



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS PUEBLA**

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

**EFFECTO DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO SOBRE LA  
PRODUCCIÓN CONTROLADA DE HUITLACOCHÉ (*Ustilago  
maydis*) EN LA REGION CENTRAL DE MÉXICO**

**LILIA HERNÁNDEZ GASCA**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**PUEBLA, PUEBLA**

**2016**



# 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

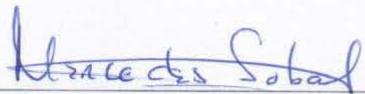
En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, la que suscribe **Lilia Hernández Gasca**, alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, 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 "**Efecto del ácido acetilsalicílico sobre la producción controlada de huitlacoche (*Ustilago maydis*) en 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 la 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 enero de 2016



---

**Lilia Hernández Gasca**



---

**Vo. Bo. Profesora Consejera  
Dra. Mercedes Sobal Cruz**

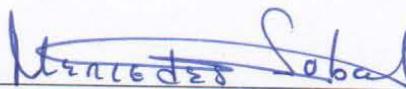
La presente tesis, titulada: **Efecto del ácido acetilsalicílico sobre la producción controlada de huitlacoche (*Ustilago maydis*) en la región central de México**, realizada por la alumna: **Lilia Hernández Gasca**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

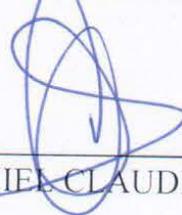
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:



DR. MERCEDES SOBAL CRUZ

ASESOR:



DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA

ASESOR:



DR. PORFIRIO MORALES ALMORA

ASESOR:



DR. FILEMÓN PARRA INZUNZA

ASESOR EXTERNO:



DR. HERMILO LEAL LARA

Puebla, Puebla, 14 de enero de 2016

## EFFECTO DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO SOBRE LA PRODUCCIÓN CONTROLADA DE HUITLACOQUE (*Ustilago maydis*) EN LA REGION CENTRAL DE MÉXICO

Lilia Hernández Gasca, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2016

Las técnicas implementadas para la infección del maíz por el hongo *Ustilago maydis* para la producción masiva de huitlacoche tienen alta variabilidad, por lo que es posible estandarizarlas y mejorarlas. En esta investigación se evaluó el efecto del ácido acetil salicílico a una concentración 100  $\mu\text{M}$  (AAS 100  $\mu\text{M}$ ) en cuatro cepas nativas procedentes de diferentes regiones de México, y en las monoesporidias aisladas de la cepa nativa CP-545 para determinar su patrón de sexualidad. Se realizaron pruebas de apareamiento con 8 monoesporidias seleccionadas para formar cruza intra-cepa e inter-cepas con 2 cepas extranjeras de referencia (CR), de las cruza se aislaron los dicariones formados (híbridos reaislados, HR). El híbrido aislado a partir de la cruza [436]x[545]<sub>15</sub> (monoesporidia nativa vs. CR) en el tratamiento [PDA + Carbón Activado (C.A.) +AAS 100  $\mu\text{M}$ ] presentó una área de crecimiento en promedio de  $0.773 \pm 0.017 \text{ cm}^2/\text{día}$ , a diferencia de su híbrido aislado cultivado en la condición testigo (PDA + C.A.), que tuvo un área de crecimiento de  $0.766 \pm 0.023 \text{ cm}^2/\text{día}$ . La cruza intra-cepa nativa [545]<sub>8x22</sub> presentó un área de crecimiento de  $0.708 \pm 0.018 \text{ cm}^2/\text{día}$  en el tratamiento, y en el testigo de  $0.437 \pm 0.016 \text{ cm}^2/\text{día}$ . Una vez caracterizadas las cruza, se infectó el maíz en una prueba a nivel invernadero para confirmar la dicarionización del material generado. Se observó que mayoritariamente los híbridos aislados fueron los que presentaron infecciones en maíz. Los resultados obtenidos en la presente investigación muestran el potencial de innovación del AAS 100  $\mu\text{M}$  en la selección de cepas y elaboración de inóculo de *U. maydis*. Se propone una estrategia de mejoramiento y selección de cepas de *U. maydis* para mejorar su producción controlada.

Palabras clave: ácido acetilsalicílico, cruza, genética clásica, híbridos, monoesporidias, *Ustilago maydis*.

ACETYLSALICYLIC ACID EFFECT ON THE CONTROLLED PRODUCTION OF  
HUITLACOCHÉ IN THE CENTRAL REGION OF MEXICO

Lilia Hernández Gasca, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2016

The techniques implemented for corn infection by the fungus *Ustilago maydis* for mass production of huitlacoche have high variability, so it is possible to standardize and improve them. In this research the effect of acetylsalicylic acid at a concentration 100  $\mu\text{M}$  (ASA) in four native strains of *U. maydis* from different regions of Mexico and the monospore isolated from the native strain CP-545 to determine their sexuality pattern was evaluated. Mating tests with 8 monospore selected to form an intra-strain crosses and foreign inter-strain with 2 reference strains (RS) of the formed dikaryon crosses (hybrid reisolated, HR) were performed. The hybrid isolated from the cross [436]x[545]<sub>15</sub> (native monospore vs. SR) treatment [PDA + Activated Carbón (AC) + ASA 100  $\mu\text{M}$ ] presented a growth area averaged  $0.773 \pm 0.017$   $\text{cm}^2/\text{day}$ , unlike its hybrid isolated cultivated in the control condition (PDA + AC) it had a growth area of  $0.766 \pm 0.023$   $\text{cm}^2/\text{day}$ . Intra-strain native crossbred [545]<sub>8x22</sub> presented a growth area of  $0.708 \pm 0.018$   $\text{cm}^2/\text{day}$  treatment, and the witness had an area of  $0.437 \pm 0.016$   $\text{cm}^2/\text{day}$ . Once the crosses were characterized, the corn was infected in a greenhouse test to confirm the level of the material generated. It was observed that most of the isolated hybrids were those with infections in corn. The results obtained in this research show the innovation potential of ASA 100  $\mu\text{M}$  in strain selection and inoculum of *U. maydis*. An improvement and selection strategy of strains of *U. maydis* is proposed to improve its controlled production of huitlacoche.

Keywords: aspirin, crosses classic, hybrid genetics, monoesporidias, *Ustilago maydis*.

## **Dedicatoria**

Para mis padres por su interminable apoyo en todo momento de mi vida, por sus enseñanzas, consejos y por su eterna paciencia.

A mi madre que es el ser más maravilloso de todo el mundo.

En memoria de mi padre, el mejor padre del mundo, que donde quiera que estés estoy segura que iluminas nuestro camino.

Para mi novio por su interminable amor que en todo momento ha sido apoyo y fuerza, por la paciencia y ternura con que respondía en mis momentos de enojo y desesperación.

A mis hermanos que siempre me han apoyado en momentos difíciles, y nunca me han dejado caer, los quiero mucho.

Para mis amigos que son las personas que han estado cerca de mí en este proceso impidiendo que me sienta sola.

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haber financiado mis estudios de Maestría en el Colegio de Postgraduados, *Campus Puebla*.

A la Línea Prioritaria de Investigación 5, Biotecnología Microbiana Vegetal y Animal, por brindarme parte de los insumos que utilicé durante la realización de este trabajo de investigación.

A mi consejo particular integrado por la Dra. Mercedes Sobal Cruz y los Dres. Daniel Claudio Martínez Carrera, Porfirio Morales Almora, Filemón Parra Inzunza y Hermilo Leal Lara por confiar en mí y por la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales del *Campus Puebla*. Siempre les agradeceré el apoyo brindado para poder concluir con mi trabajo de tesis.

A los integrantes del Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles y Medicinales, profesores, académicos y alumnos, por su apoyo durante mi estancia de investigación.

<b>CONTENIDO</b>		<b>Página</b>
<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II.</b>	<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	3
2.1	Generalidades de <i>Ustilago maydis</i> (huitlacoche).....	3
2.2	Datos históricos.....	3
2.3	Clasificación taxonómica.....	5
2.4	Descripción morfológica.....	6
2.5	Ciclo de vida de <i>Ustilago maydis</i> .....	6
2.6	Apareamiento y patogénesis.....	8
2.7	Factores ambientales que favorecen a <i>Ustilago maydis</i> .....	10
2.8	Variabilidad genética.....	11
2.9	Reguladores de crecimiento.....	12
2.10	Ácido acetil salicílico (AAS).....	13
2.11	El cultivo del maíz en México .....	14
<b>III.</b>	<b>MARCO DE REFERENCIA</b> .....	16
3.1	Producción comercial de huitlacoche en México.....	16
3.2	Producción de huitlacoche en invernadero.....	17
3.3	Producción de inóculo de huitlacoche.....	19
3.4	Uso de ácido acetilsalicílico para incrementar rendimiento.....	20
3.5	El huitlacoche en la gastronomía.....	21
3.6	Métodos de inoculación artificial de huitlacoche.....	22
3.7	Potencial de variedades de maíz en la producción de huitlacoche.....	24
3.8	Apareamiento sexual <i>in vitro</i> (fenotipo <i>fuz</i> ) de <i>U. maydis</i> .....	27
<b>IV.</b>	<b>PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	28
<b>V.</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	29
<b>VI.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	29
6.1	Objetivo general.....	29
6.2	Objetivos específicos.....	29
<b>VII.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	30
7.1	Material biológico.....	31
7.2	Selección de cepas a estudiar en base su caracterización fenotípica.....	31
7.3	Cepas de referencia.....	32
7.4	Condiciones generales del experimento.....	32
7.5	Elaboración de medios de cultivo.....	32

7.5.1	Testigos (PDA, PDA + C.A. 1%, solución agua).....	33
7.5.2	Tratamientos (PDA + AAS 100 $\mu$ M; PDA + C.A. 1% + AAS 100 $\mu$ M; solución de AAS 100 $\mu$ M).....	33
7.6	Caracterización de cepas nativas y de referencia.....	34
7.6.1	Conteo de esporidias en cámara de Neubauer.....	35
7.6.2	Viabilidad de esporidias.....	36
7.7	Aislamiento de monoesporidias de la cepa CP-545.....	36
7.8	Estandarización de los cruzamientos.....	38
7.8.1	Método de Banuett (fenotipo <i>fuz</i> ).....	38
7.8.2	Método del alternativo.....	38
7.9	Determinación del patrón de sexualidad de la CP-545.....	39
7.9.1	Clases de incompatibilidad.....	39
7.9.2	Criterios de selección.....	40
7.10	Selección de dicariones.....	40
7.10.1	Cruzas intra-cepas.....	40
7.10.2	Cruzas inter-cepas.....	40
7.10.3	Híbridos reaislados (HR).....	41
7.11	Caracterización del material biológico estudiado.....	41
7.11.1	Determinación de pH, temperatura, conductividad y resistividad.....	42
7.11.2	Área de crecimiento ( $\text{cm}^2/\text{día}$ ).....	43
7.12	Análisis estadístico (SAS) de las variables estudiadas en el laboratorio.....	43
7.13	Comprobación de la infección de los dicariones y de los HR en invernadero...	43
7.13.1	Elaboración de inóculo en medio líquido EM al 3% y EM al 3% +AAS 100 $\mu$ M.....	44
7.13.2	Prueba de virulencia en invernadero.....	46
<b>VIII.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	47
8.1	Caracterización de las cepas nativas y de referencia.....	47
8.1.1	Concentración de monoesporidias en cada dilución.....	49
8.1.2	Viabilidad de las monoesporidias después de 48 h de incubación.....	52
8.2	Mono esporidias aisladas de la cepa CP-545.....	55
8.3	Entrecruzamientos.....	55
8.3.1	Por el método de Banuett (fenotipo <i>fuz</i> ).....	55
8.3.2	Por el método alternativo.....	57
8.4	Patrón de sexualidad de la CP-545.....	58

8.4.1	Clases de incompatibilidad.....	59
8.5	Dicariones seleccionados.....	60
8.5.1	Por cruzamiento de monoesporidias en paralelo.....	62
8.5.2	Por híbrido reaislado (HR).....	68
8.6	Caracterización del material biológico estudiado.....	70
8.6.1	pH, temperatura, conductividad y resistividad.....	71
8.6.2	Área de crecimiento (cm <sup>2</sup> /día).....	72
8.7	Análisis estadístico.....	80
8.8	Confirmación de la virulencia de las cepas de <i>Ustilago maydis</i> en invernadero	84
<b>IX.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	95
<b>X.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	97
<b>XI.</b>	<b>ESTRATEGIA PARA APROVECHAR LOS RECURSOS GENÉTICOS MEJORADOS DE <i>USTILAGO MAYDIS</i> (HUITLACOICHE) PARA SU PRODUCCIÓN EN MÉXICO</b> .....	99
<b>XII.</b>	<b>LITERATURA CITADA</b> .....	110
<b>XIII.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	117

## LISTA DE FIGURAS

		Página
<b>Figura 1.</b>	Huitlacoche ( <i>Ustilago maydis</i> ) fresco.....	3
<b>Figura 2.</b>	Imagen del huitlacoche en Historia General de las Cosas de Nueva España de Fray Bernardino de Sahagún (tomada de Valadez, 2012).....	5
<b>Figura 3.</b>	Teliosporas en germinación de <i>Ustilago maydis</i> (tomada de Álvarez, 1999).....	6
<b>Figura 4.</b>	Ciclo de vida de <i>Ustilago maydis</i> (tomada de Agripedia, 2000).....	7
<b>Figura 5.</b>	Representación esquemática del ciclo de vida de <i>Ustilago maydis</i> . Se muestra la germinación de las teliosporas con la formación del promicelio y las cuatro basidiosporas. Éstas se desprenden y se multiplican en la forma de levadura. A continuación se representa la conjugación de dos esporidias sexualmente compatibles para formar el dicarion que invade la planta y se multiplica en forma micelial, dando lugar a los tumores donde se forman las teliosporas. Éstas germinan fuera de la planta para reiniciar el ciclo. Se indican los tres estadios del hongo: haploide, dicariótico y diploide, el sitio donde proliferan, y la secuencia de eventos por los cuales avanza el ciclo de vida del hongo (tomada de Agrios, 1991).....	8
<b>Figura 6.</b>	Ciclo de vida de <i>Ustilago maydis</i> . El ciclo inicia con el reconocimiento de las basidiosporas haploides sexualmente compatibles (a), para formar el filamento dicariótico infectivo (b), el cual infecta a la planta a través del apresorio (c). La penetración y proliferación del filamento conduce a la formación de tumores (d), que contienen teliosporas diploides (e), que al romperse el tumor son liberadas para generar esporas haploides nuevas (f), y reiniciar el ciclo (Modificado de Fuchs <i>et al.</i> , 2006).....	9
<b>Figura 7.</b>	Células dicarióticas infectivas (tomada de Banuett y Herskowitz, 1994).....	10
<b>Figura 8.</b>	Dimorfismo <i>in vitro</i> de <i>Ustilago maydis</i> . A. Levaduras crecidas en un medio de pH 7 (1000X). B. Micelio desarrollado en un medio de pH 3 (400X) (tomada de Ruiz <i>et al.</i> , 2008).....	11
<b>Figura 9.</b>	Esquema de reacción del ácido salicílico.....	14
<b>Figura 10.</b>	Cruzas <i>in vitro</i> basadas en el fenotipo <i>fuz</i> para confirmar el entrecruzamiento en <i>Ustilago maydis</i> (tomada de Banuett y Herskowitz, 1988).....	27
<b>Figura 11.</b>	Diagrama general de trabajo realizado.....	30
<b>Figura 12.</b>	Mapa de la república mexicana por división municipal. Mapa digital, INEGI, CONABIO.....	31
<b>Figura 13.</b>	Estandarización de protocolo.....	34
<b>Figura 14.</b>	Diluciones para conteo de esporidias. El denominador de estas fracciones recibe el nombre de factor de dilución. Como forma de cálculo directo se puede considerar que si la dilución se realiza añadiendo 1/10 parte de la muestra en el volumen final del tubo, se obtiene un factor de dilución 10 veces inferior al inicial.....	35

<b>Figura 15.</b>	Fórmula para determinar concentración monoesporidias por mililitro, en la imagen podemos observar los cuadrantes a contar por dilución.....	36
<b>Figura 16.</b>	Obtención de monoesporidias de la cepa nativa CP-545 de <i>Ustilago maydis</i> .....	37
<b>Figura 17.</b>	Entrecruzamiento de monoesporidias de <i>Ustilago maydis</i> .....	38
<b>Figura 18.</b>	Forma de entrecruzar las cepas de <i>Ustilago maydis</i> para evidenciar el fenotipo <i>fuz</i> . a) En cruz propuesta por Banuett y Herskowitz (1988). b) Por el método alternativo en paralelo.....	39
<b>Figura 19.</b>	a) Reacción negativa ( <i>fuz</i> <sup>-</sup> ): colonia cremosa y brillante (levaduriforme). b) Reacción positiva ( <i>fuz</i> <sup>+</sup> ): colonia blanca con apariencia algodonosa.....	39
<b>Figura 20.</b>	Determinación de la compatibilidad de las cruzas para ubicar las monoesporidias en sus tipos de sexualidad.....	40
<b>Figura 21.</b>	Reaislamiento de los híbridos y su siembra por triplicado en las condiciones del experimento.....	41
<b>Figura 22.</b>	Proceso para la obtención de las muestras y medición de las variables en el tiempo final.....	42
<b>Figura 23.</b>	Diagrama general de la elaboración de inóculo e infección de mazorca.	44
<b>Figura 24.</b>	Preparación de inóculos de monoesporidias y cruzas en malta al 3%...	45
<b>Figura 25.</b>	Preparación de inóculos de monoesporidias y cruzas en malta al 3% + ácido acetilsalicílico (AAS 100 µM).....	45
<b>Figura 26.</b>	Preparación del inóculo de cada híbrido reaislado en ambas condiciones experimentales (malta al 3% y malta al 3% + ácido acetilsalicílico 100 µM).....	46
<b>Figura 27.</b>	Crecimiento de la cepa nativa CP-545 de <i>Ustilago maydis</i> en las condiciones experimentales establecidas a 48 horas de incubación.....	47
<b>Figura 28.</b>	Crecimiento de la cepa nativa CP-774 de <i>Ustilago maydis</i> en las condiciones experimentales establecidas a 48 horas de incubación.....	47
<b>Figura 29.</b>	Crecimiento de la cepa nativa CP-585 de <i>Ustilago maydis</i> en las condiciones experimentales establecidas a 48 horas de incubación.....	48
<b>Figura 30.</b>	Crecimiento de la cepa nativa CP-626 de <i>Ustilago maydis</i> en las condiciones experimentales establecidas a 48 horas de incubación.....	48
<b>Figura 31.</b>	Crecimiento de la cepa extranjera de referencia CP-436 de <i>Ustilago maydis</i> en las condiciones experimentales establecidas a 48 horas de incubación.....	49
<b>Figura 32.</b>	Crecimiento de la cepa extranjera de referencia CP-437 de <i>Ustilago maydis</i> en las condiciones experimentales establecidas a 48 horas de incubación.....	49
<b>Figura 33.</b>	Conteo de monoesporidias/mL de las cepas CP-545, CP-585, CP-626 y CP-774 de <i>Ustilago maydis</i> , las barras negras muestran el promedio del conteo realizado por triplicado en cámara de Neubauer, utilizando agua como solvente. Las barras grises muestran el promedio del conteo realizado por triplicado en la cámara de Neubauer usando AAS 100 µM como solvente.....	50

<b>Figura 34.</b>	Análisis de medias del conteo en cámara de Neubauer de la emulsión de monoesporidias de <i>Ustilago maydis</i> en AAS 100 $\mu$ M. Las barras negras muestran el promedio (n=12) de las cuatro cepas sometidas a conteo en cámara de Neubauer usando agua. Las barras grises muestran el promedio (n=12) de las cuatro cepas sometidas a conteo en cámara de Neubauer usando AAS 100 $\mu$ M.....	52
<b>Figura 35.</b>	Germinación de UFE/mL de cada dilución de las cepas de <i>Ustilago maydis</i> después de 48 horas de incubación sembradas en ambas condiciones. Las barras negras muestran el promedio (n=3) de las UFE/mL en PDA. Las barras grises muestran el promedio (n=3) de las UFE/mL en PDA + AAS 100 $\mu$ M.....	53
<b>Figura 36.</b>	Análisis de medias de la germinación de UFE/mL de cada dilución de las cepas de <i>Ustilago maydis</i> , mostrando el efecto del AAS 100 $\mu$ M. Las barras negras muestran el promedio (n=12) de las cuatro cepas nativas sembradas en PDA usando agua. Las barras grises muestran el promedio (n=12) de las cuatro cepas sembradas usando PDA + AAS 100 $\mu$ M. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 0.05).....	54
<b>Figura 37.</b>	Siembra en cruz de las diferentes cepas compatibles de <i>Ustilago maydis</i> , usando agar papa dextrosa con carbón activado 1% (PDA + C.A. 1%) y agar papa dextrosa con carbón activado 1% + ácido acetilsalicílico 100 $\mu$ M (PDA + C.A. 1% + AAS 100 $\mu$ M.).....	56
<b>Figura 38.</b>	Siembra en paralelo (método del alternativo) de diferentes cepas compatibles de <i>Ustilago maydis</i> , usando agar papa dextrosa con carbón activado 1% (PDA + C.A. 1%) y agar papa dextrosa con carbón activado 1% y ácido acetilsalicílico 100 $\mu$ M (PDA +C.A. 1% + AAS 100 $\mu$ M).....	58
<b>Figura 39.</b>	Monoesporidias y cruzas intra-cepa de <i>Ustilago maydis</i> a los 24 días de incubación, en medio de cultivo agar papa dextrosa con carbón activado 1% (PDA + C.A. 1%).....	63
<b>Figura 40.</b>	Cruzas inter-cepas de <i>Ustilago maydis</i> a los 24 días de incubación en medio de cultivo agar papa dextrosa con carbón activado 1% (PDA+ 1%).....	64
<b>Figura 41.</b>	Multiesporidio de la cepa CP-545 de <i>Ustilago maydis</i> a los 24 días de incubación en medio de cultivo agar papa dextrosa con carbón activado 1% (PDA + C.A. 1%).....	65
<b>Figura 42.</b>	Monoesporidias y cruzas intra-cepa de <i>Ustilago maydis</i> a los 24 días de incubación, en medio de cultivo agar papa dextrosa con carbón activado 1% y ácido acetilsalicílico 100 $\mu$ M (PDA + C.A. + AAS 100 $\mu$ M).....	66
<b>Figura 43.</b>	Cruzas inter-cepas de <i>Ustilago maydis</i> a los 24 días de incubación en medio de cultivo agar papa dextrosa con carbón activado 1% y ácido acetilsalicílico 100 $\mu$ M (PDA+C.A. 1% + AAS 100 $\mu$ M).....	67

<b>Figura 44.</b>	Multiesporidio de la cepa nativa CP-545 de <i>Ustilago maydis</i> , a los 24 días de incubación en medio de cultivo agar papa dextrosa con carbón activado 1% y ácido acetilsalicílico 100 µM (PDA+C.A. 1% + AAS 100 µM).....	68
<b>Figura 45.</b>	Híbridos reaislados (HR) de <i>Ustilago maydis</i> en agar papa dextrosa con carbón activado 1% (PDA + C.A. 1%), a los 24 días de incubación a temperatura ambiente.....	69
<b>Figura 46.</b>	Híbridos reaislados (HR) de <i>Ustilago maydis</i> en agar papa dextrosa con carbón activado 1% y ácido acetilsalicílico 100 µM (PDA + C.A. 1% + AAS 100 µM), a los 24 días de incubación a temperatura ambiente.....	70
<b>Figura 47.</b>	Área de crecimiento (cm <sup>2</sup> /día) de las monoesporidias de <i>Ustilago maydis</i> (CP-545) usando PDA + C.A.1% (Testigo), a los 24 días de incubación. Clave 15 ([545] <sub>15</sub> ), Clave 16 ([545] <sub>12</sub> ), Clave17 ([545] <sub>19</sub> ), Clave 18 ([545] <sub>13</sub> ), Clave 19 ([545] <sub>8</sub> ), Clave 20 ([545] <sub>22</sub> ), Clave 21 ([545] <sub>3</sub> ), Clave 22 ([545] <sub>24</sub> ), Clave 23 (CP-436), Clave 24 (CP-437). CA= Carbón activado.....	73
<b>Figura 48.</b>	Área de crecimiento (cm <sup>2</sup> /día) de las monoesporidias de <i>Ustilago maydis</i> (CP-545) usando PDA + C.A. 1% + AAS 100 µM (Tratamiento), a los 24 días de incubación. Clave 15 ([545] <sub>15</sub> ), Clave 16 ([545] <sub>12</sub> ), Clave17 ([545] <sub>19</sub> ), Clave 18 ([545] <sub>13</sub> ), Clave 19 ([545] <sub>8</sub> ), Clave 20 ([545] <sub>22</sub> ), Clave 21 ([545] <sub>3</sub> ), Clave 22 ([545] <sub>24</sub> ), Clave 23 (CP-436), Clave 24 (CP-437). CA= Carbón activado.....	74
<b>Figura 49.</b>	Área de crecimiento (cm <sup>2</sup> /día) de las cruza intra-cepa de <i>Ustilago maydis</i> (CP-545) usando PDA + C.A. 1% (Testigo), a los 24 días de incubación. Clave 1([545] <sub>15x12</sub> ), Clave 2([545] <sub>19x13</sub> ), Clave 3([545] <sub>8x22</sub> ), Clave 4([545] <sub>3x24</sub> ), Clave 13 ([CP-436] [CP-437]) y la Clave 14 CP-545.]. CA= Carbón activado.....	75
<b>Figura 50.</b>	Área de crecimiento (cm <sup>2</sup> /día) de las cruza intra-cepa de <i>Ustilago maydis</i> (CP-545) usando PDA + C.A. 1% + AAS 100 µM, a los 24 días de incubación. Clave 1([545] <sub>15x12</sub> ), Clave 2([545] <sub>19x13</sub> ), Clave 3([545] <sub>8x22</sub> ), Clave 4([545] <sub>3x24</sub> ), Clave 13 ([CP-436] [CP-437]) y la Clave 14 CP-545. CA= Carbón activado.....	75
<b>Figura 51.</b>	Área de crecimiento (cm <sup>2</sup> /día) de las cruza inter-cepas en la condición testigo de <i>Ustilago maydis</i> (CP-545) usando PDA + C.A 1%, a los 24 días de incubación. Clave 5 ([436] [545] <sub>15</sub> ), Clave 6 ([437] [545] <sub>15</sub> ), Clave 7 ([436] [545] <sub>13</sub> ), Clave 8 ([437] [545] <sub>13</sub> ), Clave 9 ([436] [545] <sub>8</sub> ), Clave 10 ([437] [545] <sub>8</sub> ), Clave 11 ([436] [545] <sub>24</sub> ), Clave 12 ([437] [545] <sub>24</sub> ). CA= Carbón activado.....	76
<b>Figura 52.</b>	Área de crecimiento (cm <sup>2</sup> /día) de las cruza inter-cepas en la condición de tratamiento de <i>Ustilago maydis</i> (CP-545) usando PDA + C.A. + AAS 100 µM, a los 24 días de incubación. Clave 5 ([436] [545] <sub>15</sub> ), Clave 6 ([437] [545] <sub>15</sub> ), Clave 7 ([436] [545] <sub>13</sub> ), Clave 8 ([437] [545] <sub>13</sub> ), Clave 9 ([436] [545] <sub>8</sub> ), Clave 10 ([437] [545] <sub>8</sub> ), Clave 11 ([436] [545] <sub>24</sub> ), Clave 12 ([437] [545] <sub>24</sub> ). CA= Carbón activado.....	77

<b>Figura 53.</b>	Área de crecimiento (cm <sup>2</sup> /día) de los híbridos intra-cepa de <i>Ustilago maydis</i> (CP-545) usando PDA + C.A. 1% (Testigo), a los 24 días de incubación. Clave 1([545] <sub>15x12</sub> ), Clave 2([545] <sub>19x13</sub> ), Clave 3([545] <sub>8x22</sub> ), Clave 4([545] <sub>3x24</sub> ), Clave 13 ([CP-436] [CP-437]). CA= Carbón activado.....	78
<b>Figura 54.</b>	Área de crecimiento (cm <sup>2</sup> /día) de los híbridos intra-cepa de <i>Ustilago maydis</i> (CP-545) usando PDA + C.A. 1% + AAS 100 µM (Tratamiento), a los 24 días de incubación. Clave 1([545] <sub>15x12</sub> ), Clave 2([545] <sub>19x13</sub> ), Clave 3([545] <sub>8x22</sub> ), Clave 4([545] <sub>3x24</sub> ), Clave 13 ([CP-436] [CP-437]). CA= Carbón activado.....	78
<b>Figura 55.</b>	Área de crecimiento (cm <sup>2</sup> /día) de los híbridos inter-cepas de <i>Ustilago maydis</i> (CP-545) usando PDA + C.A. 1% (Testigo), a los 24 días de incubación. Clave 5 ([436] [545] <sub>15</sub> ), Clave 6 ([437] [545] <sub>15</sub> ), Clave 7 ([436] [545] <sub>13</sub> ), Clave 8 ([437] [545] <sub>13</sub> ), Clave 9 ([436] [545] <sub>8</sub> ), Clave 10 ([437] [545] <sub>8</sub> ), Clave 11 ([436] [545] <sub>24</sub> ), Clave 12 ([437] [545] <sub>24</sub> ). CA= Carbón activado.....	79
<b>Figura 56.</b>	Área de crecimiento (cm <sup>2</sup> /día) de los híbridos inter-cepas de <i>Ustilago maydis</i> (CP-545) usando PDA + C.A. 1% + AAS 100 µM (Tratamiento), a los 24 días de incubación. Clave 5 ([436] [545] <sub>15</sub> ), Clave 6 ([437] [545] <sub>15</sub> ), Clave 7 ([436] [545] <sub>13</sub> ), Clave 8 ([437] [545] <sub>13</sub> ), Clave 9 ([436] [545] <sub>8</sub> ), Clave 10 ([437] [545] <sub>8</sub> ), Clave 11 ([436] [545] <sub>24</sub> ), Clave 12 ([437] [545] <sub>24</sub> ). CA= Carbón activado.....	80
<b>Figura 57.</b>	Desarrollo fisiológico de la planta de maíz, híbrido HUE-CP-14 Nopalucan.....	84
<b>Figura 58.</b>	Tres niveles de infección de mazorcas infectadas de <i>Ustilago maydis</i> con EM 3% + AAS 100 µM.....	85
<b>Figura 59.</b>	Actores y sectores involucrados en la estrategia.....	103
<b>Figura 60.</b>	Estrategia para generar una red de conocimiento de <i>Ustilago maydis</i> ...	106
<b>Figura 61.</b>	Método sistemático y de fácil manejo para la producción de huitlacoche.....	109

<b>LISTA DE CUADROS</b>		<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b>	Clasificación taxonómica de <i>Ustilago maydis</i> (tomado de Paredes y Valverde, 1999).....	5
<b>Cuadro 2.</b>	Calendario agrícola para el cultivo de maíz.....	15
<b>Cuadro 3.</b>	Composición del huitlacoche (tomado de Paredes y Valverde, 1999).....	22
<b>Cuadro 4.</b>	Variedades de maíz utilizadas en los estudios para la producción de huitlacoche ( <i>Ustilago maydis</i> ) [Modificado de Castañeda de León <i>et al.</i> , 2016].....	26
<b>Cuadro 5.</b>	Cepas de <i>Ustilago maydis</i> seleccionadas para esta investigación.....	31
<b>Cuadro 6.</b>	Cepas de referencia o monoesporidias tipo del hongo <i>Ustilago maydis</i> utilizadas para confirmar los entrecruzamientos inter-cepas..	32
<b>Cuadro 7.</b>	Condiciones del experimento, siembra y tratamientos para la cepas de <i>Ustilago maydis</i> (CP-545, CP-585, CP-626 y CP-774) seleccionadas.....	32
<b>Cuadro 8.</b>	Material biológico seleccionado y caracterizado de <i>Ustilago maydis</i>	42
<b>Cuadro 9.</b>	Concentración de monoesporidias/mL de cada dilución realizada en agua (T) de las cepas nativas de <i>Ustilago maydis</i> .....	51
<b>Cuadro 10.</b>	Concentración de monoesporidias/mL de cada dilución realizada en una solución de ácido acetilsalicílico (AAS) 100 µM de las cepas nativas de <i>Ustilago maydis</i> .....	51
<b>Cuadro 11.</b>	Comparación de medias de los resultados en los tratamientos aplicados a las cepas de <i>Ustilago maydis</i> .....	52
<b>Cuadro 12.</b>	Viabilidad de monoesporidias/mL que germinaron de cada dilución sembradas en PDA (T) de las cepas de <i>Ustilago maydis</i> .....	53
<b>Cuadro 13.</b>	Viabilidad de monoesporidias/mL que germinaron en cada dilución sembradas en el tratamiento PDA + AAS 100 µM de las cepas de <i>Ustilago maydis</i> .....	54
<b>Cuadro 14.</b>	Comparación de las condiciones de germinación de UFE/mL de <i>Ustilago maydis</i> .....	54
<b>Cuadro 15.</b>	Mono esporidias aisladas de la cepa CP-545 de <i>Ustilago maydis</i> procedente de Huaquechula, Puebla.....	55
<b>Cuadro 16.</b>	Cruzas formadas entre las 14 monoesporidias y los tipos de referencia de <i>Ustilago maydis</i> por el método de cruz, en dos diferentes condiciones (PDA + C.A. 1% y PDA + C.A. 1% + AAS 100 µM). El signo + (fenotipo <i>fuz</i> <sup>+</sup> ) indica la formación de un dicarion patogénico (micelio) y el signo - (fenotipo <i>fuz</i> <sup>-</sup> ), que no hubo compatibilidad entre las monoesporidias. CA= Carbón activado.....	56

<b>Cuadro 17.</b>	Cruzas entre las 14 monoesporidias y ambos tipos de referencia de <i>Ustilago maydis</i> por el método alternativo, en dos condiciones (PDA + C.A. 1% y PDA + C.A. 1% + AAS 100 µM), el signo + (fenotipo <i>fuz</i> <sup>+</sup> ) indica la formación de un dicarion patogénico (micelio) y, el signo - (fenotipo <i>fuz</i> <sup>-</sup> ) que no hubo compatibilidad entre las monoesporidias. Reacción de ambos lados ↔, reacción de un solo lado →-. CA= Carbón activado.....	57
<b>Cuadro 18.</b>	Reacciones que mostraron las cruzas de las 24 monoesporidias de la cepa CP-545 de <i>Ustilago maydis</i> , en PDA + C.A. 1%, la I indica una reacción intermedia, la letra D una reacción débil, F una reacción fuerte.....	59
<b>Cuadro 19.</b>	Ubicación de monoesporidias de la cepa nativa de <i>Ustilago maydis</i> (CP-545) en sus dos clases de incompatibilidad.....	60
<b>Cuadro 20.</b>	Selección de las monoesporidias y ubicación en las dos clases de incompatibilidad de <i>Ustilago maydis</i> .....	61
<b>Cuadro 21.</b>	Confirmación de cruzas entre monoesporidias del tipo I de la cepa CP-545 de <i>Ustilago maydis</i> .....	61
<b>Cuadro 22.</b>	Confirmación de cruzas entre monoesporidias del tipo II de la cepa CP-545 de <i>Ustilago maydis</i> .....	61
<b>Cuadro 23.</b>	Dicarios formados de la cepa nativa CP-545 de <i>Ustilago maydis</i> ..	62
<b>Cuadro 24.</b>	Caracterización de diferentes recursos genéticos de <i>Ustilago maydis</i> en agar papa dextrosa (PDA + C.A. 1%), a los 25 días de incubación. CA= Carbón activado.....	71
<b>Cuadro 25.</b>	Caracterización de diferentes recursos genéticos de <i>Ustilago maydis</i> en agar papa dextrosa con ácido acetilsalicílico (PDA + C.A. 1% + AAS 100 µM), a los 25 días de incubación. CA= Carbón activado...	72
<b>Cuadro 26.</b>	Determinación del área de crecimiento (cm <sup>2</sup> /día) de monoesporidias, cruzas e híbridos reaislados, y la infección de <i>Ustilago maydis</i> en una prueba piloto en invernadero.....	81
<b>Cuadro 27.</b>	Comparación de las cepas de <i>Ustilago maydis</i> que infectaron el maíz.....	84
<b>Cuadro 28.</b>	Relación del material seleccionado y las condiciones de estudio de las cepas de <i>Ustilago maydis</i> cultivadas en el híbrido de maíz (HUE-CP-14 Nopalucam) bajo condición de invernadero.....	86
<b>Cuadro 29.</b>	Relación de la infección de las cepas nativas de referencia CP-545, CP- 774 y CP-585 de <i>Ustilago maydis</i> . Se presentan imágenes de las mazorcas cuando se inyectaron con los inóculos utilizados como testigo 1 (Malta al 3%), testigo 2 (Malta al 3% + AAS 100 µM) y el blanco, sólo inóculo de agua.....	94

## I. INTRODUCCIÓN

*Ustilago maydis* es un hongo dimórfico, basidiomiceto que causa la enfermedad conocida como “carbón del maíz” o “huitlacoche”. Esta enfermedad es caracterizada por la formación de tumores en los tejidos aéreos de la planta del maíz. *U. maydis* es considerado como un hongo que presenta tres formas durante su ciclo de vida; a) una forma unicelular (esporidio), la cual es haploide uninucleada y presenta crecimiento saprófito; b) una forma filamentosa dicariótica, la cual es parasítica y patogénica; y c) una forma diploide (teliospora), la cual es solamente formada en los tumores de la planta hospedera (Christensen, 1963; Banuett y Herskowitz 1996). La forma unicelular haploide no es patogénica, sin embargo, la fusión de dos esporidias haploides compatibles dan lugar a la forma dicariótica, dicha fusión celular se lleva a cabo en la planta. El dicarion filamentoso inicia su crecimiento intracelularmente a través de las células epidérmicas, por lo que la hifa dicariótica se encuentra rodeada por la membrana plasmática intacta del hospedero. En esta etapa, las plantas de maíz infectadas presentan signos tempranos de la enfermedad, como la clorosis (amarillamiento de los tejidos), la formación de antocianinas así como el retardo en el desarrollo de la planta (Banuett y Herskowitz, 1996).

