

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

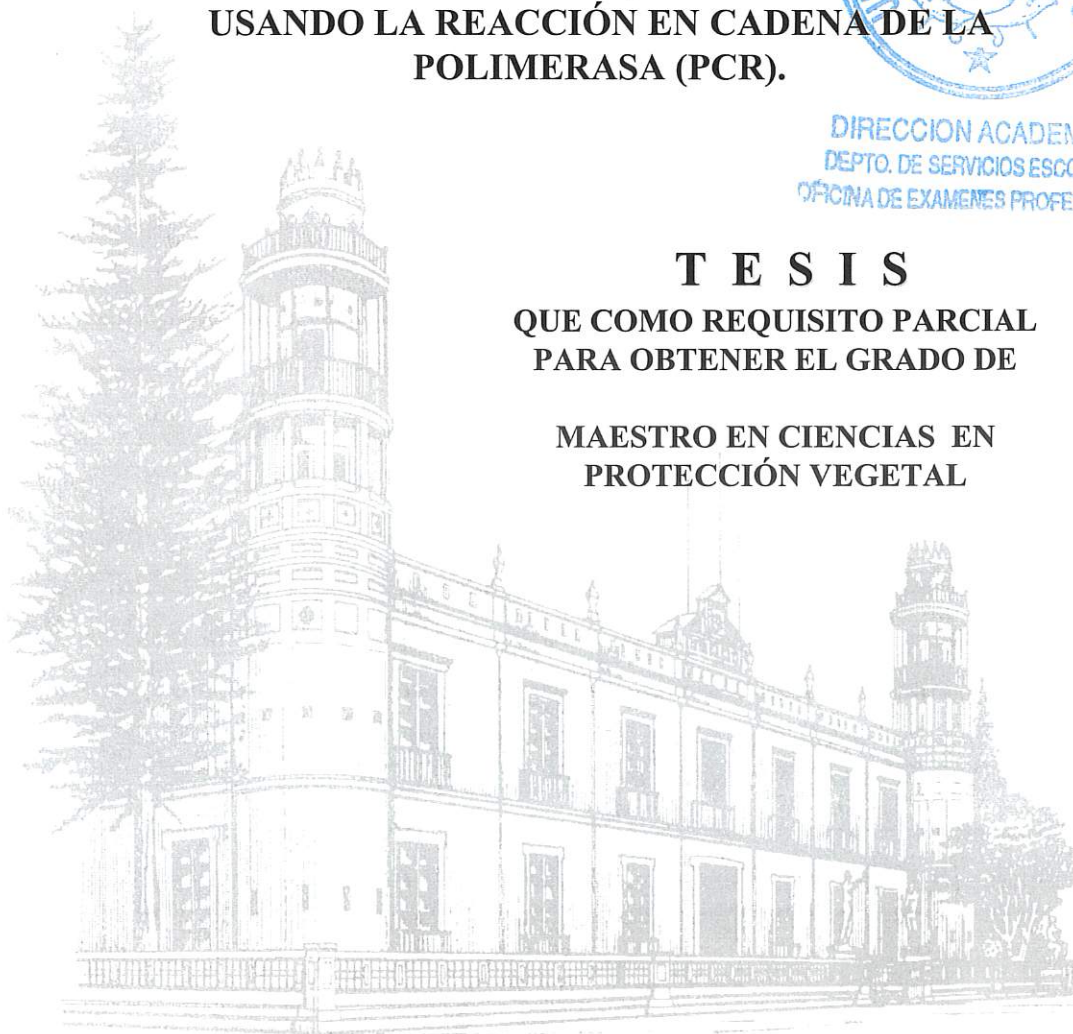
**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**

**DETECCIÓN ESPECIFICA DEL CARBÓN
PARCIAL DEL TRIGO (*Tilletia indica* Mitra),
USANDO LA REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA (PCR).**



DIRECCION ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

T E S I S
**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**
**MAESTRO EN CIENCIAS EN
PROTECCIÓN VEGETAL**



PRESENTA:
MARÍA DEL ROCÍO HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ



Chapingo, México, Agosto de 2001

DETECCIÓN ESPECÍFICA DEL CARBÓN PARCIAL DEL TRIGO (*Tilletia indica* Mitra), USANDO LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Tesis realizada por MARÍA DEL ROCÍO HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ, bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobado por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:

DR. SEBASTIÁN ROMERO COVA

ASESOR:

DR. GUSTAVO ALBERTO FRÍAS TREVIÑO

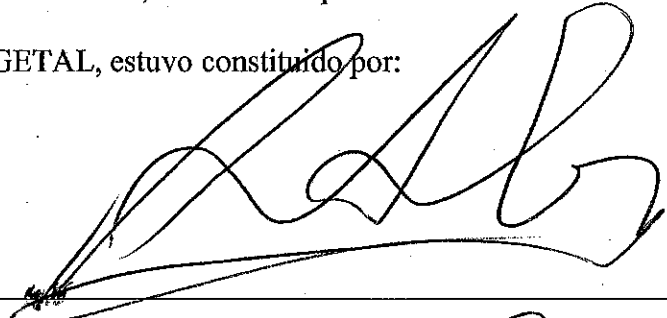
ASESOR:

M. en C. CARLOS ÁNGEL ZAPOTE MARTÍNEZ

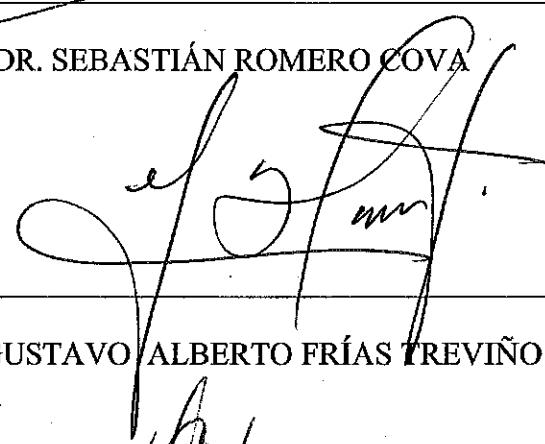
DETECCIÓN ESPECÍFICA DEL CARBÓN PARCIAL DEL TRIGO (*Tilletia indica* Mitra), USANDO LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de MARÍA DEL ROCÍO HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ, autor de la presente tesis de Maestría en Ciencias en PROTECCIÓN VEGETAL, estuvo constituido por:

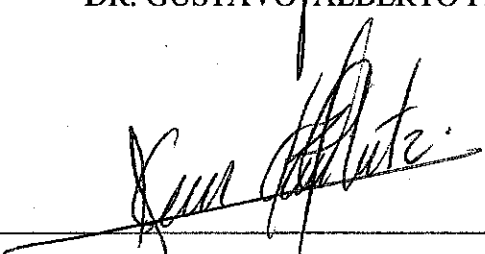
PRESIDENTE: _____


DR. SEBASTIÁN ROMERO COVA

ASESOR: _____


DR. GUSTAVO ALBERTO FRÍAS TREVIÑO

ASESOR: _____


M. en C. CARLOS ÁNGEL ZAPOTE MARTÍNEZ

DEDICATORIAS

Al tesoro mas grande que Dios me dio, mi familia:

A mis padres:

Crisoforo Hernández García
María Cristina Hernández de Hernández

Les agradezco que me sigan brindado amor, ternura, confianza, enseñanza, dedicación y tenacidad, para mí, estas son la bases que me han ayudado a alcanzar una de mis metas anheladas.

A mis hermanos:

Angel Rubén, Cristina Maribel y Liriola Marisol

Por estar siempre cerca de mi y sobre todo por el amor que nos une hoy y siempre.

A mi cuñada:

Adriana

Gracias por tu amistad y los buenos deseos emitidos en esta travesía.

A mis sobrinos:

Angel Randolph y Adriana Itzell

A ustedes pequeños tesoros por brindarme su amor y ternura.

A mis Abuelitos:

Aurora, †Pedro, Rita y †José María

Por su cariño, sus bendiciones para que Dios siempre me cuide y sobre todo por lo mas hermoso que me han brindado "mis padres".

A mi tío y a su familia:

Víctor Manuel Hernández Santos

Por el cariño y los buenos deseos brindados en este paso de mi vida profesional.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo. Por haberme permitido realizar los estudios de Maestría en Protección Vegetal, los cuales son una herramienta más para mi vida profesional .

Al Depto. de Parasitología Agrícola. Por permitir que se impartiera la maestría de tiempo parcial y por el apoyo brindado del M. en C. Antonio Segura Miranda y de su personal académico, técnico y secretarial.

A la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) en especial al Exdirector Dr. Javier Trujillo Arriaga. Por permitir el apoyo en tiempo y en el uso de las instalaciones para la realización del presente trabajo de maestría.

Al Dr. Sebastian Romero Cova. Por la dirección de esta investigación y por brindar sus conocimientos y sobretodo por creer en mí como profesionista.

Al Dr. Gustavo A. Frías Treviño. Por el apoyado brindo para poder realizar está superación personal como profesionista y por la revisión del presente trabajo.

Al M. en C. Carlos Angel Zapote Martínez. Por el gran apoyo, confianza, aportación del proyecto y sobretodo en la realización del presente trabajo, gracias por creer siempre en mí.

Al Biol. Jorge Aguilar Rios. Por haberme brindado sus conocimientos y su confianza en la realización del presente trabajo (Laboratorio de Biología Molecular de la DGSV).

Al M. en C. Camilo Hernández Juárez. Por las ideas aportadas en el presente trabajo, sobre todo por el gran apoyo brindado en la realización y revisión.

Al M. en C. Cristian Nava Díaz. Por haberme brindado su conocimientos y enseñanzas profesionales durante todos mis estudios de maestría, mil gracias.

Al M. en C. Jorge E. López Nolasco. Jefe del Depto. de Fitopatología del CNRDF. Por las facilidades de equipo, material de laboratorio y el apoyo brindados para la realización del presente trabajo.

Al Coordinador del Potsgrado. Dr. Nahum Marbán Mendoza. Por el apoyo brindado durante mi estancia.

Al Exdirector del Depto. de Parasitología Agrícola e investigador. M. en C. Cecilio Mendoza Zamora. Por el gran apoyo brindado a los estudiantes de la maestría de tiempo parcial en Protección Vegetal.

A todo el personal del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria en especial a Josefina, Lucy, Javier, Vicente, Víctor Manuel, José Manuel, Edgar y Alfonso, muchas gracias por su apoyo incondicional.

A mis compañeros de clase: Víctor, Martín, Juan Carlos, Coutiño, Ruelas, Martín, Morgado, Alejandro, Lucio, Justo, Angel, Noel, Leticia, Joaquín, Rodolfo, Lucas, Venegas, Víctor, Mota, Deras, Lilia, Edwin e Higinio, gracias por la amistad brindada. No los olvidare.

A todos mis maestros por la enseñanza transmitida durante mi formación académica, muchas gracias.

A la Ing. Alejandra Elizalde, M. en C. Lupita Valdovinos, Lic. Lupita Chavela y Anita Blanco. Por su apoyo incondicional, muchas gracias.

A mi Profesora Marta Morales Callejas. Por haber forjado las bases de mis primeros conocimientos escolares y por la confianza que depositó en mí como su alumna, ¡Mil gracias!.

*El error más grande lo cometes cuando, por temor a equivocarte,
te equivocas dejando de arriesgarte en tu camino.*

*No se equivoca el hombre que ensaya distintos caminos para alcanzar sus
metas. Se equivoca el que, por temor a equivocarse, no camina.*

*No se equivoca el hombre que busca la verdad y no la encuentra;
se equivoca el que, por temor a errar, deja de buscarla.*

(René Trossero).

DATOS BIOGRAFICOS

María del Rocío Hernández Hernández

Nació en Xalapa, Ver. El 15 de enero de 1968. Estudió la “Primaria Juan de la Luz Enríquez” (1975-1981), la Secundaria en la “Escuela Secundaria Técnica No. 3” (1981-1984), el Bachillerato en el Centro de Bachillerato Tecnológico industrial y de servicios No. 165 (1984-1987) en la especialidad de Suelos y Fertilizantes, en la Cd. de Coatepec, Ver. y la Licenciatura en el Instituto Tecnológico agropecuario No. 18 en el Mpio. de Úrsula Galván, Ver. (1987-1991) de donde egreso con el título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola.

Durante su desarrollo Profesional se ha desempeñado como técnico en una empresa de plaguicidas y semillas de hortalizas de importación en la Cd. de México (1992 y 1993), También ha laborado como, Técnico consultor enlace “C” en la DGSV-Dirección de Regulación Fitosanitaria en el Depto. de Puertos Aeropuertos y Fronteras en la expedición de Requisitos Fitosanitarios y elaboración de Normas Oficiales Fitosanitarias, en la Subdirección Internacional de Regulación como asistente técnico y en la Recepción de muestras (1993-1995) y en la Subdirección del Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario en el área de Recepción de muestras y emisión del Dictamen Fitosanitario (1995 a la fecha).

