

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA

Área de Diagnóstico Fitosanitario Laboratorio de Micología

Protocolo de Diagnóstico:

Tilletia indica Mitra
(Carbón parcial del trigo)

Tecámac, Estado de México, Octubre 2018

SENASICA nos protege a todos

SAGARPA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA,
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,
PESCA Y ALIMENTACIÓN



SENASICA
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD
AGROALIMENTARIA

Aviso

El presente protocolo de diagnóstico fitosanitario fue desarrollado en las instalaciones de la Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), con el objetivo de diagnosticar específicamente la presencia o ausencia del hongo *Tilletia indica* Mitra. La metodología descrita, tiene un sustento científico que respalda los resultados obtenidos al aplicarlo. La incorrecta implementación o variaciones en la metodología especificada en este documento de referencia pueden derivar en resultados no esperados, por lo que es responsabilidad del usuario seguir y aplicar el protocolo de forma correcta.

La presente versión podrá ser mejorada y/o actualizada quedando el registro en el historial de cambios.

I. ÍNDICE

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO	1
2. INTRODUCCIÓN	1
2.1 Información sobre la plaga.....	1
2.2 Información taxonómica	2
2.3 Flujo de trabajo	3
3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN	4
3.1 Observación directa	4
3.1.1 Interpretación de resultados	5
3.2. Hidrólisis del endospermo	5
3.2.1 Interpretación de resultados	6
3.3 Técnica de lavado tamizado	6
3.3.1 Interpretación de los resultados	7
3.4 Filtración y Centrifugado	8
3.4.1. Interpretación de los resultados	8
3.5 Descripción morfológica.....	9
3.5.1 Descripción de las teliosporas de <i>Tilletia indica</i>	9
3.6 Identificación de la plaga	9
4. REGISTROS.....	9
5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL	10
6. RECONOCIMIENTO	10
7. REFERENCIAS	10
8. ANEXOS	13
8.1 Ciclo de vida	13
8.2 Síntomas de punta negra	14
8.3 Caracterización de granos infectados.....	15
8.4 Morfología de teliosporas de <i>Tilletia indica</i>	16
8.5 Hidrolisis del endospermo en trigo	16
8.6 Características morfológicas de las especies de <i>Tilletia</i>	17
8.7 Patrones de ornamentación superficial de teliosporas de <i>Tilletia</i> sp.....	18
8.8 Elaboración de montajes	20
8.8.1. Preparaciones temporales con cubreobjetos.....	20
8.8.2. Preparaciones permanentes	21

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Tilletia indica</i> agente causal del Carbón Parcial del Trigo..	13
Figura 2. Síntomas de “Punta negra” en granos de trigo.....	14
Figura 3. Síntomas de Carbón parcial en granos de trigo.	15
Figura 4. Morfología de teliosporas maduras y células estériles de <i>T. indica</i>	16
Figura 5. Observación de teliosporas por hidrólisis del endospermo.....	16
Figura 6 . Patrones de ornamentación superficial de teliosporas de <i>Tilletia indica</i>	18
Figura 7. Patrones de ornamentación superficial de teliosporas de <i>Tilletia horrida</i>	19

Figura 8. Patrones de ornamentación superficial de teliosporas de *Tilletia walkeri*..... 20

III. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características morfológicas de *Tilletia indica*, *T. walkeri*, *T. horrida* y *T. ehrhartae* 17

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO

Describir la metodología para la identificación de *Tilletia indica* Mitra mediante caracterización morfológica.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Información sobre la plaga

El carbón parcial del trigo causado por *Tilletia indica* Mitra, fue descubierto en 1930 en Karnal, India. Actualmente, se encuentra distribuido en Pakistán, Irán, Iraq, Nepal, Afganistán y Sudáfrica. En México está presente en áreas localizadas de los estados de Sonora, Sinaloa y Baja California (Bonde et al., 1997; CABI, 2018).

Su dispersión se ha logrado principalmente por el movimiento de granos y semillas de trigo (que en adelante se denominarán como granos) y otros hospedantes para investigación; además de ser transportados por el viento, vehículos y trilladoras a campos adyacentes de otras regiones o estados.

Tilletia indica infecta a trigo (*Triticum aestivum* y *T. durum*) y triticale (*T. aestivum*, *Secale cereale*) (USDA, 2007; Sansford et al., 2008). Así como *Triticum shareonensis*, *T. variabilis*, *T. ovatum* y *T. scerit* (Aujla et al., 1985); y mediante inoculación ha infectado a especies de gramíneas (Royer y Rytter, 1988).

Este patógeno causa una reducción en el número de espiguillas y en la longitud de las espigas, donde se muestran granos carbonosos (infectados) distribuidos irregularmente, los cuales pueden estar dañados total o parcialmente (Mitra, 1931), reduciendo el peso y porcentaje de germinación de los granos (Munjal y Chatrath, 1976; Bedi y Meeta, 1981).

La infección empieza en el extremo del grano cerca del embrión y se expande a lo largo de la sutura (Mitra, 1931), las teliosporas son formadas bajo el pericarpio y la testa, por arriba de la capa de aleurona del endospermo, destrozando el endospermo junto con el escutelo, quedando solo el pericarpio y la capa de aleurona, pero sin afectar el embrión (Joshi et al., 1980).

Durante la trilla en la cosecha, los granos con teliosporas caen al suelo (Bedi, Sikka y Mundkur, 1949). Las teliosporas (diploides) germinan en la superficie del suelo y producen esporidios haploides primarios (basidiosporas), los cuales se diseminan por salpicadura a la superficie de la hoja y germinan después de producir promicelios, que a su vez producen esporidios secundarios que se dispersan por acción del aire o salpicadura. El patógeno se mueve hasta la

espiga donde germina y penetra las glumas a través de los estomas; y produce teliosporas que regresan al suelo (Anexo 8.1) (Bonde et al., 1997).

En México ha causado pérdidas económicas considerables en la región de los valles del Yaqui y Mayo en el Estado de Sonora, al no poder exportar el producto (NOM- 001-FITO-2000); ya que la masa de teliosporas reduce la calidad de la harina, debido a la producción de trimetilamina que causa un olor fétido como de pescado en descomposición. Del 1 a 4% de granos infectados puede ser suficiente para que el grano de trigo sea inaceptable para el consumo humano (CIPF, 2016).

