



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

## CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

**SELECCIÓN DE CEPAS DE *Ustilago maydis* PARA LA PRODUCCIÓN  
CONTROLADA DE HUITLACOCHÉ EN COMUNIDADES RURALES DE  
LA REGIÓN CENTRAL DE MÉXICO**

**VICTOR MACUIL TLACHINO**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PUEBLA, PUEBLA

2017



## COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS  
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

SUBDIRECCIÓN DE EDUCACIÓN  
CAMPUS PUEBLA

CAMPUE- 43-2-03

### CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **Victor Macuil Tlachino**, alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección de la Profesora **Dra. Mercedes Sobal Cruz**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **SELECCIÓN DE CEPAS DE *Ustilago maydis* PARA LA PRODUCCION CONTROLADA DE HUITLACOCHÉ EN COMUNIDADES RURALES DE LA REGIÓN CENTRAL DE MÉXICO**, y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, la Consejera y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Puebla, Puebla, 14 de diciembre del 2017

---

Victor Macuil Tlachino

---

Dra. Mercedes Sobal Cruz  
Vo. Bo. Profesora Consejera

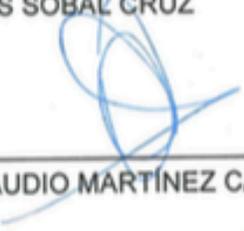
La presente tesis, titulada: **SELECCIÓN DE CEPAS DE *Ustilago maydis* PARA LA PRODUCCIÓN CONTROLADA DE HUITLACOCHÉ EN COMUNIDADES RURALES DE LA REGIÓN CENTRAL DE MÉXICO**, realizada por el alumno: **Victor Macuil Tlachino**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

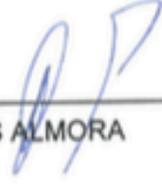
MAESTRO EN CIENCIAS

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:   
DRA. MERCEDES SOBAL CRUZ

ASESOR:   
DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA

ASESOR:   
DR. PORFIRIO MORALES ALMORA

ASESOR:   
DR. BENJAMÍN VALERIANO PEÑA OLVERA

ASESORA:   
DRA. MARÍA ROSA MAIMONE CELORIO

Puebla, Puebla, México, a 14 de diciembre del 2017

**SELECCIÓN DE CEPAS DE *Ustilago maydis* PARA LA PRODUCCIÓN  
CONTROLADA DE HUITLACOCHÉ EN COMUNIDADES RURALES DE LA  
REGIÓN CENTRAL DE MÉXICO**

Victor Macuil Tlachino, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2017

La producción de huitlacoche cuenta con técnicas bien fundadas para la infección de maíz con el hongo *Ustilago maydis*, sin embargo, la infección no siempre se lleva de la misma forma, dando como resultado variaciones en el desarrollo del hongo. En el presente trabajo se aislaron cepas patogénicas y solopatogénicas nativas de la región de Cholula, Puebla. Se estandarizó el aislamiento de esporidias mediante la técnica de microdiluciones, y de 20 esporidias nativas, se realizaron 190 cruzas, de las cuales 12 cruzas positivas se lograron con las esporidias: e12, e14, e16, e18, e22, e24 y e25, y 37 cruzas correspondieron a las esporidias e7 y e11. Se seleccionaron las esporidias e2, e7, e11, e14, e18 y e21, las cuales se entrecruzaron con las cepas de referencia CP-436 y CP-437. Se ubicaron en sus clases de compatibilidad, la e2 y e14 en la clase I, y e18 y e21 de la clase II. También se estandarizó la elaboración del inóculo mediante el conteo de esporidias por densidad óptica y recuento celular, los resultados se sometieron a una matriz de correlación de Pearson en el programa SAS. Se analizaron las variables concentración contra absorbancia, arrojando una correlación de 0.85, en una concentración de  $1 \times 10^6$  esporidias  $\cdot \text{mL}^{-1}$ . Finalmente, se probaron las cepas seleccionadas infectando plántulas de maíz de la variedad Hue-CP-14, seleccionada por su rápido ciclo (74 días de floración masculina y 81 días de floración femenina). No se encontró efecto significativo por la fuente de variación “variedad” y caracterización de 2 ciclos de cultivo de maíz bajo invernadero. Las esporidias e7 y e11 son cepas infectivas heterocarióticas, que formaron agallas a los 7 días después de la infección. Los híbridos infectivos CP-436xe7, CP-437xe7, CP-437xe11, CP-437xe14, e7xe11 y CP-436xCP-437, evidenciaron la aparición de infección a los 14 días en promedio, después de la inoculación.

**Palabras clave:** Densidad óptica, infección en plántulas, inóculo, *Zea mays*

# SELECTION OF *Ustilago maydis* STRAINS FOR CONTROLLED PRODUCTION OF HUITLACOCHÉ IN RURAL COMMUNITIES IN THE CENTRAL REGION OF MÉXICO

Victor Macuil Tlachino, M. C.  
Colegio de Postgraduados, 2017

The production of huitlacoche has well-founded techniques for the infection of corn with the fungus *Ustilago maydis*, however, the infection is not always carried in the same way, resulting in variations in the development of the fungus. In the present work, pathogenic and single pathogenic strains were isolated from the Cholula region, Puebla. Isolation of sporidia was standardized using the microdilution technique, and of 20 native sporidia, 190 crosses were made, of which 12 positive crosses were achieved with the sporidia: e12, e14, e16, e18, e22, e24 and e25, and 37 crosses corresponded to the sporidia e7 and e11. The sporidia e2, e7, e11, e14, e18 and e21 were selected, which were cross-linked with the reference strains CP-436 and CP-437. They were located in their compatibility classes, e2 and e14 in class I, and e18 and e21 in class II. We also standardized the preparation of the inoculum by counting sporidia by optical density and cell count, the results were subjected to a Pearson correlation matrix in the SAS program. The concentration against absorbance variables were analyzed, yielding a correlation of 0.85, at a concentration of  $1 \times 10^6$  sporidia  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>. Finally, the selected strains were tested by infecting maize seedlings of the Hue-CP-14 variety, selected for its rapid cycle (74 days of male flowering and 81 days of female flowering). No significant effect was found by the source of variation "variety" and characterization of 2 cycles of corn cultivation under greenhouse. The sporidia e7 and e11 are heterokaryotic infective strains, which formed galls 7 days after infection. The infective hybrids CP-436xe7, CP-437xe7, CP-437xe11, CP-437xe14, e7xe11 and CP-436xCP-437, showed the appearance of infection at 14 days on average, after inoculation.

**Keywords:** Optical density, huitlacoche, infection in seedlings, inoculum production, *Zea mays*.

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Al Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla.

## CONTENIDO

	Páginas
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	1
<b>II. MARCO TEÓRICO.....</b>	3
2.1 El hongo comestible <i>Ustilago maydis</i> .....	3
2.1.1 Taxonomía y morfología.....	4
2.1.2 Ciclo de vida de <i>U. maydis</i> .....	5
2.1.3 Genética de apareamiento.....	5
2.1.4 Patogénesis.....	7
2.2 Cultivo de maíz ( <i>Zea mays</i> ).....	8
2.3 Biotecnología de hongos comestibles.....	9
2.4 Desarrollo de la biotecnología de hongos comestibles en México.....	10
<b>III. MARCO DE REFERENCIA.....</b>	12
3.1 Antecedentes históricos del cultivo de <i>U. maydis</i> .....	12
3.2 La importancia de <i>U. maydis</i> como un hongo comestible cultivado.....	12
3.3 México y la cultura por el huitlacoche.....	13
3.3.1 Cepas cultivadas de huitlacoche.....	14
3.4 Métodos de inoculación.....	14
3.5 Relación variedades de maíz y susceptibilidad de infección.....	15
3.6 Valor nutricional.....	16
<b>IV. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	19
<b>V. HIPÓTESIS.....</b>	20
<b>VI. OBJETIVOS.....</b>	20
6.1 Objetivo general.....	20
6.2 Objetivos específicos.....	20
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	21
7.1 <b>Fase de laboratorio.....</b>	22
7.1.1 Elaboración de medios de cultivo.....	22
7.1.2 Material biológico.....	22
7.1.2.1 Aislamiento de teliosporas nativas por diluciones.....	23
7.1.2.2 Germinación de teliosporas en medio de cultivo.....	24
7.1.2.3 Aislamiento de una esporidia.....	24
7.1.2.4 Cruzas intra-específicas.....	25
7.1.2.5 Selección de esporidias tipo.....	25
7.1.2.6 Cruzas inter-específicas.....	25
7.1.2.7 Confirmación del fenotipo Fuzz.....	25
7.1.2.8 Selección de dicariones.....	26
7.1.2.9 Cinética de crecimiento de esporidias tipo en medio de cultivo líquido.....	26
7.1.2.9.1 Concentración de esporidias por conteo en cámara de Neubauer.....	26

7.1.2.9.2	Concentración de esporidias por medición de la densidad óptica.....	27
7.1.2.10	Elaboración de inóculo.....	27
7.1.2.11	Polifenoles totales.....	28
7.2	<b>Fase de Invernadero</b> .....	29
7.2.1.	Material vegetal.....	29
7.2.1.1	Labores de siembra.....	30
7.2.1.2	Caracterización de las variedades.....	30
7.2.2	Inoculación en plántulas.....	31
7.2.2.1	Caracterización de la infección.....	31
7.2.2.2	Selección de cepas infectivas de <i>U. maydis</i> .....	32
7.2.3	Diseño experimental.....	32
<b>VIII.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	34
8.1	Fase de laboratorio.....	34
8.1.1	Recolección de mazorca infectada.....	34
8.1.2	Teliospora aisladas y germinadas en medio PDA.....	34
8.1.3	Esporidias aisladas y cultivadas en medio PDA.....	36
8.1.4	Tipos de esporidias.....	37
8.1.5	Entrecruzamiento de esporidias nativas.....	37
8.1.6	Entrecruzamiento de esporidias tipo con cepas de referencia..	39
8.1.7	Confirmación mediante el ensayo de fenotipo Fuzz.....	40
8.1.8	Tipos de entrecruzamientos.....	42
8.1.9	Cinética de crecimiento de esporidias en ML-Malta.....	43
8.1.10	Concentración de esporidias por conteo en la cámara de Neubauer.....	44
8.1.11	Concentración de esporidias por medición de la densidad óptica.....	46
8.1.12	Cálculo de la concentración de esporidias para la elaboración del inóculo.....	49
8.1.13	Polifenoles totales.....	50
8.2	Fase de invernadero.....	51
8.2.1	Caracterización del maíz de la primera siembra.....	52
8.2.2	Análisis estadístico primera siembra.....	53
8.2.3	Caracterización del maíz segunda siembra.....	54
8.2.4	Análisis estadístico segunda siembra.....	55
8.2.5	Caracterización del maíz entre la primera y segunda siembra..	58
8.2.6	Análisis estadístico entre primera y segunda siembra.....	58
8.2.7	Infección del maíz por <i>U. maydis</i> .....	60
8.2.7.1	Infección en plántulas de maíz.....	60
8.2.7.2	Análisis estadístico de la infección.....	68
8.2.7.3	Selección de las cepas infectivas de <i>U. maydis</i> .....	69
8.2.7.4	Producción de teliosporas.....	75
<b>IX.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	79
<b>X.</b>	<b>CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS</b> .....	79

XI.	<b>ESTRATEGIA PARA FOMENTAR EL HONGO <i>Ustilago maydis</i> (HUITLACOCHÉ) COMO UN RECURSO GENÉTICO APROVECHABLE EN EL VALLE DE PUEBLA, MÉXICO.....</b>	80
XII.	<b>LITERATURA CITADA.....</b>	84
XIII.	<b>ANEXOS.....</b>	89

## LISTA DE FIGURAS

		Páginas
<b>Figura 1.</b>	Transición morfológica del ciclo de vida de <i>Ustilago maydis</i> ...	5
<b>Figura 2.</b>	Interacciones entre los dos loci de tipo de apareamiento durante el desarrollo de <i>Ustilago maydis</i> . El locus <i>a</i> codifica un sistema de reconocimiento de células basado en feromonas, que desencadena la fusión celular. Después de la fusión, diferentes alelos en el locus <i>b</i> inducen el desarrollo sexual y patógeno mediante la formación de un factor de transcripción heterodimérico activo.....	7
<b>Figura 3.</b>	Imagen del huitlacoche en historia general de las cosas de Nueva España de Fray Bernardino de Sahagún .....	12
<b>Figura 4.</b>	Diagrama general de trabajo para la producción de huitlacoche en invernadero.....	21
<b>Figura 5.</b>	Ubicación de la localidad de Cholula, Puebla, México que ubica la procedencia de la cepa CP-897 de <i>Ustilago maydis</i> .	22
<b>Figura 6.</b>	Diagrama de flujo para el aislamiento de teliosporas y esporidias.....	23
<b>Figura 7.</b>	Serie de diluciones para aislamiento de teliospora de <i>Ustilago maydis</i> .....	24
<b>Figura 8.</b>	Serie de diluciones para el aislamiento de una esporidia de <i>Ustilago maydis</i> .....	24
<b>Figura 9.</b>	Proceso de selección de dicariones infectivos.....	26
<b>Figura 10.</b>	Recuento de 5 cuadros grandes de la cámara de Neubauer y formula para la concentración de esporidias por mL de <i>Ustilago maydis</i> .....	27
<b>Figura 11.</b>	Diagrama para la elaboración de inóculo de <i>Ustilago maydis</i> en medio líquido.....	28
<b>Figura 12.</b>	Punciones para infección de plántulas de maíz con <i>Ustilago maydis</i> . A= 1 <sup>ra</sup> punción, B= 2 <sup>da</sup> punción. C= 3 <sup>ra</sup> punción.....	31
<b>Figura 13.</b>	Agallas seleccionadas para aislar las teliosporas de <i>Ustilago maydis</i> CP-897.....	34
<b>Figura 14.</b>	Germinación de teliosporas en medio de cultivo agar papa dextrosa de la cepa CP-897 de <i>Ustilago maydis</i> . A=Imagen en el microscopio estereoscopio de teliosporas. B= Crecimiento de teliosporas a diferentes niveles de concentración. C= Germinación de una teliospora vista con el microscopio estereoscopio.....	35
<b>Figura 15.</b>	Cultivo de una teliospora en medio agar papa dextrosa de <i>Ustilago maydis</i> (CP-897).....	36
<b>Figura 16.</b>	Colonia de una esporidia de <i>Ustilago maydis</i> (CP-897) en medio agar papa dextrosa.....	36
<b>Figura 17.</b>	Caracterización de la colonia de una esporidia a las 48 horas de incubación de <i>Ustilago maydis</i> (CP-897).....	37
<b>Figura 18.</b>	Imágenes de cruzamientos en medio PDA+CA de esporidias seleccionadas.....	41

<b>Figura 19.</b>	Tipos de reacciones. A= Reacción negativa (-). B= Reacción positiva débil (+). C= Reacción positiva fuerte (++).....	43
<b>Figura 20.</b>	Cinética de crecimiento en ML-Malta de las cepas CP-436, CP-437, e2, e7, e11, e14, e18 y e21 de <i>Ustilago maydis</i> .....	44
<b>Figura 21.</b>	Concentración de esporidias de <i>Ustilago maydis</i> por conteo en la cámara de Neubauer a 4, 8, 12 y 24 horas de incubación en ML-Malta.....	45
<b>Figura 22.</b>	Barrido en el espectrofotómetro de UV de las cepas CP-436 y CP-437 de <i>Ustilago maydis</i> a 12 horas de incubación.....	46
<b>Figura 23.</b>	Lectura de diluciones de esporidias de la cepa CP-437 de <i>Ustilago maydis</i> a $\lambda=364$ nm.....	47
<b>Figura 24.</b>	Lectura de diluciones de esporidias de la cepa CP-437 de <i>Ustilago maydis</i> a $\lambda=292$ nm.....	47
<b>Figura 25.</b>	Concentración de esporidias por D.O. para las cepas nativa e2, e7, e11, e14, e18 y e21 y las cepas de referencia CP-436 y CP-437 de <i>Ustilago maydis</i> .....	48
<b>Figura 26.</b>	Polifenoles totales de las cepas de <i>Ustilago maydis</i> en medio líquido malta.....	50
<b>Figura 27.</b>	Tres variedades de maíz sembradas en invernadero del programa de mejoramiento genético del COLPOS-Puebla: CHI-CP-12, ZAC-CP-14, y HUE-CP-14.....	51
<b>Figura 28</b>	Registro de temperatura durante los ciclos de cultivo de maíz dentro de invernadero.....	52
<b>Figura 29.</b>	Tiempo de floración masculina (DFFM) y floración femenina (DFF) por cada variedad de maíz para la primera cosecha...	53
<b>Figura 30.</b>	Tiempo de floración masculina (DFFM) y floración femenina (DFF) por cada variedad de maíz para la segunda cosecha...	56
<b>Figura 31.</b>	Interacción entre la 1 <sup>ra</sup> y 2 <sup>da</sup> cosecha para la variable peso del elote sin brácteas y si estigmas. Línea azul corresponde a la variedad de maíz CHI-CP-12, línea roja a la variedad ZAC-CP-14 y línea verde a la variedad de maíz HUE-CP-14. 1= Primera cosecha y 2= Segunda cosecha.....	60
<b>Figura 32.</b>	Seguimiento de la infección de diferentes esporidias de <i>Ustilago maydis</i> en plántulas de maíz cultivadas en invernadero.....	62
<b>Figura 33.</b>	Seguimiento de la infección de diferentes heterocariones de <i>Ustilago maydis</i> en plántulas de maíz cultivadas en invernadero.....	65
<b>Figura 34.</b>	Seguimiento de la confirmación de heterocariones infectivos de <i>Ustilago maydis</i> en plántulas de maíz cultivadas en invernadero.....	68
<b>Figura 35.</b>	Heterocariones infectivos hasta formación de teliosporas en la variedad HUE-CP-14 de maíz.....	73

<b>Figura 36.</b>	Confirmación de heterocariones infectivos hasta formación de teliosporas en dos variedades de maíz (Hue-CP-14 y Jala).....	75
<b>Figura 37.</b>	Muestras de agallas vistas al microscopio de <i>Ustilago maydis</i> y aislamiento de las mismas.....	76
<b>Figura 38.</b>	Muestras de agallas de <i>Ustilago maydis</i> vistas por segunda vez al microscopio y aislamiento de las mismas.....	78
<b>Figura 39.</b>	Sectores involucrados en la estrategia de <i>Ustilago maydis</i> como recurso genético.....	82
<b>Figura 40.</b>	Etapas para el posicionamiento de <i>Ustilago maydis</i> como un recurso genético.....	82

<b>LISTA DE CUADROS</b>		<b>Páginas</b>
<b>Cuadro 1.</b>	Clasificación Taxonómica de <i>Ustilago maydis</i> .....	4
<b>Cuadro 2.</b>	Composición química proximal (%) de las partes principales del grano de maíz .....	17
<b>Cuadro 3.</b>	Componente nutricional del huitlacoche .....	17
<b>Cuadro 4.</b>	Variables para la caracterización de maíz.....	31
<b>Cuadro 5.</b>	Incidencia de la enfermedad en las plántulas de maíz con <i>Ustilago maydis</i> .....	32
<b>Cuadro 6.</b>	Síntomas de la enfermedad en las plántulas de maíz con <i>Ustilago maydis</i> .....	32
<b>Cuadro 7.</b>	Reacciones del cruzamiento intra-cepa de monosporidias de <i>Ustilago maydis</i> .....	38
<b>Cuadro 8.</b>	Cruzas positivas de monosporicos de <i>Ustilago maydis</i> .....	39
<b>Cuadro 9.</b>	Ubicación de las esporidias de <i>Ustilago maydis</i> en sus clases de compatibilidad.....	40
<b>Cuadro 10.</b>	Coefficiente de correlación de Pearson, N=32. Prob >  r  suponiendo H0: Rho=0.....	49
<b>Cuadro 11</b>	Variables medidas en la caracterización de maíz en invernadero durante la primera siembra.....	53
<b>Cuadro 12.</b>	Significancia estadística de cuadros medios del análisis de varianza de 8 variables medidas de las 3 variedades sintéticas de maíz bajo condiciones de invernadero, Puebla, durante el primer ciclo de maíz.....	54
<b>Cuadro 13</b>	Variables medidas en la caracterización de maíz en invernadero durante la segunda siembra.....	55
<b>Cuadro 14.</b>	Significancia estadística de cuadros medios del análisis de varianza de 8 variables medidas de las 3 variedades sintéticas de maíz bajo condiciones de invernadero, Puebla, en el segundo periodo.....	57
<b>Cuadro 15.</b>	Diferencia de medias por la prueba de Tukey para las variables medidas por variedad de maíz en la segunda siembra.....	57
<b>Cuadro 16</b>	Estadísticos básicos de las 8 variables medidas en la caracterización de maíz en invernadero durante la primero y segunda siembra.....	58
<b>Cuadro 17.</b>	Significancia estadística de cuadros medios del análisis de varianza de 2 variables medidas de las 3 variedades de maíz bajo condiciones de invernadero en dos periodos de cosecha, Puebla.....	59
<b>Cuadro 18.</b>	Suma de cuadrados tipo III de la variable peso del elote sin bráctea y sin estigma en el análisis de varianza.....	59
<b>Cuadro 19.</b>	Comparación de medias por cosecha de maíz para las variables medidas en la primera y segunda siembra combinadas.....	60

<b>Cuadro 20.</b>	Relación de aparición de infección para todas las cruzas de las cepas de <i>Ustilago maydis</i> , cultivada en la variedad de maíz Hue-CP-14.....	61
<b>Cuadro 21.</b>	Significancia estadística de cuadros medios del análisis de varianza de la variable tiempo medida tras la inoculación de plántulas de maíz.....	69
<b>Cuadro 22.</b>	Comparación de medias por concentración de inóculo para la variable tiempo.....	69
<b>Cuadro 23.</b>	Relación de aparición de infección para las cruzas de las cepas de <i>Ustilago maydis</i> que infectaron las variedades de maíz.....	70

## I. INTRODUCCIÓN

El huitlacoche es una enfermedad del cultivo de maíz causada por el hongo *Ustilago maydis*, dicha enfermedad es caracterizada por la aparición de tumores en los tejidos aéreos de las plantas de maíz. *U. maydis* es un hongo de crecimiento levaduriforme *in-vitro* y filamentoso *in-vivo*, pertenece a los basidiomicetes, del orden de los Ustilaginales, o comúnmente conocidos como carbones. Durante el ciclo de vida de *U. maydis* se logran diferenciar tres tipos celulares: una forma unicelular, que corresponde a la esporidia, es haploide y saprofita; una forma filamentosa dicariótica, que corresponde al estado patogénico del organismo; y una forma diploide, que se conoce como teliospora, este estado solo se lleva a cabo dentro de los tumores de la planta de maíz (Banuett, 2002).

Para que se logre obtener la forma dicariótica infectiva de manera *in-vitro*, se debe realizar una cruce entre dos esporidias compatibles, eventualmente la cruce realizada se inocula en las plantas. La infección en el hospedero se evidencia por la aparición de clorosis, la concentración de antocianinas que derivan en manchas rojas-moradas, el retardo en el desarrollo de la planta, y la aparición de malformaciones (Pataky and Snetselaar, 2006). La formación de teliosporas permite identificar el cierre del ciclo biológico de *U. maydis* como agente patógeno en el cultivo de maíz, estas teliosporas se localizan conglomeradas en el tejido tumoral de la infección (Banuett and Herskowitz, 1996). A medida que transcurre el tiempo el tejido tumoral madura y se rompe liberando al medio ambiente las teliosporas, esta acción permite iniciar el nuevo ciclo biológico de *U. maydis*.

En varios países productores de maíz, la aparición de huitlacoche es considerada como una enfermedad grave, porque implica una pérdida en la producción tanto de forraje como de grano; sin embargo, para la agricultura mexicana la aparición de huitlacoche no es vista como una enfermedad dado que en los cultivos de maíz su aparición es muy escasa (Castañeda de León y col., 2016), además recolectar huitlacoche es una buena actividad porque en la gastronomía mexicana, y ahora poco a poco en la alta gastronomía mundial, el huitlacoche es considerado un verdadero

manjar, cada vez la demanda en regiones como Europa, Asia y Norte América es mayor. La producción de huitlacoche va en aumento ocupando el tercer lugar en la producción de hongos comestibles, por debajo de cultivos como *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus* (León y col., 2014).

Sin embargo, paradójicamente el estudio de la producción de huitlacoche en su mayoría se realiza fuera de la nación mexicana, y las cepas comerciales cultivadas de *U. maydis*, utilizadas en México para la producción de huitlacoche de manera controlada, son de procedencia extranjera de cepas mejoradas o seleccionadas. Desde Tillet (1766), se comenzó con la infección de maíz por *U. maydis* de manera inducida, y 251 años después conocemos diferentes métodos de inoculación, pero ninguno estandarizado. La producción de este hongo es hasta ahora un poco complicada ya que, aunque se cuenta con técnicas bien fundadas la infección no se lleva siempre de la misma forma, dando como resultado variaciones en el desarrollo de este, lo cual reduce la calidad y cantidad del producto. Dentro de los últimos trabajos realizados en México se encuentran los de Castañeda de León y col. (2016), quienes evaluaron la interacción de diferentes variedades maíz contra cepas de *U. maydis* con un enfoque de incremento de producción, y el de Galicia y col. (2016), con la identificación de cepas patogénicas y su interacción genética para inducir la infección. Los resultados del presente trabajo muestran el comportamiento *in-vitro* de cepas de *U. maydis* aisladas de elotes infectados nativos de la región, y su comportamiento *in-vivo* en plántulas de maíz bajo condiciones de agricultura protegida.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 El hongo comestible *Ustilago maydis*

Las royas tienen mayor impacto económico como patógenos de plantas y productos agrícolas. La enfermedad del carbón es un problema persistente ya que el hongo es capaz de atacar al huésped en cualquier momento del ciclo fenológico del maíz, generando síntomas como clorosis, tumores en hojas, tallos, espigas y mazorca, todo esto genera un crecimiento pobre, como para que el cultivo logre ser utilizado para forraje; y el conflicto más importante es la limitación en la producción de grano (Estrada y col., 2010). Los Ustilaginales, al cual pertenece *U. maydis*, forman parte de un importante grupo de hongos fitopatógenos con más de 1200 especies que infectan a más de 4000 plantas monocotiledóneas en todo el mundo. De esas especies *U. hordei* y *U. nuda* son los que atacan la cebada, *U. nigra* ataca a la avena, *U. tritici* ataca a trigo, y *U. maydis* ataca a maíz (Ruiz-Herrera, 2008).

Solo el 1 y 5% de plantas de los cultivos de maíz son infectadas por *U. maydis* en el campo, por lo que en México este hongo no es considerado una plaga, y mejor aún, constituye una ganancia extra para el agricultor, ya que una mazorca infectada tiene un mayor valor en el mercado que si no lo tuviera (Ruiz-Herrera, 2008). Las agallas, granos de maíz infectados por *U. maydis*, son comestibles y consideradas una exquisitez en México y las modernas cocinas internacionales. El huitlacoche, como se le conoce a las agallas en México, a pesar de ser considerado uno de los hongos de gran sabor es también uno de los más escasos, ya que de manera natural su producción se limita a la recolección esporádica en los cultivos de maíz. La región centro del país con los estados de Puebla, Estado de México, Hidalgo, Oaxaca, Morelos, Tlaxcala y Ciudad de México es donde existe mayor consumo y incidencia del huitlacoche (Villanueva y col., 2007).

## 2.1.1 Taxonomía y morfología

*Ustilago maydis* pertenece a los Ustilaginales, un orden de los Basidiomicetes, caracterizados por producir esporas en estructuras especializadas llamadas basidios, que incluye a los patógenos fúngicos semiobligados de plantas, comúnmente conocidos como carbones. Los basidiomicetes producen sus esporas sexuales que forman externamente sobre una estructura denominada basidio, constituida por cuatro células de tipo levaduriforme, de tal manera que estos hongos son capaces de vivir como saprófitos. En el cuadro 1 se realizó una clasificación taxonómica de *U. maydis* de Paredes-López y Valverde (1999).