La diferenciación del hongo, la ramificación extensiva de la hifa, la cariogamia, la fragmentación de la hifa, culminando con la formación de la teliospora están íntimamente acoplada al crecimiento dentro del tejido hospedero (Banuett y Herskowitz, 1996). La formación del tumor, el cual contiene una gran cantidad de teliosporas, está asociada con el alargamiento y proliferación de las células hospederas, las cuáles tiene como característica una pared celular delgada así como la pérdida de plástidos. Una vez que los tumores han madurado, estos se rompen liberando las teliosporas al ambiente y a su vez dando lugar al inicio de un nuevo ciclo de vida (Banuett, 1995). Muchos agricultores de otros países consideran que este hongo es una plaga e impide el desarrollo y maduración del maíz, además de que toda planta parasitada es contagiosa para el resto del cultivo. Hoy en día el huitlacoche es visto como una nueva fuente de ingresos ya que el consumo de este hongo es cada día más aceptado en el mundo, gracias a que con su peculiar sabor y su alto valor nutricional es considerado hoy en día como un alimento gourmet. Hace poco tiempo se iniciaron estudios para su producción comercial, aunque muchos de ellos se realizan en el extranjero. Las cepas cultivadas de *U. maydis* provienen de cepas mejoradas o seleccionadas en el extranjero.

Inicialmente Banuett y Herskowitz (1988), empezaron a estudiar la sexualidad de *U. maydis* en el hospedero, demostrando la señalización de la planta con el hongo. En México, Castañeda de León *et al.* (2016), probaron diferentes materiales biológicos en campo, ampliando las investigaciones y revisiones en huitlacoche. Estudios recientes de selección e infección de cepas de *U. maydis* fueron realizados por Cervantes (2015) y Sánchez-Medina (2005), quienes probaron la infección de cepas haploides y mutantes para comprobar la infección de dicariones y de las monoesporidias *in vitro* en tejido vegetal de maíz utilizando diferentes hormonas vegetales para asegurar la infección en planta a nivel laboratorio.

Un compuesto que interviene en el crecimiento vegetal es el ácido acetilsalicílico, su efecto en cepas nativas de huitlacoche y como promotor de la infección en plantas de maíz cultivadas en invernadero forman parte de los resultados obtenidos en esta investigación.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Generalidades de *Ustilago maydis* (huitlacoche)

El carbón común es una enfermedad muy conocida y de importancia mundial que afecta a distintos cereales como trigo, cebada, caña de azúcar y maíz, ha sido documentado desde tiempos de los romanos quienes lo llamaron *Ustilago* (del latín *ustelare* “quemar”). Se han identificado aproximadamente 300 especies de *Ustilago*, las más importantes económicamente son las que causan pérdidas en maíz (*U. maydis*), avena (*U. avenae*), cebada (*U. nuda*) y trigo (*U. tritici*) (Gold *et al.*, 1999). *U. maydis* pertenece a la división Amastigomycota que son los hongos verdaderos y a la subdivisión Basidiomycotina que se caracteriza por producir esporas en estructuras especializadas llamadas basidios. Este hongo basidiomiceto es patógeno e infecta al maíz (*Zea mays*), uno de los principales cereales en el mundo, y a su ancestro el teocintle, que se caracteriza por inducir clorosis, necrosis, hiperplasia e hipertrofia, causando el desarrollo de tumores en tallo, hojas, espigas y en los granos de elote (Agrios, 1998). *U. maydis* presenta dos formas de crecimiento, fuera de la planta es levaduriforme, saprofita, haploide no patogénica y dentro de la planta es micelial, parasítica, diploide y patogénica (Holliday, 1974) (Fig. 1).



**Figura 1.** Huitlacoche (*Ustilago maydis*) fresco.

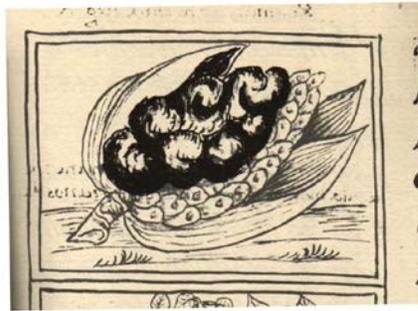
### 2.2 Datos históricos

La base cultural y bilógica de la cocina mexicana se encuentra en la milpa, un agroecosistema en el cual el hombre dirige sus esfuerzos hacia el cultivo de ciertas especies como son el maíz, frijol, jitomate, chile, amaranto y calabaza, etc. En cuanto a la relación maíz-hongo el huitlacoche se encuentra presente de forma inmaculada en la quesadilla, la cual es consumida de forma habitual y muy reconocida, es un alimento rico en contenido proteico, en particular

de la lisina, un aminoácido que se presenta en muy bajas cantidades en el maíz, por lo que su consumo simultáneo es beneficioso para nuestro organismo.

Observando esta complementariedad en el marco agrícola y alimentario, la sociedad mexicana en general decidió que el huitlacoche debía tener una historia cultural equivalente a la de otros acompañantes del maíz en la milpa, por ejemplo el frijol, la calabaza o los saltamontes, y a partir de ello se fue idealizando su consumo, hasta llegar a los reyes mexicas que lo consumían de forma habitual. Muchas de estas conjeturas no son reconocidas, ya que no representan un sustento científico. Valadez (2012), realizó un estudio en el cual se tomaron cuatro fuentes de información, las cuales crearon una visión muy diferente a la que se tenía en cuanto a la relación huitlacoche/hombre. Unos de los datos importantes es que se constató que donde crece maíz se desarrolla huitlacoche, pero no necesariamente donde aparece lo usan o lo consumen, otro dato importante es que no se concebía como un manjar de reyes, más bien como una enfermedad o algo perjudicial al maíz asociado con la lluvia. Así se lo muestra un fragmento de los murales de Tepantitla Teotihuacan, que representan al Tlacocan o paraíso de Tláloc (Dios de la lluvia) (Castañeda, 2016). La más temprana mención al huitlacoche se encuentra en una obra del siglo XVI: “Historia General de las Cosas de Nueva España”, escrita por Fray Bernardino de Sahagún, con el objetivo de salvaguardar el conocimiento indígena ante la llegada de la cultura europea y solo hace una muy breve mención al respeto, indicando que es una anomalía del maíz que lleva a que la mazorca adquiriera un color negruzco y se transforme en algo como lodo (Fig. 2).

Actualmente, se sabe que su introducción como alimento se basó en la curiosidad de diversas comunidades campesinas. A mediados del siglo XX el huitlacoche se incluyó dentro de ciertos platillos de la cocina francesa, acto que despertó e impulsó el interés en su consumo por parte de la clase alta y a partir de ese momento dejó de ser un alimento para pobres, para pasar a ser un “alimento tradicional de la cocina mexicana” (Valadez, 2012).



**Figura 2.** Imagen del huitlacoche en Historia General de las Cosas de Nueva España de Fray Bernardino de Sahagún (tomada de Valadez, 2012).

### 2.3 Clasificación taxonómica

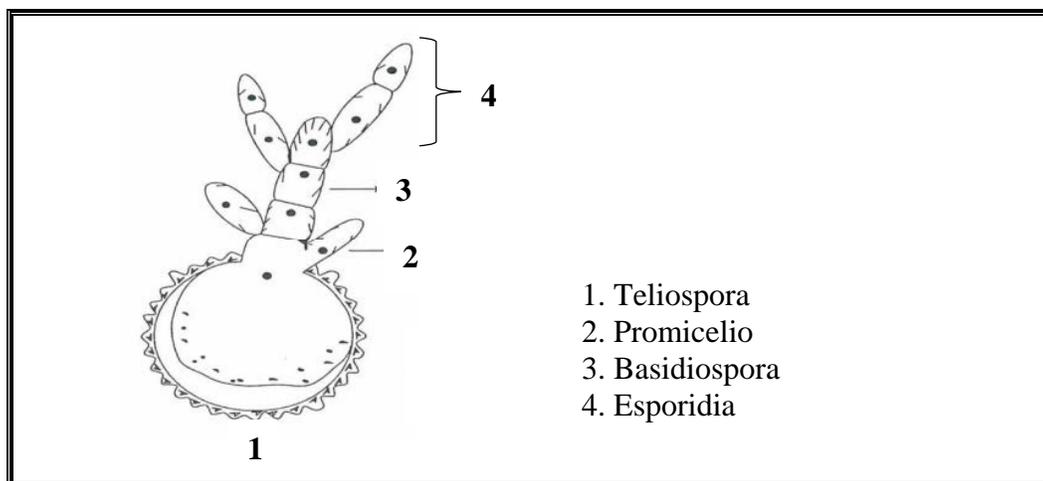
La posición taxonómica del hongo *Ustilago maydis* pertenece a la división *Amastigomycota*, que es correspondiente a los hongos verdaderos y a la subdivisión *Basidiomycotina* caracterizada por producir esporas en estructuras especializadas llamadas basidios (Mier *et al.*, 2002). Corresponden a los *Basidiomycetes*, en donde las esporas sexuales, al germinar, se forman extremadamente sobre una estructura denominada basidio constituida por una o cuatro células de tipo levaduriformes, capaces de desarrollarse en medios de cultivo; por lo que estos hongos son capaces de vivir como saprófitos en la naturaleza. En el Cuadro 1 se representa la taxonomía y clasificación de *U. maydis* (Paredes y Valverde, 1999).

**Cuadro 1.** Clasificación taxonómica de *Ustilago maydis* (tomado de Paredes y Valverde, 1999).

Taxón	Características
División <i>Amastigomycota</i>	Hongos que perdieron el estado móvil. No se adaptan a sistemas acuáticos. Producen mucho micelio. Hifas septadas o aseptadas.
Subdivisión <i>Basidiomycotina</i>	Produce basidios y basidiosporas. Estado diploide muy corto (basidio). Estado dicariótico muy prolongado.
Clase <i>Teliomycetes</i>	No forman basidiocarpos. Forman esporas de resistencia con pared gruesa. Las esporas están en grupos (soros). Hongos conocidos comúnmente como carbonces. Parásitos de plantas.
Orden <i>Ustilaginales</i>	Atrapan principalmente las estructuras reproductoras. Producen poco micelio. Promicelio septado transversalmente. Basidiosporas terminales y transversales. Soros con teliosporas café oscuro o negras.
Genero <i>Ustilago</i>	Esporas lisas, con espinas o reticuladas.
Especie <i>maydis</i>	Ataca al maíz y al teocintle.

## 2.4 Descripción morfológica

*Ustilago maydis*, es un fitopatógeno que se caracteriza por la presencia de agallas en partes aéreas de la planta, incluyendo las mazorcas. Este hongo presenta tres formas en su ciclo de vida: 1.- Una forma haploide saprófita (esporidia); 2.- Una forma micelial dicariótica, que resulta de la fusión de células haploides compatibles, forma en la cual es patógeno (parasítico); 3.- Una forma diploide (teliosporas), que forma agallas de las células hifales. Su reproducción es por meiosis para formar células haploides (Banuett y Herkowitz, 1998). *U. maydis* produce un micelio dicariótico cuyas células se transforman en teliosporas (2n) negras esféricas o elipsoidales que presentan protuberancias prominentes y en forma de espinas, de seis a once micrómetros de ancho, con capacidad para resistir las condiciones adversas del ambiente. Estas teliosporas germinan produciendo un basidio de cuatro células, llamado promicelio, cada una de las cuales se transforma en una basidiospora hialina, ovalada y nucleada (Agrios, 1991; Ruiz, 1999) (Fig. 3). Las teliosporas son primeramente binucleadas y éstas pueden germinar inmediatamente o pueden requerir de un periodo de dormancia antes de la germinación. El promicelio está formado por basidiosporas terminales y laterales (Valverde *et al*, 1995).



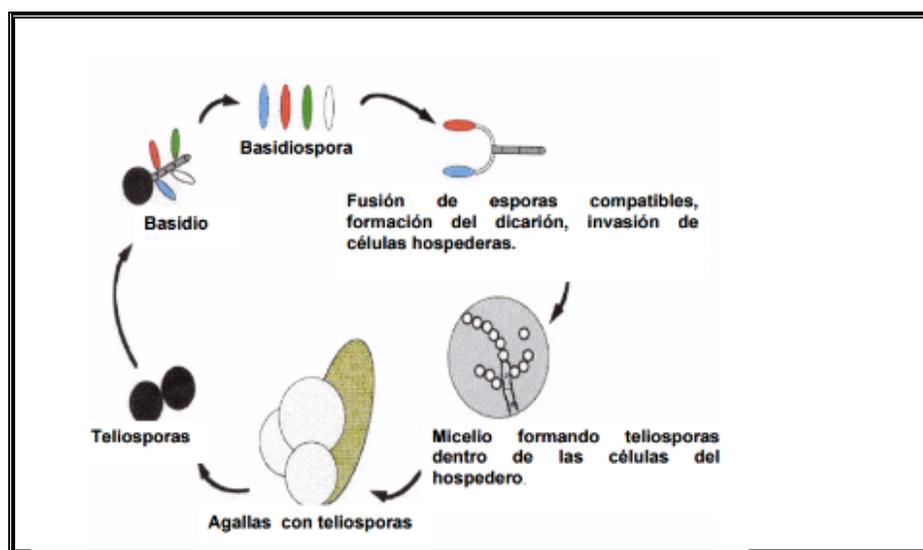
**Figura 3.** Teliosporas en germinación de *Ustilago maydis* (tomada de Álvarez, 1999).

## 2.5 Ciclo de vida de *Ustilago maydis*

El dimorfismo es la capacidad desarrollada por diversos hongos para crecer en forma de micelios o de levaduras en respuesta a las condiciones del medio ambiente. *U. maydis* es un basidiomiceto patógeno del maíz, el cual presenta un ciclo de vida complejo, no es un parásito

obligado, pero requiere de uno de sus dos huéspedes naturales para realizar su ciclo sexual. Solamente los dicariones y los diploides son infecciosos.

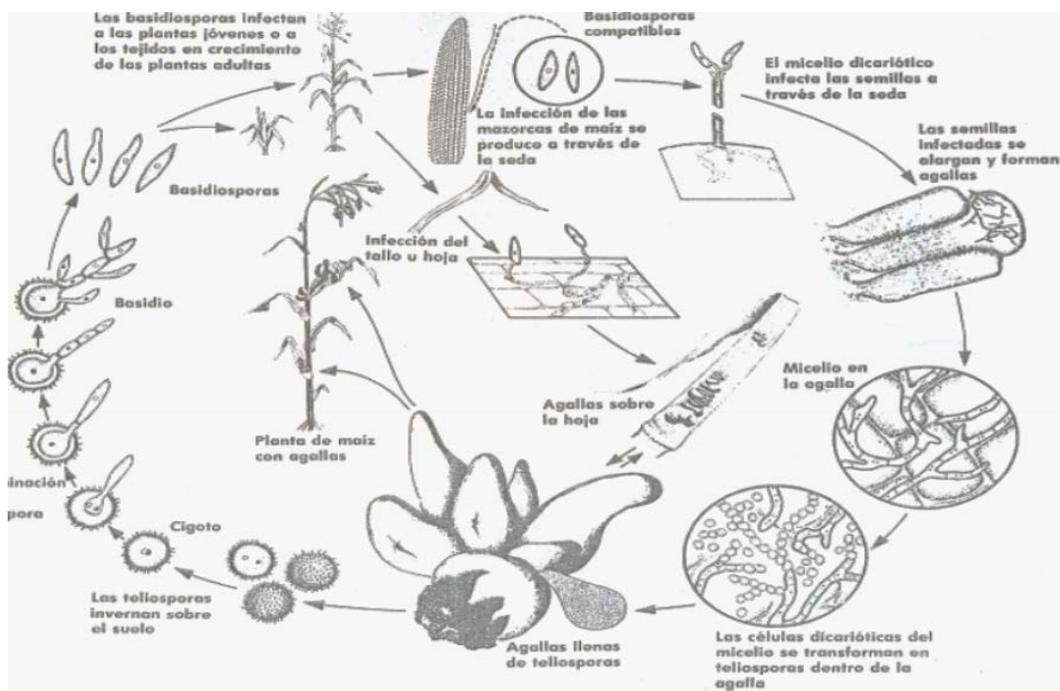
En su estado saprofítico el hongo crece en forma de levaduras haploides (esporidias). Al interactuar dos esporidias de tipos de apareamiento diferentes (reproducción sexual) compatibles, ocurre su apareamiento e inicia el desarrollo de una fase dicariótica, que constituye la forma invasiva (infectiva) del organismo. *U. maydis* crece como micelio en los tejidos del hospedante; éste eventualmente se divide y forma las teliosporas. En este punto es donde ocurre la cariogamia y el desarrollo de las esporas sexuales, llamadas teliosporas, las cuales llenan por millones las agallas características de la enfermedad, las cuales son depositadas en el suelo. Al germinar las teliosporas dan lugar a una estructura denominada promicelio, ocurren la meiosis y la mitosis, dando origen a la basidiospora. Las basidiosporas o esporidias se reproducen por gemación, reiniciándose nuevamente el ciclo de vida del hongo (Ruiz, 1995; Ruiz-Herrera y Martínez-Espinoza, 1998; Ruiz-Herrera *et al.*, 2000; Banuett, 2002). El ciclo de vida del hongo se muestra en la Figura 4.



**Figura 4.** Ciclo de vida de *Ustilago maydis* (tomada de Agripedia, 2000).

El ciclo de vida del patógeno, se completa en la mayoría de los casos una vez pasando por el hospedero. Las agallas del hongo encierran una gran masa de esporas, las cuales quedan libres una vez llegada su madurez ya que su cubierta se revienta. Las esporas pueden ser llevadas de un lugar a otro por las semillas de maíz, por el estiércol del ganado alimentado con las plantas infectadas, por el viento todo el año. Las esporas pueden mantenerse en el viento todo el año (Flores del Campo, 1991). El ciclo de vida de este hongo es corto y se pueden producir

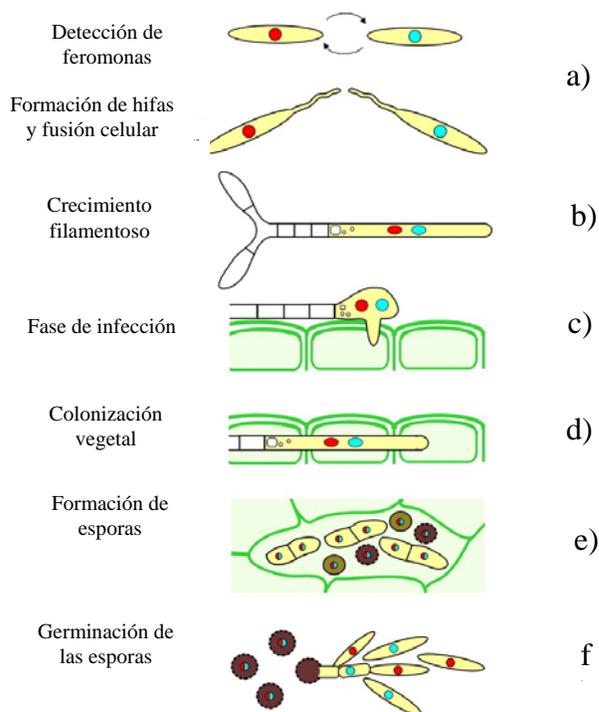
teliosporas en plantas que no han alcanzado la madurez sexual (Fig. 5). El tiempo requerido para inocular plantas y obtener progenie haploide es aproximadamente de tres semanas (Banuett y Herkowitz, 1998).



**Figura 5.** Representación esquemática del ciclo de vida de *Ustilago maydis*. Se muestra la germinación de las teliosporas con la formación del promicelio y las cuatro basidiosporas. Éstas se desprenden y se multiplican en la forma de levadura. A continuación se representa la conjugación de dos esporidias sexualmente compatibles para formar el dicarion que invade la planta y se multiplica en forma micelial, dando lugar a los tumores donde se forman las teliosporas. Éstas germinan fuera de la planta para reiniciar el ciclo. Se indican los tres estadios del hongo: haploide, dicariótico y diploide, el sitio donde proliferan, y la secuencia de eventos por los cuales avanza el ciclo de vida del hongo (tomada de Agrios, 1991).

## 2.6 Apareamiento y patogénesis

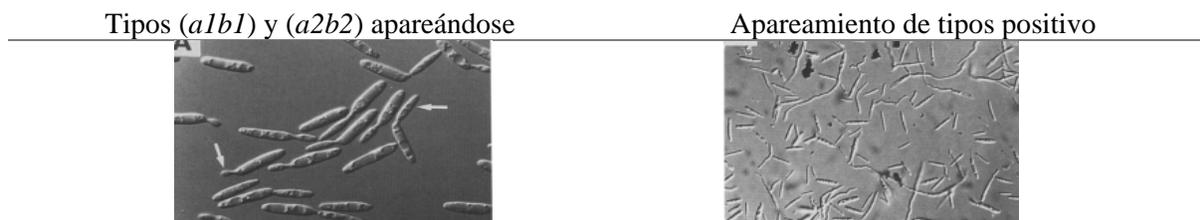
La complementación sexual en *U. maydis* es quizá el evento que más atención ha recibido debido a que solamente las células dicarióticas son infectivas (Fig. 6). La fusión de células haploides y el desarrollo del dicarion son controlados por dos loci independientes denominados *a* y *b*. Mientras que el locus *a* controla el reconocimiento y la fusión celular, el locus *b* es el responsable de la patogenicidad; ambos loci son requeridos para el mantenimiento de la fase micelial (Banuett y Herskowitz, 1989; Bölker *et al.*, 1995). Sólo dos células haploides con diferentes loci *a* y *b* se conjugan sexualmente y originan la fase patógena del hongo (Ruiz-Herrera y Martínez-Espinoza, 1998).



**Figura 6.** Ciclo de vida de *Ustilago maydis*. El ciclo inicia con el reconocimiento de las basidiosporas haploides sexualmente compatibles (a), para formar el filamento dicariótico infeccioso (b), el cual infecta a la planta a través del apresorio (c). La penetración y proliferación del filamento conduce a la formación de tumores (d), que contienen teliosporas diploides (e), que al romperse el tumor son liberadas para generar esporas haploides nuevas (f), y reiniciar el ciclo (Modificado de Fuchs *et al.*, 2006).

El loci *a* tiene dos alelos *a1* y *a2*, que contienen los genes que codifican al péptido precursor de una feromona (*mfa1* y *mfa2*) y al receptor de la misma (*pra1* y *pra2*) (Urban *et al.*, 1996). El hecho de que las células presenten loci *a* diferentes es para que éstas pueden formar tubos de conjugación y fusionarse (Spellig *et al.*, 1994). El número de alelos *b* en la naturaleza ha sido calculado en más de 25. Este locus controla el crecimiento filamentososo y la patogenicidad independientemente del locus *a* y codifica para dos proteínas (*bE* y *bW*) que contienen un homeodominio (Kronstad y Leong, 1990). Se ha demostrado que los productos de los genes *bE* y *bW* de diferentes alelos pueden formar heterodímeros mediante la interacción de sus regiones variables para producir dos diferentes heterodímeros, *bE1/bW2* y *bE2/bW1*, etc., mientras que los que provienen del mismo alelo son incapaces de interactuar (Kämper *et al.*, 1995). Estas proteínas son factores de transcripción que encienden los genes requeridos para la patogenicidad. Se ha observado que cepas haploides que producen el heterodímero activo *bE/bW2*, son capaces de formar tumor en el maíz, a pesar de que *in vitro* crecen en forma de

levadura, demostrando que el heterodímero codificado por *b* es suficiente para la patogenicidad (Fig. 7) (Bölker *et al.*, 1995). Se han identificado genes cuya expresión es *b*-dependiente, aunque ninguno ha mostrado ser esencial en la patogenicidad. Además en pocos de estos genes se han detectado sitios de unión para el heterodímero bE/bW2, lo que sugiere que este factor desencadena una cascada transcripcional (Brachmann *et al.*, 2001).



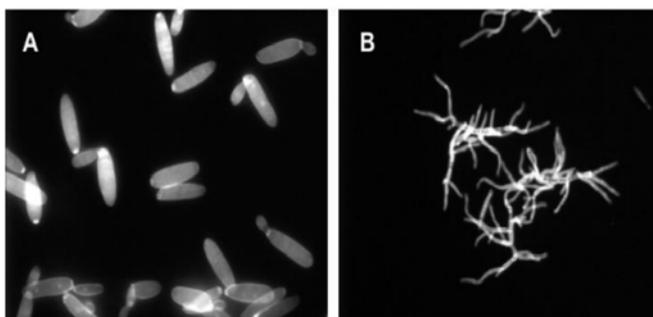
**Figura 7.** Células dicarióticas infectivas (tomada de Banuett y Herskowitz, 1994).

## 2.7 Factores ambientales que favorecen a *Ustilago maydis*

Existen diversos factores ambientales que favorecen el desarrollo del hongo *U. maydis*, como temperatura, humedad relativa, material genético. Se cree que el contacto del hongo con la superficie de la planta estimula muchos de los procesos que se llevan a cabo dentro del maíz para el desarrollo del hongo y por lo tanto, la formación del huitlacoche (Banuett y Herskowitz, 1996; Durrenberger *et al.*, 1998). Por otro lado, el crecimiento de los hongos se ve afectado por una gran variedad de factores físicos, químicos, biológicos y ambientales; por lo que entender la respuesta de las diferentes especies a estos factores es primordial para diseñar tecnologías apropiadas para la producción. Los agricultores especialmente en México, han identificado los factores que estimulan la infección de *U. maydis* en el maíz; sin embargo, científicamente no está muy claro. Se sabe que la humedad es necesaria para la germinación de las esporas, lo mismo que para el crecimiento del tubo germinativo antes de que el hongo invada la planta de maíz (Christensen, 1963; Valverde, 1992). También es conocido que las temperaturas relativamente altas son favorables, la mayoría de los investigadores coinciden en que el hongo se desarrolla muy bien entre 25-30 °C (Valverde, 1992). El desarrollo de la planta es de vital importancia en el crecimiento del hongo, plantas más vigorosas y succulentas presentan más agallas y éstas son mucho más grandes. Los tratamientos que estimulan la producción y el vigor, como altas dosis de nitrógeno y materia orgánica, también incrementan la enfermedad significativamente (Guevara Lara *et al.*, 2000). Por otro lado, la respuesta del maíz al ataque de *U. maydis* está condicionada por la variabilidad del hongo y de la planta; así

como por los mecanismos de infección y el medio ambiente. Las variedades de maíz difieren en su susceptibilidad a este hongo, se sabe que el maíz dulce tiene un alto grado de sensibilidad (Christensen, 1963; Valverde, 1992; Vanegas, 1995; Pan *et al.*, 2008). La resistencia de algunas variedades de maíz parece que está asociada a caracteres morfológicos, funcionales y fisiológicos de las plantas (Valverde, 1992; Vanegas, 1995, Guevara Lara *et al.*, 2000). Otro factor importante es la técnica de inoculación para su producción ya que de no hacerlo bien el inóculo no infecta apropiadamente a la planta.

Además de la respuesta a la feromona existen varias condiciones ambientales que promueven la transición de levadura a micelio, como son la carencia de nitrógeno, la exposición al aire (Gold *et al.*, 1994), la presencia de lípidos en el medio de cultivo (Klose *et al.*, 2004) y cambios de pH (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995; Martínez-Espinoza *et al.*, 2004), los cuales son dependientes de la vía de señalización dependiente de cAMP y de la de las MAP cinasas. Esto hace pensar que una vez que el hongo percibe las señales ambientales se encienden mecanismos que facilitan la penetración e invasión del hospedero a esto se le llama dimorfismo (Fig. 8).



**Figura 8.** Dimorfismo *in vitro* de *Ustilago maydis*. A. Levaduras crecidas en un medio de pH 7 (1000X). B. Micelio desarrollado en un medio de pH 3 (400X) (tomada de Ruiz *et al.*, 2008).

## 2.8 Variabilidad genética

La variabilidad genética se refiere a la variación en el material genético dentro y entre poblaciones de organismos. La variación surge por recombinación y mutación del hereditario, es un requisito necesario para que la especie evolucione y se adapte a nuevas condiciones (Jiménez y Collada, 2000).

*U. maydis*, tiene gran cantidad de líneas o biotipos con diferentes características fisiológicas y patogénicas, las cuales se pueden considerar razas fisiológicas (Valverde, 1998). Su

característica de ser predominantemente heterotálico provoca que surjan nuevos biotipos por hibridación en cada nueva generación sexual, debido a que las teliosporas son diploides y cuando ocurre la meiosis se originan nuevos recombinantes. También pueden aparecer nuevos biotipos por mutación. Por otro lado, de una sola agalla es posible aislar una vasta gama de líneas haploides que diferencian en su patogenicidad. Una sola hectárea (Ha) de maíz puede contener miles de agallas y las teliosporas serían incontables. Las infecciones de campo son el resultado de dicariones de diversas constituciones genéticas, ya que el viento dispersa las esporas a grandes distancias; sin embargo, es importante distinguir entre la variabilidad fenotípica y diferencias genéticas verdaderas. Se ha demostrado que el índice de crecimiento, color, producción esporidial de colonias y otros caracteres en los medios de cultivo pueden ser modificados por fluctuaciones ambientales como temperatura, nutrimentos, vitaminas, sustancias de crecimiento, agentes químicos, y presencia de colorantes, entre otros (Valverde, 1998; Valdez-Morales, 2010).

## **2.9 Reguladores de crecimiento**

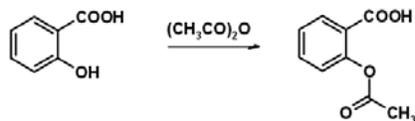
Los “reguladores de crecimiento de las plantas (PGRs)” (llamados también fitorreguladores), son sustancias que en muy pequeña cantidad afectan el desarrollo de las plantas. Los principales reguladores del crecimiento en plantas son las fitohormonas u hormonas vegetales. Las fitohormonas se producen en las células de la planta, sin formar glándulas y se definen como compuestos orgánicos que se sintetizan en una parte de la planta, y se trasladan a otro sitio donde ejercen su acción fisiológica en muy bajas concentraciones, entre  $10^{-9}$  M a  $10^{-6}$  M, muy por debajo de la concentración de otros compuestos como nutrientes y vitaminas. Las fitohormonas se caracterizan por participar en variadas respuestas morfogénicas y de crecimiento de manera pleotrópica, esto quiere decir, que una misma hormona participa en diferentes procesos y además, dependiendo de su concentración, la misma hormona puede ser estimuladora o inhibitoria de una misma respuesta. Cada respuesta ocurre en un tiempo determinado en el desarrollo de la planta y se presenta solamente en un tejido específico u órgano. Las fitohormonas u hormonas vegetales son pequeñas moléculas químicas que afectan al desarrollo y crecimiento de los vegetales a muy bajas concentraciones. En las plantas sólo 5 tipos de sustancias se reconocen oficialmente como hormonas vegetales: Auxinas, Citoquininas, Giberelinas, Ácido Abscísico, y Etileno (Jordan y Casaretto, 2006), todas son moléculas que se encuentran en un rango de peso molecular entre 28 Da (etileno) y 346 Da

(giberelinas). Todas son activas entre  $10^{-6}$  y  $10^{-8}$  M. Otras sustancias que eventualmente pueden clasificarse como fitohormonas son los brasinosteroides, el ácido salicílico, los jasmonatos, la sistemina, las poliaminas, el óxido nítrico (NO), y los péptidos. Una fitohormona es un compuesto orgánico sintetizado en una parte de la planta y que es o no translocada a otra parte donde, a muy bajas concentraciones, produce una respuesta fisiológica. Las hormonas vegetales pueden actuar de dos maneras. En la primera la hormona atraviesa la membrana celular de la célula diana y alcanza el citoplasma. Allí se une a una molécula adecuada (receptor) y forma un complejo hormona-receptor (Jordan y Casaretto, 2006). La segunda hormona se une a un receptor de membrana en la célula diana. La unión hormona-receptor produce en este último un cambio conformacional que conduce a una cascada interna de reacciones citoplásmicas que pueden producir efectos muy variados, nuevas actividades enzimáticas, modificación de procesos metabólicos, inducción de síntesis de ARNm, etc.

### **2.10 Ácido acetil salicílico (AAS)**

El término salicilato se ha utilizado para la descripción de un grupo de compuestos químicos que presenta el radical 2-hidroxibenzoico. Dentro de estos compuestos se encuentra el salicilato de sodio, el éster y metilo del ácido salicílico, así como el ácido acetilsalicílico, los cuales son de gran utilidad química (López *et al.*, 1998).

El ácido salicílico (AS) es muy conocido gracias al extenso uso clínico de la aspirina, ácido acetil salicílico (AAS). El nombre de AS proviene de *Salix*, árbol cuyas hojas y corteza, tradicionalmente se utilizaban como cura para el dolor y la fiebre, de donde Johann Bochner en 1828 aisló la salicilina. En 1874, se inició la producción comercial de AS en Alemania, mientras que el nombre comercial de Aspirina, aplicado al AAS fue introducido en 1898 por la Bayer Company (Gutiérrez-Coronado *et al.*, 1998). El AS es una sustancia encontrada en todos los tejidos vegetales (Raskin, 1992). Su concentración se eleva cuando las células, órganos o planta completa son sometidos a la acción de algún tipo de estrés, sea este biótico o abiótico, además es un inductor de resistencia sistémica adquirida (Malamy *et al.*, 1992; Gaffney *et al.*, 1993; Métraux *et al.*, 1990). El ácido acetilsalicílico (AAS) se sintetiza a partir de ácido salicílico y anhídrido acético en presencia de ácido, según la reacción indicada (Fig. 9).



**Figura 9.** Esquema de reacción del ácido salicílico.

Una vez sintetizado el ácido acetilsalicílico es necesario cristalizarlo para eliminar las impurezas que contiene. Este proceso debe realizarse una o más veces hasta lograr el producto puro. El ácido acetilsalicílico se comercializa con el nombre de Aspirina por la casa Bayer, siendo uno de los medicamentos más consumidos en el mundo. Fue sintetizado a finales del siglo pasado por el químico alemán Félix Hofmann. Actúa como antipirético y fundamentalmente como analgésico. Como antipirético ejerce su efecto a dos niveles: aumenta la disipación térmica mediante vasodilatación (acción poco significativa) y actúa sobre el termostato hipotalámico, que es el centro regulador de la temperatura del organismo. Su vía de administración es oral, ya que se absorbe bien por el tracto gastrointestinal.

### **2.11 El cultivo del maíz en México**

En México, el maíz es uno de los cultivos más importantes desde el punto de vista alimenticio, político, industrial y social. Este cultivo consta de diversas etapas que van desde las labores de preparación del suelo, siembra, crecimiento y desarrollo (fase vegetativa, fase reproductiva y llenado de grano), por último para la cosecha de elotes, forraje, ensilaje o para grano, los cuales se llevan a cabo en diferentes etapas del desarrollo de la planta. En México se realizan dos ciclos productivos: primavera-verano y otoño-invierno considerando las diferentes condiciones agroclimáticas, y si el cultivo es de temporal o de riego. El ciclo productivo del maíz se inicia con la siembra de este, actividad que comprende los meses de octubre a marzo, dando inicio así al ciclo Otoño-Invierno, en tanto que su cosecha abarca los meses que van de diciembre a septiembre del siguiente año. La fase de alta producción se realiza en los meses de mayo y junio, cuando se obtiene aproximadamente, el 78% del total de producción nacional del ciclo. Mientras que la siembra correspondiente al ciclo Primavera-Verano empieza en el mes de abril y finaliza septiembre. La cosecha de este ciclo comprende diez meses, de junio a marzo, es en los meses de noviembre y diciembre cuando se obtiene la mayor parte de la producción, representando esta el 73% del total nacional producido durante este ciclo (Cuadro 2). La producción está caracterizada por una amplia gama de variedades, de las que se obtienen: tortillas, forraje para animales, almidones, glucosa, fructosa, dextrosa, aceites,

botanas, etanol para bebidas o como insumo en la producción de biocombustible, etc. Sin embargo, las dos variedades más importantes son el maíz blanco y el amarillo o forrajero. El maíz blanco es producido exclusivamente para el consumo humano, ya que cuenta con un alto nivel nutricional, y el maíz amarillo se destina al procesamiento industrial y a la alimentación animal (Galarza-Mercado, 2012).

**Cuadro 2.** Calendario agrícola para el cultivo del maíz.

← Año					← Año →										Año →													
Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May							
		Año Agrícola																										
		Siembra Otoño-Invierno																										
			Cosechas Otoño-Invierno																									
							Siembras Primavera-Verano																					
										Cosecha Primavera-Verano																		
		Cierre definitivo																										

El maíz es la forma domesticada de una subespecie de teocintle (*Zea mays* spp. *parviglumis*), un pasto silvestre que existe de manera natural en regiones aisladas entre los 400-1700 msnm de la Sierra Madre Occidental (Michoacán y Jalisco). Es una planta alta, de ciclo biológico anual y crecimiento determinado. Sus hojas ubicadas una frente a otra, son largas y angostas, insertándose de modo alterno a lo largo de un tallo sólido. Además de su tamaño, otra característica distintiva de esta gramínea consiste en la separación de los sexos en distintas estructuras florales. A diferencia de otros pastos, los cuales producen flores perfectas (bisexuales), el maíz produce inflorescencias masculinas (espigas) las cuales coronan a la planta en el ápice del tallo, e inflorescencias femeninas (mazorcas), las cuales se ubican en el ápice de los primordios de las ramas laterales que emergen de las axilas foliares. La inflorescencia masculina (estaminada), una panícula dispersa, produce pares de espiguillas separadas, cada una de las cuales encierra una flor fértil y otra estéril. La inflorescencia femenina (pistilada), es una espiga que produce pares de espiguillas sobre la superficie de un raquis altamente condensado (eje central u olote). Cada una de las espiguillas femeninas encierra dos flósculos fértiles, uno de cuyos ovarios madurará para dar origen al fruto del maíz una vez que haya sido sexualmente fertilizado por el polen con la ayuda de una corriente de viento (Salvador-Ricardo, 2001).

