



NORMAS INTERNACIONALES PARA MEDIDAS FITOSANITARIAS

NIMF 27 PROTOCOLOS DE DIAGNÓSTICO

PD 4

***Tilletia indica* Mitra**

Adoptado 2015; publicado 2015

ÍNDICE

1. Información sobre la plaga	PD 4-3
2. Información taxonómica.....	PD 4-3
3. Detección.....	PD 4-3
3.1 Examen de semillas/ grano.....	PD 4-4
3.2 Extracción de teliosporas de las semillas/ grano, prueba de lavado mediante tamiz selectivo	PD 4-4
4. Identificación.....	PD 4-6
4.1 Morfología de las teliosporas	PD 4-6
4.1.1 Identificación morfológica.....	PD 4-6
4.1.2 Comparación morfológica con otras especies de <i>Tilletia</i>	PD 4-7
4.2.1 Germinación de las teliosporas	PD 4-7
4.2.2 Germinación de especies similares a <i>Tilletia</i>	PD 4-11
4.2.3 Recuperación de teliosporas individuales	PD 4-11
4.3 Identificación molecular.....	PD 4-11
4.3.1 Análisis de la región ITS1 con enzimas de restricción	PD 4-12
4.3.2 Prueba de PCR convencional con cebadores específicos para la especie	PD 4-13
4.3.3 Prueba de PCR con cebadores específicos para la especie y una sonda fluorescente.....	PD 4-14
4.3.4 PCR directa en tiempo real de las teliosporas	PD 4-14
4.3.4.1 Amplificación del ADN de <i>Tilletia</i> antes de la PCR en tiempo real.....	PD 4-15
4.3.4.2 Prueba de identificación de especies mediante PCR en tiempo real con cinco sondas fluorescentes.....	PD 4-15

5. Registros	PD 4-17
6. Puntos de contacto para información adicional	PD 4-17
7. Agradecimientos	PD 4-17
8. Referencias	PD 4-18
9. Figuras	PD 4-21

REVOCADO

1. Información sobre la plaga

Tilletia indica Mitra ocasiona la enfermedad del carbón de Karnal, también conocida como carbón parcial del trigo (*Triticum* spp.). El carbón de Karnal se describió por vez primera en Karnal (India), en 1931. El patógeno se encuentra ampliamente distribuido en ciertas regiones de Asia meridional y Asia sudoccidental (USDA, 2007; Wiese, 1987). También se ha detectado en algunas áreas de los Estados Unidos y México, y en Sudáfrica (Crous *et al.*, 2001; Fuentes-Dávila, 1996).

Sus hospedantes son, entre otros, *Triticum aestivum*, *Triticum durum* y *Triticum aestivum* × *Secale cereale*. Se han registrado pocos casos en *Triticum aestivum* × *Secale cereale*; no obstante, se ha comprobado que las especies de *Secale* pueden ser hospedantes (Sansford *et al.*, 2008). Se ha comprobado que *T. indica* puede infectar a otras especies de gramíneas en condiciones de invernadero, pero nunca se ha detectado en estos hospedantes alternativos en el campo (Inman *et al.*, 2003).

T. indica es un carbón patógeno que infecta las inflorescencias. El hongo infecta las semillas a través del extremo germinal del grano y se desarrolla dentro del pericarpio donde produce una masa pulverulenta de color negro parduzco constituida por teliosporas. Cuando está fresca, la masa de esporas produce un olor fétido, como de pescado en descomposición (trimetilamina). A diferencia de los carbonos sistémicos, *T. indica* no suele infectar todas las semillas de una espiga del hospedante, y el aspecto de las espigas con semillas infectadas no suele ser diferente del de las espigas sanas (Figura 1). Normalmente, la colonización de las semillas es tan parcial, con diferentes grados de infestación (Figura 2). Es, por lo tanto, muy difícil detectar la enfermedad en el campo. Los síntomas no se observan generalmente hasta después de la cosecha, salvo que sea alto el grado de infestación.

T. indica reduce la calidad del grano al provocar su descoloración e impartir al grano y a los productos elaborados con él un olor desagradable. Además, ocasiona una pequeña reducción del rendimiento. En general se considera que *Triticum aestivum* que contiene más de 3 % de granos carbonosos no es apto para el consumo humano (Fuentes-Dávila, 1996).

En el grano o semillas cosechados se encuentran con frecuencia otras especies de *Tilletia* que pueden confundirse con *T. indica*. Éstas incluyen *Tilletia walkeri* (patógeno de *Lolium perenne* y *Lolium multiflorum*), *T. horrida* (patógeno de *Oryza* spp.) y *T. ehrhartae* (patógeno de *Ehrharta calycina*). En Australia, se detectan semillas cosechadas de *Triticum aestivum* contaminadas con *T. walkeri* y *T. ehrhartae*. *T. walkeri* y *T. horrida* están presentes en los Estados Unidos y se detectan en semilla cosechada de *Triticum aestivum* sobre todo en zonas donde *Oryza* spp. y *Lolium* spp. se cultivan en rotación con *Triticum aestivum* (Castlebury, 1998; Castlebury y Carris, 1999; Pascoe *et al.*, 2005). Dada la similitud morfológica de estos patógenos, su identificación precisa es importante.

2. Información taxonómica

Nombre:	<i>Tilletia indica</i> Mitra, 1931
Sinónimos:	<i>Neovossia indica</i> (Mitra) Mundkur, 1941
Posición taxonómica:	Eukaryota, Fungi, Basidiomycota, Ustilaginomycotina, Exobasidiomycetes, Exobasidiomycetidae, Tilletiales, Tilletiaceae
Nombres comunes:	Carbón de Karnal o carbón parcial
Referencia:	MycoBank 267835

3. Detección

En el esquema de procedimiento de diagnóstico de *T. indica* que se muestra en la Figura 3 se describen los procedimientos para la detección de teliosporas en semillas o grano de las plantas hospedantes. Las muestras de semillas o grano se examinan visualmente para detectar la presencia de granos carbonosos (apartado 3.1). Si se detecta un grano carbonoso, se pueden retirar las teliosporas y puede identificarse *T. indica*, por su morfología (apartado 4.1).

- Si no se detectan granos carbonosos en la muestra, ésta podrá someterse a prueba para detectar la presencia de teliosporas utilizando una prueba de lavado mediante tamiz con aberturas de tamaño selectivo en tres submuestras (apartado 3.2). Sin embargo, es posible que mediante esta prueba no se pueda distinguir entre el grano infestado y el grano contaminado con teliosporas en la superficie de las semillas. Si en la prueba de lavado mediante tamiz con aberturas de tamaño selectivo no se detectan teliosporas, el resultado del diagnóstico de la muestra es negativo. Si se detectan teliosporas, el número de teliosporas detectadas determinará qué método puede utilizarse para su identificación: Si se detectan 10 teliosporas o más, el primer paso es la identificación de la especie de las teliosporas (apartado 4.1) por morfología. Si es necesario confirmar la identificación, el siguiente paso es o bien aislar y hacer germinar las teliosporas (apartado 4.2.1) y luego aplicar los protocolos de análisis molecular descritos en los apartados 4.3.1 a 4.3.3 o bien extraer teliosporas individuales (apartado 4.2.3) y luego someterlas a una prueba directa de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real (apartado 4.3.4). (Véanse los pasos A, B y C en la Figura 3.)
- Si se detectan menos de 10 teliosporas, es muy recomendable, para distinguir de manera confiable *T. indica* de otras especies similares, repetir la prueba de lavado con tamiz selectivo en nuevas submuestras. El límite de detección puede o no coincidir con el límite normativo.

En este protocolo de diagnóstico, los métodos (incluidas las referencias a nombres comerciales) se describen según se publicaron, ya que en ellos se define el nivel inicial de sensibilidad, especificidad y/o reproducibilidad alcanzado.

3.1 Examen de semillas / grano

El examen visual directo, ya sea para detectar granos carbonosos o teliosporas que contaminan la superficie de las semillas o granos, no se considera un método fiable para fines fitosanitarios. Sin embargo, los granos carbonosos podrán detectarse mediante un examen visual combinado con el uso de un microscopio de baja resolución (de 10 a 40 aumentos). El presente protocolo se basa en el examen de una muestra de 1 kg de semillas o granos; es preciso examinar toda la muestra para detectar la presencia de granos carbonosos de trigo (Figura 2) o semillas de otras poáceas (por ejemplo, de *Lolium* spp.). Se registran los síntomas observados y la presencia de semillas de otras poáceas.

Si hay presencia de granos carbonosos, el análisis de la morfología de las teliosporas permite realizar un diagnóstico positivo. Las teliosporas se deben montar sobre un portaobjetos para microscopio y se debe describir su morfología. Si la morfología de las teliosporas concuerda con la de *T. indica* (véase el apartado 4.1 y las figuras 4 a 6), el diagnóstico puede considerarse positivo.

Para facilitar la visualización de los síntomas, los granos pueden remojar en NaOH al 0.2 % durante 24 horas a 20° C, lo que blanquea levemente el endospermo y hace que destaque en marcado contraste la parte ennegrecida por la infección. Este procedimiento es especialmente útil para analizar los lotes de semillas sometidos a tratamientos químicos con tintes que podrán ocultar los síntomas (Agarwal y Mathur, 1992; Mathur y Cunfer, 1993). En casos de infestación y contaminación grave, podrán observarse teliosporas en la superficie de las semillas (Mathur y Cunfer, 1993).

En ausencia de granos carbonosos, se podrá utilizar la prueba de lavado mediante tamiz con aberturas de tamaño selectivo (apartado 3.2) para determinar la presencia o ausencia de *T. indica* en la muestra, o bien se podrá considerar que al no haber granos carbonosos *T. indica* no está presente. Si se detecta contaminación de la muestra con semillas de *Lolium* spp., es muy probable que se detecte *T. walkeri* en la muestra.

3.2 Extracción de teliosporas de las semillas/ grano, prueba de lavado mediante tamiz selectivo

La prueba de lavado mediante tamiz con aberturas de tamaño selectivo es un método fiable de detección de teliosporas de *T. indica* en una muestra sin tratar de *Triticum aestivum*, *Triticum durum* o *Triticum aestivum* × *Secale cereale*. Es importante analizar un mínimo de tres submuestras de 50 g

cada una para garantizar la detección de las teliosporas en caso de que estén presentes en la muestra (consúltese en el Cuadro 1 el número de muestras necesarias para detectar diferentes números de teliosporas). Este método tiene una eficiencia de recuperación promedio de 82 % y para el examen microscópico normalmente se necesitan tan solo unas pocas preparaciones por cada 50 g de muestra. El método se describe a continuación y, de forma más detallada, en Inman *et al.* (2003), Peterson *et al.* (2000) y Wright *et al.* (2003). El límite de detección podrá o no coincidir con el límite normativo.