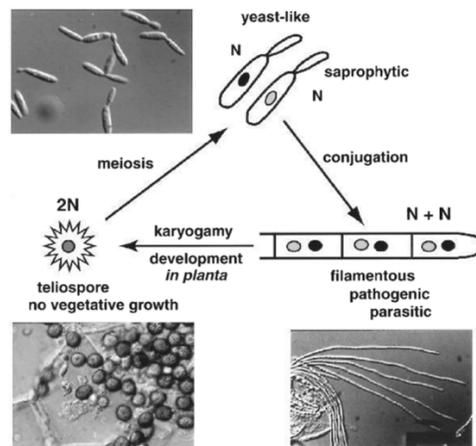
**Cuadro 1.** Clasificación taxonómica de *Ustilago maydis*.

TAXÓN		CARACTERÍSTICAS
Reino	Fungi	Eucariótica Pared celular (quitina) Heterótrofos
Subreino	Eumycota	No precisas vivir en medio tan acuosos
Rama	Amastigomycota	Es fundamental la dispersión aérea de sus esporas
Filo	Basidiomycota	Poseen hifas septadas dicariótica
Clase	Basidiomycetes	Formación de basidios, meiosporangios que producen basidiosporas exógenas, uninucleadas y haploides
Subclase	Heterobasidiomycetidae	El basidiocarpo está ausente
Orden	Ustilaginales	Patógenos peligrosos a plantas, con sólo la etapa dicariótica que es obligatoriamente parasitaria
Familia	Ustilaginaceae	El basidio se desarrolla mediante la germinación de células de reposo de pared gruesa (teliospora) que suelen ser negras y llamadas esporas del carbón ó tizón
Género	<i>Ustilago</i>	Esporas lisas, con espinas o reticuladas
Especie	<i>maydis</i>	Ataca al teocintle, maíz

Fuente: Paredes-López y Valverde, 1999.

### 2.1.2 Ciclo de vida de *U. maydis*

*U. maydis* presenta 3 tipos de células a lo largo de su vida, la primera en forma haploide unicelular y no patogénica, la segunda en forma filamentosa y patogénica, y la tercera en forma diploide (Fig. 1). En esta última ocurre la meiosis para dar origen a la forma haploide y reiniciar el ciclo (Banuett, 2002).



**Figura 1.** Transición morfológica del ciclo de vida de *Ustilago maydis*. Fuente: Banuett, 2002.

El proceso de infección comienza con la plasmogamia de las esporidias, eso solo si existe compatibilidad entre las esporidias, para generar una forma dicariótica capaz de infectar al maíz, *U. maydis* no es un parasito obligado, pero es hasta cuando entra con su hospedero que comienza a crecer de manera filamentosa. Esta invasión genera una alteración en el crecimiento del maíz, generando así los tumores y agallas. Dentro del hospedero ocurre la cariogamia y es así que germinan las teliospora.

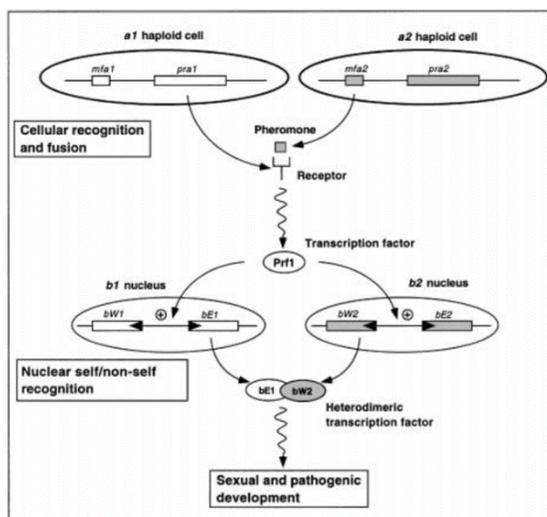
### 2.1.3 Genética de apareamiento

*U. maydis* se encuentra en la lista de los 10 hongos patógenos de plantas utilizado como modelo (Dean y col., 2012), su genoma puede secuenciarse en un corto tiempo dado su pequeño tamaño ( $\approx 20\text{MB}$ ). Para el desarrollo de la forma dicariótica

patogénica es necesario la fusión de dos células, dicho proceso está regido por dos loci genéticos que funcionan como un sistema de determinación del tipo de apareamiento.

El locus *a* es el encargado del control de la fusión de células haploides y el crecimiento filamentosos del micelio dicariótico. Un alelo codifica precursores para un factor de apareamiento de feromonas lipopéptidicas (*mfa1* y *mfa2*) y el otro especifica el receptor (*pra1* y *pra2*) para la feromona secretada por células de tipo de apareamiento opuesto. Por lo tanto, la fusión de células haploides ocurre solamente entre células que difieren la posición del gen en el locus *a*, es decir, una célula *a1* solo puede fusionarse con una célula *a2* (Bölker y col., 1992). A partir del reconocimiento de feromonas las células forman tubos de conjugación que orientan su crecimiento hacia la fuente de feromonas, estas hifas de acoplamiento se funden en sus puntas y ambos núcleos migra al citoplasma común y forman una célula dicariótica (Snetselaar y col., 1996).

Actualmente, se conocen 33 alelos en el locus *b*, que codifican para dos proteínas de diferente tamaño denominados *bE* y *bW* (Castañeda de León y col., 2016). Las células que llevan diferentes alelos *a* pero idénticos alelos *b* se fusionarán, pero no formarán un dicarion estable y no son patógenas para las plantas de maíz. Las proteínas de homeodominio *bW* y *bE* pueden formar heterodímeros, pero sólo si se derivan de alelos diferentes; Por ejemplo, la proteína *bW1* es capaz de interactuar con *bE2*, *bE3*, *bE4*, etc., pero no con *bE1* (Kämper y col., 1995). Se piensa que el heterodímero de *bW/bE* actúa como un activador de transcripción o represor que en última instancia regula la expresión de los genes necesarios para la reacción patogénica del dicarion (Fig. 2) (Bölker, 2001).



**Figura 2.** Interacciones entre los dos loci de tipo de apareamiento durante el desarrollo de *Ustilago maydis*. El locus *a* codifica un sistema de reconocimiento de células basado en feromonas, que desencadena la fusión celular. Después de la fusión, diferentes alelos en el locus *b* inducen el desarrollo sexual y patógeno mediante la formación de un factor de transcripción heterodimérico activo.  
Fuente: Bölker, 2001.

## 2.1.4 Patogénesis

Bovey (1989), mencionó que un patosistema está formado por la presencia de un agente causal virulento (patógeno), un hospedante susceptible y condiciones ambientales favorables. En el caso de la simbiosis de *U. maydis*-maíz, el hongo ingresa a las células de la planta a través de heridas, generadas por granizo y a través de las células epidermales de la lámina de las hojas, tallo o jilote, así el hongo crece hasta alcanzar el tejido vascular donde se ramifica (Jiménez, 2013). Banuett and Herskowitz (1996), mencionan que el acoplamiento y la penetración ocurre dentro de un lapso de tiempo de 2 días, durante estos días los tejidos infectados pueden parecer ligeramente cloróticos, pero hay pocos signos visibles de la infección, de tal forma que en esta etapa el dicarion se comporta como un hongo biotrófico. Pataky and Snetselaar (2006), dicen que el crecimiento hifal se desarrollará tanto intracelular como extracelularmente, esta invasión micelial ocurre entre 3 a 5 días, ya que las células vegetales siguen sometidas a la corriente del sistema vascular normal aun y cuando están invadidas por las hifas del hongo. Es a partir de una semana, 5 a 7 días después de la infección, que se puede observar un crecimiento anormal de las células

vegetales, también conocidos como tumores, pues las células vegetales siguen creciendo y dividiéndose durante estas primeras etapas de la infección (Banuett and Herskowitz, 1996).

A medida que los tumores se agrandan las hifas también lo hacen. La cariogamia de las esporidias ocurre en las primeras etapas del crecimiento tumoral, y es seguida por una rápida proliferación de hifas a través de las células vegetales. Entre 8 y 9 días después de la inoculación las paredes hifales se hinchan y gelatinizan, los protoplastos pierden su forma cilíndrica y se transforman a esféricas. Entre los 12 y 15 días de infección las esporas se agrandan y pigmentan, mismas que pueden ser vistas saliendo de los restos de las hifas gelatinizadas, con cada teliospora formada en las agallas del maíz infectado se completa el ciclo de vida de *U. maydis* (Banuett and Herskowitz, 1996; Pataky and Snetselaar, 2006).

## **2.2 Cultivo de maíz (*Zea mays*)**

El maíz (*Zea mays*), pertenece a la familia de las gramíneas, es una especie anual originaria de los trópicos de América Latina, domesticada por los pueblos indígenas de México desde hace aproximadamente 10,000 años. Fue introducida a Europa en el siglo XVII (Deras, 2016).

El sistema radicular del maíz se desarrolla a partir de la radícula de la semilla, que debe ser sembrada a una profundidad adecuada para tener la cantidad de agua necesaria y lograr un buen desarrollo. El crecimiento de las raíces disminuye después del emerger la plántula. Las primeras raíces adventicias inician su desarrollo a partir del primer nudo a una profundidad uniforme, sin relación con la profundidad con la que fue colocada la semilla. Un grupo de raíces adventicias se desarrolla a partir de cada nudo sucesivo hasta llegar a los siete o diez nudos, todos debajo de la superficie del suelo. Estas raíces adventicias se desarrollan en una red espesa de raíces fibrosas. El sistema de raíces adventicias es el principal sistema de fijación de la planta, y además absorbe agua y nutrimentos. El tallo está compuesto por una epidermis

exterior, impermeable y transparente, y el sistema vascular por donde circulan las sustancias alimenticias, y una médula de tejido esponjoso y blanco donde almacena azúcares. Sus inflorescencias masculinas y femeninas se encuentran bien diferenciadas:

La inflorescencia masculina es terminal y se le conoce como panícula, panoja, espiga o "miahuatl", compuesta por un eje central o raquis y ramas laterales; a lo largo del eje central se distribuyen los pares de espiguillas de forma polística y en las ramas con arreglo dístico y cada espiguilla está protegida por dos brácteas o glumas, que a su vez contienen en forma apareada las flores estaminadas; en cada florecilla componente de la panícula hay tres estambres donde se desarrollan los granos de polen. Las inflorescencias femeninas, las mazorcas, se localizan en las yemas axilares de las hojas; son espigas de forma cilíndrica que consisten de un raquis central u olote donde se insertan las espiguillas por pares, cada espiguilla con dos flores pistiladas una fértil y otra abortiva, estas flores se arreglan en hileras paralelas, las flores pistiladas tienen un ovario único con un pedicelo unido al raquis, un estilo muy largo con propiedades estigmáticas donde germina el polen.

El cultivo de maíz es el más importante en México. Desde un punto de vista alimentario los mexicanos tienen como base el maíz en su dieta, socialmente forma parte de su cultura siendo que este cultivo tiene a México como centro de origen, y económicamente hasta 2010 García-Salazar y Ramírez (2012) mencionan que el consumo nacional aparente de maíz blanco fue de 21.03 millones de toneladas y 9.78 de maíz amarillo. De acuerdo a SAGARPA-INEGI (2015) en el estado de Puebla el cultivo del maíz ocupa 457,528 hectáreas sembradas y de estas el 91.3 % se cultiva bajo condiciones de temporal.

### **2.3 Biotecnología de hongos comestibles**

Los hongos comestibles constituyen un alimento muy apreciado como parte de la dieta humana dentro de las culturas indígenas debido a sus atributos sensoriales y

nutricionales. Valdez y col. (2009), dicen que se consumen principalmente en el sureste de Asia, Europa y Mesoamérica. Hasta 2009 se conocen cerca de 2000 especies de hongos comestibles; de los cuales aproximadamente 22 han sido cultivos comercialmente y sólo 10 se producen a escala industrial (Valdez y col., 2009). En México, las especies de mayor importancia socioeconómica de acuerdo a Martínez-Carrera y col. (2010), son *Amanita caesarea*, *Lyophyllum decastes*, *Agaricus campestris*, *Pleurotus ostreatus*, *Volvariella bombycina*, *Boletus edulis*, *Hypomyces lactifluorum*, *Russula brevipes*, *Lactarius indigo*, *Ramaria flava*, *Collybia dryophila*, *Amanita rubescens* y *Cantharellus cibarius*.

En nuestro del país, la producción comercial de hongos comestibles ofrece ventajas sociales, económicas y ecológicas. De acuerdo a Valdez y col. (2009), se estima que la producción comercial en fresco es de aproximadamente 47 mil 468 toneladas anuales. La importancia ecológica de esta actividad económica radica en la utilización y reciclaje de más de 474 mil toneladas de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales. El cultivo de hongos en México ha evolucionada a diferencia de otros países. Por ejemplo, las setas (*Pleurotus*) en México comenzaron su cultivo en 1974 con una estimación anual de 360 toneladas, a partir de ese año su producción se incrementó notablemente alcanzando alrededor de mil 825 toneladas en 2005.

#### **2.4 Desarrollo de la biotecnología de hongos comestibles en México**

Las especies de hongos comestibles cultivados y sus presentaciones se han diversificado recientemente. *U. maydis*, hongo parásito del maíz y el producto de su infección, el huitlacoche, es consumido en México, y sólo recientemente se ha logrado desarrollar un sistema para su producción controlada. Por su tipo de desarrollo como un hongo patógeno del maíz, su producción controlada representa retos biotecnológicos muy diferentes al de los hongos saprófitos que se han cultivado comúnmente (*A. bisporus*, *P. ostreatus/pulmonarius*) (Castañeda de León y col., 2016). Reyes y col. (2009), mencionan que los hongos comestibles se considera como

alimentos que además de su contenido nutrimental, mejoran la salud y reducen el riesgo de contraer enfermedades. Esta idea genera oportunidades dentro de la biotecnología para la producción de alimentos funcionales, que reducirán los gastos médicos y mejorarían la calidad de los alimentos de la población. Pérez-Moreno y *col.* (2010), comenta que los principales efectos atribuidos a los hongos medicinales son antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, antiinflamatorios, antioxidantes, antihipertensivos, antitumorales, citostáticos, cardiotónicos, reductores de los niveles de colesterol y estimulantes del sistema inmunitario. En trabajos realizados por Martínez-Carrera y *col.* (2010), se demuestra que las propiedades de los hongos pueden extraerse mediante extractos acuosos y alcohólicos, dichos extractos están compuesto principalmente por lecitinas y polisacáridos de alto peso molecular ( $\alpha$ -glucanos,  $\beta$ -glucanos, heteroglicanos, proteoglicanos y polisacaropéptidos), en dichos trabajos se ha demostrado que tras purificar estas macromoléculas, se rescatan las propiedades funcionales sin efectos secundarios adversos y que incluso pueden modificarse químicamente para mejorarlas.

### III. MARCO DE REFERENCIA

#### 3.1 Antecedentes históricos del cultivo de *U. maydis*

En cuanto a su historia no hay ninguna fuente antigua donde haga referencia como alimento especial de reyes prehispánicos, según algunos autores en el código Florentino o historia general de las cosas de la Nueva España, es de Bernardino de Sahagún, donde aparece la imagen más antigua (Fig. 3), el huitlacoche, cuitlacoche o cuitlacoichi -en náhuatl- o *Ustilago maydis*, en la presente disertación se usa huitlacoche, se concibe como “algo raro” que crece sobre la mazorca. En tiempos prehispánicos, era visto como una anomalía del maíz, como un producto indeseable y molesto, porque significaba la pérdida de la mazorca. En el área maya, por ejemplo, era algo anormal, provocado por la acción divina ligada a la lluvia, pero “ese algo no tenía identidad cultural”; su conocimiento biológico en México se dio a partir de 1895 (Valadez, 2012).



**Figura 3.** Imagen del huitlacoche en historia general de las cosas de Nueva España de Fray Bernardino de Sahagún. Fuente: Tomado de Valadez, 2012.

#### 3.2 La importancia de *U. maydis* como un hongo comestible cultivado

México es el octavo país productor de maíz en el mundo (FIRA 2016), y además es centro de origen del mismo, esto posiciona al maíz mexicano como una de las mejores aceptadas por los agricultores, aunado a ellos la diversidad del relieve mexicano genera condiciones que permiten a las variedades de maíz adaptarse a un amplio

rango de condiciones climáticas y calidades de suelo. Sin embargo, los estudios contemporáneos buscan la mejora de las variedades que ofrezca un mayor valor nutrimental o en su caso un producto de mayor valor agregado, es aquí donde el huitlacoche toma relevancia (León y col., 2014), posicionando a la producción de huitlacoche en tercer lugar. Sobre todo, por conservar sus valores nutricionales o la preservación de su contenido de proteínas y vitaminas incluso después de haber sido cocinado. De acuerdo a Ruiz (1999), gran parte del huitlacoche que se comercializa es recolectado de los cultivos de maíz infectados de manera natural y de forma esporádica, por lo tanto, la recolección del mismo se realiza de manera manual, lo cual a su vez genera que este proceso incremente el costo de producción; al proceso de producción anterior también debe sumársele el costo de producción del maíz, el de desespigamiento, preparación del inóculo, inoculación de la planta y mantenimiento del cultivo de huitlacoche (Tracy y col., 2007).

De tal manera que la producción de huitlacoche se considera como un cultivo alternativo, gracias a su valor económico y debido al incremento de su popularidad como alimento, y como alimento funcional, algunas empresas incluso ya lo venden enlatado por que representa un importante ingreso económico.

### **3.3 México y la cultura por el huitlacoche**

Ruan-Soto y Ordaz-Velázquez (2015), mencionan que en México se consumen alrededor de 371 especies de hongos comestibles de manera tradicional, y dentro de estas especies el huitlacoche (agallas de maíz infectadas por *U. maydis*) ocupa uno de los primeros lugares, al ser identificado en la mayoría del territorio mexicano. Desde la colonia, hasta el siglo XIX, el huitlacoche fue alimento de subsistencia para indígenas y campesinos, en el siglo XX se convierte en alimento de la élite mexicana. Es por esta razón que en México el huitlacoche se considera una herencia culinaria desde épocas prehispánicas. Para los antiguos agricultores, cuando lo veían en sus cultivos de maíz, era considerado como una maldición, pero en el momento que se

arriesgan a comerlo, se dieron cuenta de que era un verdadero manjar, y esa idea de maldición se convirtió en lo opuesto (Mesalles, 2016). Los chefs mexicanos exploran su uso en salsas y fusionándolos con otros ingredientes como el chile y el ajo para resaltar su sabor y su textura, mismos que han sido adoptados por chefs de Francia y otros países, de acuerdo al consulado de México, menciona que la gastronomía mexicana se encuentra entre las 5 primeras a nivel mundial, y dentro de esta gastronomía el huitlacoche es altamente considerado (Mesalles, 2016).

### **3.3.1 Cepas cultivadas de huitlacoche**

De acuerdo a Mata y *col.* (2010), en la actualidad la mayoría de las cepas utilizadas en el cultivo de hongos comestibles comerciales provienen de 3 regiones principalmente que corresponden a América del Norte, Europa y el sur de Asia. Estas cepas provienen de colecciones que son y han sido utilizadas en diversas investigaciones orientadas al incremento de especies comestibles y medicinales, el mejoramiento del sistema de cultivo, la producción de enzimas y la expresión fisiológica para la adaptabilidad de los hongos dependiendo de la región. Las cepas son mantenidas mediante la utilización de procedimientos de conservación para hongos. García-López y Uruburú-Fernández (1991), hacen referencia a tres grupos, métodos de elección o de conservación a largo y mediano plazo, y otros. Entre los cuales los más utilizados son la conservación por resiembra en medio sólido (agar), en aceite mineral, de esporas almacenadas en tierra, arena o silica gel, en agua mineral, por liofilización, y en nitrógeno líquido.

### **3.4 Métodos de inoculación**

De acuerdo a Castañeda de León y *col.* (2016), en México la inoculación para la producción de huitlacoche de manera controlada se da de dos maneras: la inducción rudimentaria de la infección y la producción asistida. Ambas contemplan la utilización

de teliosporas o de esporidias, pues en cualquiera de los casos se propicia que *U. maydis* logre parasitar la planta, la diferencia entre la utilización de una o de otra será de tiempo. En el caso de utilización de teliosporas como inóculo comienza a partir de Tillet (1766), que optó por espolvorear los granos de maíz con teliosporas, y fue hasta Holbert, y col. (1924), que inyectaron las teliosporas en la planta de maíz. La utilización de teliosporas implica que estas primero deben germinar para obtener esporidias, después las esporidias deberán cruzarse y eventualmente si las esporidias logran encontrarse con genotipos diferentes (cruza positiva) habrá un crecimiento filamentosos parasítico.

La utilización de esporidias comienza con Brefeld (1888), aunque no de la forma que actualmente se conoce, él optó por la aspersion de las esporidias a los granos de maíz fue hasta Griffiths (1928), que utilizando jeringas hipodérmicas infectó a las plantas de maíz con esporidias. Cuando se utilizan esporidias se reduce el tiempo de infección en comparación con la utilización de teliosporas, ya que se elimina el tiempo de espera de germinación de teliosporas, y el proceso comienza a partir de las cruces entre esporidias, si la cruce entre esporidias es positiva (genotipos diferentes) se logrará el crecimiento filamentosos infectivo.

### **3.5 Relación variedades de maíz y susceptibilidad de infección**

El maíz es el cultivo más importante a nivel mundial ya que ha alcanzado hasta 817 millones de toneladas (Mejía, 2009), pero además este cultivo tiene a México como centro de origen. México tiene una vasta cantidad de variedades de maíz, y no solo eso, los trabajos de investigación que se realizan dentro del país han permitido generar nuevas variedades, esto con el propósito de “aumentar el rendimiento del cultivo”, sin embargo, con la siembra de híbridos y variedades de alto rendimiento se ha propiciado también la introducción de enfermedades de bastante importancia, como el carbón de la espiga causado por el hongo *Sporisorium reilianum* (SAGARPA, 2002). Cada variedad de maíz responde a la infección por *U. maydis* de manera diferente, esto se

debe a la virulencia de la cepa, a la región del cultivo, a la fecha de siembra, y sobre todo al clima del medio ambiente antes y después de la inoculación.

De tal forma que entre variedades de maíz se tendrá niveles de resistencia a patógenos, y para el caso de la infección de maíz por *U. maydis*, se ha evidenciado que, tras realizar varias pruebas entre variedades de dicho cultivo, las de genotipo de maíz dulce han presentado una buena susceptibilidad a la infección, lo cual resulta idóneo para la producción de huitlacoche (Castañeda de León y *col.* 2016). En cuanto al origen de las variedades se puede clasificar en dos: variedades criollas o nativas, y variedad híbridas o sintéticas. La desventaja de utilizar variedades criollas radica en su heterogeneidad genética y fenotípica que desencadenaran producciones inconsistentes, mientras que en la utilización de variedades sintéticas las dos fuentes de variación antes mencionadas (genotipo y fenotipo) se reducen gracias a su homogeneidad genética. Sin embargo, es importante conservar el pool genético que nos ofrece las variedades criollas, porque sobre explotar solo una línea genética de maíz biológicamente implica estimular la resistencia al patógeno, además, aunque se pretenda estandarizar la producción el genotipo siempre interactuará con el medio ambiente para expresar un fenotipo y debe recordarse que en el sistema huitlacoche son dos organismos los que interactúan.

### **3.6 Valor nutricional**

El grano de maíz por si solo ya es una fuente alimentaria en la dieta de las personas, debido a que contiene una gran porción de hidratos de carbono (Cuadro 2) pero una vez que el hongo logra infectar al grano y transformarlo a huitlacoche los principales valores nutrimentales crecen de manera considerable (Cuadro 3). En el caso de proteína el grano de maíz contiene 9.91%, y este valor crece hasta 21% según lo reportado por Paredes-López y *col.* (2000), tras la infección.

**Cuadro 2.** Composición química proximal (%) de las partes principales del grano de maíz.

Componente químico	Pericarpio	Endospermo	Germen	Total bs*
Proteínas	3.7	8.0	18.4	9.91
Extracto etéreo	1.0	0.8	33.2	4.78
Fibra cruda	86.7	2.7	8.8	2.66
Cenizas	0.8	0.3	10.5	1.42
Almidón	7.3	87.6	8.3	71.5
Azúcar	0.34	0.62	10.8	2.58

\*bs= base seca. Fuente: Tomado de Ortiz, 2006.

Las cenizas en grano de maíz son de 1.42%, mientras que tras la infección con *U. maíz* el porcentaje alcanza valores entre los 2.9% (Valdez y col., 2010), como el valor más bajo, y hasta 7.5% de acuerdo a Loaiza (2010), como el valor más alto. En cuanto a la fibra el grano de maíz presenta un valor de 2.66%, muy poco si comparamos con la producción de huitlacoche que alcanza hasta 60.4% (Valdez y col., 2010). Finalmente, la presencia de carbohidratos en maíz sano es de 74.08%, y una vez infectado tiene valores que van desde 4% hasta 86.6% de acuerdo a Valdez y col., (2010) (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Componente nutricional del huitlacoche.

Componentes (g/100 g base seca)					Autores
Proteínas	Grasa	Cenizas	Fibra y Carbohidratos		
11.5 - 16.4	1.6 - 2.3	5.2 - 7.0	16.0 - 23.5	55.1 - 66.5	Valverde y col. (1995)
8.9 - 18.8	2.0 - 6.3	2.9 - 5.3	39.4 - 60.4	72.7 - 86.8	Valdez y col. (2010)
12.6	2.2	7.5	50.0	4.0	Loaiza (2010)
9.6 -14.2	2.4 - 3.6	3.8 -5.3	54 -65	6.4 -10.0	Beas y col. (2011)
10.0 - 14.5	2.7 - 6.5	3.4 -6.2	75.6 - 82.7		Vanegas y col. (1995)
12.1 - 21.0	3.6 - 11.1	4.3 - 6.1	62.6 - 74.5		Paredes López y col. (2000)
Componentes (g/100 g peso fresco)					Autores
0.91 - 2.54	0.12 - 0.43	0.35 - 2.14	5.59 -8.36		
					Kealey and Kosikowski (1981)

Fuente: Tomado de Castañeda de León y col. (2016).

Chang and Miles (2004), mencionan que los hongos comestibles presentan un gran número de compuestos biológicamente activos, como lo son los compuestos fenólicos,

dichos compuestos ofrecen grandes beneficios a la salud y protección contra enfermedades crónico degenerativas; es por esto que son fundamentalmente considerados como parte de las dietas saludables y adicionalmente se han procesados generando nutraceuticos.

#### IV. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El Plan Puebla, inició 1967 como un proyecto para elevar los rendimientos de la agricultura campesina e incrementar la oferta nacional de alimentos básicos y generación de tecnologías para el cultivo de maíz (González, 1990). Esta actividad sigue constante en la región del Valle de Puebla, dada su importancia por ser una de las principales productoras de dicha gramínea. Esto ha permitido la variabilidad de especies génicas de maíz, es decir especies híbridas y criollas.

Por otra parte, las investigaciones que se han desarrollado en torno a *U. maydis*, han confirmado que el crecimiento de huitlacoche está estrechamente ligado con el tipo de maíz que infecta. La producción de huitlacoche hasta ahora ha sido poco constante, dado que a pesar de que se cuenta con técnicas bien fundamentadas, la infección se lleva siempre de formas diferentes, dando como resultado variaciones en la producción, lo cual reduce la calidad y cantidad del producto (Valdez y col., 2009).

Además, las cepas utilizadas actualmente son de procedencia extranjera, lo cual representa una inversión por parte de los agricultores que puede evitarse si se utilizan cepas nativas de la región, incrementando la adaptabilidad maíz-*U. maydis* a las condiciones geográficas locales. Con esta investigación se logró aislar cepas nativas con capacidad infectiva como opción para los productores de huitlacoche en el Valle de Puebla, México.