### **III. MARCO DE REFERENCIA**

#### **3.1 Producción comercial de huitlacoche en México**

Desde la Colonia hasta el siglo XIX, el huitlacoche fue alimento de subsistencia para indígenas y campesinos; comienza a tener autonomía cultural en el siglo XX, momento en que se convierte en alimento de la élite mexicana (El huitlacoche, un “invento” mexicano reciente, 2011). En México, este hongo es considerado una herencia culinaria desde épocas prehispánicas. Para los antiguos agricultores, cuando lo veían en sus milpas, era como una maldición, pero cuando se arriesgaron a comerlo, se dieron cuenta de que era un verdadero manjar, y esa maldición se convirtió en bendición. Su sabor ha sido descrito como "delicado y ligeramente ahumado, con una textura deliciosa" y es un ingrediente sofisticado y de gran aceptación. 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 otras latitudes. Este hongo se genera en las mazorcas de maíz y se ha clasificado como plaga, alimento y principio activo en remedios caseros; en la investigación se han recuperado las propiedades de este hongo, para la socialización crítica de sus bondades, como la inclusión de éste en la dieta de los mexicanos y algunos otros usos. Así mismo es un producto que se ha conocido desde tiempos prehispánicos; el problema actual es que con la implementación de maíces resistentes a este hongo se ha ido perdiendo poco a poco su producción, una producción de 400 a 500 toneladas anuales promedio, principalmente en el periodo de lluvia (Juárez-Montiel *et al.*, 2011).

El consumo de huitlacoche en México se ha extendido a través de diferentes regiones del país. Existe información de que las agallas de huitlacoche son consumidas en una gran variedad de presentaciones, principalmente en estados del centro y algunos del sur de México, tanto por la población urbana en una amplia variedad de platillos tradicionales y de la alta cocina, como por diferentes grupos campesinos e indígenas del país en los estados de Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Puebla, Tlaxcala, Veracruz y Yucatán, donde tiene diversos usos no sólo como alimento, sino también en la medicina tradicional y con usos cosméticos (Valadez Azua *et al.*, 2011). Sí bien en la época de lluvias el huitlacoche se obtiene por recolección de plantas infectadas naturalmente en los cultivos de maíz para su venta en fresco en mercados y tianguis, en la actualidad el hongo se cultiva de manera controlada en la zona central de México con una tasa de crecimiento importante (Castañeda de León *et al.*, 2016).

En el período 2009-2010, la empresa “Los Aztecas” procesó alrededor de 1 ton/semana de huitlacoche fresco, el cual alcanzó un precio al consumidor de MN \$100.00 pesos/kg en tiendas de autoservicio (Castañeda de León y Leal-Lara, 2012). En la Central de Abastos de la Ciudad de México llegan un promedio de 1.5 a 2 ton/semana de huitlacoche fresco durante todo el año, provenientes principalmente de los estados de Hidalgo, México, Morelos y Puebla. El volumen se incrementa considerablemente a 3.5 ton/día durante la época de lluvias. Adicionalmente, en algunas ciudades de los E.U.A. con importante presencia de mexicanos, existe una fuerte demanda de huitlacoche fresco, el cual se llega a vender hasta en USD \$40.00 dólares/kg (Pataky y Chandler, 2003). En la década de 1980, se estimaba que alrededor de 400 a 500 ton por año de huitlacoche eran vendidas en fresco en los mercados durante la época de lluvias y que la compañía Herdez, S. A., procesaba alrededor de 100 ton anuales de este hongo para enlatarlo (Kealey y Kosikowski, 1981; Arnold, 1992). En el 2012, la producción de huitlacoche alcanzó aproximadamente las 1,000 ton/año, incluyendo tanto el cultivado como aquel que se produce de forma silvestre, del cual se enlata alrededor de un 40% (Castañeda de León y Leal Lara, 2012). Actualmente, cabe mencionar que el cultivo de huitlacoche ha logrado un desarrollo biotecnológico importante y en los últimos años su producción controlada y consumo siguen en aumento, inclusive se ha posicionado rápidamente en el tercer lugar dentro de hongos comestibles cultivados en nuestro país, después de los champiñones (*Agaricus spp.*) y las “setas” (*Pleurotus ostreatus/pulmonarius*) cuyos niveles de producción son de alrededor de 59,000 ton y 3,000 ton anuales, respectivamente (Martínez-Carrera *et al.*, 2012). Asimismo, el huitlacoche ha desplazado en producción a otros hongos cultivados considerados como “exóticos”, tales como el *shiitake* (*Lentinula*) y el *reishi* (*Ganoderma*). Todo lo anterior coloca a este hongo comestible como un producto fúngico interesante, con un amplio potencial de mercado no únicamente para su comercialización y consumo nacional, sino también para su exportación (Castañeda de León y Leal Lara, 2012).

### **3.2 Producción de huitlacoche en invernadero**

El huitlacoche es un platillo exótico de la alta cocina nacional e internacional, conocido como “caviar azteca” o “trufa mexicana”, que muestra una demanda creciente en los mercados nacional e internacional, los cuales no pueden abastecerse con la forma tradicional de recolección, por ello la mirada de los expertos está puesta en la producción bajo invernadero. El huitlacoche (*Ustilago maydis*) es un hongo comestible que se consume principalmente en la

región de los Valles Altos de México. Valverde y Paredes López (1993), determinaron que contiene proteína de alta calidad y de bajo riesgo para el consumo humano. El hongo se obtiene de plantas susceptibles y se desarrolla en la mazorca, hojas, tallo y en raíces aéreas (Agrios, 2005). En ensayos experimentales y comerciales a cielo abierto, los mejores rendimientos se obtienen cuando se inocula la mazorca en etapa de jilote, alcanzándose hasta 12 t·Ha<sup>-1</sup> de hongo fresco (Martínez-Martínez *et al.*, 2000). La producción artificial de huitlacoche requiere que la variedad de maíz (hospedero) sea susceptible al hongo, que la cepa del patógeno sea virulenta y que el ambiente sea favorable, con un 80-85 % de humedad relativa y una temperatura de 16-32 °C (Villanueva *et al.*, 1999; Martínez-Martínez *et al.*, 2000). La evaluación de genotipos de maíz para fines de producción de huitlacoche, permite conocer su nivel de susceptibilidad genética (Pan *et al.*, 2008). En condiciones ambientales que favorecen el desarrollo del hongo es posible incrementar el rendimiento y la calidad del huitlacoche.

Villanueva *et al.* (1999), encontraron que existe variación patogénica del hongo; dado que la infección y desarrollo del mismo está en función de la habilidad del patógeno, la susceptibilidad del hospedante y su interacción con el ambiente (Christensen, 1963). Estos mismos autores evaluaron la técnica de inoculación, la cual constituye un factor importante para favorecer el desarrollo del hongo en el interior del jilote. Así mismo, para que se presente la infección ideal, debe inocularse en etapa de jilote en donde la producción de grano de maíz es el sustrato alimenticio para el desarrollo del hongo y así producir agallas de mejor tamaño por disponer de una alta concentración de carbohidratos (Pataky y Chandler, 2003). En algunos años se obtienen precipitaciones espaciadas, las cuales pueden coincidir con el periodo de infección y desarrollo del hongo, lo que afecta negativamente la producción del hongo (Villanueva *et al.*, 2007).

Desde hace mucho tiempo se sabe que las condiciones ambientales son muy importantes para la producción del huitlacoche (Tisdale y Johnston, 1926); y la mayoría de las investigaciones coinciden con mantener el lugar de estudio con un ambiente bajo control (Thakur *et al.*, 1989). Una buena alternativa para obtener consistentemente las condiciones ambientales favorables para producir huitlacoche, es cultivar el maíz bajo condiciones controladas de humedad relativa y temperatura; lo cual es posible en un invernadero equipado para controlar dichos factores. Son muy pocos los estudios reportados de cultivo de huitlacoche en invernadero de

los cuales se puede mencionar una investigación donde se realizaron dos experimentos en dos años consecutivos (2005 y 2006) con el objetivo de identificar híbridos comerciales adecuados y densidades apropiadas de población de plantas para maximizar la producción artificial de huitlacoche–hidropónico en invernadero. En los dos ensayos el híbrido 30G40 fue estadísticamente superior (1,649.2 kg·ha<sup>-1</sup> a 62,500 plantas y 7,923.30 kg·ha<sup>-1</sup> a 166,666 plantas·ha<sup>-1</sup>), lo que fue explicado por mayores porcentajes de incidencia (52.41 y 23.67%) e índice de severidad (52.48 y 47.21 %), respectivamente. El híbrido 30G40 aumentó 134% el rendimiento de huitlacoche al pasar de baja densidad de población (62,500 plantas·ha<sup>-1</sup>) a alta (166,666 plantas·ha<sup>-1</sup>). El incremento de la densidad de plantas aumentó notablemente el rendimiento unitario de huitlacoche en los híbridos 30G40 y H-58; y la disminuyó en el H-161 y el Cóndor. El índice de severidad (porcentaje de la mazorca cubierta con agallas) fue similar en las híbridos 30G40, H-161 y Cóndor, en las dos densidades de población ensayadas (62,500 y 166,666 plantas·ha<sup>-1</sup>); no así el porcentaje de incidencia que aumentó significativamente en 30G40 en alta densidad y disminuyó en H-161 y Cóndor (Madrigal-Rodríguez *et al.*, 2010).

### **3.3 Producción de inóculo de huitlacoche**

Los agricultores han tratado de producir huitlacoche desde décadas atrás y se han empleado varias estrategias para producir un inóculo efectivo. En un inicio se utilizaban las agallas (teliosporas) secas como inóculo para mezclar con las semillas de maíz antes de ser sembradas, pero este método no daba buenos resultados. Posteriormente, los agricultores dejaron grandes cantidades de esporas del hongo en el suelo antes de sembrar el campo con maíz, sin obtener resultados satisfactorios. También se trató de producir huitlacoche usando como inóculo esporas esparcidas sobre las plantas cuando el jilote estaba pequeño, este método si infectó, sin embargo, fue muy poca la producción como para utilizarlo a gran escala. Actualmente, la producción del inóculo se lleva a cabo en los laboratorios con métodos de identificación de cepas de *U. maydis* compatibles, para después ajustar el solvente a utilizar a una densidad de 10<sup>6</sup> esporidias·ml<sup>-1</sup>, previamente a la inoculación (Villanueva *et al.*, 2007). Se debe tomar en cuenta también que los agricultores deben ser asesorados por profesionales para aplicar técnicas de inoculación y producción para el desarrollo de la enfermedad en sus plantas. Estas incluyen detección y selección de variedades de maíz susceptibles, métodos de inoculación e inducción de la enfermedad, virulencia de cepas de *U. maydis* utilizada, fechas de siembra y cosecha, entre otros (Villanueva, 1997; Villanueva *et al.*, 2007). Se han

desarrollado de biotecnologías para probar la inducción exitosa de este hongo comestible a nivel de laboratorio. Cabrera- Ponce *et al.* (2012) formaron dicariones a nivel de laboratorio, y los probaron en tejido de maíz cultivado *in vitro*, demostraron que los dicariones fueron capaces de infectar, siendo un híbrido de referencia el que infectó cerca del 90% del material vegetal, seguido por la cruce de dos mutantes de *U. maydis*.

### **3.4 Uso de ácido acetilsalicílico para incrementar rendimiento**

El ácido salicílico (AS) es muy conocido gracias al extenso uso clínico de la aspirina o ácido acetilsalicílico. El AS pertenece a un grupo muy diverso de sustancias conocidas como fenólicas. En las plantas los compuestos fenólicos, relacionados con el llamado metabolismo secundario, están involucrados en gran cantidad de actividades de regulación en las plantas. En particular diferentes estudios muestran la importancia de AS en los procesos fisiológicos y de adaptación de las plantas.

Algunas especies de importancia económica como la cebada (*Hordeum* spp.), contienen hasta 1 µg/g de peso fresco (Hennig *et al.*, 1993; Raskin, 1992). El arroz es un caso exclusivo donde se puede encontrar en hojas hasta 37.19 µg/g de peso fresco (Raskin *et al.*, 1992). Partiendo de la observación inicial de que la aspirina aumenta la vida en florero de las flores cortadas, probablemente por un efecto combinado de inhibición en la biosíntesis de etileno y celulasa en los tejidos (Ferrarese *et al.*, 1996) y de acidificación del medio, se sabe que el AS presenta propiedades de retraso de la senescencia (Bourbouloux *et al.*, 1998), inductor de floración y tuberización así como de compuesto termogénico y alelopático, entre otras (Raskin *et al.*, 1992). Se conoce que aplicando el AS de forma exógena incrementa la biomasa de soja (*Glicine max* L., Merr.), el rendimiento de trigo (*Triticum* spp.) (López *et al.*, 1998) y hortalizas (Gutiérrez *et al.*, 1998). En pretratamiento con semillas de melón (*Citrullus vulgaris* Schrat) aumenta la germinación, incluso en medios afectados por la salinidad (Gutiérrez *et al.*, 1998). En cultivo de células de soja aumenta la concentración de sustancias antioxidantes brindándole mayor resistencia a la acción de herbicidas (Knörzera *et al.*, 1999). En el arroz ejerce un efecto estimulante sobre la germinación (González *et al.*, 2005). En cuanto a las aplicaciones de AS y AAS no se han encontrado diferencias significativas en tejidos vegetales y animales, se supone que el AAS es rápidamente transformado a AS según Gutiérrez *et al.*, (1998).

El panorama mostrado en esta revisión ilustra los grandes avances obtenidos en pocos años en relación con el papel del AS en las actividades fisiológicas y de adaptación de las plantas. Aunque visiblemente incompleto el cuerpo de conocimiento obtenido, es valioso si se piensa en la implementación de nuevas técnicas de manejo. Sin embargo, es necesario realizar investigaciones utilizando el AS en su uso en hongos de consumo humano y mayor cantidad de especies vegetales, ampliar el rango de patógenos estudiados e incrementar los estudios en zonas tropicales y subtropicales, ya que el grueso de la investigación procede de zonas templadas. Potencialmente puede desarrollarse una nueva tecnología que tome en cuenta la inducción o potenciación de los mecanismos de desarrollo en el reino fungi, utilizando compuestos ambientalmente inócuos, y ello requiere el esfuerzo combinado de investigadores.

### **3.5 El huitlacoche en la gastronomía**

El carbón común del maíz (*Zea mays*), se conoce en México como huitlacoche y se ha consumido tradicionalmente como alimento o condimento desde tiempos prehispánicos. Actualmente ha aumentado la demanda considerablemente, tanto en el ámbito nacional como internacional. Su delicada textura, ligero sabor ahumado con matices dulces y su delicioso sabor son las características principales del huitlacoche, ya que no se parece a ningún otro alimento conocido (Paredes y Valverde, 1999). Nutricionalmente, tiene un alto contenido de proteínas, minerales y antioxidantes. Por si fuera poco, contiene todos los aminoácidos necesarios para el organismo y tanta fibra como la avena. De acuerdo a los investigadores del Instituto Politécnico Nacional, puede ser considerado como alimento nutracéutico (palabra derivada de nutrición y farmacéutico que hace referencia a aquellos alimentos con beneficiosos a la salud humana). Dos recomendaciones para cocinar el huitlacoche: no utilices aceite de oliva, ya que su gusto fuerte podría opacar su tenue y delicado sabor y cocínalo poco, para conservar su textura y sus nutrientes (Huitlacoche, caviar azteca o trufa mexicana, 2013). Según Paredes-López y Valverde (1999), el huitlacoche contiene carbohidratos, proteínas, grasas, minerales y vitaminas que contribuyen a su sabor. Posee proteínas de muy buena calidad, la cual es superior a la de las proteínas del maíz y de otros vegetales. El contenido de carbohidratos y fibra es muy alto y contiene poca grasa, por lo que se le considera un alimento bajo en calorías (Cuadro 3). Asimismo, contiene gran cantidad de ácido linólico, el cual es esencial para la nutrición humana (Paredes *et al.*, 2000). Su popularidad como comida típica mexicana ha rebasado las fronteras de México (Paredes-López y Valverde, 1999). Este hongo

ha atraído la atención de los gourmets de los Estados Unidos, teniendo un gran potencial no solamente entre la población hispana, sino en muchos restaurantes, principalmente en la comida japonesa (Pataky y Chandler, 2003), también se ha extendido su consumo a países Europeos (Jiménez de León, 2008). En el mercado estadounidense al no existir traducción del nombre de huitlacoche, se le ha denominado de diferentes formas como “maizteca”, “maize mushroom”, “mexican truffle”, “caviar azteca”, entre otros (Pataky, 19991; Arnold, 1992, Pope y McCarter, 1992a). Su descripción como delicadeza culinaria ha sido el tema de periódicos y revistas como New York Magazine, Foods Arts, Science News, entre otras (Paredes-López y Valverde, 1999).

**Cuadro 3.** Composición del huitlacoche (Paredes y Valverde, 1999).

Componente	g/100 g de base seca
Proteínas	2.3-7.4
Grasas	1-2
Cenizas	1-4.2
Fibra	7.5-26.6
Carbohidratos	53-65

### 3.6 Métodos de inoculación artificial de huitlacoche

La gran aceptación del huitlacoche ha despertado el interés por llevar a cabo estudios para encontrar el mejor método de inoculación de este patógeno en su hospedero. A través del tiempo algunos investigadores han desarrollado diferentes métodos de inoculación para producir enfermedades, ésta práctica es necesaria principalmente para la evaluación de variedades de plantas susceptibles a cierta enfermedad y para utilizar los conocimientos obtenidos en los programas de fitomejoramiento. Los métodos de inoculación con *U. maydis* se han venido realizando desde 1766 cuando Tillet espolvoreó granos de maíz con teliosporas antes de la siembra, al observar que no se desarrolló el carbón concluyó que el carbón del maíz no era una enfermedad contagiosa sino que era causada por una cantidad excesiva de savia que se acumulaba en ciertas partes de la planta y luego producía dilatación excesiva del tejido celular, pero esta teoría fue desechada rápidamente. Posteriormente, se inocularon las semillas de maíz con teliosporas y los resultados también fueron negativos. Fue hasta 1895 cuando Brefel demostró la naturaleza infectiva de *U. maydis*, quien no pudo obtener infección por inoculación de semilla pero logró la infección mediante la aspersión a la planta de maíz con

una suspensión de esporidias producidas en caldo nutritivo; también se obtuvieron buenos resultados espolvoreando teliosporas secas sobre las plantas, pero tiempo después observó resultados pobres o negativos. En 1900 Arthur y Stuart inyectaron cultivos del carbón en plántulas de maíz mediante tubos de vidrio (Christensen, 1963). Después de algunas décadas Thakur *et al.*, (1989) probaron la inoculación de una suspensión de aislados compatibles de *U. maydis* mediante inyección en el nudo apical de 3 a 10 días antes de que saliera la espiga y llegaron a obtener 100% de plantas infectadas. Pataky (1991), probó la aspersión de una suspensión de esporidias sobre la unión de las hojas (entre sexto y octavo nudo), la inyección de una suspensión de esporidias en los entrenudos sexto a octavo, así como los misma técnicas pero dañando hojas y nudos con arena antes de asperjar las esporidias. El único método que incrementó la incidencia de la infección fue el de la inyección; sin embargo, las agallas se presentaron en tallo, hoja y espiga más que en mazorca. Se siguieron realizando ensayos de inoculación principalmente en maíz dulce, incluyendo la variación de combinaciones de cepas, resultando la inyección transversal de mazorcas por el canal de los estilos la más exitosa (Pope y Mc Carter, 1991; 1992). Pataky (1991), evaluaron diferentes métodos de inoculación en distintas etapas de desarrollo de la planta de maíz, los mejores resultados fueron de un 50% de incidencia cuando se inyectó el inóculo en una etapa en que los estilos habían emergido completamente.

Pope y McCarter (1992), reportaron que inyectando 3 mL de una suspensión de esporidias a través del canal de los estilos obtuvo un 97% de infección, con al menos el 60% de los granos de cada una de las mazorcas infectados. Pataky *et al.* (1995), también reportan la inyección de una suspensión de esporas por el canal de los estilos como el método más exitoso para llevar a cabo la producción de huitlacoche. Vanegas *et al.*, (1995), reportó igualmente que la inyección longitudinal a través del canal de los estilos, y sin causar daño mecánico previo a los tejidos, es adecuada para producir huitlacoche de manera masiva. Posteriormente, entre 1995 y 1999, se han realizado trabajos encaminados a estudiar factores ambientales y estrategias de producción como evitar la polinización con el fin de incrementar la severidad de la infección, evaluar el punto de madurez que deben tener los estilos en el momento de realizar la inoculación y se han probado distintos materiales de maíz híbrido (Valverde *et al.*, 1995; Vanegas *et al.*, 1995; duToit y Pataky, 1999a,b). Pataky y Chandler (2003), reportaron que

evitar la polinización de las plantas de maíz eliminando las espigas, incrementa notablemente la severidad de la infección por *U. maydis*.

Castañeda de León *et al.* (2008), implementaron el primer sistema de cultivo masivo de huitlacoche en México para la empresa Hongos de México, S.A., utilizando la inoculación a través del canal de los estigmas con cepas haploides compatibles, en diferentes variedades de maíz híbrido seleccionados para valles altos y medios. Valdez-Morales *et al.* (2009), infectaron 16 variedades de maíz con cepas de *U. maydis* por inyección en el canal de los estigmas, encontrando que la mejor calidad de huitlacoche se produce en variedades de maíz con mazorcas grandes y totalmente cubiertas por las hojas. Madrigal-Rodríguez *et al.* (2010), infectaron híbridos comerciales de maíz, a diferentes densidades de siembra en invernadero con nutrición hidropónica, con cepas de *U. maydis* aisladas de cada híbrido, logrando infectividades en promedio del 15% y sólo una máxima de 35%. Después de muchos años de experimentar con diferentes métodos y diferentes materiales de maíz se ha llegado a la conclusión de que la inoculación por el canal de los estilos con una longitud entre 5 y 10 cm, y cuando no han sido polinizados los granos de maíz es la mejor manera de obtener huitlacoche de buena calidad y a gran escala. Debe mencionarse que actualmente el huitlacoche es producido en algunas regiones de Estados Unidos, donde se vende congelado hasta en 40 dólares por kg principalmente a restaurantes (Tracy *et al.*, 2007). A pesar de todos estos esfuerzos, la producción de huitlacoche a gran escala resulta difícil de realizar, es urgente implementar programas de adaptación de la tecnología de producción que ha dado mejores resultados en campos experimentales, principalmente en regiones que tengan condiciones ambientales favorables para el desarrollo de huitlacoche (Valdez *et al.*, 2009).

### **3.7 Potencial de variedades de maíz en la producción de huitlacoche**

El huitlacoche (*Ustilago maydis* DC.), es una de las pocas especies de hongos comestibles que para su cultivo artificial requiere un hospedante vivo, que es el cultivo de maíz (Agrios, 2005). En México, desde épocas prehispánicas la cultura Azteca lo consideraba un ingrediente básico en la preparación de platillos (Ruiz-Herrera y Martínez-Espinoza, 1998).

La tecnología utilizada en México para la producción comercial de huitlacoche está basada en algunos híbridos comerciales para la producción de elote y grano, utilizando como inóculo formulaciones con esporidias de cepas purificadas de corta duración (Villanueva *et al.*, 2007). Esto último es el mayor problema técnico ya que existe la dependencia de un laboratorio con

excelentes características de asepsia de personal capacitado para una labor perseverante, continua y precisa en el laboratorio (Martínez-Martínez *et al.*, 2000). En el campo también se tienen problemas principalmente con esporidias que se aplican al jilote, ya que ese inóculo tiene una caducidad de cuatro días después de su elaboración (Villanueva *et al.*, 2007). La búsqueda de híbridos comerciales susceptibles al huitlacoche es una actividad permanente, debido a que periódicamente aparecen en el mercado nuevos materiales con características deseables para ser utilizados como cultivo hospedero (León-Ramírez *et al.*, 2004). Estas características pueden ir desde la altura de la mazorca, precocidad en días a cosecha y potencial de rendimiento de huitlacoche (Madrigal-Rodríguez *et al.*, 2010).

Muchos genotipos de maíz dulce han sido evaluados en experimentos para inducir agallas, habiéndose identificado variedades con una buena susceptibilidad a la infección que pueden ser adecuados para la producción de huitlacoche (Cuadro 4). Asimismo, pueden existir otros genotipos entre otras variedades de maíz híbrido que puedan presentar susceptibilidad a la infección por *U. maydis* (Pataky, 1991; Valverde *et al.*, 1993). Algunos factores en términos productivos, que deben ser considerados en la elección de una variedad de maíz para el cultivo controlado de huitlacoche son la incidencia de la infección, la severidad y el rendimiento de huitlacoche. El uso de variedades de maíz criollo para producir huitlacoche puede representar desventajas importantes, debido a su heterogeneidad genética y fenotípica que produce resultados inconsistentes y un alto coeficiente de variación en los experimentos, aunque podría haber excepciones. Los maíces híbridos son genéticamente más uniformes y se obtienen mejores resultados. Es importante implementar el uso de variedades locales, criollos adaptados y mejorados, así como aprovechar la experiencia de agricultores acerca de las líneas de maíz que presentan alta susceptibilidad a la infección natural a *U. maydis* en sus regiones (Castañeda de León *et al.*, 2016).

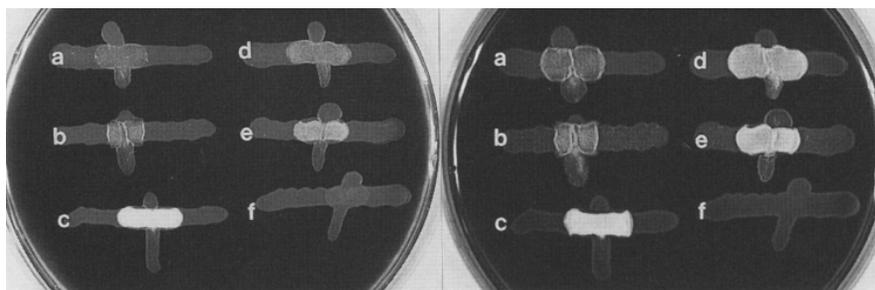
**Cuadro 4.** Variedades de maíz utilizadas en los estudios para la producción de huitlacoche (*Ustilago maydis*) [Modificado de Castañeda de León *et al.*, 2016].

Año	Variedad de Maíz	Sitio de Estudio (Ciudad, País)	Resultados	Autor
2008	21 híbridos diseñados para valles medios y altos: Pantera, Sb308, Matador, Milenio, As31, As720, As722, As820, As822, As900, As902, As905, As910, As948, As1501, Sb308, 7573, Cronos, Grano de Oro, Hoja de Plata, Matador, Milenio, Pantera, Tornado Elotero y Vulcano	Pilcaya, Guerrero, México	Los híbridos mostraron diferencias en parámetros fenológicos y comerciales, más no en severidad de la infección, en todos los casos fue mayor al 90%. Los pesos de las mazorcas fluctuaron entre 350-740 g, la aparición de espigas y jilotes fue entre los 67-116 días, y la maduración de las agallas entre 19-33 días. Las variedades As910, Matador y Milenio presentaron agallas más grandes y con buena protección de hojas; As720, As910 y Matador presentaron mejor protección de las hojas y mayores pesos de mazorcas. Los híbridos 7573, Tornado Elotero, As905 y As948, se proponen como los mejores para la producción de huitlacoche en valles medios.	Castañeda de León y Leal Lara
2009	16 genotipos de maíz criollo con floración intermedia: Cañada de Flores, Del Norte, Don Francisco, Loma de Cabras, Cruz del Palmar, Del Norte de Guanajuato, Del Tigre, La Biznaga, Las Cruces, San Juan Xido, La Palmilla, Pinalillo, La Cuadrilla, Corina de Michoacán, Corina Cajete y Corina 852	Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Irapuato, México	Encontraron diferencias significativas entre los maíces evaluados. Los porcentajes de incidencia variaron de 31-92% (promedio 72%), con grados de severidad que oscilaron entre 46-97%, con un valor promedio de 77%. El rendimiento, o peso de huitlacoche por mazorca varió considerablemente en las líneas de maíz (80-450 g), y proponen a la variedad de maíz Criollo de Loma de Cabras como el más adecuado para llevar a cabo la producción de huitlacoche a escala industrial.	Valdez-Morales <i>et al.</i>
2010	Primero incluyó a cuatro híbridos (H-58, 30G40, H-161, Cónдор) y después a los híbridos: Gavilán, H-48 y H135	Invernadero del Campo Agrícola Experimental Universidad Autónoma Chapingo, México	Infectaron híbridos comerciales de maíz, a diferentes densidades de siembra en invernadero con nutrición hidropónica, con cepas de <i>U. maydis</i> aisladas de cada híbrido. El mejor híbrido fue 30G40 con la máxima infectividad promedio de 35%, las otras variedades mostraron infectividades en promedio del 15%. Con todos los híbridos alrededor del 60% de las plantas no resultaron infectadas, índice de severidad de 0%. El rendimiento de huitlacoche fue mayor en 166,666 plantas ha <sup>-1</sup> de maíz (3,592 kg ha <sup>-1</sup> ) que en 62,500 plantas ha <sup>-1</sup> (960 kg ha <sup>-1</sup> ), aunque el rendimiento de hongo por planta inoculada fue igual de bajo en ambas densidades (0.02 kg planta <sup>-1</sup> ) con todos los híbridos.	Madrigal-Rodríguez <i>et al.</i>
2011	Híbrido 3114 (compañía Petrisco) Derivado de MO <sub>17</sub> , Derivado de K <sub>19</sub> , Tlaltizapan-8946, Po-Tzu-ChiaI8946, Srinagar 8848, SYN-late K3615/1 L7, BSSS C5, B línea derivada de [(A662×B73)(3)] 73	Estación experimento al de Karaj, Irán	En general, los componentes aditivos, de dominancia y de epistasis fueron importantes en la resistencia del maíz contra <i>U. maydis</i> . Los autores concluyeron que el análisis genético de la resistencia a <i>U. maydis</i> en el maíz con cruza de triple prueba de procedimiento de selección recurrente pueden ser eficaces en el mejoramiento de la resistencia del maíz a <i>U. maydis</i> , ya que explota a los componentes aditivos y no aditivos de variación genética para mejorar la resistencia del maíz.	Namayandeh <i>et al.</i>

2011	44 genotipos en 2008 y 30 líneas fueron seleccionados y cultivados en 2009	Estación experimental de Karaj y Esfahan, Irán	En este estudio, se determinó con base en la intensidad de la infección, el índice de infección (0-7). Entre las líneas examinadas en 2008, la línea 41 (KE 77004/1-1-1) se clasificó como susceptible y las líneas 28 y 42 (KE 77003/1-81) y (37A) como resistentes. También el híbrido, K SC 400 fue identificado como resistente. En una segunda prueba, la línea (29 (KE77004/1-1-1) se especifica como susceptible y los 27 (KE77005 / 4) y la 9 (KE77006 / 3 xK1263 / 1) como resistentes, respectivamente.	<i>Zamani et al.</i>
2013	Cinco híbridos Zp 707 × Un44052, Un 44052 × DK17, DK17 × HS, IK8 × Zp707, y IK8 × HS (producidos por el Departamento de Suelo y Agua de la Facultad de Agricultura y Forestal en 2010)	Campo experimental, Facultad de Agricultura y Forestal, Universidad de Duhok, Iraq	Un excelente desarrollo de huitlacoche se detectó utilizando la inyección del jilote. La mayor incidencia de agallas 44.5% se produjo en el híbrido de Zp707 × Un44052 en comparación con el 5.6% cuando se inyectó en la hoja en espiral, las heridas aumentaron la infección a más de 77.5 % en otros híbridos. Sin embargo, hasta un 74 % de los jilotes inyectados fueron infectados cuando los estigmas surgieron 5-10 cm, mientras que se observó un 13.34 % de agallas por inyección en vaina foliar. El híbrido más susceptible fue Un 44 052 × Dk17	<i>Hassan et al.</i>

### 3.8 Apareamiento sexual *in vitro* (fenotipo *fuz*) de *U. maydis*

La confirmación sexual del apareamiento *in vitro* del hongo se determina con el fenotipo *fuz*, propuesto por Banuett y Herskowitz (1988), y es la reacción que se origina después de inocular en cruz una suspensión celular (*alb1*) con otra suspensión celular (*a2b2*) de *U. maydis*, en una caja Petri con medio de cultivo adicionado con carbón activado al 1% para contrastar las colonias crecidas. La reacción es positiva cuando fenotípicamente (*fuz*<sup>+</sup>) se observa una colonia blanca con apariencia algodonosa, indicando que las células entrecruzadas presentan alelos *a* y *b* diferentes. Por el contrario, la reacción es negativa (*fuz*<sup>-</sup>) cuando fenotípicamente se observa una colonia cremosa y brillante que nos indica que las células entrecruzadas presentan alelos idénticos (Fig. 10).



**Figura 10.** Cruzas *in vitro* basadas en el fenotipo *fuz* para confirmar el entrecruzamiento en *Ustilago maydis* (tomado de Banuett y Herskowitz, 1988).

#### **IV. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

La producción controlada de *Ustilago maydis* en campo está en proceso de desarrollo, debido a las diferentes maneras en que se infecta la planta, da como resultado variaciones en la calidad y cantidad del producto. El desarrollo y uso de biotecnologías intermedias encaminadas a mejorar la producción controlada de huitlacoche, permitirá la implementación de estándares en los procesos productivos del cultivo. Castañeda de León *et al.* (2016) discutieron la importancia de establecer calendarios de siembra de maíz, fechas y técnicas de inoculación y cosecha, procesamiento del producto terminado, un competitivo programa de venta, así como un análisis de los factores ambientales para el adecuado desarrollo de las plantas de maíz, y del hongo *U. maydis*, en términos de sus características productivas (alta incidencia, severidad y rendimiento) y comerciales (tamaño y peso de agallas, protección de las hojas, sabor), además de un manejo integral de plagas (MIP). De esta manera, este cultivo debe de realizarse de manera conjunta con diversas áreas y personas involucradas. La principal actividad agrícola es la siembra y producción de maíz en grano, dado que hay variaciones en el rendimiento de este cultivo por las condiciones climáticas, ubicación geográfica y precio del maíz, por lo que la opción de cultivar huitlacoche es darle valor agregado al maíz. El cultivo de huitlacoche constituye una alternativa viable debido a que los precios que llega a alcanzar el hongo fresco fuera de temporada son superiores a los precios que alcanzan otros hongos comestibles, y su cultivo reditúa en mayores beneficios económicos que los obtenidos con la producción de maíz (Calderón-Fernández, 2010). Sin embargo, para lograr esta actividad productiva hace falta seleccionar recursos genéticos que cubran los estándares de calidad, tamaño y sabor de las cepas a cultivar. Las cepas cultivadas actualmente de *U. maydis* son de procedencia extranjera y se siembran de manera empírica. En México, no existe un programa de selección de recursos genéticos nativos de *U. maydis* utilizando genética clásica y molecular, y tampoco la forma de asegurar que los materiales genéticos formados tengan capacidad de infección. En esta investigación se estudió el efecto del ácido acetilsalicílico (AAS) sobre el crecimiento de cepas nativas y se seleccionaron recursos genéticos de *U. maydis* con base en la viabilidad de las esporidias y el vigor de las colonias. Esto permitirá establecer una estrategia de mejoramiento de genético *U. maydis* para su producción controlada.

## **V. HIPÓTESIS**

El ácido acetilsalicílico (AAS) promoverá el desarrollo *in vitro* de las colonias de *Ustilago maydis*, lo que permitirá la formación de híbridos a partir de diversos genotipos nativos y extranjeros.