Es importante remojar todo el equipo, antes de utilizarlo, en una solución de lejía (1,6 % de hipoclorito de sodio (NaOCl) como ingrediente activo) durante 15 minutos, para eliminar el riesgo de falsos positivos por contaminación cruzada de la muestra con muestras anteriores. La lejía mata las teliosporas y les confiere un aspecto hialino, en contraste con su aspecto normal oscuro y pigmentado. Posteriormente todo el equipo se enjuaga con agua del grifo.

La muestra de 50 g de semillas sin tratar se coloca en un matraz Erlenmeyer (250 ml) con 100 ml de una solución acuosa de Tween 20 al 0,01%. La muestra se coloca sobre un agitador durante 3 min a 200 r.p.m. para liberar las teliosporas; a continuación, se vierte sobre un tamiz de 53 μm situado sobre otro tamiz de 20 μm , ubicado dentro de un embudo colocado sobre otro matraz (500 ml). A continuación, el matraz que contenía la muestra se enjuaga dos veces con aproximadamente 50 ml de agua de grifo estéril cada vez: el agua de enjuague se vierte sobre la muestra retenida sobre el tamiz. La muestra se vuelve a lavar con agua de grifo estéril (200-300 ml) usando una botella aspiradora para asegurarse de la completa eliminación de las teliosporas de la muestra. Se retiran la muestra y el tamiz de 53 μm . El tamiz de 20 μm se inclina en un ángulo de 45° y los residuos de la muestra se lavan sobre el tamiz con una botella aspiradora llena de agua de grifo estéril, de arriba hacia abajo, con un movimiento de barrido lateral en uno y otro sentido. Este procedimiento lava todas las teliosporas recuperadas de la muestra a la parte inferior del tamiz. A continuación, las teliosporas y los residuos se vierten, por lavado, a un tubo de centrifuga cónico de 15 ml. Es importante utilizar tubos de polipropileno, ya que en los de policarbonato las teliosporas se adherirán a las paredes, falseando los resultados. Estos pasos se repiten hasta que el tamiz de 20 μm se vea limpio. El volumen final en el tubo será de aproximadamente 8 ml. En caso necesario, el tamiz de 20 μm puede examinarse con un microscopio de baja resolución para comprobar si quedan teliosporas residuales.

La suspensión recogida se centrifuga a 1000 g durante 3 min, para recuperar las teliosporas, ya que son más densas que la mayor parte de los residuos recogidos en la prueba de lavado. La fuerza centrífuga relativa (FCR [g]) puede calcularse a partir de las r.p.m. mediante la ecuación siguiente: $FCR = 1,12 \frac{r_{\text{p.m.}}^2}{r_{\text{máx.}}}$ donde $r_{\text{máx.}}$ es el radio máximo (mm) desde el centro de rotación al extremo inferior del tubo de centrifuga. Se retira el sobrenadante cuidadosamente, sin perturbar el sedimento, usando una pipeta Pasteur desechable nueva. El sedimento puede examinarse a continuación en el microscopio. Si el sedimento es demasiado espeso, se puede añadir agua, para diluir la suspensión, y revolver el sedimento con una punta de pipeta para homogeneizar la suspensión antes de examinarla con el microscopio. Se distribuye toda la suspensión de sedimento en lotes de 20 μl sobre portaobjetos de microscopía y se cubren con cubreobjetos. Las preparaciones se examinan en un microscopio de campo claro con 20-40 aumentos. Es importante examinar la presencia de teliosporas en cada milímetro cuadrado de la suspensión sobre el portaobjetos. Si se encuentran teliosporas, se registran sus características morfológicas (por ejemplo, el tamaño, el color y la ornamentación) y el número de teliosporas presentes en cada portaobjetos.

Cuadro 1. Número de submuestras de 50 g necesarias para detectar diferentes niveles de contaminación con niveles de confianza especificados, suponiendo que la distribución de las teliosporas es uniforme (Peterson et al., 2000)

Nivel de contaminación (n.º de teliosporas por 50 g de muestra)	Número de muestras necesarias para la detección en función del nivel de confianza (en %)		
	99 %	99,9 %	99,99 %
1	3	5	6
2	2	3	4
5	1	1	1

4. Identificación

La identificación de *T. indica* se basa en los siguientes elementos: a) síntomas en los granos y morfología de las teliosporas, o b) morfología de las teliosporas y detección de la secuencia de ADN característica mediante una de las técnicas de PCR (véase la Figura 3).

4.1 Morfología de las teliosporas

Si en una prueba de lavado con tamiz se encuentran teliosporas sospechosas, podrían reexaminarse para detectar síntomas los granos, tanto los de la submuestra o submuestras lavadas como los de la muestra madre. Si se detectan síntomas, estos deberían confirmarse mediante examen microscópico de las teliosporas. También deberían examinarse todas las semillas de gramíneas presentes en la muestra para comprobar si presentan signos de infestación por carbón; si se detectan signos, las teliosporas asociadas deberían examinarse microscópicamente. Si las teliosporas detectadas en la prueba de lavado con tamiz son las mismas que las encontradas en los granos carbonosos, puede realizarse un diagnóstico. Si, por el contrario, no se encuentran granos carbonosos en la muestra mayor, se recomienda realizar una de las pruebas moleculares (apartados 4.3.1 a 4.3.4) para la identificación.

En el Cuadro 2 se indican las características morfológicas de las teliosporas de *T. indica*, así como las de las teliosporas de las especies comunes de *Tilletia* que se pueden encontrar en los envíos de semillas o grano y que pueden confundirse con *T. indica*.

4.1.1 Identificación morfológica

Las teliosporas de *T. indica* son globosas a subglobosas, presentan a veces un pequeño fragmento de hifa (más común en teliosporas inmaduras, pero también, en ocasiones, en teliosporas maduras); su diámetro suele ser de 22-47 µm, ocasionalmente mayor, hasta de 64 µm (de 35-41 µm de promedio); son de color naranja parduzco pálido a marrón rojizo oscuro, aunque las teliosporas maduras son negras y opacas (Figuras 4 y 5); están densamente ornamentadas con espinas de punta aguda a truncada, ocasionalmente con extremo curvado, de 1,4-5,0 (-7,0) µm de alto; las que en una vista superficial se presentan ya sea como espinas individuales (densamente equinuladas) o formando crestas estrechas y próximas entre sí (fina trama cerebriforme) (Figuras 4 y 5); las espinas están cubiertas por una delgada membrana hialina (Carris *et al.*, 2006; CMI, 1983).

Las células estériles de *T. indica* son globosas o subglobosas a lacrimiformes (con forma de lágrima), marrón amarillentas, de 10–28 µm × 48 µm, con o sin apículo (tallo corto), con paredes lisas de hasta 7 µm de espesor y laminadas. En general es poco frecuente encontrar células estériles en el agua de lavado tamizada (Carris *et al.*, 2006; CMI, 1983).

Si en una prueba de lavado con tamiz se detectan 10 o más teliosporas, puede confirmarse la identificación morfológica. Si se detectan menos de 10 teliosporas, las características morfológicas no se consideran completamente confiables a efectos de confirmar la identificación (EPPO, 2007). En tal

caso, se recomienda volver a preparar nuevas submuestras de la muestra original de 1 kg y repetir la prueba.

4.1.2 Comparación morfológica con otras especies de *Tilletia*

Las características morfológicas más importantes que permiten discriminar entre *T. indica*, *T. walkeri*, *T. horrida* y *T. ehrhartae* son el tamaño de las teliosporas (valores extremos y promedio), la ornamentación y el color (Cuadro 2; figuras 4 a 8). Los informes publicados a menudo presentan variaciones en el cuanto al tamaño de las esporas. Este es afectado por el medio de preparación y los tratamientos de calentamiento. Pascoe *et al.* (2005) mostraron que, en Australia, *T. walkeri* y *T. ehrhartae* son contaminantes comunes del *Triticum aestivum* cosechado. En los Estados Unidos, *T. walkeri* y también *T. horrida*, hongos morfológica y genéticamente similares, son contaminantes conocidos del *Triticum aestivum* cosechado (Castlebury y Carris; 1999; Cunfer y Castlebury, 1999; Smith *et al.*, 1996). Además de las especies de *Tilletia* mencionadas en el Cuadro 2, podrán confundirse con *T. indica* otras especies de *Tilletia* con esporas tuberculadas (Durán, 1987; Durán y Fischer, 1961; Pimentel *et al.*, 1998). Es menos probable encontrar estas especies como contaminantes de *Triticum aestivum*. Estas especies incluyen a *Tilletia barclayana sensu lato* (carbón de varias especies de poáceas, por ejemplo, *Panicum* y *Paspalum*), *Tilletia eragrostidis* (en *Eragrostis*), *Tilletia inolens* (en *Lachnagrostis filiformis*), *Tilletia rugospora* (en *Paspalum*) y *Tilletia boutelouae* (en *Bouteloua gracilis*). Ninguna de estas especies morfológicamente similares se ha detectado infestando naturalmente *Triticum aestivum*.

Los perfiles medianos de giro de las teliosporas se pueden realzar blanqueando las teliosporas en NaOCl al 10 % durante 15-20 min. En caso necesario, las teliosporas pueden enjuagarse a continuación dos veces en agua y teñirse, por ejemplo con azul de tripano o azul de algodón en lactoglicerol (Figura 8).

4.2 Aislamiento y germinación de las teliosporas

Actualmente hay dos métodos disponibles para confirmar la identificación de las teliosporas detectadas en la prueba de lavado con tamiz (apartado 3.2). Existe un procedimiento estándar, que consiste en recuperar las teliosporas de los portaobjetos e inducir su germinación (apartado 4.2.1), y un procedimiento nuevo desarrollado por Tan *et al.* (2009) que permite realizar la PCR directamente en una sola teliospora recuperada del portaobjetos (apartado 4.2.3).

4.2.1 Germinación de las teliosporas

T. indica es un biotro facultativo. Para su cultivo, las teliosporas se remojan en agua, se esteriliza rápidamente su superficie y luego se hacen germinar en placas de agar agua.

Las teliosporas se pueden recuperar de los portaobjetos y cubreobjetos lavándolos con agua destilada sobre el tamiz de 20 µm y recogiendo el agua de lavado en un tubo de centrifuga cónico limpio y estéril (como en el apartado 3.2). Debería recogerse un volumen aproximado de 3-5 ml. Los tubos se incuban a 21° C hasta el día siguiente para hidratar las teliosporas y aumentar la vulnerabilidad de los contaminantes fúngicos y bacterianos a la posterior esterilización de la superficie. Tras la incubación durante la noche, las teliosporas se sedimentan por centrifugación a 1 200 g durante 3 min.

Se elimina el sobrenadante y las teliosporas se esterilizan mediante la suspensión del sedimento en 5 ml de lejía (0,3-0,5 % de ingrediente activo NaOCl); el tubo se invierte rápidamente tres veces y se centrifuga a 1 200 g durante 1 min. Algunas teliosporas pueden destruirse si el tiempo total en el blanqueador excede los 2 min. Como alternativa al tratamiento con lejía, la superficie de las teliosporas puede esterilizarse en 5-10 ml de agua electrolizada acidificada (AEA) durante 30 min. El AEA esteriliza la superficie de las teliosporas en forma eficaz, pero, a diferencia del tratamiento con blanqueador de 1-2 min, estimula la germinación de teliosporas en lugar de reducirla (Bonde *et al.*, 1999). Posteriormente, las teliosporas se lavan dos veces mediante la eliminación del sobrenadante, la suspensión del sedimento en 1 ml de agua destilada estéril y la centrifugación a 1200 g durante 5 min.