## **V. HIPÓTESIS**

De las cepas aisladas de *U. maydis*, alguna tendrá capacidad infectiva en cultivo de maíz bajo condiciones de invernadero.

## **VI. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo general**

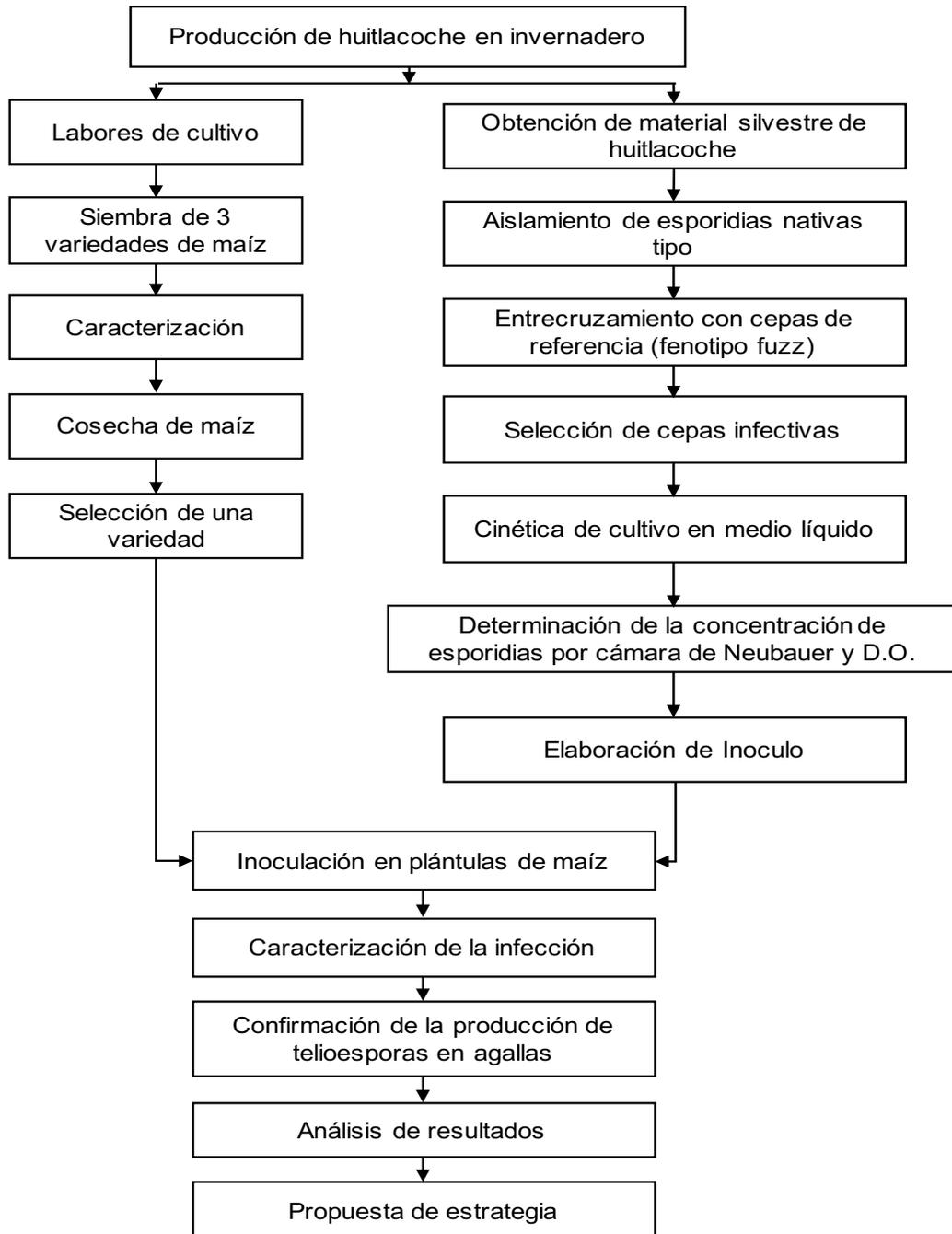
Seleccionar una cepa de *U. maydis* altamente infectiva y con características óptimas que requieren los productores de huitlacoche de la región central de México.

### **6.2 Objetivos específicos**

1. Generar híbridos de *U. maydis* con potencial infectivo.
2. Estandarizar el método para elaboración de inóculo de *U. maydis*.
3. Proponer una estrategia de cultivo de *U. maydis* con cepas seleccionadas a los productores de maíz de la región central de México.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Diagrama general de trabajo realizado en el presente proyecto de investigación como parte del Laboratorio de Hongos Comestibles, Medicinales y Funcionales, del Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla (Fig. 4).



**Figura 4.** Diagrama general de trabajo para la producción de huitlacoche en invernadero.

## 7.1 Fase de laboratorio

### 7.1.1 Elaboración de medios de cultivo

Se empleó medio papa dextrosa agar (PDA) y agua destilada estéril, pesando 39 g/L, las condiciones de esterilización fueron 121°C a 20 PSI por 22 minutos. El medio se vertió en placas de Petri y se dejó gelificar bajo condiciones de esterilidad. Al medio PDA se agregó carbón activado al 1%. Se esterilizó y se vertió en placas de Petri, se dejó gelificar bajo condiciones de esterilidad. Para preparar el medio liquido malta (ML-Malta) se diluyeron 30 g/L en agua destilada estéril, el medio se vertió en matraces de 50 mL con tapa, las condiciones de esterilización fueron 121°C a 20 libras por 22 minutos. Los matraces se dejaron enfriar totalmente sellados a temperatura ambiente antes de utilizar.

### 7.1.2 Material biológico

Las esporidias utilizadas en el experimento del hongo de *Ustilago maydis* (D.C.) Corda, se aislaron de agallas frescas de la localidad de Cholula, Puebla, México (Fig. 5).

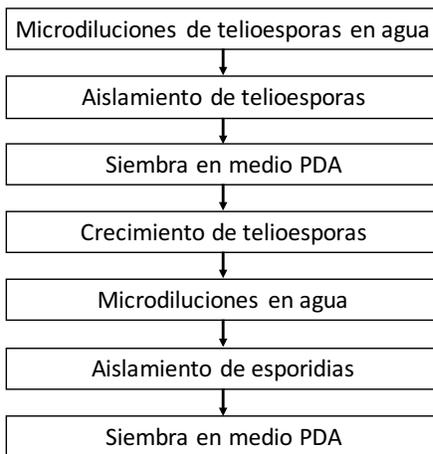


**Figura 5.** Ubicación de la localidad de Cholula, Puebla, México que ubica la procedencia de la cepa CP-897 de *Ustilago maydis*.

Para la confirmación de cepas patogénicas, se utilizaron dos cepas haploides registradas como CP-436 y CP-437 del Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados, *Campus Puebla*.

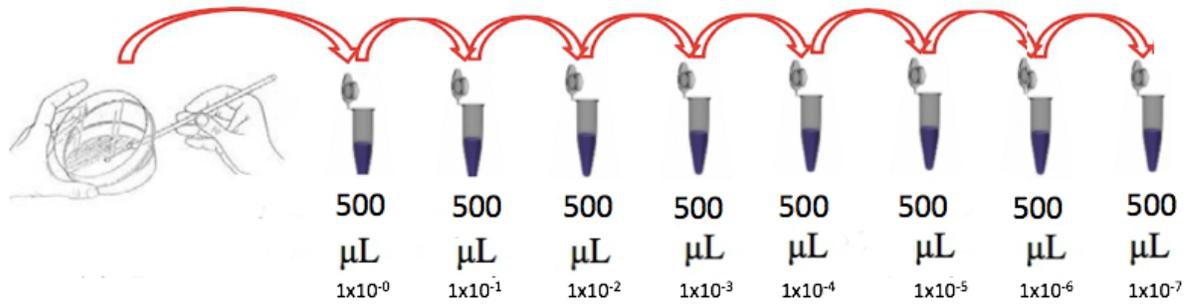
### 7.1.2.1 Aislamiento de teliosporas nativas por diluciones

Se realizaron dos tipos de aislamientos, el primero consistió en el aislamiento de las teliospora de las agallas de huitlacoche para posteriormente pasar al aislamiento de las esporidias, que surgen de la germinación de las teliosporas. Ambos procesos forman parte de uno solo y se puede apreciar en la figura 6.



**Figura 6.** Diagrama de flujo para el aislamiento de teliosporas y esporidias.

Se tomaron tejidos de las agallas de la cepa CP-897 y se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1% (v/v). Una vez limpias se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se realizaron una serie de diluciones con 500  $\mu$ L de agua destilada estéril, agitándose vigorosamente de manera manual. De la solución de teliospora se realizaron diluciones en agua destilada estéril como se muestra en la figura 7 hasta llegar a la dilución  $1 \times 10^{-7}$ .  $1 \times 10^{-1}$   $1 \times 10^{-2}$   $1 \times 10^{-3}$   $1 \times 10^{-4}$   $1 \times 10^{-6}$   $1 \times 10^{-7}$



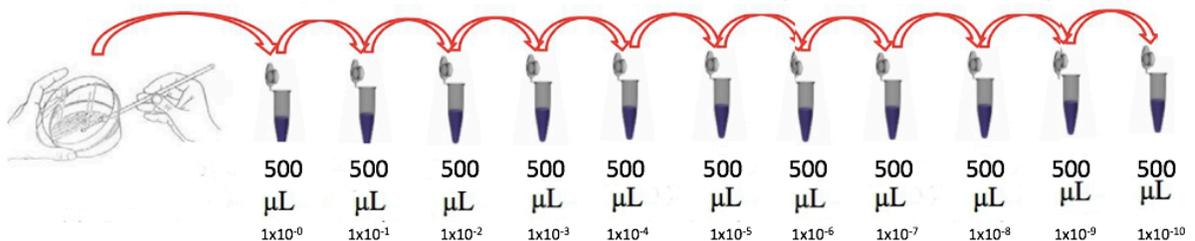
**Figura 7.** Serie de diluciones para aislamiento de teliospora de *Ustilago maydis*.

### 7.1.2.2 Germinación de teliosporas en medio de cultivo

De la última dilución mencionada se tomaron 10  $\mu\text{L}$  y depositaron en una caja de Petri para poder aislar una teliospora. Cada teliospora aislada se incubó en caja de Petri con medio PDA (Difco) a 25 °C por 120 horas.

### 7.1.2.3 Aislamiento de una esporidia

A las 120 horas de incubación la colonia formada de cada teliospora se estrió para su rápida propagación, y se siguió incubando a 25 °C por 48 horas. Transcurrido el tiempo se tomó una asada de la colonia y se diluyó en 500  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril, para realizar una serie de microdiluciones como se muestra en la figura 8, hasta llegar a la dilución  $1 \times 10^{-10}$ . De esta dilución se depositaron 10  $\mu\text{L}$  en PDA (Difco) para aislar sólo una esporidia. Las esporidias aisladas se incubaron a 25 °C.



**Figura 8.** Serie de diluciones para el aislamiento de una esporidia de *Ustilago maydis*.

Las esporidias aisladas se incubaron a temperatura ambiente en medio PDA y se observaron cada 24 horas al microscopio estereoscopio (Zeiss), con la ayuda de un asa bacteriológica en anillo se fue estriando el crecimiento de la esporidia. Se realizó una clasificación morfológica de la colonia generada a partir de cultivo de una esporidia aislada en medio PDA.

#### **7.1.2.4 Cruzas intra-específicas**

Las cruzas se realizaron únicamente con esporidias silvestres de *U. maydis* en la campana de flujo laminar y con un asa bacteriológica en anillo, se sembraron los pares de cepas en paralelo con una separación de 5 mm.

#### **7.1.2.5 Selección de esporidias tipo**

Esta selección se realizó contemplando el cambio de morfología al realizar el cruce de dos esporidias con respecto de su morfología original.

#### **7.1.2.6 Cruzas inter-específicas**

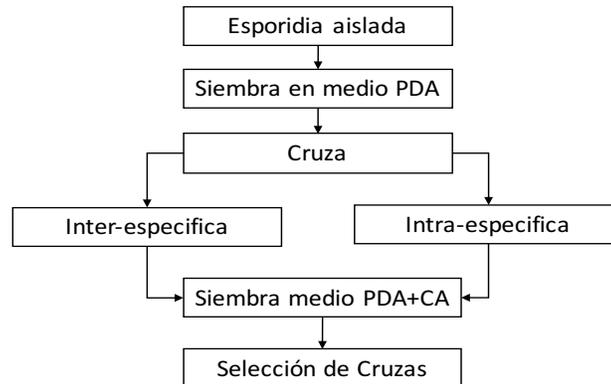
Estas cruzas se realizaron entre las cepas silvestres y las cepas de referencia CP-436 y CP-437 del CREGENHC, se sembraron los pares de esporidias en paralelo con una separación de 5 mm.

#### **7.1.2.7 Confirmación del fenotipo Fuzz**

Para la selección de cruzas, se contemplan las características morfológicas de la reacción fenotipo Fuzz de la metodología de Banuett and Herskowitz (1989), en medio PDA (Difco) más carbón activado (Hycel de México) para notar un contraste entre el medio y la morfología de las colonias. Las cruzas positivas serán aquellas que presenten una morfología de colonia algodonosa y blanca, y vista al microscopio se puede observar un crecimiento filamentosos; mientras que una craza negativa se identifica por la formación de colonias con morfología cremosa, no filamentosas, y vista al microscopio se observa un crecimiento levaduriforme.

### 7.1.2.8 Selección de dicariones

La selección de los dicariones se realizó de acuerdo a la reacción positiva de fenotipo Fuzz y al cambio de las características morfológicas de la colonia con respecto a su morfología antes de la cruza. El proceso general se aprecia en la figura 9.



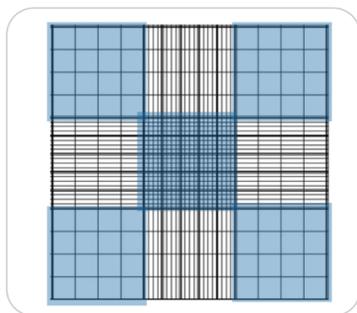
**Figura 9.** Proceso de selección de dicariones infectivos.

### 7.1.2.9 Cinética de crecimiento de esporidias tipo en medio de cultivo líquido

Dentro de la campana de flujo laminar se realizó la inoculación de matraces de 125 mL con 30 mL de ML-Malta, con la ayuda de un asa bacteriológica en anillo se tomó una asada de la colonia de esporidia y se colocó en el matraz, los matraces se mantuvieron en el orbital a 140 rpm y 24 °C por 24 horas. Se tomaron alícuotas a las 4, 8, 12 y 24 horas para realizar la curva de crecimiento.

#### 7.1.2.9.1 Concentración de esporidias por conteo en cámara de Neubauer

Consiste en colocar un cubre objetos sobre la cámara en posición horizontal, a partir de las alícuotas se tomaron 10  $\mu$ L y se colocaron en el borde del cubre objetos de manera suave y continua, permitiendo el llenado uniforme de la cámara. Una vez llenada la cámara se colocó en el microscopio compuesto y con el objetivo de 10x se realizó el conteo como se muestra en la figura 10.



$$[\text{esporidias/ml}] = \frac{\text{esporidias contadas} \times 10.000}{\text{numero de cuadros}}$$

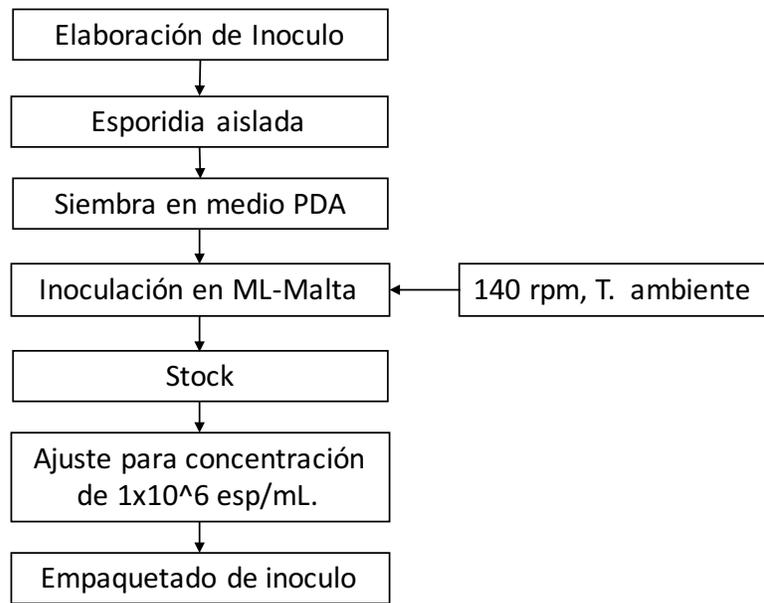
**Figura 10.** Recuento de 5 cuadros grandes de la cámara de Neubauer y formula para la concentración de esporidias por mL de *Ustilago maydis*.

### 7.1.2.9.2 Concentración de esporidias por medición de la densidad óptica

Para la medición de absorbancia, del matraz de inoculación se tomaron alícuotas de 500 µL y depositaron en un Eppendorf de 2 mL, con la ayuda de una micropipeta se colocaron 5 repeticiones de 100 µL en cada pozo de la microplaca. La lectura del ensayo se realizó en el espectrofotómetro de microplacas a una  $\lambda$  de 292 nm. Las lecturas fueron descargadas en el programa Excel.

### 7.1.2.10 Elaboración de inóculo

Con la ayuda de un asa bacteriológica en anillo se tomó una asada, de una caja Petri con *U. maydis* inoculada en medio PDA durante 24 horas, y se colocó en 30 ml de ML-Malta, previamente esterilizado, durante 12 horas a 140 rpm y 24°C dentro del orbital. Trascurrido el tiempo se determina la concentración de esporidias por mililitro de cada cepa y posteriormente se diluyo para obtener una concentración de  $1 \times 10^6$  esporidas  $\cdot \text{mL}^{-1}$ , utilizando agua destilada estéril como disolvente. La formación de heterocariones se realizó mezclando las monosporidias correspondientes al tratamiento, pero bajo la misma concentración de  $1 \times 10^6$  esporidas  $\cdot \text{mL}^{-1}$  utilizando la ecuación  $C_1V_1=C_2V_2$ , despejamos “ $V_1$ ” que nos ayudara conocer el volumen a diluir. Dado que nosotros definimos la “ $C_2$ ” y “ $V_2$ ” la ecuación resultante es “ $V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$ ”, finalmente, se realizó un homogenizado con la ayuda de vortex a 100 revoluciones durante 10 seg. Todo el proceso se esquematiza en la figura 11.



**Figura 11.** Diagrama para la elaboración de inóculo de *Ustilago maydis* en medio líquido.

#### 7.1.2.11 Polifenoles totales

En la cuantificación de polifenoles totales se usó el método colorimétrico-espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Müller y *col.*, 2010).

Se utilizó una solución saturada de carbonato de sodio, para eso se disolvieron 7.5 g de carbonato de sodio en 100 mL de agua destilada. Para llegar a la saturación de la solución he inducir la precipitación del soluto se agregaron 0.3 g de carbonato de sodio y se colocó en refrigeración durante una hora. En un matraz aforado de 10 mL se colocó 1 mL del reactivo Folin-Ciocalteu y se llevó el enrase con agua destilado. Para la solución stock de ácido gálico [1000 ppm], se pesaron 0.010050 g de ácido gálico y se disolvieron en 0.5 mL de etanol como pre-diluyente, se colocó la solución en un matraz aforado de 10 mL y se llevó el enrase con agua destilada.

Curva de calibración. En matraces aforados de 10 mL y envueltos con papel aluminio para evitar la luz, se pusieron 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mL de la solución stock de ácido gálico, todos se llevaron el enrase con agua destilada. En una microplaca de 96 pozos se tomaron 5 réplicas de 20  $\mu$ L de cada muestra. Posteriormente, se agregaron

100 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu, 75 µL de solución saturada de carbonato de sodio. La placa se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad por 2 horas. Al término del tiempo de incubación, se leyó la placa en un espectrofotómetro de microplacas (EPOCH, Biotek) a una longitud de onda de 740 nm.

La ecuación para el cálculo de polifenoles totales como equivalentes de ácido gálico se determinó el software EXCEL 2016, en base a los datos graficados de la curva de calibración. Con los valores de la solución estándar de ácido gálico se construyó una línea de tendencia, la ecuación de la recta y el valor de  $R^2$ . Los valores de la ecuación ( $y = mx + b$ ) se utilizaron para determinar la concentración del ácido gálico presente en los extractos.

## **7.2 Fase de invernadero**

### **7.2.1 Material vegetal**

Material 1. CH1-CP-12, Nopalucan P.P.L. 2a. Nopalucan precoz, es una variedad sintética generada por el Programa de Recursos Fitogenéticos del Campus Puebla del Colegio de Postgraduados, formada con materiales de grano blanco de la región de Libres, Puebla. Esta variedad es de ciclo precoz (90 a 95 días a floración femenina) que se adapta a condiciones de suelos con nivel de fertilidad media a pobre, en la región de los Valles Altos de Puebla, con altitudes entre 2100 a 2500 msnm. Se recomienda para siembras intermedias o tardías y el rendimiento potencial es de 6 ton por hectárea. Esta variedad se recomienda para doble propósito (grano y rastrojo). Tiene mediana resistencia al acame.

Material 2. Zac-CP-14, Tropical 4 P.L. Tropi 1, es otra variedad sintética generada por el Programa de Recursos Fitogenéticos del Campus Puebla del Colegio de Postgraduados, formada con la línea S1 de grano blanco. Esta variedad es de ciclo intermedio a tardío (105 a 115 días a floración femenina) que se adapta a condiciones de suelos con nivel de fertilidad alto a intermedio, en la región de los Valles Altos de

Puebla, con altitudes entre 2100 a 2500 msnm. Se recomienda para siembras tempranas y el rendimiento potencial es de 8 a 9 ton por hectárea. Esta variedad se recomienda para doble propósito (grano y forraje). Manifiesta resistencia al acame.

Material 3. Hue-CP-14, Nopalucan U.P. PL semilla grande: Nopalucan Ultra Precoz, es la variedad sintética generada por el Programa de Recursos Fitogenéticos del Campus Puebla del Colegio de Postgraduados, formada con materiales de grano blanco de la región de Libres, Puebla. Esta variedad es de ciclo muy precoz (75 a 85 días a floración femenina) que se adapta a condiciones de suelos con nivel de fertilidad pobre a intermedia, en la región de los Valles Altos de Puebla, con altitudes entre 2100 a 2500 msnm. Se recomienda para siembras tardías y el rendimiento potencial es de 4.5 ton por hectárea. Tiene mediana resistencia al acame.

#### **7.2.1.1 Labores de siembra**

Para la siembra del material vegetal, se utilizó 22.5 kg de tierra negra y se colocó en bolsa para invernadero (25 cm x 50 cm). Se humedeció la tierra a capacidad de campo (CC) un día antes previo a la siembra. Durante el transcurso de la mañana se realizó la siembra de las semillas de maíz a una profundidad de 6 a 8 cm, con 4 semillas por maceta y cubriendo con tierra, sin apretar la tierra para dejar que la plántula emergiera más fácilmente. Se registró la temperatura durante todo el ciclo de cultivo de los maíces en el invernadero.

#### **7.2.1.2 Caracterización de las variedades**

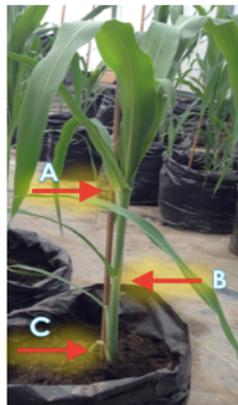
Se sembró el maíz en dos periodos (primavera y verano) bajos condiciones de invernadero. Para la caracterización de las 3 variedades de maíz se consideran las variables descritas en el cuadro 4. Se seleccionó una variedad de maíz en base al análisis estadístico para una mayor homogeneidad.

**Cuadro 4.** Variables para la caracterización de maíz.

Variable	Unidad de medida	Abreviatura
Altura de Planta	m	AP
Peso de la planta con elote	Kg	PPE
Longitud de la mazorca	cm	LM
Diámetro de la mazorca	cm	DM
Color de grano	-	CG
Peso de la mazorca sin hoja y sin estigma	gr	PMSHE
Biomasa fresca (granos de elote)	gr	PG
Diámetro del olote	cm	DO
Longitud del olote	cm	LO

### 7.2.2 Inoculación en plántulas

La inoculación de plántulas se realizó con 3 punciones a diferentes alturas de la planta (figura 12), con la ayuda de una jeringa del #3 y aguja 21 g x 32 mm hipodérmica, depositando 1 mL de inóculo con una concentración de  $1 \times 10^6$  esporias/ml, en los puntos “A” a “C” para conservar las condiciones de esterilidad del inóculo.



**Figura 12.** Punciones para infección de plántulas de maíz con *Ustilago maydis*. A= 1<sup>ra</sup> punción. B= 2<sup>da</sup> punción. C= 3<sup>ra</sup> punción.

#### 7.2.2.1 Caracterización de la infección

Se tomó registro de la evolución de la infección considerando los parámetros que se muestran en los cuadros 5 y 6. La incidencia de la enfermedad se midió del 0 al 4, yendo desde la planta sana a la muerte por la infección.

**Cuadro 5.** Incidencia de la enfermedad en las plántulas de maíz con *Ustilago maydis*.

VALOR	INCIDENCIA
0	Planta sana
1	Infección escasa (1 punto) en tallo
2	Infección regular (2 puntos) en tallo
3	Infección abundante (3 puntos) en tallo
4	Muerte de la planta

Los valores asignados a los síntomas se definieron en base al efecto de la inoculación de *U. maydis*, desde la aparición de clorosis a la formación de agallas.

**Cuadro 6.** Síntomas de la enfermedad en las plántulas de maíz con *Ustilago maydis*.

VALOR	SÍNTOMA
1	Clorosis
2	Presencia de antocianinas (manchas rojas)
3	Formación de tumor
4	Aparición de agallas

### 7.2.2.2 Selección de cepas infectivas de *U. maydis*

Terminado el ciclo de infección de *U. maydis* en las plántulas, se seleccionaron aquellas que lograron completar su ciclo hasta la aparición de agallas. A partir de las cepas que lograron terminar su proceso de infección hasta la formación de teliosporas, se recolectaron las agallas y bajo condiciones de esterilidad se confirmó su producción al microscopio, confirmando morfológicamente la aparición de éstas.

### 7.2.3 Diseño experimental

Se realizó un diseño experimental completamente al azar tanto para la selección de la variedad de maíz como para la infección de las plántulas.  $Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$ . Dónde:  $Y_{ij}$ : es la respuesta (variable de interés).  $\mu$ : es la media general del experimento.  $T_i$ : es el efecto de tratamiento.  $\varepsilon_{ij}$ : es el error aleatorio asociado a la respuesta  $Y_{ij}$ .

Se realizaron 26 tratamientos con 52 unidades experimentales. Se procedió a la aleatorización de los tratamientos mediante el uso del software Statistical Analysis System (SAS).

## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Fase de laboratorio

#### 8.1.1 Recolección de mazorca infectada

En la recolección de maíz infectado por *U. maydis* se tomó solo aquel elote que mostrara una cobertura casi total con agallas de color café, y reduciendo de manera selectiva la presencia de algunos otros patógenos. Se seleccionaron las agallas de manera equidistantes (Fig. 13).