2.2 Información taxonómica

Nombre: *Tilletia indica* Mitra, 1931

Sinónimo: *Neovossia indica* (Mitra) Mundkur, 1941

Nombres comunes: Carbón parcial del trigo (español)
Karnal bunt (inglés)

Posición taxonómica:

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Subphylum: Ustilaginomycotina

Clase: Exobasidiomycetes

Subclase: Exobasidiomycetidae

Orden: Tilletiales

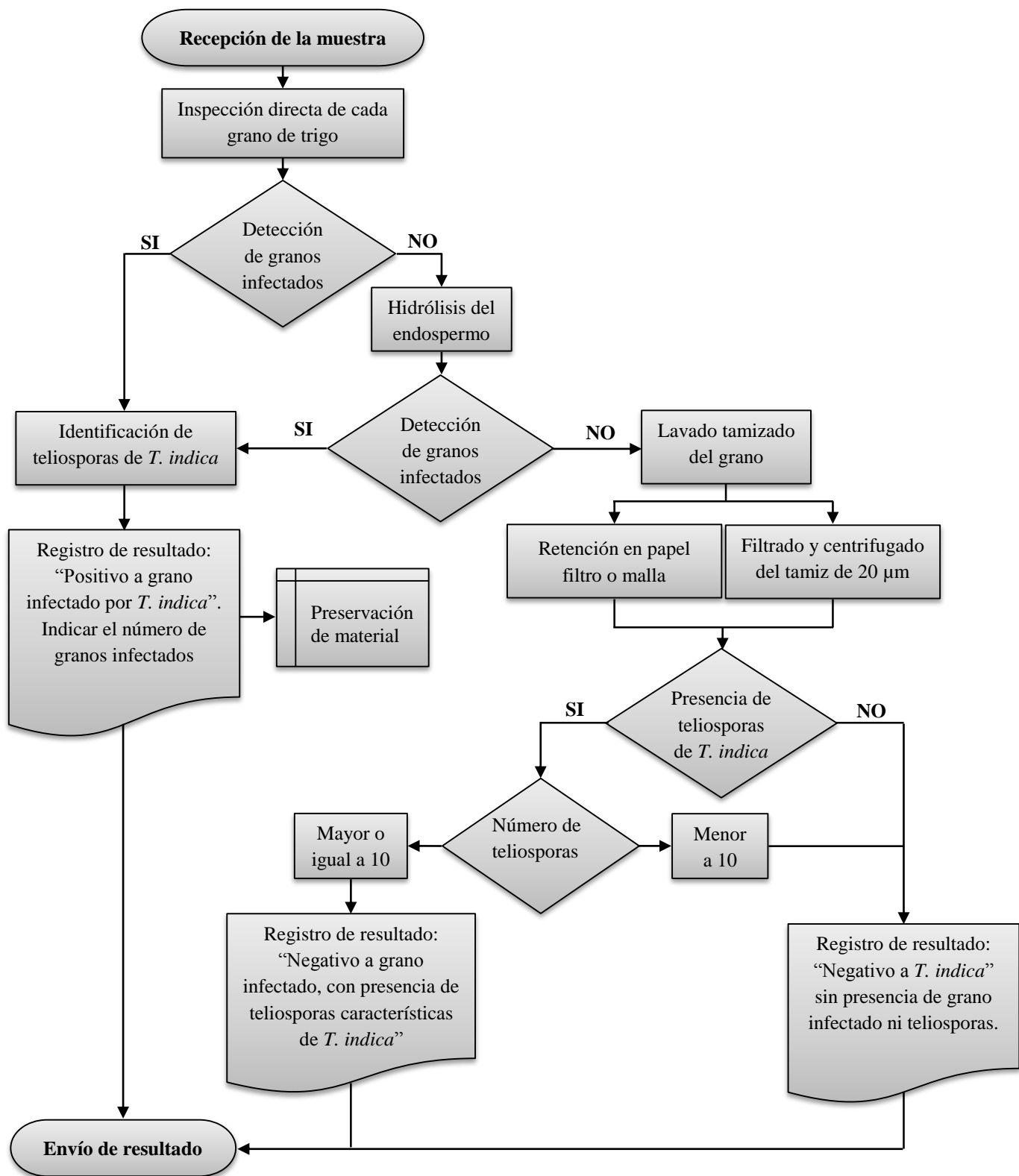
Familia: Tilletiaceae

Género: *Tilletia*

Especie: *Tilletia indica*

(Robert et al., 2005)

2.3. Flujo de trabajo



3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

El presente protocolo se basa en la Norma Oficial Mexicana NOM-001-FITO-2000, en la que se establece la campaña contra el carbón parcial del trigo, misma que define el diagnóstico positivo al reporte del análisis del grano o semilla que indique que se encontró infección.

Sin embargo, se debe señalar la presencia de teliosporas, ya que pueden representar un riesgo de diseminación de la enfermedad durante la movilización de granos entre zonas con distinto estatus fitosanitario y para exportación; además de su detección permite localizar los posibles puntos de contaminación de teliosporas durante el procesamiento del material.

Para la detección de granos infectados por *Tilletia indica* se requiere de una muestra de 1 kg; sin embargo, se pueden manejar muestras de menor tamaño, siempre y cuando sean representativas al sitio del muestro, al método de muestreo y al destino del producto.

Se examina visualmente el total de la muestra para localizar granos infectados (Sección 3.1); en caso de no encontrar granos infectados, se realiza la prueba de hidrólisis de endospermo para visualizar teliosporas ocultas debajo de la cubierta del grano (Sección 3.2); posteriormente, si estas estructuras no son observadas, se procede a utilizar la técnica de lavado y tamizado para obtener teliosporas (Sección 3.3), con diez o más teliosporas se realiza la identificación morfométrica de *T. indica* (CIPF, 2016).

3.1 Observación directa

La observación directa se realiza para detectar granos infectados con teliosporas de *Tilletia indica*; dado que se pueden confundir con síntomas de “Punta negra”, causados por *Alternaria* spp. o *Helminthosporium* spp., es necesario tener cuidado; la sintomatología del carbón parcial del trigo se caracteriza por la presencia de manchas oscuras de color café a negro en la base del grano (Anexo 8.2) (Agarwal y Mathur, 1992; Mathur y Cunfer, 1993).

La técnica consiste en:

- 1) Observar el total de los granos que comprenden la muestra, seleccionar granos (Anexo 8.3) con síntomas “granos sospechosos” y observarlos con un microscopio estereoscopio para discriminar los granos con síntomas de Punta negra.
- 2) A partir de granos carbonosos observar la presencia de teliosporas.
- 3) Tomar con un alfiler entomológico las teliosporas de los granos y realizar el montaje en portaobjetos (Anexo 8.8) con medio de montaje.

- 4) Observar el montaje en un microscopio compuesto y comparar la morfología de las teliosporas para determinar la especie (Sección 3.4).

3.1.1 Interpretación de resultados

En caso de encontrar granos infectados por teliosporas que corresponden a la morfología de *Tilletia indica*, el resultado del diagnóstico se considera positivo, señalando:

- “Positivo a grano infectado por *Tilletia indica*” debe indicarse el número de granos infectados.

Si no se encuentran granos infectados, continuar con la técnica de hidrólisis del endospermo.

3.2. Hidrólisis del endospermo

De acuerdo con Agarwal y Verma (1983), esta técnica permite detectar infecciones en granos asintomáticos, los granos permanecen en una solución de hidróxido de sodio (NaOH), con el fin de aclarar el endospermo y visualizar las teliosporas que se encuentran presentes (Kashyap y Kaur, 2011). Es útil especialmente para analizar los lotes de semillas sometidos a tratamientos químicos con colorantes que ocultan los síntomas (Agarwal y Mathur, 1992; Mathur y Cunfer, 1993).