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características de <i>T. indica</i> , <i>T. barclayana</i> , <i>T. walkeri</i> y <i>T. tritici</i> .	10
Cuadro 2. Características distintivas de <i>T. tritici</i> con base a teliosporas.	32
Cuadro 3. Características observadas y reportadas para <i>T. barclayana</i> con base en las teliosporas.	33
Cuadro 4. Características distintivas de <i>T. indica</i> con base a teliosporas.	33
Cuadro 5. Relación promedio de rendimiento $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ obtenido del DNA extraído de micelio, teliosporas y grano.	35
Cuadro 6. Relación promedio de absorbancias (260/280 nm) obtenido del DNA extraído de micelio, teliosporas y grano.	36
Cuadro 7. Cantidades de cada uno de los componentes de la mezcla de reacción, para la estandarización de las condiciones de PCR.	39

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Grano de trigo con diferentes grados de daño: A) Severamente infectados, B) Medianamente infectados y C) Con teliosporas adheridas (infestadas). 24
- Figura 2.** Cantidad del DNA de *T. indica*, observada por electroforesis en gel de agarosa (0.8%) de las muestras (0.1 g) de 1=Micelio; 2=Teliosporas; 3=Granos severamente infectados, 4=Grano parcialmente infectado, 5=Grano con teliosporas adheridas. Con los métodos Hexadecitrimetilamonio (CTAB) (A), Dellaporta *et al.*, 1983(B), PlantDNAzol Reagent® (C) y Nucleón Phyt PURE® (D). 37
- Figura 3.** Productos amplificados a partir del DNA de *T. indica*, de 825 pb con los iniciadores TI17M1 y TI17M2 observados por electroforesis en gel de agarosa (1.2%) de las muestras de 1=Micelio (0.1g); 2=Teliosporas (0.1g); 3=Granos severamente infectados, 4=Grano parcialmente infectado, 5=Grano con teliosporas adheridas. Con los métodos CTAB (A), Dellaporta *et al.*, 1983(B), PlantDNAzol Reagent® (C) y Nucleón Phyt PURE® (D). 40

RESUMEN

Tilletia indica Mitra, es el agente causal del carbón parcial del trigo (*Triticum aestivum* L.). Por muchos años, el trigo ha sido el cereal al que se le dedica la mayor superficie de siembra a nivel mundial; en México, es uno de los cereales más importantes después del maíz. El diagnóstico de carbones en el Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario, se realiza por técnicas morfología y tamaño de teliosporas. Sin embargo, cuando se trata de realizar el diagnóstico de una enfermedad, cuyo patógeno es morfológicamente similar a varias especies, su identificación resulta muy difícil. En años recientes, se han desarrollado diversas técnicas basadas en la comparación de los ácidos nucleicos: marcadores moleculares, análisis de secuencias de DNA (secuenciación) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Esta última utiliza DNA, permitiendo mayor confiabilidad que las técnicas de diagnóstico tradicionales. El objetivo del presente trabajo fue estandarizar la PCR para la detección de *T. indica* patógeno. Se evaluaron cuatro métodos de extracción de DNA (CTAB, Dellaporta *et al.*, 1983, PlantDNAzol Reagent® y Nucleón Phytopure®), de diferentes tejidos (micelio, teliosporas y grano con diferentes grados de infección). Para la PCR, se probaron diferentes parámetros de reacción ($MgCl_2$, *Taq* polimerasa GIBCO BRL, oligonucleótidos, DNA y temperaturas de anillamiento), se utilizaron un par de oligonucleótidos específicos para *T. indica* (TI17M1 5'-TCCCCTTGGATCAGAACGTA-3' y TI17M2 5'-AGAAGTCTAACTCCCCCCTCT-3') derivados de la clona pTIMD17. La especificidad de éstos, fue evaluada con *T. tritici* y *T. barclayana*. El método más eficiente fue el CTAB, para los tejidos probados y para teliosporas de las otras especies. Con estos oligonucleótidos se obtuvo un fragmento esperado de 825 pb en *T. indica*. Estos resultados demuestran la aplicación de la técnica como una herramienta adicional y confiable en el diagnóstico de *T. indica*.

Palabras clave: *Tilletia indica*, diagnóstico, PCR

ABSTRACT

Tilletia indica Mitra is the causal agent of Karnal bunt of wheat (*Triticum aestivum* L.). Through the years, wheat has the main cereal crop grown all over the world; in Mexico it is also one of the most important cereal crops surpassed only by corn. The diagnosis of smuts in the National Center of Phytosanitary Diagnostic Reference is carried out by morphological characteristics and size of the teliospores. However, when a smut disease is caused by a pathogen similar to several species, the diagnosis turns out too difficult by this method. In recent years, several techniques, based on the comparison of nucleic acids, have been developed; molecular markers, sequences analysis of DNA (sequentiation) and the Polymerase Chain Reaction (PCR). The last one uses DNA, thereby being more reliable than the other techniques. The main objective of the present research work was the standarization of the PCR technique for the detection of the Karnal bunt pathogen. Four extraction methods of DNA (CTAB, Dellaporta *et al.*, 1983, PlantDNAzol Reagent® y Nucleón Phytopure®), from different tissues (mycelium, teliospores and seeds with different levels of infection) were evaluated. For PCR, different reaction parameters (MgCl₂, *Taq* polymerase GIBCO BRL, oligonucleotides, DNA and temperatures of circular bands) were tested, and a pair of oligonucleotides, specific for *T. indica* (TI17M1 5'-TCCCCTTGGATCAGAACGTA-3' y TI17M2 5'-AGAAGTCTAACTCCCCCTCT-3'), derived from the clone pTIMD17, were utilized. The specificity of these oligonucleotides was evaluated with *T. tritici* and *T. barclayana*. The most efficient method for the tissues tested and for teliospores of this species was the CTAB. With these oligonucleotides the expected fragment 825 pb for *T. indica* was obtained. These results show that this technique may be used as an additional and reliable tool for the diagnosis of *T. indica*.

Key words: *T. indica*, diagnosis, PCR.

CONTENIDO

INDICE DE CUADROS	vii
INDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo general	3
1.1.2. Objetivos particulares	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Generalidades del cultivo	4
2.2. Principales países productores	4
2.3. Principales estados productores de trigo en México	5
2.4. Importancia del trigo para México	5
2.5. Principales enfermedades fungosas que atacan al trigo	6
2.6. Generalidades del carbón parcial del trigo	7
2.6.1. Agente causal	7
2.6.2. Comparación morfológica de <i>T. indica</i> con <i>T. tritici</i> y <i>T. barclayana</i>	9
2.6.3. Síntomas del carbón parcial del trigo	10
2.6.4. Ciclo de la enfermedad	11
2.6.5. Condiciones ambientales que favorecen la enfermedad	12
2.6.6. Pérdidas que ha causado la enfermedad en producción de trigo	12
2.6.7. Distribución mundial del carbón parcial	13
2.6.8. Distribución nacional del carbón parcial	14
2.7. Métodos de diagnóstico para carbones	16
2.7.1. Método tradicional	16
2.7.2. Otros métodos de diagnóstico	16

2.7.2.1. Electroforesis de isoenzimas	16
2.7.2.2. Análisis del DNA	17
2.7.2.2.1. La técnica de PCR para el diagnóstico de <i>T. indica</i>	22
III. MATERIALES Y METODOS	24
3.1. Origen de las cepas utilizadas	24
3.2. Extracción de teliosporas	25
3.3. Protocolos de extracción de DNA	26
3.3.1. Método de Dellaporta <i>et al.</i> , 1983	26
3.3.2. Método Plant DNAzol Reagent®	27
3.3.3. Método del Nucleon Phytopure®	28
3.3.4. Método de Doyle y Doyle, 1987 (CTAB)	28
3.4. Cuantificación de ácidos nucleicos	29
3.5. Estandarización de las condiciones de PCR	30
3.6. Separación de los productos amplificados	31
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	32
4.1. Material biológico utilizado	32
4.1.1. Características morfológicas de las cepas utilizadas	32
4.2. Extracción de DNA de <i>T. indica</i>	34
4.2.1. Determinación de la concentración del DNA	34
4.2.2. Calidad del DNA	35
4.3. Optimización de las condiciones de PCR	38
V. CONCLUSIONES	42
VI. LITERATURA CITADA	44
APENDICE	57

I. INTRODUCCIÓN

El trigo (*Triticum aestivum* L.) es un cereal de gran importancia que ocupa el 20% de la tierra cultivada en el mundo. En México, se cultivan alrededor de 1'000,000 ha, con un rendimiento promedio de 3.9 toneladas por ha (SAGAR, 1996). Sin embargo, la producción nacional no es suficiente para el consumo del país, por lo que se importan grandes cantidades de trigo principalmente de E.U.A. y Canadá. También, el tratado de libre comercio que firmó México con estos dos países ha ocasionado un mayor flujo de trigo y de una gran variedad de productos agrícolas, lo cual conlleva al riesgo de introducción de plagas de interés cuarentenario.

El carbón parcial del trigo (*Tilletia indica* (Mitra), Sin. *Neovossia indica* (Mitra) Mundkur) es una enfermedad que se transmite por semilla, infecta a los granos en desarrollo y los convierte parcialmente en masas carbonosas (SAGAR, 1996). Esta enfermedad causa bajas en el rendimiento de la cosecha y afecta en gran medida la calidad del grano, ya que cuando se tiene una infección mayor al 3% en la muestra, se considera no apto para el consumo humano (USDA, 1996).

Si bien el carbón parcial está presente en el país, su distribución se encuentra limitada a ciertas zonas geográficas (plaga tipo A-2), lo cual implica que para realizar importaciones y movilizaciones nacionales e internacionales de grano y semilla de trigo

deben de cumplir ciertos requisitos fitosanitarios, para retrasar o evitar de esta manera el ingreso y diseminación a zonas libres.

Debido a la importancia de esta enfermedad, es necesario emplear técnicas de diagnóstico confiables y rápidas que garanticen, que el material movilizado entre países o dentro de un país se encuentre libre del patógeno, lo cual permitirá conservar zonas libres de carbón parcial y detectar nuevos focos de infección.

El diagnóstico de carbones, en el Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario (CNRF) de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV), se ha venido realizando por caracterización morfológica de las teliosporas. La principal desventaja de este método es que el patógeno es morfológicamente similar a otras especies del mismo género (*T. walkeri* y *T. barclayana*) y la diferenciación resulta laboriosa. Esta problemática se ve reducida por el uso de otras herramientas, tales como análisis de isoenzimas y análisis de proteínas; sin embargo, estos métodos requieren experiencia en la interpretación de los polimorfismos complejos (Bonde *et al.*, 1989). La aparición de técnicas basadas en el análisis de ácido desoxirribonucleico (DNA) proveen diagnósticos más confiables y específicos; dentro de éstas se encuentra la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) por sus siglas en inglés, la cual utiliza la enzima DNA *Taq* polimerasa para amplificar pequeñas cantidades de DNA específico, permitiendo que el diagnóstico tenga mayor confiabilidad (Henson *et al.*, 1993). Mediante esta técnica se ha identificado a este patógeno usando iniciadores específicos para amplificar fragmentos del DNA *T. indica* y diferenciarla de otras especies de *Tilletia* (Smith *et al.*, 1996); del mismo modo, McDonald *et al.*, (1998) probó la especificidad de estos iniciadores

obteniendo amplificación únicamente para *T. indica* y menciona que esta técnica tiene una rango de especificidad del 90%. Debido a esto, se planteó el presente trabajo con los siguientes objetivos:

1.1. Objetivo general

- Detectar a *T. indica* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa

1.1.2. Objetivos particulares

- Evaluar métodos de extracción de DNA a partir de micelio, teliosporas y grano infectado e infestado con *T. indica*.
- Optimizar la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para amplificar el DNA de *T. indica*.
- Determinar la especificidad de la técnica para el diagnóstico de *T. indica*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades del cultivo

El trigo (*Triticum* spp. L.) pertenece a la Familia Poaceae. El trigo harinero (*Triticum aestivum* L.), se cultiva en un amplio rango de ambientes y es el cereal al que se le dedica mayor superficie de cultivo en el mundo, pues proporciona el alimento número uno al ser humano; es el de mayor producción, comparado con los cultivos de arroz, maíz y papa (Briggle, 1980; Camacho, 1997); es fuente de carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales. El consumo es principalmente en forma de pan y como ingrediente básico de muchos productos alimenticios (Schmit, 1980; Camacho, 1997).

El trigo crece en ambientes templados, áridos o semiáridos, con altitudes desde el nivel del mar hasta por arriba de los 3000 m.s.n.m., (SARH, 1992). La temperatura mínima para su crecimiento es de 3 a 4°C, la óptima de 25°C y la máxima de 30 a los 32°C; crece mejor en suelos bien drenados (Camacho, 1997).

2.2. Principales países productores

Existen aproximadamente 23 países que se dedican a la producción del trigo, dentro de los cuales destacan: China, Estados Unidos de América, India, Rusia, Francia, Canadá, Turquía, Ucrania, Alemania, Paquistán, Australia, Inglaterra, Escocia, Irlanda, Irán, Argentina, Kasajastán, Polonia, Italia, Rumania, Egipto, Hungría, Dinamarca, España y México. (Hamilton, 1997; FAO, 1996, citado por Camacho, 1997).