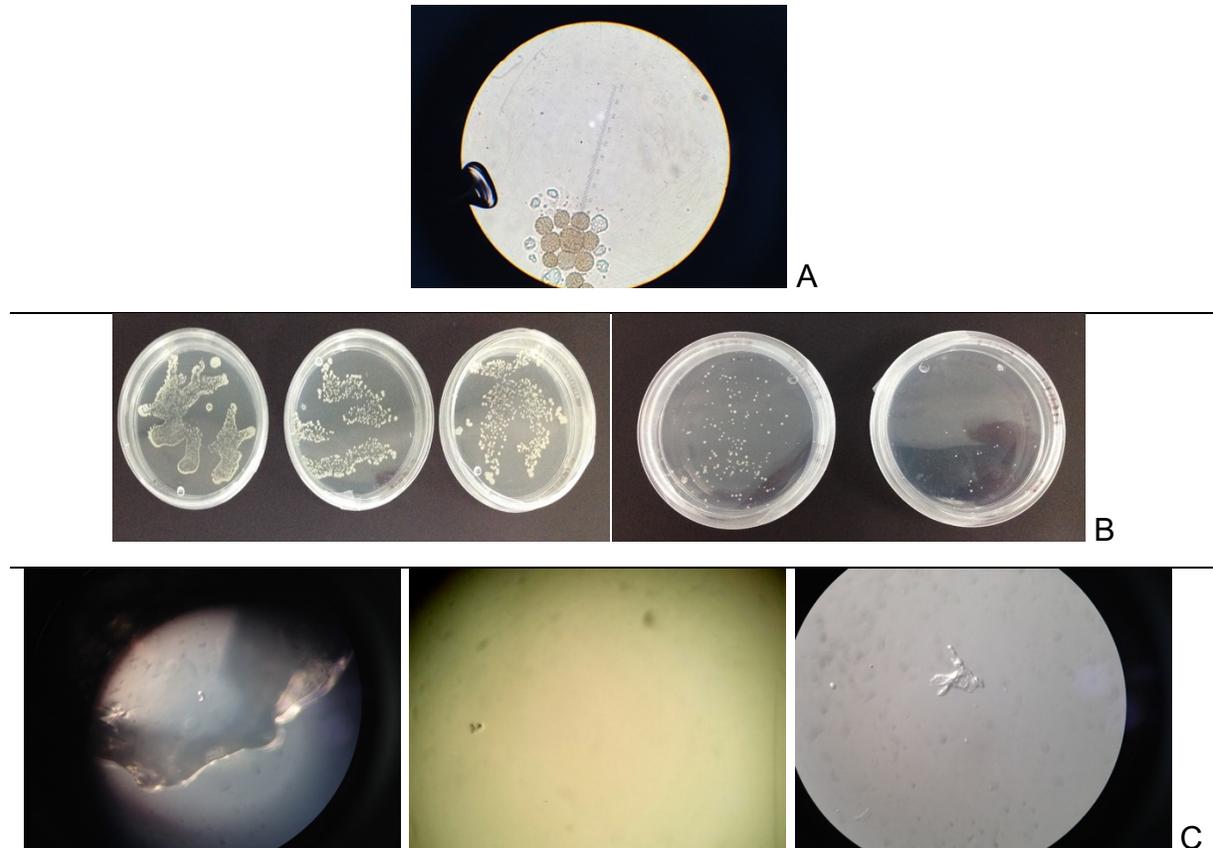
**Figura 13.** Agallas seleccionadas para aislar las teliosporas de *Ustilago maydis* CP-897.

Muchas metodologías sugieran el lavado de las agallas para reducir contaminantes del tipo microbiológico, sin fisuras o que están totalmente secas, pues dentro del maíz existe un ambiente bastante húmedo lo que ocasiona la proliferación de algunos otros patógenos como: *Physoderma maydis*, *Puccinia sorghi*, *Physopella zaeae*, que son altamente frecuentes (Montaño, 2015).

#### 8.1.2 Teliosporas aisladas y germinadas en medio PDA

Después de haber sido lavadas las agallas, en condiciones de esterilidad se realizó la recolección de teliosporas en un sistema acuoso, para ser observadas al microscopio (Fig. 14-A) y sobre todo para trabajar con micro-diluciones. Las micro-diluciones fueron

sembradas en medio PDA, y para evitar la contaminación por otros fitopatógenos, se usó gentamicina, de esta manera se observó un crecimiento libre de contaminantes (Fig. 14-B).

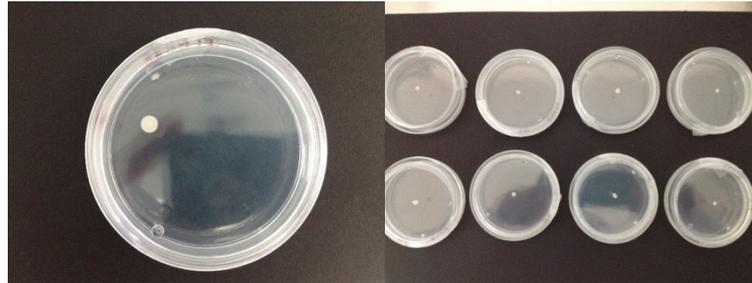


**Figura 14.** Germinación de teliosporas en medio de cultivo agar papa dextrosa de la cepa CP-897 de *Ustilago maydis*. A=Imagen en el microscopio estereoscopio de teliosporas. B= Crecimiento de teliosporas a diferentes niveles de concentración. C= Germinación de una teliospora vista con el microscopio estereoscopio.

En la figura 14-C se aprecia la germinación de una teliosporas, a través del microscopio estereoscopio (Zeuss) y en medio PDA, donde de izquierda a derecha se observa como la teliospora germina y después el tubo germinativo de la teliospora se bifurca para seguir creciendo en el medio de cultivo.

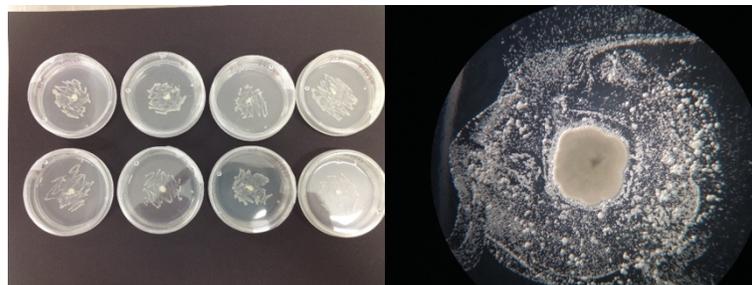
### 8.1.3 Esporidias aisladas y cultivadas en medio PDA

Cada una de las teliosporas aisladas fueron sembradas en cajas de Petri con medio PDA (Fig. 15). La cepa nativa a partir de la cual se aislaron fue registrada y conservada en el CREGENHC, con el registro CP-897.



**Figura 15.** Cultivo de una teliospora en medio agar papa dextrosa de *Ustilago maydis* (CP-897).

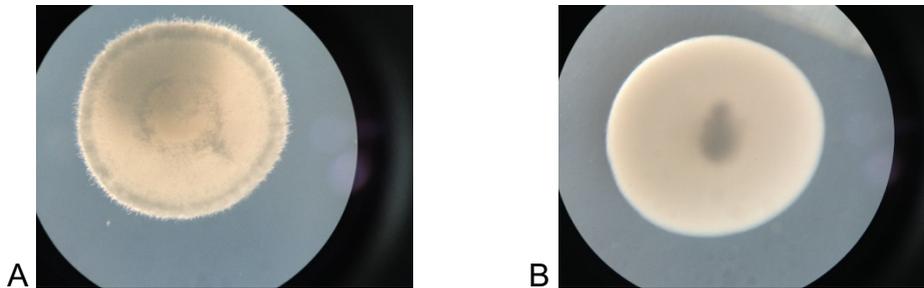
Una semana después de haber sido aislada he incubada, el crecimiento de la colonia fue muy lento, por lo tanto, para incrementar el área de colonización se adicionó agua destilada estéril y se estiró cada una de las colonias de esporidias. En la figura 16 se muestra el crecimiento de una esporidia después de haber sido propagada para ocupar un mayor espacio de colonización.



**Figura 16.** Colonia de una esporidia de *Ustilago maydis* (CP-897) en medio agar papa dextrosa.

#### 8.1.4 Tipos de esporidias

Durante el aislamiento de esporidias se logró apreciar los fenotipos expresados de manera *in vitro* de *U. maydis* en medio PDA. El primero (Fig. 17-A), fue una colonia de color blanco con crecimiento promicelial en los bordes y por encima. La figura 17-B, fue una colonia de aspecto liso o rugoso, sin un crecimiento en los bordes.



**Figura 17.** Caracterización de la colonia de una esporidia a las 48 horas de incubación de *Ustilago maydis* (CP-897).

#### 8.1.5 Entrecruzamientos de esporidias nativas

A partir de 20 monospóricos aislados, se generó el cruzamiento mediante la técnica de Banuett (fenotipo Fuzz) donde podemos observar, con un signo “+” una reacción positiva débil al cruzamiento de las cepas, con un signo “-” una reacción negativa, y con un signo “++” una reacción positiva fuerte (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Reacciones del cruzamiento intra-cepa de monosporidias de *Ustilago maydis*.

Esporidias	2	4	5	6	7	9	11	12	14	15	16	18	20	21	22	24	25	27	28	30
2	-																			
4	-	-																		
5	-	-	-																	
6	-	-	-	-																
7	++	++	++	++	-															
9	-	-	-	-	++	-														
11	+	+	+	+	++	+	-													
12	-	-	-	-	++	-	+	-												
14	-	-	-	-	++	-	+	-	-											
15	-	-	-	-	++	-	+	-	-	-										
16	-	-	-	-	++	-	+	+	+	-	-									
18	-	-	-	-	++	-	+	-	+	-	-	-								
20	-	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-	-							
21	-	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-						
22	-	-	-	-	++	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-					
24	-	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-				
25	-	-	-	-	++	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-			
27	-	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
28	-	-	-	-	++	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
30	-	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-

Se realizaron 190 cruza inter-específicas, de las cuales poco más del 25% (49 cruza) correspondieron a reacciones positivas. De estas reacciones positivas 12 correspondieron a las cruza de los monospóricos que se presentan en el cuadro 8. Mientras que 37 correspondieron a la sumatoria del comportamiento de las cepas e7 y e11, las cuales en ambos casos al cruzar cada una de los monospóricos con estas dos cepas su reacción siempre fue positiva. Este primer comportamiento evidencia cepas heterocarióticas infectivas o también llamadas cepas solo patogénicas como lo describen Galicia y col. (2016).

**Cuadro 8.** Cruzas positivas de monospóricos de *Ustilago maydis*.

e12xe16
e12xe22
e14xe16
e14xe18
e16xe22
e16xe25
e16xe28
e18xe22
e18xe24
e22xe30
e24xe25
e25xe30
e7xtodas las cepas
e11xtodas las cepas

### 8.1.6 Entrecruzamiento de esporidias tipo con cepas de referencia

A partir de las reacciones que se obtuvieron en las cruzas intra-específicas se seleccionaron los monospóricos e7 y e11 como principales monospóricos de interés, dado el comportamiento que tienen ante las demás cepas, junto con los monospóricos e2, e14, e18 y e21, que fueron cruzados contra los monospóricos de referencia CP-436 (*a1b1*) y CP-437 (*a2, b2*), mismo que han sido caracterizados molecularmente y probados en campo por el CREGENHC.

En el cuadro 9 se observa la clasificación de los monospóricos nativos, siendo de la clase I aquellos que reaccionan positivamente con el monospórico CP-437 y de la clase II los que reacciones positivamente con el monospórico CP-436. En cuanto a los monospóricos e7 y e11, la respuesta en sus cruzas ha sido positivas con ambos monospóricos de referencia (CP-436 y CP-437), de tal manera que no pertenece a una sola clase y posiblemente se traten de cepas heterocarióticas.

**Cuadro 9.** Ubicación de las esporidias de *Ustilago maydis* en sus clases de compatibilidad.

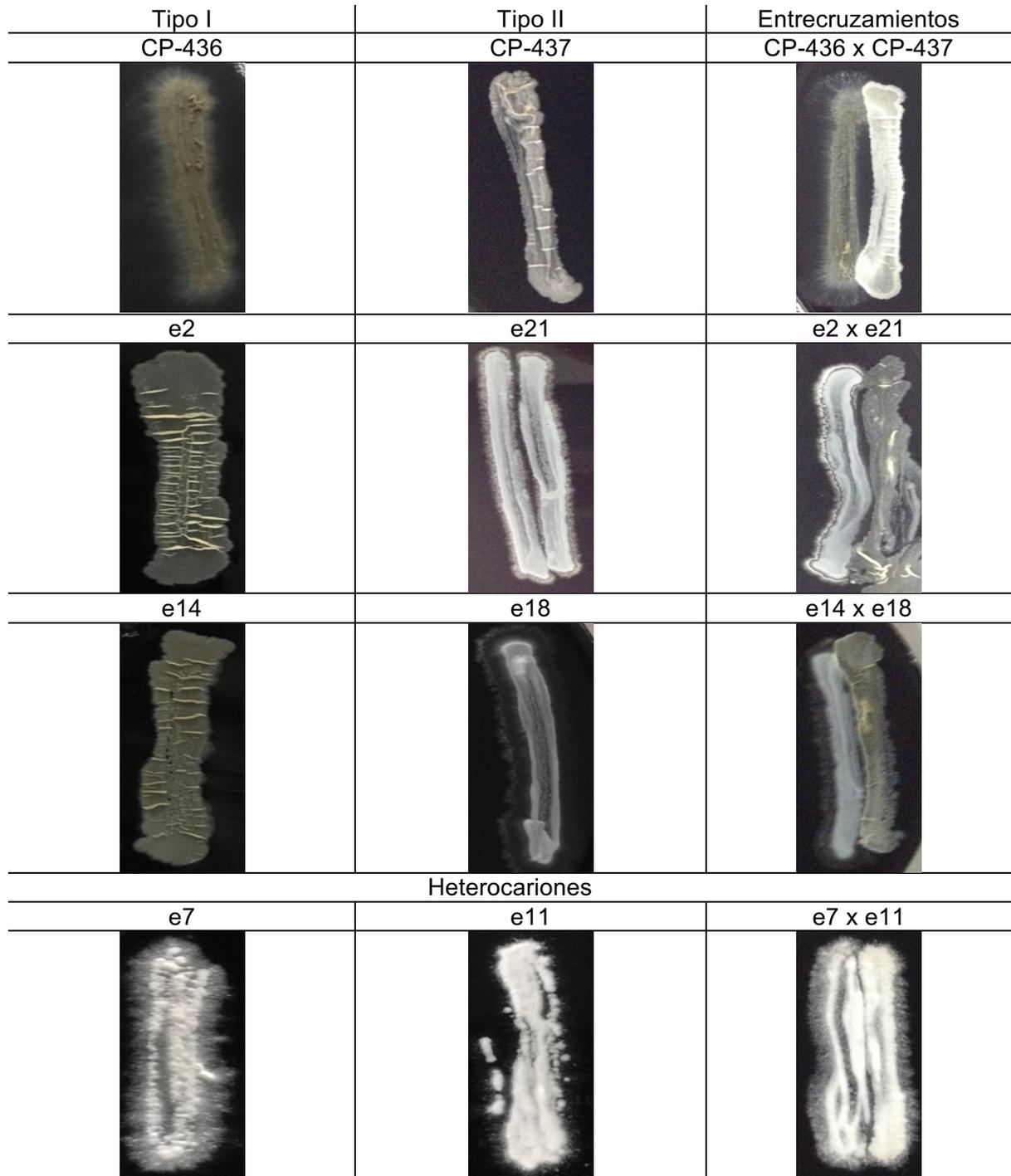
<b>CLASE I</b>	<b>CLASE II</b>
$(a_1b_1)$	$(a_2b_2)$
CP-436	CP-437
E2	E21
E14	E18
Heterocariones	
E7	
E11	

### 8.1.7 Confirmación mediante el ensayo de fenotipo Fuzz

Las imágenes de las esporidias tipo, del entrecruzamiento entre ellas mismas y el de las cruzadas con otras esporidias en medio PDA+CA a 120 horas, de incubación a temperatura ambiente se muestran en la figura 18. En el caso del cruzamiento de las cepas de referencia CP-436 y CP-437, se observan diferencias. La cepa CP-436 fue de color gris/verde con bordes de estructura promicelial, mientras que la cepa CP-437 fue de color blanco/amarillo de bordes de apariencia rugosa y consistencia levaduriforme, al cruzarse entre sí, la cepa CP-437 se volvió totalmente blanca y con una apariencia más algodonosa, mientras que la cepa CP-436 se tornó totalmente de color verde y conservando sus bordes con estructura promicelial. La cruce de las cepas e2 con la e21 fue la cruce negativa nativa, esto porque al cruzar las dos cepas, la cepa e21 de color blanco y bordes con estructura promicelial blanquecina con un centro de apariencia levaduriforme, fue igual a su crecimiento aislado; mientras que, la cepa e2 de color blanco/amarillo y apariencia rugosa también conservó sus características ya sea cruzada o sola.

La cruce de las cepas e14 y e18 correspondió a una cruce positiva nativa ya que la cepa e14 de apariencia rugosa y levaduriforme de color blanco/amarillo cambia al momento de cruzarse, a una cepa menos rugosa, mientras que la cepa e18 de apariencia levaduriforme color blanco y un halo cambia al momento de cruzarse a una cepa con un borde de crecimiento promicelial. Finalmente, la cruce entre las posibles cepas heterocarióticas, que correspondió a las cepas e7 y e11, al momento de cruzarse no presentaron mayor cambio con respecto a su crecimiento aislado, de

aparición algodonosa y bordes con estructura promicelial, salvo la intensificación de su crecimiento con estructura promicelial y aparición algodonosa.



**Figura 18.** Imágenes de cruzamientos en medio PDA+CA de esporidias seleccionadas.

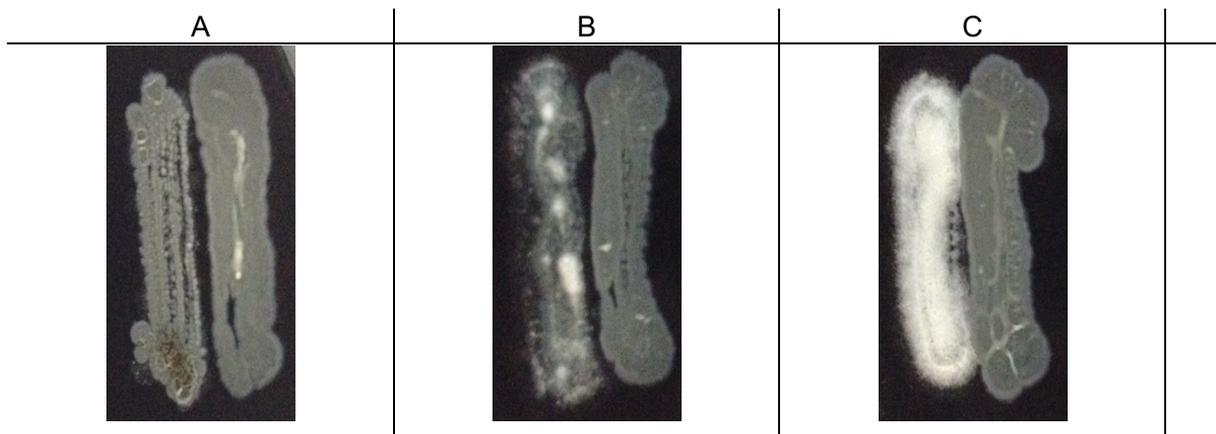
### 8.1.8 Tipos de entrecruzamientos

Dado que la clasificación de las reacciones fue morfológica, se procedió a describir los tipos de reacción encontrados.

Reacción negativa “-”. Se clasificó de esta manera porque ninguna de las colonias presentó algún cambio en su morfología con respecto a la colonia original aislada, además tomando como referencia a la cruce de las cepas CP-436 y CP-437 no comparte características morfológicas similares a dicho cruzamiento (Fig. 19-A).

Reacción positiva débil “+”. Se clasificó de esta manera porque existió un cambio en la morfología en al menos una de las colonias cruzadas con respecto a la morfología de la colonia original aislada. Puede presentar la formación de un crecimiento filamentososo algodonoso blanco, pero es muy débil en comparación con la reacción positiva fuerte. Presentó una morfología similar a la cruce de las cepas de referencia CP-436 y CP-437 (Fig. 19-B).

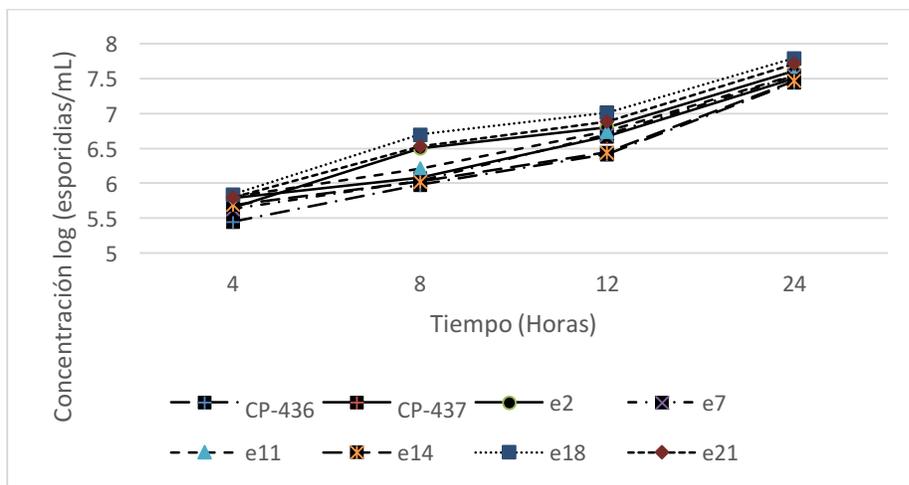
Reacción positiva fuerte “++”. Se clasificó de esta manera porque existió un cambio en la morfología de las colonias cruzadas con respecto a la morfología de las colonias originales aisladas. Además, presentó la formación de un crecimiento filamentososo algodonoso blanco que se observó a simple vista por el contraste del medio. Con respecto a la cruce de las cepas de referencia CP-436 y CP-437, esta reacción fue distinta por la gran formación algodonosa promicelial que resalta de esta reacción, mientras que en la cruce de referencia fue mínima (Fig. 19-C).



**Figura 19.** Tipos de reacciones. A= Reacción negativa (-). B= Reacción positiva débil (+). C= Reacción positiva fuerte (++)

### 8.1.9 Cinética de crecimiento de esporidias en ML-Malta

El crecimiento durante 24 horas de *U. maydis*, tanto de las cepas de referencia como las cepas nativas se muestra en figura 20. Se aprecia que las cepas de mayor producción, y en orden de mayor a menor, son la e18, e21 y e2, las tres son colonias de esporidias de la cepa CP-897 de procedencia nativa, en comparación con las cepas de referencian, de procedencia extranjera, que presentan un crecimiento menor siendo primero la cepa CP-437 y luego la cepa CP-436 con el crecimiento más bajo entre estas dos, aunque de forma global a la CP-436 se le anexa la e14 como las cepas de menor crecimiento entre todas.

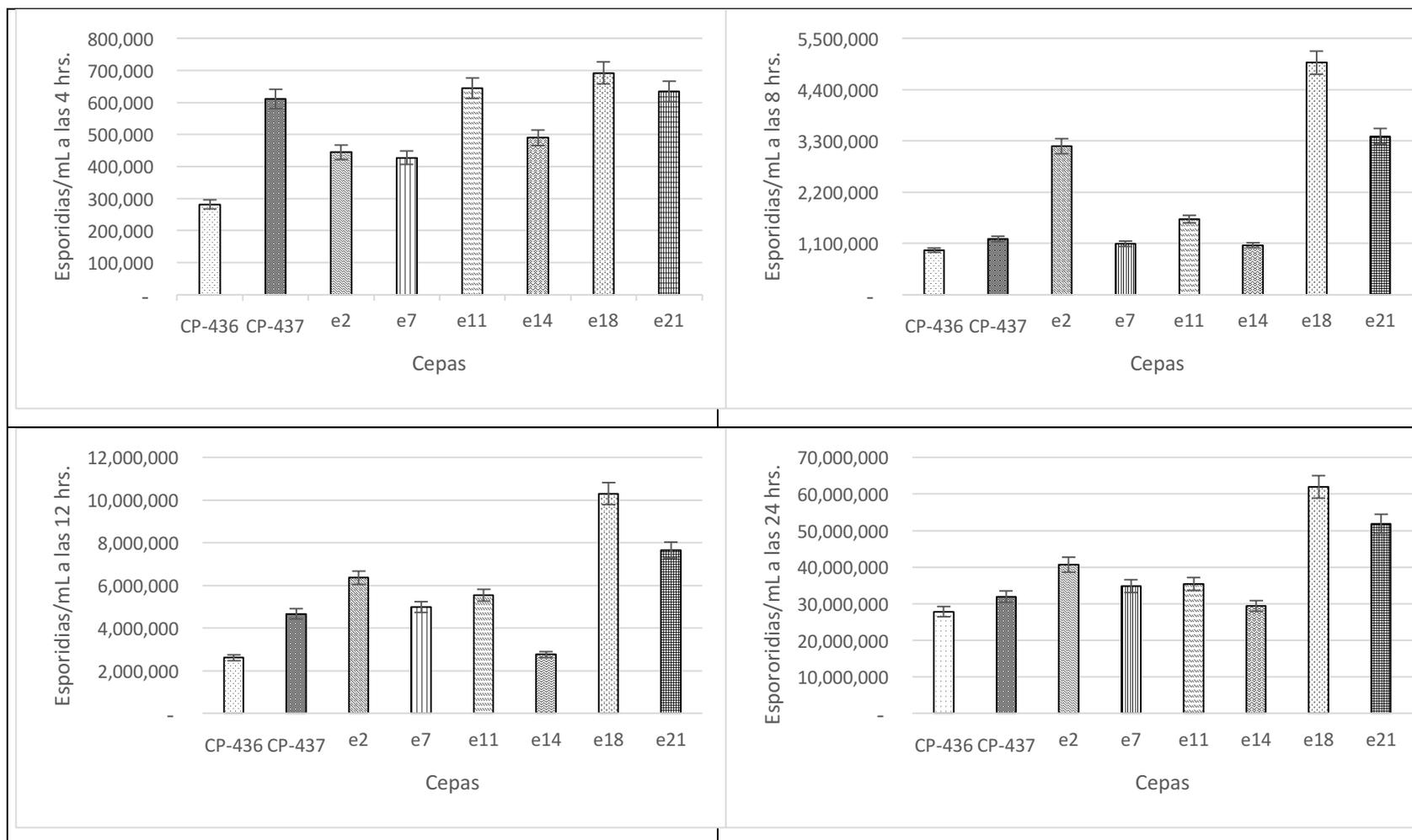


**Figura 20.** Cinética de crecimiento en ML-Malta de las cepas CP-436, CP-437, e2, e7, e11, e14, e18 y e21 de *Ustilago maydis*.

### 8.1.10 Concentración de esporidias por conteo en la cámara de Neubauer

Las cepas de referencia, CP-436 y CP-437, mostraron un crecimiento menor que en comparación con las cepas nativas e18 y e21, sin embargo, entre ellas la cepa CP-437 presentó un mayor crecimiento que la cepa CP-436.