El sedimento se vuelve a suspender en 1 ml de agua destilada estéril y se coloca de forma aséptica, 200 µl de la suspensión de teliosporas sobre placas de agar agua al 2 % con antibióticos (AA+A), extendiéndola con una espátula estéril. Como antibióticos, se utilizan 60 mg de penicilina G (sal sódica) y 200 mg de sulfato de estreptomicina por litro de agar (EPPO, 2007). Las placas de AA+A se incuban a 21° C con un ciclo de iluminación de 12 h. Tras dejarlas reposar unos 5 días, las placas se sellan o se colocan dentro de bolsas de polietileno transparentes.

A los 7-14 días, las teliosporas no latentes producen un promicelio que contiene, en su extremo, de 32 a 128 basidiosporas (esporidios primarios) o más. Estas colonias producen esporidios secundarios — normalmente de dos tipos: filiformes y alantoides — que pueden cultivarse directamente en medios sólidos (Figura 9) o en medios nutritivos líquidos como caldo papa dextrosa. Se cortan pequeños bloques de agar (de 1 cm × 1 cm) que contienen teliosporas germinadas o colonias y se pegan en la parte interna de la tapa de una placa de Petri de modo que la teliospora germinada quede frente a la superficie del caldo, lo que permite la liberación de los esporidios sobre la superficie del caldo. A continuación, las placas se incuban a 21° C con un ciclo de iluminación de 12 horas. A los 2-3 días, las basidiosporas depositadas sobre la superficie del caldo producen pequeñas capas miceliales de aproximadamente 0,5-1,0 cm de diámetro. Cada capa micelial se extrae con una aguja de disección estéril, y se posa con suavidad sobre un papel filtro estéril para eliminar el exceso de caldo. El micelio se introduce en recipientes adecuados (por ejemplo, tubos de microcentrífuga de 1.5-2.0 ml) para extraer el ADN inmediatamente, o bien para almacenarlo a -80° C y extraer el ADN más adelante.

No siempre se podrá hacer germinar las teliosporas para el análisis molecular, por ejemplo, si las semillas se han tratado con NaOH, como en el caso del grano tratado con fungicida. Si se aumenta el número de submuestras tamizadas se podrá incrementar el número de teliosporas recuperadas y, por lo tanto, el número de teliosporas que pueden hacerse germinar. Las teliosporas pueden tener un período de latencia, que puede afectar su germinación (Carris *et al.*, 2006). Esto se puede resolver realizando una PCR directa en tiempo real en teliosporas individuales (véase el apartado 4.3.4).

REVOCAADO

Cuadro 2. Características morfológicas de las teliosporas de *Tilletia indica*, *Tilletia walkeri*, *Tilletia horrida* y *Tilletia ehrhartae*, y hospedantes asociados a estas cuatro especies

Especie	Tamaño de las teliosporas (µm)	Tamaño de las teliosporas (promedio) (µm)	Color de las teliosporas	Forma de las teliosporas	Vaina de las teliosporas	Espinas de las teliosporas	Hospedante
<i>T. indica</i> ^a	22–64	35–41	Marrón anaranjado pálido a marrón rojizo oscuro; esporas maduras entre negras y opacas	Globosa a subglobosa.	Presente	1,4–5(–7) µm En vista superficial, densamente equinuladas o dispuestas en crestas estrechas y próximas entre sí (formando una fina trama cerebriforme). En vista mediana, el contorno es más suave y completo debido a la disposición densa de las espinas, ocasionalmente con puntas curvadas.	<i>Triticum</i> spp.
<i>T. walkeri</i> ^b	28–35	30–31	Amarillo pálido a marrón rojizo oscuro (nunca negro ni opaco)	Globosa a subglobosa.	Presente, extendido hasta los extremos de las proyecciones, de hialino a marrón amarillento	3-6 µm Trama gruesa +/- cerebriforme. Crestas anchas con aspecto cerebriforme incompleto en vista superficial. En vista mediana, el perfil es irregular con huecos entre las espinas.	<i>Lolium perenne</i> y <i>Lolium multiflorum</i>
<i>T. horrida</i> ^c	14–36 (maduras: <25)	24–28	Castaño claro a oscuro, pueden ser semiopacas	Globosa a subglobosa.	Presente, extendida hasta los extremos de las espinas, de hialina a coloreada	1,5-4 µm Con frecuencia curvadas, con aspecto de escamas poligonales en vista superficial.	<i>Oryza</i> spp.
<i>T. ehrhartae</i> ^d	17–25	no hay datos	Marrón oliváceo muy oscuro en teliosporas maduras.	Globosa a subglobosa.	Presente, extendida hasta el ápice de las	1-2,5 µm Espinas cilíndricas o ligeramente cónicas. En vista superficial, rara vez cerebriformes. Escamas poligonales más grandes y agudas.	<i>Ehrharta calycina</i>

Pueden ser opacas debido a la melanización de las escamas.

espinas o un poco más allá.

En vista mediana, de generalmente truncadas a ligeramente redondeadas en el ápice.

Notas: ^aBasado en Inman *et al.* (2003). ^bBasado en Castlebury, 1998; Milbrath *et al.*, 1998; Castlebury y Carris, 1999; Cunfer y Castlebury, 1999. ^cComo *T. barclayana*: Durán y Fischer, 1961; CMI, 1965; Durán, 1987; Castlebury y Carris, 1999. Como *T. horrida*: Khanna y Payak, 1968; Aggarwal *et al.*, 1990; Castlebury, 1998. ^dPascoe *et al.*, 2005.

REVOCADO

4.2.2 Germinación de especies similares a *Tilletia*

En cultivo, *T. walkeri* y *T. indica* producen colonias muy similares. Tras cultivarse en agar papa dextrosa (APD) durante 14 días a 19° C con un ciclo de iluminación de 12 h, ambas especies producen típicamente colonias costrosas irregulares de color entre blanco y crema y de crecimiento lento, de aproximadamente 4-6 mm de diámetro (Figura 9). En cambio, los cultivos similares de *T. horrida* presentan un crecimiento significativamente más lento (con colonias de solo 2-3 mm de diámetro), porque su temperatura óptima es mayor. Los aislamientos de *T. horrida* también pueden producir un pigmento púrpura rojizo (Figura 9), tanto en APD como en caldo de papa dextrosa.

4.2.3 Recuperación de teliosporas individuales

Tras examinar las teliosporas y registrar su morfología, la preparación microscópica se deja secar, con o sin cubreobjetos. Cuando se retira el cubreobjetos, se coloca boca abajo sobre el portaobjetos para que se pueda comprobar la presencia de teliosporas adheridas a él.

En otro portaobjetos, se coloca una sola pieza obtenida de un cubreobjetos cortado en láminas minúsculas ($1 \times 1 \text{ mm}^2$) que ha sido esterilizada (en autoclave a 121° C durante 15 min o en horno a 170° C durante 2 h). Se añade sobre esta pieza de cubreobjetos una gota de 1 µl de tampón (TE) Tris-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Con ayuda de un microscopio compuesto o de disección, se toma una sola teliospora con una aguja muy fina y se introduce en la gota de tampón TE. La teliospora se transferirá a la gota. Se toma, con unas pinzas, otra pieza pequeña esterilizada de cubreobjetos y se coloca encima formando un sándwich. Se aplasta la teliospora presionando con las pinzas sobre el cubreobjetos, y luego se transfiere el sándwich de vidrio a un tubo de PCR de 0,2 ml. El cubreobjetos se tritura luego con la punta de una pipeta (Tan *et al.*, 2009). A continuación, se sigue el procedimiento que se describe en el apartado 4.3.4.1.

4.3 Identificación molecular

Se cuenta con varios métodos moleculares para la identificación de *T. indica*. Podrá utilizarse cualquiera de los métodos descritos a continuación, pero es esencial que el material de referencia (controles positivos) se haya obtenido de expertos en la materia (véase el apartado 6).

Los tres primeros protocolos descritos a continuación dan buenos resultados, pero dependen de la germinación de las teliosporas para poder extraer suficiente ADN de la capa micelial producida. La germinación de las teliosporas puede llevar hasta tres semanas. Peterson *et al.* (2000) determinaron que la tasa media de germinación de las teliosporas era del 55 %, lo que reduce en gran medida las posibilidades de identificar las teliosporas mediante estos tres métodos moleculares. Se describe también un cuarto protocolo molecular que no se basa en la germinación de las teliosporas.

Hay diferencias significativas, a efectos de diagnóstico, en el ADN nuclear y mitocondrial (ADNm) de *T. indica*, *T. walkeri* y *T. horrida*. Se han identificado polimorfismos interespecíficos mediante diversos métodos de PCR, como la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), el análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y el de los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) (Laroche *et al.*, 1998; Pimentel *et al.*, 1998). En las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS) 1 y 2 del ADN ribosómico (ADNr) nuclear la similitud entre las secuencias de *T. walkeri* y *T. indica* es >98 % (Levy *et al.*, 2001). Ahora bien, *T. walkeri* presenta en la región ITS1 un sitio de restricción de enzimas (*Sca1*) importante a efectos del diagnóstico, ya que no está presente en *T. indica*, *T. horrida* ni en otras especies estrechamente relacionadas (Levy *et al.*, 2001; Pimentel *et al.*, 1998). Las diferencias en la secuencia del ADNm han permitido diseñar cebadores específicos para las especies *T. indica* y *T. walkeri* (Frederick *et al.*, 2000). Estos cebadores se pueden utilizar en pruebas de PCR convencionales, en un sistema basado en una sonda TaqMan® (Frederick *et al.*, 2000) o en un análisis múltiple en tiempo real con cinco sondas (Tan *et al.* 2009).

4.3.1 Análisis de la región ITS1 con enzimas de restricción

La región genética objetivo es la región ITS del gen del ARNr nuclear (Pimentel *et al.*, 1998). El amplicón producido mediante la PCR incluye las regiones ITS1 e ITS2 y el fragmento conservado 5.8S. Este amplicón tiene aproximadamente 670 pares de bases (pb), incluidas las secuencias de los cebadores. Para *T. indica* se utilizan los oligonucleótidos siguientes:

Cebador directo ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')

Cebador inverso ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White *et al.*, 1990).

Se extrae ADN del micelio ya sea moliéndolo en un mortero o poniendo aproximadamente 0.1 g de micelio en un tubo de microcentrífuga estéril de 2 ml relleno hasta un tercio con perlas de vidrio estériles de 0.5 mm y 1 ml de agua apta para análisis moleculares. El tubo se sella con una tapa de rosca con junta tórica y se agita en un agitador de perlas (*beadbeater*) o en un homogeneizador tisular (*tissue lyser*) a un cuarto de potencia durante 5 min. La muestra molida se deja reposar durante 30 s y luego se extrae su ADN mediante un equipo patentado de extracción de ADN de hongos. No es necesario limpiar el ADN. El ADN extraído se utiliza inmediatamente, se conserva hasta el día siguiente a 4° C o se almacena a -20° C durante períodos más largos.