2.3. Principales estados productores de trigo en México

La producción de trigo se obtiene en seis zonas localizadas en el noroeste de México (Sonora, Sinaloa y Baja California, Baja California Sur); en el Bajío (Querétaro, Guanajuato, Jalisco y Michoacán); en la Laguna (incluye parte de Durango y Coahuila, norte de Zacatecas, San Luis Potosí y Aguascalientes); los valles altos de la altiplanicie mexicana (Estado de México, Puebla, Hidalgo y Tlaxcala) (Fuentes-Dávila y Hettel, 1992; Camacho, 1997; Robles, 1986, citado por Blanco en 1998). La principal región productora de trigo se encuentra en el estado de Sonora, el cual ocupa el primer lugar en los cultivos de invierno con aproximadamente 300,000 ha que producen alrededor de 1,500,000 ton, con un rendimiento promedio de 4.7 ton/ha (SARH, 1992).

2.4. Importancia del trigo para México

Entre 1990 y 1995, en México, el volumen global de trigo cosechado fue de 4,770,000,000 de ton, que representó el 21% del consumo aparente en este período, lo que se tradujo en un promedio *per capita* de 52 kg; el promedio anual fue de 968,000 ha de trigo que representaron alrededor del 7.6% de la superficie promedio sembrada con gramíneas anuales, colocándolo en el cuarto lugar de acuerdo al área de siembra. Los estados de Sonora, Guanajuato, Sinaloa, Baja California, Baja California Sur y Michoacán en conjunto sumaron el 65% de la superficie sembrada anualmente. En los estados de la región Noroeste del país se sembró el 46% de la superficie con un promedio anual de 2,954,000,000 ton de trigo, es decir, el 78% de la producción nacional. En particular, Sonora dedicó un 26% de la superficie destinada a la producción con un promedio anual de 1,221,000,000 ton.

2.5. Principales enfermedades fungosas que atacan al trigo

Patógenos comunes como *Septoria tritici*, *Helminthosporium* spp., *Bipolaris* sp., *Drechslera* sp. y *Alternaria* sp. pueden ocasionar manchas y tizones foliares, destruir parte del tallo y de la raíz o atacar directamente a los granos y en cualquiera de los casos ocasiona pérdidas considerables en la producción (Obst y Zogg, 1980; Zillinsky, 1984; Agrios, 1985; Wiese, 1987).

El cornezuelo (*Claviceps purpurea*) es una enfermedad que se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo; aparece con mayor frecuencia en el centeno, pero también es común encontrarlo en el trigo (Agrios, 1985; Wiese, 1987), ocasionando pérdidas de hasta 0.1% (Alderman *et al.*, 1999).

El tizón de la espiga del trigo (*Fusarium graminearum*) no sólo provoca graves pérdidas, sino que también produce micotoxinas que afectan la salud humana y animal (Ireta y Gilchrist, 1994; Dubin *et al.*, 1996).

Las royas se encuentran entre las enfermedades más destructivas, ya que ocasionan pérdidas equivalentes a casi el 10% de la cosecha mundial de grano por año, atacan a las hojas y los tallos. Dentro de las principales están: la roya negra del tallo (*Puccinia graminis*), roya amarilla o rayada (*Puccinia striiformis*), la roya café o foliar (*Puccinia recondita*) (Obst y Zogg, 1980; Agrios, 1985).

Las pérdidas ocasionadas por las royas son igualadas por los carbones, aunque no superadas. Los carbones a diferencia de las royas atacan a los granos, reemplazándolos

por masas de esporas polvorientas de color negro que se asemejan al hollín o carbón; de esta manera, la disminución en el rendimiento y la calidad del grano es directa (Agrios, 1985). Dentro de los carbonos que atacan al trigo están el carbón cubierto (*Tilletia caries*), el carbón apestoso (*Tilletia foetida*), el carbón del enanismo (*Tilletia controversa*) y el carbón parcial (*Tilletia indica*) (Zillinsky, 1984; Agrios, 1985; Wiese, 1987).

2.6. Generalidades del carbón parcial del trigo

2.6.1. Agente causal

El patógeno (*Tilletia indica* Mitra) (Basidiomycota: Ustilaginales: Ustomycetes: Tilleriaceae), fue clasificado originalmente por Mitra en 1931; posteriormente, Mundkur en 1940 lo reclasificó como *Neovossia indica* por observar características distintivas como promicelio no ramificado, algunas teliosporas con presencia de un apéndice o pináculo, que es una característica distintiva del género *Neovossia*. (por el contrario, la ausencia de dicho apéndice es también típico del género *Tilletia*; actualmente ambos géneros son considerados como sinónimos (Romero 1994), pero es más usual el nombre de *T. indica* debido a que no todas las teliosporas presentan el apéndice).

Por su parte, Durán y Fischer (1961) indican que las esporas son globosas y subglobosas y que ocasionalmente presentan adheridas a ellas fragmentos de micelio, son de color subopaco, rojizo oscuro a café cúprico, su diámetro es de 24-47 μm y también presentan espinas compactas de 1.4-4.9 μm .

Las teliosporas de *T. indica* son de color café oscuro a negro, miden de 22-49 μm , son esféricas a ovaladas con reticulaciones y espinas truncadas; se ha observado que también presentan una membrana hialina cubriendo las espinas, la cual persiste en las esporas maduras (Joshi *et al.*, 1983).

Por su parte, Zilinsky (1984) menciona que el tamaño de las teliosporas son de 25-42 μm , mientras que Saari y Mamuluk (1996), indican que el tamaño de la teliosporas corresponden a 24-47 μm y son de color subopaco, café claro a obscuro, de forma globosa con ornamentación de espinas truncadas.

Fuentes y Durán (1986, citado por Nagarajan, 1997), observan que las teliosporas pueden ser de forma globosa o subglobosa, de 22-49 μm de tamaño, reticuladas con proyecciones y cubiertas por una capa gruesa.

La morfología varía principalmente en el tamaño y longitud de las espinas; Romero (1994) indicó que las teliosporas son globosas, café oscuras, grandes (de 22 a 49 μm de diámetro) con la superficie reticulada y una tela membranosa que las cubre hasta su maduración; cuando germinan, en el ápice del promicelio se forman numerosas esporidias binucleadas (frecuentemente más de 100), no se fusionan como sucede con las de otros carbones, sino que germinan directamente y producen hifas infectivas.

Por otro lado, Paulitz (1995) indica que el tamaño de las esporas es de 25-52 μm y en promedio de 38-42 μm , su forma es globosa o subglobosas con paredes verrucosas con espinas truncada que miden de 1.5 a 5 μm .

NAPPO 1999 describe a las esporas de *T. indica* tienen un diámetro de 22-61 μm y que las espinas miden 1.5 a 7.0 μm .

2.6.2. Comparación morfológica de *T. indica* con *T. tritici* y *T. barclayana*

Tilletia caries (D.C.) Tul. 1847 (sin. *Tilletia tritici*) es el llamado carbón común del trigo. Las teliosporas se caracterizan por tener paredes gruesas tri-laminadas con apariencia de red cubierta por una gelatina semitransparente. En *T. tritici* las teliosporas son de color amarillo claro a gris o café rojizo, son generalmente globosas y ocasionalmente ovoides, miden 15-23.5 μm de diámetro, aunque en algunas ocasiones alcanzan 25 μm ; además presenta reticulaciones poligonales de 0.5-1.5 μm de profundidad, las células estériles son globosas a subglobosas de 9.8-18.2 μm de diámetro y son semitransparentes (Zillinsky, 1984; Wiese, 1987 y Romero, 1994) *T. tritici* es muy similar a *T. leavis*, excepto que en ésta última las paredes de las teliosporas son lisas y semitransparentes de forma globosa-alargada.

Tilletia barclayana (sin. *Tilletia horrida*) es el agente causal del carbón del grano del arroz. Las teliosporas son muy parecidas a las de *T. indica*, su forma es variable, ya que se encuentran desde formas globosas, poliédricas, elongadas o contorneadas de 21-30 μm de diámetro, el color es amarillo pálido con paredes delgadas de 2.5 μm , se encuentran rodeadas de espinas hialinas o ligeramente coloreadas puntiagudas en el ápice e irregularmente poligonales en la base, las espinas son curvadas y miden 1.5-4.2 μm de alto (Durán y Fischer, 1961) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características de *T. indica*, *T. barclayana*, *T. walkeri* y *T. tritici* (Romero 1984 y NAPPO 1999).

Características para el diagnóstico	<i>T. indica</i>	<i>T. barclayana</i>	<i>T. walkeri</i>	<i>T. tritici</i>
Tamaño (µm)	22-61	17-36	26-44	14-24
Color	Café a negro opaco	Café a negro opaco	Café claro a oscuro. Nunca de color negro opaco	Amarillo pálido
Morfología	Globosa a subglobosa	Globosa a subglobosa	Esférica	Globosas poliédricas
Espinas	Densas, 1.5 a 7.0 µ de longitud; ornamentación verrugosa en la superficie	Pueden ser curvadas; las puntas son circulares, achatadas y largas	Achatadas; con acanaladuras en la superficie a veces similares a las de <i>T. indica</i>	Espinas curvadas que miden de 1.5-4.2 µm
Hospedero principal	Trigo	Arroz	Pasto	Trigo

2.6.3. Síntomas del carbón parcial del trigo

El carbón parcial del trigo es una enfermedad de la semilla y los síntomas sólo son visibles cuando el grano se encuentra completamente desarrollado, el patógeno convierte el ovario del grano infectado en un soro o masa de teliosporas, de color castaño oscuro. El soro se forma en la porción del embrión en forma longitudinal y deja el resto de la semilla intacta; sin embargo, en variedades susceptibles, cuando las infecciones son muy severas, el endospermo puede ser invadido y el grano completo

puede transformarse en un soro; el cual emite un olor a pescado descompuesto, debido a la trimetilamina, que es desagradable al paladar (Romero, 1994; Nagarajan, 1997).

Cashion y Lutrell (1988), citados por Nagarajan (1997), estudiaron porqué el patógeno no invade al embrión y demostraron que el micelio sólo prolifera en el pericarpio, desintegrando las capas medias de las células parenquimatosas, evitando la fusión de la otras capas del pericarpio con la cubierta de la semilla.

Roberson y Lutrell (1987), citados por Nagarajan (1997), demostraron que el crecimiento micelial provoca una ruptura de las células que rodean al tejido vascular, evitando que los nutrientes lleguen al embrión; el resultado es una semilla pobremente desarrollada, con pocas posibilidades de originar una planta vigorosa y sana.

2.6.4. Ciclo de la enfermedad

Las teliosporas de *T. indica* persisten en el suelo y en la semilla. Las esporas que se encuentran en el suelo son la fuente primaria del inóculo; éstas producen esporidios primarios y secundarios, los cuales son dispersados por el viento e infectan las espigas penetrando directamente por las glumas y las paredes del ovario; con el tiempo forman una masa de teliosporas oscuras dentro del grano. Durante la cosecha el pericarpio que cubre las teliosporas es fácilmente roto, contaminando el suelo y la semilla sana. Los granos parcialmente infectados pueden producir plantas sanas; sin embargo, aquellos severamente afectadas pierden su viabilidad o presentan una germinación anormal (Wiese, 1987; Rai y Singh, 1978, citado por Fuentes-Dávila, 2000).

2.6.5. Condiciones ambientales que favorecen la enfermedad

La germinación de las teliosporas de *T. indica* es favorecida por temperaturas de 14-20°C y las cercanas a 17°C son consideradas óptimas; sin embargo, la enfermedad puede desarrollarse más allá de éstas, debido a que se ha observado la germinación a temperaturas extremas de 5 y 25°C, con alta humedad relativa y lluvias constantes durante la floración (Smilanick *et al.*, 1985 y Bonde *et al.*, 1997).

T. indica sobrevive en ambientes de invierno como los de Canadá. Investigaciones hechas en el CIMMYT, en México, demostraron que las teliosporas fueron viables después de dos años a temperaturas de -18°C y después de un año a -30°C (Chachal, 1992).

2.6.6. Pérdidas que ha causado la enfermedad en producción de trigo

Brennan *et al.* (1990), en un estudio realizado en el noreste de México, señaló que existen dos formas de ocasionar pérdidas por parte de *T. Indica*; por un lado se encuentran aquellas relacionadas con los costos directos como son pérdida en el rendimiento (6%), pérdida en la calidad de granos infectados (37%), pérdidas por falta de exportación en la semilla (16%); por otro lado aquellas que se dan en los costos indirectos debidos principalmente a las pérdidas por las restricciones en la siembra (29%), los costos adicionales por el transporte de semilla de áreas libres de carbón parcial (8%) y pérdidas debidas a los rechazos de grano infectado por la industria, tratamiento a la semilla y fumigación de grano (Brennan *et al.*, 1990).

El daño real de la enfermedad se encuentra en el impacto que tiene sobre la calidad del grano y la harina, por lo que el daño en el rendimiento y viabilidad sobre la semilla resulta menor (Kohli *et al.*, 1993; USDA-APIS, 1996).

Además del impacto económico que esta enfermedad ha causado en México en años recientes, ha afectado el flujo de germoplasma experimental dentro del país y a nivel internacional.

2.6.7. Distribución mundial del carbón parcial

T. indica fue identificada en la región de Karnal al noroeste de la India por Mitra en 1930 (Fuentes-Dávila, 1997). Posteriormente, se extendió al norte y noroeste de la India (1998) y Paquistán (1975); se piensa que la floración uniforme de variedades precoces y las altas dosis de nitrógeno fueron determinantes para la rápida diseminación de la enfermedad (Munjal, 1975, citado por Kohli *et al.*, 1993).