La técnica consiste en:

- 1) Sumergir de 50 a 100 g de granos en una solución de NaOH. La CIPF, 2016 señala una concentración de 0.2% durante 24 horas a 20 °C; sin embargo, se ha observado que aumentando la concentración al 2% durante 2 horas a 20 °C, se pueden observar las teliosporas debajo de la epidermis.
- 2) Posteriormente, decantar el líquido y lavar las semillas o granos con agua destilada (Kashyap, et al., 2011).
- 3) Observar los granos en un microscopio estereoscópico para detectar la presencia de teliosporas debajo de la cubierta del grano (Anexo 8.5).
- 4) Realizar el montaje de las teliosporas en portaobjetos (Anexo 8.8) y observar con un microscopio compuesto.
- 5) Medir 10 teliosporas para realizar la identificación morfológica y determinar la especie (Cuadro 1).

3.2.1 Interpretación de resultados

En caso de detectar teliosporas dentro del grano o semillas, cuya morfometría corresponda a *Tilletia indica*, el resultado se determina positivo. Señalando:

- “Positivo a grano infectado por *Tilletia indica*” indicando el número de granos infectados.

En caso de ser negativa, proceder a la técnica de lavado y tamizado para la obtención de teliosporas.

3.3 Técnica de lavado tamizado

El lavado tamizado permite detectar teliosporas de *T. indica* donde no se encontraron granos infectados. Esta técnica tiene una eficiencia de recuperación promedio de 82% de teliosporas (CIPF, 2016).

Se requiere realizar un lavado del grano y filtración del agua a través de tamices o mallas que inicialmente permitan separar las esporas de hongos del material vegetal, así como discriminar el tamaño de las esporas a fin de retener en la última malla o tamiz las teliosporas de *Tilletia indica* de acuerdo con su morfometría (Sección 3.3.1). Una alternativa rápida para retener y visualizar las teliosporas o cuando el tamaño de muestra es muy pequeña, es utilizar la técnica de filtración y centrifugado (Sección 3.4).

Previo y posteriormente al uso de los filtros o mallas, es necesario desinfectar el material utilizado con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1.6% durante 3 minutos y enjuagar el material con agua corriente (CIPF, 2016).

- 1) Homogeneizar los granos o semillas dentro de su empaque original mediante agitación, pesar 50 gr si la cantidad de la muestra lo permite, si la muestra es menor procesar el total de la muestra.
- 2) Depositar los granos en un matraz Erlenmeyer de 250-300 mL y adicionar agua al doble del volumen del grano, agregar dos gotas de TWEEN® 20 (monolaurato de polioxietilensorbitano) para liberar la tensión superficial que existe entre las teliosporas y los granos.
- 3) Colocar el matraz sobre un agitador orbital durante 5 minutos a 200 rpm o en un agitador de brazos a una velocidad media durante 30 minutos para liberar las teliosporas.
- 4) En un matraz Kitasato de 500 mL o de mayor capacidad, colocar un embudo Büchner y sobre éste una malla o papel filtro Whatman™ del número 1, en caso de utilizar papel es necesario mojarlo con el fin de fijarlo en el embudo.

- 5) Sobre el matraz Kitasato filtrar el agua a través de un tamiz con una apertura al tamaño máximo de las teliosporas, por ejemplo, de 60 o 53 μm para separar de esporas de otros hongos.
- 6) Enjuagar el matraz que contenía la muestra y verter el líquido de la misma forma. Esperar a que se filtre completamente el agua.

Nota: se puede utilizar una bomba de vacío conectada al matraz para filtrar el agua con mayor rapidez, en caso de utilizar papel filtro tener cuidado de no romperlo para evitar la pérdida de esporas.

- 7) Con ayuda de unas pinzas de disección, retirar la malla o papel filtro y colocarla dentro de la base de una caja Petri.
- 8) Si se utiliza malla observarla directamente en un microscopio estereoscópico o en un microscopio óptico compuesto en busca de teliosporas para su identificación. Si se utiliza papel filtro, éste debe observarse primero con un microscopio estereoscópico para localizar teliosporas sospechosas a *T. indica* y recolectarlas con un alfiler entomológico.
- 9) Realizar el montaje de las teliosporas (Anexo 8.8), observarlas en un microscopio compuesto e identificar al menos 10 teliosporas para obtener el rango y promedio de su tamaño y características morfológicas (forma, color y ornamentación) a fin de determinar la especie de *T. indica*.

Nota: en caso de no detectar 10 teliosporas repetir dos veces más el tamizado, si la muestra lo permite.

3.3.1 Interpretación de los resultados

Cuando el número de teliosporas obtenidas por lavado tamizado es menor a 10, o las características morfológicas no son determinantes para *Tilletia indica*, el resultado se determina como:

- “Negativo a *Tilletia indica*” sin presencia de grano infectado ni teliosporas.

Cuando el número de teliosporas presentes es igual o mayor a 10 y cumplen con las características morfométricas de *T. indica*, el resultado se determina como “Negativo”, ya que no se encontraron granos infectados; sin embargo, se debe indicar la presencia de teliosporas:

- “Negativo a grano infectado, con presencia de teliosporas características de *Tilletia indica*”.

3.4 Filtración y Centrifugado

En esta técnica, el agua de lavado del grano se filtra a través de dos tamices, uno de 60 μm de apertura, sobrepuesto a otro de 20 μm . El primer tamiz separa los residuos y el segundo retiene las teliosporas de *T. indica*, mismas que son recuperadas a través de un lavado del tamiz en un tubo para centrifuga y se sedimentan por centrifugación (Kashyap, et al., 2011), lo que facilita la obtención de teliosporas para la elaboración de montajes.

Para desarrollar la técnica:

- 1) Se requiere previamente lavar los granos para después filtrar el agua de lavado a través de un tamiz con una apertura mayor al tamaño de las teliosporas, por ejemplo de 60 o 53 μm ; y a su vez filtrar a través de un tamiz de 20 μm o de menor tamaño.
- 2) Enjuagar el matraz que contenía la muestra y verter el líquido de la misma forma anteriormente descrita. Esperar a que se filtre completamente el agua.
- 3) Lavar el tamiz de 20 μm inclinando en un ángulo de 45°, arrastrar los residuos de la superficie con una piseta con agua destilada, desde la parte superior hacia abajo del tamiz, con un movimiento de barrido lateral en uno y otro sentido, con el fin de recuperar las teliosporas, vaciar y reservar el líquido en un tubo para centrifuga.
- 4) Centrifugar la suspensión a 1200 g durante 3 minutos, retirar el sobrenadante cuidadosamente, sin perturbar el sedimento.
- 5) Recuperar el sedimento con una micropipeta, y realizar el montaje en portaobjetos.
- 6) Examinar los montajes con microscopio compuesto y observar las características morfológicas y morfométricas para determinar la especie de *T. indica*.

3.4.1. Interpretación de los resultados

Cuando el número de teliosporas obtenidas por filtrado y centrifugación es menor a 10, o las características morfológicas no son determinantes para *Tilletia indica*, el resultado se determina como:

- “Negativo a *Tilletia indica*” sin presencia de grano infectado ni teliosporas.