En la PCR para producir el amplicón de restricción se utilizan los siguientes componentes (concentración por cada 50 µl de reacción única): tampón de PCR 1× (que contiene 1.5 mM de MgCl₂ (Applied Biosystems))¹, 0.2 mM de cada uno de los trifosfatos de desoxirribonucleótidos, 1,25 µl de AmpliTaq (5 U/µl) (Applied Biosystems), 0.5 µM de cada cebador y 1 µl del ADN extraído. En la PCR se aplican ciclos térmicos con los siguientes parámetros: desaturación a 94° C durante 2 min; 30 ciclos a 94° C durante 1 min, 54° C durante 1 min y 72° C durante 1 min, y una etapa de extensión a 72° C durante 10 min.

La restricción del amplicón de PCR se realiza como sigue. Mezcla de restricción (concentración por cada 20 µl de reacción única): 7,3 µl de agua apta para análisis moleculares, 2,0 µl de tampón de restricción (Promega)², 0,2 µl de seroalbúmina bovina (10 µg/µl), 0,5 µl de enzima de restricción (ya sea *TaqI* o *ScaI* de 10 U/µl (Promega)) y 10,0 µl de la solución pura del amplicón de ADN elaborada antes (>50 ng/µl de ADN). Esta mezcla se incuba durante 3 horas a 37° C, y la reacción se mezcla suavemente por inversión durante la incubación. Los productos de restricción se almacenan a 4° C antes de su visualización en un gel. Cuando sea preciso, se toman 10 µl del producto de la reacción, se añade un marcador adecuado y se revela en un gel al 2%.

El análisis es positivo para *T. indica* si las muestras de prueba amplificadas se cortan con la enzima de restricción *TaqI* generando cinco productos (que se dan a 60, 70, 110, 170 y 260 pb) y *ScaI* no produce cortes. El resultado es positivo para *T. walkeri* si las muestras de prueba amplificadas se restringen con la *TaqI* generando los mismos cinco fragmentos que en el caso de *T. indica*, pero *ScaI* restringe los productos amplificadas generando dos fragmentos a 140 pb y 520 pb. Si el producto amplificado proviene de *T. horrida*, la *TaqI* produce cuatro fragmentos de ADN (60, 110, 150 y 335 pb) y la *ScaI* no produce cortes. Otras especies de *Tilletia* generan patrones de restricción diferentes con estas y otras enzimas (Pimentel *et al.*, 1998).

¹ El uso de productos de la marca Applied Biosystems en este protocolo de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros que también podrán ser adecuados. Esta información se proporciona para la comodidad de los usuarios de este protocolo y no constituye un aval por parte de la CMF del producto químico, el reactivo o el equipo mencionados. Pueden usarse otros productos equivalentes si se demuestra que producen los mismos resultados.

² El uso de productos de la marca Promega en este protocolo de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros que también podrán ser adecuados. Esta información se proporciona para la comodidad de los usuarios de este protocolo y no constituye un aval por parte de la CMF del producto químico, el reactivo o el equipo mencionados. Pueden usarse otros productos equivalentes si se demuestra que producen los mismos resultados.

4.3.2 Prueba de PCR convencional con cebadores específicos para la especie

En esta prueba, diseñada por Frederick *et al.* (2000), se utiliza ADN³ y produce un amplicón de 414 pb. Para *T. indica* se utilizan los oligonucleótidos siguientes:

Cebador directo Tin 3 (5'-CAA TGT TGG CGT GGC GC-3')

Cebador inverso Tin 4 (5'-CAA CAG CTC TGA TGG CTC CG-3').

Se extrae el ADN del micelio moliendo 0,5-1,0 g de micelio en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml con 75 µl de tampón de lisis y luego moliéndolo más aún con una mano de mortero estéril conectada a un taladro eléctrico. Se añaden otros 75 µl de tampón de lisis antes de extraer el ADN usando un kit patentado para la extracción del ADN de hongos. No es necesario limpiar el ADN. El ADN extraído es utilizado inmediatamente, conservado hasta el día siguiente a 4° C o almacenado a -20° C durante períodos más largos.

En la PCR para esta prueba se utilizan los siguientes componentes (concentración por cada 25 µl de reacción única): tampón de PCR 1× (que contiene 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl (a pH 8,3), 1,5 mM de MgCl₂ y 0.001% (p/v) de gelatina); 0.1 µM de dATP, de dGTP, de dCTP y de dTTP; 0,1 µM de cada cebador; 0,5 U de ADN polimerasa *AmpliTaq*, y 1,0 µl de ADN extraído según el método antes descrito.

En la PCR los parámetros de los ciclos térmicos son: desnaturalización a 94° C durante 1 min; 25 ciclos de 94° C durante 15 s, 65° C durante 15 s y 72° C durante 15 s, y una etapa de extensión a 72° C durante 6 min.

En caso necesario, se toman 10 µl del producto de reacción y se añade un marcador adecuado y se revela en un gel de agarosa al 2%.

En la prueba para *T. walkeri*, el cebador Tin 3 se sustituye por 0,1 µl del cebador directo Tin 11 (5'-TAA TGT TGG CGT GGC AT-3') (25 µM) de GenBank, se genera un amplicón de 414 pb.

Las reacciones positivas producen un único amplicón de 414 pb tanto en *T. indica* (cebadores Tin 3/Tin 4) como en *T. walkeri* (cebadores Tin 11/Tin 4). Si los cebadores específicos para *T. walkeri* y *T. indica* no producen resultados positivos para las muestras de la prueba (pero las muestras de los controles positivos de ADN sí dan resultados positivos), entonces las extracciones de la muestra pertenecen a otra especie de *Tilletia*, por ejemplo *T. horrida*. En caso necesario, las especies presentes en estas muestras podrán identificarse mediante análisis con enzimas de restricción (apartado 4.3.1).

Otra posibilidad es que no se produzca amplificación por ser el ADN de mala calidad. Esto se puede comprobar sometiendo los extractos a una prueba con los cebadores universales (ITS1 e ITS4) descritos en el apartado 4.3.1. Si el ADN que contienen las muestras es de buena calidad y, por consiguiente, las muestras analizadas no son de *T. indica* ni de *T. walkeri* sino de otra especie de *Tilletia*, al revelar los amplicones de la PCR en un gel de agarosa se observará una única banda (de aproximadamente 670 pb). Si tampoco así se produce amplificación, debería extraerse de nuevo el ADN y volver a realizarse la prueba.

³ Ferreira y sus colegas presentaron los números de registro en GenBank AF218058, AF218059 y AF218060. Esta secuencia mitocondrial muestra una homología baja con una secuencia de ADN mitocondrial de *T. indica* con número de registro DQ993184: Los resultados de la búsqueda con el instrumento BLAST muestran una homología de solo el 30 % aproximadamente. El contenido de AT en la composición de base en el ADN mitocondrial es más alto que el contenido de GC, que es generalmente del 30-40 % (Kurtzman, 1985); sin embargo, el contenido de AT de las tres secuencias presentadas a GenBank por Ferreira y sus colegas es del 43.5 %, menor que el contenido de GC (56.55 %). (C) Cuando los cebadores Tin 3/Tin 4 se obtienen de ADN mitocondrial extraído de *T. indica* y purificado no pueden amplificar el ADN mitocondrial para producir el amplicón deseado; por lo tanto, las tres secuencias presentadas son de ADN genómico.

4.3.3 Prueba de PCR con cebadores específicos para la especie y una sonda fluorescente

En esta prueba, diseñada por Frederick *et al.* (2000), se utiliza ADN genómico y se produce un amplicón de 212 pb. Para *T. indica* se utilizan los oligonucleótidos siguientes:

Cebador directo Tin 3 (5'-CAA TGT TGG CGT GGC GC-3')

Cebador inverso Tin 10 (5'-AGCTCCGCTCAAGTTCCTC-3')

Sonda RT: sonda TaqMan® (10 µM) (Applied Biosystems): 5'-(etiqueta FAM)-ATT CCC GGC GGC TTC GTC ACT-(extintor TAMRA)-3'.

Se extrae el ADN del tejido micelial según se describe en el apartado 4.3.2.

En la PCR para esta prueba se utilizan los siguientes componentes (concentración por cada 25 µl de reacción única): TaqMan® Universal Master Mix 1×, 0,4 µM de cebadores Tin3/Tin10 o bien Tin11/Tin10 y 4 µM de la sonda, 12,5 ng de ADN genómico para pruebas específicas tanto para *T. indica* como para *T. walkeri* (obtenidos según se describe en el apartado 4.3.2). En la PCR los parámetros de los ciclos son: 50° C durante 2 min, 95° C durante 10 min y 34 ciclos de 95° C durante 15 s y 60° C durante 1 min.

Se deberían utilizar tubos y tapas de calidad óptica para permitir el seguimiento de la amplificación en tiempo real.

En la prueba para *T. walkeri*, el Tin 3 se sustituye por 1,0 µl del cebador directo Tin 11 (5'-TAA TGT TGG CGT GGC AT-3') (25 µM), que produce un amplicón de 212 pb.

T. indica produce amplificación con los cebadores Tin 3/Tin 10 y *T. walkeri* con los cebadores Tin 11/Tin 10. Si ninguno de los pares de cebadores produce amplificación, pero las muestras de control reaccionan según lo esperado, entonces las extracciones de las muestras pertenecen a otra especie de *Tilletia*, por ejemplo a *T. horrida*. Si en la prueba de detección de *T. indica* el ciclo umbral (Ct) de una muestra es >33, el resultado indica que es negativo para *T. indica* y es muy probable que se trate de otra especie de *Tilletia*. Asimismo, si en la prueba de detección de *T. walkeri* el Ct es >33, el resultado indica que es negativo para *T. walkeri* y que es muy probable que se trate de otra especie de *Tilletia*. En caso necesario, las especies presentes en estas muestras podrán identificarse mediante análisis con enzimas de restricción (apartado 4.3.1).

Si el ADN es de mala calidad, la amplificación no es posible. Esto se puede comprobar sometiendo los extractos a una prueba con los cebadores universales (ITS1 e ITS4) descritos en el apartado 4.3.1. Si el ADN que contiene las muestras es de buena calidad y, por consiguiente, las muestras analizadas no son de *T. indica* ni de *T. walkeri* sino de otra especie de *Tilletia*, al revelar los amplicones de la PCR en un gel de agarosa se observará una única banda (de aproximadamente 670 pb). Si tampoco así se produce amplificación, debería extraerse de nuevo el ADN y volver a realizarse la prueba.

