., Bruns T., Lee S. y Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. y White T.J. (Eds.) *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, USA. pp 315–322.

- Williams J.R. y Stelfox D. Dispersal of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum* in relation to *Sclerotinia* stem rot of rapeseed. *Plant Dis. Repr.* 63: 395-399.
- Williams R.H., Ward E. y McCartney A. 2001. Methods for integrated air sampling and DNA analysis for detection of airborne fungal spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2453–2459.
- Yajima W., Rahman M., Das D., Suresh M.R. y Kav N. 2008. Detection of *Sclerotinia sclerotiorum* Using a Monomeric and Dimeric Single-Chain Fragment Variable (scFv) Antibody. *J. Agric. Food Chem.* 56: 9455-9463.