Cuando el número de teliosporas presentes es igual o mayor a 10 y cumplen con las características morfométricas de *T. indica*, el resultado se determina como “Negativo”, ya que no se encontraron granos infectados; sin embargo, se debe indicar la presencia de teliosporas:

- “Negativo a grano infectado, con presencia de teliosporas características de *Tilletia indica*”.

3.5 Descripción morfológica

Realizar el montaje en portaobjetos de las teliosporas obtenidas para identificar las características morfológicas (coloración, forma, ornamentación y tamaño).

De acuerdo con Durán y Fischer (1961), las características de las teliosporas de especies del género *Tilletia* como *T. walkeri*, *T. horrida* y *T. ehrhartae* caen dentro de varios patrones generales, por ejemplo: liso, reticulado, cerebriforme, equinulado, verrucoso, tuberculado, y estriado; pudiendo presentarse la integración entre dos patrones (Cuadro 1 y Figuras del Anexo 8.7).

3.5.1 Descripción de las teliosporas de *Tilletia indica*

Teliosporas globosas a subglobosas, negras y opacas al madurar, de 22 a 47 μm de diámetro, midiendo hasta 64 μm (de 35 a 41 μm en promedio); con ornamentación en forma de proyecciones compactas, delgadas y truncadas ocasionalmente con extremo curvado, de 1.4 a 5.0 μm de alto, cubiertas por una delgada membrana hialina y formando crestas estrechas de fina trama cerebriforme (Durán y Fischer, 1961; Carris, Castlebury y Goates, 2006).

Mezcladas con las teliosporas se encuentran células estériles (teliosporas inmaduras) globosas a subglobosas, frecuentemente lacrimiformes (forma de lagrima), marrón a amarillentas, de 10 a 28 μm de ancho y con un máximo de 48 μm de longitud, con o sin tallo bien desarrollado (apículo), paredes lisas y laminadas de hasta 7 μm de espesor (Figura 4 del Anexo 8.4) (Durán y Fischer, 1961; CABI, 2018).

3.6 Identificación de la plaga

Para reportar una identificación positiva a *Tilletia indica*, es necesario la detección de granos infectados con teliosporas que corresponden con las características de *T. indica*, por medio de las técnicas de inspección directa o hidrólisis del endospermo.

Se requiere reportar la presencia de teliosporas de *Tilletia indica* mediante la técnica de lavado y tamizado o centrifugado, se deben obtener al menos 10 teliosporas maduras y completas que cumplan con las características morfológicas y morfológicas de *T. indica*.

4. REGISTROS

- Almacenar los registros del proceso de diagnóstico de la muestra. Contar con evidencia fotográfica de los granos infectados y de las teliosporas.

La muestra sobrante se conserva después de su procesamiento y hasta un mes después de emitido el resultado de diagnóstico para posible corroboración del resultado, a temperatura ambiente (16-25 °C), debidamente sellada en su empaque original.

En caso de obtener un resultado positivo, conservar:

- Los granos infectados se separan y almacenan en tubos o viales a temperatura ambiente.
- El papel filtro que contiene teliosporas producto del lavado y tamizado en cajas Petri a temperatura ambiente.
- Montajes permanentes con teliosporas características de *Tilletia indica*, debidamente etiquetadas.

5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL

Correo: lab.micologia@senasica.gob.mx

Teléfono: 01 (52) 55 5905 1000, **Ext.** 51424, 51409 y 51373

6. RECONOCIMIENTO

Este protocolo fue elaborado por el Laboratorio de Micología del CNRF (Lervin Hernández Ramos, Magnolia Moreno Velázquez y Nayeli Carrillo Ortiz), revisado por la Jefatura del Departamento de Fitopatología (María del Rocío Hernández Hernández) y editado por el Grupo DiaFi (Ana Karen Preuss Ángeles y Ariana Guadalupe Robles Zarate).

Agradecimiento a quienes participaron en elaboración y revisión de versiones anteriores del Protocolo: Antonio Cárcamo Rodríguez, David Bonilla López, Grisel Negrete Fernández, Israel David Rivas Avilés, Monserrat Valdés García y Óscar Morales Galván.

7. REFERENCIAS

- Agarwal, V. K. and Mathur, S. B. (1992). *Detection of karnal bunt in wheat seed samples treated with fungicides*. FAO Plant Protection Bulletin. 40: 148-153.
- Agarwal V. K. and Verman H. S. (1983). *A simple technique for the detection of Karnal bunt infection in wheat seed samples*. Seed Research, 11(1):100-102.
- Aujla, S. S., Sharma, I., Gill, K. S., and Kour, V. (1985). *Neovossia indica* on wild species of wheat. *Indian Phytopathology*. 38:191.
- Bedi, P. S. and Meeta, M. (1981). Effect of Karnal bunt of weight and germination of wheat grain and subsequent metabolism of seeding. *Indian Phytopathology*. 34 (1), 114.
- Bedi, P. S., Sikka, M. R., and Mundkur, B. B. (1949). Transmission of wheat bunt due to *Neovossia indica* (Mitra). Mundkur. *Indian Phytopathology*. 2 (1), 20-26.

- Bonde, M. R., Peterson, G. L. and Schaad, N. W. (1997). Karnal Bunt of Wheat. *Plant Disease*. 81 (12), 1370-1377.
- CABI. (2018). *Tilletia indica* (Karnal bunt of wheat). Recuperado de 17 de abril de 2018 de <https://www.cabi.org/isc/datasheet/36168#F6A5A9BA-C2F2-4D6A-B415-537020D8D60E>
- Carris L. M., Castlebury, L. A. and Goates, B. J. (2006). Nonsystemic Bunt Fungi- *Tilletia indica* and *T. horrida*: A review of History, Systematics, and Biology.
- CIPF, (2016). Comisión Internacional de Protección Fitosanitaria Anexo 4. *Tilletia indica* Mitra. Norma Internacional para Medidas Fitosanitarias 27. Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas.
- Durán, R. and Fischer, G. W. (1961). *The genus Tilletia*. Seattle, WA, Washington State University 138. United States.
- Joshi, L. M., Singh, D. V. and Srivastava, K. D. (1980). Present status of Karnal bunt in India. *Indian Phytopathology*. 33(1), 147-148.
- Kashyap, P. L., Kaur, S., Sanghera, G. S., Kang, S. S. and Pannu, P. P. (2011). Novel methods for quarantine detection of karnal bunt (*Tilletia indica*) of wheat. *Elixir Agriculture*. 31, 1873-1876.
- Mathur S. B. and Cunfer, B. M. (1993). Seed-Borne Diseases and Seed Health Testing of Wheat. Danish. Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, Copenhagen (DK). 31-43 p.
- Mitra, M. (1931). A new bunt on wheat in India. *Annals of Applied Biology*. 18 (2), 178-179.
- Mundkur, B. B. (1940). A second contribution towards a knowledge of Indian Ustilaginales. *British Mycological Society*. 13 (1), 54-58.
- Munjal, R. L. and Chatrath, M. S. (1976). Studies on mode on infection of *Neovossia indica* incitant of Karnal bunt of wheat. *Journal of Nuclear Agriculture and Biology*. 5 (2), 40-41.
- Robert, V., Stegehuis, G. and Stalpers, J. (2005). The MycoBank engine and related databases. Available online: <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000067&Rec=123982&Fields=All>
- Royer, H. M. and Rytter, J. (1988). Comparison of host ranges of *Tilletia indica* and *T. barclayana*. *Plant disease*. 72, 133- 136.
- SAGARPA. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2002). NORMA Oficial Mexicana NOM-001-FITO-2001. Por la que se establece la campaña contra el carbón parcial del trigo.
- Sansford, C. E., Baker, R. H. A., Brennan, J. P., Ewert, F., Gioli, B. Inman, A. Kinsella, A., Magnus, H. A., Miglietta, F., Murray, G. M., Porta-Puglia, A. Porter, J. R., Rafoss, T. Riccioni, L. and 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, 603-61. USDA. (2007). Karnal Bunt Manual. 148.