El carbón parcial del trigo está presente en Paquistán (Munjal, 1975), Nepal (Singh *et al.*, 1989), Afganistán (Locke *et al.*, 1955, citados por Bonde y Smilanick, 1999), Irak (CMI, 1989), Siria, Turquía, Suecia (Lambat *et al.*, 1983, citado Bonde y Smilanick, y Paulitz, 1995), Líbano, Santo Domingo, (NAPPO, 1993), Brasil (CABI, 2000), Estados Unidos de América (Donde *et al.*, 1997; Cunfer y Castlebury, 1999) y México (Fuentes-Dávila y Hettel, 1992).

2.6.8. Distribución nacional del carbón parcial

En 1970 se detectó en el Valle del Yaquí, Son., México. Rodríguez (2000) menciona que en 1971, fue detectado en Cd. Obregón, Son. con niveles de infestación de 0.0 y 0.2%; para 1980 se incrementó la presencia de la enfermedad en estas regiones y se extendió a los estados vecinos Sinaloa y Baja California Sur. En 1983, el gobierno mexicano impuso medidas legales para prevenir la diseminación de la enfermedad, restringiendo la siembra de trigo en campos infestados (Delgado, 1984 citado por Kohli *et al.*, 1993; Fuentes-Dávila y Hettel, 1992).

En el ciclo invierno 1984-1985 el problema se había extendido a 26,000 ha del Valle del Yaquí y 4,000 ha del Valle del Mayo, además de algunas superficies de trigo en el Valle del Carrizo y del Valle del Fuerte en el Norte de Sinaloa (Rodríguez, 2000).

En 1987 la SARH (actualmente SAGARPA) estableció la Cuarentena Interior Permanente No. 16 Contra el Carbón Parcial del Trigo *Neovossia* (*T. indica*), declarando la producción de semillas y grano en cuarentena, para los estados de Sonora (Bacum, Alamos, Rosario, Cajeme, Etchojoa, Quiriego, Guaymas, Navojoa y Huatabampo); Sinaloa (Ahome, El Fuerte, Guasave, Salvador Alvarado, Angostura y Culiacán) y Baja California Sur (Comondú). La cuarentena también señaló los procedimientos para la producción de semillas en las áreas cuarentenadas y de la movilización de equipos y maquinaria de las áreas infestadas e incluye las regulaciones para grano de trigo (Rodríguez, 2000).

En 1989 se encontraron granos infectados en dos lotes de trigo harinero en el campo experimental del CIMMYT en Atizapán, Toluca, Edo. de México (Kohli *et al.*, 1993); en el estado de Guanajuato se detectó en el municipio de Tarimoro, Apaseo el Grande e Irapuato en el estado de Guanajuato; en Irapuato se encontraron granos contaminados en bodegas, así como en Arandas, Jal. y Pastor Ortiz, Michoacán (Narro *et al.*, 2000). Para 1991-1992 se encontró en la Costa de Hermosillo y Caborca, Son. (Fuentes-Dávila, 1997).

De acuerdo a las necesidades fitosanitarias de que este patógeno no fuera movilizado la SARH crea la campaña contra el carbón parcial del trigo (1995), la cual se aplica tanto en zonas donde existe la plaga como en zonas libres reconocidas. Es dentro de estas últimas, en donde la instrumentación de medidas preventivas favorece la producción de trigo. El muestreo en campo, en centros de acopio, el diagnóstico fitosanitario, la capacitación y la divulgación son acciones que han ayudado a confirmar la ausencia del patógeno causante del carbón parcial y han permitido dar a conocer a los productores y técnicos agrícolas la importancia que tiene esta enfermedad actualmente, así como la importancia que tiene el evitar la entrada a zonas en las cuales nunca se ha presentado, y que bajo el cumplimiento de requerimiento fitosanitario se pueden llegar a declarar nacionalmente zona libres para posteriormente ser reconocidas por autoridades agrícolas de otros países (SAGAR, 2000)

2.7. Métodos de diagnóstico para carbones

2.7.1. Método tradicional

El método de laboratorio que se utiliza para la detección de *T. indica* se encuentra establecido en la NOM-001-FITO-1995 (SAGAR, 1996 y Sánchez, 2000), consiste en el lavado del grano y filtrado del líquido resultante de los granos para obtener teliosporas de carbón parcial; éstas son identificadas por características morfométricas tales como: forma, color, ornamentaciones y tamaño, entre otros.

2.7.2. Otros métodos de diagnóstico

2.7.2.1. Electroforesis de isoenzimas

La electroforesis de isoenzimas permite el análisis de los diferentes patrones proteicos que caracterizan a una especie. Las isoenzimas catalizan la misma reacción pero tienen diferente estructura molecular lo que permite diferente movilidad electroforética, las cuales son visualizadas después de la electroforesis, mediante la aplicación específica de un colorante. La presencia de los diferentes patrones de proteínas son debidos a la gran variabilidad de éstas, lo que dificulta su interpretación (Barrera *et al.*, 1993)

Las enzimas más importantes que se han utilizado para el diagnóstico de *T. indica* son la fosfato-glucosa, 6 fosfato-glucosa deshidrogenasa, manitol- deshidrogenasa, nucleosido-fosforilasa y manosa-fosfato-isomerasa (Bonde *et al.*., 1988; Bonde *et al.*., 1989). El análisis de éstas ha sido usado para distinguir aislamientos de *T. indica* y *T. barclayana*, usando extractos proteicos de teliosporas germinadas. Los métodos electroforéticos requieren experiencia para la interpretación de los diversos complejos polimórficos asociados con estas especies (Bonde *et al.*, 1989).

2.7.2.2. Análisis del DNA

La variación natural de las secuencias de DNA se puede detectar de diferentes formas, entre las que destacan la secuenciación directa; este método se ha utilizado en organismos modelo como *Arabidopsis* sp., no obstante es un método laborioso y costoso, por lo que en años recientes han surgido nuevas técnicas de uso más general, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), los polimorfismos del DNA amplificadas al azar conocidos como RAPD's por sus siglas en inglés (Random Amplified Polymorphic DNA) y los polimorfismos de la longitud de los fragmentos amplificadas, conocidos como RFLP's por sus siglas en inglés (Amplified Fragment Length Polymorphism), los cuales han sido utilizados en la taxonomía, diagnóstico, revalidación de la variación intra e interespecífica y en las relaciones filogenéticas de hongos fitopatógenos y de importancia comercial. En la actualidad estas técnicas son ampliamente utilizadas en Biología Molecular, ya que permiten el análisis del genoma, no se encuentran sujetas a cambios ambientales y pueden reducir tiempo, espacio y costo en programas de taxonomía, diagnóstico y fitomejoramiento (Rojas, 2000).

Los primeros ensayos de la PCR se realizaron en forma manual, utilizando la amplificación del fragmento de Klenow de la DNA polimerasa de la bacteria *Escherichia coli*, así como varios baños de agua para alcanzar diferentes temperaturas. Después del paso de desnaturalización, en cada ciclo se requería una nueva cantidad de enzimas para reemplazar la incluida inicialmente. Estos primeros ensayos hicieron que la PCR resultara costosa, compleja y poco eficiente (Prost y Larzul, 1989). Posteriormente con los descubrimientos de la enzima DNA polimerasa termoestable (DNA *Taq* polimerasa), aislada de la bacteria *Thermus aquaticus* y la introducción de

termocicladores automatizados permitieron disminuir significativamente el costo y hacerla más eficiente (Henson y French, 1993).

La PCR consiste en la síntesis enzimática de millones de copias de un segmento específico de DNA, es decir, es un proceso bioquímico *in vitro*, mediante el cual las cadenas individuales de DNA blanco son duplicadas por la DNA polimerasa en cada uno de los ciclos (generalmente entre 20 y 30) que integran la reacción, al final de cada uno de los cuales las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de DNA específico sometido al proceso (Barrera *et al.*, 1993; Mills, 1994).

Cada uno de los ciclos de la reacción consta de tres pasos, determinados por temperaturas y tiempos específicos, que son: 1) Desnaturalización, (92-98°C, 30 a 90 s), en el cual se separan o desnaturalizan las dos cadenas complementarias del DNA blanco; 2) alineamiento (50-60°C, 30-60 s) en el que se realiza el apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas simples del segmento de DNA blanco desnaturalizado y 3) Extensión, (70-74°C, 30-90 s), en el que la DNA polimerasa extiende la longitud de los iniciadores apareados al DNA blanco, al ir polimerizando los desoxirribonucleótidos libres, resultando en nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas presentes al inicio de la reacción (Erlich *et al.*, 1991; Barrera *et al.*, 1993).

Los reactivos requeridos para PCR son: DNA, iniciadores (oligonucleótidos, primer u oligomeros) específicos que flanquean el gen o segmento que actúa como blanco para la

amplificación; mezcla de desoxiribunucleótidos (dNTP's); solución amortiguadora de reacción y DNA *Taq* polimerasa (Barrera *et al.*, 1993; Henson y French, 1993).

En el diagnóstico clínico, la técnica ha sido utilizada en la genética, inmunología, en el campo de la Oncología y para la detección de virus; en Microbiología para el diagnóstico rápido y preciso de infecciones producidas por bacterias, hongos y virus; en la Medicina Legal la técnica ha enriquecido el análisis de las pruebas de paternidad y la identificación de individuos a través de la tipificación de regiones cromosómicas con secuencias de DNA altamente variables o polimórficas. El proyecto del genoma humano también ha recurrido a esta técnica, así como la Arqueología, la Biología Evolutiva, la Biología Molecular y la Ingeniería Genética (Henson y French, 1993). En los campos de la Biotecnología ha contribuido a facilitar el mejoramiento de plantas y animales (Erlich *et al.*, 1991; Dong *et al.*, 1992; Barrera *et al.*, 1993); en el análisis de alimentos (Niederhauser *et al.*, 1992), así como en el análisis ambiental (Bej *et al.*, 1991). En el diagnóstico de fitopatógenos, está contribuyendo en la identificación más precisa de los agentes causales de las diversas enfermedades (Mills, 1994; Clark, 1994; Schaad *et al.*, 1994).

Una modificación de la PCR son los RAPD's (Random Amplified Polimorfism of DNA). A diferencia de la PCR, en los RAPD's se emplea un oligonucleótido de secuencia arbitraria (de 9 a 10 bases) con un contenido de 50 a 80% de guanina-citocina. En teoría el número de fragmentos amplificados dependerá de la longitud de oligonucleótido y el tamaño de genoma, además de la probabilidad de que exista complementariedad entre el iniciador y el DNA blanco, pero en forma general se

pueden obtener de dos a diez productos de amplificación. Los RAPD's detectan cambios en la secuencia del DNA en un sitio arbitrario en el genoma, estos cambios se manifiestan en el número y longitud de los productos amplificados (Rojas, 2000). Este procedimiento se ha utilizado para reconocer la variabilidad genética en aislamientos de *Sclerotinia homoeocarpa* causante de la mancha dólar en pastos (Raina *et al.*, 1997); *Colletotrichum kahawae* en café (Omondi *et al.*, 1997); diferenciación de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*; o para establecer relaciones entre diferentes aislamientos de especies de hongos (Grajal *et al.*, 1993); para reconocer la variación de patogenicidad de *Botrytis cinerea* (Kerssies *et al.*, 1997); para detectar el tizón tardío (*Phytophthora infestans*) y la pudrición rosada en papa (*P. erythroseptica*) (*P. nicotianae*) (Tooley *et al.*, 1998).

Existe además un método que combina el uso de enzimas de restricción, hibridación con la PCR, y se conoce como Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de DNA amplificados (Amplified Fragment Length Polimorfism, AFLP por sus siglas en inglés) que tiene una mayor sensibilidad para encontrar las diferencias entre individuos (Vos *et al.*, 1995).

Gaudet y colaboradores (2000), por clonación y secuenciación generaron iniciadores específicos a partir del análisis de huellas genéticas generadas (más de 35) por la técnica de AFLP's, a partir de *T. indica*, *T. barclayana* y *T. walkeri*, para identificar *T. indica*.

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa ha permitido identificar diversos hongos como *Gaeumannomyces graminis* (Schesser *et al.*, 1991 citado por Mills en 1994). Mills (1994), la utilizó para identificar aislamientos de *Colletotrichum acutatum*

y *C. gloeosporioides*, los cuales no se habían podido distinguir con las técnicas morfológicas tradicionales.

Roll *et al.* (1990) usaron micelio colectado de árboles de limón infectados para detectar *Phoma tracheiphila* y tejido infectado de hojas de cebada fueron suficientes para secuenciar DNA de *Pyrenophora teres*.

Nazar *et al.* (1991) encontraron diferencias en la secuencia de las regiones de los espacios transcritos internos (ITS) del hongo de la marchitez, *Verticillium dahliae* y *V. albo-atrum* y diseñaron iniciadores que amplifican el DNA de cada especie.

También se han encontrado diferencias en las secuencias de las regiones ITS de *Leptosphaeria maculans*, lo cual permitió la identificación de aislamientos virulentos de este patógeno en hojas de canola (Xue *et al.*, 1992). En el mismo año, Lee y Taylor usaron regiones de DNA ribosomal con fines filogenéticos para ubicar especies de *Phytophthora*.