## **VI. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo general**

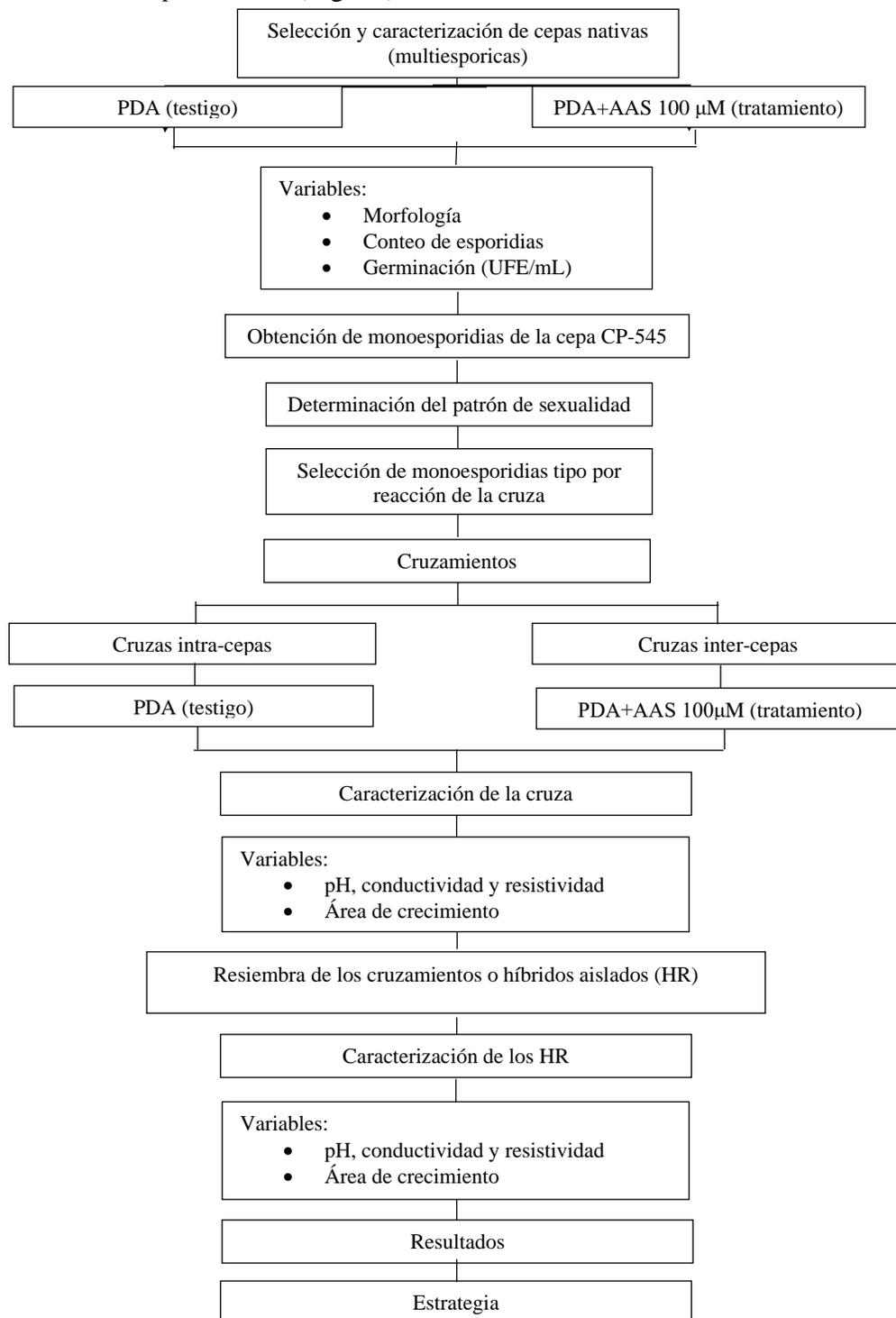
Seleccionar cepas de huitlacoche (*Ustilago maydis*) en condiciones de laboratorio utilizando el AAS como promotor del crecimiento de las colonias.

### **6.2 Objetivos específicos**

1. Caracterizar y seleccionar cepas de huitlacoche (*U. maydis*) a partir de los recursos genéticos nativos.
2. Desarrollar una propuesta de estrategia para el mejoramiento genético del huitlacoche (*U. maydis*) con base en los recursos genéticos nativos procedentes de diferentes regiones de México.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

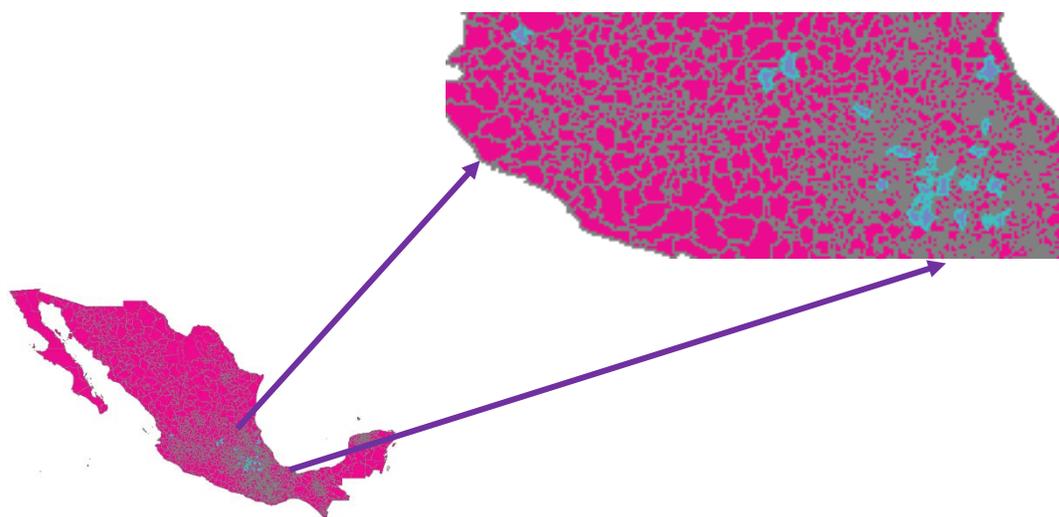
Diagrama general del trabajo realizado en la presente investigación el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, Medicinales y Funcionales, del Colegio de Postgraduados, *Campus Puebla* (Fig. 11).



**Figura 11.** Diagrama general del trabajo realizado.

## 7.1 Material biológico

Las cepas nativas de *Ustilago maydis* que se utilizaron para esta investigación provienen de una colección de 117 cepas registradas en el CREGENHC, Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla. Los especímenes de huitlacoche fueron recolectados en diferentes zonas geográficas de nueve estados del centro de México (Chiapas, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Morelos, Puebla, Querétaro, Tlaxcala y Veracruz). La localización de los municipios se llevó a cabo en el programa libre de Mapa Digital de México, INEGI, CONABIO (Fig. 12).



**Figura 12.** Mapa de la república mexicana por división municipal. Mapa digital, INEGI, CONABIO.

## 7.2 Selección de cepas a estudiar en base su caracterización fenotípica

La selección de las cepas para esta investigación se basó en la caracterización fenotípica (densidad, forma, textura, color) realizada a las 117 cepas registradas en el CREGENHC. En el Cuadro 5 podemos observar a las cuatro cepas seleccionadas en esta investigación.

**Cuadro 5.** Cepas de *Ustilago maydis* seleccionadas para esta investigación.

Registro	Procedencia	Variedad de maíz	Densidad	Textura
CP-774	Jomulcó, Nayarit	Jala	Abundante	Rugosa
CP-545	Huaquechula, Puebla	Maíz blanco	Abundante	Rugosa
CP-626	INIFAP, Bajío Celaya, Gto.	Azul, Rojo	Abundante	Rugosa
CP-585	Tihuatlán, Veracruz	Maíz blanco	Abundante	Rugosa

### 7.3 Cepas de referencia

Las cepas de *U. maydis* empleadas como referencia en la presente investigación fueron la CP-437 y CP-436, las cuales son dos cepas haploides estudiadas por Flora Banuett (California State University, Long Beach, CA, U.S.A). Estas cepas extranjeras al cruzarse forman un dicarion patogénico (fenotipo *fuz*<sup>+</sup>) para la planta de maíz, confirmando el hongo comestible conocido como huitlacoche. Las cepas se han mantenido en medio de cultivo PDA en refrigeración para su conservación (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Cepas de referencia o monoesporidias tipo del hongo *Ustilago maydis* utilizadas para confirmar los entrecruzamientos inter-cepas.

Registro	Procedencia	Densidad	Textura	Bio. Mol.
CP-436	E.U.A	Abundante	Rugosa	√
CP-437	E.U.A	Abundante	Lisa	√

### 7.4 Condiciones generales del experimento

En el experimento se utilizó como tratamiento una solución de ácido acetilsalicílico (AAS) 100 µM estéril y como testigo agua destilada estéril (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Condiciones del experimento, siembra y tratamientos para la cepas de *Ustilago maydis* (CP-545, CP-585, CP-626 y CP-774) seleccionadas.

<b>Soluciones para la realización de diluciones</b>		
	Tipo de inóculo	Condiciones de cultivo
Testigo	Sólido	Agua destilada estéril
Tratamiento	Sólido	AAS 100 µM estéril
<b>Medios para cultivar cepas</b>		
	Tipo de inóculo	Condiciones de cultivo
Testigo	Sólido	PDA estéril
Tratamiento	Sólido	PDA + AAS 100 µM estéril
<b>Medios para los entrecruzamientos</b>		
	Tipo de inóculo	Condiciones de cultivo
Testigo	Sólido	PDA + C.A 1% estéril
Tratamiento	Sólido	PDA + C.A 1% + AAS 100 µM estéril
<b>Medios para inóculos</b>		
	Tipo de medio	Condiciones de cultivo
	Líquido	EM 3% estéril
	Líquido	EM 3% + AAS 100 µM estéril

AAS= Ácido acetilsalicílico. C.A.= Carbón activado. PDA= Papa dextrosa agar.

### 7.5 Elaboración de medios de cultivo

La elaboración de los medios de cultivo se llevó a cabo en condiciones estériles y con material estéril con la finalidad de que los resultados obtenidos durante el experimento fueran

confiables. A continuación se menciona la preparación de cada uno de los medios y soluciones utilizadas.

#### **7.5.1 Testigos (PDA, PDA + C.A. 1%, solución agua)**

##### **Preparación de PDA**

Para su preparación se suspendieron 39 g del medio papa dextrosa agar deshidratado (Difco) por cada litro de agua destilada estéril, se llevó a ebullición por un minuto y esterilizó a 121°C durante 25 minutos. Posteriormente, el medio estéril se vació en cajas Petri y se dejó gelificar dentro de la campana de flujo laminar.

##### **Preparación de PDA con carbón activado al 1%**

Se pesaron 39 g del medio deshidratado (Difco) y 10 g de carbón activado (Hycel de México) por cada litro de agua destilada estéril, una vez mezcladas se llevó a ebullición por un minuto y esterilizó a 121°C durante 25 minutos. Posteriormente, el medio estéril se vació en cajas Petri y se dejó gelificar dentro de la campana de flujo laminar.

##### **Solución testigo (agua)**

La solución utilizada como testigo fue agua destilada estéril, la cual se esterilizó a 121°C durante 25 minutos en una botella de 1000 mL de capacidad, una vez estéril se dejó enfriar y almacenó en un lugar seguro para su uso.

#### **7.5.2 Tratamientos (PDA + AAS 100 $\mu$ M; PDA + C.A. 1% + AAS 100 $\mu$ M; solución de AAS 100 $\mu$ M)**

##### **Preparación de PDA con AAS 100 $\mu$ M**

Para su preparación se suspendieron 39 g del medio deshidratado y se disolvió en un litro de una solución de AAS 100  $\mu$ M, se llevó a ebullición por un minuto y esterilizó a 121°C durante 25 minutos. Posteriormente, se vació el medio de cultivo en cajas Petri y se dejó gelificar.

##### **Preparación de PDA con AAS 100 $\mu$ M y carbón activado al 1%**

Se suspendieron 39 g del medio deshidratado y 10 g de carbón activado (Hycel de México) en un litro de AAS 100  $\mu$ M, se llevó a ebullición por un minuto y esterilizó a 121°C durante 25 minutos. Posteriormente, se vació el medio de cultivo en cajas Petri y se dejó gelificar.

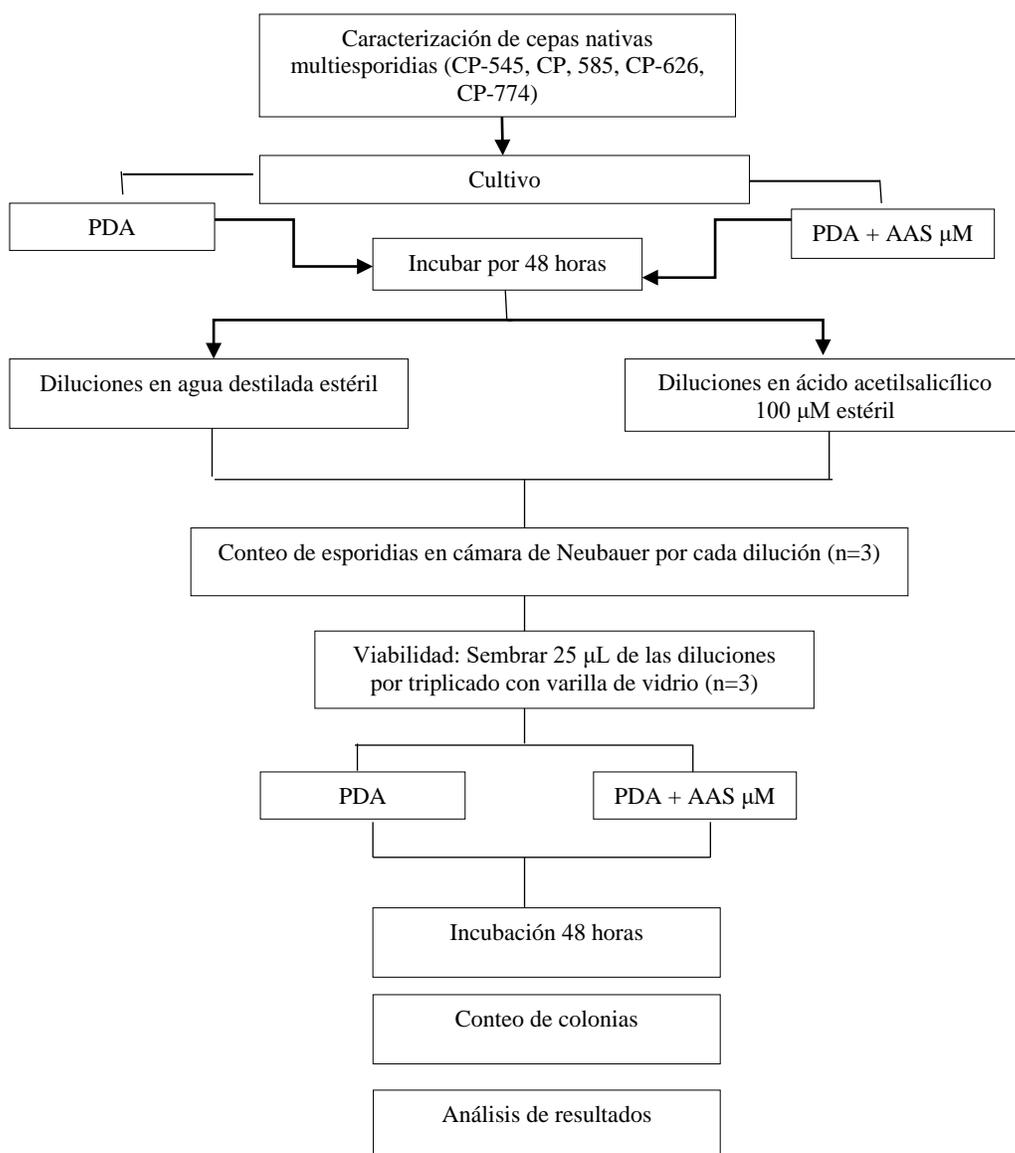
##### **Preparación de la solución de ácido acetilsalicílico 100 $\mu$ M**

Para la elaboración del ácido acetil salicílico (AAS) 100  $\mu$ M, se utilizó un vaso de precipitado con la cantidad requerida de agua destilada estéril, se pesó el ácido acetil salicílico correspondiente para a una concentración de 100  $\mu$ M. Para la homogenización del ácido acetil

salicílico se colocó en una parrilla eléctrica con agitación magnética, hasta que el ácido quedo totalmente homogenizado y diluido en el agua. Se esterilizó a 121°C durante 25 minutos, una vez estéril se dejó enfriar y almacenó para su uso.

### 7.6 Caracterización de cepas nativas y de referencia

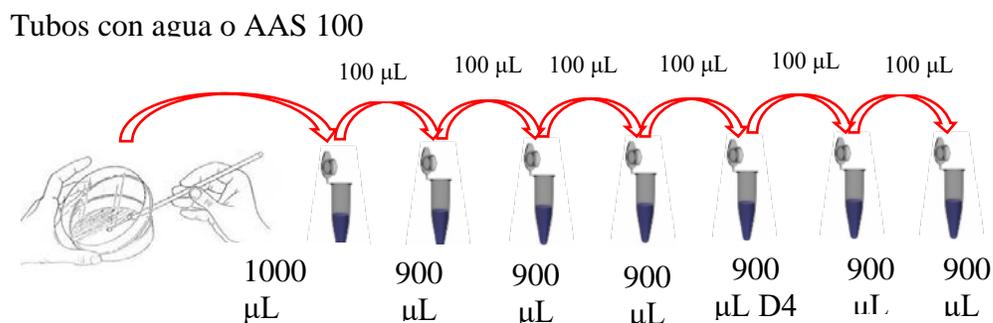
La cepas CP-545, CP-585, CP-626 y CP-774 de *U. maydis*, se reactivaron previamente en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) y en PDA + AAS 100  $\mu$ M. Se sembraron las cepas en ambas condiciones, sellaron con papel parafilm y se incubaron por 48 horas a temperatura ambiente (Fig. 13).



**Figura 13.** Estandarización del protocolo.

### 7.6.1 Conteo de esporidias en cámara de Neubauer

En esta etapa se llevaron a cabo una serie de diluciones en ambas condiciones para estandarizar un protocolo que facilite el aislamiento de monoesporidias de las (cepas CP-545, CP-585, CP-626 y CP-774). Para la preparación de las diluciones se realizó lo siguiente. En una campana de flujo laminar se tomó un tubo eppendorf estéril con capacidad de 1.5 mL y se colocó 1 mL de agua destilada estéril o AAS 100  $\mu\text{M}$ , según sea la condición experimental, con una asada cargada de la cepa cultivada previamente en una placa de Petri con PDA o PDA con AAS 100  $\mu\text{M}$  cuidando la correspondencia, se procedió a homogenizar en un vórtex (Heidolph, Germany) la solución, se rotuló el tubo con la clave DS (dilución semilla), una vez obtenida la dilución semilla se prepararon otros 6 tubos eppendorf estériles con 900  $\mu\text{L}$  de la solución correspondiente (agua o AAS 100  $\mu\text{M}$ ) y se rotularon con las claves D1, D2, D3, D4, D5 y D6. Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de la dilución inicial DS con una micropipeta (GILSON) y se transfirieron al primero de los tubos con 900  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril o AAS 100  $\mu\text{M}$ . Este primer tubo correspondió a la dilución D1 ( $10^{-1}$ ). Se mezcló perfectamente el tubo D1 con la ayuda del vórtex y con una punta nueva estéril se transfirieron nuevamente 100  $\mu\text{L}$  de la dilución a un segundo tubo con 900  $\mu\text{L}$  del solvente. El segundo tubo correspondió a la Dilución D2 ( $10^{-2}$ ). Se realizó esta operación repetidamente para obtener las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ . Este proceso se realizó para ambas condiciones (testigo y tratamiento) [Fig. 14].

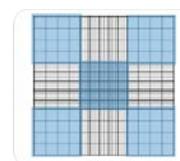


**Figura 14.** Diluciones para conteo de esporidias. El denominador de estas fracciones recibe el nombre de factor de dilución. Como forma de cálculo directo se puede considerar que si la dilución se realiza añadiendo 1/10 parte de la muestra en el volumen final del tubo, se obtiene un factor de dilución 10 veces inferior al inicial.

Posterior a las diluciones realizadas en ambas condiciones, se llevó a cabo el conteo de esporidias en cámara de Neubauer de las diluciones realizadas de cada cepa en agua y en AAS

100  $\mu\text{M}$ . Para la realización del conteo se colocó un cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer, y se colocó en posición horizontal dentro de la cámara de flujo laminar. Se tomaron 20  $\mu\text{L}$  con un micropipeta con una punta desechable estéril de la dilución a contar y se colocó en el borde del cubreobjetos, en el extremo de la cámara de Neubauer tratando de dejar que el líquido penetrara entre la cámara y el cubreobjetos del lado lateral, por capilaridad. Se colocó la cámara de Neubauer en la bandeja del microscopio (Zeiss) enfocando el microscopio a 40x. En seguida, se realizó el conteo de cinco cuadrantes de la cámara. El número de esporidias contenidas en cada cuadrante se registró. Este proceso se realizó por triplicado para cada dilución y según la condición del experimento de todas las cepas a analizar. Una vez que se tenía el número de esporidias por triplicado de cada dilución se capturaron los datos en una hoja de Excel con el fin de conocer la concentración de esporidias por mililitro de cada dilución, la fórmula utilizada la podemos ver en la Figura 15.

$$\text{Concentración (mL)} = \frac{\text{Total Células Contadas} \times 250.000}{\text{Número de Cuadrados}}$$



**Figura 15.** Fórmula para determinar concentración de monoesporidias por mililitro, en la imagen podemos observar los cuadrantes a contar por dilución.

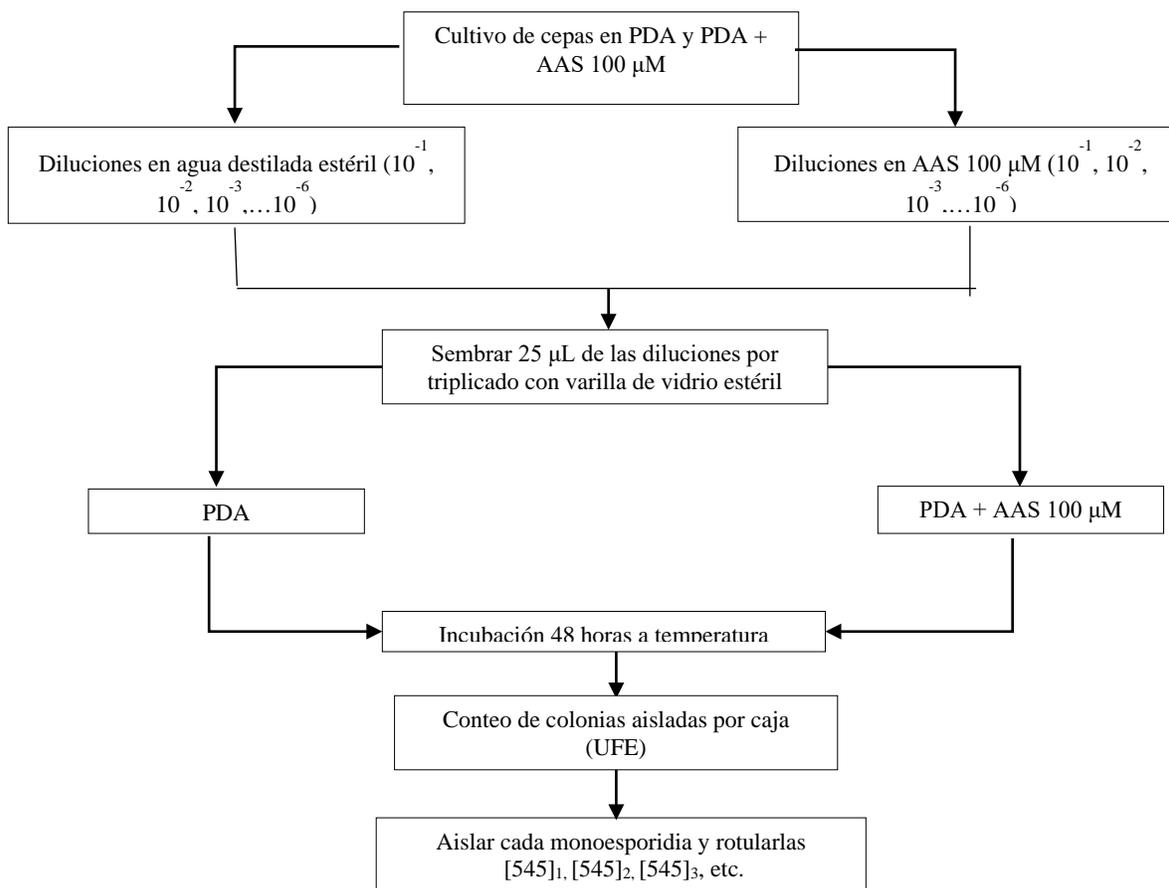
### 7.6.2 Viabilidad de esporidias

Una vez realizado el conteo y el cálculo de la concentración de esporidias se procedió a realizar la prueba para determinar la viabilidad de las esporidias. Para esto, se colocaron 25  $\mu\text{L}$  de cada una de las diluciones realizadas en agua destilada estéril sobre una caja de Petri con medio de cultivo PDA y otros 25  $\mu\text{L}$  de cada una de las diluciones realizadas en AAS 100  $\mu\text{M}$  sobre una caja de Petri de PDA + ASS 100  $\mu\text{M}$ . La siembra se realizó por triplicado por cada dilución. Se distribuyeron los 25  $\mu\text{L}$  de inóculo con una varilla de vidrio esterilizada en alcohol y quemada en la llama de un mechero Bunsen. Una vez que se realizó la siembra se procedió a rotular e incubar las placas por 48 horas a temperatura ambiente.

### 7.7 Aislamiento de monoesporidias de la CP-545

Para la obtención de monoesporidias se trabajó con la CP-545, a la cual se le realizaron una serie de diluciones en agua destilada estéril y AAS 100  $\mu\text{M}$  con el fin de poder aislar monoesporidias en ambas condiciones (PDA y PDA + AAS 100  $\mu\text{M}$ ). Se llevó a cabo la

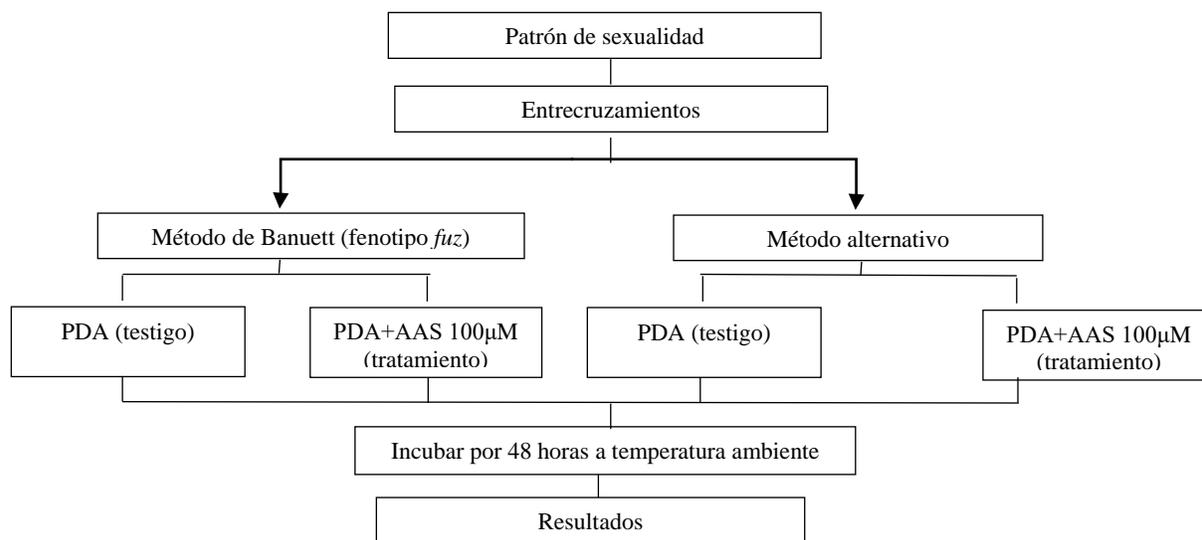
siembra de 25  $\mu\text{L}$  para cada dilución por triplicado en cajas de Petri con medio PDA para las diluciones realizadas en agua y PDA+AAS 100  $\mu\text{M}$  para las diluciones realizadas en AAS 100  $\mu\text{M}$  y se incubaron a temperatura ambiente. Después de 48 horas, se contaron las monoesporidias que geminaron y se consideró a cada una de ellas como una unidad formadora de monoesporidia (UFE). Se aislaron las colonias de las diluciones  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  que estuvieron lo más separadas unas de otras, en cajas de PDA y PDA+ AAS 100  $\mu\text{M}$  de manera individual según su procedencia, con el fin de mantener cada monoesporidia pura. Las monoesporidias fueron rotuladas con una clave que contiene el número de la cepa de origen de aislamiento y el número del aislamiento, quedando la numeración de la siguiente manera [545]<sub>1</sub>, [545]<sub>2</sub>, [545]<sub>3</sub>, hasta la [545]<sub>24</sub>. En la Figura 16 podemos observar un diagrama para la obtención de monoesporidias.



**Figura 16.** Obtención de monoesporidias de la cepa nativa CP-545 de *Ustilago maydis*.

## 7.8 Estandarización de los cruzamientos

Para determinar el patrón de sexualidad de las monoesporidias aisladas se llevaron a cabo una serie de experimentos previos. La estandarización se llevó a cabo por medio del fenotipo *fuz*, descrito por Banuett y Herskowitz (1988), y por el método alternativo propuesto en el Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla (Fig. 17).



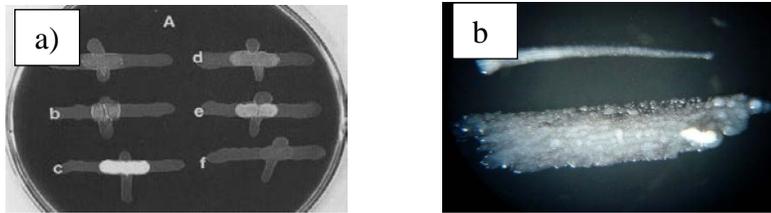
**Figura 17.** Entrecruzamiento de monoesporidias de *Ustilago maydis*.

### 7.8.1 Método de Banuett (fenotipo *fuz*)

Consiste en colocar una línea o gota de la suspensión celular (*a1b1*) con otra suspensión celular (*a2b2*) en forma de cruz de *U. maydis* para formar el dicarion, sobre una caja de Petri que contenga agar papa dextrosa (PDA) con carbón activado (C.A) al 1%, con la finalidad de dar contraste a las colonias crecidas.

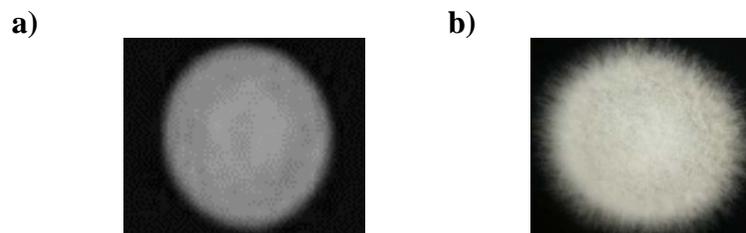
### 7.8.2 Método alternativo

Este método consiste en colocar una línea en paralelo de un tipo con otra línea del segundo tipo, dejando unos milímetros de distancia, con el fin de observar el momento de la reacción entre las dos monoesporidias que se aislaron, el medio de cultivo fue el mismo que se utilizó para evidenciar el fenotipo *fuz*. Para este experimento se manejaron solo 7 monoesporidias aisladas de la CP-545 en agua y 7 en AAS 100 µM. En la Figura 18 se muestran cada uno de los métodos desarrollados.



**Figura 18.** Forma de entrecruzar las cepas de *Ustilago maydis* para evidenciar el fenotipo *fuz*. a) En cruz propuesta por Banuett y Herskowitz (1988). b) Por el método alternativo en paralelo.

El fenotipo *fuz<sup>-</sup>* es negativo cuando fenotípicamente se observa una colonia cremosa y brillante (levaduriforme), que indica que las células confrontadas presentan los alelos idénticos y es positiva cuando fenotípicamente se observa una colonia blanca con apariencia algodonosa, indicando que las células confrontadas presentan alelos a y b diferentes (Fig. 19).



**Figura 19.** a) Reacción negativa (*fuz<sup>-</sup>*): colonia cremosa y brillante (levaduriforme). b) Reacción positiva (*fuz<sup>+</sup>*): colonia blanca con apariencia algodonosa.

## 7.9 Determinación del patrón de sexualidad de la CP-545

Para determinar el tipo sexual y la reacción de las cruces se realizó un experimento el cual consistió en realizar una cuadrícula de registro para cruzar las 24 monoesporidias aisladas entre ellas, los entrecruzamientos se realizaron en paralelo.

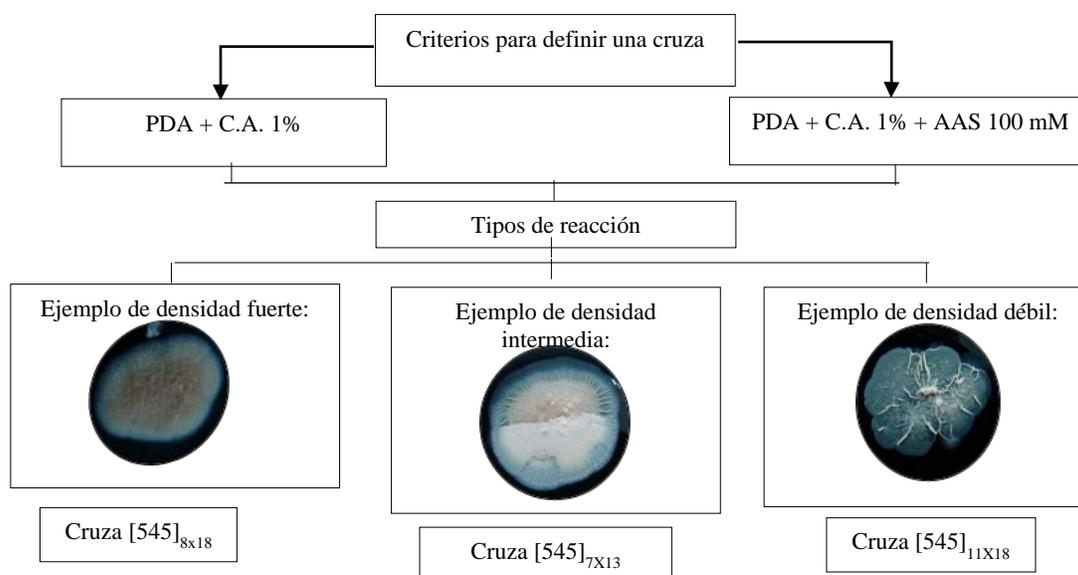
### 7.9.1 Clases de incompatibilidad

Consistió en la identificación de monoesporidias de un solo tipo ( $a_1b_1$  o  $a_2b_2$ ), con el fin de asegurar que sean haploides. Este proceso se realizó a partir del patrón de sexualidad donde se registraron las monoesporidias compatibles y las incompatibles. Se ubicaron las monoesporidias en sus dos tipos de incompatibilidad, las de tipo I, las cuales deben ser compatibles con las del tipo II, pero no entre las del mismo tipo.

## 7.9.2 Criterios de selección

Los criterios de selección para determinar la reacción de las cruza se basaron en lo siguiente (Fig. 20).

- Densidad fuerte: ambas monoesporidias presentan forma micelial abundante cubriendo toda la cruz.
- Densidad intermedia: una de las monoesporidias presenta forma levaduriforme con poco micelio y la otra presenta abundante micelio.
- Densidad débil: ambas monoesporidias presentan forma levaduriforme sin micelio aparente.



**Figura 20.** Determinación de la compatibilidad de las cruza para ubicar las monoesporidias en sus tipos de sexualidad.

## 7.10 Selección de dicariones

### 7.10.1 Cruzas intra-cepas

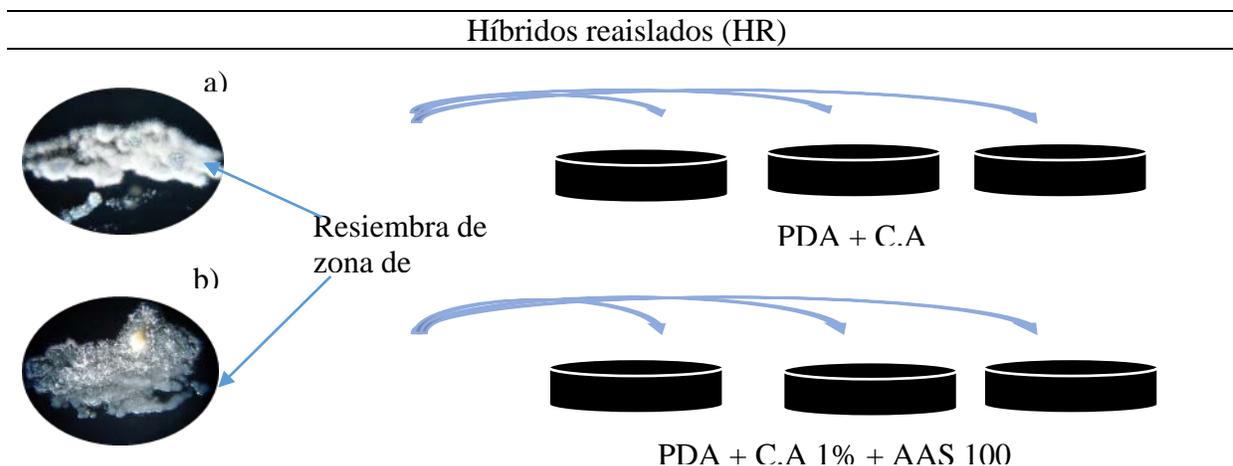
Con el patrón de sexualidad realizado en base a los criterios que definieron una cruz, se seleccionaron las monoesporidias que mostraron la formación de un dicarion nativo (reacción fuerte) confirmando que las monoesporidias que formaron los dicariones no formaran dicariones con monoesporidias de su mismo tipo.

### 7.10.2 Cruzas inter-cepas

Con las monoesporidias nativas seleccionadas de la CP-545 se realizaron cruza con las cepas de referencia CP-436 y CP437 (Banuett) para formar dicariones inter-cepas.

### 7.10.3 Híbridos reaislados (HR)

Se reaislaron las cruzas intra-cepas e inter-cepas, en el momento en que se observó la reacción, se realizaron tres cortes circulares en la zona con una punta estéril y se pasó cada uno de los cortes en tres nuevas cajas de Petri de 100x15mm en la condición correspondiente, las condiciones siempre se mantuvieron durante todo el experimento, dejando incubar el híbrido a temperatura ambiente (Fig. 21).