Se determinó que tanto la prueba de *T. indica* como la de *T. walkeri* tienen una sensibilidad analítica de 5 pg de ADN total. Esta concentración produjo niveles detectables de fluorescencia (Frederick *et al.*, 2000). La especificidad de las pruebas para las especies de interés se comprobó con ADN extraído de *T. barclayana*, *Tilletia tritici*, *Tilletia laevis*, *Tilletia controversa* y *Tilletia fusca*. Ninguno de estos aislados generó amplificación en la prueba específica para *T. indica* ni en la prueba para *T. walkeri* (Frederick *et al.*, 2000).

4.3.4 PCR directa en tiempo real de las teliosporas

Esta prueba, diseñada por Tan *et al.* (2009), se basa en la región ITS presente entre las secuencias del ADNr nuclear correspondientes a las subunidades ribosómicas pequeña y grande. Se determinó que las especies de *Tilletia* tienen dos regiones variables (ITS1 e ITS2) separadas por el gen conservado del ARNr 5.8S (Levy *et al.*, 2001; Tan y Murray, 2006). En el protocolo se contempla, en primer lugar, la amplificación del ADN específico de *Tilletia*- y después la identificación de las especies de *Tilletia* mediante PCR en tiempo real y sondas fluorescentes. Este estudio se centró en la región del ITS1 del

ADNr para el diseño de la prueba múltiple: una prueba de PCR con cinco sondas fluorescentes para la identificación en el grano de especies de *Tilletia* estrechamente relacionadas.

Se añade una parte alícuota de la mezcla de reacción al tubo de PCR (del apartado 4.2.3) y el sándwich de vidrio se tritura con la punta de la misma pipeta para liberar el contenido de la espora. Durante la trituración es importante asegurarse de no cortar el tubo de PCR.

4.3.4.1 Amplificación del ADN de *Tilletia* antes de la PCR en tiempo real

La amplificación del ADN específico de *Tilletia* de varias especies de *Tilletia* se realiza con los cebadores MK56 (5'-GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA TT-3') (Tan *et al.*, 1996) y *Tilletia*-R (5'-CAA GAG ATC CGT TGT CAA AAG TTG-3') (Tan y Murray, 2006). Cada PCR se realiza en 20 µl (reacción única) que contienen 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos dATP, dTTP, dCTP y dGTP, 0,5 µM de cada uno de los dos cebadores y 0,5 U de polimerasa de ADN Taq (Invitrogen⁴) en tampón 1× (50 mM de Tris (pH 9,0), 20 mM de NaCl, 1% de Triton X-100 y 0,1% de gelatina).

Los parámetros de los ciclos térmicos son: un ciclo inicial de 95° C durante 3 min; 20 ciclos de 94° C durante 20 s, 63° C durante 30 s y 72° C durante 30 s, reduciéndose la temperatura de hibridación en 1° C por ciclo durante 5 ciclos hasta 59° C; finalmente, una incubación de 10 min a 72° C y 4° C, respectivamente.

Los productos de restricción se podrán almacenar a 4° C. Para su visualización en gel, se toman 10 µl del producto de reacción, se añade un marcador adecuado y se revela en un gel de agarosa al 2%. El tamaño esperado del fragmento es de 260 pb. Sin embargo, este fragmento no será visible si la PCR se realiza en una sola teliospora, ya que no habrá suficiente ADN presente.

4.3.4.2 Prueba de identificación de especies mediante PCR en tiempo real con cinco sondas fluorescentes

Las pruebas de PCR en tiempo real se realizan en el instrumento Rotor-Gene 6000 (Qiagen⁵), en reacciones de 20 µl en tubos de centrifuga de 0.1 ml con las sondas de doble etiqueta y los cebadores oligonucleótidos (Cuadro 3). La mezcla de reacción para la prueba de cinco sondas consta de ImmoBuffer 1× (Bioline⁶), 5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos dATP, dTTP, dCTP y dGTP, 1 U de polimerasa de ADN Immolase™ (Bioline) y 0.2 µM, 0.4 µM y 0.9 µM de cada una de las sondas de doble etiqueta, los cuatro cebadores directos y los cuatro cebadores inversos, respectivamente (Cuadro 3). Como patrón de ADN se utiliza 1 µl del producto de la amplificación mediante PCR del ADN específico de *Tilletia* (apartado 4.3.4.1).

Los parámetros de los ciclos térmicos son: un ciclo inicial de 95° C durante 10 min seguido de 40 ciclos de 94° C durante 15 s y 65° C durante 60 s, con una reducción de la temperatura de hibridación de 1° C por ciclo durante 6 ciclos a 60° C. Se utiliza la opción de normalización "Dynamic

⁴ El uso de productos de la marca Invitrogen en este protocolo de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros que también podrán ser adecuados. Esta información se proporciona para la comodidad de los usuarios de este protocolo y no constituye un aval por parte de la CMF del producto químico, el reactivo o el equipo mencionados. Podrán usarse otros productos equivalentes si se demuestra que permiten obtener los mismos resultados.

⁵ El uso de productos de la marca Qiagen en este protocolo de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros que también podrán ser adecuados. Esta información se proporciona para la comodidad de los usuarios de este protocolo y no constituye un aval por parte de la CMF del producto químico, el reactivo o el equipo mencionados. Podrán usarse otros productos equivalentes si se demuestra que permiten obtener los mismos resultados.

⁶ El uso de productos de la marca Bioline en este protocolo de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros que también podrán ser adecuados. Esta información se proporciona para la comodidad de los usuarios de este protocolo y no constituye un aval por parte de la CMF del producto químico, el reactivo o el equipo mencionados. Podrán usarse otros productos equivalentes si se demuestra que permiten obtener los mismos resultados.

tube” para determinar el nivel de fluorescencia de referencia promedio de cada muestra individual antes de iniciar la amplificación. Se registran los datos de fluorescencia en cinco canales: verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí.

La sensibilidad de la prueba para esporas individuales fue del 10-40 % (es decir, solo el 10-40 % de las esporas con identificación positiva conocida como *T. indica* dieron resultados positivos en la prueba de PCR) (Tan y Wright, 2009). Esta sensibilidad responde a diversas causas, entre ellas el hecho de que todas las esporas y granos carbonosos de *T. indica* tuvieron que ser sometidos a autoclave dos veces, por lo que pudo deteriorarse el material genético. La especificidad de la sonda para *T. indica* se comprobó con una mezcla de ADN de *T. indica*: *T. walkeri* o *T. ehrhartae* o *T. caries*, en proporciones de 1:0,1 pg y 0,1:1 pg (rango de concentración adecuado determinado mediante el análisis de una sola espora). Se analizó la especificidad de los cebadores y se determinó que no reaccionan con otras especies de *Tilletia*.

Deberían generarse curvas estándar para cada una de las pruebas de detección de cada una de las especies, según se describe en Tan *et al.* (2009) utilizando concentraciones conocidas de ADN de *Tilletia* spp. El valor de Ct (valor del ciclo en el que la curva de amplificación cruza la línea de umbral) obtenido se utiliza para establecer el umbral correspondiente a la especie de *Tilletia* objeto de la prueba. Por lo general, un valor de Ct superior al establecido en esta etapa se considera un resultado negativo.

Cuadro 3. Secuencias y modificaciones de los cebadores y sondas usados en la prueba diagnóstica de PCR con cinco sondas fluorescentes para *T. indica* y otras especies relacionadas (*Tilletia* spp.)

Pares de cebadores (secuencia 5'-3')	Sondas (modificaciones 5', 3')	Canal	Objetivo
KB-DL-For (directo): CTTCGGAAGAGTCTCCTT (nt. 67-82a)	ACGGAACGAACGAAGC (nt. 105-120) (6-FAM, BHQ)	Verde	<i>T. indica</i>
KB-DL- Rev (inverso): CCGGACAGGTACTIONTATC (nt. 127-142)	ACCGAAGGAACAAGGC (nt. 67-82b) (JOE, BHQ1)	Amarillo	<i>T. walkeri</i>
Hor-DL-For (directo): GGCCAATCTTCTCTCTATC (nt. 40-59 ^c)	CAACCCAGACTACGGAGGGTGA (nt. 60-81) (CAL Fluor Red 610, BHQ2)	Naranja	<i>T. horrida</i> (algunas cepas no se detectan)
Hor-DL-Rev (inverso): CCGGACAGGATCACTA (nt. 87-102)			
Tri-DL-For (directo): ATTGCCGTACTTCTCTTC (nt. 56-73 ^d)	AGAGGTCGGCTCTAATCCCATCA (nt. 75-97) (Quasar 670, BHQ2)	Rojo	Amplio espectro*
Tri-DL-Rev (inverso): GTAGTCTTGTTGGATAATAG (nt. 99-112)			
Ehr-DL-For (directo): CGCATTCTTATGCTTCTTG (nt. 72-90 ^e)	CAGAGTCATTGGTTCTTCGGAGC (nt. 104-126) (Quasar 705, BHQ2)	Carmesí	<i>T. ehrhartae</i>
Ehr-DL-Rev (inverso): GTTAGGAACCAAAGCCATC (nt. 128-146)			

Notas: Los números de registro de GenBank son aAF398434, bAF310180, cAF310171, dAF398447 y eAY770433. La lista de los materiales de referencia utilizados y sus lugares de origen figura en Tan et al. (2009); los materiales se conservan en el Elizabeth Macarthur Agricultural Institute (EMAI) del Department of Primary Industries de Nueva Gales del Sur (Australia) (véase la sección 6: puntos de contacto). nt. = nucleótido.

* Incluye *T. caries*, *T. laevis*, *T. controversa*, *T. fusca*, *T. bromi*, *T. goloskokovii*.

5. Registros

Véase la NIMF 27 (*Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas*) donde figura una lista de la información que debe registrarse y conservarse.

En el informe sobre el diagnóstico debería incluirse el número de submuestras positivas y el número estimado de teliosporas detectadas en cada submuestra positiva. Si se obtuvieron cultivos para el análisis molecular, deberían describirse la morfología de las colonias, especialmente su pigmentación y su tasa de crecimiento en condiciones definidas. Los cultivos deberían conservarse (los micelios obtenidos de caldos de cultivo o los tapones de micelio de placas de agar se pueden almacenar congelados a -80°C).

6. Puntos de contacto para información adicional

Puede obtenerse información adicional sobre este organismo en las siguientes fuentes:

Department of Agriculture and Food, Government of Western Australia, South Perth, WA 6151, Australia (Sra. Dominie Wright; dirección electrónica: dominie.wright@agric.wa.gov.au; tel: +61 8 9368 3875; Fax: + 61 8 474 2658).

Elizabeth Macarthur Agricultural Institute (EMAI), New South Wales Department of Primary Industries, Camden, NSW 2570, Australia (Dra. Mui-Keng; dirección electrónica: mui-keng.tan@dpi.nsw.gov.au).

Laboratory of Plant Inspection and Quarantine, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen, 518045 Guangdong Province, China (Dr Guiming Zhang; dirección electrónica: zgm2001cn@yahoo.com.cn; tel: +86 755 8211 1148; Fax: +86 755 2558 8630).