Forma recomendada de citar:

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018). Protocolo de Diagnóstico: *Tilletia indica* Mitra (Carbón parcial del trigo) [Versión 2.0]. Tecámac, México: Autor.

8. ANEXOS

8.1 Ciclo de vida

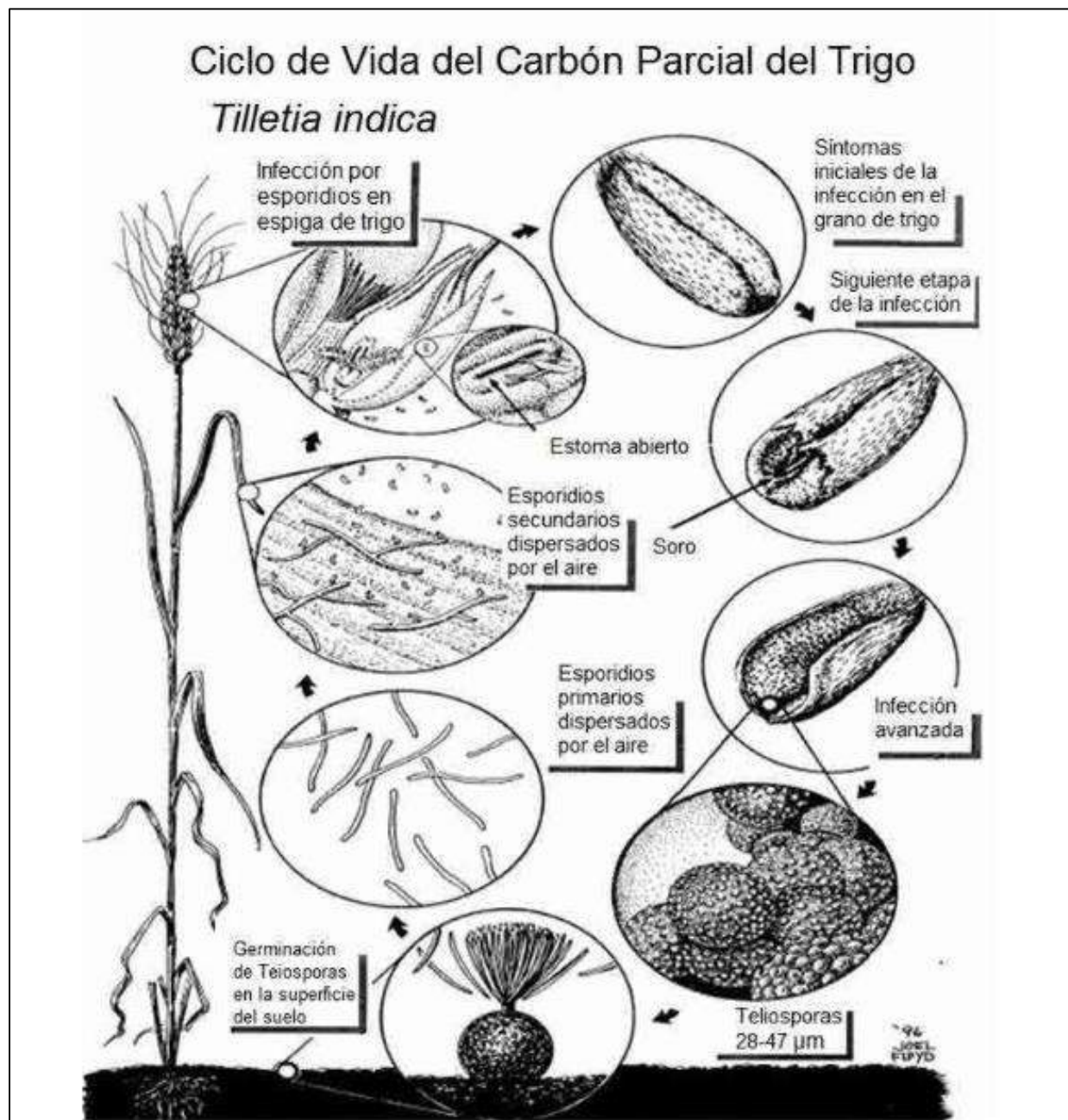


Figura 1. Ciclo de vida de *Tilletia indica* agente causal del Carbón Parcial del Trigo. Tomada de Bonde et al., 1997.

8.2 Síntomas de punta negra

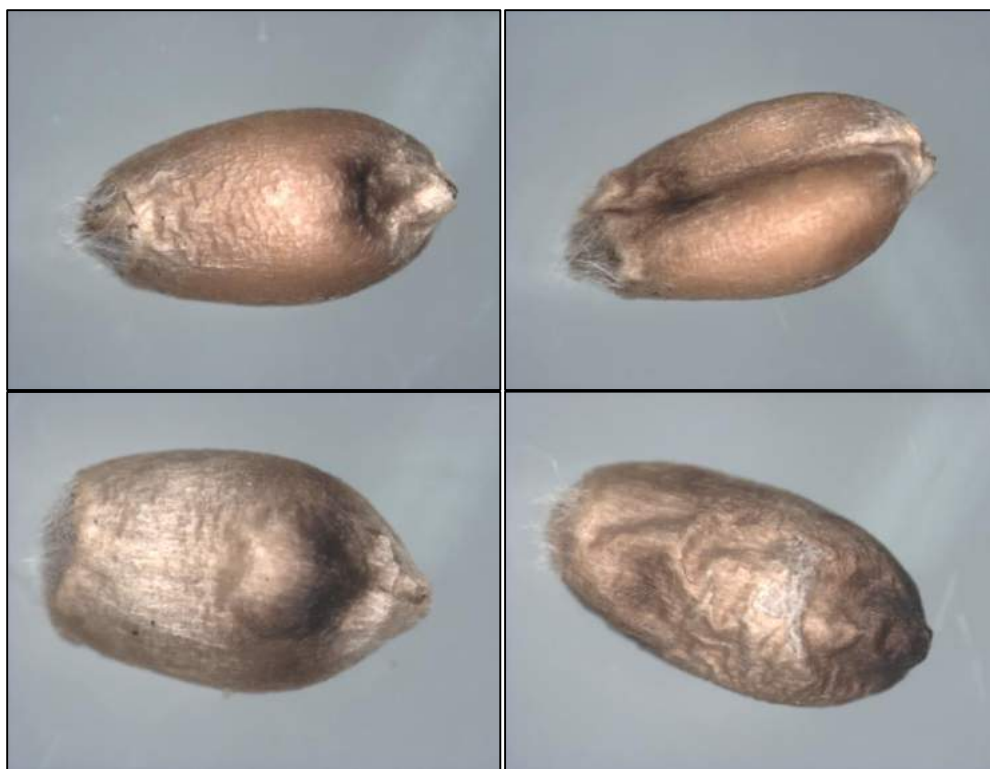


Figura 2. Síntomas de “Punta negra” en granos de trigo. (Fotografías: Laboratorio de Micología, CNRF, 2018).