**Figura 21.** Reaislamamiento de los híbridos y su siembra por triplicado en las condiciones del experimento.

### 7.11 Caracterización del material biológico estudiado

Al material biológico se le realizaron una serie de estudios para caracterizarlos en base a las variables área de crecimiento, pH, conductividad y resistividad en el tiempo inicial y final del experimento. El material biológico seleccionado se muestran en el Cuadro 8, en total se caracterizaron 37 cepas, divididas en 4 cruzas intra-cepas, 8 cruzas inter-cepas, 8 monoesporidias nativas, una cepa multiesporia nativa (CP-545), dos cepas tipo de referencia (CP-436 y CP-437), la cruce de referencia [CP-436xCP-437], y 13 híbridos reaislados de las cruzas seleccionadas. Para ello se prepararon cajas de Petri con PDA+C.A 1% y PDA+C.A. 1%+AAS 100  $\mu$ M, los dicariones se formaron por el método alternativo (n= 3). También se incluyeron las variables como el tipo reacción fuerte (F), intermedia (I), y débil (D), el área de los cruzamiento monitoreada por intervalos, pH inicial y final, y la morfología de las colonias.

**Cuadro 8.** Material biológico seleccionado y caracterizado de *Ustilago maydis*.

Descripción	Clave	
	Cruza	HR
Intra-cepas débiles		
[545] <sub>15x12</sub>	1	HR1
[545] <sub>19x13</sub>	2	HR2
Intra-cepas fuertes		
[545] <sub>8x22</sub>	3	HR3
[545] <sub>3x24</sub>	4	HR4
Multiesporidio		
CP-545	14	
Híbrido Banuett		
CP-436xCP-437	13	HR13
Inter-cepas fuertes		
[545] <sub>15xCP-436</sub>	5	HR5
[545] <sub>13xCP-436</sub>	7	HR7

[545] <sub>8xCP-436</sub>	9	HR9
[545] <sub>24xCP-436</sub>	11	HR11
Inter-cepas débiles		
[545] <sub>15xCP-437</sub>	6	HR6
[545] <sub>13xCP-437</sub>	8	HR8
[545] <sub>8xCP-437</sub>	10	HR10
[545] <sub>24xCP-437</sub>	12	HR12
Monoesporidias		
[545] <sub>15</sub>	15	
[545] <sub>12</sub>	16	
[545] <sub>19</sub>	17	
[545] <sub>13</sub>	18	
[545] <sub>8</sub>	19	
[545] <sub>22</sub>	20	
[545] <sub>3</sub>	21	
[545] <sub>24</sub>	22	
CP-436 (referencia)	23	
CP-437 (referencia)	24	

### 7.11.1 Determinación de pH, temperatura, conductividad y resistividad

Para el tiempo inicial o tiempo cero, se midió un volumen de 10 mL del medio de cultivo en ambas condiciones por triplicado con una probeta, y se trasvasaron a un matraz para medir el pH, temperatura, conductividad y resistividad empleando un potenciómetro (Mettler Toledo, modelo Seven Excellence), con electrodos Mettler Toledo In Labb Expert Pro pH 0-14 y temperatura 0-100 °C, la resistividad 30 K $\Omega$  y conductividad eléctrica de 500  $\mu$ s/cm. Para la medición de cada una de las variables a tiempo final, se utilizó el contenido completo de la placa de Petri de 100x15mm de cada réplica (n=3) en ambas condiciones. Para ello se tomó el medio de cultivo de cada réplica y se colocó en un tubo Falcon de 50 mL y se homogenizó en una mezcladora comercial manual Hamilton Beach a máxima velocidad sin agregar ningún solvente (Fig. 22).



**Figura 22.** Proceso para la obtención de las muestras y medición de las variables en el tiempo final.

### **7.11.2 Área de crecimiento (cm<sup>2</sup>/día)**

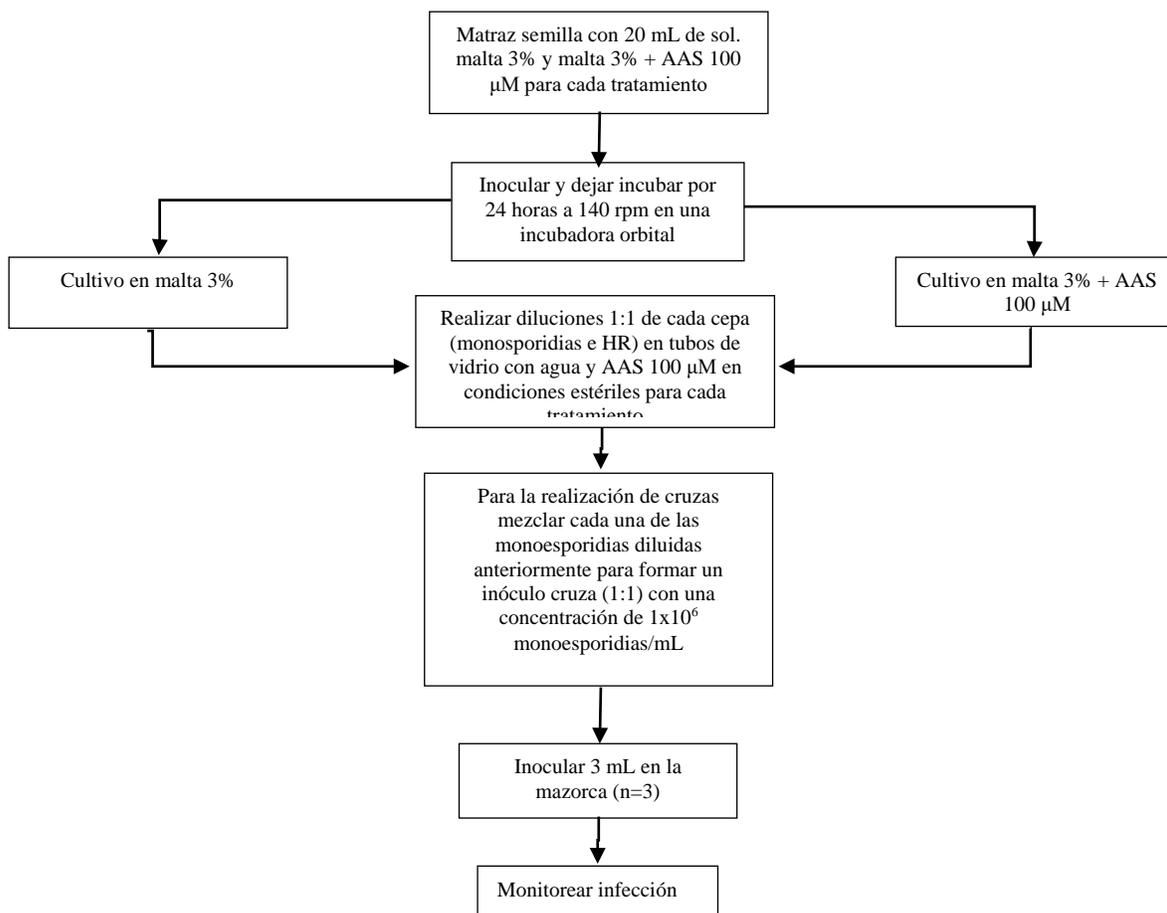
Se tomaron imágenes de cada cruce e híbrido reaislado (HR) y sus réplicas tanto del tratamiento como del testigo, dependiendo de los tiempos de muestreo. Para ello, se empleó una cámara Cyber-Shot Sony (DSC-H7). Las cajas Petri se colocaron sobre un paño negro y en el extremo superior se colocó una regla como referencia al tamaño de la caja de Petri y al crecimiento de la colonia con el fin de analizar las imágenes. Las imágenes se analizaron con el programa *Image J* 1.48 descargado en línea para la versión 2010 de Windows. Para calcular el área de crecimiento de cada cepa, se ajustó la escala y se midió el contorno de la colonia. Los datos fueron guardados en una hoja de cálculo Excel versión 2010 y se determinó la desviación estándar de las réplicas de cada experimento. Esta variable se expresó en cm<sup>2</sup>/día.

### **7.12 Análisis estadístico (SAS) de las variables estudiadas en el laboratorio**

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado con el fin de analizar los resultados obtenidos en el programa de SAS 9.4, mediante un análisis de varianza (ANOVA), y la prueba de Tukey (P 0.05).

### **7.13 Comprobación de la infección de los dicariones y de los HR en invernadero**

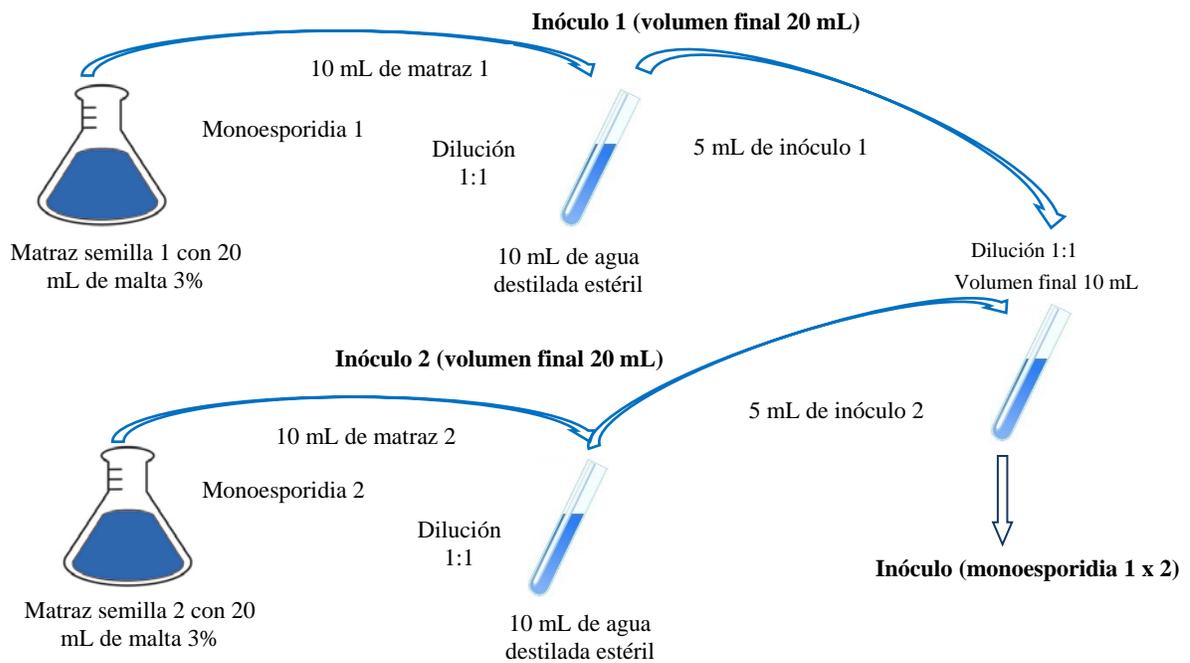
En la Figura 23, se muestra de manera general la elaboración del inóculo del material biológico estudiado y la infección de mazorca en una prueba piloto realizada en el invernadero del COLPOS *campus* Puebla.



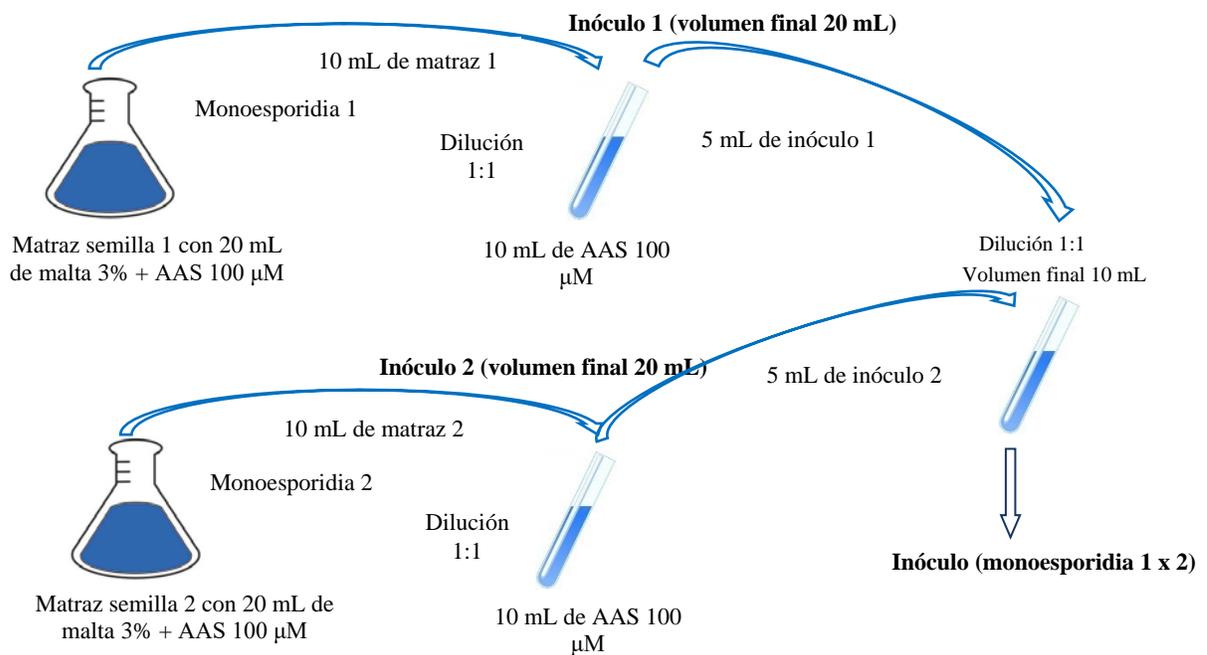
**Figura 23.** Diagrama general de la elaboración de inóculo e infección de mazorca.

### 7.13.1 Elaboración de inóculo en medio líquido EM 3% y EM 3% + AAS 100 μM

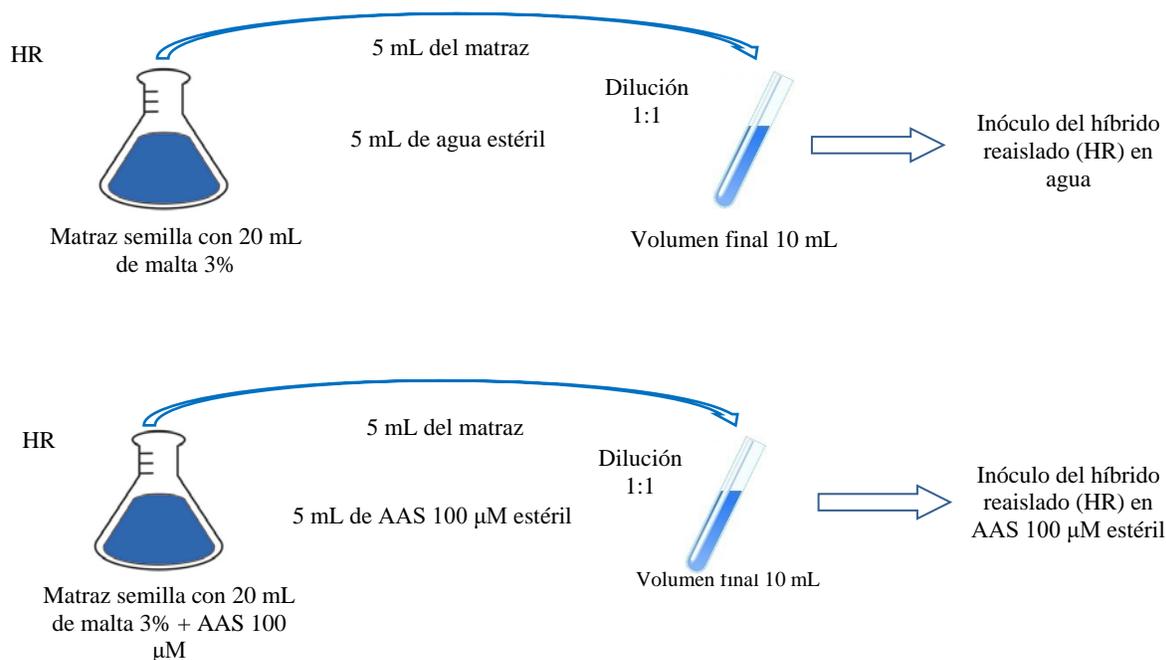
Para la elaboración del inoculo se utilizó malta de grado alimenticio. Para su preparación se mezclaron 3 g de malta por cada 100 mL de agua o AAS 100 μM, se dispusieron 20 mL de ese medio de cultivo en un matraz Erlenmeyer, se taparon con tapones de algodón y se esterilizaron a 121°C durante 25 minutos. Posteriormente, se dejó enfriar el medio y se inoculó con el material biológico a estudiar (monoesporidias para formar cruza o híbridos reaislados) e incubó a 27°C por 24 horas a 140 rpm. El cultivo obtenido se diluyó en agua o AAS 100 μM (1:1) hasta obtener una concentración aproximada de  $1 \times 10^6$  esporidias/mL (Valdez-Morales, 2009; Madrigal-Rodríguez, 2010), dicha concentración se verificó por conteo en cámara de Neubauer. Este procedimiento se realizó para ambas condiciones, descrito en las Figuras 24, 25 y 26, de manera esquemática.



**Figura 24.** Preparación de inóculos de monoesporidias y cruza en malta al 3%.



**Figura 25.** Preparación de inóculos de monoesporidias y cruza en malta al 3% + ácido acetilsalicílico (AAS 100  $\mu\text{M}$ ).



**Figura 26.** Preparación del inóculo de cada híbrido reaislado en ambas condiciones experimentales (malta al 3% y malta al 3% + ácido acetilsalicílico 100  $\mu$ M).

### 7.13.2 Prueba de virulencia en invernadero

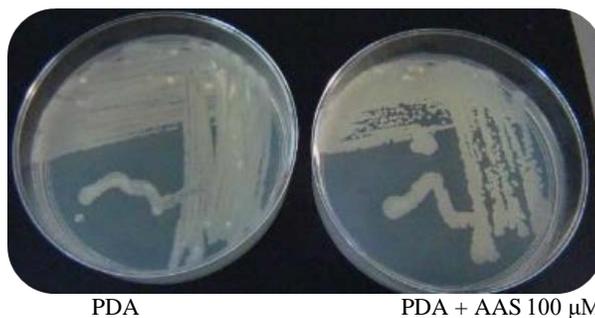
Para esta prueba piloto se inocularon 3 mazorcas (híbrido HUE-CP-14 Nopalucan) por cada cruz, monosporidia, HR y multiesporidio, incluyendo los testigos que consistían en mazorcas infectadas con la solución estéril de EM 3% + AAS 100  $\mu$ M y EM 3%, y los blancos (mazorcas sin inocular). Los materiales biológicos inoculados en el maíz ( $n= 3$ ) representan las dos condiciones que se manejaron en el laboratorio.

La inoculación se realizó en etapa de jilote en dos puntos equidistantes a lo largo de la mazorca, comenzando por la parte de arriba, para ello se utilizó una jeringa de plástico desechable de 5 mL a la cual se le colocó una aguja estéril desechable 16G x 1" (1.60 mm de diámetro x 25 mm de largo) de la marca Precision Glide Needle. Se inyectaron 3 mL de la suspensión de esporidias por planta utilizando una jeringa distinta para cada tratamiento y material biológico. Se colectaron las mazorcas a los 25 días después de la inoculación de cada material, se evaluó si hubo infección (I) y el nivel de infección (%) que las mazorcas presentaban, siendo  $I_1= 0-30\%$  del tamaño de la mazorca,  $I_2 = 31-60\%$  con respecto al tamaño de la mazorca e  $I_3= 61-100\%$ , mazorca infecta en su totalidad.

## VIII. RESULTADOS

### 8.1 Caracterización de las cepas nativas y de referencia

La CP-545 presentó una densidad abundante, textura rugosa, color crema, las colonias presentaron círculos medianos (Fig. 27).



**Figura 27.** Crecimiento de la cepa nativa CP-545 de *Ustilago maydis* en las condiciones experimentales establecidas a 48 horas de incubación.

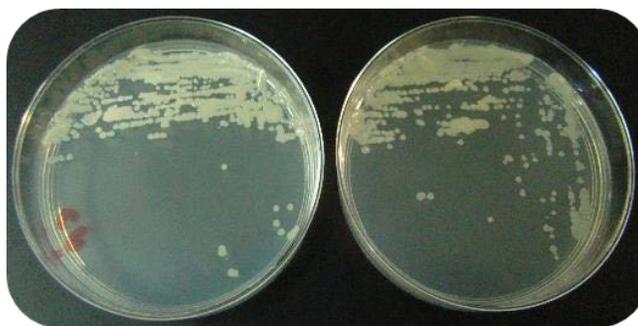
La CP-774 presentó una densidad abundante, textura rugosa, color crema, las colonias presentaron círculos pequeños y medianos (Fig. 28).



**Figura 28.** Crecimiento de la cepa nativa CP-774 de *Ustilago maydis* en las condiciones experimentales establecidas a 48 horas de incubación.

La CP-585 presentó una densidad abundante, textura rugosa, color crema, las colonias presentaron círculos medianos (Fig. 29).





PDA

PDA + AAS 100  $\mu$ M

**Figura 31.** Crecimiento de la cepa extranjera de referencia CP-436 de *Ustilago maydis* en las condiciones experimentales establecidas a 48 horas de incubación.

Por otro lado, la segunda cepa de referencia CP-437 de *U. maydis*, presentó una densidad abundante, textura lisa, color crema, las colonias presentaron círculos medianos (Fig. 32).



PDA

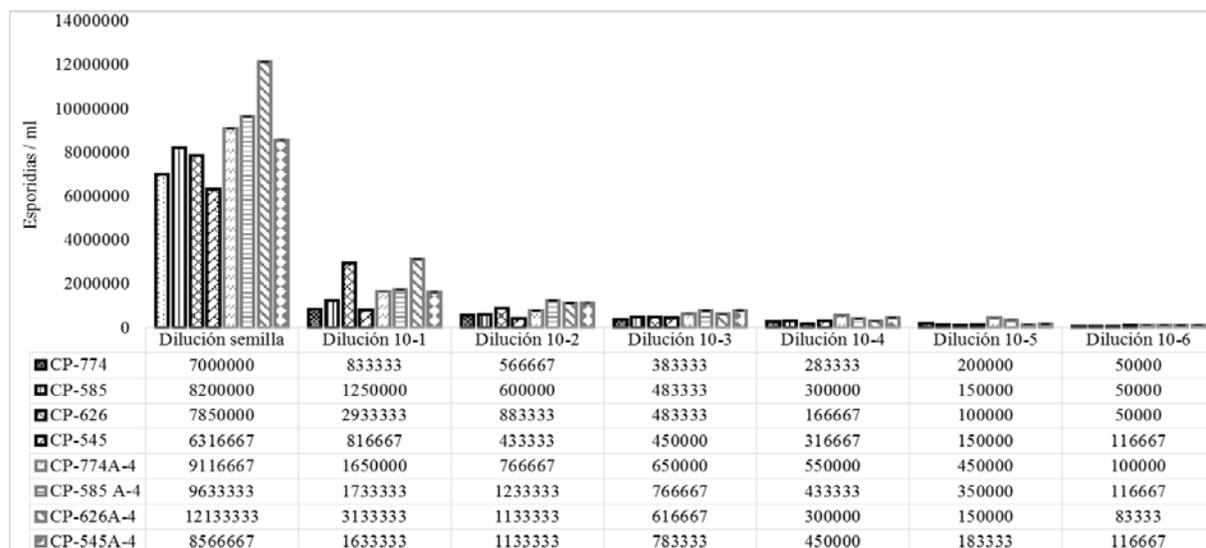
PDA + AAS 100  $\mu$ M

**Figura 32.** Crecimiento de la cepa extranjera de referencia CP-437 de *Ustilago maydis* en las condiciones experimentales establecidas a 48 horas de incubación.

### 8.1.1 Concentración de monoesporidias en cada dilución

En la Figura 33 se observa el promedio del conteo ( $n=3$ ) de las monoesporidias/mL de las cepas CP-545, CP-585, CP-626 y CP-774 de *U. maydis* en ambas condiciones, agua (testigo) y la solución de AAS 100  $\mu$ M (tratamiento). La concentración de monoesporidias de una serie de diluciones fue evaluada a las 48 horas de incubación de cada cepa crecida en las condiciones PDA (testigo) y tratamiento (PDA + AAS 100  $\mu$ M). El testigo y tratamiento

presentaron abundantes monoesporidias, sin embargo, el tratamiento con AAS 100  $\mu\text{M}$  presentó mayor concentración de monoesporidias/mL en todas las cepas estudiadas (Fig. 33).



**Figura 33.** Conteo de monoesporidias/mL de las cepas CP-545, CP-585, CP-626 y CP-774 de *Ustilago maydis*, las barras negras muestran el promedio del conteo realizado por triplicado en cámara de Neubauer, utilizando agua como solvente. Las barras grises muestran el promedio del conteo realizado por triplicado en la cámara de Neubauer usando AAS 100  $\mu\text{M}$  como solvente.

La germinación de monoesporidias de *U. maydis* diluidas en agua y sembradas en medio de cultivo PDA y las diluidas en ácido acetilsalicílico 100  $\mu\text{M}$  y sembradas en PDA + AAS 100  $\mu\text{M}$  se monitorearon y contaron a las 48 horas de incubación. Las diluciones realizadas en AAS 100  $\mu\text{M}$  mostraron una mejor dispersión de monoesporidias que las diluciones realizadas en agua estéril. Todas las cepas estudiadas de *U. maydis* germinaron en las dos condiciones. En el Cuadro 9, puede observarse el análisis estadístico de la germinación de las monoesporidias de las cepas estudiadas de *U. maydis* diluidas en la solución de agua (testigo). En la dilución 10<sup>-1</sup> y 10<sup>-2</sup> la concentración más alta fue en la cepa CP-626 con 2933333 $\pm$ 28867.51 y 883333 $\pm$ 16667 monoesporidias mL<sup>-1</sup>, respectivamente. En la dilución 10<sup>-3</sup> las más altas concentraciones fueron en las cepas CP-585 y CP-626 con 483333 $\pm$ 16667 y 483333 $\pm$ 16667, respectivamente. En la dilución 10<sup>-4</sup> fueron tres cepas que tuvieron las concentraciones más altas de monoesporidias germinado, la CP-774, CP-585 y CP-545 con 283333 $\pm$ 16667, 300000 $\pm$ 0 y 316666 $\pm$ 16667, respectivamente. Finalmente, en la dilución 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-6</sup> la más alta germinación fue en la cepa CP-774 y CP-545 con 200000 $\pm$ 0 y 116666 $\pm$ 16667, respectivamente.

**Cuadro 9.** Concentración de monoesporidias/mL de cada dilución realizada en agua (T) de las cepas nativas de *Ustilago maydis*.

Registro	Diluciones						
	DS	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
CP-774	7000000±0 <sup>c</sup>	833333±16667 <sup>c</sup>	566666±16667 <sup>b</sup>	383333±16667 <sup>b</sup>	283333±16667 <sup>a</sup>	200000±0 <sup>a</sup>	50000±0 <sup>b</sup>
CP-585	8200000±0 <sup>a</sup>	1250000±0 <sup>b</sup>	600000±0 <sup>b</sup>	483333±16667 <sup>a</sup>	300000±0 <sup>a</sup>	150000±0 <sup>b</sup>	50000±0 <sup>b</sup>
CP-626	7850000±0 <sup>b</sup>	2933333±28867.51 <sup>a</sup>	883333±16667 <sup>a</sup>	483333±16667 <sup>a</sup>	166666±16667 <sup>b</sup>	100000±0 <sup>c</sup>	50000±0 <sup>b</sup>
CP-545	6316666±60093 <sup>d</sup>	816666±16667 <sup>c</sup>	433333±16667 <sup>c</sup>	450000±28868 <sup>ab</sup>	316666±16667 <sup>a</sup>	150000±0 <sup>b</sup>	116666±16667 <sup>a</sup>

Valores con la misma letra son estadísticamente iguales. Tukey (0.05). DS= Dilución semilla. T= Testigo.

Por otro lado, en el Cuadro 10 puede observarse el análisis estadístico de la concentración de las monoesporidias de las cepas estudiadas de *U. maydis* diluidas en la solución con AAS 100µM. Puede observarse que en la dilución 10<sup>-1</sup> la cepa con la más alta concentración de monoesporidias fue también la CP-626 con 3133333±16667, mientras que en la dilución 10<sup>-2</sup>, fueron tres las cepas que obtuvieron las más altas concentraciones de monoesporidias, la CP-585, CP-626 y CP-545 con 1233333±16667, 1133333±16667 y 1133333±44096, respectivamente. En la dilución 10<sup>-3</sup> las cepas CP-585 y CP-545 obtuvieron las más altas concentraciones de monoesporidias con 766666±16667 y 783333±33333, respectivamente. En la dilución 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-5</sup> fue la cepa CP-774 la que obtuvo las más alta concentración de monoesporidias con 550000±0 y 450000±0, respectivamente. Finalmente, en la dilución 10<sup>-6</sup> todas las cepas fueron del mismo grupo por lo que no hubo diferencia significativa entre las cepas para esta dilución.

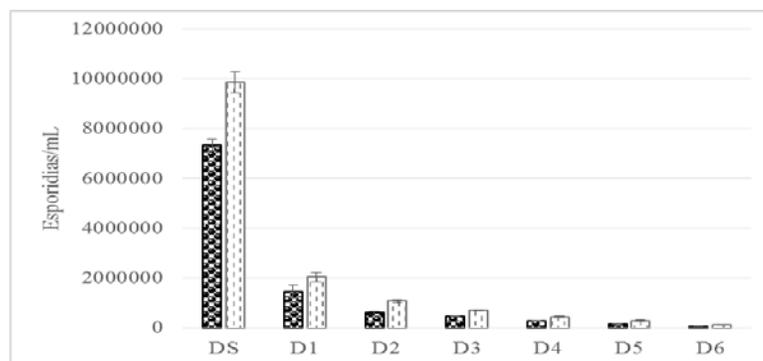
**Cuadro 10.** Concentración de monoesporidias/mL de cada dilución realizada en una solución de ácido acetilsalicílico (AAS) 100 µM de las cepas nativas de *Ustilago maydis*.

Registro	Diluciones						
	DS	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
CP-774	9116666±16667 <sup>c</sup>	1650000±0 <sup>b</sup>	766666±16667 <sup>b</sup>	650000±0 <sup>b</sup>	550000±0 <sup>a</sup>	450000±0 <sup>a</sup>	100000±0 <sup>a</sup>
CP-585	9633333±16667 <sup>b</sup>	1733333±16667 <sup>b</sup>	1233333±16667 <sup>a</sup>	766666±16667 <sup>a</sup>	433333±16667 <sup>b</sup>	350000±0 <sup>b</sup>	116666±16667 <sup>a</sup>
CP-626	12133333±16667 <sup>a</sup>	3133333±16667 <sup>a</sup>	1133333±16667 <sup>a</sup>	616666±16667 <sup>b</sup>	300000±0 <sup>c</sup>	150000±0 <sup>c</sup>	83333±16667 <sup>a</sup>
CP-545	8566666±60093 <sup>d</sup>	1633333±6009 <sup>b</sup>	1133333±4409 <sup>a</sup>	783333±3333 <sup>a</sup>	450000±28868 <sup>b</sup>	183333±16667 <sup>c</sup>	116666±16667 <sup>a</sup>

Valores con la misma letra son estadísticamente iguales. Tukey (0.05). DS= Dilución semilla. Tx= Tratamiento.

Se observó que en ambas condiciones la cepa que con mayor frecuencia se encontró en el grupo estadístico *a* fue la CP-626. En la Figura 34 y Cuadro 11, se observan los resultados de

un análisis de medias por Tukey con un alfa del 0.05 de confiabilidad, diferenciando las condiciones del experimento sin tomar en cuenta las cepas, evidenciando que el uso del AAS 100  $\mu\text{M}$  favoreció la emulsión de monoesporidias en dicha solución.



**Figura 34.** Análisis de medias del conteo en cámara de Neubauer de la emulsión de monoesporidias de *Ustilago maydis* en AAS 100  $\mu\text{M}$ . Las barras negras muestran el promedio (n=12) de las cuatro cepas sometidas a conteo en cámara de Neubauer usando agua. Las barras grises muestran el promedio (n=12) de las cuatro cepas sometidas a conteo en cámara de Neubauer usando AAS 100  $\mu\text{M}$ .

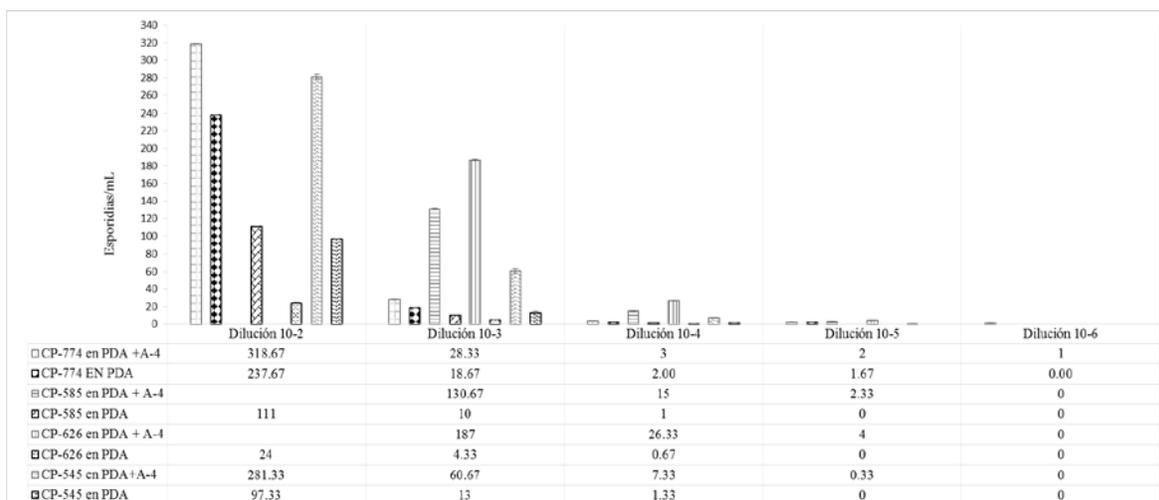
**Cuadro 11.** Comparación de medias de los resultados en los tratamientos aplicados a las cepas de *Ustilago maydis*.

CE	Diluciones						
	DS	D1	D2	D3	D4	D5	D6
T	7341666.67 $\pm$ 222062.76 <sup>b</sup>	1458333.33 $\pm$ 262117.93 <sup>a</sup>	620833.33 $\pm$ 49794.4 <sup>b</sup>	450000 $\pm$ 15075.57 <sup>b</sup>	266666.67 $\pm$ 1 8802.54 <sup>b</sup>	150000 $\pm$ 10660.04 <sup>b</sup>	66666.67 $\pm$ 9401.27 <sup>b</sup>
AAS 100 $\mu\text{M}$	9862500 $\pm$ 411580.7 <sup>a</sup>	2037500 $\pm$ 191596.66 <sup>a</sup>	1066666.67 $\pm$ 54818.34 <sup>a</sup>	704166.67 $\pm$ 23402.23 <sup>a</sup>	433333.33 $\pm$ 2 7752.51 <sup>a</sup>	283333.33 $\pm$ 3 7098.01 <sup>a</sup>	104166.67 $\pm$ 7 432.35 <sup>a</sup>

Valores con la misma letra son estadísticamente iguales, Tukey (0.05). CE= Condiciones experimentales. T= Testigo.

### 8.1.2 Viabilidad de las monoesporidias después de 48 h de incubación

En la Figura 35 se observa el promedio del conteo de la germinación de UFE/mL (n=3) de las cepas CP-545, CP-585, CP-626 y CP-774 de *U. maydis* en ambas condiciones, PDA (testigo) y PDA + AAS 100  $\mu\text{M}$  (tratamiento). Las UFE fueron contadas a las 48 horas de incubación de cada cepa a temperatura ambiente. El testigo y tratamiento presentaron abundantes monoesporidias con una mayor concentración en el tratamiento. También se observó que el tratamiento con AAS 100  $\mu\text{M}$  presentó mayor germinación de UFE en todas las cepas estudiadas.



**Figura 35.** Germinación de UFE/mL de cada dilución de las cepas de *Ustilago maydis* después de 48 horas de incubación sembradas en ambas condiciones. Las barras negras muestran el promedio (n=3) de las UFE/mL en PDA. Las barras grises muestran el promedio (n=3) de las UFE/mL en PDA + AAS 100  $\mu$ M.

En el Cuadro 12, puede observarse el análisis estadístico de la prueba de viabilidad de las monoesporidias de las cepas estudiadas de *U. maydis* sembradas en medio de cultivo PDA (testigo). Como se puede notar, en la dilución 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-5</sup> la germinación de monoesporidias más alta fue en la cepa CP-774 con 237.66±0.33, 18.66±0.33, 2±0 y 1.66±0.6 UFE/mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Finalmente, en la dilución 10<sup>-6</sup> todas las cepas fueron del mismo grupo por lo que no hubo diferencia significativa entre las cepas para esta dilución.

**Cuadro 12.** Viabilidad de monoesporidias/mL que germinaron de cada dilución sembradas en PDA (T) de las cepas de *Ustilago maydis*.

Registro	Dilución 10 <sup>-2</sup>	Dilución 10 <sup>-3</sup>	Dilución 10 <sup>-4</sup>	Dilución 10 <sup>-5</sup>	Dilución 10 <sup>-6</sup>
CP-774	237.66±0.33 <sup>a</sup>	18.66±0.33 <sup>a</sup>	2±0 <sup>a</sup>	1.66±0.6 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>
CP-585	111±1.7 <sup>b</sup>	10±0 <sup>b</sup>	1±0 <sup>ab</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>a</sup>
CP-626	24±0.58 <sup>c</sup>	4.33±0.33 <sup>c</sup>	0.66±0.33 <sup>b</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>a</sup>
CP-545	97.33±0.30 <sup>b</sup>	13±3.6 <sup>b</sup>	1.33±0.6 <sup>ab</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>a</sup>

Valores con la misma letra son estadísticamente iguales, Tukey (0.05).