Por otro lado, *Gaeumannomyces graminis* que provoca la enfermedad de la corona y la raíz de pasto y cereales fue detectado por PCR usando fragmentos de DNA mitocondrial de aproximadamente 450 pb (Henson *et al.*, 1993).

2.7.2.2.1. La técnica de PCR para el diagnóstico de *T. indica*

Para la detección y diferenciación de *T. indica* de otras especies, se han utilizado secuencias específicas del DNA mitocondrial (DNAMt) a partir del micelio (Ferreira *et*

al., 1996); del mismo modo Frederick *et al.* (2000) analizaron el DNAm_t mediante la PCR para amplificar un fragmento de 2.30 Kb para *T. indica* que la diferencio de *T. walkeri*. Por otro lado, Levy *et al.* (2000) diferenciaron a *T. indica* de otras especies que atacan pastos por medio de los espacios transcritos internos (ITS1/ITS2) del DNA ribosomal (DNAr) y encontraron que la enzima de restricción ScaI no digirió los fragmentos amplificados por PCR con el iniciador ITS1 de *T. indica* pero sí los de otras especies de *Tilletia*.

Smith *et al.* (1996) utilizaron dos juegos de iniciadores desarrollados por análisis de secuenciación de fragmentos clonados con la enzima DraI de DNA mitocondrial de *T. indica*. El primer par de iniciadores TI17M1 (5'-TCCCCTTGGATCAGAACGTA-3') y TI17M2 (5'-AGAAGTCTAACTCCCCCCTCT-3') derivados del clon pTIMD17 amplificaron un producto de 825 pares de bases (pb) para todos los aislamientos de *T. indica* y no para otras especies del género; el par de iniciadores (primers) TI57M1 (5'-TTTTCCCTCTCTCCTTTTTTCA-3') y TI57M2 (5'-AGCAAAGACAAAGTAGGCTTCC-3') derivados del clon pTIMD57 produjeron un fragmento de 118 pb, el cual fue único para *T. indica*. La especificidad de los productos amplificados para *T. indica* fue confirmado por hibridación (southern-blot) usando las sondas PTI-MD17 ó PTI-MD57 marcadas con ³²P. El método también empleó un control de PCR usando los iniciadores que amplifican regiones altamente conservadas, tales como los espacios internos transcritos (ITS) del DNA ribosomal reportado en la literatura para diversos grupos de hongos; todas las especies de *Tilletia* amplificaron un fragmento de 420pb usando los iniciadores ITS3 e ITS4 como testigos. Estos resultados demostraron que la PCR fue negativa para *T. barclayana* y especies de *Tilletia* spp.,

usando iniciadores específicos de *T. indica*, los cuales no estuvieron asociados con la degradación de DNA micelial o por la presencia de inhibidores de PCR. Usando teliosporas germinadas a partir de semillas procesadas con el método de extracción del lavado del grano, demostraron que es suficiente detectar con un nivel de infestación de cinco teliosporas x 50 gramos de muestra. Del mismo modo McDonald *et al.*, (1999) probaron los mismos iniciadores y demostraron que fue suficiente una teliospora para el desarrollo de esta técnica.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Origen de las cepas utilizadas

Las cepas utilizadas se extrajeron de granos de trigo infectados e infestados con teliosporas de *T. indica* (Fig. 1). También se trabajó con grano infestados con *T. tritici* y grano de arroz (*Oryza sativa* L.) infestado con *T. barclayana*; estas cepas fueron proporcionadas, por el CNRF-DGSV. Dichas cepas fueron corroboradas mediante claves taxonómicas (Durán y Ficher, 1967) para este estudio.

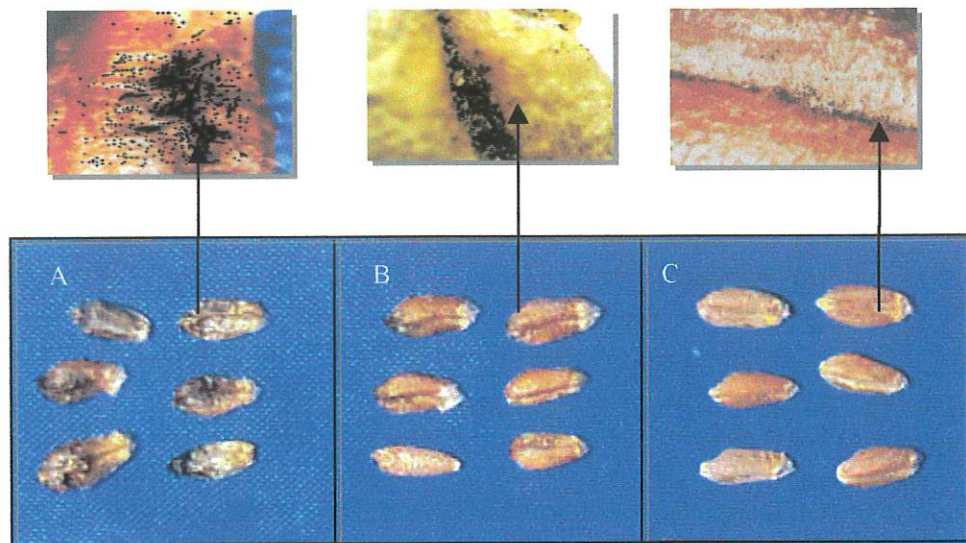


Fig. 1. Grano de trigo con diferentes grados de daño: A) Severamente infectados; B) Medianamente infectados y C) Con teliosporas adheridas (infestadas).

Se utilizó una cepa con micelio joven (30 días de edad) la cual fue proporcionada por el Programa de Carbón Parcial del Trigo del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) de Sonora.

Para la extracción de DNA de *T. indica*, *T. tritici* y *T. barclayana*, se tamizaron teliosporas a partir de granos dañados y del macerado directo de granos infectados e infestados de *T. indica*. Estos procedimientos se describen a continuación:

3.2. Extracción de teliosporas

De un kilogramo de trigo se tomaron cuatro muestras de 50 g las cuales se colocaron en matraces con 100 mL de agua + 2 gotas de tween 20 y se agitaron por 30 min. El sobrenadante obtenido se filtró a través de dos mallas, una de ellas de 50 μ para retener las impurezas y otra de 20 μ para retener las teliosporas. Se colectaron de tamiz de 20 μ , se recogió en un vaso de precipitado pequeño, y se filtró a través de papel Whatman No. 1, colocado en un embudo Buchner de 8 cm de diámetro. Dicho embudo se colocó en un matraz kitasato unido a una bomba de vacío de 1 HP. Una vez que el líquido se eliminó por presión negativa, los filtros se transfirieron a cajas Petri y se procedió a su observación al microscopio estereoscópico para determinar la presencia o ausencia de las teliosporas y en su caso identificarlas mediante características morfológicas por medio de Claves taxonómicas.

3.3. Protocolos de extracción de DNA

Para la extracción de DNA las teliosporas que se encontraron en la malla de 20 μ se recuperaron en un vaso de precipitados de 50 mL, dejándose precipitar en el fondo del vaso por 3 h. Finalmente se tomaron las esporas con una micropipeta, colocándose en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL para ser centrifugadas por 10 min a 14000 rpm y así obtener una pastilla de aproximadamente. 0.1 g para llevar a cabo la extracción de DNA.

Se probaron cuatro protocolos de extracción para micelio, teliosporas y granos infectados e infestados: Dellaporta *et al.*, (1983), Plant DNAzol Reagent® (GIBCO BRL), Nucleon Phytopure (Amersham Life Science) y Hexadeciltrimetilamonio-CTAB- (Doyle y Doyle 1987).

3.3.1. Método de Dellaporta *et al.*, 1983

Se maceró en un mortero 0.1 g de tejido (micelio, teliosporas y grano de trigo infestados e infectados con teliosporas de *Tilletia* spp.) en nitrógeno líquido (N₂); el macerado fue vertido en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL; se adicionaron 500 µL Buffer de extracción (Apéndice 1) y 300 µL de SDS al 20 %, se agitó en vortex (Maxi mix II). La mezcla se colocó en baño María a 65°C por 20 min; transcurrido este tiempo, se adicionaron 160 µL de acetato de potasio 5M y se colocó en hielo durante 20 min; se centrifugó a 16000xg/4° C por 15 min; posteriormente, se adicionaron 350 µL de isopropanol frío, se agitó por inversión y se incubaron a -20°C durante 1 h o toda la noche, después se centrifugó a 16000xg durante 20 min y el sobrenadante fue desechado; la pastilla fue secada a temperatura ambiente y disuelta en 100 µL de buffer TE (Apéndice 2) en baño María a 60°C. Se adicionaron 50 µL de Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se homogenizó en vortex, la mezcla se centrifugó a 13000xg durante 5 min. El sobrenadante se colocó en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL estéril, se agregaron 45 µL de cloroformo y se homogeneizó en vortex, la mezcla se centrifugó a 13000xg durante 5 min. Al sobrenadante obtenido se le adicionaron 40 µL de cloroformo y se centrifugó a 13000xg por 5 min; al sobrenadante obtenido se le

agregaron 3 μL de NaOAc, 16 μL de isopropanol frío y se incubó por 30 min a -20°C ; se centrifugó por 10 min a 13000xg; el sobrenadante se desechó y la pastilla fue lavada con 200 μL de etanol al 70% en vortex, se centrifugó a 13000xg durante 5 min y la pastilla se secó durante 10 min. Finalmente, se disolvió en 50 μL de agua desionizada estéril y se almacenó a -70°C .

3.3.2. Método Plant DNAzol Reagent®

Se maceró 0.1 g de tejido en N_2 líquido; se mezcló con 300 μL de Plant DNAzol Reagent® (GIBCO BRL LIDETECHNOLOGIES) en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL estéril. Se incubó a temperatura ambiente por 5 min; se adicionaron 300 μL de cloroformo; se mezclaron en vortex vigorosamente y se incubaron en agitación a temperatura ambiente por 5 min; posteriormente se centrifugó a 12000xg por 10 min, el sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL estéril, se precipitó con 250 μL de etanol absoluto, se mezcló por inversión de 6 a 8 veces y se incubó a temperatura ambiente por 5 min; se centrifugó a 5000xg por 4 min; la pastilla se lavó con Plant DNAzol Reagent®-etanol (1 volumen de DNAzol con 0.75 volúmenes de etanol absoluto), se mezcló con 300 μL de solución de lavado y se homogeneizó en un vortex, se incubó a temperatura ambiente por 5 min y se centrifugó a 5000xg durante 4 min, se volvió a lavar con 300 μL de etanol al 70% y se centrifugó a 5000xg por 4 min; la pastilla se resuspendió en 50 μL de agua desionizada-estéril y se almacenó a -70°C .

3.3.3. Método del Nucleon Phytopure®

Se pesó 0.1 g de tejido y se maceraron en N₂ líquido; el macerado se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, se adicionaron 600 µL de reactivo 1 (Amersham LIFE SCIENCE, 1997) y se mezclaron; se agregaron 200 µL de (reactivo 2 del Nucleon Phytopure®) se mezclaron por inversión para homogeneizar y se incubó a 65°C, con agitación por 10 min. La muestra se colocó en hielo por 20 min, se adicionaron 500 µL de cloroformo frío y 100µL de Nucleon Phytopure®; y se agitó por 10 min; se centrifugó a 1300xg por 10 min y la fase acuosa se transfirió a otro tubo. El DNA fue precipitado con un volumen igual de isopropanol frío y se mezcló por inversión; se centrifugó a 4000xg durante 5 min; la pastilla se secó por 10 min y se resuspendió en agua bidestilada estéril.

3.3.4. Método de Doyle y Doyle, 1987 (CTAB)

Se congeló 0.1 g de cada una de las muestras (micelio, teliosporas y granos infectados e infestados) a -70°C toda la noche; la pastilla se maceró en una cápsula de porcelana (estéril y congelada), se colocó en un tubo estéril de 1.5 mL estéril y se adicionó 1 mL de buffer de extracción (Apéndice 3), mezclándose en vórtex; el volumen se dividió en dos partes iguales y se agregaron 25 µL de SDS al 20%; se mezclaron con vórtex e incubaron a temperatura ambiente por 1 h con agitación lenta; se agregaron 75 µL de NaCl 5M y 65 µL de solución CTAB (Apéndice 4) y se mezcló e incubó a 65°C por 15 min, la solución se dividió en dos tubos de microcentrífuga de 1.5 mL estéril y se agregó un volumen igual de cloroformo-alcohol-isoaminico (24:1), se mezcló en vórtex y se centrifugó a 13000xg por 12 min; la fase acuosa se transfirió a un tubo de

microcentrifuga de 1.5 mL estéril. El DNA se precipitó con 0.6 volúmenes de isopropanol frío y se incubó a -20°C por 30 min ó toda la noche; transcurrido este tiempo, se centrifugó a 13000xg durante 5 min; la pastilla se lavó con 500 μL de etanol frío al 70% con vórtex y se centrifugó a 13000xg por 5 min. La pastilla se secó a temperatura ambiente y se disolvió en 40 μL de agua bidestilada estéril y se almacenó a -70°C .