8.3 Caracterización de granos infectados



Figura 3. Síntomas de Carbón parcial en granos de trigo. A1 y A2 primeros síntomas de la infección de *T. indica*; A3 y A4, avance progresivo de la infección de *T. indica*; A5 y A6 ruptura del pericarpio y teliosporas; A7 y A8 infección avanzada, grano en forma de “canoas”. (Fotografías: Laboratorio de Micología, CNRF, 2018).

8.4 Morfología de teliosporas de *Tilletia indica*

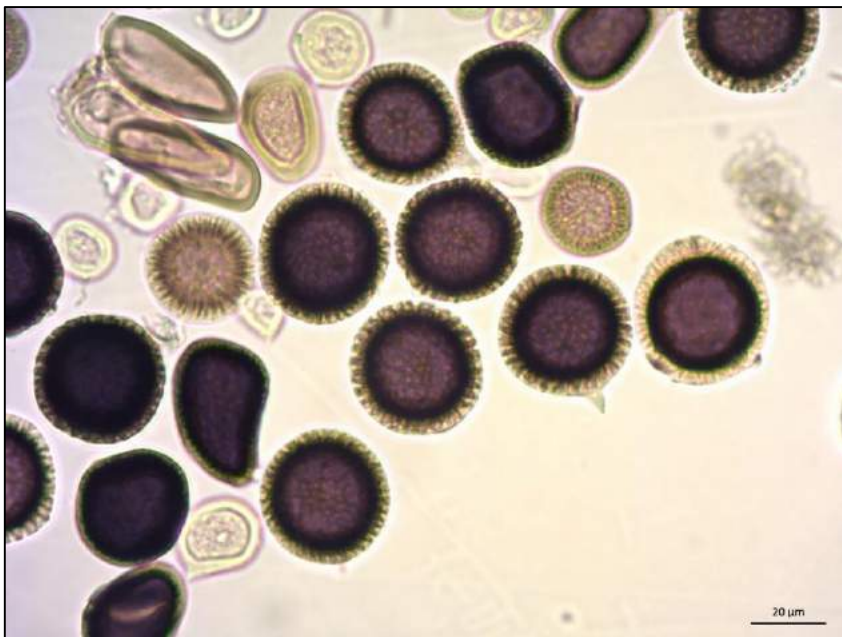


Figura 4. Morfología de teliosporas maduras y células estériles de *T. indica*. (Micrografía: Laboratorio de Micología, CNRF, 2018).

8.5 Hidrolisis del endospermo en trigo

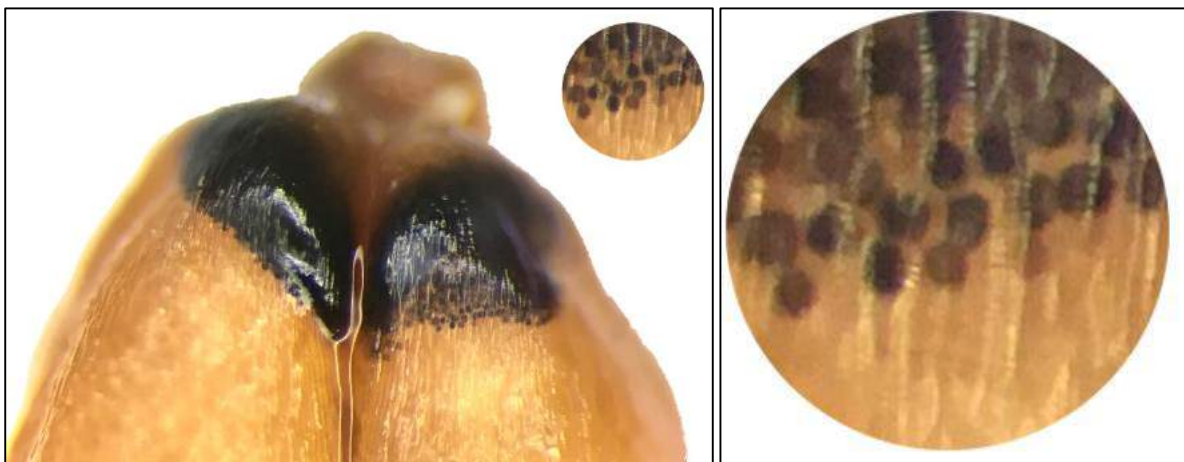


Figura 5. Observación de teliosporas por hidrólisis del endospermo. (Fotografía: Laboratorio de Micología, CNRF, 2018).

8.6 Características morfológicas de las especies de *Tilletia*

Cuadro 1 Características morfológicas de *Tilletia indica*, *T. walkeri*, *T. horrida* y *T. ehrhartae*, y sus hospedantes. CIAP, 2016.

Característica de las teliosporas	<i>Tilletia indica</i>	<i>Tilletia walkeri</i>	<i>Tilletia horrida</i>	<i>Tilletia ehrhartae</i>
Tamaño μm (rango)	22-47-(61)(26-55(-64))	28-35	14-36 (maduras: <25)	17-25
Tamaño μm (promedio)	35-41(40-44)	30-31	24-28	No hay datos
Color	Marrón anaranjado pálido a marrón rojizo oscuro; esporas maduras negras y opacas	Amarillo pálido a marrón rojizo oscuro (nunca negro ni opaco)	Castaño claro a oscuro; pueden ser semiopacas	Marrón oliváceo muy oscuro en teliosporas maduras. Pueden ser opacas debido a la melanización de las escamas
Forma	Globosa a subglobosa	Globosa	Globosa a subglobosa	Globosa a subglobosa
Cubierta de la teliospora	Presente, extendida hasta la punta de las espinas o un poco más allá.	Presente, extendido hasta los extremos de las proyecciones, de hialino a marrón amarillento	Presente, extendida hasta los extremos de las espinas, de hialina a coloreada	Presente, extendida hasta la punta de las espinas o un poco más allá.
Ornamentación de la teliospora	1,4-5(-7) μm Vista mediana: El contorno es más suave y completo debido a la disposición densa de las espinas, ocasionalmente con puntas curvadas. Vista superficial densamente equimuladas o dispuestas en crestas estrechas y próximas entre sí (formando una fina trama).	3-6 μm Trama gruesa más o menos cerebriforme. Crestas anchas con aspecto cerebriforme incompleto en vista superficial. En vista mediana, el perfil es irregular con huecos entre las espinas.	1.5-4 μm Con frecuencia curvadas, con aspecto de escamas poligonales en vista superficial.	1-2.5 μm Espinass cilíndricass o ligeramente cónicas. En vista superficial, rara vez cerebriformes. Escamas poligonales más grandes y agudas.
Hospedantes	<i>Triticum</i> spp.	<i>Lolium perenne</i> <i>Lolium multiflorum</i>	<i>Oryza</i> spp.	<i>Ehrharta calycina</i>