Por otro lado, en el Cuadro 13 se presenta el análisis estadístico de la prueba de viabilidad de las monoesporidias de las cepas estudiadas de *U. maydis* sembradas en medio de cultivo PDA + AAS 100  $\mu$ M. En la dilución 10<sup>-2</sup> la germinación de monoesporidias más alta en la cepa CP-774 con 318.66±0.33 monoesporidias mL<sup>-1</sup>. En la dilución 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-5</sup> la mayor cantidad

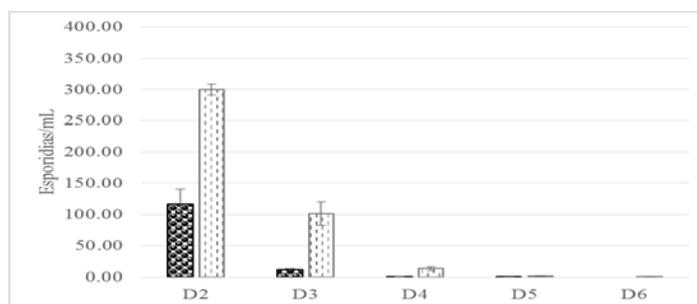
de monoesporidias germinadas fueron de la cepa CP-626 con  $187 \pm 0.58$ ,  $26.33 \pm 0.33$  y  $4 \pm 0$  UFC/mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Finalmente, en la dilución  $10^{-6}$  todas las cepas fueron del mismo grupo sin presentar diferencias significativas entre las cepas para esta dilución.

**Cuadro 13.** Viabilidad de monoesporidias/mL que germinaron en cada dilución sembradas en el tratamiento PDA + AAS 100  $\mu$ M de las cepas de *Ustilago maydis*.

Registro	Dilución $10^{-2}$	Dilución $10^{-3}$	Dilución $10^{-4}$	Dilución $10^{-5}$	Dilución $10^{-6}$
CP-774	$318.66 \pm 0.33^a$	$28.33 \pm 0.33^d$	$3 \pm 0^d$	$2 \pm 0^b$	$1 \pm 0.58^a$
CP-585	DPC	$130.66 \pm 0.67^b$	$15 \pm 0.58^b$	$2.33 \pm 0.33^b$	$0 \pm 0^a$
CP-626	DPC	$187 \pm 0.58^a$	$26.33 \pm 0.33^a$	$4 \pm 0^a$	$0 \pm 0^a$
CP-545	$281.33 \pm 3.38^b$	$60.66 \pm 2.33^c$	$7.33 \pm 0.33^c$	$0.33 \pm 0.33^c$	$0 \pm 0^a$

Valores con la misma letra son estadísticamente iguales, Tukey (0.05). DPC= Demasiadas para contarse.

En la Figura 36 y Cuadro 14 se observan los resultados de un análisis de medias por Tukey con un alfa del 0.05 de confiabilidad, diferenciando las condiciones del experimento sin tomar en cuenta las cepas, demostrando que el uso del AAS 100  $\mu$ M favoreció la germinación de las UFE/mL.



**Figura 36.** Análisis de medias de la germinación de UFE/mL de cada dilución de las cepas de *Ustilago maydis*, mostrando el efecto del AAS 100  $\mu$ M. Las barras negras muestran el promedio (n=12) de las cuatro cepas nativas sembradas en PDA usando agua. Las barras grises muestran el promedio (n12) de las cuatro cepas sembradas usando PDA + AAS 100  $\mu$ M. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 0.05).

**Cuadro 14.** Comparación de las condiciones de germinación de UFE/mL de *Ustilago maydis*.

Condición	Diluciones				
	D2	D3	D4	D5	D6
Testigo	$117.41 \pm 23.30^b$	$11.5 \pm 1.63^b$	$1.25 \pm 0.18^b$	$0.41 \pm 0.23^b$	$0 \pm 0^a$
AAS 100 $\mu$ M	$300 \pm 8.49^a$	$101.66 \pm 18.58^a$	$12.91 \pm 2.68^a$	$2.16 \pm 0.41^a$	$0.25 \pm 0.18^a$

El tratamiento con AAS mostró resultados favorables ya que si se pudo incrementar el número de UFE/mL, probablemente también mejore la concentración de inóculo para producir cuítlacoche, aumentando la infección y tamaño de agalla. Un punto importante a mencionar es

que el uso de AAS en plantas y humanos ha sido estudiado ampliamente, y recién iniciado en hongos para consumo humano.

## 8.2 Monoesporidias aisladas de la cepa CP-545

De las 24 monoesporidias aisladas, de la 1 a la 7 germinaron y se aislaron de la dilución de agua, y de la 8 a la 24 fueron aisladas de las diluciones de AAS 100  $\mu\text{M}$ , todas se cultivaron en ambas condiciones para el experimento. La clave designada para cada monoesporidia fue un número progresivo de aislamiento. En el Cuadro 15 se pueden observar las claves para identificar a cada monoesporidia.

**Cuadro 15.** Monoesporidias aisladas de la cepa CP-545 de *Ustilago maydis* procedente de Huaquechula, Puebla.

Condición	Monoesporidias
Agua	[545] <sub>1</sub> , [545] <sub>2</sub> , [545] <sub>3</sub> , [545] <sub>4</sub> , [545] <sub>5</sub> , [545] <sub>6</sub> , [545] <sub>7</sub>
AAS 100 $\mu\text{M}$	[545] <sub>8</sub> , [545] <sub>9</sub> , [545] <sub>10</sub> , [545] <sub>11</sub> , [545] <sub>12</sub> , [545] <sub>13</sub> , [545] <sub>14</sub> , [545] <sub>15</sub> , [545] <sub>16</sub> , [545] <sub>17</sub> , [545] <sub>18</sub> , [545] <sub>19</sub> , [545] <sub>20</sub> , [545] <sub>21</sub> , [545] <sub>22</sub> , [545] <sub>23</sub> , [545] <sub>24</sub>

## 8.3 Entrecruzamientos

Los entrecruzamientos realizados con las 14 monoesporidias y los tipos de referencia para realizados tanto por el método en cruz como por el método en alternativo (paralelo), confirmaron que las monoesporidias 2-14 presentaron una reacción positiva con la cepa de referencia CP-436; con la monoesporidia 1 se pudo observar una reacción parcialmente positiva (promicelio).

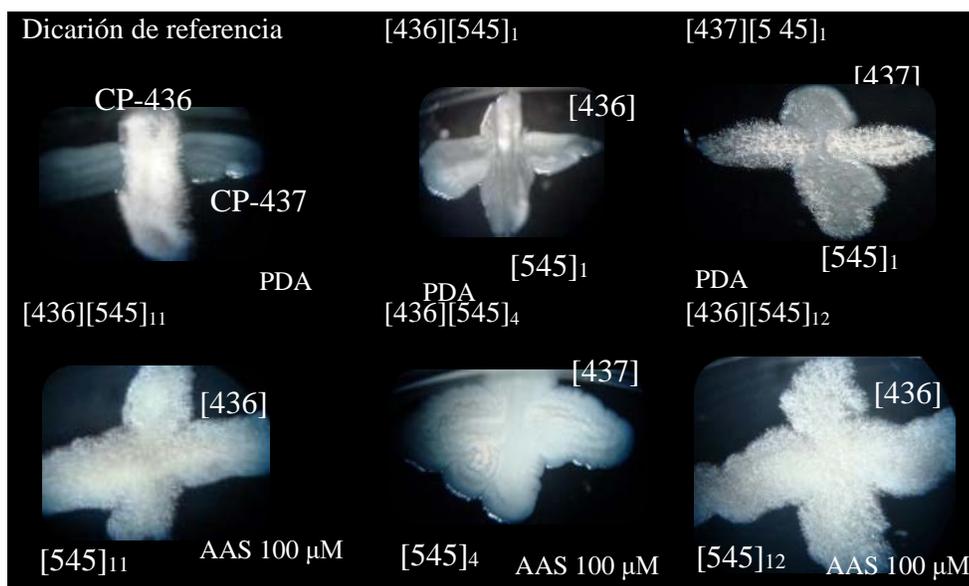
### 8.3.1 Por el método de Banuett (fenotipo *fuz*)

Las cruas formadas por el método de Banuett (fenotipo *fuz*) se realizaron con las primeras 14 monoesporidias aisladas de la CP-545 y sus tipos de referencia, para las monoesporidias [545]<sub>1</sub>, [545]<sub>2</sub>, [545]<sub>3</sub>, [545]<sub>4</sub>, [545]<sub>5</sub>, [545]<sub>6</sub>, [545]<sub>7</sub>, se realizó la prueba del fenotipo *fuz* en agar papa dextrosa con carbón activado al 1% (PDA + C.A. 1%), y para las monoesporidias [545]<sub>8</sub>, [545]<sub>9</sub>, [545]<sub>10</sub>, [545]<sub>11</sub>, [545]<sub>12</sub>, [545]<sub>13</sub>, [545]<sub>14</sub> realizó en agar papa dextrosa con carbón activado al 1% y ácido acetilsalicílico (100  $\mu\text{M}$  PDA + C.A. 1% + AAS 100  $\mu\text{M}$ ), en ambos tratamientos se utilizó como testigo el dicarion de referencia, el cual se forma con la crusa de los tipo de referencia (CP-436)x(CP-437). En el Cuadro 16 se puede observar con un signo + (fenotipo *fuz*+) las cruas que formaron dicariones patogénicos (micelio) y con signo – (fenotipo *fuz*-) los que no lo formaron (forma levaduriforme).

**Cuadro 16.** Cruzas formadas entre las 14 monoesporidias y los tipos de referencia de *Ustilago maydis* por el método de cruz, en dos diferentes condiciones (PDA + C.A. 1% y PDA + C.A. 1% + AAS 100  $\mu$ M). El signo + (fenotipo *fuz*<sup>+</sup>) indica la formación de un dicarion patogénico (micelio) y el signo - (fenotipo *fuz*<sup>-</sup>), que no hubo compatibilidad entre las monoesporidias. CA= Carbón activado.

Registro	PDA + C.A. 1%		PDA + C.A. 1% + AAS 100 $\mu$ M	
	CP- 437	CP-436	CP- 437	CP-436
[545] <sub>1</sub>	+	-		
[545] <sub>2</sub>	-	+		
[545] <sub>3</sub>	-	+		
[545] <sub>4</sub>	-	+		
[545] <sub>5</sub>	-	+		
[545] <sub>6</sub>	-	+		
[545] <sub>7</sub>	-	+		
[545] <sub>8</sub>			-	+
[545] <sub>9</sub>			-	+
[545] <sub>10</sub>			-	+
[545] <sub>11</sub>			-	+
[545] <sub>12</sub>			-	+
[545] <sub>13</sub>			-	+
[545] <sub>14</sub>			-	+
Dicarion de referencia	+	+	+	+

En la Figura 37 se observa la reacción de las cruzas sembradas en cruz donde se observó la formación de dicariones patógenos (formación de micelio) y la cruz de dos monoesporidias del mismo tipo que no formaron dicarion (forma levaduriforme).



**Figura 37.** Siembra en cruz de las diferentes cepas compatibles de *Ustilago maydis*, usando agar papa dextrosa con carbón activado 1% (PDA + C.A. 1%) y agar papa dextrosa con carbón activado 1% + ácido acetilsalicílico 100  $\mu$ M (PDA +C.A. 1% + AAS 100  $\mu$ M).

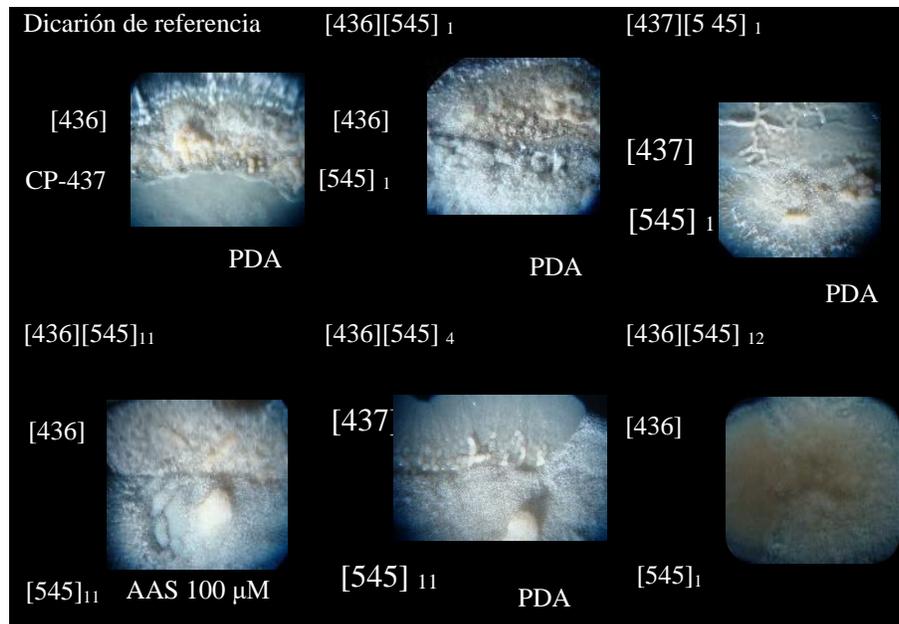
### 8.3.2 Por el método alternativo

Con las 14 monoesporidias aisladas a partir de la CP-545 se realizaron las cruzas por el método alternativo *Campus* Puebla, utilizando los tipos de referencia, y como testigo el dicarion patogénico de referencia [CP-436] [CP-437] para poder comparar la apariencia de la colonia (micelio). Con este método también se observó la reacción (fenotipo *fuz*), la cual determinó si ambos monoesporidios formaban micelio (fenotipo *fuz*<sup>+</sup>), sólo un monoesporidio o ninguno de ellos (fenotipo *fuz*<sup>-</sup>), para esto la flecha indica el sentido de la reacción (Cuadro 17).

**Cuadro 17.** Cruzas entre las 14 monoesporidias y ambos tipos de referencia de *Ustilago maydis* por el método alternativo, en dos condiciones (PDA + C.A. 1% y PDA + C.A. 1% + AAS 100 µM), el signo + (fenotipo *fuz*<sup>+</sup>) indica la formación de un dicarion patogénico (micelio) y, el signo - (fenotipo *fuz*<sup>-</sup>) que no hubo compatibilidad entre las monoesporidias. Reacción de ambos lados ↔, reacción de un solo lado →-. CA= Carbón activado.

Registro	PDA + C.A. 1%				PDA + C.A. 1% + AAS 100 µM			
	CP-436	Sentido de la cruz	CP- 437	Sentido de la cruz	CP-436	Sentido de la cruz	CP- 437	Sentido de la cruz
[545] <sub>1</sub>	-	↔	+	→	-	↔	+	→
[545] <sub>2</sub>	+	↔	-	→	+	↔	-	→
[545] <sub>3</sub>	+	↔	-	→	+	↔	-	→
[545] <sub>4</sub>	+	↔	-	→	+	↔	-	→
[545] <sub>5</sub>	+	↔	-	→	+	↔	-	→
[545] <sub>6</sub>	+	↔	-	→	+	↔	-	→
[545] <sub>7</sub>	+	↔	-	→	+	↔	-	→
[545] <sub>8</sub>	+	↔	-	→	+	↔	-	→
[545] <sub>9</sub>	+	↔	-	→	+	↔	-	→
[545] <sub>10</sub>	+	↔	-	→	+	↔	-	→
[545] <sub>11</sub>	+	↔	-	→	+	↔	-	→
[545] <sub>12</sub>	+	↔	-	→	+	↔	-	→
[545] <sub>13</sub>	+	↔	-	→	+	↔	-	→
[545] <sub>14</sub>	+	↔	-	→	+	↔	-	→
Dicarion de referencia	+	←(436)	+	←(436)	+	←(436)	+	←(436)

En la Figura 38 se observa la reacción de las cruzas en paralelo, donde se observó la formación de dicariones patógenos en ambos sentidos (↔), formación de micelio determinada por una reacción fuerte, una reacción intermedia (→) sólo un monospórico formó micelio o promicelio y una reacción débil, ninguno formó micelio.



**Figura 38.** Siembra en paralelo (método del alternativo) de diferentes cepas compatibles de *Ustilago maydis*, usando agar papa dextrosa con carbón activado 1% (PDA + C.A. 1%) y agar papa dextrosa con carbón activado 1% y ácido acetilsalicílico 100  $\mu\text{M}$  (PDA +C.A. 1% + AAS 100  $\mu\text{M}$ ).

#### 8.4 Patrón de sexualidad de la CP-545

La determinación de patrón de sexualidad obtenido al entrecruzar las 24 monoesporidias se realizó en la condición PDA+C.A. 1% por triplicado para cada cruce. El Cuadro 18 muestra los resultados obtenidos para cada cruce, para determinar el tipo de reacción se utilizaron como criterios la designación intermedia: solo una presenta micelio; fuerte: ambas formaron micelio y débil: ninguna presentó micelio o sea ambas presentaron forma levaduriforme.

**Cuadro 18.** Reacciones que mostraron las cruzas de las 24 monoesporidias de la cepa CP-545 de *Ustilago maydis*, en PDA + C.A. 1%, la I indica una reacción intermedia, la letra D una reacción débil, F una reacción fuerte.

CP-545	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	D																							
2	D	D																						
3	I	D	D																					
4	I	I	I	D																				
5	I	I	I	F	D																			
6	I	D	I	F	I	D																		
7	I	D	I	I	I	I	D																	
8	I	I	D	I	I	I	D	D																
9	I	D	D	I	I	I	D	D	D															
10	I	I	D	F	I	I	I	I	D	D														
11	I	D	D	F	I	I	I	I	I	I	D													
12	I	I	I	F	I	I	I	I	D	D	D	D												
13	I	D	D	F	I	I	I	I	I	D	D	D	D											
14	F	D	I	I	D	I	D	I	D	D	D	D	I	D										
15	I	I	I	F	I	I	I	I	I	I	I	D	D	I	D									
16	I	D	I	I	D	D	D	I	I	D	D	D	D	D	I	D								
17	I	I	I	I	I	F	I	F	I	I	D	D	D	I	I	D	D							
18	F	I	I	F	F	F	D	F	F	I	D	D	I	I	I	I	D	D						
19	F	I	I	I	F	I	I	F	I	D	D	D	D	D	D	D	I	D	D					
20	F	D	I	I	I	I	D	I	I	I	D	D	D	D	I	I	D	D	I	D				
21	F	I	F	I	I	F	D	F	I	D	I	D	I	I	I	I	I	I	I	I	I	D		
22	F	I	D	F	D	D	F	F	I	I	I	D	D	I	D	D	I	D	I	D	D	D	D	
23	I	D	F	D	F	I	D	I	I	I	D	D	I	I	I	D	I	I	I	I	D	D	D	
24	F	I	F	F	I	I	I	F	I	I	F	D	I	D	I	I	I	I	I	D	I	D	I	D

#### 8.4.1 Clases de incompatibilidad

Se identificaron las monoesporidias que tuvieron reacciones fuertes y se organizaron en grupos. En el Cuadro 19 se indican con un asterisco (\*) a las monoesporidias del tipo II que aparecen con más frecuencia con reacción fuerte cuando se cruzaron con las del tipo I.

**Cuadro 19.** Ubicación de monoesporidias de la cepa nativa de *Ustilago maydis* (CP-545) en sus dos clases de incompatibilidad.

Tipo I	Tipo II	Tipo I	Tipo II
<b>1</b>	14	5	18*
	18*		19*
	19*		23*
	20*	6	17
	21*		18*
	22*		21*
	24*	7	22*
<b>2</b>	-	8	17
<b>3</b>	21*		18*
	23		19*
	24*		21*
<b>4</b>	5		22*
	6		24*
	8	9	18*
	10	10	-
	11	11	24*
	12	12,13,14,15,16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24	-
	15		
	18*		
	22*		
	24*		

### 8.5 Dicariones seleccionados

Una vez identificadas las monoesporidias del tipo II de reacción fuerte que se presentaron con mayor frecuencia, se seleccionaron únicamente las que se repetían con las monoesporidias del tipo I, en el Cuadro 20 se puede observar el arreglo realizado. En los Cuadros 21 y 22 se describen las reacciones de las cruzas entre las monoesporidas de las mismas clases para confirmar su incompatibilidad entre ellas mismas.

**Cuadro 20.** Selección de las monoesporidias y ubicación en las dos clases de incompatibilidad de *Ustilago maydis*.

Se

Tipo I	Tipo II
1	18
3	19
4	21
6	22
8	24

seleccionaron las monoesporidias de reacción fuerte e intermedia que formaron dicariones intra-cepa y se caracterizaron a nivel de laboratorio.

**Cuadro 21.** Confirmación de cruzas entre monoesporidias del tipo I de la cepa CP-545 de *Ustilago maydis*.

Cruza	1	3	4	6	8
1	Sin reacción				
3	Reacción intermedia	Sin reacción			
4	Reacción intermedia	Reacción intermedia	Sin reacción		
6	Reacción intermedia	Reacción intermedia	Reacción fuerte	Sin reacción	
8	Reacción intermedia	Reacción débil	Reacción intermedia	Reacción intermedia	Sin reacción

**Cuadro 22.** Confirmación de cruzas entre monoesporidias del tipo II de la cepa CP-545 de *Ustilago maydis*.

	18	19	21	22	24
18	Sin reacción				
19	Reacción débil	Sin reacción			
21	Reacción intermedia	Reacción intermedia	Sin reacción		
22	Reacción débil	Reacción intermedia	Reacción débil	Sin reacción	
24	Reacción intermedia	Reacción intermedia	Reacción intermedia	Reacción débil	Sin reacción

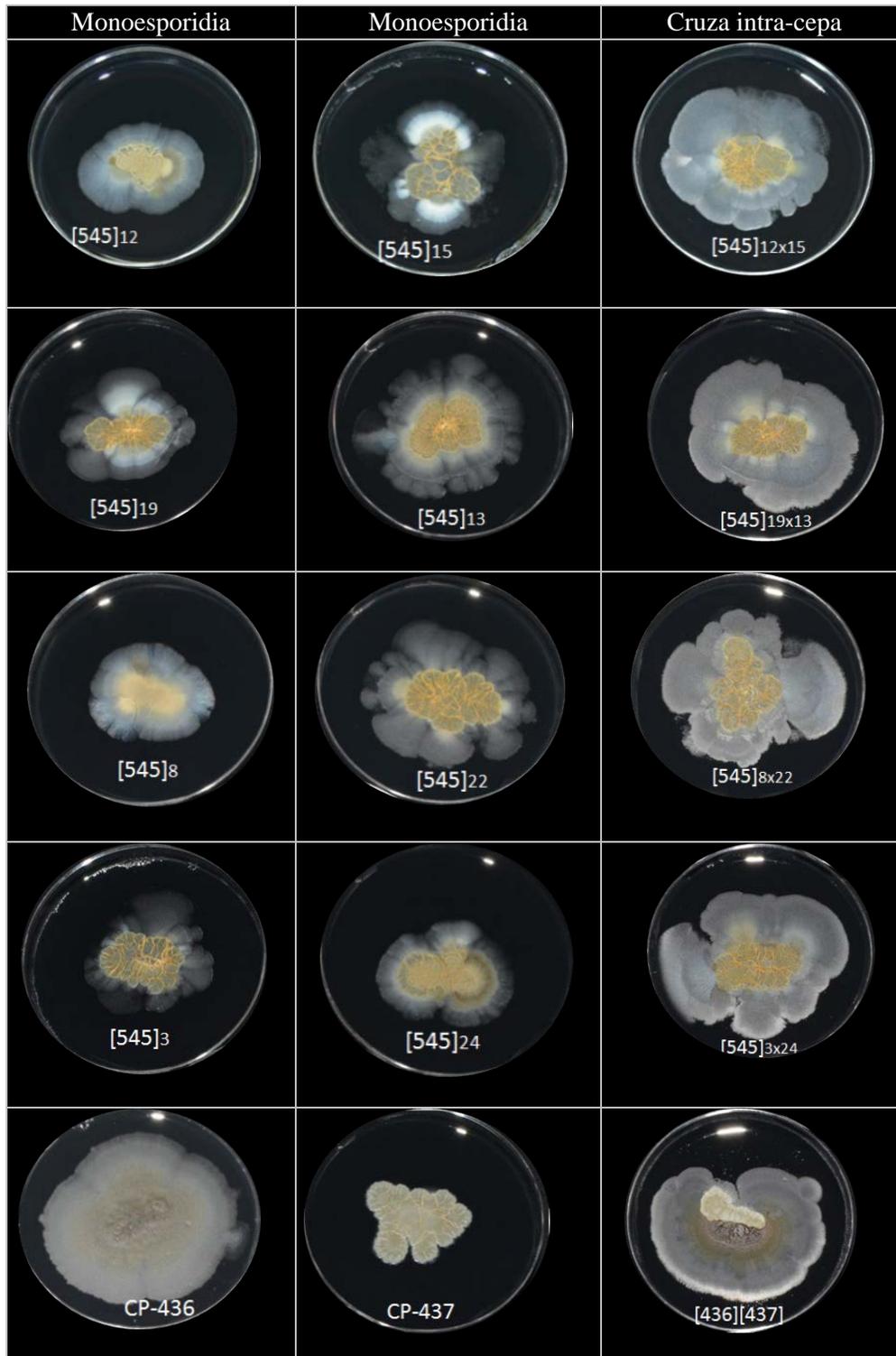
Con estas pruebas de confirmación entre monoesporidias de la misma clase se ubicaron los dicariones por tipo de reacción (Cuadro 23).

**Cuadro 23.** Dicariones formados de la cepa nativa CP-545 de *Ustilago maydis*.

Entrecruzamiento de monoesporidias (tipos I y II)	
Reacción débil	Reacción fuerte
3x22	1x24
6x22	3x21
Reacción intermedia	3x24
3x18	4x18
3x19	4x22
4x19	4x24
4x21	6x18
6x19	6x21
6x24	8x18
Reacción fuerte	8x19
1x18	8x21
1x19	8x22
1x21	8x24
1x22	

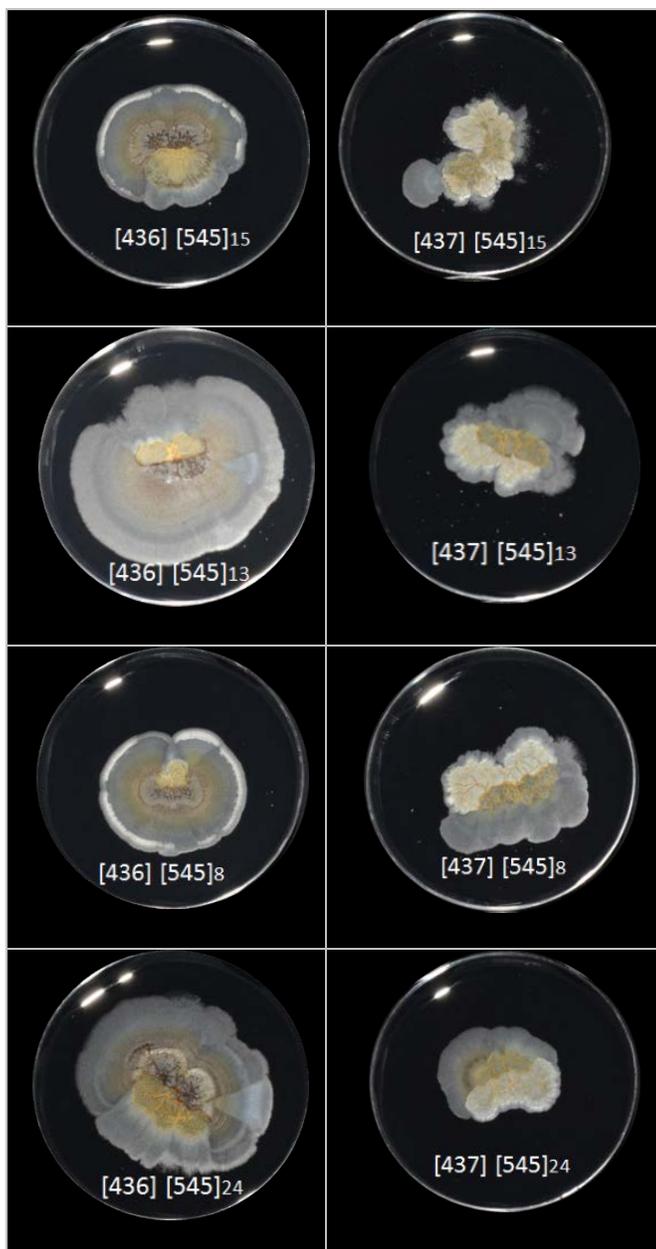
### 8.5.1 Por cruzamiento de monoesporidias en paralelo

Las cruza intra-cepa [545]<sub>15x12</sub> y [545]<sub>19x13</sub> confirmaron su reacción débil al no formar micelio entre ambas monoesporidias en PDA + C.A. 1%; en el caso de las cruza intra-cepa fuertes [545]<sub>8x22</sub>, [545]<sub>3x24</sub> y [436][437] se formaron dicariones patogénicos viables con potencial de infección de plantas comparado con la cruza [436][437], dicarion de referencia, formado con los tipos de referencia extranjeros. Para el caso de las monoesporidias débiles se pudo observar que su desarrollo fue más lento y sin formación de micelio, pero en algunos casos se presentó la formación en PDA + C.A. 1% (Fig. 39).



**Figura 39.** Monoesporidias y cruza intra-cepa de *Ustilago maydis* a los 24 días de incubación, en medio de cultivo agar papa dextrosa con carbón activado 1% (PDA+C.A. 1%).

Las monoesporidias [545]<sub>15</sub>, [545]<sub>13</sub>, [545]<sub>8</sub>, [545]<sub>24</sub> cuando se cruzaron en PDA + C.A. 1% con la cepa de referencia CP-437 (cruzas inter-cepas) su reacción fue débil, contrario cuando se cruzaron con la CP-436 (cruzas inter-cepas) ya que formaron dicariones con textura micelial probablemente patogénicos (Fig. 40).



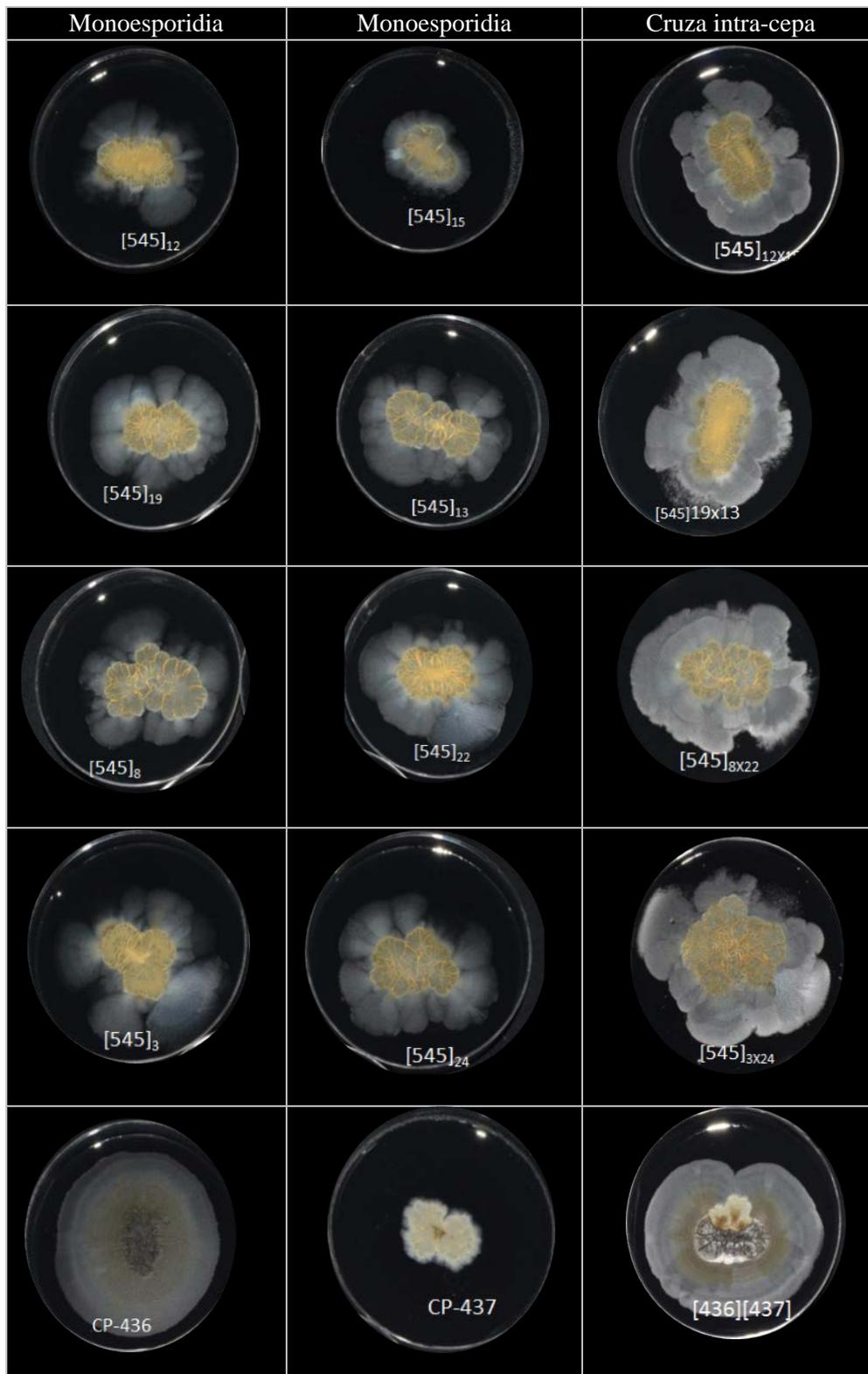
**Figura 40.** Cruzas inter-cepas de *Ustilago maydis* a los 24 días de incubación en medio de cultivo agar papa dextrosa con carbón activado 1% (PDA+C.A. 1%).

La reacción de las cruzas se observaron en la mayoría de los casos a las 24 horas, y con el paso de los días la consistencia del micelio cambió un poco ya que parecía perder vigor. Para el caso del multiesporidio nativo CP-545 de *U. maydis*, se pudo observar que su desarrollo no presentó la formación de micelio en PDA + C.A. 1% (Fig. 41).



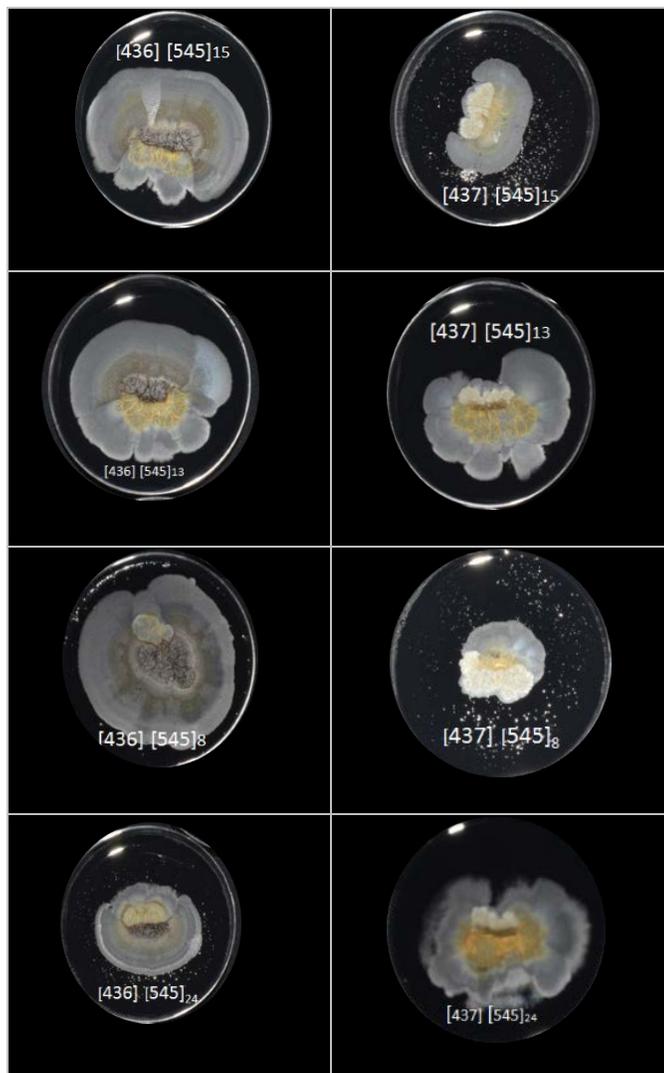
**Figura 41.** Multiesporidio de la cepa CP-545 de *Ustilago maydis* a los 24 días de incubación en medio de cultivo agar papa dextrosa con carbón activado 1% (PDA+C.A. 1%).

Tanto las cruzas, las monoesporidias y los multiesporidios a los 24 días de incubación creciendo en PDA + C.A. 1% + AAS 100  $\mu$ M, se muestran en la Figura 42. Las áreas de los dicariones fueron mayores que la de sus respectivas monoesporidias, así como la textura y el color de las colonias, mostrando micelio las cruzas intra-cepa que la colonia formada con los tipos de referencia en su cruce intra-cepa.



**Figura 42.** Monoesporidias y cruza intra-cepa de *Ustilago maydis* a los 24 días de incubación, en medio de cultivo agar papa dextrosa con carbón activado 1% y ácido acetilsalicílico 100  $\mu$ M (PDA+C.A. + AAS 100  $\mu$ M).

En cuanto a las cruzas inter-cepas las monoesporidias [545]<sub>15</sub>, [545]<sub>13</sub>, [545]<sub>8</sub>, [545]<sub>24</sub> con la cepa de referencia CP-437 su reacción fue débil, pero no así cuando se cruzaba con la CP-436 ya que formaron dicariones con apariencia patogénica en PDA + C.A. 1% AAS 100  $\mu$ M (Fig. 43).



**Figura 43.** Cruzas inter-cepas de *Ustilago maydis* a los 24 días de incubación en medio de cultivo agar papa dextrosa con carbón activado 1% y ácido acetilsalicílico 100  $\mu$ M (PDA+C.A. 1% + AAS 100  $\mu$ M).