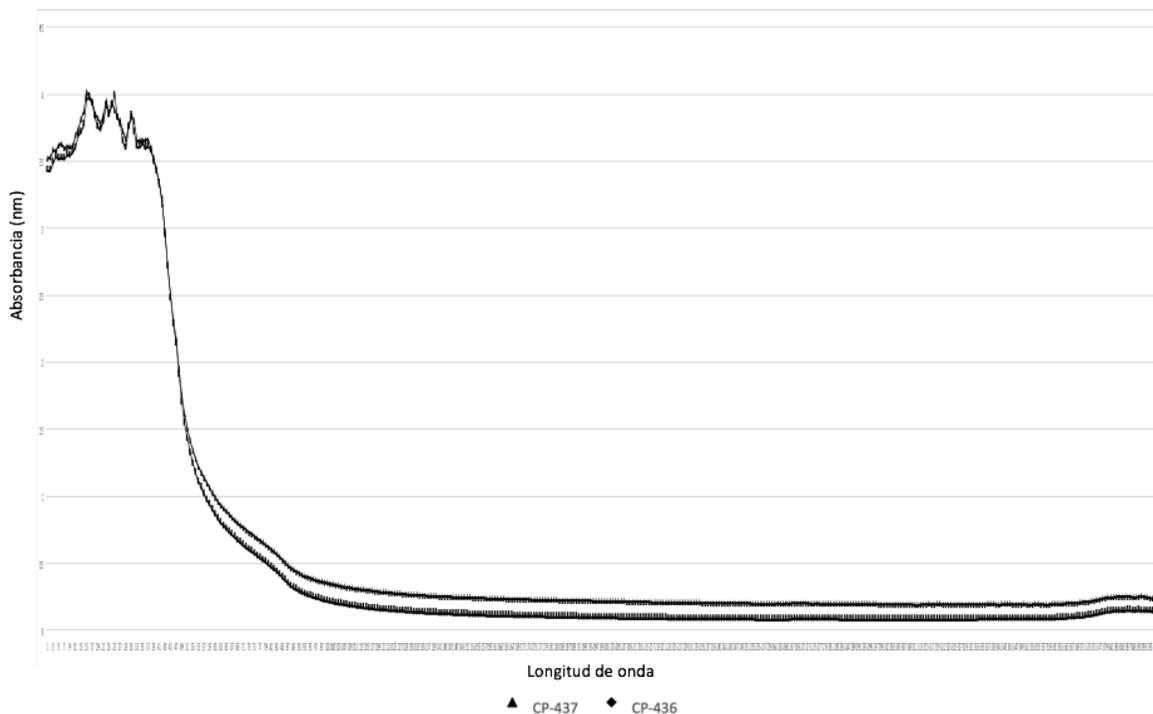
Entre las cepas nativas que se diferenciaron en cuanto al recuento celular fueron las cepas e18 y e21 (Fig. 21). Durante las primeras 4 horas y hasta la toma de muestra, de mayor a menor, el orden de las cepas nativas fue: e18, e21, e11, e14, e2 y e7; al final después de 24 horas, el orden de las cepas nativas en cuanto a la concentración de esporidias fue: e18, e21, e2, e7, e11 y e14. En un lapso de 12 horas existe una concentración de esporidias tal que se puede asegurar una infección del cultivo de maíz, además la concentración de esporidias a este tiempo permitió la estandarización de la concentración, asegurando que el volumen de pipeteo es correcto y no se vio influenciado por la viscosidad del cultivo.



**Figura 21.** Concentración de esporidias de *Ustilago maydis* por conteo en la cámara de Neubauer a 4, 8, 12 y 24 horas de incubación en ML-Malta

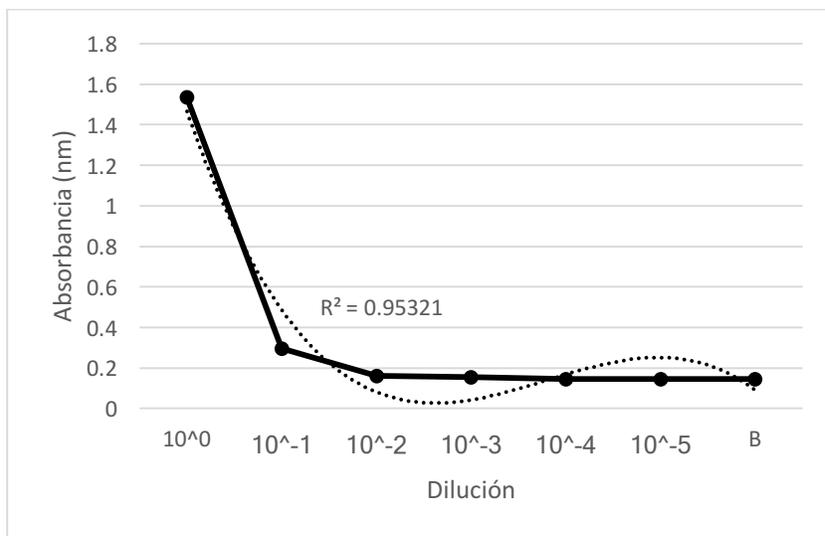
### 8.1.11 Concentración de esporidias por medición de la densidad óptica

El barrido espectral representa del inóculo a la radiación electromagnética en diferentes longitudes de onda, siendo este perfil propio del crecimiento de *U. maydis* en medio líquido malta (Fig. 22). A partir del barrido se identificaron las longitudes de onda de 292 nm y 364 nm como valores en donde se exploraría las microdiluciones de diluciones de esporidias.



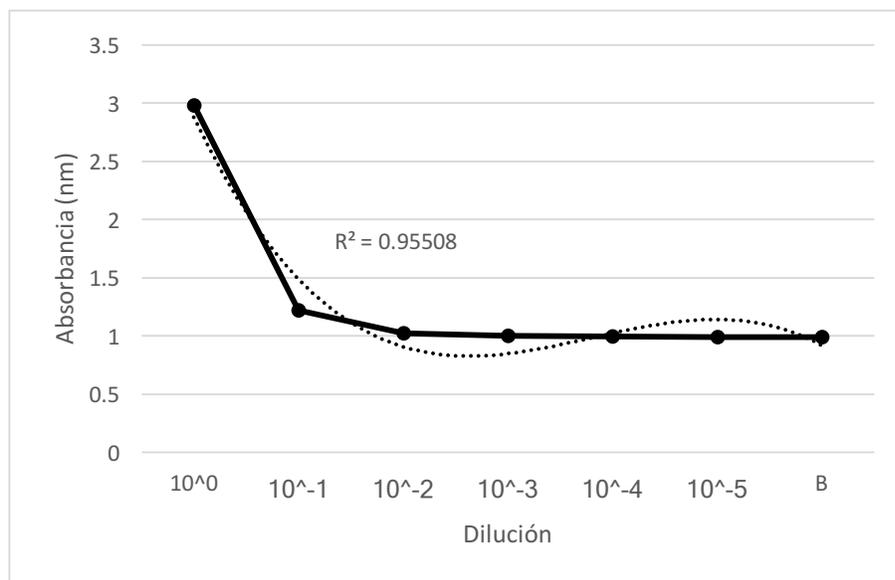
**Figura 22.** Barrido en el espectrofotómetro de UV de las cepas CP-436 y CP-437 de *Ustilago maydis* a 12 horas de incubación.

La lectura de las diluciones de esporidias de *U. maydis* a 364 nm se observan en la figura 23, presenta una amplitud de entre 0.1 a 1.5 unidades de absorbancia, con un coeficiente de determinación de 0.953, las diluciones corrieron de la más concentrada ( $10^0$ ) a la más diluida ( $10^{-5}$ ) con el blanco al final (B).



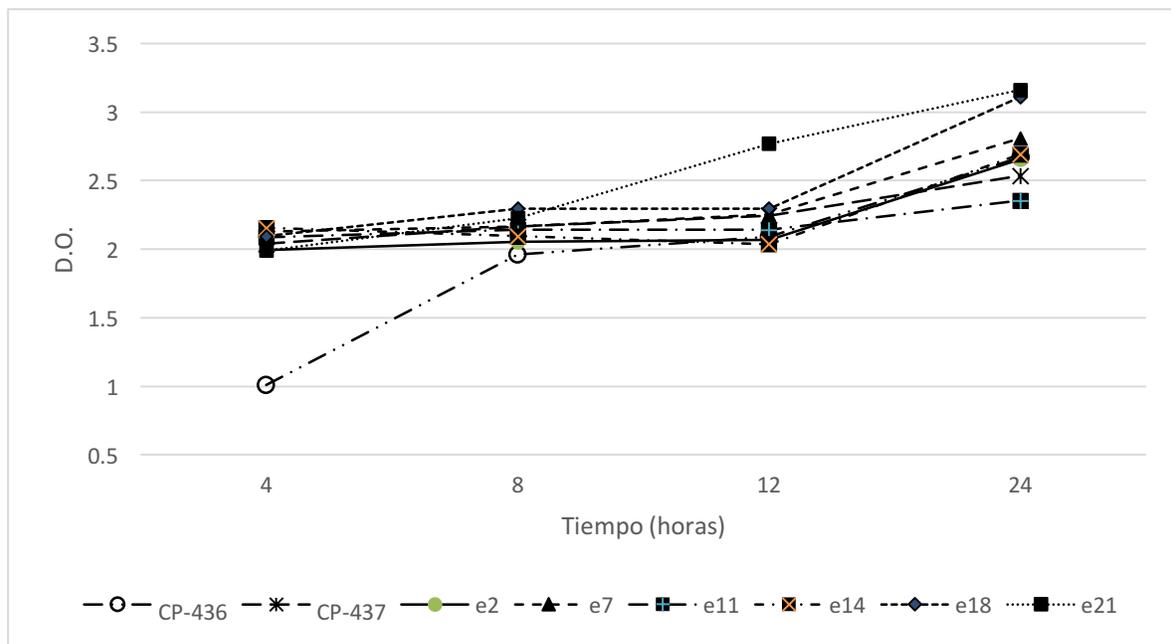
**Figura 23.** Lectura de diluciones de esporidias de la cepa CP-437 de *Ustilago maydis* a  $\lambda=364$  nm.

Mientras que, con un coeficiente de determinación de 0.955, lecturas a 292 nm nos permitieron trabajar en una amplitud de 1 a 3 unidades de absorbancia, esto es 36% más grande que con el ensayo a 364 nm (Fig. 24). De igual manera las diluciones corren de la más concentrada ( $10^0$ ) a la más diluida ( $10^{-5}$ ) con el blanco al final (B). De esta manera se decidió trabajar con una  $\lambda$  de 292 nm.



**Figura 24.** Lectura de diluciones de esporidias de la cepa CP-437 de *Ustilago maydis* a  $\lambda=292$  nm.

Una vez establecida la longitud de onda de trabajo, se midió la densidad óptica y correlacionó la turbidez del inóculo con el conteo de esporidias. En la figura 25 se concentran todas las esporidias de *U. maydis* medidas por D.O. a lo largo de 24 horas, donde encontramos el mismo comportamiento que en la cinética utilizando el conteo en cámara de Neubauer, es decir, las absorbancias más altas en su mayoría correspondieron a las cepas nativas, lo cual resultó razonable por la alta concentración de esporidias



**Figura 25.** Concentración de esporidias por D.O. para las cepas nativas e2, e7, e11, e14, e18 y e21 y las cepas de referencia CP-436 y CP-437 de *Ustilago maydis*.

Se comprobó el comportamiento de los conteos de crecimiento de *Ustilago maydis* en medio líquido malta, mediante recuento celular y densidad óptica. Las variables: absorbancia y concentración se sometieron a una matriz de correlación de Pearson. En el cuadro 10 se observa que la absorbancia con respecto a la concentración presentó un coeficiente de correlación de 0.85 y una significancia alta de 0.0001.

**Cuadro 10.** Coeficiente de correlación de Pearson, N=32. Prob > |r| suponiendo H0: Rho=0.

	Absorbancia	Concentración
Absorbancia	1.00000	0.85315 <i>P</i> <.0001
Concentración	0.85315 <i>P</i> <.0001	1.00000

### 8.1.12 Cálculo de la concentración de esporidias para la elaboración del inóculo

Establecida y comprobada matemáticamente la correlación de la absorbancia con la concentración de esporidias, se procedió a desarrollar la ecuación del cálculo de la concentración de esporidias por mililitro.

Así por ejemplo si la concentración inicial es de 37,913,505 esporidias•mL<sup>-1</sup> y si requerimos preparar 10 mL de inóculo a una concentración de 1 x10<sup>6</sup> esporidias•mL<sup>-1</sup>, entonces tenemos:

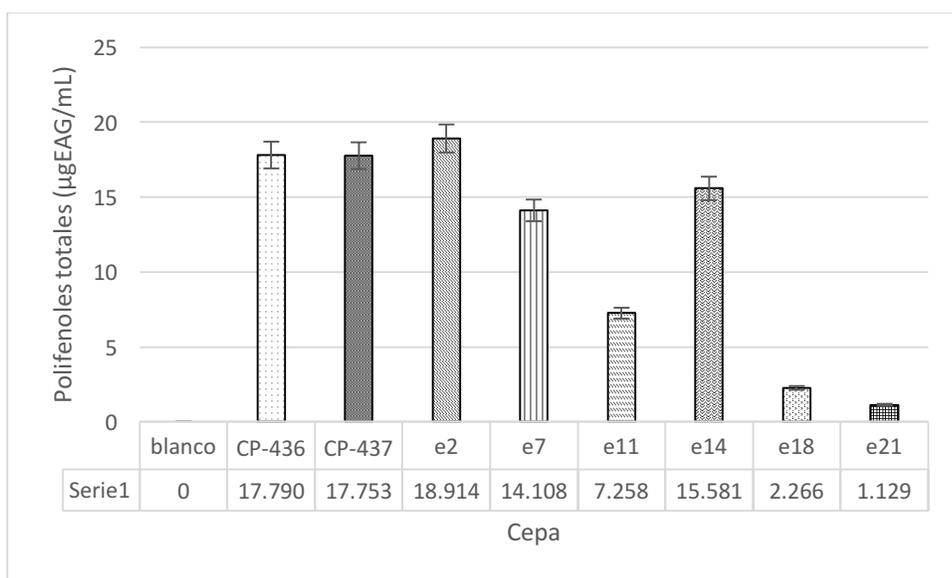
$$V_1 = \frac{\left(\frac{1 \times 10^6 \text{ esporidias}}{\text{mL}}\right)(10 \text{ mL})}{\left(\frac{37,913,505 \text{ esporidias}}{\text{mL}}\right)} =$$

0.264 mL de inóculo, serán diluidos en 9.736 ml de agua destilada estéril.

Thakur y *col.* (1989), Cota (2004), Valdez y *col.* (2009), Escalante (2013), y Hernández-Gasca (2016), han utilizado 1x10<sup>6</sup> esporidias•mL<sup>-1</sup> como concentración de referencia en la preparación de inóculo a 24 y 48 horas de incubación en medio líquido malta o PDA, diluyendo para alcanzar la concentración mediante un recuento celular. A partir de las primeras 4 horas para las cepas de referencia tuvimos en promedio 346,500 esporidias•mL<sup>-1</sup> y para las cepas nativas 622,250 esporidias•mL<sup>-1</sup>; mientras que a las 12 horas de incubación para las cepas referencia tuvimos en promedio 3,417,500 esporidias•mL<sup>-1</sup>, y para las cepas nativas 32,166,667 esporidias•mL<sup>-1</sup>. Con el tiempo sigue aumentando el número de esporidias dificultando su manipulación, a 24 horas de incubación el inóculo se volvió denso y difícil de tomar un volumen exacto.

### 8.1.13 Polifenoles totales

La concentración de polifenoles totales para las cepas de referencia CP-436 y CP-437 se muestra en la figura 26, así como para las 6 cepas seleccionadas nativas. La cepa e2 alcanzó una producción de 18.9 ugEAG/mL siendo esta la cepa de mayor producción, y la cepa de menor producción fue la cepa e21 con tan solo 1.1 ugEAG/mL. La cepa e14 tuvo una producción de 15.5 ugEAG/m, la cepa e7 una producción de 14.1 ugEAG/mL, la cepa e11 una producción de 7.2 ugEAG/mL y la cepa e18 de 2.2 ugEAG/mL, 4 valores que se encuentran por debajo de la producción de las 2 cepas de referencia, CP-436 con una producción de 17.7 ugEAG/mL y la cepa CP-437 con 17.7 ugEAG/mL.



**Figura 26.** Polifenoles totales de las cepas seleccionadas de *Ustilago maydis* en medio líquido malta.

De manera natural encontramos genotipos capaces de producir una mayor cantidad de polifenoles, mismos que si los incluyes como parte de la dieta, mejora la estabilidad frente a la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Steinbert y col., 1989), además estimulan el sistema inmune, incluso tienen injerencia en la regulación del metabolismo de hormonas, así como efecto antiviral y antibacteriano (Liu, 2004). El huitlacoche en la dieta mejora la estabilidad frente a la oxidación de las lipoproteínas

de baja densidad (LDL), proceso que ha sido asociado de forma significativa con la génesis de aterosclerosis y enfermedades del corazón.

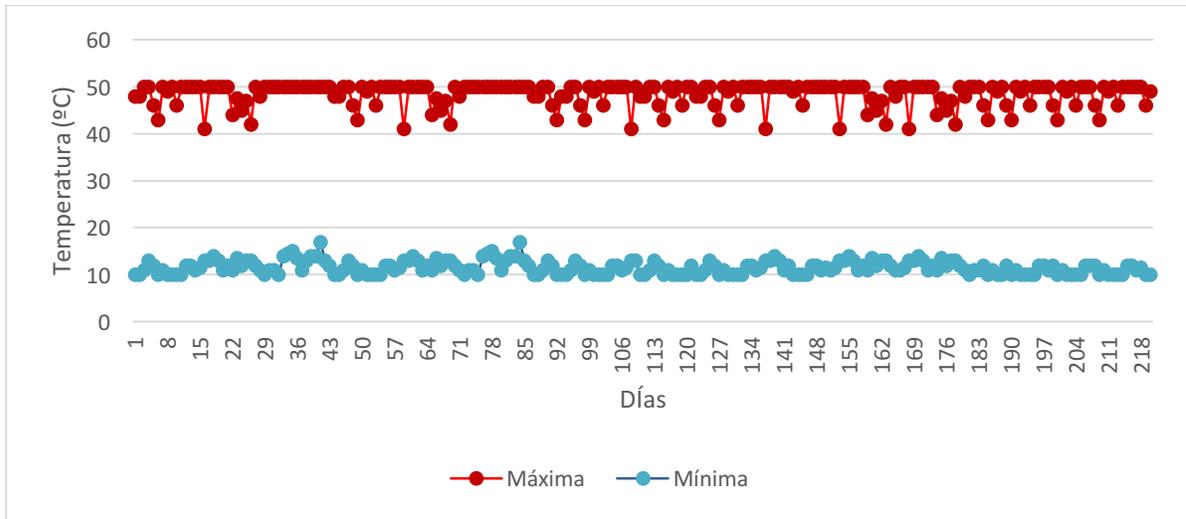
## 8.2 Fase de invernadero

Gaspar y *col.* (2010), realizaron caracterizaciones de maíz y dentro de ellas se encuentran 8 variables básicas, altura de planta, peso de planta con elote, largo de elote, diámetro de elote, peso del elote sin bráctea y sin estigma, peso de grano, diámetro de elote y largo de elote (Fig. 27).



**Figura 27.** Tres variedades de maíz sembradas en invernadero del programa de mejoramiento genético del COLPOS-Puebla: CHI-CP-12, ZAC-CP-14, y HUE-CP-14.

El experimento se calendarizó del 22 de marzo al 05 de octubre del 2016, con un total de 218 días. En la figura 28 se muestra el registro de temperatura a lo largo del periodo mencionado, siendo 50 °C la temperatura más alta registrada dentro del invernadero, y la temperatura más baja fue de 10 °C.



**Figura 28.** Registro de temperatura durante los ciclos de cultivo de maíz dentro de invernadero.

### 8.2.1 Caracterización del maíz primera siembra

Durante la primera siembra las 8 variables evaluadas en la caracterización del maíz mostraron lo siguiente. Con respecto a la altura de la planta, la máxima fue de 4.65 m mientras que la mínima fue de 1.54 m. Para el peso de la planta con elote, el valor máximo fue de 1.84 kg y el mínimo de 0.500 kg. El largo del elote alcanzó una longitud de 50 cm, y como mínimo midió 15.5 cm. El diámetro del elote fue de 8.28 cm como máximo, y como mínimo 2.63 cm. El peso del elote sin bráctea y sin estigma fue de 370 g como máximo, y como mínimo 110 g. El peso máximo del grano fue de 180 g, mientras que como mínimo peso 10 g. En cuanto al diámetro del olote como máximo fue de 4.46 cm, y como mínimo de 1.51 cm. Finalmente, el largo del olote alcanzó un máximo de 24 cm, y un mínimo de 9.50 cm (Cuadro 11).

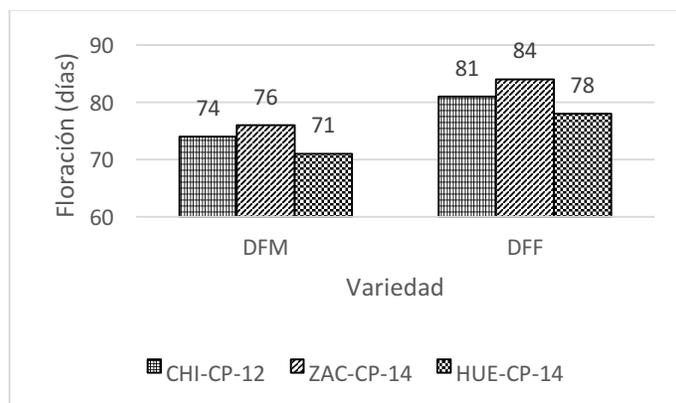
**Cuadro 11.** Variables medidas en la caracterización de maíz en invernadero durante la primera siembra.

	N	Máximo	Mínimo	Desviación estándar	Media	Mediana	Moda
AP	45	4.65	1.54	0.674	3.538	3.64	3.80
PPE	45	1.84	0.50	0.288	1.331	1.38	1.38
LE	45	50.00	15.50	6.863	34.572	35.25	36.50
DE	45	8.28	2.63	1.146	5.887	5.81	5.57
PESBE	45	370.00	110.00	58.431	215.111	215.00	140.00
PG	45	180.00	10.00	38.644	61.222	60.00	20.00
DO	45	4.46	1.51	0.531	2.910	3.02	3.18
LO	45	24.00	9.50	3.622	17.456	17.50	14.00

AP= Altura de planta. PPE= Pesos de planta con elote. LE= Largo de elote. DE= Diámetro de elote. PESBE= Pesos del elote sin bráctea y sin estigma. PG= Peso de grano. DO= Diámetro de elote. LO= Largo de elote.

### 8.2.2 Análisis estadístico primera siembra

La siembra se llevó a cabo a partir del 22 de marzo al 13 de julio de 2016. La temperatura osciló entre 50 °C la máxima y 10 °C la mínima. La variedad CHI-CP-12 tardó 74 días de floración masculina y 81 días de floración femenina, siendo esta la de ciclo intermedio en comparación con las dos variedades restantes (Fig. 29). Para la variedad ZAC-CP-14 fue la de ciclo más tardío con 76 días de floración masculina y 84 días de floración femenina. La variedad HUE-CP-14 fue la variedad de ciclo corto, con 71 días de floración masculina y 78 días de floración femenina.



**Figura 29.** Tiempo de floración masculina (DFFM) y floración femenina (DFF) por cada variedad de maíz para la primera cosecha.

En el cuadro 12 se observa la significación estadística de los cuadrados medios del análisis de varianza de las 8 variables medidas en esta primera siembra. Como se puede apreciar para ninguna de las variables dependientes encontramos efecto significativo frente a la fuente de variación (3 variedades) a nivel invernadero, para seleccionar los recursos vegetales estudiados. Lo más importante fue que el peso del elote sin brácteas y sin estigmas (PESBE), y el peso de grano (PG), considerado como el rendimiento del sustrato, donde *U. maydis* crecerá para su infección y posterior comercialización, no fueron significativos de acuerdo al modelo estadístico planteado frente a la fuente de variación, las condiciones de invernadero fueron uniformes, se evitó influenciar las variables dependientes con respecto de la variedad de maíz.

**Cuadro 12.** Significancia estadística de cuadros medios del análisis de varianza de 8 variables medidas de las 3 variedades sintéticas de maíz bajo condiciones de invernadero, Puebla, durante el primer ciclo de maíz.

Variables	Fuentes de Variación	GL	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
AP	Variedad	2	0.30984222 <sup>ns</sup>	0.3	0.7412
PPE	Variedad	2	0.07072889 <sup>ns</sup>	0.43	0.6503
LE	Variedad	2	123.3347222 <sup>ns</sup>	1.27	0.2906
DE	Variedad	2	0.29930889 <sup>ns</sup>	0.1	0.9026
PESBE	Variedad	2	5086.66667 <sup>ns</sup>	1.02	0.3708
PG	Variedad	2	4281.666667 <sup>ns</sup>	2.95	0.0633
DO	Variedad	2	0.27872667 <sup>ns</sup>	0.42	0.6587
LO	Variedad	2	0.10972222 <sup>ns</sup>	0	0.9958

AP= Altura de planta. PPE= Pesos de planta con elote. LE= Largo de elote. DE= Diámetro de elote. PESBE= Pesos del elote sin bráctea y sin estigma. PG= Peso de grano. DO= Diámetro de elote. LO= Largo de elote. \*\*=Diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.01$ ); \*=Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ); ns= Diferencias no significativas.

### 8.2.3 Caracterización del maíz segunda siembra

Durante la segunda siembra las 8 variables evaluadas en la caracterización del maíz mostraron lo siguiente, la altura de la planta más alta fue de 3.63 m mientras que la mínima fue de 2.16 m. Para el peso de la planta con elote, la planta que más pesó tuvo 1.62 kg y la menor de 0.600 kg. El largo del elote alcanzó un valor máximo de 37 cm, y el mínimo midió 20 cm. El diámetro del elote fue de 8.28 cm como máximo, y como mínimo 4.14 cm. El mayor peso del elote sin bráctea y sin estigma fue de 190 g, y

como mínimo 80 g. El elote con grano fue de 130 g, mientras que como mínimo peso 35 g. En cuanto al diámetro del olote como máximo fue de 3.98 cm, y como mínimo de 2.39 cm. Finalmente, el largo del olote alcanzó un máximo de 24 cm, y un mínimo de 11 cm (Cuadro 13).

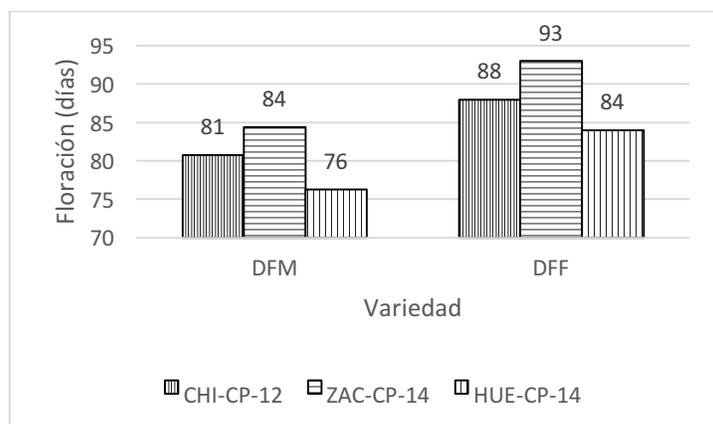
**Cuadro 13.** Variables medidas en la caracterización de maíz en invernadero durante la segunda siembra.

	N	Máximo	Mínimo	Desviación estándar	Media	Mediana	Moda
AP	48	3.63	2.16	0.386	2.714	2.630	2.63
PPE	48	1.62	0.60	0.258	0.918	0.845	1.10
LE	48	37.00	20.00	4.019	29.366	29.500	27.50
DE	48	8.28	4.14	0.802	5.270	5.170	4.77
PESBE	48	190.00	80.00	29.223	117.604	110.000	100.00
PG	48	130.00	35.00	21.850	69.240	70.000	70.00
DO	48	3.98	2.39	0.386	3.117	3.020	3.02
LO	48	24.00	11.00	2.531	16.130	16.000	15.00

AP= Altura de planta. PPE= Pesos de planta con elote. LE= Largo de elote. DE= Diámetro de elote. PESBE= Pesos del elote sin bráctea y sin estigma. PG= Peso de grano. DO= Diámetro de olote. LO= Largo de olote.

#### 8.2.4 Análisis estadístico segunda siembra

La variedad CHI-CP-12 tardo 81 días de floración masculina y 88 días de floración femenina, siendo esta la de ciclo intermedio en comparación con las dos variedades restantes (Fig. 30). ZAC-CP-14 fue la variedad de ciclo más tardío con 84 días de floración masculina y 93 días de floración femenina, con respecto a las demás variedades evaluadas. La variedad HUE-CP-14 fue la variedad de ciclo corto con 76 días de floración masculina y 84 días de floración femenina.



**Figura 30.** Tiempo de floración masculina (DFFM) y floración femenina (DFF) por cada variedad de maíz para la segunda cosecha.