3.4. Cuantificación de ácidos nucleicos

Para determinar la pureza se tomaron 6 μL del DNA y se mezclaron en 54 μL de agua destilada estéril (dilución 1:10). La dilución fue colocada en una celdilla de cuarzo con capacidad de 60 μL , (tipo 105.205.01-S1) de espectofotómetro (Spectronic) y se leyó a una longitud de onda de 260 y 280 nm. Una vez obtenida la lectura. Se determinó la concentración del DNA ($\mu\text{g}/\text{mL}$) realizando el siguiente cálculo:

Factor de dilución = $\frac{\text{Volumen total en la celda}}{\text{Volumen de la muestra}}$

Conc. de DNA = (Factor de dilución)(50)(lectura a 260 nm).

La calidad de DNA se determinó dividiendo la lectura de 260 nm entre la lectura de 280 nm. Teniendo que un buen DNA debe dar valores entre 1.7 y 2.0 (Sanbrook, 1988).

La integridad de los ácidos nucleicos fue observada en electroforesis con un gel de agarosa colocando una alícuota de 5 μ L (5 μ g/ μ L) de buffer de carga (Apéndice 5), el cual fue cargado en un gel de agarosa al 0.8% y teñido con una solución de bromuro de etidio (1 μ g/ μ L) (Apéndice 6). Se utilizaron 5 μ L del marcador de peso molecular (0.5 mg/ μ L) ladder 1Kb-(GIBCO BRL LIFE TECHNOLOGIES). Una vez colocado el gel en la cámara de electroforesis fue cubierto con amortiguador Buffer TAE (Apéndice 7). Las muestra fueron corridas a 80 voltios por 30 min; transcurrido este tiempo, el gel fue expuesto a un transiluminador de luz ultravioleta (Ultra-Lum).

3.5. Estandarización de las condiciones de PCR

Se utilizaron los iniciadores descritos por Smith *et al.* (1996) TI17M1 (5'-TCCCCTTGGATCAGAACGTA-3') y TI17M2 (5'-AGAAGTCTAACTCCCCCCTCT-3') a una concentración 3mM. Las cantidades de DNA probadas fueron 100, 75, 50, 25, 10 ng. Otros parámetros evaluados fueron las concentraciones de MgCl₂ (6, 4, 3, 2 y 1.5 mM). Las cantidades probadas de *Taq* DNA polimerasa fueron 2.5, 1.5, 1, 0.75 y 0.5 U; solución amortiguadora (Buffer 1X) y los dNTP's no se sometieron a variación debido a que existen antecedentes de que la reacción no es sensible a las variaciones de este factor Barrera *et al.* (1993). La reacción fue completada a 50 μ L con agua destilada estéril. Al final se agregó una gota de aceite mineral para evitar la evaporación. Los programas térmicos estandarizados fueron 94°C de desnaturalización; 50, 60 y 65°C de apareamiento y 72°C de polimerización con tiempo de 1'-1'-2' el número de ciclos también se optimizó probando 35, 45 y 70 ciclos con las mismas condiciones de tiempo; al final se dió una extensión de 72°C durante 4 min. Para todas las reacciones se utilizó

un termociclador Biometra. Adicionalmente, se evaluó la capacidad de amplificación por PCR utilizando DNA extraído por los cuatro métodos mencionados anteriormente.

3.6. Separación de los productos amplificados

Los productos amplificados fueron observados por corrimiento de electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, el cual fue teñido con una solución de bromuro de etidio ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$), y cubierto con TAE 1X (Apéndice 7) y corrida a 80 voltios 30 min. Se incluyó un carril con un marcador de peso molecular de 100 pb (Ladder GIBCO BRL). Los fragmentos amplificados fueron observados en un transiluminador de luz ultravioleta.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Material biológico utilizado

4.1.2. Características morfológicas de las cepas utilizadas

Las teliosporas de la cepa de *T. tritici* se reconocieron por presentar paredes gruesas con una apariencia de red, cubierta por una gelatina semitransparente de color amarillo claro, globosas a subglobosas y de 15 a 23 μm de diámetro en promedio; estas características corresponden con las mencionadas por Durán y Fischer, (1961); Zillinsky, (1984); Wiese, (1987) y Romero (1994) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Características distintivas de *T. tritici* con base a teliosporas (Durán y Fischer, 1961; Zillinsky, 1984; Wiese, 1987 y Romero, 1994).

Carácter	Literatura	*Observación
Tamaño μm	15-23	17.5-22.5
Color	Amarillo claro a gris o café rojizo	Amarillas claro
Morfología	Globosa, paredes reticuladas	Globosa a subglobosa

*Promedio de 15 observaciones.

Las teliosporas encontradas en los granos de arroz presentaron 21-30 μm de diámetro en promedio; esporas globosas a subglobosa; reticulaciones delgadas curvas y conspicuas en el ápice. Estas características corresponden a *T. barclayana* las cuales la diferencian de *T. indica*, como lo reportan Durán y Fischer (1961); Romero, (1994) y CABI (1999) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Características observadas y reportadas para *T. barclayana* con base a las teliosporas (Durán y Fischer, 1961, CABI, 1999 y Romero, 1994).

Carácter	Literatura	*Observación
Tamaño μm	21-30	27.5-30
Color	Café amarillo a café olivo	Café amarillas a café oscuro
Morfología	Globosa a subglobosa con reticulaciones y espinas	Globosa a subglobosa
Espinas	Delgadas curvas y conspicuas en el ápice	Delgadas curvas en el ápice

*Promedio de 15 observaciones.

La cepa de *T. indica* fue identificada por las siguientes características teliosporas de 22-61 μm de diámetro, color café oscuro a negros, de forma globosa a subglobosa y espinas truncadas; estas características corresponden con las citadas por Durán y Fischer (1961), Zillinsky (1984); Romero (1994) y NAPO, (1999) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Características distintivas de *T. indica* con base a teliosporas (Duran y Fischer, 1961; Zillinsky, 1984; Romero; 1994 y NAPO, 1999).

Carácter	Literatura	*Observación
Tamaño μm	22-61	37.5-42
Color	Café oscuro a negro	Café oscuro a negros
Morfología	Globosa a subglobosa	Globosa a subglobosa
Espinas	Con reticulaciones y espinas Truncadas y una capa hialina cubriendo a las espinas	Truncadas con una capa hialina que cubre a las espinas.

*Promedio de 15 observaciones.

El micelio de la cepa de *T. indica*, producido en medio de cultivo Agar-Agua (1.5 a 2 %), tuvo crecimiento tipo levaduriforme y de color blanco cremoso.

4.2. Extracción de DNA de *T. indica*

4.2.1. Determinación de la concentración del DNA

Los rendimientos individuales del DNA total en cada muestra por los métodos descrito anteriormente, mostraron una consistencia relativa al menos entre las muestras de teliosporas y grano (total y parcialmente infectados y teliosporas adheridas al grano) (Cuadro 5), ya que la muestra de micelio tiene valores de rendimiento de DNA inferiores a las otras dos muestras en varios de los métodos de extracción realizados, excepto con el método de Plant DNAzol Reagent® (micelio=2.62 µg/µL). El mayor diferencial de rendimiento entre métodos se observa en la muestra del grano con un cálculo de 17.98 µg/µL de DNA total por 0.1 g de tejido, mismo que se obtuvo de la diferencia entre el mayor rendimiento del DNA (método de Nucleon Phytopure®) y el menor rendimiento (método Plant DNAzol Reagent®). Esto se puede explicar debido que este método (Nucleon Phytopure®) fue originalmente descrito para extracción de ácidos nucleicos de grano (Amersham LIFE SCIENCE ,1997) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Relación promedio de rendimiento $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ obtenidos del DNA extraído de micelio, teliosporas y grano.

Métodos utilizados/muestras	Micelio	Teliosporas	Grano (total, parcialmente infectados) y teliosporas adheridas al grano	Promedio general
Dellaporta 1983	0.15	0.45	1.45	0.68
CTAB	0.51	7.46	2.82	3.59
Nucleon Phytopure®	1.03	8.01	19.34	9.46
Plant DNAzol Reagent®	2.62	0.78	1.3	1.58

Al comparar los métodos de extracción en la columna de valores promedio de las observaciones, el método del Nucleon Phytopure® resultó superior a los otros, ya que se obtuvieron $9.46 \mu\text{g}/0.1 \text{ g}$ de tejido, seguido por el método de CTAB con $3.59 \mu\text{g}/0.1 \text{ g}$ el Plant DNAzol Reagent® con $1.58 \mu\text{g}/0.1 \text{ g}$; en tanto, que con el método de Dellaporta *et al.* (1983) se obtuvieron en promedio $0.68 \mu\text{g}/0.1 \text{ g}$, aunque como se verá más adelante esto no impidió que se obtuvieran resultados aceptables en la detección por PCR.

4.2.2. Calidad del DNA

Para analizar la calidad del DNA, se tomó en cuenta el parámetro “relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm”, la cual debe estar entre 1.7 y 2.0 para ser considerado de buena calidad (Sambrook *et al.*, 1988), ya que frecuentemente el DNA viene mezclado con proteínas, fenoles y polisacáridos. Este requisito se logró con los métodos de Hexadeciltrimetil amonio CTAB Doyle y Doyle (1987) y Dellaporta *et al.* (1983) los cuales tuvieron una relación promedio de absorbancia de 1.92 y 1.7, respectivamente, en tanto que los otros métodos dieron valores promedios de 1.5 de pureza; sin embargo,

para el caso de la muestra “teliosporas” se tuvo buena lectura con los métodos comerciales del Plant DNAzol Reagent® y Nucleon Phytopure® (Cuadro 6).

Cuadro 6. Relación promedio de absorbancias (260/280 nm) obtenido del DNA extraído de micelio, teliosporas y grano.

Métodos utilizados/muestras	Micelio	Teliosporas	Grano (total, parcialmente infectados y teliosporas adheridas al grano)	Promedio general
Dellaporta 1983	1.6	1.5	1.8	1.6
CTAB	1.7	2	2.0	1.9
Nucleon Phytopure®	1.5	1.7	1.4	1.5
Plant DNAzol Reagent®	1.6	2.0	1.3	1.6

La integridad de DNA se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. En la Figura 2, se muestran las imágenes de los cuatro métodos probados conteniendo una alícuota (5 µL) del DNA obtenido de todos los tejidos probados: micelio, teliosporas aisladas y teliosporas en grano (severa y parcialmente infectados y grano con teliosporas adheridas de *T. indica*). Existe una coincidencia parcial entre lo observado y lo estimado, ya que la imagen del método Nucleon Phytopure® muestra mayor concentración en ambos criterios (cantidad promedio 9.46 µg/0.1 g e integridad del DNA), lo mismo para CTAB; sin embargo, el método de Dellaporta *et al.*, 1983, muestra cantidad de DNA baja pero una buena integridad.

La estimación de la concentración de DNA por la intensidad de fluorescencia emitida por el bromuro de etidio es considerada por algunos autores (Sambrook *et al.*, 1989) como la medición más precisa de la calidad y cantidad del DNA, con mayor razón cuando hay

impurezas como proteínas y fenol, puesto que es una observación directa, aunque tiene la desventaja de ser una carácter estrictamente visual. Los cuatro métodos fueron evaluados con los mismos tejidos para *T. indica*, *T. tritici* y *T. barclayana* con resultados similares.

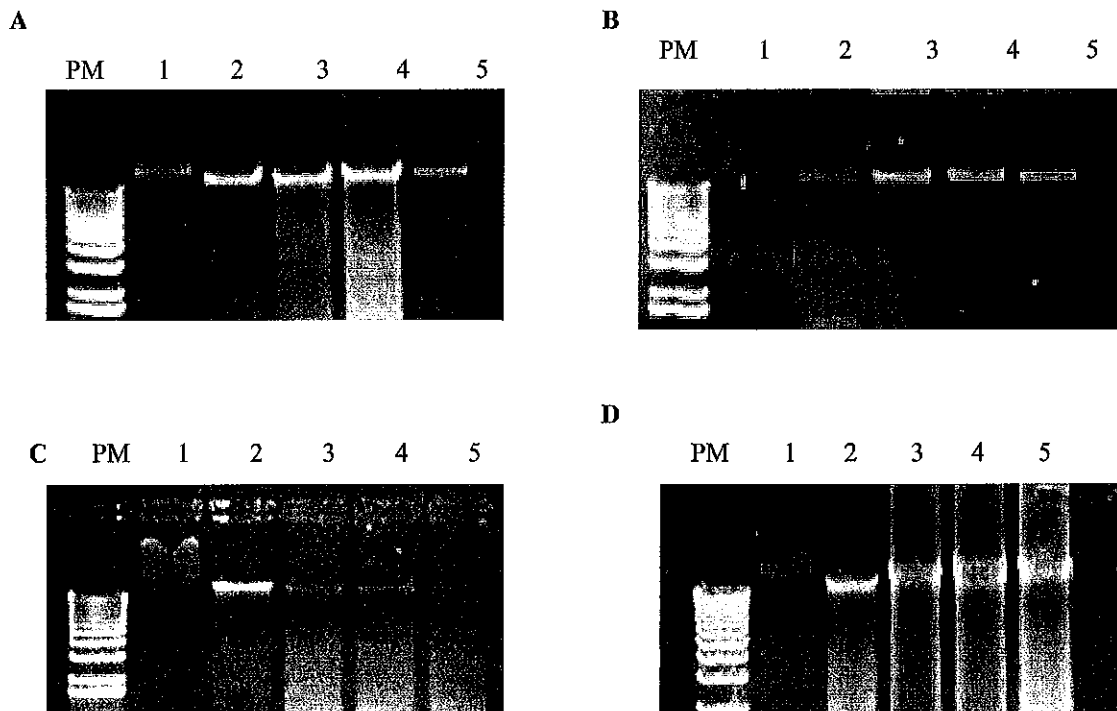


Fig. 2. Cantidad del DNA de *T. indica*, observada por electroforesis en gel de agarosa (0.8%) de las muestras (0.1 g) de 1=Micelio; 2=Teliosporas; 3=Granos severamente infectados, 4=Grano parcialmente infectado, 5=Grano con teliosporas adheridas. Con los métodos Doyle y Doyle, 1987 (CTAB) (A), Dellaporta *et al.*, 1983 (B), Plant DNAzol Reagent® (C) y Nucleon Pytopure® (D).