United States Department of Agriculture (USDA) Agricultural Research Service (ARS), North Atlantic Area (NAA), Fort Detrick, MD 21702, Estados Unidos de América (Sr. Gary Peterson; dirección electrónica: gary.peterson@ars.usda.gov).

USDA Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), Riverdale, MD, Estados Unidos de América (Dra. Mary E. Palm; dirección electrónica: Mary.E.Palm@aphis.usda.gov)

USDA APHIS, Beltsville, MD, Estados Unidos de América (Dr. John McKemy; dirección electrónica: John.McKemy@aphis.usda.gov)

Food and Environment Research Agency, York YO41 1LZ, Reino Unido (Dr. Kelvin Hughes; dirección electrónica: Kelvin.Hughes@fera.gsi.gov.uk).

Podrán presentar una solicitud de revisión de un protocolo de diagnóstico las organizaciones nacionales de protección fitosanitaria (ONPF), las organizaciones regionales de protección fitosanitaria (ORPF) o los órganos auxiliares de la Comisión de Medidas Fitosanitarias (CMF) por conducto de la Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (ippc@fao.org), que a su vez remitirá la solicitud al Grupo técnico sobre protocolos de diagnóstico (GTPD).

7. Agradecimientos

La versión original del presente protocolo fue redactada por A.J. Inman, K.J.D. Hughes y R.J. Bowyer, de la Agencia de investigación alimentaria y ambiental (Food and Environment Agency), en York (Reino Unido) en 2003. Ese protocolo se sometió a una prueba interlaboratorios en laboratorios europeos⁷ (Riccioni *et al.*, 2002) y ha servido de base para el protocolo de la EPPO PM 7/29(2)

⁷ A. Radova, State Phytosanitary Administration, Olomouc (República Checa); I. Vloutoglou, Benaki Phytopathological Institute, Atenas (Grecia); A. Porta-Puglia, Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Roma (Italia); C. Montuschi, Servizio Fitosanitario Regionale, Bolonia (Italia); I. van Brouwershaven, NPPO, Wageningen (Países Bajos); M. de Jesus Gomes, E. Diogo y M.R. Malheiros, Direção-Geral de Protecção das

(EPPO, 2007). El protocolo ha sido mejorado por: D.G. Wright, del Departamento de agricultura y alimentación (Department of Agriculture and Food) del Gobierno de Australia Occidental, en Perth (Australia); K.J.D. Hughes, Food and Environment Agency, York (Reino Unido), y G. Zhang, del Laboratorio de inspección y cuarentena vegetal de Shenzhen (China). El protocolo fue revisado por V. Cockerell, de Science and Advice for Scottish, Edimburgo (Reino Unido).

8. Referencias

- Agarwal, V.K. y Mathur, S.B.** 1992. Detection of karnal bunt in wheat seed samples treated with fungicides. *Boletín Fitosanitario de la FAO*, 40: 148–153.
- Aggarwal, R., Joshi, L.M. y Singh, D.V.** 1990. Morphological differences between teliospores of *Neovossia indica* and *N. horrida*. *Indian Phytopathology*, 43: 439–442.
- Bonde, M.R., Nester, S.E., Khayat, A., Smilanick, J.L., Frederick, R.D. y Schaad, N.W.** 1999. Comparison of effects of acidic electrolyzed water and NaOCl on *Tilletia indica* teliospore germination. *Plant Disease*, 83: 627–632.
- Carris, L.M., Castlebury, L.A. y Goates, B.J.** 2006. Nonsystemic bunt fungi – *Tilletia indica* and *T. horrida*: A review of history, systematics, and biology. *Annual Review of Phytopathology*, 44: 113–133.
- Castlebury, L.A.** 1998. Morphological characterisation of *Tilletia indica* and similar fungi. En: V.S. Malik y D.E. Mathre, eds. *Bunts and smuts of wheat: An international symposium*, págs. 97–105. Ottawa, Organización Norteamericana de Protección a las Plantas (NAPPO). 445 + xv págs.
- Castlebury, L.A. y Carris, L.M.** 1999. *Tilletia walkeri*, a new species on *Lolium multiflorum* and *L. perenne*. *Mycologia*, 91: 121–131.
- CMI (Commonwealth Mycological Institute).** 1965. *Tilletia barclayana*. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 75. Wallingford (Reino Unido), CAB International.
- CMI (Commonwealth Mycological Institute).** 1985. *Tilletia indica*. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 748. Wallingford (Reino Unido), CAB International.
- Crous, P.W., Jaarsveld, A.B. van, Castlebury, L.A., Carris, L.M., Frederick, R.D. y Pretorius, Z.A.** 2001. Karnal bunt of wheat newly reported from the African continent. *Plant Disease*, 85: 561.
- Cunfer, B.M. y Castlebury, L.A.** 1999. *Tilletia walkeri* on annual ryegrass in wheat fields in the southeastern United States. *Plant Disease*, 83: 685–689.
- Durán, R.** 1987. *Ustilagoes of Mexico: Taxonomy, symptomatology, spore germination, and basidial cytology*. Seattle, Washington State University (Estados Unidos). 331 + xvi págs.
- Durán, R. y Fischer, G.W.** 1961. *The genus Tilletia*. Seattle, WA, Washington State University (Estados Unidos). 138 págs.
- EPPO (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas).** 2007. Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas PM 7/29(2). *Tilletia indica*. *OEPP/EPPO Bulletin*, 37: 503–520.
- Frederick, R.D., Snyder, K.E., Tooley, P.W., Berthier-Schaad, Y., Peterson, G.L., Bonde, M.R., Schaad, N.W. y Knorr, D.A.** 2000. Identification and differentiation of *Tilletia indica* and *T. walkeri* using the polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 90: 951–960.
- Fuentes-Dávila, G.** 1996. Karnal bunt. En: R.D. Wilcoxson y E.E. Saari, eds. *Bunt and smut diseases of wheat: Concepts and methods of disease management*, págs. 26–32. México, DF, Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). 74 págs.
- Inman, A.J., Hughes, K.J.D. y Bowyer, R.** 2003. Protocol for extracting teliospores from untreated seed or grain by size-selective sieving. En: *EU recommended protocol for the diagnosis of a quarantine organism: Tilletia indica*, págs. 21–26. Department for Environment, Food and

Culturas, Lisboa (Portugal); V. Cockerell, Science and Advice for Scottish Agriculture, Edimburgo (Reino Unido); A. Barnes, Food and Environment Research Agency (FERA), York (Reino Unido).

- Rural Affairs (Reino Unido), DIAGPRO (EU Project on Diagnostic Protocols). 38 págs. 38 págs. Disponible en <http://www.fera.defra.gov.uk/plants/planthealth/pestsdiseases/documents/protocols/tipro.pdf> (consultado el 3 de octubre de 2010).
- Khanna, A. y Payak, M.M.** 1968. Teliospore morphology of some smut fungi. II. Light microscopy. *Mycologia*, 60: 655–662.
- Kurtzman, C.P.** 1985. Molecular taxonomy of the fungi. págs. 35–63. *En*: W. Bennett y L.L. Lasure, eds. *Gene manipulations in fungi*. Orlando, FL, Academic Press, Inc. 558 págs.
- Laroche, A., Gaudet, D.A., Despins, T., Lee, A. y Kristjansson, G.** 1998. Distinction between strains of Karnal bunt and grass bunt using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *En*: V.S. Malik y D.E. Mathre, eds. *Bunts and smuts of wheat: An international symposium*, pág. 127. Ottawa, Organización Norteamericana de Protección a las Plantas (NAPPO). 445 + xv págs.
- Levy, L., Castlebury, L.A., Carris, L.M., Meyer, R.J., Pimentel, G.** 2001. Internal transcribed spacer sequence-based phylogeny and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism differentiation of *Tilletia walkeri* and *T. indica*. *Phytopathology*, 91: 935–940.
- Mathur, S.B. y Cunfer, B.M.** 1993. Karnal bunt. *En*: S.B. Mathur y B.M. Cunfer, eds. *Seed-borne diseases and seed health testing of wheat*, págs. 31–43. Frederiksberg (Dinamarca), Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries. 168 págs.
- Milbrath, G.M., Pakdel, R. y Hilburn, D.** 1998. Karnal bunt spores in ryegrass (*Lolium* spp.). *En*: V.S. Malik y D.E. Mathre, eds. *Bunts and smuts of wheat: An international symposium*, págs. 113–116. Ottawa, Organización Norteamericana de Protección a las Plantas (NAPPO). 445 + xv págs.
- Pascoe, I.G., Priest, M.J., Shivas, R.G., Cunningham, J.H.** 2005. Ustilospores of *Tilletia ehrhartae*, a smut of *Ehrharta calycina*, are common contaminants of Australian wheat grain, and a potential source of confusion with *Tilletia indica*, the cause of Karnal bunt of wheat. *Plant Pathology*, 54: 161–168.
- Peterson, G.L., Bonde, M.R. y Phillip, J.C.** 2000. Size-selective sieving for detecting teliospores of *Tilletia indica* in wheat seed samples. *Plant Disease*, 84: 999–1007.
- Pimentel, G., Carris, L.M., Levy, L. y Meyer, R.** 1998. Genetic variability among isolates of *Tilletia barclayana*, *T. indica* and allied species. *Mycologia*, 90: 1017–1027.
- Riccioni, L., Valvassori, M., Inman, A.J., Hughes, K.J., Bowyer, R.J., Barnes, A.V., Montuschi, C.** 2002. International validation of a diagnosis protocol for *Tilletia indica* [*Triticum* - *Secale* - × *Triticosecale*]. Comunicación interna. Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Roma (Italia).
- Sansford, C.E., Baker, R.H.A., Brennan, J.P., Ewert, F., Gioli, B., Inman, A.J., Kinsella, A., Magnus, H., Miglietta, F., Murray, G.M., Porta-Puglia, A., Porter, J.R., Rafoss, T., Riccioni, L. y Thorne, F.** 2008. The new pest risk analysis for *Tilletia indica*, the cause of Karnal bunt of wheat, continues to support the quarantine status of the pathogen in Europe. *Plant Pathology*, 57: 603–611.
- Smith, O.P., Peterson, G.L., Beck, R.J., Schaad, N.W. y Bonde, M.R.** 1996. Development of a PCR-based method for identification of *Tilletia indica*, causal agent of Karnal bunt of wheat. *Phytopathology*, 86: 115–122.
- Tan, M.-K. y Murray, G.M.** 2006. A molecular protocol using quenched FRET probes for the quarantine surveillance of *Tilletia indica*, the causal agent of Karnal bunt of wheat. *Mycological Research*, 110: 203–210.
- Tan, M.-K., Timmer, L.W., Broadbent, P., Priest, M. y Cain, P.** 1996. Differentiation by Molecular Analysis of *Elsinoe* spp. Causing Scab Diseases of Citrus and Its Epidemiological Implications. *Phytopathology* 86:1039–1044.