En el cuadro 14 se observa la significación estadística de los cuadrados medios del análisis de varianza de las 8 variables medidas en la segunda siembra. Se pudo apreciar que para las variables altura de planta (AP), peso de plantas con elote (PPE) y largo del olote (LO) encontramos efecto significativo, por parte de nuestra fuente de variación, la variedad. Sin embargo, dentro de este periodo de cosecha existe un factor que no se contempló en el análisis y que está directamente ligado a las variables donde encontramos efecto significativo, se trata del régimen de radiación solar durante el periodo de crecimiento. Si bien es cierto que las condiciones de cultivo fueron las mismas, es decir, misma forma de fertilización, misma forma de riego, la realidad es que el área dentro del invernadero para el cultivo del maíz seguía siendo  $35.25\text{m}^2$ , y al ser un experimento continuo estas segundas unidades experimentales se colocaron a lado de las primeras, así que las plantas de maíz del primer cultivo interrumpieron la cantidad de luz que recibían las plántulas de maíz del segundo periodo, sin dejar de mencionar que las condiciones de luz de los meses de septiembre y octubre no son iguales que las de marzo y abril, siendo estas últimas el inicio de la estación de otoño.

**Cuadro 14.** Significancia estadística de cuadros medios del análisis de varianza de 8 variables medidas de las 3 variedades sintéticas de maíz bajo condiciones de invernadero, Puebla, en el segundo periodo.

Variables	Fuentes de Variación	GL	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
AP	Variedad	2	0.72457656**	5.85	0.0055
PPE	Variedad	2	0.34726658**	6.39	0.0036
LE	Variedad	2	33.70265625 <sub>ns</sub>	2.19	0.1234
DE	Variedad	2	1.27590208 <sub>ns</sub>	2.07	0.1378
PESBE	Variedad	2	3169.14063 <sub>ns</sub>	3.08	0.0556
PG	Variedad	2	594.16146 <sub>ns</sub>	1.26	0.2940
DO	Variedad	2	0.18660625 <sub>ns</sub>	1.27	0.2913
LO	Variedad	2	43.5950521**	9.18	0.0005

AP= Altura de planta. PPE= Pesos de planta con elote. LE= Largo de elote. DE= Diámetro de elote. PESBE= Pesos del elote sin bráctea y sin estigma. PG= Peso de grano. DO= Diámetro de elote. LO= Largo de elote. \*\*=diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.01$ ); \*=diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ); ns= diferencias no significativas.

Para las variables de rendimiento peso del elote sin brácteas y sin estigmas (PESBE) y peso de grano (PG), no encontramos efecto significativo de acuerdo al modelo estadístico planteado de tal forma que las condiciones de cultivo fueron uniformes.

Para corroborar el no haber percibido efecto significativo en el análisis de varianza de las variables PESBE y PG, y diferenciar las variables AP, PPE y LO, se corrió una prueba de medias por Tukey con  $\alpha$  de 0.05. En el cuadro 15 se muestran los promedios en columna por variables, y nuevamente se comprobó que estadísticamente no existió diferencia alguna entre dichas variables, considerando que la prueba agrupó las variables dependientes como un solo grupo.

**Cuadro 15.** Diferencia de medias por la prueba de Tukey para las variables medidas por variedad de maíz en la segunda siembra.

Variedad	AP	PPE	LE	DE	PESBE	PG	DO	LO
CHI-CP-12	2.916 <sup>a</sup>	1.0344 <sup>a</sup>	30.156 <sup>a</sup>	5.596 <sup>a</sup>	115.94 <sup>a</sup>	64.281 <sup>a</sup>	3.237 <sup>a</sup>	16.031 <sup>ab</sup>
ZAC-CP-14	2.735 <sup>ab</sup>	0.9678 <sup>ab</sup>	30.250 <sup>a</sup>	5.103 <sup>a</sup>	133.59 <sup>a</sup>	70.313 <sup>a</sup>	3.028 <sup>a</sup>	17.828 <sup>a</sup>
HUE-CP-14	2.492 <sup>b</sup>	0.7525 <sup>b</sup>	27.691 <sup>a</sup>	5.111 <sup>a</sup>	105.78 <sup>a</sup>	58.125 <sup>a</sup>	3.086 <sup>a</sup>	14.531 <sup>b</sup>

AP= Altura de planta. PPE= Pesos de planta con elote. LE= Largo de elote. DE= Diámetro de elote. PESBE= Pesos del elote sin bráctea y sin estigma. PG= Peso de grano. DO= Diámetro de elote. LO= Largo de elote. Medias con la misma letra en columnas, entre variedades y variables, no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha \leq 0.05$ ; GL=45).

### 8.2.5 Caracterización del maíz entre la primera y segunda siembra

Durante la segunda siembra las 8 variables evaluadas en la caracterización del maíz mostraron lo siguiente, la altura de la planta más alta fue de 4.65 m mientras que la pequeña de 1.54 m. Para el peso de la planta con elote, la máxima fue de 1.84 kg, y la mínima de 0.500 kg. El largo del elote alcanzó un valor máximo de 50 cm, y el mínimo midió 15.5 cm. El diámetro del elote fue de 8.28 cm como máximo a .63 cm. El peso del elote sin bráctea y sin estigma fue de 370 g, y el más bajo de 80 g. El peso máximo del grano fue de 180 g, mientras que el mínimo fue de 10 g. En cuanto al diámetro del olote fue de 4.46 cm a 1.51 cm. Finalmente, el largo del olote alcanzó 24 cm, y un mínimo de 9.50 cm (Cuadro 16).

**Cuadro 16.** Estadísticos básicos de las 8 variables medidas en la caracterización de maíz en invernadero durante la primera y segunda siembra.

	N	Máximo	Mínimo	Desviación estándar	Media	Mediana	Moda
AP	93	4.65	1.54	0.682	3.113	2.96	2.63
PPE	93	1.84	0.50	0.341	1.118	1.10	0.71
LE	93	50.00	15.50	6.134	31.885	32.00	30.00
DE	93	8.28	2.63	1.026	5.569	5.57	5.57
PESBE	93	370.00	80.00	66.853	164.785	147.50	100.00
PG	93	180.00	10.00	31.214	65.360	65.00	40.00
DO	93	4.46	1.51	0.471	3.0168	3.02	3.02
LO	93	24.00	9.50	3.160	16.772	16.50	15.00

AP= Altura de planta. PPE= Pesos de planta con elote. LE= Largo de elote. DE= Diámetro de elote. PESBE= Pesos del elote sin bráctea y sin estigma. PG= Peso de grano. DO= Diámetro de olote. LO= Largo de olote.

### 8.2.6 Análisis estadístico entre primera y segunda siembra

Analizado los datos de cada cosecha por separado, se procedió a análisis las variables rendimiento, peso del elote sin brácteas y sin estigmas (PESBE) y peso de grano (PG), en un modelo de diseño de bloques al azar, considerando a la cosecha como bloque (Software SAS Versión University para el S.O. Windows 7).

La significación estadística de los cuadrados medios del análisis de varianza de las 2 variables consideradas como rendimiento, PESBE y PG, se aprecian en el cuadro 17.

Se observa que no existió efecto significativo para la variable peso de grano (PG) de acuerdo al modelo estadístico planteado frente a las fuentes de variación del modelo, cosecha y variedad, mas no así para la variable peso del elote sin brácteas y sin estigma (PESBE), arrojando diferencias altamente significativas.

**Cuadro 17.** Significancia estadística de cuadros medios del análisis de varianza de 2 variables medidas de las 3 variedades de maíz bajo condiciones de invernadero en dos periodos de cosecha, Puebla.

VARIABLES	Fuentes de Variación	GL	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
PESBE	Cosecha, Variedad	3	60959.0535**	21.96	<.0001
PG	Cosecha, Variedad	3	2166.01607 <sup>ns</sup>	2.18	0.0964

PESBE= Pesos del elote sin bráctea y sin estigma. PG= Peso de grano. \*\*= Diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.01$ ); \*= Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ); ns= Diferencias no significativas.

Para identificar la fuente de variación que nos generó el efecto significativo dentro de la variable PESBE en nuestro modelo, se muestra la suma de cuadrados tipo III. En el cuadro 18 se puede observar que el efecto de significancia fue dado por la fuente de variación bloque (que corresponde a la cosecha) con una probabilidad de menor a 0.0001 (altamente significativo), pero en ningún momento por la fuente de variación variedad, es decir, existieron diferencias estadísticamente significativas entre la 1ª y 2ª cosecha, pero no por la fuente de variación.

**Cuadro 18.** Suma de cuadrados tipo III de la variable peso del elote sin bráctea y sin estigma en el análisis de varianza.

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadro de la media	F-Valor	Pr > F
bloque	1	169372.9940	169372.9940	61.00**	<.0001
variedad	2	13504.1667	6752.0833	2.43 <sup>ns</sup>	0.0937

\*\*=Diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.01$ ); \*=Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ); ns= Diferencias no significativas

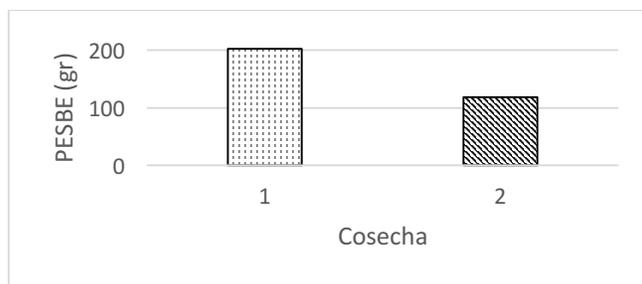
Sin embargo, tras realizar la prueba de medias para las variables PESBE y PG con respecto a la cosecha, si encontramos a dos grupos estadísticos diferentes por la prueba de Tukey con  $\alpha$  de 0.01 (Cuadro 19), para el peso del elote sin brácteas y sin estigma (PESBE), donde la primera cosecha fue la más alta siendo el grupo “a”.

**Cuadro 19.** Comparación de medias por cosecha de maíz para las variables medidas en la primera y segunda siembra.

Cosecha	PESBE	PG
1	203.00 <sup>a</sup>	57.667 <sup>a</sup>
2	118 <sup>b</sup>	69.240 <sup>a</sup>

PESBE= Pesos del elote sin bráctea y sin estigma. PG= Peso de grano. Medias con la misma letra en columnas, entre variedades y variables, no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha \leq 0.01$ ; GL=89).

La interacción de la 1<sup>a</sup> y 2<sup>da</sup> cosecha de la variable peso del elote sin brácteas y sin estigma (PESBE) se observa en la figura 31. Fue notorio como el rendimiento fue mayor en la 1<sup>a</sup> cosecha, obteniendo para todas las variedades de maíz rendimientos mayores que en la 2<sup>da</sup> cosecha, confirmando la posición de la 1<sup>a</sup> cosecha como grupo “a” en la prueba de medias de Tukey.



**Figura 31.** Interacción entre la 1<sup>ra</sup> y 2<sup>da</sup> cosecha para la variable peso del elote sin brácteas y si estigmas (PESBE). 1= Primera cosecha y 2= Segunda cosecha.

## 8.2.7 Infección del maíz por *U. maydis*

### 8.2.7.1 Infección en plántulas de maíz

En el cuadro 20 se observa que las cepas e7 y e11 presentaron la aparición de la enfermedad a los 7 días después de haber sido infectada la planta de maíz, también el híbrido formado por las cepas CP-437xe14 mostraron infección a los 7 días después de la inoculación. A los 14 días, el híbrido de referencia CP-436xCP-437 evidenciaron la aparición de la enfermedad; en el mismo lapso de tiempo los híbridos formados por cepas nativas e7xe11, e14xe18, CP-436xe7, CP-436xe11 y CP-437xe7, mostraron la aparición de la enfermedad.

**Cuadro 20.** Relación de aparición de infección para todas las cruzas de las cepas de *Ustilago maydis* cultivada en la variedad de maíz Hue-CP-14

Registro	Tiempo de infección (días)			
	7	14	21	28
CP-436	-	-	-	-
CP-437	-	-	-	-
e2	-	-	-	-
e7	√	√	√	√
e11	√	√	√	√
e12	-	-	-	-
e14	-	-	-	-
e16	-	-	-	-
e18	-	-	-	-
e21	-	-	-	-
e28	-	-	-	-
e30	-	-	-	-
CP-436xCP-437	-	√	√	√
e2xe21	-	-	-	-
e7xe11	-	√	√	√
e12xe14	-	-	-	-
e12xe16	-	-	-	-
e12xe18	-	-	-	-
e14xe16	-	-	-	-
e14xe18	-	√	√	√
e16xe28	-	-	-	-
e18xe28	-	-	-	-
e22xe30	-	-	-	-
CP-436xe2	-	-	-	-
CP-436xe7	-	√	√	√
CP-436xe11	-	√	√	√
CP-436xe14	-	-	-	-
CP-436xe18	-	-	-	-
CP-436xe21	-	-	-	-
CP-437xe2	-	-	-	-
CP-437xe7	-	√	√	√
CP-437xe11	-	-	√	√
CP-437xe14	√	√	√	√
CP-437xe18	-	-	-	-
CP-437xe21	-	-	-	-

Durante 28 días se evaluó el comportamiento de los monocariones en las plántulas, (Fig. 32). Al ser monocariones de acuerdo a Banuett (1999), las plantas no mostraron signos de infección al desarrollarse de manera natural; sin embargo, para las cepas e7 y e11 fue de otra manera, estas cepas generaron en las plantas clorosis, acumulación de antocianinas e incluso, para la cepa e7, la aparición de tumores en las hojas a los 7 días de la inoculación, eventualmente la aparición de agallas a las 18 días después de haber sido inoculadas, con mayor tamaño en la zona del tallo cercana al suelo.

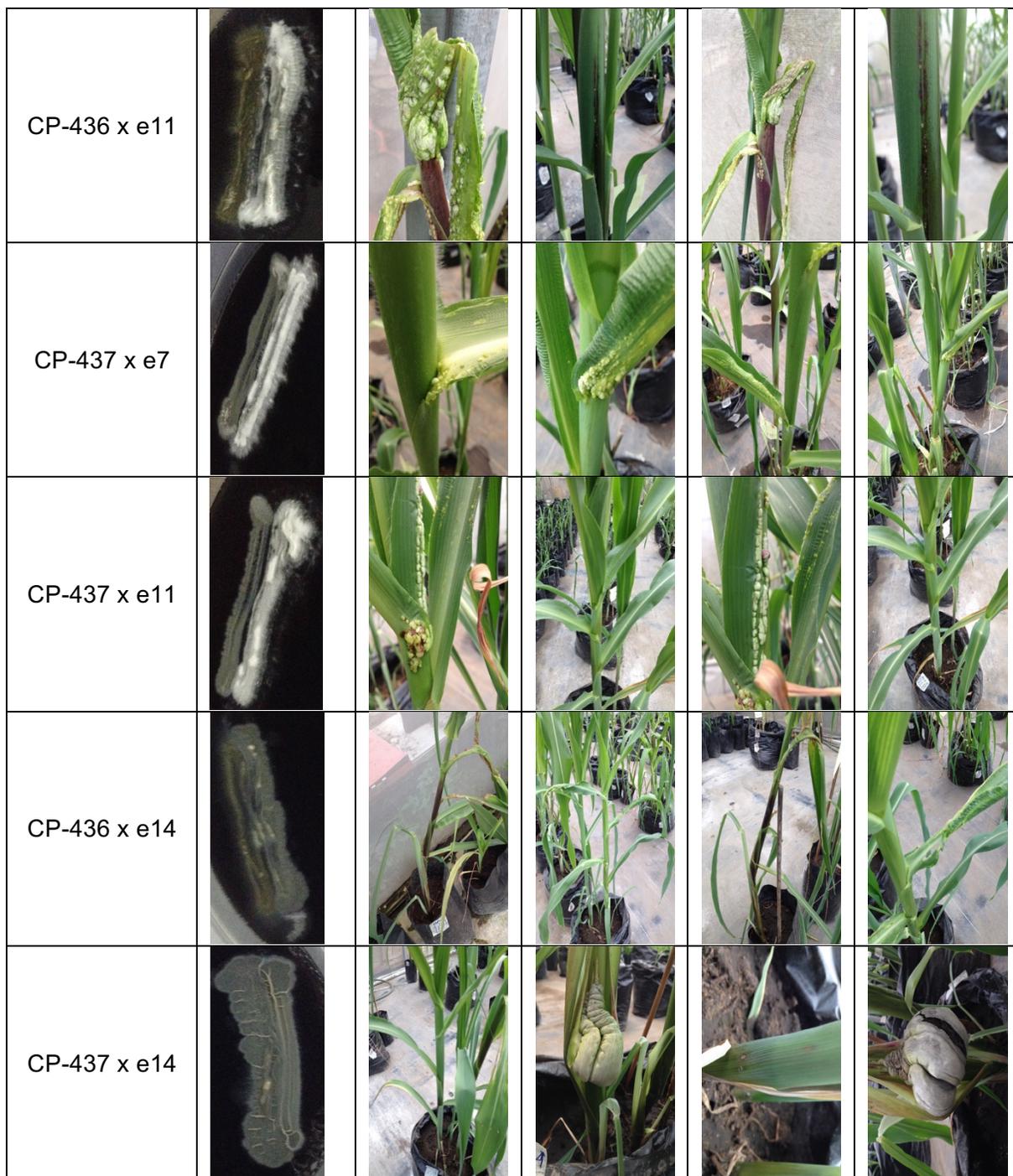
Esporidias	Morfología de la colonia en medio de cultivo	Tiempo (días)			
		14	18	21	28
CP-436					
CP-437					
e7					
e11					
e14					

**Figura 32.** Seguimiento de la infección de diferentes esporidias de *Ustilago maydis* en plántulas de maíz cultivadas en invernadero.

Los híbridos también fueron inoculados en las plántulas de maíz. El híbrido formado por las cepas e2xe21 fungió en el experimento como control negativo nativo, dado que en la reacción de fenotipo Fuzz al cruzar dichas cepas en cajas de Petri, no mostraron cambio en la morfología de sus colonias, y las plántulas inoculadas con este híbrido tampoco mostraron evidencia de enfermedad (Fig. 33). El híbrido formado por las cepas e14xe18 utilizado como control positivo nativo, evidenció un cambio de sus colonias al cruzarse respecto a de manera aislada, sin embargo, en las plántulas de maíz no produjo agallas, pero si detuvo el crecimiento de las plantas, presentó clorosis y necrosis en la parte aérea de las misma. El híbrido de referencia, formado por las cepas CP-436xCP-437, cepas que han sido probadas *in-vivo* y caracterizadas molecularmente en el CREGENHC, aseguraron la infección del maíz, confirmado previamente con el fenotipo Fuzz, reacción positiva, y en el experimento se observó la infección hasta la formación de agallas en la parte aérea de las plántulas. El fenotipo Fuzz al cruzar las cepas e7xe11 se apreció una reacción positiva, y al momento de inocular las plantas también se evidencia la capacidad infectiva de dichas cepas con la formación de tumores y agallas en la zona media del tallo de la plántula de maíz.

Ambas monoesporidias (e7 y e11) se cruzaron con cada una de las cepas de referencia y aparecieron tumores en la parte área de las plántulas de maíz. El híbrido formado con la cepa e14xCP-436, en el ensayo de fenotipo Fuzz dio resultado negativo, que se comprobó en la inoculación de plantas de maíz, mismas que no presentaron signos de enfermedad. En el caso del híbrido formado por las cepas e14xCP-437, la apariencia de la colonia no mostró una reacción positiva, sin embargo, al momento de inocular en las plántulas de maíz, la infección se llevó acabo, incluso su desarrollo fue tal que produjo agallas en la zona del tallo cercana al suelo.

Heterocariones	Morfología en medio de cultivo	Días			
		14	18	21	28
e2xe21					
e14xe18					
CP-436x CP-437					
e7xe11					
CP-436 x e7					



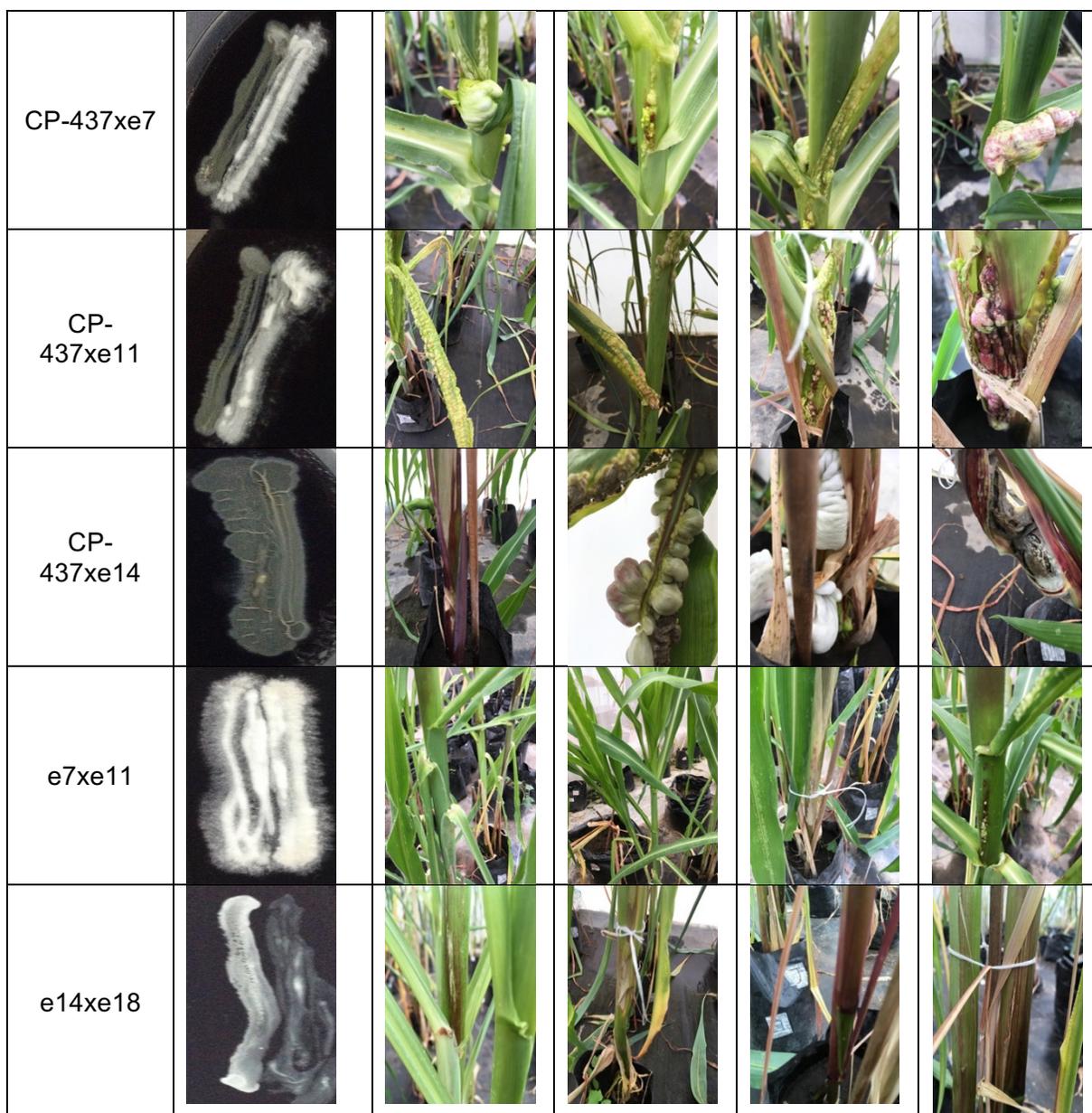
**Figura 33.** Seguimiento de la infección de diferentes heterocariones de *Ustilago maydis* en plántulas de maíz cultivadas en invernadero.

Dado que se establecieron dos siembras a lo largo del primero año, como parte de la caracterización del maíz, también se realizó para la prueba *in-vivo* de los híbridos formados entre cepas nativas y de referencia que resultaron positivas en el primero

experimento (Fig. 34). Las cepas e7 y e11 fueron cepas infectivas por si solas, sin la necesidad de cruzarse con cualquier otra cepa, y llegaron a la formación de tumores, y con la cepa e7 hasta la formación de agallas, que evidenció su capacidad infectiva. El híbrido formado por las cepas CP-436xCP-437 son cepas infectivas una vez que se cruzan entre sí, en las plántulas se formaron agallas en la parte centro del tallo y aérea de las plántulas de maíz. La cruce de las cepas e7 y e11 con la cepa de referencia CP-436 resulto infectiva hasta la formación de tumores, sobre todo en la parte media del tallo de las plántulas de maíz; mientras que la cepa de referencia CP-437 con cada una de las cepas nativas e7 y e11 también resultaron infectivas hasta la formación de agallas, en la parte área de las plántulas con la cepa e7, y en la parte media con la cepa e11.

Los híbridos formados con la cepa e14 y cada una de las cepas de referencia resultaron positivas, aunque para el híbrido CP-436xe14 las plantas solo presentaron necrosis en la parte área, y en el híbrido CP-437xe14 hubo formación de agallas en la parte del tallo cercana al suelo, y en las partes aéreas (incluyendo las hojas de las plántulas). El híbrido formado por las cepas e7xe11 fue infectivo, evidenciando la enfermedad con la formación de tumores en la parte media del tallo. Finalmente, se realizó nuevamente la inoculación del control positivo nativo, las cepas e14xe18, mostró solo acumulación de antocianinas y clorosis en la parte aérea de las plantas.

Esporidias	Cultivo PDA+AC	en	Días			
			7	14	21	28
e7						
e11						
CP-436-CP-437						
CP-436xe7						
CP-436xe11						
CP-436xe14						



**Figura 34.** Seguimiento de la confirmación de heterocariones infectivos de *Ustilago maydis* en plántulas de maíz cultivadas en invernadero.

### 8.2.7.2 Análisis estadístico de la infección

Para corroborar de manera estadística, si existió algún efecto de la concentración del inóculo con respecto al tiempo de aparición de agallas de este experimento, observamos la significancia estadística de cuadrados medios del análisis de varianza de la variable tiempo, en el cuadro 21. Con un valor de F calculada de 0.55 no existió efecto significativo por la fuente de variación que aplicamos en el modelo,

estadísticamente el tiempo de aparición de agallas del inóculo a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporidias  $\cdot \text{mL}^{-1}$  con respecto del inóculo a una concentración de  $5 \times 10^6$  esporidias  $\cdot \text{mL}^{-1}$  fueron parecidos.

**Cuadro 21.** Significancia estadística de cuadros medios del análisis de varianza de la variable tiempo medida tras la inoculación de plántulas de maíz.

Variable	Fuente de Variación	GL	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tiempo	Concentración	1	24.5000000 <sub>ns</sub>	0.55	0.4675

\*\*= Diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.01$ ). \*= Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). ns= Diferencias no significativas.

En el cuadro 22 se observa el análisis de medias por Tukey con  $\alpha$  de 0.05, donde se evidencian las dos concentraciones como un solo grupo, siendo que la diferencia en días entre las dos contracciones fue de 2 días.

**Cuadro 22.** Comparación de medias por concentración del inóculo de *Ustilago maydis* para la variable tiempo.

Variable	$1 \times 10^6$ esporidias/mL	$5 \times 10^6$ esporidias/mL
Tiempo	12.444 <sub>a</sub>	14.778 <sub>a</sub>

Medias con la misma letra en fila, entre tiempo y concentración, no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha \leq 0.05$ ; GL=16).

### 8.2.7.3 Selección de las cepas infectivas de *U. maydis*

Para confirmar los resultados obtenidos en el primer experimento sobre las esporidias nativas e7, e11, e14 y e18 se realizó otra infección, pero en esta ocasión incrementando 5 veces la concentración del inóculo de  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  esporidias  $\cdot \text{mL}^{-1}$  y además con una variedad de maíz nativa del Valle de Jala en Nayarit, Colima.