La reacción de las cruzas se observaron en la mayoría de los casos a las 24 horas y con el paso de los días la consistencia del micelio perdiendo vigor. Para el caso del multiesporidio CP-545 se pudo observar que su desarrollo no presentó la formación de micelio en PDA + C.A. 1% + AAS 100  $\mu$ M (Fig. 44).

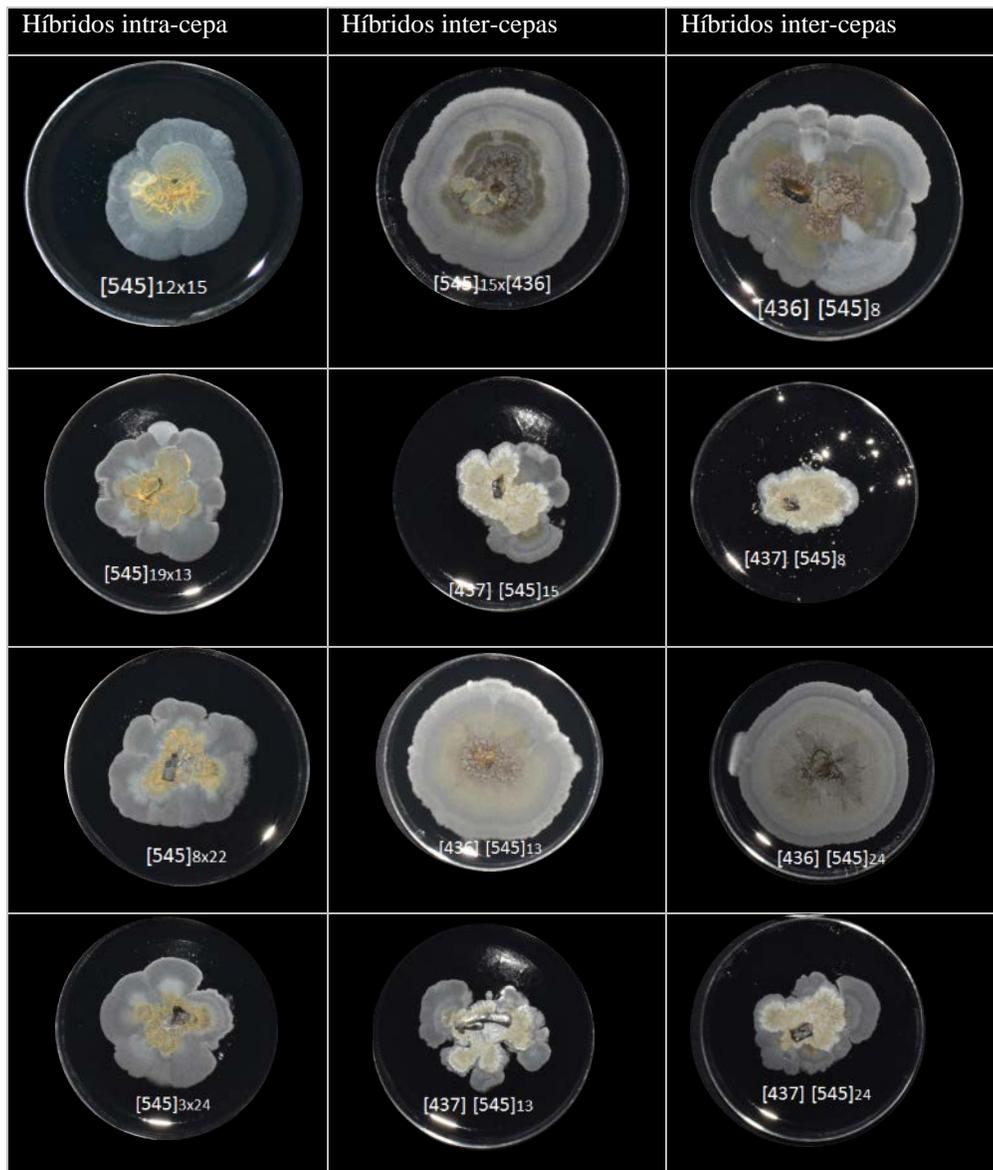


**Figura 44.** Multiesporidio de la cepa nativa CP-545 de *Ustilago maydis*, a los 24 días de incubación en medio de cultivo agar papa dextrosa con carbón activado 1% y ácido acetilsalicílico 100  $\mu$ M (PDA+C.A. 1% + AAS 100  $\mu$ M).

### 8.5.2 Por híbrido reaislado (HR)

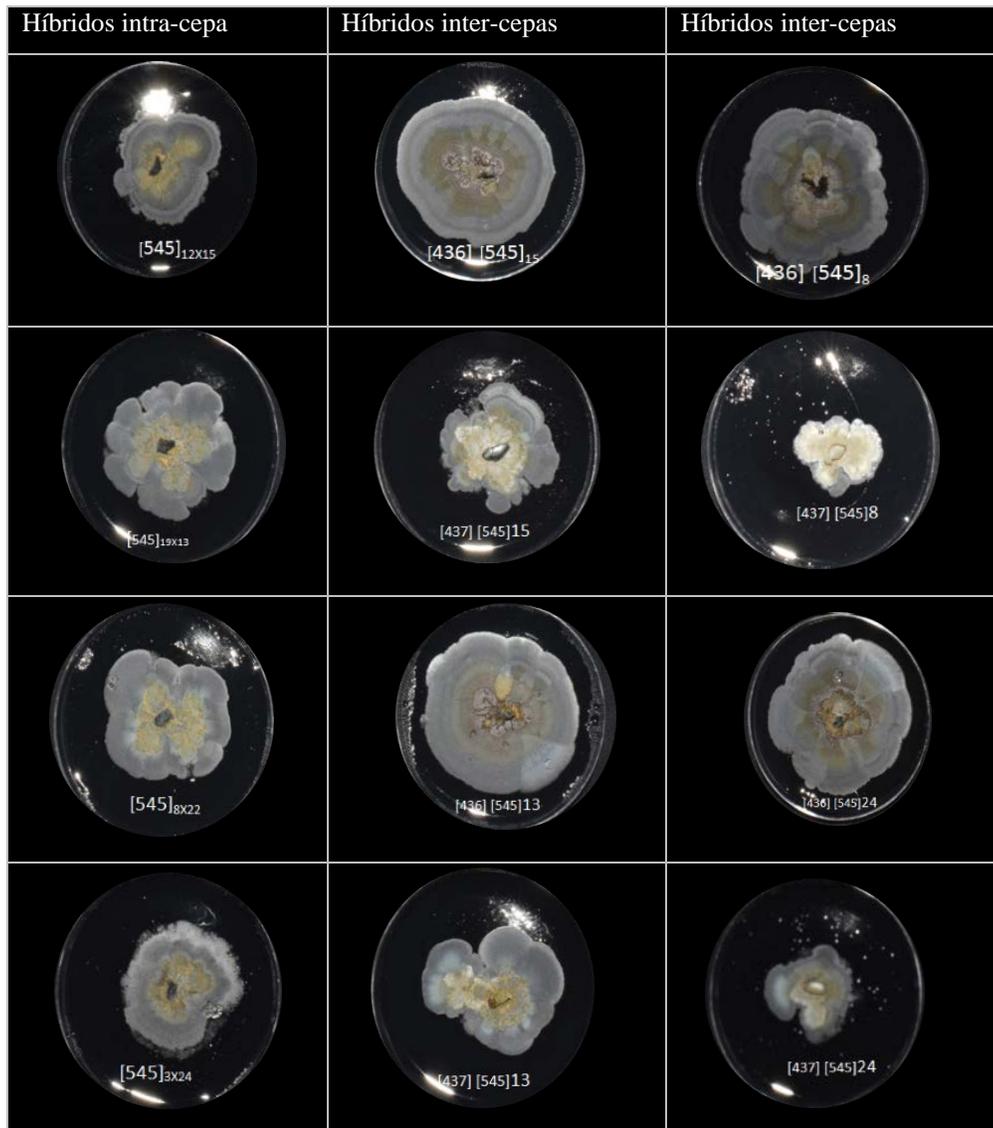
Se reaislaron un total de 13 híbridos con tres réplicas cada uno formados a partir de las cruces inter-cepas e intra-cepa, en ambas condiciones. Para el caso de los híbridos reaislados a partir de la zona de reacción de las cruces en medio PDA + C.A. 1%, se pudo observar que los que formaron micelio al ser reaislados lo mantuvieron después de sembrados, y también los que no formaron micelio mantuvieron esa característica. Todos fueron caracterizados en una cinética de 24 días, durante los cuales se les tomaron una serie de imágenes cada determinado tiempo para poder medir el área de crecimiento. En Figura N3 se pueden observar los híbridos reaislados en medio PDA + C.A. 1%.

En el caso de los híbridos reaislados a partir de la zona de reacción de las cruces que formaron micelio (dicariones virulentos) en medio PDA + C.A. 1% + AAS 100  $\mu$ M, se observó que mantenían su fase micelial, siendo los siguientes: Clave 3 ([545]<sub>8x22</sub>), Clave 4 ([545]<sub>3x24</sub>), Clave 5 ([436] [545]<sub>15</sub>), Clave 7 ([436] [545]<sub>13</sub>), Clave 9 ([436] [545]<sub>8</sub>), Clave 11 ([436] [545]<sub>24</sub>), Clave 13 ([CP-436] [CP-437]). Sin embargo, los híbridos que nunca formaron micelio se mantuvieron así al ser reaislados como dicariones, Clave 1 ([545]<sub>15x12</sub>), Clave 2 ([545]<sub>19x13</sub>), Clave 6 ([437] [545]<sub>15</sub>), Clave 8 ([437] [545]<sub>13</sub>), Clave 10 ([437] [545]<sub>8</sub>), Clave 12 ([437] [545]<sub>24</sub>), Clave 14 (CP-545). Todos fueron caracterizados durante 24 días para medir el área de crecimiento (Fig. 45).



**Figura 45.** Híbridos reaislados (HR) de *Ustilago maydis* en agar papa dextrosa con carbón activado 1% (PDA + C.A. 1%), a los 24 días de incubación a temperatura ambiente.

En Figura 46 se pueden observar los híbridos reaislados (HR) en medio PDA + C.A. 1% + AAS 100  $\mu$ M. Se observó que el desarrollo de algunas cepas fue más lento en el tratamiento que en el testigo.



**Figura 46.** Híbridos reaislados (HR) de *Ustilago maydis* en agar papa dextrosa con carbón activado 1% y ácido acetilsalicílico 100  $\mu$ M (PDA + C.A. 1% + AAS 100  $\mu$ M), a los 24 días de incubación a temperatura ambiente.

### 8.6 Caracterización del material biológico estudiado

Esta etapa se llevó acabo a los 25 días de incubación en ambas condiciones con el fin de obtener la mayor información del comportamiento de las monoesporidias, multiesporidios y cruza inter-cepas e intra-cepa de las cuales de obtuvieron los resultados que se detallan a continuación.

### 8.6.1 pH, temperatura, conductividad y resistividad

En el Cuadro 24 se muestran los valores de pH del material biológico caracterizado de *U. maydis* en medio de cultivo PDA + C.A. 1%, se observaron valores de pH de 5.6-5.9, la resistividad se presentó en rangos de 42-65 con temperaturas de 23-25°C. El pH a tiempo inicial fue de  $7.5 \pm 0.048$ , se observó que el desarrollo de las cepas disminuyó el pH pasando de ligeramente alcalino a ácido. A tiempo inicial el valor de la conductividad fue de  $3236.28 \pm 377.46$  y el de resistividad de  $191 \pm 20.55$ , variando estos datos al final de la cinética. La temperatura al momento de la toma de resultados estuvo en  $23.94 \pm 0.466$ .

**Cuadro 24.** Caracterización de diferentes recursos genéticos de *Ustilago maydis* en agar papa dextrosa (PDA + C.A. 1%), a los 25 días de incubación. CA= Carbón activado.

Registro	pH	Conductividad ( $\mu$ S)	Resistividad ( $\Omega$ )	Temperatura ( $^{\circ}$ C)
[545] <sub>15x12</sub>	5.7	9535.800	63.75	25
[545] <sub>19x13</sub>	5.7	12075.025	49.25	25.2
[545] <sub>8x22</sub>	5.6	11911.150	48.50	25.2
[545] <sub>3x24</sub>	5.7	12806.675	46.75	25.2
[436][545] <sub>15</sub>	5.7	10859.625	52.75	25.1
[437][545] <sub>15</sub>	5.7	10519.750	58.5	25.2
[436][545] <sub>13</sub>	5.7	12594.175	46.25	23.3
[437][545] <sub>13</sub>	5.7	12396.125	47.5	25.3
[436][545] <sub>8</sub>	5.7	11153.625	53.25	25.5
[437][545] <sub>8</sub>	5.7	12671.525	46.75	23.7
[436][545] <sub>24</sub>	5.7	10589.525	56.75	23.8
[437][545] <sub>24</sub>	5.7	11827.775	49.75	23.8
[436][437]	5.7	10642.175	58	24.0
CP-545	5.7	25018.500	45.75	24.1
[545] <sub>15</sub>	5.9	13795.600	42.75	24.1
[545] <sub>12</sub>	5.7	10121.025	59	24.3
[545] <sub>19</sub>	5.7	12703.525	46.25	24.5
[545] <sub>13</sub>	5.7	11072.250	53	24.5
[545] <sub>8</sub>	5.7	11043.175	53.0	24.5
[545] <sub>22</sub>	5.7	11804.300	49.50	24.5
[545] <sub>3</sub>	5.7	11669.875	49.50	24.5
[545] <sub>24</sub>	5.7	8778.175	69	24.5
CP-436	5.7	13577.250	42.50	24.5
CP-437	5.7	11538.425	50	24.5

En el Cuadro 25 se muestran los valores de pH del material biológico caracterizado de *U. maydis* en medio de cultivo PDA + C.A. 1% + AAS 100  $\mu$ M, se observó un pH ligeramente más ácido de 5.4-5.5 a los 25 días de incubación, la resistividad también fue menor que el testigo, en rangos de 40-54 con una temperatura de 25°C. El pH a tiempo cero fue de  $7.07 \pm$

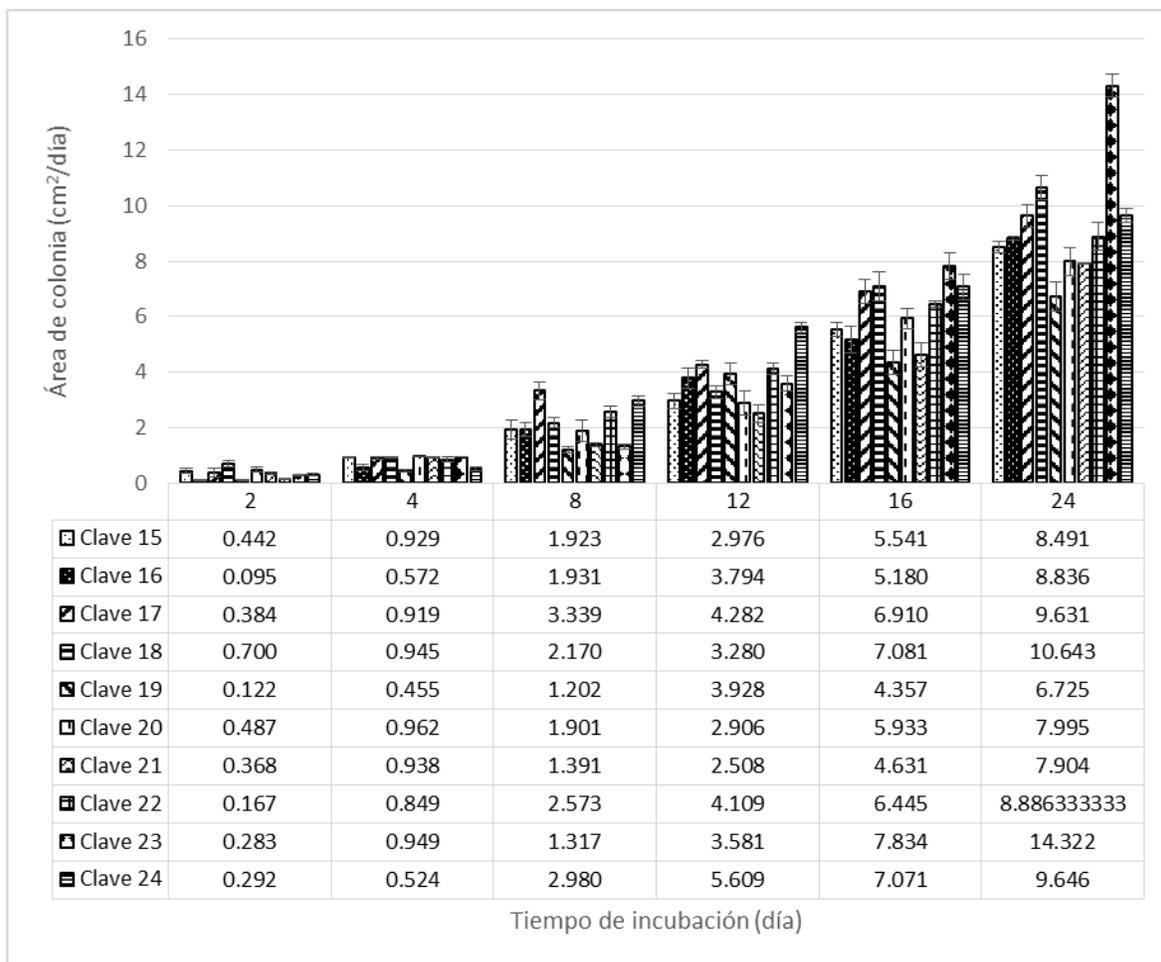
0.036, se observó que el desarrollo de las cepas disminuyó el pH. A tiempo inicial el valor de la conductividad fue de  $3149.22 \pm 1320.7$  y el de resistividad de  $208.6 \pm 68.42$ , variando estos datos al final de la cinética. La temperatura al momento de la toma de resultados fue de  $24.5 \pm 0.596$ .

**Cuadro 25.** Caracterización de diferentes recursos genéticos de *Ustilago maydis* en agar papa dextrosa con ácido acetilsalicílico (PDA + C.A. 1% + AAS 100  $\mu$ M), a los 25 días de incubación. CA= Carbón activado.

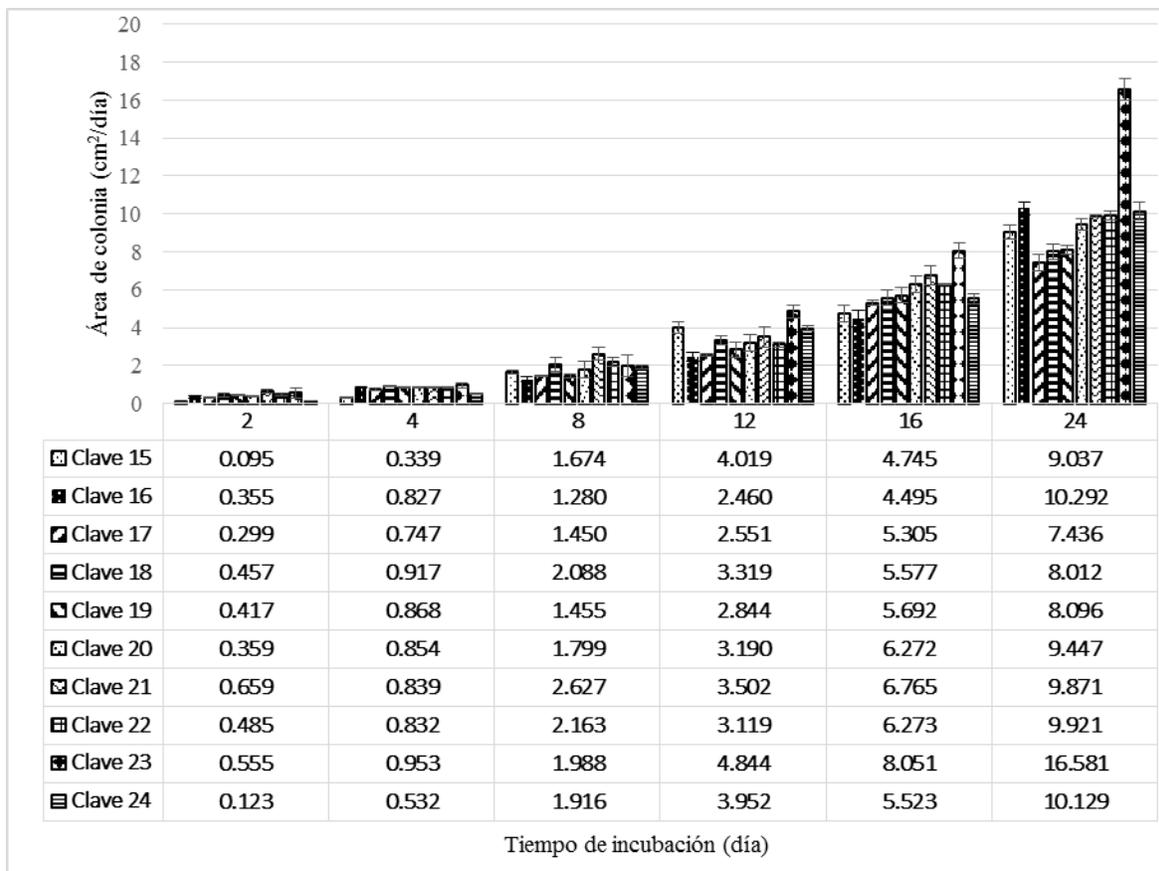
Registro	pH	Conductividad ( $\mu$ S)	Resistividad ( $\Omega$ )
[545] <sub>15x12</sub>	5.5	10581.600	54.50
[545] <sub>19x13</sub>	5.5	10721.300	53.25
[545] <sub>8x22</sub>	5.48	10629.400	52.75
[545] <sub>3x24</sub>	5.48	12033.950	47.75
[436][545] <sub>15</sub>	5.51	11703.950	49
[437][545] <sub>15</sub>	5.5	11126.875	52
[436][545] <sub>13</sub>	5.5	11751.850	49.25
[437][545] <sub>13</sub>	5.46	11321.375	51.0
[436][545] <sub>8</sub>	5.52	10990.525	51.25
[437][545] <sub>8</sub>	5.52	11511.100	49.5
[436][545] <sub>24</sub>	5.51	13483.375	40.25
[437][545] <sub>24</sub>	5.48	11584.200	50.5
[436][437]	5.51	11257.625	50.75
CP-545	5.47	11625.675	49.5
[545] <sub>15</sub>	5.5	11334.175	50.75
[545] <sub>12</sub>	5.47	11305.300	50.75
[545] <sub>19</sub>	5.51	12140.575	47.75
[545] <sub>13</sub>	5.51	11391.900	49.75
[545] <sub>8</sub>	5.47	11546.150	49.75
[545] <sub>22</sub>	5.5	15466.250	35.75
[545] <sub>3</sub>	5.5	11745.900	47.75
[545] <sub>24</sub>	5.56	10836.300	52.75
CP-436	5.48	12637.650	46.25
CP-437	5.50	11923.475	48.75

### 8.6.2 Área de crecimiento (cm<sup>2</sup>/día)

En la Figura 47 se muestra el área de crecimiento de las monoesporidias de *U. maydis* (CP-545) del testigo (PDA+C.A. 1%), y en la Figura 48, el área de crecimiento de las monoesporidias en el tratamiento (PDA+C.A. 1%+ AAS 100  $\mu$ M). El área de crecimiento en presencia de AAS 100  $\mu$ M fue en la mayoría de los casos mayor que en el testigo, a los 24 días de incubación. La cruz con Clave 23 presentó un área de 14.32 cm<sup>2</sup> en el testigo, y en el tratamiento presentó un área de 16.58 cm<sup>2</sup>, casi un 15% más de área de crecimiento.

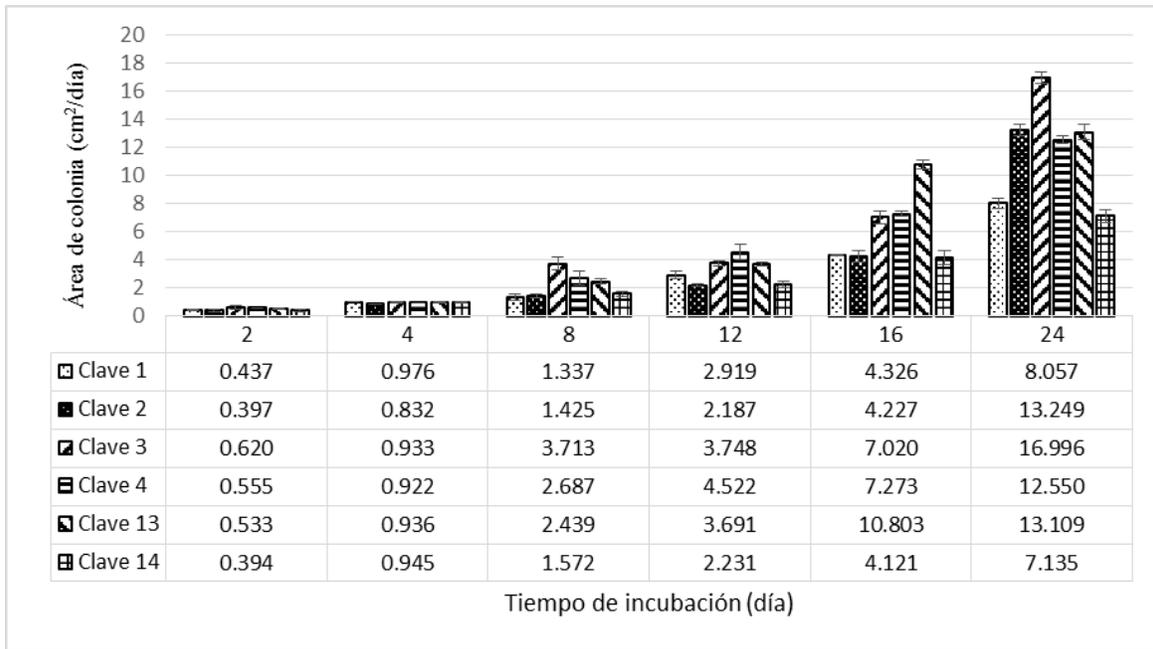


**Figura 47.** Área de crecimiento (cm<sup>2</sup>/día) de las monoesporidias de *Ustilago maydis* (CP-545) usando PDA + C.A. 1% (Testigo), a los 24 días de incubación. Clave 15 ([545]<sub>15</sub>), Clave 16 ([545]<sub>12</sub>), Clave 17 ([545]<sub>19</sub>), Clave 18 ([545]<sub>13</sub>), Clave 19 ([545]<sub>8</sub>), Clave 20 ([545]<sub>22</sub>), Clave 21 ([545]<sub>3</sub>), Clave 22 ([545]<sub>24</sub>), Clave 23 (CP-436), Clave 24 (CP-437). CA= Carbón activado.

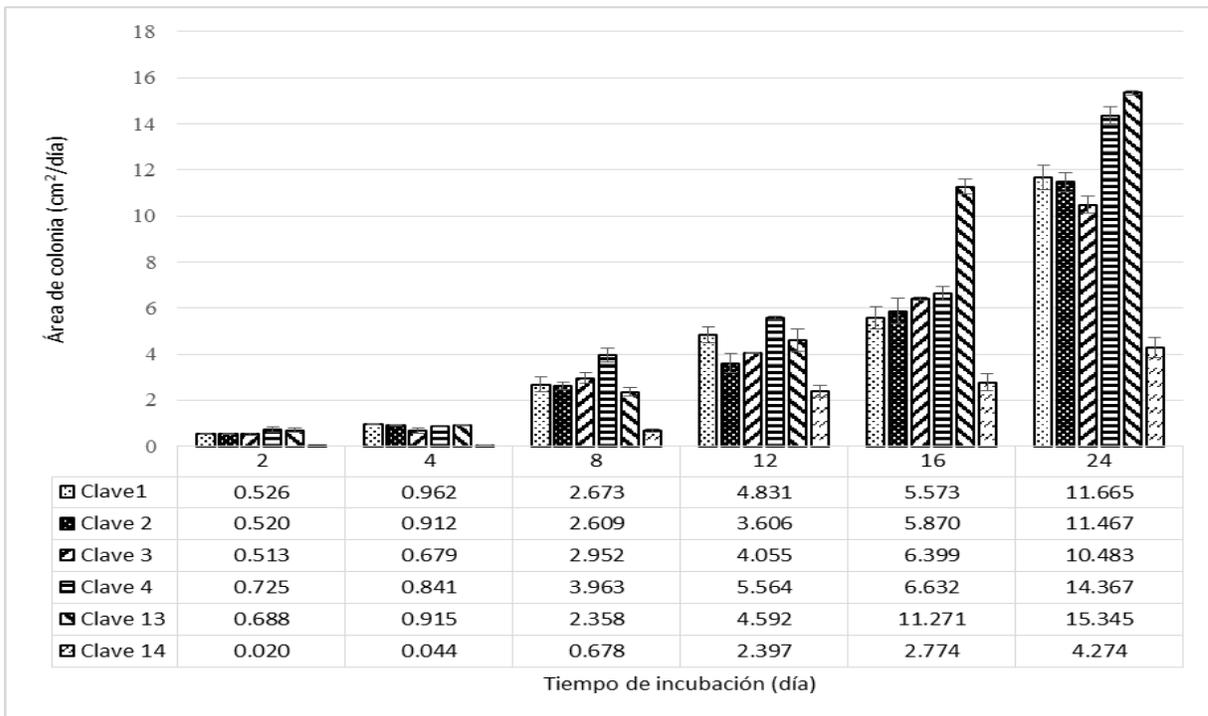


**Figura 48.** Área de crecimiento (cm<sup>2</sup>/día) de las monoesporidias de *Ustilago maydis* (CP-545) usando PDA + C.A. 1% + AAS 100 μM (Tratamiento), a los 24 días de incubación. Clave 15 ([545]<sub>15</sub>), Clave 16 ([545]<sub>12</sub>), Clave 17 ([545]<sub>19</sub>), Clave 18 ([545]<sub>13</sub>), Clave 19 ([545]<sub>8</sub>), Clave 20 ([545]<sub>22</sub>), Clave 21 ([545]<sub>3</sub>), Clave 22 ([545]<sub>24</sub>), Clave 23 (CP-436), Clave 24 (CP-437). CA= Carbón activado.

En la Figura 49 se muestra el área de crecimiento de las cruza intra-cepa de las monoesporidias de *U. maydis* (CP-545) creciendo en la condición testigo (PDA+C.A. 1%). y en la Figura 50 el área de crecimiento de las monoesporidias en el tratamiento (PDA+C.A. 1% + AAS 100 μM). El área de crecimiento en presencia de AAS 100 μM fue en la mayoría de los casos mayor que en el testigo. A los 24 días de incubación la cruza con Clave 13 presentó un área de 13.11 cm<sup>2</sup>, y en el tratamiento presentó un área de 15.34 cm<sup>2</sup>, presentando también un incremento de un 15% de área de la colonia.

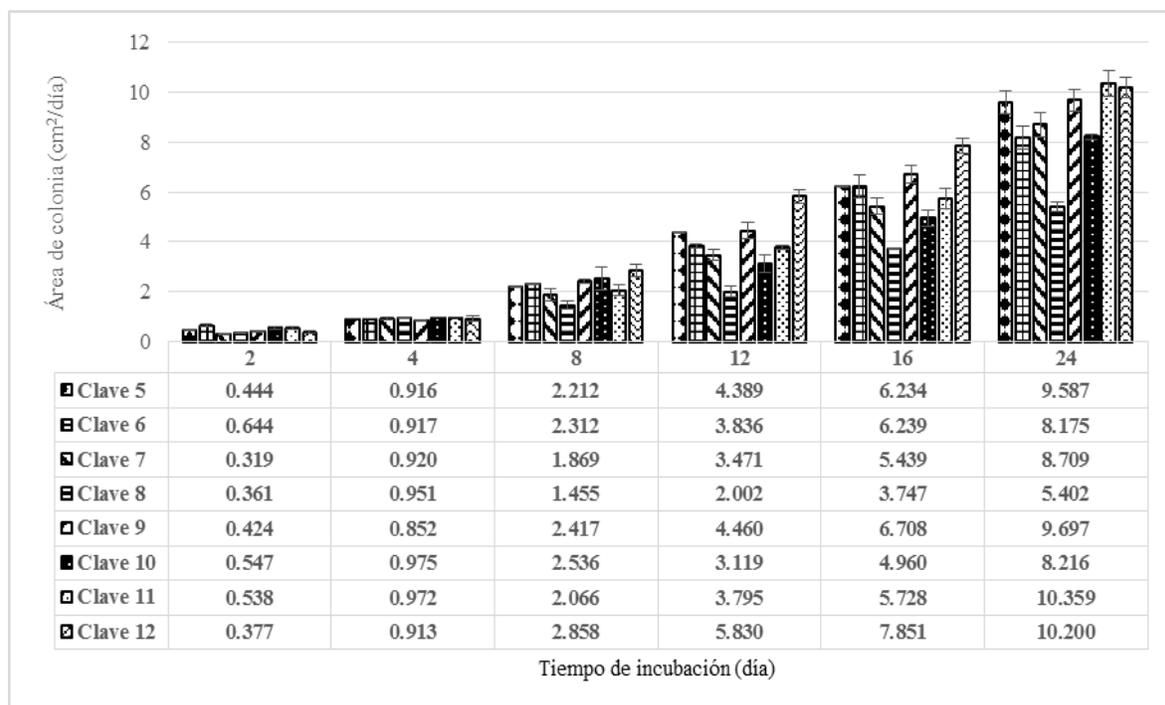


**Figura 49.** Área de crecimiento ( $\text{cm}^2/\text{día}$ ) de las cruza intra-cepa de *Ustilago maydis* (CP-545) usando PDA + C.A. 1% (Testigo), a los 24 días de incubación. Clave 1([545]<sub>15x12</sub>), Clave 2([545]<sub>19x13</sub>), Clave 3([545]<sub>8x22</sub>), Clave 4([545]<sub>3x24</sub>), Clave 13 ([CP-436] [CP-437]) y la Clave 14 CP-545. CA= Carbón activado.

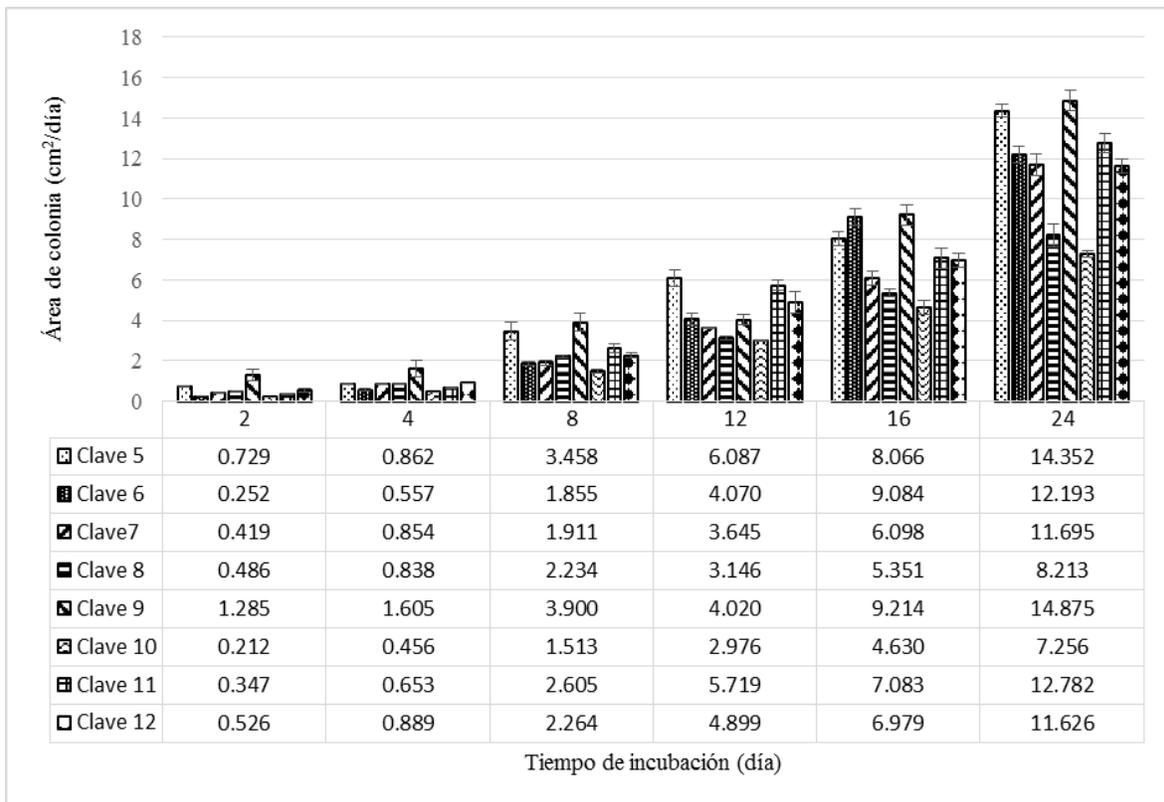


**Figura 50.** Área de crecimiento ( $\text{cm}^2/\text{día}$ ) de las cruza intra-cepa de *Ustilago maydis* (CP-545) usando PDA + C.A. 1% + AAS 100  $\mu\text{M}$ , a los 24 días de incubación. Clave 1([545]<sub>15x12</sub>), Clave 2([545]<sub>19x13</sub>), Clave 3([545]<sub>8x22</sub>), Clave 4([545]<sub>3x24</sub>), Clave 13 ([CP-436] [CP-437]) y la Clave 14 CP-545. CA= Carbón activado.