- Tan, M.-K. y Wright, D.G.** 2009. *Enhancing the detection of Tilletia indica, the cause of Karnal bunt. Final report.* CRC20004: Karnal bunt detection. Canberra (Australia), CRC National Plant Biosecurity. 63 págs.
- Tan, M.-K., Ghalayini, A., Sharma, I., Yi J., Shivas, R., Priest, M. y Wright, D.** 2009. A one-tube fluorescent assay for the quarantine detection and identification of *Tilletia indica* and other grass bunts in wheat. *Australasian Plant Pathology*, 38: 101–109.
- USDA (United States Department of Agriculture).** 2007. *Karnal bunt manual.* Frederick, MD, USDA. 160 págs. Disponible en http://www.aphis.usda.gov/import_export/plants/manuals/online_manuals.shtml (consultado en febrero de 2012).
- White ,T.J., Bruns, T., Lee S. y Taylor, J.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *En:* M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky y T.J. White, eds. *PCR protocol: A guide to methods and applications*, págs. 315–322. Londres, Academic Press. 482 págs.
- Wiese, M.V., ed.** 1987. *Compendium of wheat diseases*, 2nd ed. Saint Paul, MN, APS Press. 112 págs.
- Wright, D., Murray, G. y Tan, M.-K.** 2003. National diagnostic protocol for the identification of *Tilletia indica*, the cause of Karnal bunt. Perth (Australia), Department of Agriculture and Food, Government of Western Australia.

REVOCADO

9. Figuras



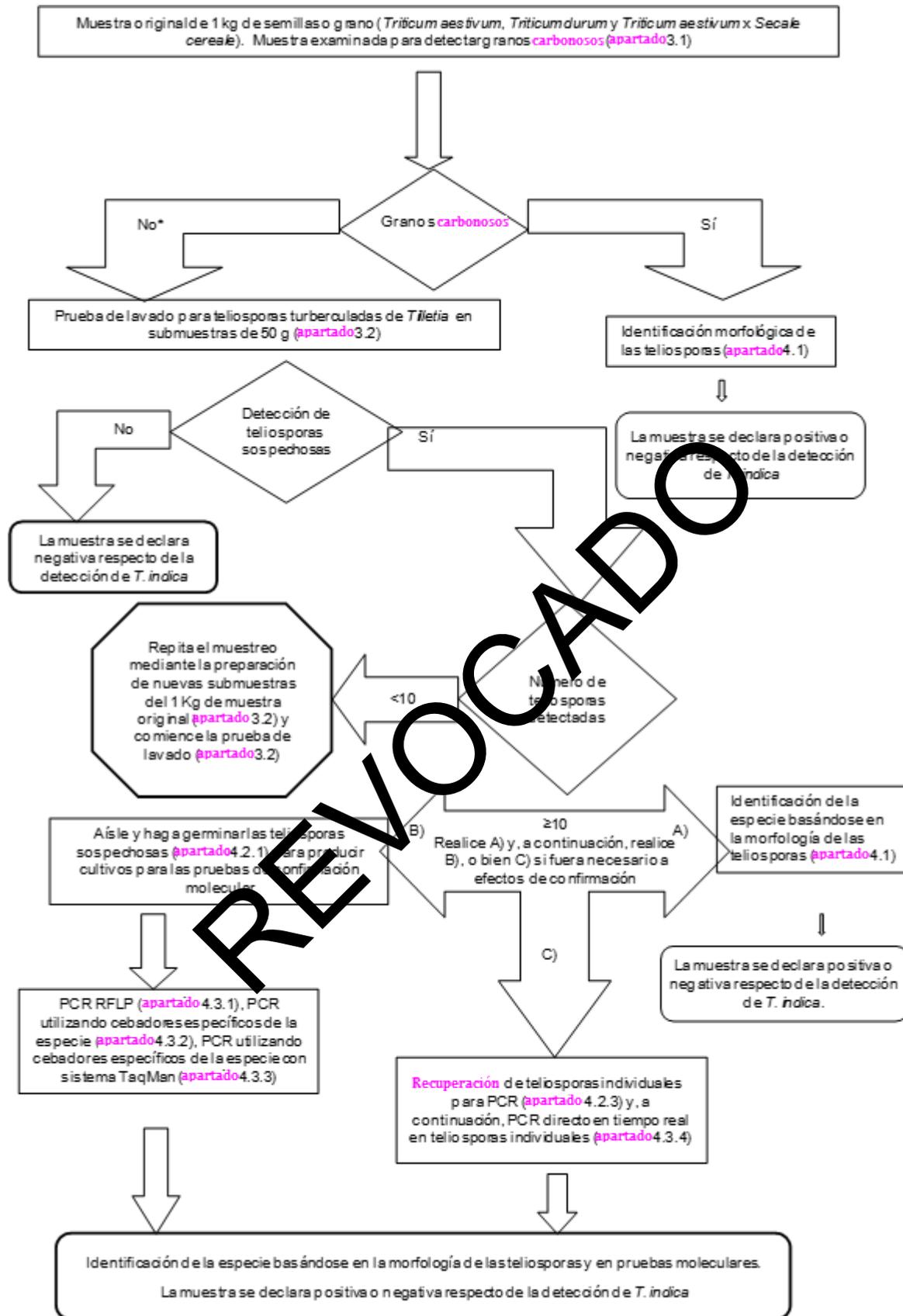
Figura 1. Espiga de trigo infectada con síntomas de carbón de Karnal.

Fotografía por gentileza del Departamento de agricultura y alimentación del Gobierno de Australia Occidental.



Figura 2. Granos de trigo infectados, con síntomas de carbón de Karnal.

Fotografía por gentileza del Departamento de agricultura y alimentación del Gobierno de Australia Occidental.



* En ausencia de granos carbonosos, se puede considerar que no hay presencia de T. indica.

Figura 3. Diagrama de flujo del procedimiento para la detección e identificación de Tilletia indica en muestras de semillas y grano.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa; RFLP: polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción.

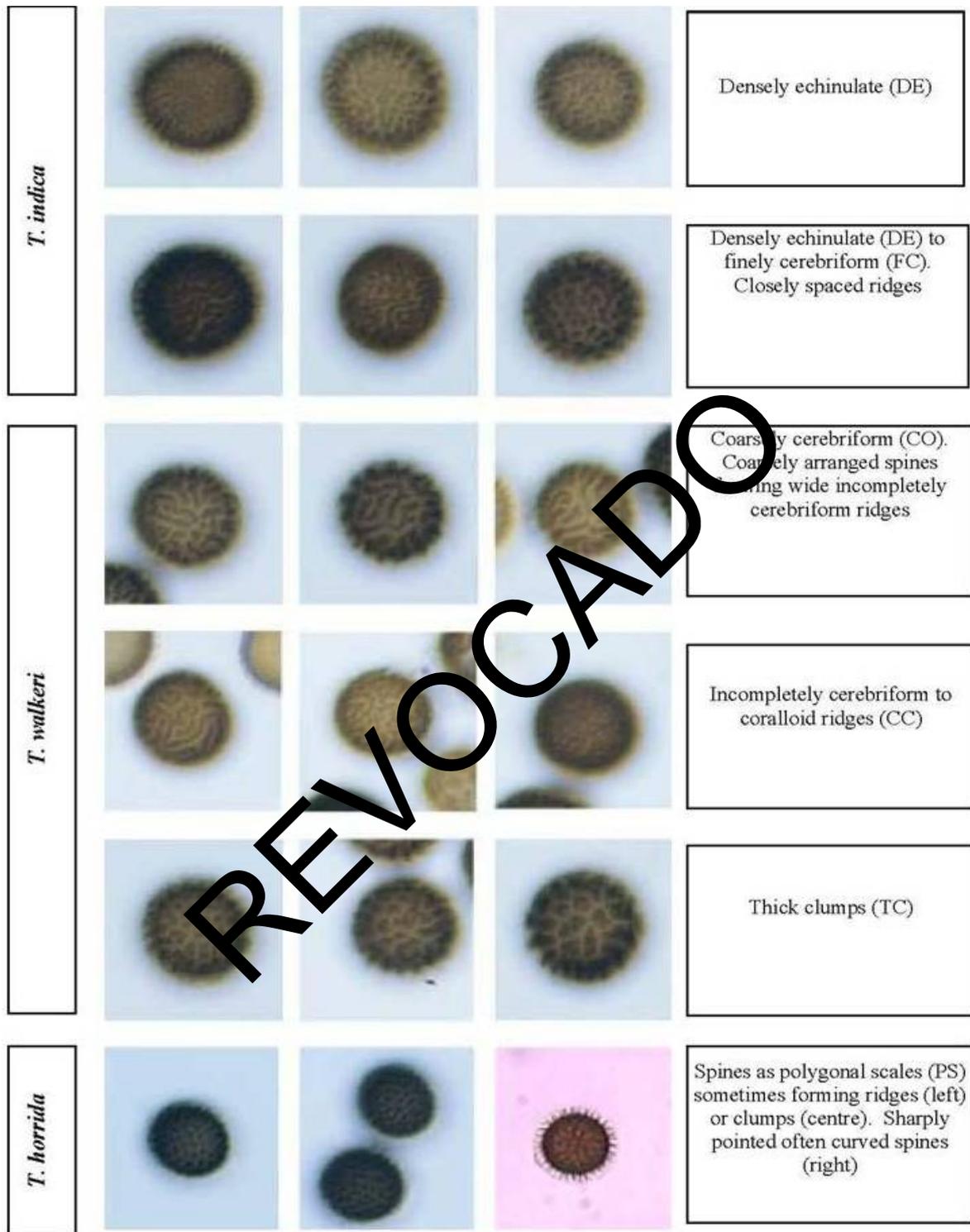


Figura 4. Clave gráfica de la ornamentación de teliosporas de *Tilletia*, para uso junto con el Cuadro 2 (apartado 4.1).

Fotografías por gentileza de A. Inman, Central Science Laboratory, York (Reino Unido).

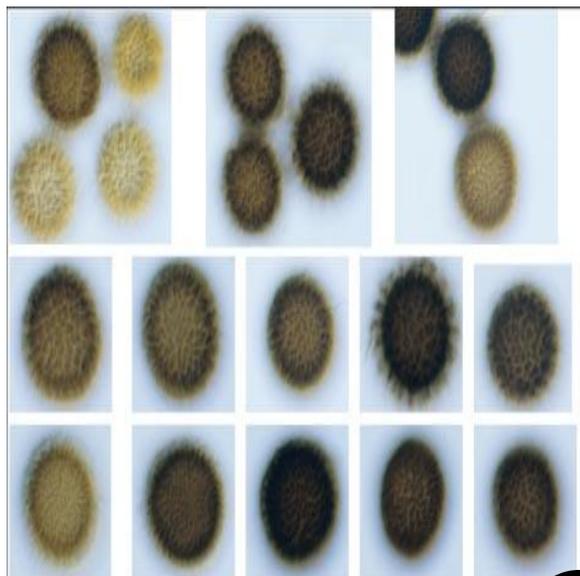


Figura 5. Patrones de ornamentación superficial de teliosporas de *Tilletia indica*. Espinas densamente dispuestas, ya sea individualmente (densamente equinuladas) o en crestas estrechas y próximas entre sí (fina trama cerebriforme). Escala: 10 mm = 17 μ m.