8.7 Patrones de ornamentación superficial de teliosporas de *Tilletia* sp.

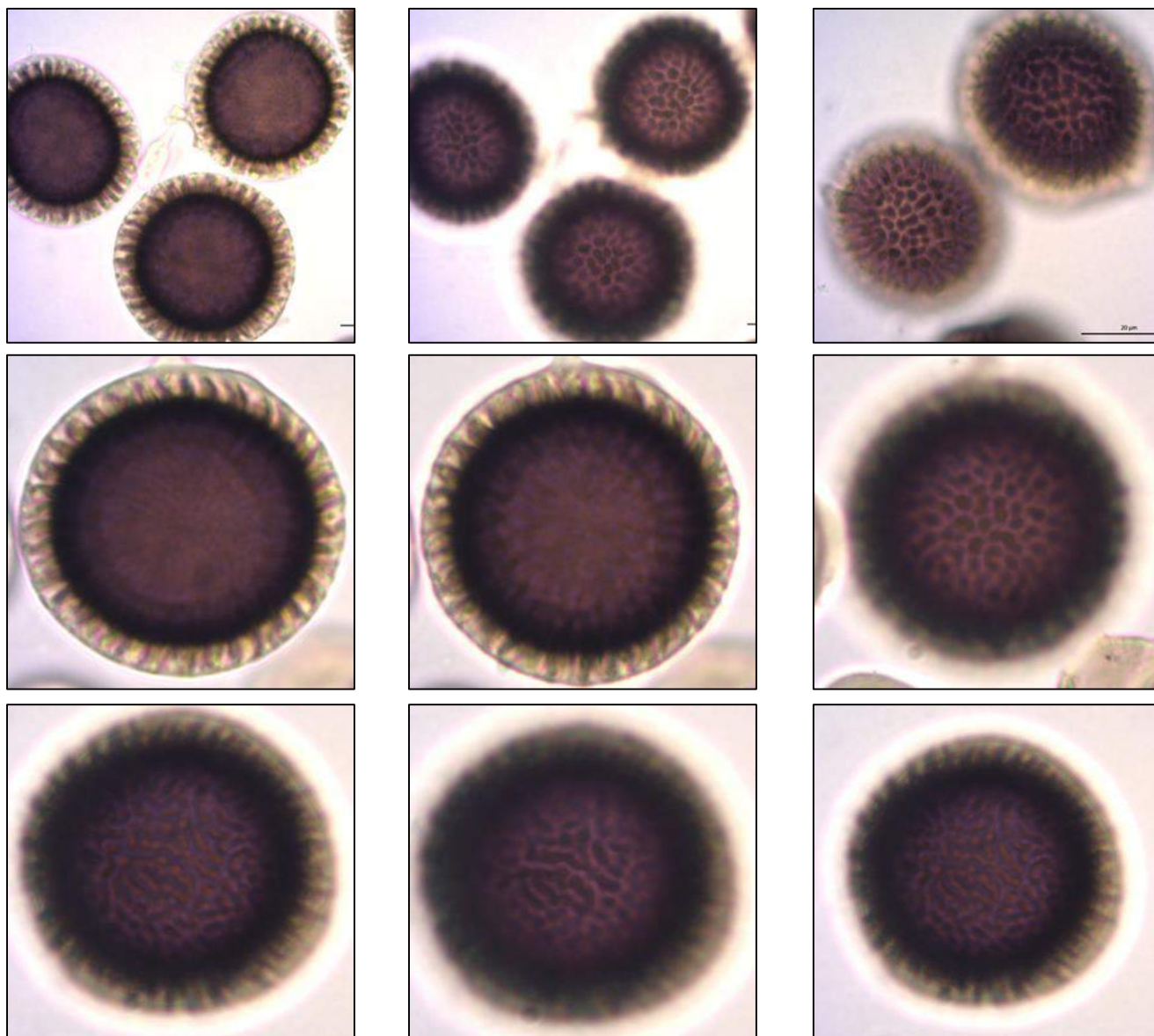


Figura 6 . Patrones de ornamentación superficial de teliosporas de *Tilletia indica*. Microscopio compuesto, aumento 100x. Espinas densamente dispuestas, ya sea individualmente (densamente equinuladas) o en crestas estrechas y próximas entre sí (fina trama cerebriforme). (Micrografías: Laboratorio de Micología, CNRF, 2018).