Los elementos revisados hasta el momento parecen indicar que los métodos Nucleon Pytopure® y CTAB reúnen un mayor número de atributos de rendimiento e integridad del DNA para los fines deseados; sin embargo, de éstos, el método de Nucleon

Phytopure® resulta ser, en comparación con el número de muestras procesadas con el kit (Amersham LIFE SCIENCE), el más costoso a diferencia del CTAB.

Tanto el rendimiento (medición por espectofotómetro) y la integridad de DNA (observación en gel de agarosa) indican que el mejor método de extracción y purificación del DNA de los tejidos probados de *T. indica* es el Nucleon Phytopure® (Fig. 2D) debido a que reúne los atributos deseados; el método del CTAB, es el segundo mejor para todos los tejidos observando una cantidad promedio de 3.9 µg/µL y una integridad buena (Fig. 2A) . Por otro lado, el método del Plant DNAzol®, sólo mostró una banda bien definida para la muestra de teliosporas (Fig. 2C) y poca cantidad. El método Dellaporta *et al.*, (1983) (Fig. 2B) mostró, buena constitución pero poco rendimiento y calidad (1.7) para teliosporas.

4.3. Optimización de las condiciones de PCR

Se logró la amplificación con el parámetro 94-60-72°C, obteniéndose un producto de 825 pb (Fig. 3) con todos los ciclos térmicos (35,45,70) se observó el mismo producto amplificado; lo cual indica que 35 ciclos son suficientes para amplificar el DNA de *T. indica* a partir de los iniciadores utilizados, sin embargo, se pueden utilizar hasta 70 ciclos cuando la cantidad de DNA es mínima (McDonald *et al.*, 1999).

Para el caso de la enzima DNA *Taq* polimerasa, se partió utilizando 2.5 unidades con la cual hubo amplificación; sin embargo, debido al alto costo de la misma fue necesario

minimizar la cantidad por reacción, probándose también 1.5, 1.0, 0.75 y 0.5 unidades, la mejor amplificación se obtuvo con 1 unidad (Cuadro 7).

Cuadro 7. Cantidades de cada uno de los componentes de la mezcla de reacción, para la estandarización de las condiciones de PCR

Buffer 10X PCR	DNTP's	Iniciadores TI17M1/ TI17M2	<i>Tap Pol</i> (Amplitaq)	DNA	MgCl ₂
1 X	200 µM	3 µM	2.5 U	100 ng	6 mM
1 X	200 µM	3 µM	1.5 U	75 ng	4 mM
1 X	200 µM	3 µM	1.0 U	50 ng	3 mM
1 X	200 µM	3 µM	0.75 U	25 ng	2 mM
1 X	200 µM	3 µM	0.5 U	10 ng	1.5mM

La concentración de MgCl₂, ideal fue 4 mM, con la cual se obtuvo el fragmento esperado (Cuadro 7). La concentración optima de DNA fue 50 ng, que corresponde a la citada en la literatura, y con la cual se obtuvo amplificación. La concentración de los demás reactivos no se variaron debido a que la literatura (Barrera *et al.*, 1993) reporta que no son sensibles a variación.

Para amplificar el fragmento esperado de 825 pb (Smith *et al.*, 1996), se probaron los DNA's obtenidos de cada uno de los tejidos utilizados (micelio, teliosporas aisladas, grano severa, ligeramente infectados y grano con teliosporas adheridas) con los cuatro métodos de extracción de DNA. En todos se obtuvo al menos amplificaciones para uno de los tejidos probados (Fig. 3); sin embargo, para el método del CTAB se obtuvo amplificación en todos ellos debido principalmente a que las lecturas de absorvancia de 260-280 nm caen en el parámetro óptimo (1.7-2.0). Para el caso del método de Dellaporta *et al.* (1983) hubo amplificación en todos, excepto en el tejido de grano con

teliosporas adheridas, posiblemente debido a la naturaleza del tejido, pues es rico en polisacaridos los cuales pueden inhibir la reacción (Barrera *et al.*, 1993). El método de Nucleon Phytopure® fue también bueno para todos los tejidos probados excepto para micelio; esto se debe probablemente, a la baja pureza observada (1.5); el método de PlantDNAzol Reagent® solo amplificó el fragmento esperado en el micelio y teliosporas, esto quizás debido a que este método fue diseñado para extracción de DNA de plantas pero no para grano; este resultado corresponde con las lecturas de pureza (micelio=1.6 y teliosporas=2.0, con las cuales se obtiene amplificación) (Cuadro 6).

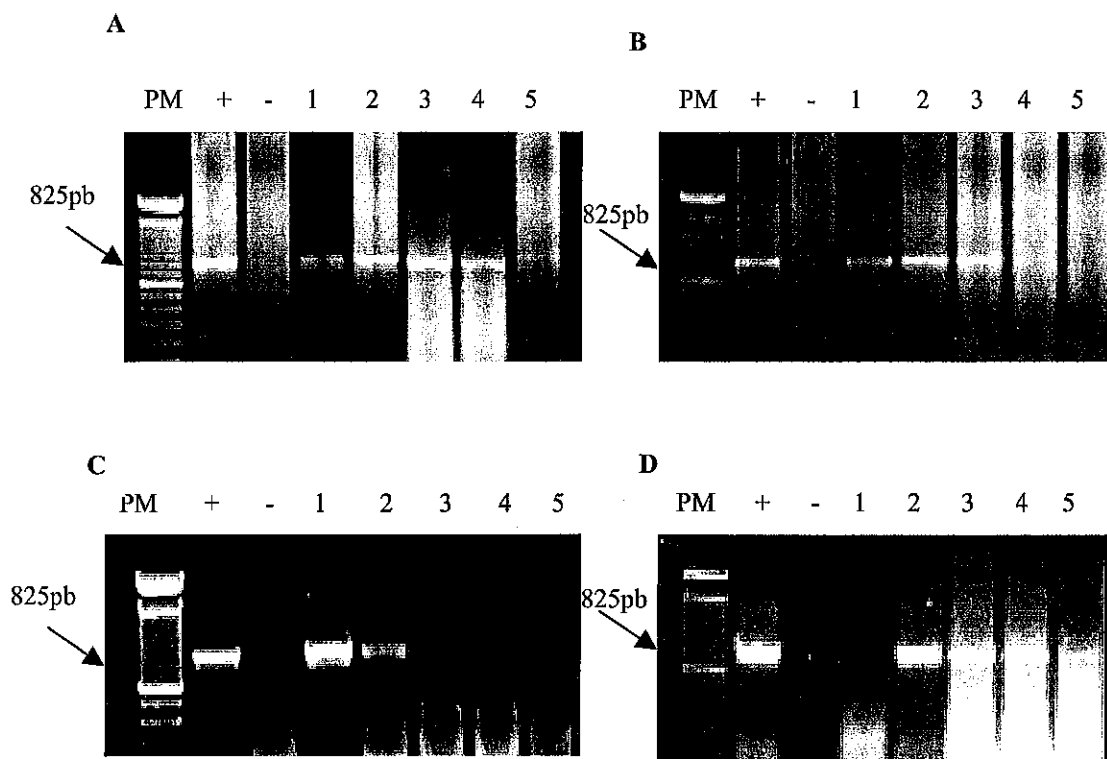


Figura 3. Productos amplificados a partir del DNA de *T. indica*, de 825 pb con los iniciadores TI17M1 y TI17M2 observados por electroforesis en gel de agarosa (1.2%) de las muestras de 1=Micelio (0.1g); 2=Teliosporas (0.1g); 3=Granos severamente infectados), 4=Grano parcialmente infectado, 5=Grano con teliosporas adheridas. Con los métodos Doyle y Doyle, 1987 (CTAB) (A), Dellaporta *et al.*, 1983(B), Plant DNAzol Reagent® (C) y Nucleon Phytopure® (D).

Los métodos analizados de extracción de DNA, sugieren que el método que reúne la mayor cantidad de atributos para la Reacción en Cadena de la Polimerasa es el CTAB (Fig. 3A), seguido del Nucleon Phytopure® (Fig. 3D), Dellaporta *et al.*, (1983)(Fig. 3B) mientras que el método de PlantDNAzol Reagent® (Fig. 3C) no reúne dichas características.

V. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos y bajo las condiciones que prevalecieron durante el desarrollo de esta investigación se llegó a las siguientes conclusiones:

Es factible la detección rápida y precisa de *T. indica* con todos los tejidos mediante la técnica PCR.

De los cuatro métodos de extracción de DNA evaluados, el que cumplió los parámetros óptimos fue el CTAB seguido por el Nucleón Phytopure®, debido al buen rendimiento y pureza necesarios para la detección de *T. indica* (por esta técnica).

De todos las fuentes de DNA evaluadas, las teliosporas siempre presentaron amplificación.

Las condiciones evaluadas con las que se obtuvo amplificación fueron las siguientes: 1 X de Buffer de PCR, 200 μ M dNTP's, 3 μ M de iniciadores, 1 U de *Taq* Pol (amplitaq), 50 ng de DNA blanco, 4 mM de $MgCl_2$; el programa de amplificación fue 94, 60,72 (grandos centigrados de desnaturalización, apareamiento y polimerización) y los tiempos de 1'- 1'- 2', respectivamente durante 35 ciclos, con las cuales se amplificó el fragmento esperado (825 pb).

Las especies de *T. indica* de *T. barclayana* y *T. tritici* pueden diferenciarse por PCR cuando se usaron los iniciadores TI17M1/M2 reportados por Smith *et al.* (1996).

Mediante este estudio se determinó que la PCR es una buena técnica para complementar el diagnóstico de *T. indica*.

VI. LITERATURA CITADA

- Agrios G., N. 1985. Fitopatología. Limusa, México. 756 p.
- Alderman, S.D. Frederickson, G. Milbrath, N. Montes, J. Navarro-Sánchez, G. Odvody. 1999. Guía para la identificación de *Claviceps purpurea* y *Claviceps africana* en muestras de semilla de sorgo y otros cereales. Asoc. Mex. de semillas; Asoc. Amer. de semillas, Asoc. de semillas de Oregon y Asoc. de semillas de Texas, 18p.
- Amersham LIFE SCIENCE. 1997. Nucleon extraction and purification protocols, England. pp 20
- Barrera-S., H., A. Ortiz L., R. Rojas M., A. y Reséndez, P.D. 1993. Reacción en Cadena de la Polimerasa. Ciencia y Desarrollo. 18:50-60.
- Bej, A. K., Mahbubani M., H. Dicesare, J.L. and Atlas, R.M. 1991. Polymerase chain reaction-gene probe detection of microorganisms by using filterconcentrated samples. Applied DNA Environmental Microbiology 57: 3529-3524.

- Blanco A., M. 1998. Efecto de enfermedades fungosas en trigo (*Triticum aestivum* L.) de temporal. Tesis Maestro en Ciencias. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Texcoco, Edo. de México. 125 p.
- Bonde, M., R. Peterson, G. L., and Royer, M.H. 1988. Inheritance of isozymes in the smut pathogen *Tilletia indica*. *Phytopathology* 78:1276-1279.
- Bonde, M., R. Peterson, G. L. and Matsumoto, T. T. 1989. The use of isozymes to identify telospores of *Tilletia indica*. *Phytopathology* 79:596-599.
- Bonde, M., R., Peterson, G. L. Schaad, N., W. and Smilanick, J., L. 1997. Karnal bunt of wheat. *Plant Disease* 81 (12): 1370-1377.
- Bonde, M., R. and Smilanick, J., L. 1999. Karnal Bunt a Fungal Disease of Wheat. 15 p.
- Brennan, J.P., Warham, E.J., Hernández, J., Byerley, D. and Coronel, F. 1990. Economic Losses from Karnal bunt of wheat in México. CIMMYT. Economic Working Paper. 90/02.
- Briggle, W.L. 1980. Documenta Ciba-Geigy. Wheat: Origin and Botany of wheat. 6-13pp.
- CABI. 2000. Crop Protection Compendium. Global Module. 2000 edition. Centre for Agriculture and Bioscience International. United Kingdom.