Para la cepa e7 la aparición de la enfermedad fue a los 7 días después de la inoculación en ambas variedades de maíz (Cuadro 23). Mientras que para cepa e11 en la variedad Hue-CP-14 la aparición de la enfermedad fue a los 7 días y para la variedad de maíz Jala la aparición fue hasta los 21 días, después de la inoculación. Para el híbrido formado por las cepas CP-437xe7 la aparición de la enfermedad fue a los 7 días en ambas variedades de maíz. Mientras que, para el híbrido formado por las cepas CP-437xe11 en la variedad de maíz Hue-CP-14 la enfermedad apareció hasta los 28 días después de la inoculación, y en la variedad de maíz Jala a los 14 días. En

el caso del híbrido formado por las cepas CP-437xe14 fue a los 7 días en la variedad de maíz Hue-CP-14, y a 21 días después de la inoculación en la variedad de maíz Jala. Finalmente, el híbrido formado por las cepas e7xe11 indujo la enfermedad a los 28 días después de la inoculación, pero en la variedad de maíz Hue-CP-14.

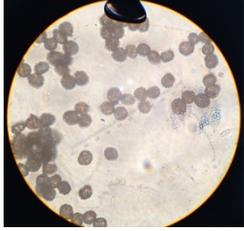
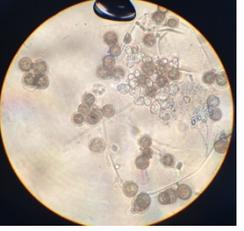
**Cuadro 23.** Relación de aparición de infección para las cruzas de las cepas de *Ustilago maydis* que infectaron las variedades de maíz.

Registro	Variedad de maíz	Tiempo de infección (Días)			
		7	14	21	28
e7	Hue-CP-14	√	√	√	√
	Jala	√	√	√	√
e11	Hue-CP-14	√	√	√	√
	Jala	-	-	√	√
CP-436xCP-437	Hue-CP-14	-	-	√	√
	Jala	-	-	-	-
CP-436xe7	Hue-CP-14	-	-	√	√
	Jala	-	-	-	-
CP-436xe11	Hue-CP-14	-	-	√	√
	Jala	-	-	-	-
CP-436xe14	Hue-CP-14	-	-	-	-
	Jala	-	-	-	-
CP-437xe7	Hue-CP-14	√	√	√	√
	Jala	√	√	√	√
CP-437xe11	Hue-CP-14	-	-	-	√
	Jala	-	√	√	√
CP-437xe14	Hue-CP-14	√	√	√	√
	Jala	-	-	√	√
e7xe11	Hue-CP-14	-	-	-	√
	Jala	-	-	-	-
e14xe18	Hue-CP-14	-	-	-	-
	Jala	-	-	-	-

Los híbridos seleccionados fueron aquellos que lograron infectar las plántulas de maíz hasta la formación de agallas con teliosporas. Durante el primer experimento los híbridos formados por las cepas CP-436xe7, CP-436xe11 y CP-437xe11, mostraron evidencia de infección, dado que en el ciclo temprano de la enfermedad las plántulas

de maíz presentaron clorosis y acumulación de antocianinas, eventualmente la enfermedad se desarrolló hasta la formación de tumores en los tallos y parte aéreas de las plántulas, sin embargo, en un lapso de un mes no lograron obtener agallas y pese a que se diseccionaron los tumores no se encontraron teliosporas. Por el contrario, los híbridos formados por las cepas CP-437xe14, CP-436xCP-437 y e7xe11 si presentaron el desarrollo de la enfermedad en su totalidad hasta la formación de agallas con teliosporas (Fig. 35). Las plantas inoculadas con estos híbridos también desarrollaron clorosis, acumulación de antocianinas y formación de tumores en las primeras fases del ciclo infectivo. Las esporidias e7 y e11 por si solas se comportan de manera infectiva en las plántulas de maíz, dado que se evidencia todo el ciclo infectivo de *U. maydis* hasta la formación de agallas con teliosporas.

Repeticiones	Infección	Teliosporas
Cruzas Inter-específicas		
6	 CP-436xe7	-
6	 CP-436xe11	-
6	 CP-437xe7	

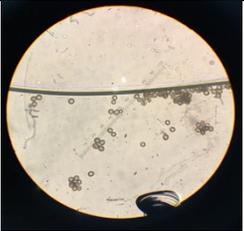
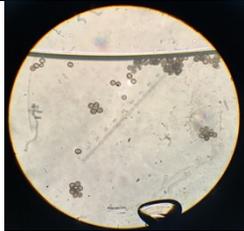
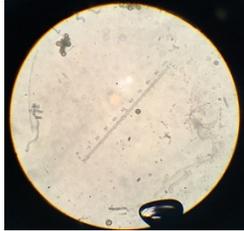
6	 <p>CP-437xe11</p>	-
9	 <p>CP-437xe14</p>	
Cruza Intra-específica		
9	 <p>e7xe11</p>	
Cruza de referencia		
6	 <p>CP-436xCP-437</p>	
Heterocariones		
9	 <p>e7</p>	

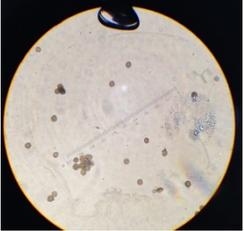
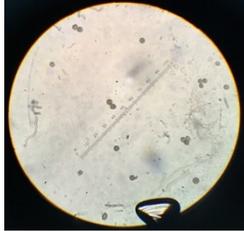
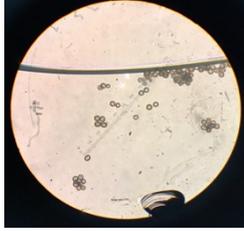


**Figura 35.** Heterocariones infectivos hasta formación de teliosporas de *Ustilago maydis* en la variedad de maíz HUE-CP-14.

Las esporidias e7 y e11 fueron infectivas en las dos variedades de maíz y desarrollaron la enfermedad hasta la formación de agallas con esporidias, igual que en el primero experimento. El híbrido formado por las cepas de referencia CP-436xCP437 solo desarrolló la enfermedad hasta la producción de esporidias en la variedad de maíz Hue-CP-14 pero no en la variedad nativa. Mientras que, las cepas CP-436xe7, CP-436xe11 y CP-436x14 evidencian la enfermedad en ambas variedades de maíz, pero en ninguna llega a consolidarse con la formación de teliosporas (Fig. 36).

Los híbridos formados por las cepas CP-437xe7 y CP-437xe14 si desarrollaron la enfermedad en ambas variedades de maíz hasta la formación de agallas con teliosporas; mientras que el híbrido CP-437xe11 a pesar que desarrolló la enfermedad en ambas variedades de maíz, solo se llegó a la producción de teliosporas en la variedad de maíz Jala. El híbrido e7xe11 infectó hasta la producción de teliosporas solo en la variedad de maíz Hue-CP-14. Finalmente, el híbrido formado por las cepas e14xe18 evidenciaron clorosis y acumulación de antocianinas en ambas variedades de maíz, pero no hubo formación de agallas con presencia de teliosporas.

	Variedad de maíz			
	Hue-CP-14		Jala	
Registro	Infección	Teliosporas		
e7				
e11				
CP-436xCP-437				-
CP-436xe7		-		-
CP-436xe11		-		-
CP-436xe14		-		-

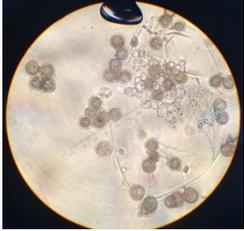
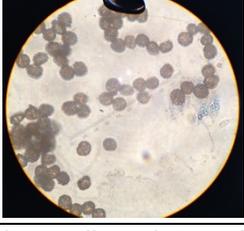
CP-437xe7				
CP-437xe11		-		
CP-437xe14				
e7xe11			-	-
e14xe18		-		-

**Figura 36.** Confirmación de heterocariones infectivos hasta formación de teliosporas de *Ustilago maydis* en dos variedades de maíz (Hue-CP-14 y Jala).

#### 8.2.7.4 Producción de teliosporas

Las cepas que logran infectar hasta la formación agallas, en el primero experimento, fueron colectadas para su disección (Fig. 37). La infección de las cepas e7 y e11 por si solas lograron infectar al maíz hasta la producción de teliosporas, mientras que los híbridos infectivos hasta la formación de teliosporas fueron el e7xe11, CP-436xCP-437

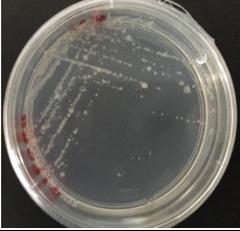
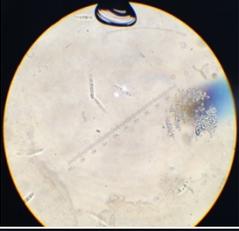
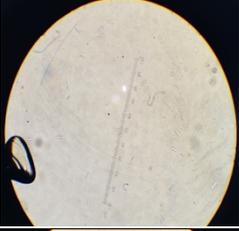
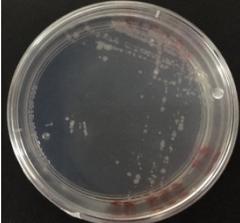
y CP-437xe14. Las teliosporas se observaron al microscopio y además se sembraron en medio PDA incubadas a 24 °C durante 48 horas.

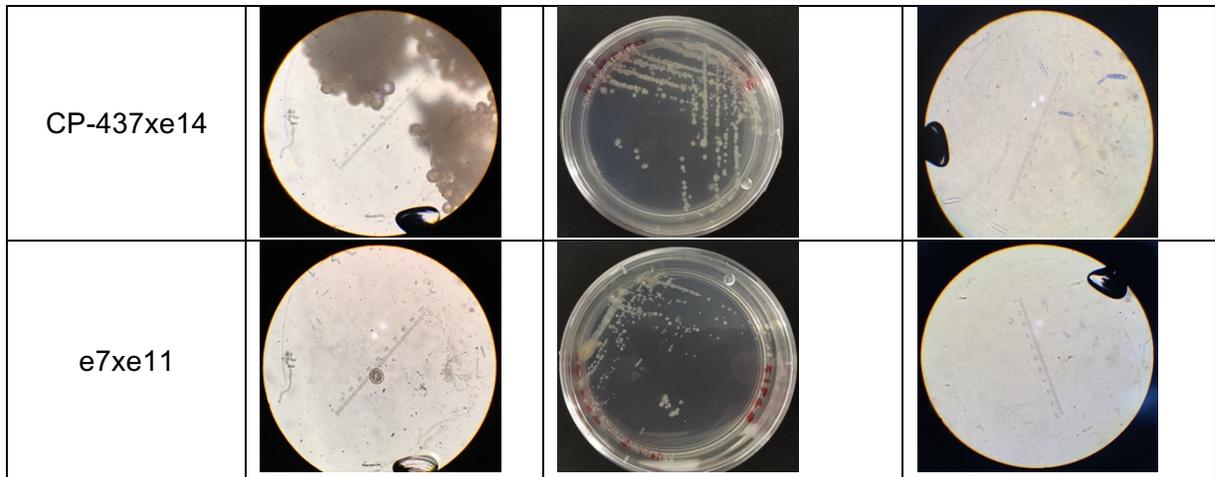
Registro	Teliospora	Aislamiento en medio PDA	Vista al microscopio
e7			
e11			
e7xe11			
CP-436xCP-437			
CP-437xe14			

**Figura 37.** Muestras de agallas vistas al microscopio de *Ustilago maydis* y aislamiento de las mismas.

En el segundo experimento se recolectaron las agallas de los híbridos infectivos y se sembraron en medio PDA, igual que en el primer experimento, las cepas infectivas fueron e7 y e11, y los híbridos e7xe11, CP-436xCP-437 y CP-437xe14. A diferencia

del primer experimento también fueron infectivos hasta la formación de agallas los híbridos: CP-436xe7, CP-437xe7 y CP-437xe11 (Fig. 38).

Registro	Teliospora	Aislamiento en MS-PDA	Vista al microscopio
e7			
e11			
CP-436xCP-437			
CP-436xe7			
CP-437xe7			
CP-437xe11			



**Figura 38.** Muestras de agallas de *Ustilago maydis* vistas por segunda vez al microscopio y aislamiento de las mismas.

## **IX. CONCLUSIONES**

1. Las condiciones del invernadero no tuvieron efecto significativo sobre el rendimiento de las tres variedades de maíz.
2. Las variedades de maíz cultivadas tuvieron el mismo rendimiento y diferente ciclo del cultivo.
3. Se seleccionó la variedad HUE-CP-14, ya que tuvo el ciclo más corto de cultivo.
4. Se estandarizó en aislamiento de esporidias mediante la técnica de microdiluciones. Se lograron aislar 20 monosporidias que fueron cruzadas entre sí para identificar híbridos infectivos mediante el ensayo de fenotipo Fuzz.
5. El ensayo de fenotipo Fuzz fue una prueba confiable para la selección de cepas con capacidad infectiva, pero necesita comprobarse de otra manera, con técnicas moleculares y pruebas de infección en plantas.
6. Se seleccionaron 6 monospóricos nativos, e2 y e14 de la clase I; e18 y e21 de la clase II; y e7 y e11 como heterocariones.
7. Las cepas e7 y e11 presentaron capacidad infectiva, consideradas como cepas heterocarióticas.
8. La estandarización del inóculo se realizó mediante el recuento celular y la determinación de densidad óptica.
9. El tiempo de aparición de agallas del inóculo a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporidias  $\cdot \text{mL}^{-1}$  con respecto del inóculo de concentración de  $5 \times 10^6$  esporidias  $\cdot \text{mL}^{-1}$  fueron estadísticamente iguales.
10. Los híbridos formados por las cepas CP-436xe7, CP-437xe7, CP-437xe11, CP-437xe14, e7xe11 y CP-436xCP-437, presentaron capacidad infectiva hasta la formación de agallas en plántulas de maíz

## **X. CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS**

Con los resultados obtenidos en la presente investigación se acepta la hipótesis, logrando obtener cepas de *U. maydis* con capacidad infectiva (e7, e11 y CP-437xe14) en plántulas de la variedad de maíz CP-HUE-14, bajo condiciones controladas.

## **XI. ESTRATEGIA PARA FOMENTAR EL HONGO *Ustilago maydis* (HUITLACOCHÉ) COMO UN RECURSO GENÉTICO APROVECHABLE EN EL VALLE DE PUEBLA, MÉXICO**

La biodiversidad es el conjunto de especies, así como los ecosistemas y los procesos que estas especies integran. La humanidad depende de la biodiversidad para su subsistencia, por lo que es estratégico realizar una conservación y manejo sostenible de la misma para poder responder a las demandas actuales y futuras de la población.

México, a nivel mundial es uno de los 5 países con mayor diversidad biológica, y centro de origen de recursos fitogenéticos como maíz, jitomate y algodón, entre otras. Sin embargo, el gobierno mexicano ha optado por darle mayor importancia al ingreso de tecnologías extranjeras y políticas “sin un correcto seguimiento”, o lo que es peor, proyectos sin seguimiento continuo. Con lo anterior podemos vislumbrar una pérdida de recursos genéticos, y fitogenéticos, ya que al entrar a este fenómeno de globalización deja de lado el aprovechamiento de la biodiversidad con la que cuenta, y únicamente explota los de mayor demanda por el mercado global.

Una estrategia para la conservación y aprovechamiento de la biodiversidad es el fomento del mercado local, del consumo local, y sobre todo de proyectos que contemplen un aprovechamiento integro de los recursos genéticos y fitogenéticos locales que puedan ser aprovechados para un potencial de mayor demanda.

Ruiz-Herrera (2008), menciona que del 1 y 5% de plantas de los cultivos de maíz es infectadas por *U. maydis*, representan en México una ganancia extra para el agricultor, ya que una mazorca infectada tiene un mayor valor en el mercado que si no lo tuviera

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Posicionar a *Ustilago maydis* como un recurso genético fúngico que contribuya al desarrollo agrícola de la región del Valle de Puebla.

### **Objetivo específico**

1. Divulgar el conocimiento en torno a la infección de maíz por *Ustilago maydis*.
2. Evidenciar las áreas de oportunidad de la producción de huitlacoche para los agricultores.
3. Proponer el cultivo intensivo controlado de *U. maydis* en el Valle de Puebla.

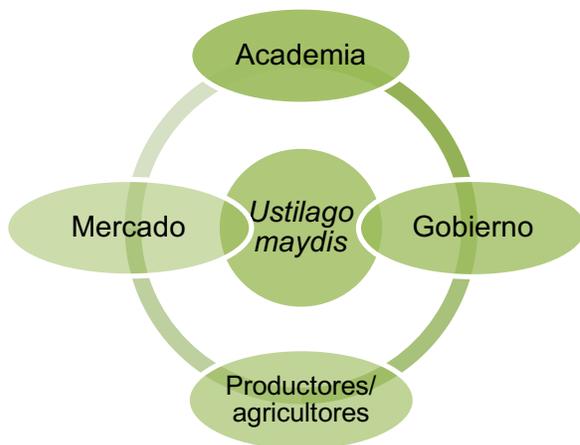
## **IDENTIFICACIÓN DE ACTORES**

Sector académico, centros de investigación e instituciones académicas se encargan de desarrollar alternativas mediante proyectos viables con el objetivo de mejorar la calidad de vida en los entornos social, político, económico, cultural y ecológico. Además, cuentan con la capacidad de transformar datos en información.

Sector gubernamental, a través de este sector se puede adquirir el financiamiento, y la captación de grupos interesados en el aprovechamiento de los recursos genéticos y fitogenéticos en pro del desarrollo de pequeños, medianos y grandes productores (SAGARPA y SEDESOL).

Sector económico primario, comprende a los pequeños, medianos y grandes agricultores que contribuyen con el suministro de la materia prima en el comienzo de la cadena de valor (productores del Valle de Puebla).

Mercado, es imprescindible contar con un mercado al cual abastecer, por lo tanto, debemos identificar o generar un nicho de mercado que guste de los beneficios del aprovechamiento de *U. maydis* (Fig. 39).



**Figura 39.** Sectores involucrados en la estrategia de *Ustilago maydis* como recurso genético.

En el desarrollo de la estrategia, para fomentar a *U. maydis* como recurso genético aprovechable en el Valle de Puebla, se contemplan 3 etapas descritas en la figura 40.



**Figura 40.** Etapas para el posicionamiento de *Ustilago maydis* como un recurso genético.

En el país, la producción comercial de hongos comestibles ofrece ventajas sociales, económicas y ecológicas. De acuerdo a Valdez y col. (2009), se estima que la producción comercial en fresco es de aproximadamente 47 mil 468 toneladas anuales. El grano de maíz por si solo ya es una fuente alimentaria base en la dieta de las personas, pero una vez que el hongo logra infectar al grano y transformarlo a huitlacoche los principales valores nutrimentales crecen de manera considerable, de tal forma que el aprovechamiento de *U. maydis* como recurso genético lograría ser una alternativa para el comercio de pequeños agricultores. Hernández (2016), hizo énfasis en la creación de una red interdisciplinaria, esto es importante porque permite el análisis y desarrollo de la evolución de la estrategia, pero es fundamental que el conocimiento se socialice para evitar estudios aislados y discontinuos de temas específicos que en su mayoría no están relacionados.

## XII. LITERATURA CITADA

- Banuett, F. and Herskowitz, I. 1989. Different *a* alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, vol. 86: 5878-5882.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. 1996. Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Development*, vol. 122: 2965-2976.
- Banuett, F. 2002. Pathogenic Development in *Ustilago maydis*. A Progression of Morphological Transitions That Results in Tumor Formation and Teliospore Production. University of California, San Francisco, California. MYCOLOGY SERIES, 15. In *Molecular Biology of Fungal Development* (by Heinz D. Osiewacz CRC Press) 349-398 p. May 7, 2002, 608 p.
- Beas, F. R., Loarca, P. G., Guzmán, S. H. M., Rodríguez, M. G., Vasco, M. N. L., y Guevara, L. F. 2011. Nutraceutical potential of bioactive components present in huitlacoche from the central zone of Mexico. *Revista Mexicana de Ciencia Farmacéuticas*, vol. 42: 36-44
- Brefeld, O. 1888. Recent investigations of smut fungi and smut diseases (Neue Untersuchungen über die Brandpilze und die Brandkrankheiten). II. *Nachr. aus d. Klub d. Landw. Berlin* 1888: 1557-1584, 1588-1594, 1597-1601. (E. F. Smith. English translation. *Journal of Mycology* 6, 1-8, 59-71, 153-164. 1890-1891).
- Bölker, M., Urban, M., and Kahmann, R. 1992. The *a* Mating Type Locus of *U. maydis* Specifies Cell Signaling Components. Institut für Genbiologische Forschung Berlin GmbH Ihnestrasse 63, D-1 000 Berlin 33, Federal Republic of Germany. *Cell*, vol. 68(3): 441-450.
- Bölker, M. 2001. *Ustilago maydis* a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. Universität Marburg, Fachbereich Biologie, Karl-von-Frisch-Strasse 8, D-35032 Marburg, Germany. *Microbiology*, vol. 147(6): 1395-1401.
- Bovey, R. 1989. *La Defensa de las Plantas Cultivadas. Tratado Práctico de Fitopatología y Zoología Agrícola*. Barcelona, España: Omega. (No. Libro 632 B6y.).
- Castañeda de León, V., Martínez-Carrera, D., Morales, P., Sobal, M., Gil, A. y Leal, L. H. 2016. El huitlacoche, producto de la interacción *Ustilago maydis* - maíz, una aportación de México al mundo en el sistema agroalimentario microbiano. Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla, Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales y Recursos Fitogenéticos. En *Ciencia, Tecnología e Innovación en el Sistema Agroalimentario de México* (Editado por D. Martínez-Carrera y J. Ramírez Juárez). Pp 641-694. Colegio de Postgraduados-AMC-CONACYT-UPAEP-IMINAP, San Luis Huexotla, Texcoco, México.

- Chang S, and Miles, P 2004. Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect and Environmental Impact. 2<sup>a</sup> Ed. Boca Raton: CRC Press, 451.
- Cota, N. C. B. 2004. Evaluación de cepas locales de *Ustilago maydis* en maíz para la producción de huitlacoche en el valle del Yaqui. otoño 2003. Tesis de Licenciatura, Instituto Tecnológico de Sonora CD. Obregón, Sonora, 95.
- Dean, R., Van Kan, Jan A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, Kim E., Di Pietro, A., Spanu, Pietro D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J. and Foster, G. D. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology © BSPP and Blackwell Publishing LTD. Molecular plant pathology, vol. 13(4): 414-430.
- Deras, F. H. 2016. Guía técnica: El cultivo del maíz. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 40.
- Escalante, P. C. 2013. Estudios de la reacción del maíz al huitlacoche con fines de planificación de la cosecha. Departamento de Fitotecnia Instituto de Horticultura. Tesis de Maestría, Chapingo, México, 80.
- Estrada, L. A. A., Chagolla, L. A., Ramos, A. H. E., Guerrero, A. A. and Ruiz, H. J., 2010. Identification of proteins secreted by the fungus *Ustilago maydis* (DeCandole) Corda (Basidiomicete) grown under in vitro conditions. Universidad De La Salle Bajío y CINVESTAV-IPN Irapuato. Nova scientia, vol. 2(4): 104-130.
- FIRA, 2016. Panorama Agroalimentario. Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial, 38.
- Galicia, G. P. R., Silva, R. H. V., Mendoza, O. L. E., Zavaleta, M. H. A., Córdova, T. L. and Espinosa, C. A. 2016. Selection of aggressive pathogenic and solopathogenic strains of *Ustilago maydis* to improve Huitlacoche production. Acta Botanica Brasilica, vol. 30(4): 683-692.
- García-López M.D. and Uruburú-Fernández, F. 1991. La conservación de cepas microbianas. Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Universitat de València. 46100 Burjassot (Valencia), Actualidad SEM, vol. 30: 12-16.
- García-Salazar. J. A. y Ramírez J. R. 2012. Demanda de Semilla Mejorada de Maíz en México: Identificación de Usos y Zonas de Producción con Mayor Potencial de Crecimiento. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). Texcoco, Estado de México, 27.
- Gaspar E. Á., Ortiz, T. E., López, P. A. y López, R. G. 2010. Characterization and yield performance of native maize populations from molcaxac, Revista Fitotecnia Mexicana, vol. 33(4): 287-296.
- González, L. G. 1990. Lecciones del Plan Puebla para el cambio tecnológico en el campo mexicano. Colegio de Postgraduados-Montecillo, Estado de México. Comercio exterior, vol. 40(10): 962-967.
- Griffiths, M. 1928. Smut susceptibility of naturally resistant corn when artificially inoculated. Journal Agricultural Research vol. 36: 77-89.