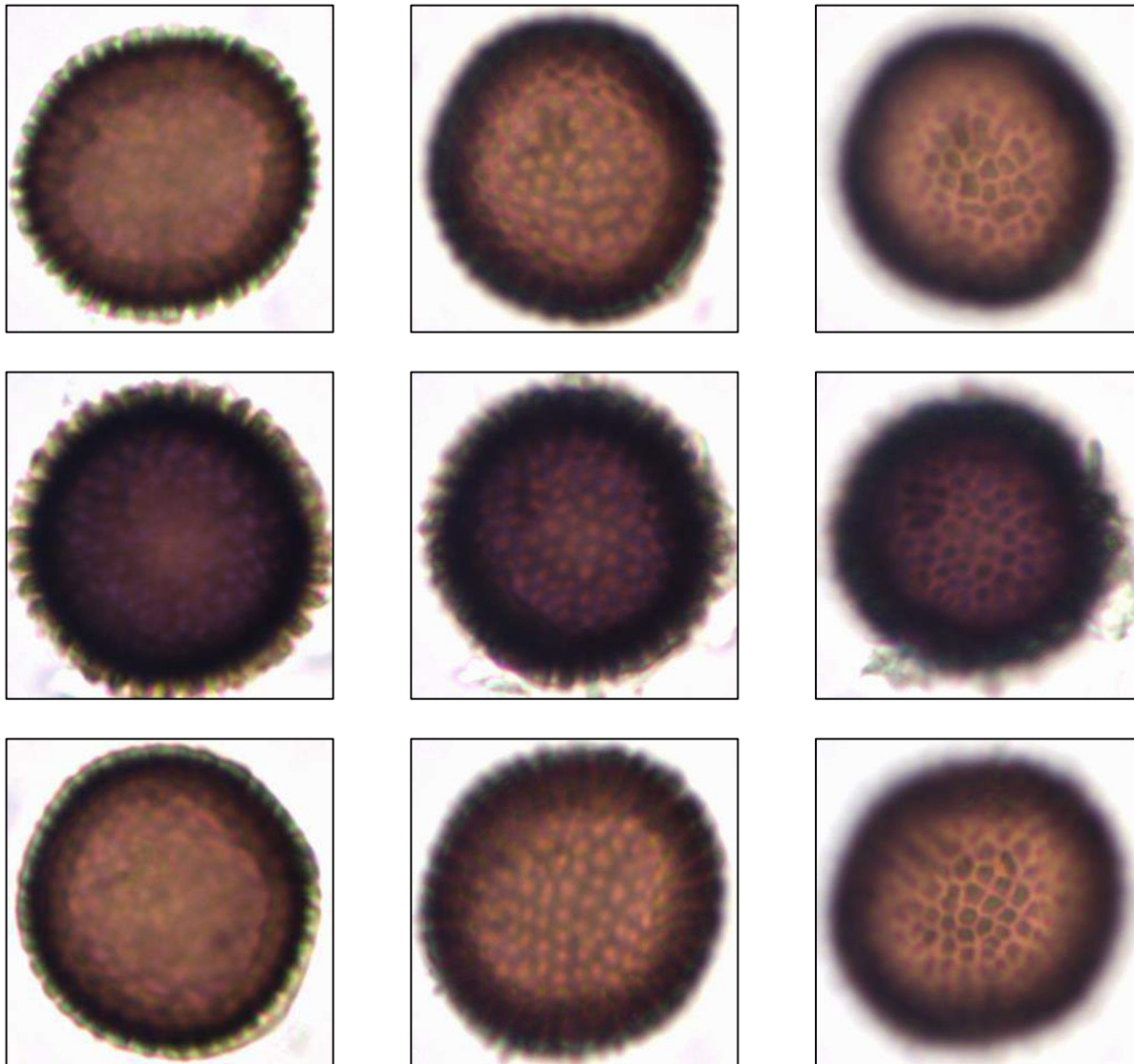


Figura 7. Patrones de ornamentación superficial de teliosporas de *Tilletia horrida*. Espinas dispuestas en escamas poligonales o, en ocasiones, en crestas cerebriformes. (Micrografías: Laboratorio de Micología, CNRF, 2018).

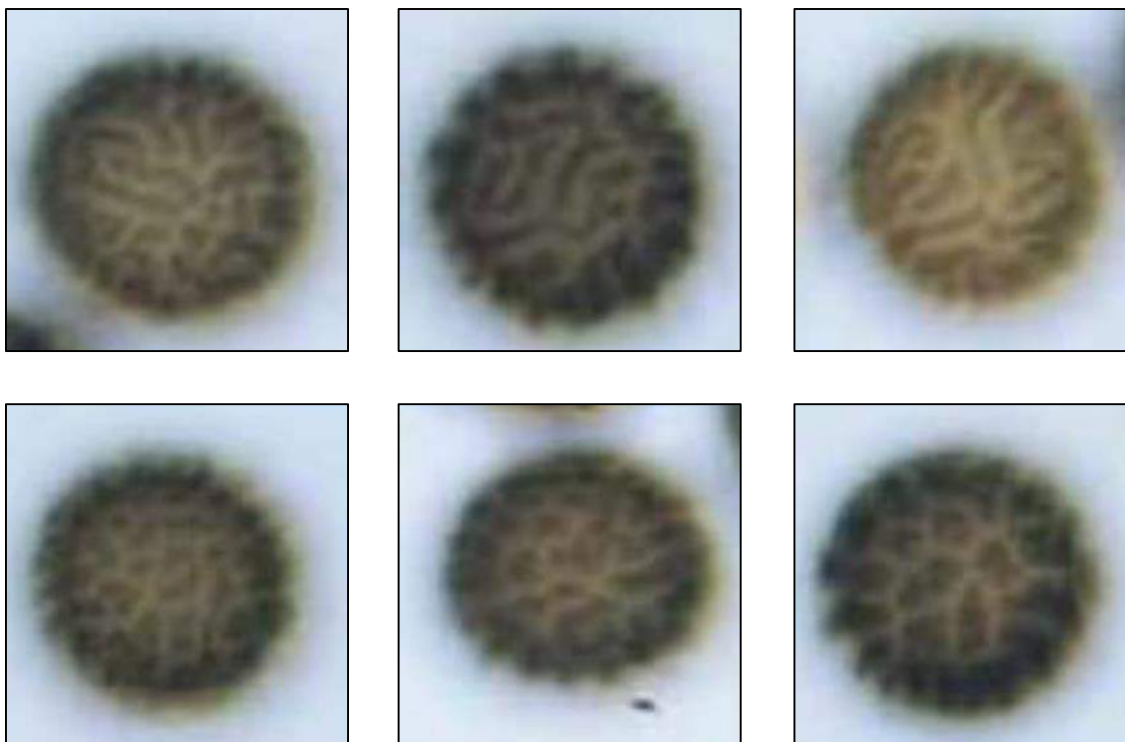


Figura 8. Patrones de ornamentación superficial de teliosporas de *Tilletia walkeri*. Espinas dispuestas en baja densidad y formando crestas anchas, trama entre cerebriforme y coraloides o en grumos gruesos. (Micrografías: A. Inman, Central Science Laboratory, York- NIMF 27).

8.8 Elaboración de montajes

8.8.1. Preparaciones temporales con cubreobjetos

- 1) Partir de granos o semillas con teliosporas de *Tilletia indica*, así como del papel filtro resultante de la técnica de lavado tamizado.
- 2) Colocar una gota de líquido de montaje (glicerina con azul de Nilo, lactofenol) en un portaobjeto.
- 3) Colocar las teliosporas del hongo dentro de la gota de líquido de montaje, con la ayuda de una aguja de disección o de un alfiler entomológico, evitando la formación de burbujas de aire.
- 4) Cubrir la gota con un cubreobjetos y presionar ligeramente para que se distribuya la gota.
- 5) Calentar por segundos para eliminar burbujas de aire y aclarar las teliosporas.
- 6) Observar con un microscopio compuesto. En caso de que no se aprecien las estructuras, debe realizarse otra preparación.

Nota: se puede sellar la preparación con barniz.

8.8.2. Preparaciones permanentes

- 1) Colocar una gota de medio de montaje (lactofenol, ácido láctico, glicerina) con colorante sobre un portaobjetos.
- 2) Adicionar las esporas del hongo sobre la gota con ayuda de una aguja de disección o de un alfiler entomológico. Eliminar burbujas con una aguja o calentar el portaobjetos.
- 3) Con ayuda de un sacabocados, formar un anillo de parafina alrededor de la gota. Para esto, calentar el extremo del sacabocados en un mechero e introducirlo en parafina sólida e inmediatamente colocarlo alrededor de la gota.

Nota: el diámetro del sacabocados debe ser mayor al de la gota.

- 4) Colocar un cubreobjetos sobre el anillo de parafina y calentar hasta que el anillo se derrita, cuidando que no queden burbujas de aire en la gota ni en la parafina.
- 5) Dejar enfriar y observar en un microscopio compuesto.
- 6) Etiquetar la preparación con los datos de la muestra.