- Camacho, C.M.A. 1997. El Trigo en el Contexto de la Producción Agrícola Nacional y Mundial En: Memorias del Primer Simposio Internacional de Trigo realizado del 7 al 9 de abril de 1997 en Cd. Obregón, Son. 203 p.
- Clark, M.F. 1994. The Identification and Characterization of Pest Organisms: Immunodiagnosis Methods Using Polyclonal and Monoclonal Antibodies. Hawksworth, D.L. CAB International. Wallingford, United Kingdom. 377-393pp.
- CMI Distribution Maps of Plant Diseases. 1989. *Tilletia indica* Map No.173. Commonwealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, Oxon, U.K.
- Cunfer, B.M. and Castlebury, L.A. 1999. *Tilletia walkeri* on annual ryegrass in wheat fields in the southeastern United States. Plant Disease 83:685-689.
- Chachal, S.S., and Mathur, S.B. 1992. Germination of deep-frozen *Tilletia indica* and *Tilletia barclayana* teliospores. FAO Plant Protection Bull. 40 (1-2): 31-35.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1:19-21.
- Dong, L. C., Sun, C. W., Thies, K. L., Luthe, D. S., and Graves, C. H., 1992, Use of polymerase chain reaction to detect pathogenic strains of *Agrobacterium*. Phytopathology 82: 434-439.

- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Dubin, H.J., Gilchrist, L., Reeves, J. and McNab, A. 1996. *Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects*. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, El Batán, México. 130 p.
- Durán, R. and Fischer, W.G. 1961. *The Genus Tilletia*. Washington State University, U.S.A. 138 p.
- Erllich, U.A., Gelfand, D. and Sninsky, J.J. 1991. Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. *Sc.* 252:1643-1650.
- Ferreira, M.A.S. V., Tooley, P. W., Hatziloukas, E., Castro, C. and Schaad, N.W. 1996. Isolation of species-specific mitochondrial DNA sequences for identification of *Tilletia indica*, the Karnal bunt of wheat fungus. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:87-93.
- Frederick, R.D., Snyder, K.E., Tooley, P.W., Berthier-Schaad, Y., Peterson, G.L., Bonde, M. R., Schaad, N.W. and Knorr D.A. 2000. Identification and differentiation of *Tilletia indica* and *T. walkeri* using the Polymerase Chain Reaction. *Phytopathology* 90:951-60.

Fuentes-Dávila, G. y Hettel, G.P. 1992. Estado actual de la investigación sobre el carbón parcial en México. En: Reporte Especial de Trigo No. 7. México, D.F.: CIMMYT. 41 p.

Fuentes-Dávila, G. 1997. Carbón parcial del trigo, Situación Actual y Pespectivas. Memoria del Primer Simposio Internacional del Trigo. Cd. Obregón, Son. México. 203.

Fuentes-Dávila, G. 2000. Epidemiología del patógeno. En: Evento Regional de Aprobación Fitosanitaria en Carbón Parcial del Trigo. "Base Técnica". Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados de Fitosanidad. Roque, Gto. 43 p.

Gardner, J.S., Allen, J.V., Hess, W.M. and Tripathi, R.K. 1983. Sheath structure of *Tilletia indica* teliospores. *Mycologia* 75:333-336.

Gaudet, D.A., Laroche, A., Despins, T. Kristjansson, G. 2000. Development of species specific PCR primers for the identification of karnal bunt and other *Tilletia* species. XII Biennial Workshop on the Smut Fungi. Sociedad Mexicana de Fitopatología. p. 23.

Grajal, M. M., J. Simon, C. J. and Muelhlbauer, F. J. 1993. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. *Phytopathology* 83; 612-614.

- Hamilton, I.R. 1997. Bunts and Smuts of Wheat: An International Symposium. Wheat Distribution in a Changing World. North American Plant Protection Organization. 29-30pp.
- Henson, J.M. and French, R. 1993. The Polymerase Chain Reaction and Plant Disease Diagnosis. *Ann. Rev. Phytopathol.* 31:81-109.
- Henson, J.M., Goins, T., Grey, W., Mather, D.E. and Elliott, M.L. 1993. Use of polymerase chain reaction to detect *Gaeumannomyces graminis* DNA in plants grown in artificially and naturally infested soil. *Phytopathology* 83:283-87.
- Ireta, M.J. and Gilchrist, S.L. 1994. Roña o Tizón de la espiga del trigo (*Fusarium graminearum* Schwabe). Wheat Program Special Report. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, El Batán, México. 25 p.
- Joshi, M.L., Sing, V.D. and Srivastava, D.K., 1983. *The Botanical Review*, 49(4):310-327.
- Kerssies, A., Bosker-Van Zessen, A. I., Wagemakers, C. A. M. and Vankan, J. A. L. 1997. Variation in pathogenicity and DNA polymorphism among *Botrytis cinerea* isolates sampled inside and outside a glasshouse. *Plant Disease* 81: 781-786.

- Kohli, M. M., Fuentes-Dávila, G., Rajarem, S. and Butler, L. 1993. Carbón parcial de trigo y movimiento internacional de germoplasma de CIMMYT. Fundacep Fecotrigo. Cruz Alta-RS. 21 p.
- Lee, S.B., Taylor, J.W. 1992. Phylogeny of five fungus-like protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. Mol. Biol. Evol. 9:636-653.
- Levy, L., Meyer, R.J. and Tschanz, A.T. 2000. Differentiation of *Tilletia indica* from the Undescribed *Tilletia* species on Ryegrass by ITS Sequence-Differences. [WWW.bunts and smuts revisited. htm](http://WWW.buntsandsmutsrevisited.htm)
- McDonald, J.G., Wong, E., Kristjansson, G.T. and White, G.P. 1999. Direct amplification by PCR of DNA from ungerminated teliospores of *Tilletia* species. Can. J. Plant Pathol. 21:78-80
- Mills, P.R. 1994. The Identification and Characterization of Pest Organisms: DNA-Based Methods for Identification and Characterization. Hawksworth, D.L. CAB International. Wallingford, United Kingdom. 477-445pp.
- Munjal, R.L. 1975. Status of Karnal bunt (*Neovossia indica*) of wheat in northern India during 1968-69 and 1969-1970. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology 5:185-187)

Nagarajan, S., 1997. Karnal Bunt (*Tilletia indica*) of wheat-a review. Plant Pathology 76:01-08.

Narro, S.J., Paredes, M.R., Quijano, C.J.A., Fuentes-Dávila, G., Maya De León, J.L., 2000. Identificación de zonas con mayor probabilidad de presencia de carbón parcial en el cultivo de trigo, del periodo de enero-abril. Estudio en forma mensual en el estado de Guanajuato con base en datos precisos de clima-revista.

NAPPO. Newsletter, april de 1993. Distribution of *Tilletia indica* in Mexico. Vol. 13 (2):6

NAPPO. 1999. Norma de la NAPPO sobre Medidas Fitosanitarias (Procedimiento Armonizado para Distinguir Morfológicamente a las Teliosporas de Carbón Parcial, Carbón del Pasto y Carbón del Arroz.

Nazar, R.N., Hu. X., Schmidt, J., Culham. D. and Robb.J. 1991. Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. Physiol. Mol. Plant Pathol. 39:1-11

Niederhauser, C., Candrian, U., Hofelein, C., Jermini, M., Buhler, H. P. and Luthy, J. 1992. Use of polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in food. Applied and Environmental Microbiology 58: 1564-1569.

- Obst, A. and Zogg, H. 1980. Documenta Ciba-Geigy. Wheat: The major leaf and ear diseases of wheat in Europe and Seedling blights, root and foot rots of wheat. 50-58pp.
- Omondi, C. O., Hindorf, H., Welz, H. G., Saucke, D., Ayiecho, P. O. and Mwang'Ombe, A. W. 1997. Genetic diversity among isolates of *Colletotrichum kahawae* causing coffee berry disease. J. Genetic Micrology 13: 800-804
- Paulitz, T. 1995. Karnal Bunt Disease: A pest Risk Assesment Report Plant Science Department MacDonald College, Canada, 73 p.
- Peterson, G. L. Bonde, M. R., Dowler, W. M. and Royer, M. H. 1984. Morphological comparisons of *Tilletia indica* (Mitra) from India and México.
- Raina, K., Jackson, N. and Chandlee, J. M. 1997. Detection of genetic variation in *Sclerotinia homoeocarpa* isolates using RAPD's analysis. Mycological Research 101: 585-590.
- Rojas, M. R. I. 2000. Métodos Moleculares para el Diagnóstico de Hongos Fitopatógenos. En: Memorias del curso "Detección e identificación de fitopatógenos de importancia cuarentenaria mediante técnicas moleculares", DGSV México, D.F.

Rollo, F., Salvi, R., Torchia, P. 1990. Highly sensitive and fast detection of *Phoma tracheiphila* by polymerase chain reaction. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32:572-76

Prost, E. and Larzul, D. 1989. The Polymerase Chain Reaction and its Applications. Meth. In Mol. and Cel. Biol. 45-51.

Rodríguez, V.J., 2000. Historia de la Fitosanidad en México Siglo XXI, Secretaria de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, Universidad Autónoma Chapingo y Colegio de Postgraduados Montecillos, México, 94-96 pp

Romero, C.S., 1994. Hongos Fitopatógenos, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México. p. 275 ,

SARH. 1992. Guía Fitosanitaria para el cultivo del trigo. Series Sanidad Vegetal. Sistema Producto trigo. México, D.F. 298 p.

SAGAR. 1996. Norma Oficial Mexicana NOM-001-FITO-1995, por la que se establece la campaña contra el carbón parcial del trigo. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Diario Oficial de la Federación, Lunes 16 de diciembre de 1996. México, D.F. 1-12 pp.

SAGAR, COMISION NACIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA -
DELEGACION ESTAL DE SANIDAD VEGETAL EN GUANAJUATO. 2000:

Evento Regional de Aprobación Fitosanitaria en Carbón Parcial del Trigo. "Base Técnica". Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados de Fitosanidad. Roque, Gto. pp. 172.

Saari, E.E. and O.F. Mamuluk 1996. Bunts and Smut of wheat, In: Bunt and smut Diseases of wheat. CIMMYT : 1-11 pp.

Sambrook, D.J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1988. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring N.Y. pp 386-394.

Sánchez, R.C.V. 2000. Sistema de lavado y filtrado para detección de teliosporas de *Tilletia indica* Mitra en trigo. En: Evento Regional de Aprobación Fitosanitaria en Carbón Parcial del Trigo. "Base Técnica". Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados de Fitosanidad. Roque, Gto. 43 p.

Schaad, N.W., Smith, O.P., Bonde, M.R., Peterson, G.L., Beck, R.J., Hatziloukas, E. and Panopoulos, N.J. 1994. The Identification and Characterization of Pest Organisms: Polymerase Chain Reaction Methods for the Detection of Seedborne Plant Pathogens. Hawksworth, D.L. CAB International. Wallingford, United Kingdom. 461-471pp.

Schmit, W.J. 1980. Documenta Ciba-Geigy. Wheat: Genetics and breeding in wheat 14-18pp.

- Singh, D.V., Agarwal, R., Shrestha, J.K., Thapa, B.R. and Dubin, H.J. 1989. First Report of *Tilletia indica* in Nepal. Plant Disease 73:273.
- Smilanick, J.L., J.A. Hoffmann, and M.H. Royer. 1985. Effect of temperature, pH, light, and dessication on teliospore germination of *Tilletia indica*. Phytopathology 75:1428-1431.
- Smith, O.P., Gary P.L., Beck, R.J., Schaad, N.W. and Bonde, M.R. 1996. Development of a PCR-Based Method for identification of *Tilletia indica* causal agent of Karnal Bunt of Wheat. Phytopath. 86:1, 115-122.
- Tooley, P. W., Carras, M. M. and Lambert, D. H. 1998. Application of a PCR-based test for detection of potato late blight and pink rot in tubers. Amer. J. Potato Res. 75: 187-194.
- USDA-APIS . 1996. Karnal Bunt. A fungal Disease or wheat. 4 pp.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Vande Lee, T., Hornes, M. and Fritjers, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: A new concept for DNA fingerprinting. Nucl. Acids Res. 23:4407-4414.
- Wiese, V.M. 1987. Compendium of Wheat Diseases. 2nd ed. American Phytopathological Society. 112 p.

Xue, B., Goodwin, P.H. and Annis, S.L. 1992. Pathotype identification of *Leptosphaeria maculans* with PCR and oligonucleotide primers from ribosomal internal transcribed spacer sequences. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 141:179-88

Zillinsky, F. J. 1984. Guía para la identificación de enfermedades en cereales de grano pequeño. Centro Internacional para el mejoramiento de maíz y trigo. (CIMMYT). El Batán, México, 141 p.

APENDICE

1. Buffer de extracción

Tris HCl 1M pH 8 - 50 mL

EDTA 0.5M, pH - 50 mL

NaCl 5M-50 mL

Ajustar el volumen a 500 mL y
esterilizar a 15 lb/15 min.

β -mercapto-etanol 410 μ l (o 14 μ l por
cada muestra de 15 mL)

2. Buffer TE pH 8.0

Tris-HCl 10mM

EDTA 1mM

3. Buffer de Lisis.

1.4M NaCl

0.02M EDTA

0.1M Tris-HCl pH 8.0

2gr de CTAB por 100 mL de Buffer

4. Buffer CTAB

CTAB 10%

NaCl 0.7 M

5. Buffer de carga

0.25% azul de bromofenol

0.25% de Xyleno cyanol FF

30% de glycerol en H₂O

Almacenar a 4°C

6. Bromuro de etidium (10mg/L)

1g de bromurio de etidio

100mL de H₂O

Almacenar a temperatura ambiente

7. Buffer de corrido

Tris-acetato (TAE),

1x: 0.04 M Tris-acetato; 0.001 M

EDTA