- Hernández-Gasca, L. 2016. Efecto del ácido acetilsalicílico sobre la producción controlada de huitlacoche (*Ustilago maydis*) en la región central de México. Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados, Campus Puebla, 110.
- Holbert, W. J., Burlison, L., Benjamin Koehler, Woodworth, C. M., y Duncan, G. 1924. Corn root, stalk, and ear rot diseases, and their control thru seed selection and breeding. Agricultural Experiment Station, Bulletin No. 255: 239-472.
- Jiménez, O. M. K. 2013. Proyecto de producción de inóculo de huitlacoche (*Ustilago maydis*) con fines comerciales. Trabajo de Experiencia Recepcional presentado a la Facultad de ciencias agrícolas, Universidad Veracruzana.
- Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Böker, M. y Kahmann, R. 1995. Multiallelic Recognition: Nonself-Dependent Dimerization of the bE and bW Homeodomain Proteins in *Ustilago maydis*. Institut für Genetik und Mikrobiologie der Universität München, Maria-Ward-Strasse 1a, 80638 München, Federal Republic of Germany. Cell, vol. 81(1): 73-83.
- Kealey, K. S. and Kosikowski, F. V. 1981. Corn smut as a food source, perspectives on biology, composition and nutrition. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition vol. 15: 321-351.
- León, R. C. G., Sánchez, A. J. A., and Ruiz, H. J., 2014. *Ustilago maydis*, a Delicacy of the Aztec Cuisine and a Model for Research. Departamento de Ingeniería Genética, Unidad Irapuato, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Irapuato, Gto, México. Natural Resources, vol. 5(06): 256.
- Liu, R. H. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. The Journal of Nutrition, vol. 134: 3479S-3485S.
- Loaiza, A. S. G. 2010. Estudio nutricional y alternativa de uso del Huitlacoche (*Ustilago maydis*) desecado en deshidratador solar. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia.
- Martínez-Carrera, D., Pérez, A. B., Mayett, Y., Jiménez, F. R., Sobal, M., Morales, P., Bonilla, M., Ramírez, C. P., Tello, I., Trigós, A., Mendoza, G., Soriano, S. J. y González, N. 2010. Desarrollo de bebidas y alimentos funcionales a partir de los recursos genéticos de hongos comestibles en México. Capítulo 15. Pp. 225. En Hacia un Desarrollo Sostenible de Producción- Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica. Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Eds. Martínez- Carrera, D., N. Curvetto, M, Sobal, P. Morales y V. M. Mora. RLHCM, COLPOS, UNS, CONACYT, AMC, UEM, UPAEP, IMINAP, Puebla, 648.
- Mata, G., Salmones, D., y Hernández, G. 2010. Basic and applied research on mushroom cultivation at the Institute of Ecology, Xalapa, México. In D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales, y V. M. Mora (Eds.), Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y perspectivas en el siglo

- XXI (pp. 243–270). México: Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNSCONACYT-AMC-UAEM- UPAEP-IMINAP, 648.
- Mesalles, F. J. 2016. El huitlacoche. Boletín Informativo Consulado de México. Comunidad Mexicana en Centroamérica. Edición 16, Junio, 11 .
- Mejía, D. PhD, AGST. 2009. MAIZE Post-harvest Operations. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), AGST, 89.
- Montaño, B. M. A. 2015. Identificación de hongos fitopatógenos asociados al complejo manchas de asfalto (CMA) en el cultivo de Maíz *Zea mays* L. en el estado de Chiapas. Departamento de parasitología, Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Nabarro Saltillo, Coahuila, México, 30.
- Müller, L., Gnoyke, S., Popken, M. A. and Böhn, V. 2010. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. LWT-Food Science and Technology vol. 43: 992- 999.
- Ortiz, P. S. 2006. Determinación de la composición química proximal y fibra dietaria de 43 variedades criollas de maíz de 7 municipios del sureste del estado de Hidalgo. Nutrición, Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del estado de Hidalgo, 60.
- Paredes-Lopez. O. y Valverde, M. E. 1999. Los Alimentos Mágicos de las Culturas Indígenas de México-El Caso del Huitlacoche. Culiacán, Sinaloa, 50.
- Paredes-Lopez. O., Valverde, M. E., Guevara, L. F. y Vanegas, E. P. 2000. Tecnologías para la producción masiva de huitlacoche. Cuaderno de trabajo, Área de alimentos, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Sistema de Investigación Miguel Hidalgo, Querétaro, 33.
- Pataky, J. K. and Snetselaar, K. M. 2006. Common smut of corn. The Plant Health Instructor. DOI, 10.1094/ PHI-I-2006-0927-01.
- Pérez-Moreno. J., A. Lorenza, F. V. Carrasco, H. y A. Yescas, P. 2010. Los hongos comestibles silvestres del Parque Nacional Izta-Popo, Zoquiapan y Anexos. Colegio de Postgraduados, SEMARNAT, CONACyT, Montecillo, Texcoco, Estado de México. Revista mexicana de micología, 167.
- Reyes, G. M. G., M. González, P. y V. Zamora-Equihua. 2009. Guía de hongos de los alrededores de Morelia. Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Museo de Historia Natural. Morelia, Michoacán.
- Ruan-Soto, F. y Ordaz-Velázquez, M. 2015. Aproximaciones a la etnomicología Maya. Revista Pueblos y Fronteras Digital, vol. 10(20): 44-69
- Ruiz, I. 1999. Producción de Huitlacoche por inoculación artificial de cepas locales de *Ustilago maydis* (D.C.) Corda, en híbridos regionales de maíz (*Zea mays* L.) en el Valle del Yaqui. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Sonora. Cd. Obregón, Sonora, México, 47-78.
- Ruiz-Herrera. J. 2008. *Ustilago maydis*: ascenso de un hongo mexicano de la gastronomía local al mundo científico. Centro de Investigación y de Estudios

- Avanzados del IPN, Irapuato, Gto. México Revista Electrónica Nova Scientia, 20.
- SAGARPA. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-081- FITO-2001. Manejo y eliminación de focos de infestación de plagas, mediante el establecimiento o reordenamiento de fechas de siembra, cosecha y destrucción de residuos. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Diario Oficial de la Federación, 18 de septiembre del 2002. México, D. F. 8.
- SAGARPA-INEGI. 2015. Encuesta Nacional Agropecuaria. México, 20.
- Snetselaar K. M., Bölker M. and Kahmann R. 1996. *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. Fungal Genetics and Biology, vol 20: 299-312.
- Steinbert, D., S. Parthasarathy, T. E. Carew, J. C. Khoo, and J. L. Witztum. 1989. Beyond cholesterol. Modification of low-density lipoproteins that increase its atherogenicity. New England Journal of Medicine, 320: 915-924.
- Thakur, R. P., Leonard, K. J. and Pataky, J. K. 1989. Smut gall development in adult corn plants inoculated with *Ustilago maydis*. Plant Disease vol. 73: 921-925.
- Tillet, M. 1766. Observation sur la maladie du Mais ou ble de Turquie. Mémoires Académie des Sciences Paris 1760: 254-261.
- Tracy, W.F.; Vargas, C.; Zepeda, L.; Pataky, J.K. and Chandler, M. A. 2007. Production and Marketing of huitlacoche. En: Sigues in new crops and new uses. (pp: 233-236), Janick J. y Whipkey (Eds.) ASHS Press. Alexandria, VA
- Valadez, A. R. 2012. "El huitlacoche, un recurso alimentario mexicano no tan milenario". Antropológicas Boletín 5: 1-9.
- Valdez, M. M., Valverde, M. E., y Paredes L. O. 2009. Procedimiento tecnológico para la producción masiva de huitlacoche. SinncO, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. SinncO, 10-37.
- Valdez, M., M., Barry, K., Fahey, G. C., Domínguez, J., González de Mejía, E., Valverde, M. E., and Paredes, L. O. 2010. Effect of maize genotype, developmental stage and cooking process on the nutraceutical potential of huitlacoche (*Ustilago maydis*). Food Chemistry vol 119: 689-997.
- Valverde, M. E., Paredes López, O., Pataky, J. K. and Guevara-Lara, F. 1995. Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a food source biology, composition and production. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition vol. 35: 191-229.
- Vanegas, P. E., M. E. Valverde, O. Paredes López and J. K. Pataky. 1995. Production of the edible fungus huitlacoche (*Ustilago maydis*): effect of maize genotype on chemical composition. Journal of Fermentation and Bioengineering vol. 80: 104-106.
- Villanueva, V. C.; Sánchez, R. E.; y Villanueva, S. E. 2007. El huitlacoche y su cultivo. México: Mundi prensa, 95.

### XIII. ANEXOS

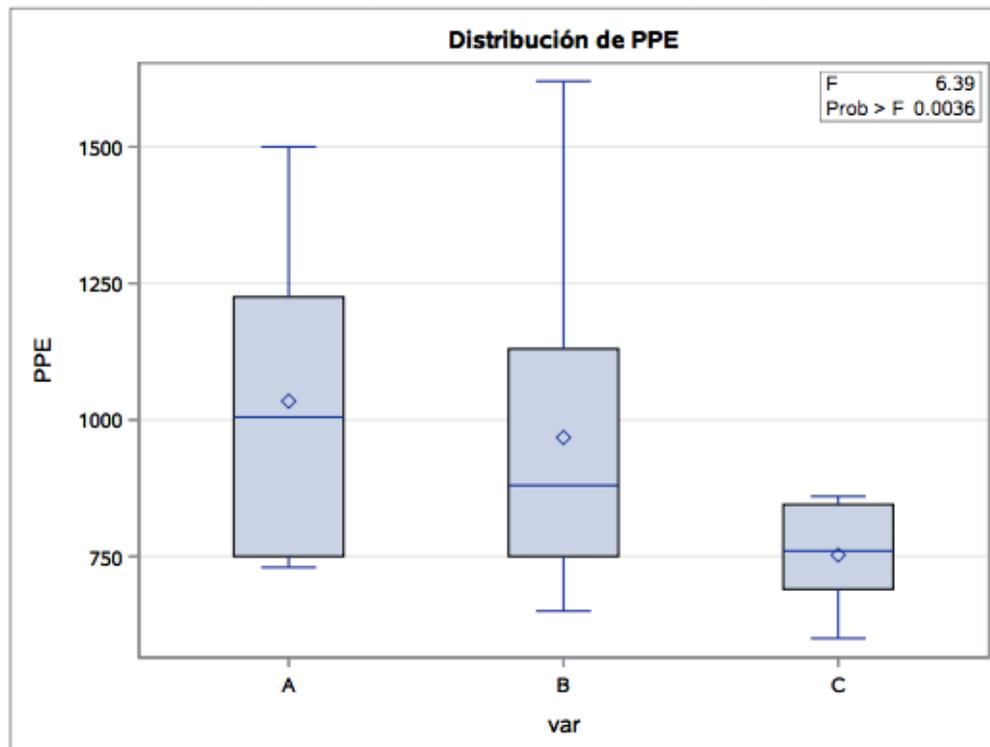
#### Segunda siembra

Variable dependiente: PPE

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	694533.167	347266.583	6.39	0.0036
Error	45	2445768.750	54350.417		
Total corregido	47	3140301.917			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	PPE Media
0.221168	25.38985	233.1318	918.2083

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
var	2	694533.1667	347266.5833	6.39	0.0036

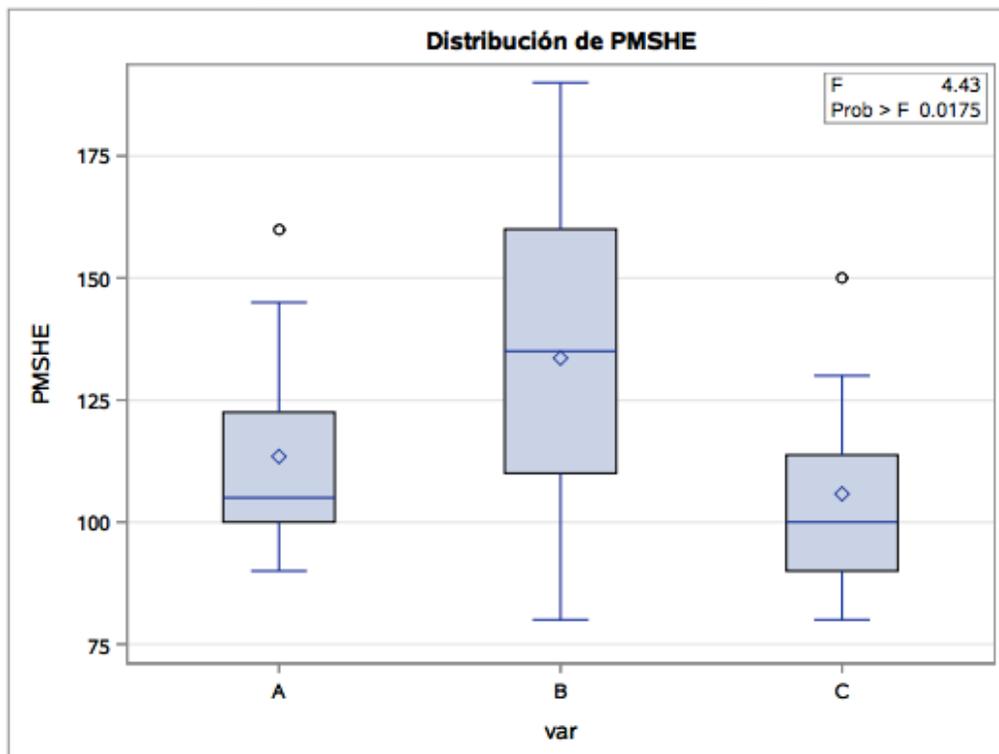


**Variable dependiente: PMSHE**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	6604.94792	3302.47396	4.43	0.0175
Error	45	33532.03125	745.15625		
Total corregido	47	40136.97917			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	PMSHE Media
0.164560	23.21138	27.29755	117.6042

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
var	2	6604.947917	3302.473958	4.43	0.0175

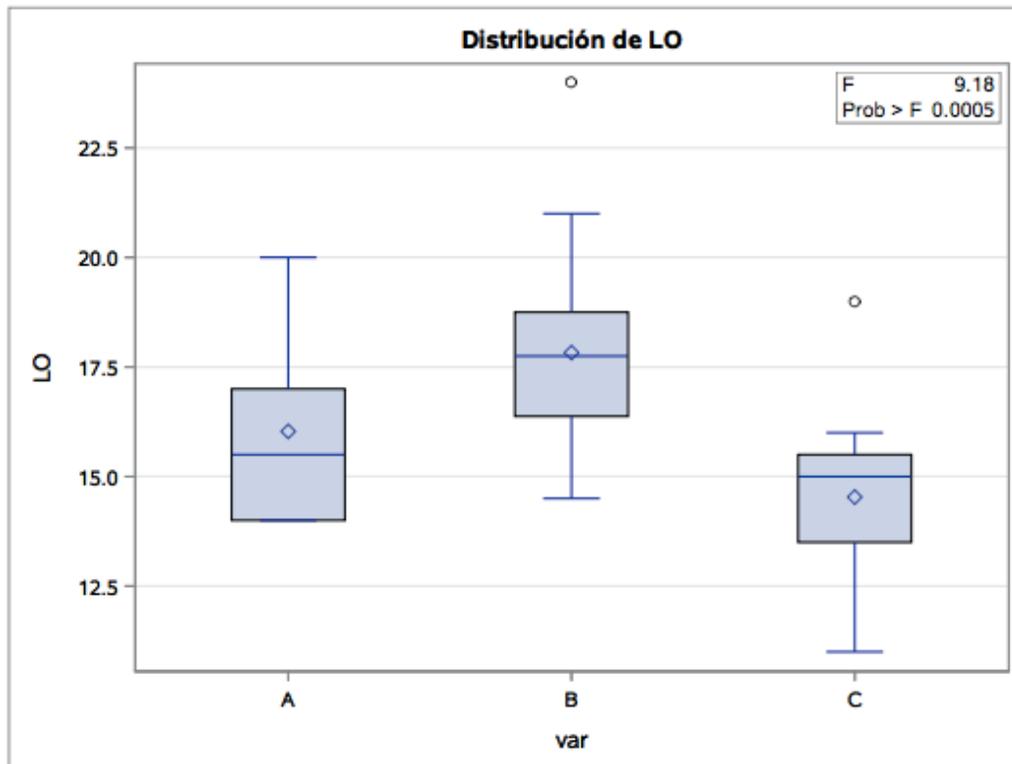


**Variable dependiente: LO**

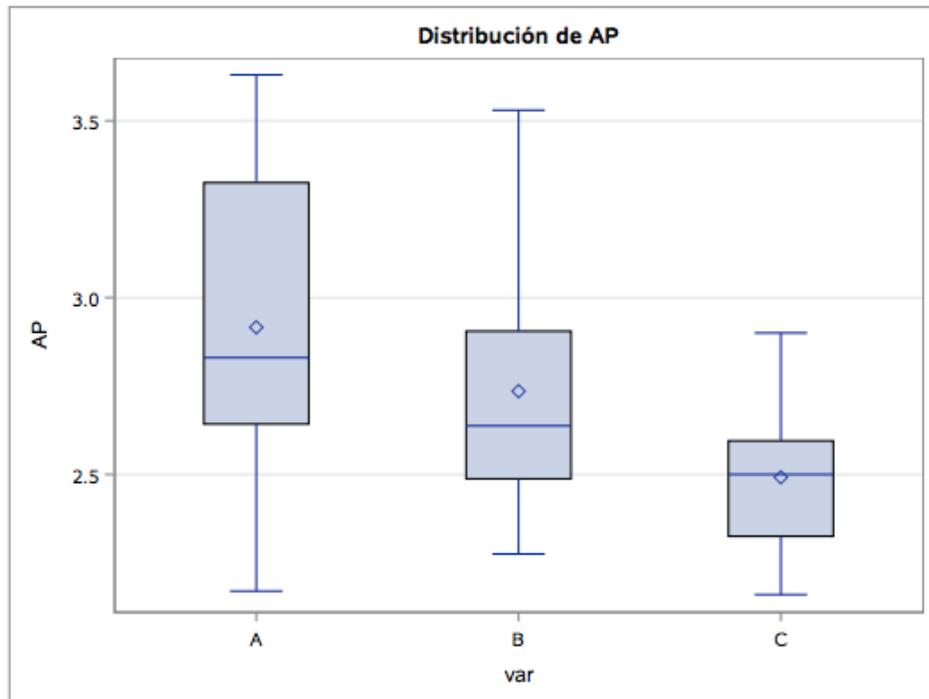
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	87.1901042	43.5950521	9.18	0.0005
Error	45	213.8085938	4.7513021		
Total corregido	47	300.9986979			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	LO Media
0.289669	13.51345	2.179748	16.13021

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
var	2	87.19010417	43.59505208	9.18	0.0005



**Procedimiento ANOVA**



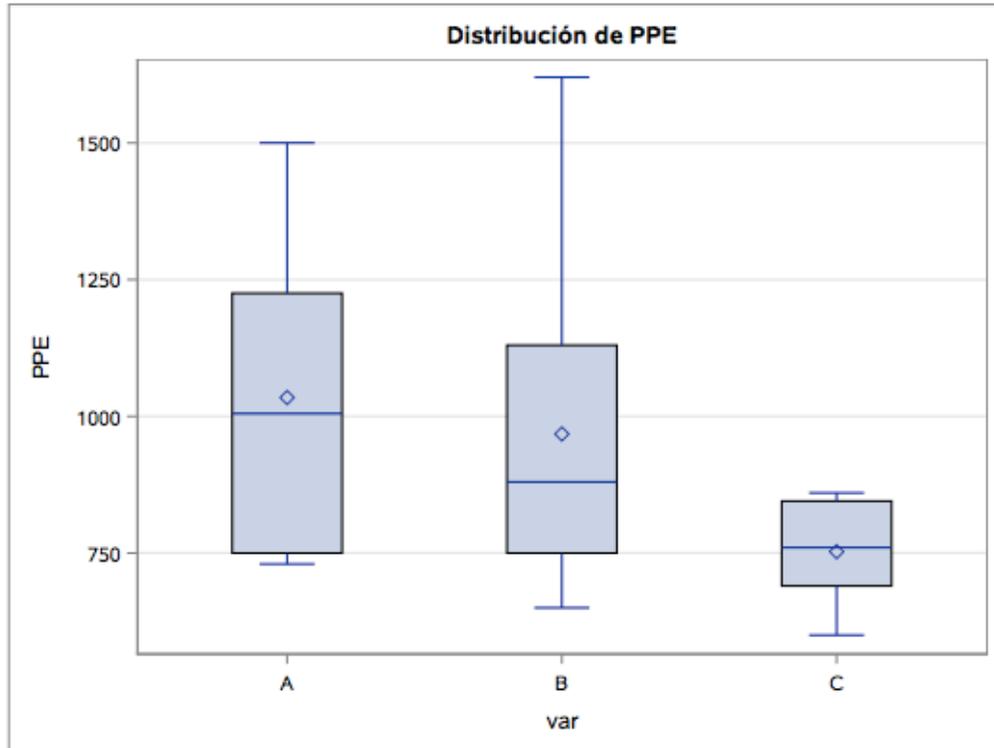
**Procedimiento ANOVA**

**Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para AP**

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	45
Error de cuadrado medio	0.123783
Valor crítico del rango estudentizado	3.42747
Diferencia significativa mínima	0.3015

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.				
Tukey Agrupamiento	Media	N	var	
	A	2.9159	16	A
	A			
B	A	2.7353	16	B
B				
B		2.4919	16	C

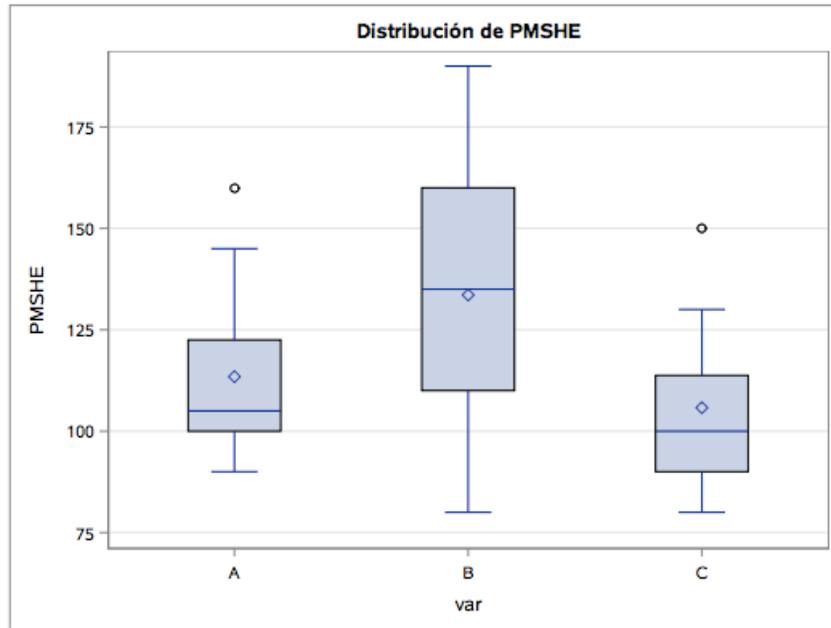


**Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para PPE**

**Note:** This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	45
Error de cuadrado medio	54350.42
Valor crítico del rango estudentizado	3.42747
Diferencia significativa mínima	199.76

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	var
A	1034.38	16	A
A			
A	967.75	16	B
B	752.50	16	C

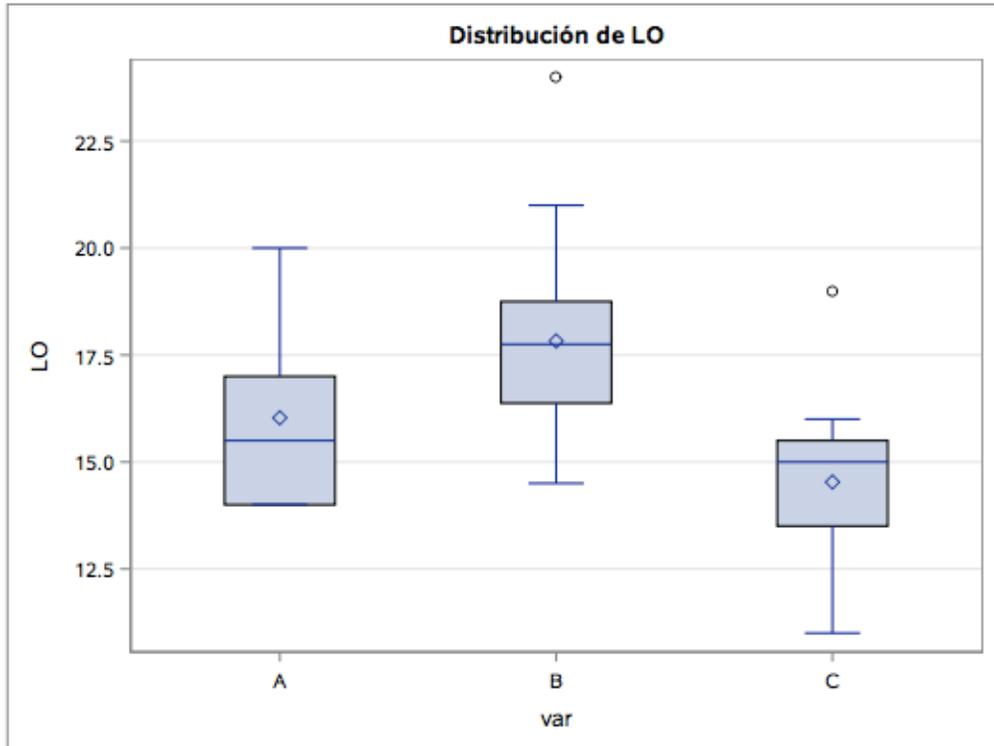


**Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para PMSHE**

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	45
Error de cuadrado medio	745.1563
Valor crítico del rango estudentizado	3.42747
Diferencia significativa mínima	23.39

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	var
A	133.594	16	B
A			
B	113.438	16	A
B			
B	105.781	16	C



**Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para LO**

**Note:** This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	45
Error de cuadrado medio	4.751302
Valor crítico del rango estudentizado	3.42747
Diferencia significativa mínima	1.8678

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.				
Tukey Agrupamiento	Media	N	var	
	A	17.8281	16	B
	A			
B	A	16.0313	16	A
B				
B		14.5313	16	C

## Peso del elote sin bráctea y sin estigma

### Procedimiento GLM

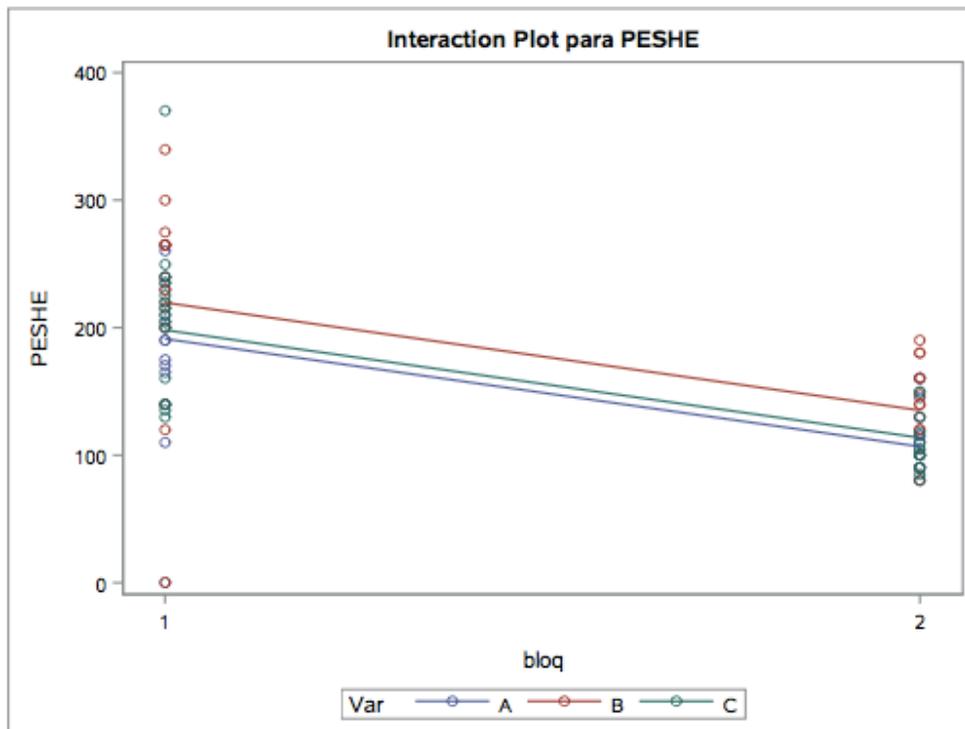
Variable dependiente: PESHE

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	173620.4167	57873.4722	20.21	<.0001
Error	86	246312.6389	2864.1005		
Total corregido	89	419933.0556			

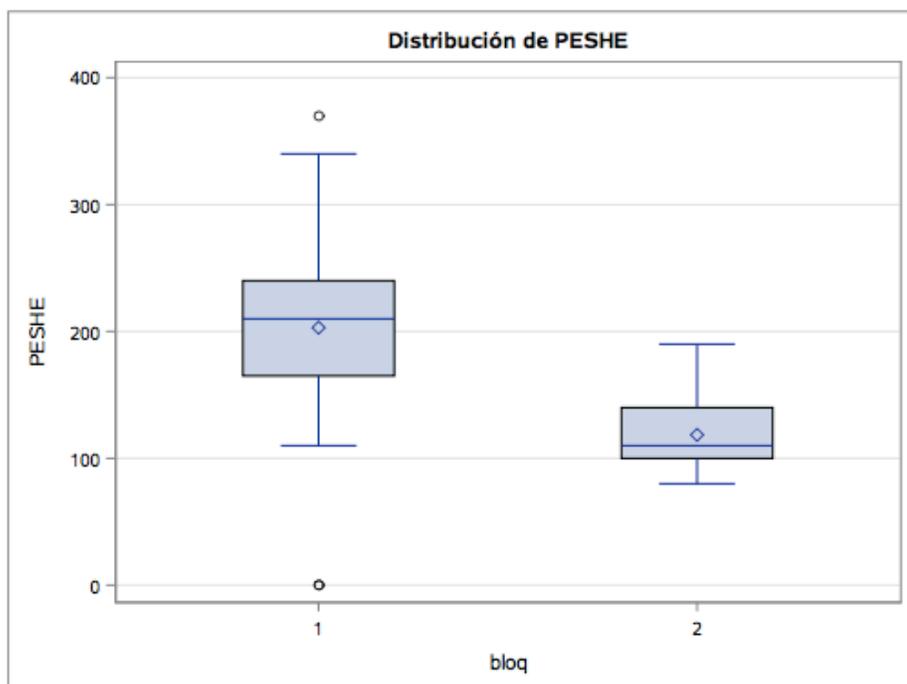
R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	PESHE Media
0.413448	33.28650	53.51729	160.7778

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
bloq	1	160444.4444	160444.4444	56.02	<.0001
Var	2	13175.9722	6587.9861	2.30	0.1064

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
bloq	1	160444.4444	160444.4444	56.02	<.0001
Var	2	13175.9722	6587.9861	2.30	0.1064



**Procedimiento GLM**



**Procedimiento GLM**

**Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para PESHE**

**Note:** This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.01
Grados de error de libertad	86
Error de cuadrado medio	2864.1
Valor crítico del rango estudentizado	3.72510
Diferencia significativa mínima	29.718

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	bloq
A	203.00	45	1
B	118.56	45	2