Fotografías por gentileza de A. Inman, Central Science Laboratory, York (Reino Unido).

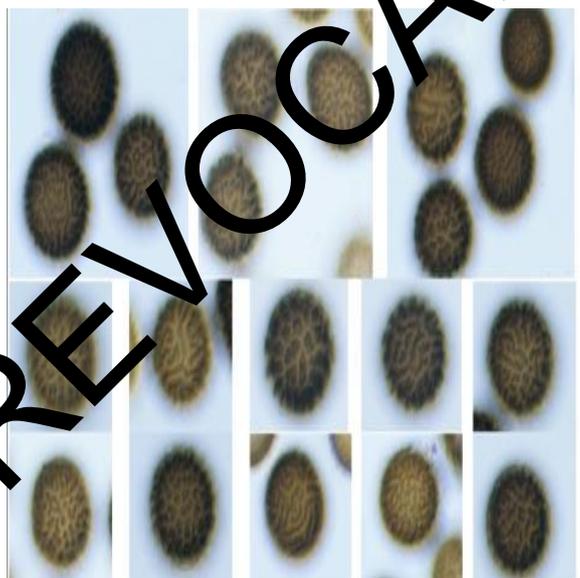


Figura 6. Patrones de ornamentación superficial de teliosporas de *Tilletia walkeri*. Espinas dispuestas en baja densidad y formando crestas anchas, en una trama entre cerebriforme incompleta y coraloide o en grumos gruesos. Escala: 10 mm = 17 μ m.

Fotografías por gentileza de A. Inman, Central Science Laboratory, York (Reino Unido).



Figura 7. Patrones de ornamentación superficial de teliosporas de *Tilletia horrida*. Las espinas están dispuestas en escamas poligonales o, en ocasiones, en crestas cerebriformes. Escala: 10 μ m = 17 μ m.

Fotografías por gentileza de A. Inman, Central Science Laboratory, York (Reino Unido).

REVOCADO

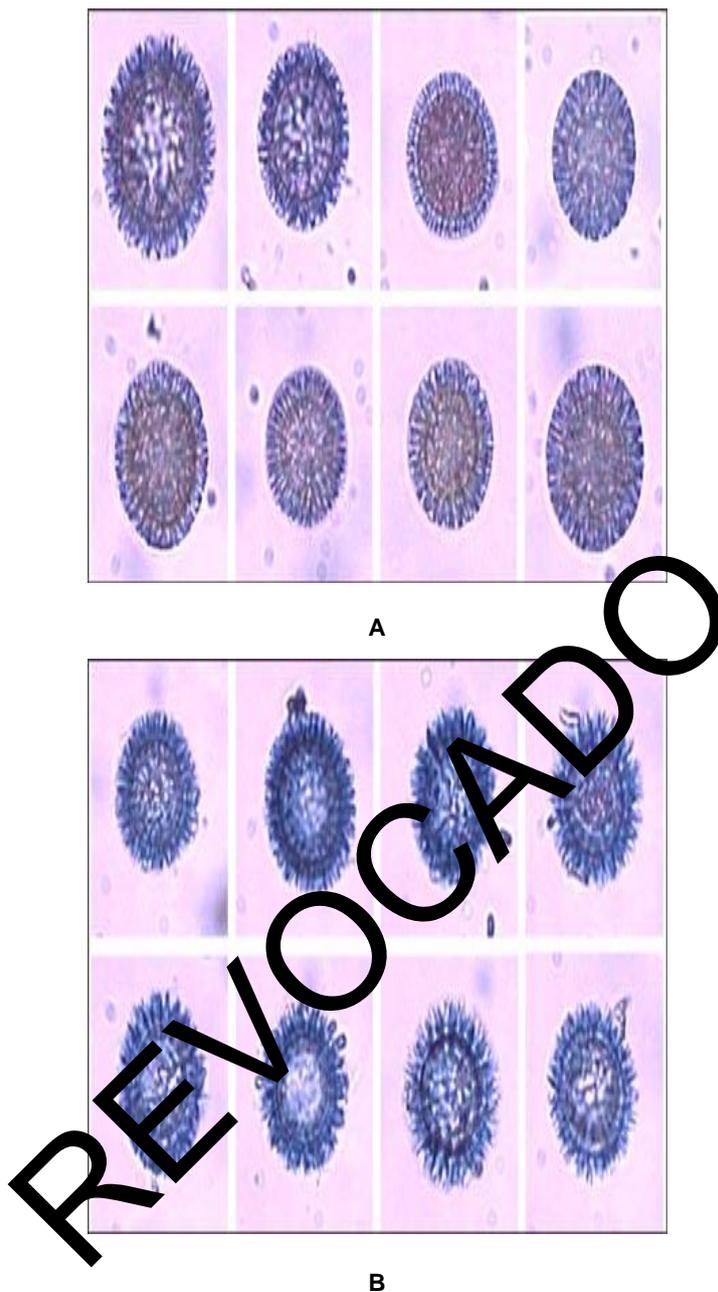


Figura 8. Perfiles en vista mediana de teliosporas de *Tilletia indica* (A) y *Tilletia walkeri* (B) después del tratamiento con lejía y tinción con azul tripano en lactoglicerol. Véase como el contorno de las teliosporas de *T. indica* es más suave que el de las teliosporas de *T. walkeri*, que presenta mayor irregularidad y huecos más evidentes entre las espinas.

Fotografías por gentileza de A. Inman, Central Science Laboratory, York (Reino Unido).

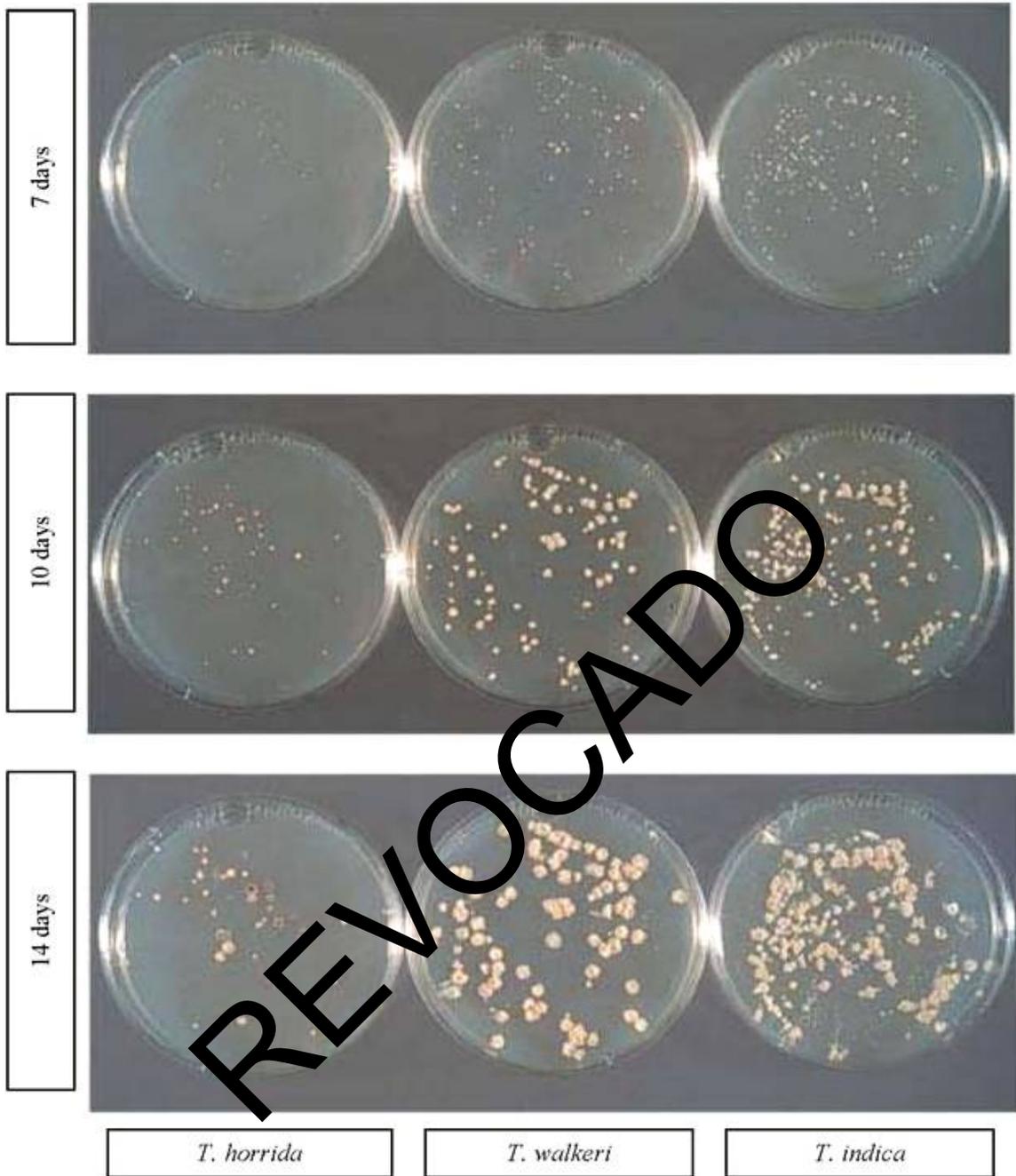


Figura 9. Colonias de *Tilletia indica* (derecha), *Tilletia walkeri* (centro) y *Tilletia horrida* (izquierda), a los 7 días (arriba), 10 días (centro) y 14 días (abajo) de cultivo sobre agar papa dextrosa (APD) a 19° C y ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Obsérvese que las colonias de *T. horrida* presentan un menor crecimiento y pigmentación púrpura a los 14 días.

Fotografías por gentileza de A. Inman, Central Science Laboratory, York (Reino Unido).

REVOCADO

Historia de la publicación

Esta no es una parte oficial de la norma

2006-03 La CMF-1 añadió *Tilletia indica* / *T. controversa* (2004-014) dentro del tema: Hongos y organismos similares a los hongos

2012-11 El CN aprobó el proyecto para consulta de los miembros (foro de decisión electrónica)

2012-07 Presentado para consulta a los miembros

2013-05 Aprobación del CN para adopción mediante decisión electrónica (devuelto al GRPD)

2013-06 Revisado por el GTPD

2013-10 Remitido al CN para que apruebe su adopción mediante decisión electrónica

2013-10 El CN aprobó el proyecto mediante decisión electrónica para el período de notificación de 45 días

2013-12 Período de notificación de 45 días

2014-01 El CN adoptó el PD en nombre de la CMF

2014-08 Corrección de aspectos menores sobre la sección 6 por la Secretaría

NIMF 27. Anexo 4 *Tilletia indica* Mitri (2014)

2015-03 La CMF-10 ha tomado nota de los cambios editoriales efectuados en español por el grupo de examen de los idiomas

Última actualización de la historia de la publicación: 2015-04