En la Figura 51 se muestra el área de crecimiento de las cruzas inter-cepas de las monoesporidias de *U. maydis* (CP-545) del testigo (PDA+C.A. 1%) y en la Figura 52 el área de crecimiento de las cruzas inter-cepas en el tratamiento (PDA+C.A. 1% + AAS 100  $\mu$ M). El área de crecimiento en presencia de AAS 100  $\mu$ M fue en la mayoría de los casos mayor que en PDA testigo. A los 24 días de incubación la cruz con Clave 9 presento un área de 9.70 cm<sup>2</sup>, el tratamiento un área de 14.87 cm<sup>2</sup>, representando casi un 65% más de área. Se observó una mayor área de crecimiento en *Ustilago maydis* (CP-545) en medio de cultivo PDA con la adición de AAS 100  $\mu$ M.

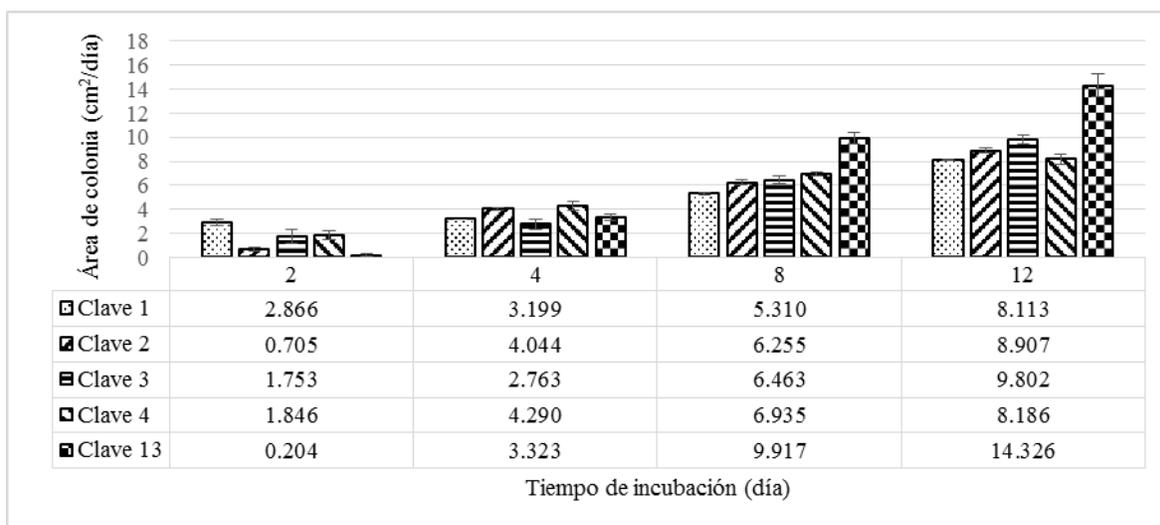


**Figura 51.** Área de crecimiento (cm<sup>2</sup>/día) de las cruzas inter-cepas en la condición testigo de *Ustilago maydis* (CP-545) usando PDA + C.A. 1%, a los 24 días de incubación. Clave 5 ([436] [545]<sub>15</sub>), Clave 6 ([437] [545]<sub>15</sub>), Clave 7 ([436] [545]<sub>13</sub>), Clave 8 ([437] [545]<sub>13</sub>), Clave 9 ([436] [545]<sub>8</sub>), Clave 10 ([437] [545]<sub>8</sub>), Clave 11 ([436] [545]<sub>24</sub>), Clave 12 ([437] [545]<sub>24</sub>). CA= Carbón activado.

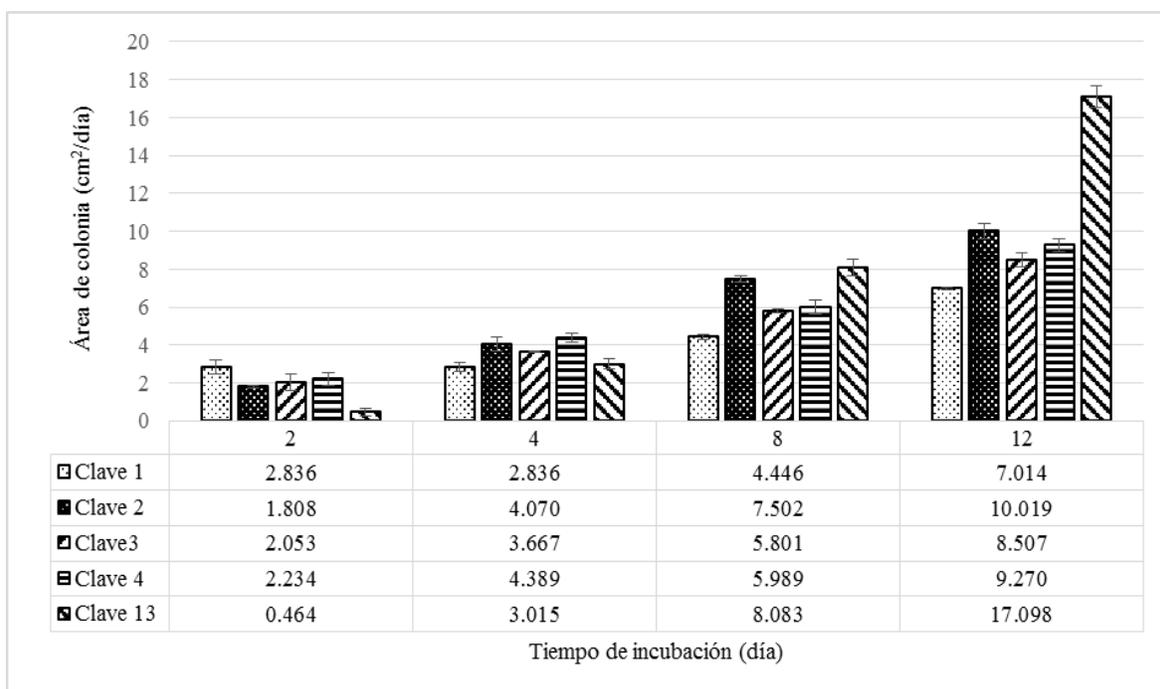


**Figura 52.** Área de crecimiento ( $\text{cm}^2/\text{día}$ ) de las cruza inter-cepas en la condición de tratamiento de *Ustilago maydis* (CP-545) usando PDA + C.A. + AAS  $100 \mu\text{M}$ , a los 24 días de incubación. Clave 5 ([436] [545]<sub>15</sub>), Clave 6 ([437] [545]<sub>15</sub>), Clave 7 ([436] [545]<sub>13</sub>), Clave 8 ([437] [545]<sub>13</sub>), Clave 9 ([436] [545]<sub>8</sub>), Clave 10 ([437] [545]<sub>8</sub>), Clave 11 ([436] [545]<sub>24</sub>), Clave 12 ([437] [545]<sub>24</sub>). CA= Carbón activado.

La Figura 53 muestra el área de crecimiento de las híbridos intra-cepa de *U. maydis* (CP-545) en el testigo (PDA+C.A. 1%), y en la Figura 54 el área de crecimiento de los híbridos intra-cepa en el tratamiento (PDA+C.A. 1% + AAS  $100 \mu\text{M}$ ). El área de crecimiento en presencia de AAS  $100 \mu\text{M}$  fue en la mayoría de los casos mayor que en el tratamiento, a los 24 días de incubación. En condición testigo la cruza con Clave 9 presentó un área de  $14.326 \text{ cm}^2$ , y en el tratamiento un área de  $17.098 \text{ cm}^2$ , más de un 16% de área por efecto de AAS.

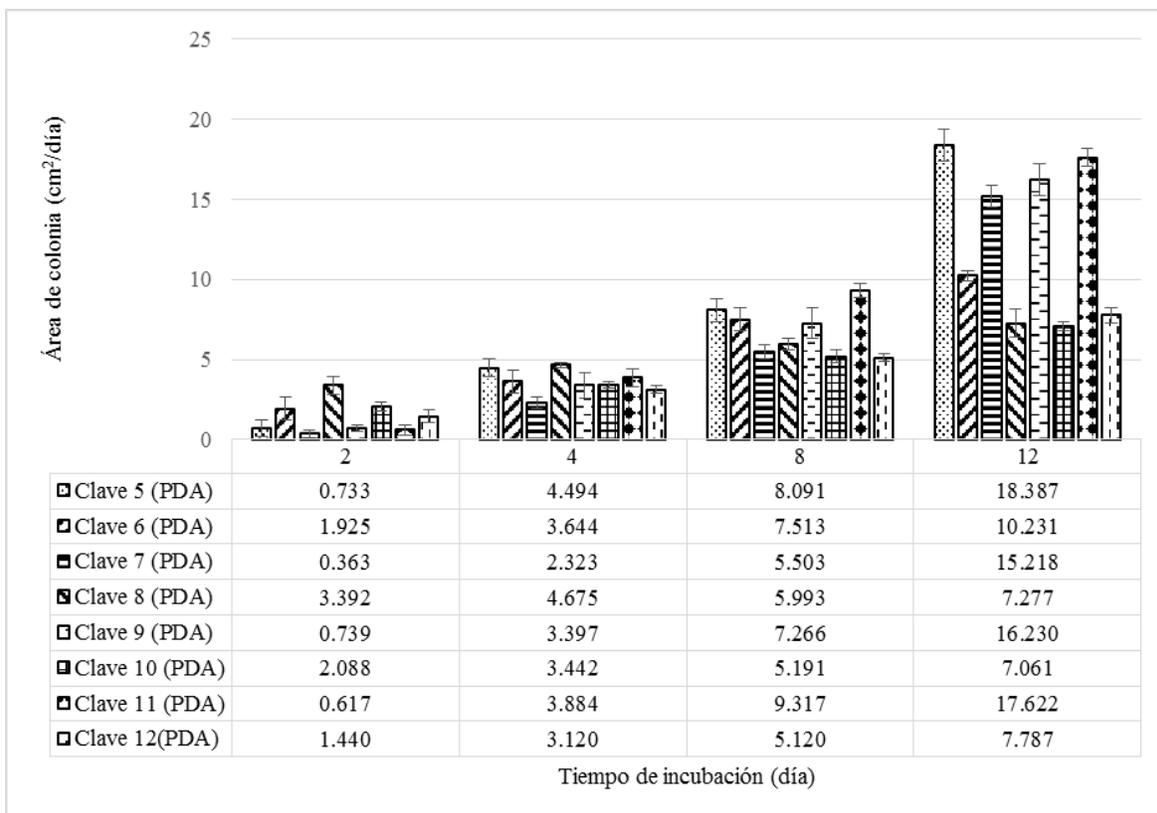


**Figura 53.** Área de crecimiento ( $\text{cm}^2/\text{día}$ ) de los híbridos intra-cepa de *Ustilago maydis* (CP-545) usando PDA + C.A. 1% (Testigo), a los 24 días de incubación. Clave 1([545]<sub>15x12</sub>), Clave 2([545]<sub>19x13</sub>), Clave 3([545]<sub>8x22</sub>), Clave 4([545]<sub>3x24</sub>), Clave 13 ([CP-436] [CP-437]). CA= Carbón activado.

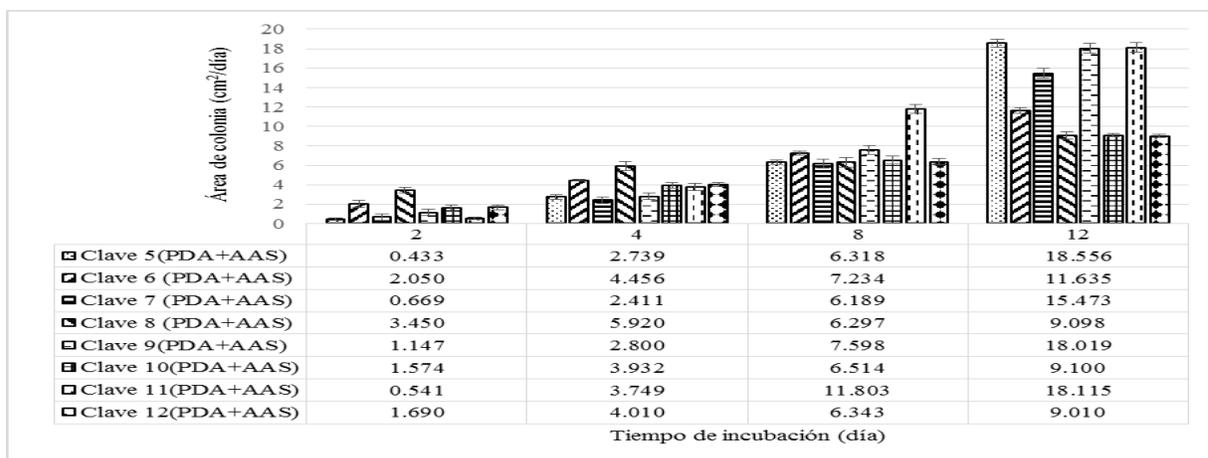


**Figura 54.** Área de crecimiento ( $\text{cm}^2/\text{día}$ ) de los híbridos intra-cepa de *Ustilago maydis* (CP-545) usando PDA + C.A. 1% + AAS 100  $\mu\text{M}$  (Tratamiento), a los 24 días de incubación. Clave 1([545]<sub>15x12</sub>), Clave 2([545]<sub>19x13</sub>), Clave 3([545]<sub>8x22</sub>), Clave 4([545]<sub>3x24</sub>), Clave 13 ([CP-436] [CP-437]). CA= Carbón activado.

En la Figura 55 se muestra el área de crecimiento de los híbridos inter-cepas de *U. maydis* (CP-545) creciendo en el testigo (PDA+C.A. 1%) y en la Figura 56 el área de crecimiento de los mismos híbridos creciendo en el tratamiento (PDA+C.A.1% + AAS 100  $\mu$ M). El área de crecimiento en presencia de AAS 100  $\mu$ M también fue en la mayoría de los casos mayor que en el testigo, a los 24 días de incubación. La cruza con Clave 9 presentó un área de 18.386  $\text{cm}^2$ , y en el tratamiento presentó un área de 18.556  $\text{cm}^2$ , con una breve diferencia.



**Figura 55.** Área de crecimiento ( $\text{cm}^2/\text{día}$ ) de los híbridos inter-cepas de *Ustilago maydis* (CP-545) usando PDA + C.A.1% (Testigo), a los 24 días de incubación. Clave 5 ([436] [545]<sub>15</sub>), Clave 6 ([437] [545]<sub>15</sub>), Clave 7 ([436] [545]<sub>13</sub>), Clave 8 ([437] [545]<sub>13</sub>), Clave 9 ([436] [545]<sub>8</sub>), Clave 10 ([437] [545]<sub>8</sub>), Clave 11 ([436] [545]<sub>24</sub>), Clave 12 ([437] [545]<sub>24</sub>). CA= Carbón activado.



**Figura 56.** Área de crecimiento ( $\text{cm}^2/\text{día}$ ) de los híbridos inter-cepas de *Ustilago maydis* (CP-545) usando PDA + C.A. 1% + AAS 100  $\mu\text{M}$  (Tratamiento), a los 24 días de incubación. Clave 5 ([436] [545]<sub>15</sub>), Clave 6 ([437] [545]<sub>15</sub>), Clave 7 ([436] [545]<sub>13</sub>), Clave 8 ([437] [545]<sub>13</sub>), Clave 9 ([436] [545]<sub>8</sub>), Clave 10 ([437] [545]<sub>8</sub>), Clave 11 ([436] [545]<sub>24</sub>), Clave 12 ([437] [545]<sub>24</sub>). CA= Carbón activado.

### 8.7 Análisis estadístico

En el Cuadro 26 se observó la formación de 38 grupos de un total de 74 materiales analizados con tres réplicas cada uno, el análisis varianza y de comparación de medias por Tukey con una significancia de 0.05, diferenciar la velocidad de crecimiento por día del material biológico caracterizado (cruzas inter-cepas e intra-cepa, híbridos reaislados intra-cepa e inter-cepas, multiesporidios y monoesporidios). Dentro de los grupos formados en base a la velocidad de crecimiento del material biológico sometido a esta caracterización, se puede concluir que en el grupo *a*, hubo tres HR inter-cepas cultivados en PDA+ C.A. 1% + AAS 100  $\mu\text{M}$  y sólo uno HR inter-cepas en PDA + C.A. 1% (testigo), la mayoría de cruzas se encontraron a partir del grupo 7 *cdefg*, y finalmente, en el último grupo *z* se encontró el multiesporico CP-545 en PDA + C.A. 1%, con una velocidad de crecimiento de 0.018  $\text{cm}^2/\text{día}$ .

Se pudo observar que la velocidad de crecimiento del híbrido reaislado (HR) inter-cepas [436][545]<sub>15</sub> tuvo una velocidad de crecimiento de 0.773  $\text{cm}^2/\text{día}$  en PDA+C.A. 1% + AAS 100  $\mu\text{M}$ , en comparación con su craza (C) inter-cepas [436][545]<sub>15</sub> en las mismas condiciones, con un crecimiento de 0.399  $\text{cm}^2/\text{día}$ , por lo que el híbrido reaislado fue más rápido que su craza casi un 50% más de velocidad de crecimiento, ubicando al HR en el grupo *a* y a la craza en los grupos *mnopqrstuv*. En cuanto a los testigos (PDA+C.A. 1%) del mismo material biológico observamos lo siguiente: el híbrido reaislado inter-cepas [436][545]<sub>15</sub> presentó una velocidad de crecimiento de 0.766  $\text{cm}^2/\text{día}$ , en comparación con su craza en las mismas

condiciones, con un crecimiento de 0.598 cm<sup>2</sup>/día, también se observó que el híbrido reaislado fue más rápido encontrándose en el grupo *a*, y la cruza en los grupos *defgh* (Cuadro 26). La cruza de referencia [436][437] se ubicó en cuatro grupos, los cuales fueron diferentes significativamente, en PDA + C.A. 1% con una velocidad de crecimiento de 0.639 cm<sup>2</sup>/día formo parte del grupo *bcd*e, en comparación con la condición de tratamiento (PDA+ C.A. 1% + AAS 100 μM) con una velocidad de crecimiento de 0.546 cm/día ubicándose en el grupo *efghi*, con esto podemos concluir que el uso de ácido en la cruza de referencia se incrementó la velocidad de crecimiento. Para el HR de referencia en el tratamiento (PDA+ C.A. 1% + AAS 100 μM) tuvo una velocidad de crecimiento de 0.712 cm<sup>2</sup>/día, formó parte del grupo *abc*, en comparación cuando creció en el testigo (PDA+ C.A. 1%), con una velocidad de crecimiento de 0.597 cm<sup>2</sup>/día formando parte del grupo *defgh*.

**Cuadro 26.** Determinación del área de crecimiento (cm<sup>2</sup>/día) de monoesporidias, cruzas e híbridos reaislados, y la infección de *Ustilago maydis* en una prueba piloto en invernadero.

Material biológico	Descripción	Condiciones	Área de crecimiento			Reacción de la cruza	Infección (n= 3)
			Media	Error	Grupos		
[436][545] <sub>15</sub>	HR inter	AAS 100 μM	0.773	0.017	A	Fuerte	√
[436][545] <sub>15</sub>	HR inter	T	0.766	0.023	A	Fuerte	√
[436][545] <sub>24</sub>	HR inter	AAS 100 μM	0.755	0.021	A	Fuerte	√
[436][545] <sub>8</sub>	HR inter	AAS 100 μM	0.751	0.021	A	Fuerte	√
[436][545] <sub>24</sub>	HR inter	T	0.734	0.023	AB	Fuerte	√
[436][437]	HR referencia	AAS 100 μM	0.712	0.023	ABC	Intermedia	√
[545] <sub>8x22</sub>	Cruza intra	AAS 100 μM	0.708	0.018	ABC	Fuerte	√
CP-436	Tipo de referencia	T	0.691	0.024	ABCD	Débil	
[436][545] <sub>8</sub>	HR inter	T	0.676	0.024	ABCD	Fuerte	
[436][545] <sub>13</sub>	HR inter	AAS 100 μM	0.645	0.021	BCDE	Fuerte	√
[436][437]	Cruza referencia	T	0.639	0.004	BCDE	Intermedia	√
[436][545] <sub>13</sub>	HR inter	T	0.634	0.016	BCDEF	Fuerte	√
[436][545] <sub>8</sub>	Cruza inter	T	0.620	0.020	CDEFG	Fuerte	
[545] <sub>3x24</sub>	Cruza intra	T	0.599	0.016	DEFGH	Fuerte	
[436][545] <sub>15</sub>	Cruza inter	T	0.598	0.014	DEFGH	Fuerte	
[436][437]	HR referencia	T	0.597	0.023	DEFGH	Intermedia	√
CP-436	Tipo de referencia	AAS 100 μM	0.597	0.018	DEFGH	Débil	
[545] <sub>19x13</sub>	Cruza intra	AAS 100 μM	0.552	0.016	EFGHI	Débil	
[436][437]	Cruza referencia	AAS 100 μM	0.546	0.022	EFGHI	Intermedia	√
[436][545] <sub>24</sub>	Cruza inter	T	0.533	0.019	FGHIJ	Fuerte	√
[545] <sub>3x24</sub>	Cruza intra	AAS 100 μM	0.523	0.010	GHIJK	Fuerte	

[437][545] <sub>15</sub>	Cruza inter	T	0.508	0.017	HIJKL	Débil	
[436][545] <sub>13</sub>	Cruza inter	T	0.487	0.022	IJKLM	Fuerte	√
[545] <sub>15x12</sub>	Cruza intra	T	0.486	0.022	IJKLM	Débil	
[437][545] <sub>15</sub>	HR inter	AAS 100 µM	0.485	0.013	IJKLM	Débil	
[437][545] <sub>24</sub>	Cruza inter	T	0.484	0.015	IJKLM	Débil	
[545] <sub>19x13</sub>	Cruza intra	T	0.478	0.017	IJKLMN	Débil	
[545] <sub>13</sub>	Monoesporidia	AAS 100 µM	0.443	0.018	JKLMNO	Débil	
[545] <sub>8x22</sub>	Cruza intra	T	0.437	0.016	JKLMNOP	Fuerte	√
[436][545] <sub>24</sub>	Cruza inter	AAS 100 µM	0.432	0.021	JKLMNOPQ	Fuerte	√
[545] <sub>12</sub>	Monoesporidia	T	0.429	0.014	KLMNOPQR	Débil	
[437][545] <sub>15</sub>	Cruza inter	T(HR)	0.426	0.008	KLMNOPQRS	Débil	
[437][545] <sub>24</sub>	Cruza inter	AAS 100 µM	0.425	0.018	KLMNOPQRS	Débil	
CP-437	Tipo de referencia	T	0.422	0.019	KLMNOPQRS	Débil	
[545] <sub>19x13</sub>	HR intra	AAS 100 µM	0.417	0.017	LMNOPQRS	Débil	
[545] <sub>24</sub>	Monoesporidia	T	0.413	0.010	LMNOPQRS	Débil	
[545] <sub>3</sub>	Monoesporidia	T	0.411	0.003	LMNOPQRST	Débil	
[545] <sub>8x22</sub>	HR intra	T	0.408	0.017	LMNOPQRSTU	Fuerte	√
[436][545] <sub>8</sub>	Cruza inter	AAS 100 µM	0.404	0.018	MNOPQRSTUV	Fuerte	√
CP-437	Tipo de referencia	AAS 100 µM	0.402	0.011	MNOPQRSTUV	Débil	
[545] <sub>19</sub>	Monoesporidia	AAS 100 µM	0.401	0.017	MNOPQRSTUV	Débil	
[436][545] <sub>15</sub>	Cruza inter	AAS 100 µM	0.399	0.019	MNOPQRSTUV	Fuerte	√
[545] <sub>22</sub>	Monoesporidia	T	0.394	0.013	MNOPQRSTUVW	Débil	
[545] <sub>3x24</sub>	HR intra	AAS 100 µM	0.386	0.015	MNOPQRSTUVW	Fuerte	
[437][545] <sub>8</sub>	HR inter	AAS 100 µM	0.379	0.008	NOPQRSTUVWX	Débil	
[437][545] <sub>13</sub>	HR inter	AAS 100 µM	0.379	0.015	NOPQRSTUVWX	Débil	
[545] <sub>15</sub>	Monoesporidia	T	0.377	0.016	NOPQRSTUVWX	Débil	
[437][545] <sub>24</sub>	HR inter	AAS 100 µM	0.375	0.008	OPQRSTUVWX	Débil	
[545] <sub>19x13</sub>	HR intra	T	0.371	0.008	OPQRSTUVWX	Débil	
[545] <sub>24</sub>	Monoesporidia	AAS 100 µM	0.370	0.020	OPQRSTUVWX	Débil	
[545] <sub>12</sub>	Monoesporidia	AAS 100 µM	0.368	0.003	OPQRSTUVWX	Débil	
[436][545] <sub>13</sub>	Cruza inter	AAS 100 µM	0.363	0.020	OPQRSTUVWX	Fuerte	√
[545] <sub>8x22</sub>	HR intra	AAS 100 µM	0.354	0.016	OPQRSTUVWX	Fuerte	
[545] <sub>15</sub>	Monoesporidia	AAS 100 µM	0.354	0.008	OPQRSTUVWX	Débil	
[437][545] <sub>8</sub>	Cruza inter	AAS 100 µM	0.342	0.004	OPQRSTUVWX	Débil	
[437][545] <sub>13</sub>	Cruza inter	T	0.342	0.024	OPQRSTUVWX	Débil	
[545] <sub>3x24</sub>	HR intra	T	0.341	0.017	PQRSTUVWX	Fuerte	
[437][545] <sub>15</sub>	Cruza inter	AAS 100 µM	0.341	0.019	PQRSTUVWX	Débil	
[545] <sub>15x12</sub>	HR intra	T	0.338	0.023	PQRSTUVWX	Débil	
[545] <sub>8</sub>	Monoesporidia	T	0.337	0.010	PQRSTUVWX	Débil	
[545] <sub>13</sub>	Monoesporidia	T	0.334	0.016	QRSTUVWX	Débil	

[545] <sub>22</sub>	Monoesporidia	AAS 100 µM	0.333	0.021	QRSTUUVWX	Débil	
[545] <sub>3</sub>	Monoesporidia	AAS 100 µM	0.329	0.001	RSTUUVWX	Débil	
[437][545] <sub>24</sub>	HR inter	T	0.324	0.020	STUUVWXY	Débil	
[545] <sub>19</sub>	Monoesporidia	T	0.310	0.018	TUUVWXY	Débil	
[545] <sub>15x12</sub>	Cruza intra	AAS 100 µM	0.308	0.029	UVWXY	Débil	
[437][545] <sub>13</sub>	HR inter	T	0.303	0.020	VWXY	Débil	
[437][545] <sub>8</sub>	Cruza inter	T	0.302	0.006	VWXY	Débil	
CP-545	Multiesporidia	AAS 100 µM	0.297	0.018	WXY	Débil	
[437][545] <sub>8</sub>	HR inter	T	0.294	0.011	WXY	Débil	
[545] <sub>15x12</sub>	HR intra	AAS 100 µM	0.281	0.014	XY	Débil	
[545] <sub>8</sub>	Monoesporidia	AAS 100 µM	0.280	0.021	XYZ	Débil	
[437][545] <sub>13</sub>	Cruza inter	AAS 100 µM	0.225	0.008	YZ	Débil	
CP-545	Multiesporidia	T	0.178	0.018	Z	Débil	

AAS= Ácido acetilsalicílico. T= Testigo (PDA+C.A. 1%). HR= Híbrido reaislado. Inter= Dicarión inter-cepa. Intra= Dicarión intra-cepa.

En el Cuadro 27 se incluyeron los resultados obtenidos en la prueba piloto realizada en el invernadero, comparando si la velocidad de crecimiento de las cruzas tuvo alguna relación con la virulencia de la mazorca. En cuanto a la infección en invernadero se pudo observar que la mayoría de las cruzas (C) e híbridos reaislados (HR) ubicados en el primer grupo presentaron infección en la mazorca, y que los 20 materiales virulentos estaban categorizados con una reacción fuerte en laboratorio coincidiendo ese resultado en el invernadero, de los cuales 11 procedían del tratamiento (PDA + C. A. 1% + AAS 100 µM) y 9 de la condición testigo (PDA + C. A. 1%). En los 11 materiales virulentos estudiados en el tratamiento incluían 4 híbridos reaislados (HR) inter-cepa, 4 cruzas inter-cepas (C), 1 craza intra-cepa (C), la craza y el híbrido reaislado de referencia. Cabe destacar una craza intra-cepa y su híbrido reaislado, resultado de la craza de dos monoesporidias nativas aisladas en el laboratorio [(545)<sub>8x22</sub>], presentaron infección fuerte en las pruebas de laboratorio y en el invernadero, a diferencia de la craza de referencia (cepas extranjeras), que infectó pero presentó una reacción intermedia en el laboratorio. Dentro de los materiales virulentos de obtenidos en la condición testigo se observaron 3 híbridos reaislados inter-cepas (HR), 2 cruzas inter-cepas, 1 híbrido reaislado intra-cepa, 1 craza intra-cepa, la craza y el híbrido reaislado de referencia. En esta misma condición el híbrido reaislado intra-cepa fue el mismo que se ubicó en la categoría de

tratamiento, aunque con una menor velocidad de crecimiento, en comparación con la cruzada intra-cepa estudiada en el tratamiento (Cuadro 31).

**Cuadro 27.** Comparación de las cepas de *Ustilago maydis* que infectaron el maíz.

C	Material biológico	Descripción	VC (cm <sup>2</sup> /día)	C	Material biológico	Descripción	VC (cm <sup>2</sup> /día)
Tx	[436][545] <sub>15</sub>	HR inter	0.773±0.017	T	[436][545] <sub>15</sub>	HR inter	0.766±0.023
	[436][545] <sub>24</sub>	HR inter	0.755±0.021		[436][545] <sub>24</sub>	HR inter	0.734±0.023
	[436][545] <sub>8</sub>	HR inter	0.751±0.021		[436][545] <sub>13</sub>	HR inter	0.634±0.016
	[436][545] <sub>13</sub>	HR inter	0.645±0.021		[436][545] <sub>24</sub>	Cruza inter	0.533±0.019
	[436][545] <sub>24</sub>	Cruza inter	0.432±0.021		[436][545] <sub>13</sub>	Cruza inter	0.487±0.022
	[436][545] <sub>8</sub>	Cruza inter	0.404±0.018		[436][437]	HR Referencia	0.597±0.023
	[436][545] <sub>15</sub>	Cruza inter	0.399±0.019		[436][437]	Cruza Referencia	0.639±0.004
	[436][545] <sub>13</sub>	Cruza inter	0.363±0.020		[545] <sub>8x22</sub>	Cruza intra	0.437±0.016
	[436][437]	HR Referencia	0.712±0.023		[545] <sub>8x22</sub>	HR intra	0.408±0.017
	[545] <sub>8x22</sub>	Cruza intra	0.708±0.018				
[436][437]	Cruza Referencia	0.546±0.022					

C= Condición. T= Testigo (PDA + C.A. 1%). Tx= Tratamiento (PDA + C. A. 1% + AAS 100 µM). VC= Velocidad de crecimiento.

### 8.8 Confirmación de la virulencia de las cepas de *U. maydis* en invernadero

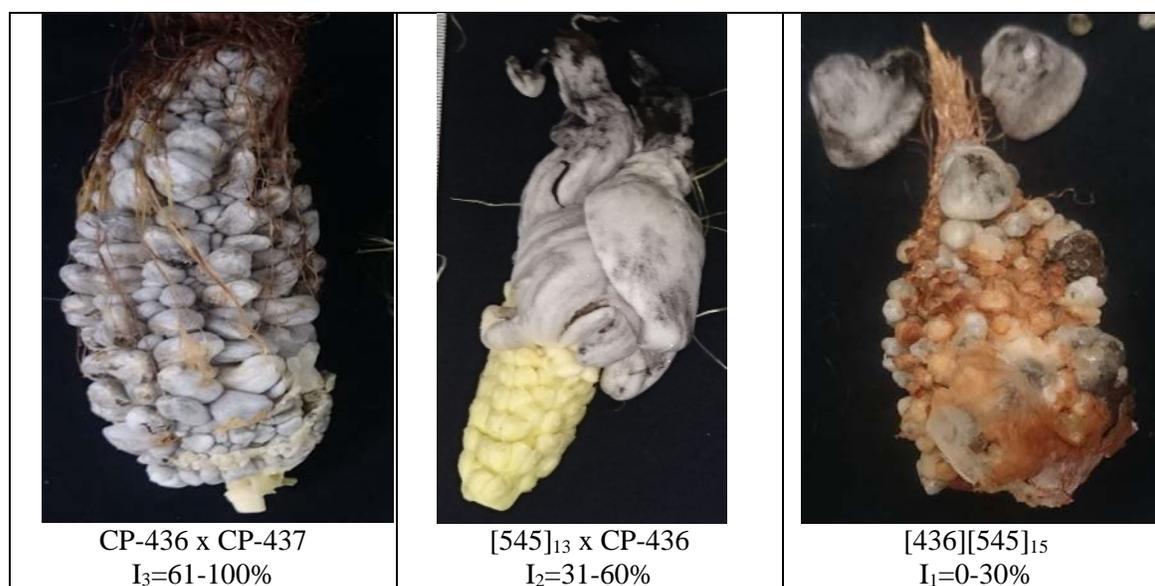
El desarrollo de la variedad de maíz (híbrido HUE-CP- 14 Nopalucan), en condición de invernadero se muestra en la Figura 57. Todas las plantas de maíz mostraron un buen desarrollo, con hojas verdes y turgentes.



**Figura 57.** Desarrollo fisiológico de la planta de maíz, híbrido HUE-CP-14 Nopalucan.

De los 40 materiales biológicos inoculados en el maíz cultivado en condición de invernadero se observaron 11 materiales virulentos. Se colectaron las mazorcas para observar si hubo o no infección a partir de los 25 días después de la inoculación de cada material con sus respectivas réplicas, se evaluó el nivel de infección que presentaron las mazorcas (I<sub>1</sub>=0-30%, I<sub>2</sub>=31-60%, I<sub>3</sub>=61-100%). El material biológico infectivo en inóculo EMA 3% + AAS 100 µM fue el

siguiente [43][545]<sub>15</sub>, [436][545]<sub>24</sub>, [436][545]<sub>13</sub> (HR inter), [436][545]<sub>24</sub> y [436][545]<sub>13</sub>, (Cruza inter), [545]<sub>8x22</sub> (Cruza intra), [545]<sub>8x22</sub> (HR intra), [CP-436][CP-437] (HR referencia), [436][437] (Cruza de referencia); y para el caso de los inóculos en EMA 3% los dicariones infectivos fueron [436][545]<sub>15</sub>, [436][545]<sub>24</sub>, [436][545]<sub>13</sub> (HR inter), [436][545]<sub>24</sub>, [436][545]<sub>8</sub>, [436][545]<sub>13</sub>, (Cruza inter), [545]<sub>8x22</sub> (Cruza intra), [545]<sub>8x22</sub> (HR intra), [436][437] (HR de referencia), [CP-436][CP-437] (Cruza de referencia). Es importante mencionar que los testigos (dicarion de referencia) [CP-436]x[CP-437] en ambas condiciones formaron huitlacoche siendo más rápido en su formación y colectado primero el que tenía AAS 100 µM. Los blancos, monoesporidias y multiespóricos inoculados presentaron el comportamiento esperado al no formar micelio, esto debido a que las monoesporidias como los tipos de referencia son de un solo tipo y no beben infectar. En la Figura 58 se pueden observar los dicariones formados en el laboratorio demostrando los diferentes niveles de infección.

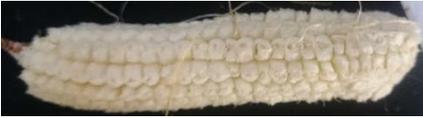


**Figura 58.** Tres niveles de infección de mazorcas infectadas de *Ustilago maydis* con EM 3% + AAS 100 µM.

En el Cuadro 28 se muestra el registro de los recurso genéticos de *U. maydis* infectando las mazorcas de maíz, las condiciones de estudio demostraron el efecto del AAS en la patogenidad del hongo. Durante el ciclo de cultivo de maíz se presentó una plaga de insectos (pulgones), los cuales dañaron algunas muestras del material estudiado de *U. maydis*.

**Cuadro 28.** Relación del material seleccionado y las condiciones de estudio de las cepas de *Ustilago maydis* cultivadas en el híbrido de maíz (HUE-CP-14 Nopalucam) bajo condición de invernadero.

Caso	Registro	Condiciones	Descripción	Infección
1	[436][545] <sub>15</sub> (HR)	AAS 100 $\mu$ M	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	
2	[436][545] <sub>15</sub> (HR)	T	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	
3	[436][545] <sub>24</sub> (HR)	AAS 100 $\mu$ M	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	
4	[436][545] <sub>8</sub> (HR)	AAS 100 $\mu$ M	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	
5	[436][545] <sub>24</sub> (HR)	T	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	
6	[436][437] (HR)	AAS 100 $\mu$ M	Dicarión de referencia (intra)	
7	[545] <sub>8x22</sub>	AAS 100 $\mu$ M	Dicarión intra nativo	
8	CP-436	T	Tipo de referencia	

9	[436][545] <sub>8</sub> (HR)	T	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	
10	[436][545] <sub>13</sub> (HR)	AAS 100 $\mu$ M	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	
11	[436][437]	T	Dicarión de referencia (intra)	
12	[436][545] <sub>13</sub> (HR)	T	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	
13	[436][545] <sub>8</sub>	T	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	
14	[545] <sub>3x24</sub>	T	Dicarión intra nativo	
15	[436][545] <sub>15</sub>	T	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	
16	[436][437] (HR)	T	Dicarión de referencia (intra)	
17	CP-436	AAS 100 $\mu$ M	Tipo de referencia	

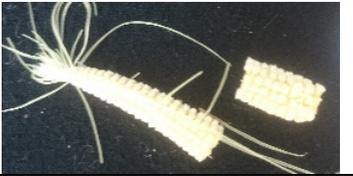
18	[545] <sub>19x13</sub>	AAS 100 $\mu$ M	Dicarión intra nativo	
19	[436][437]	AAS 100 $\mu$ M	Dicarión de referencia (intra)	
20	[436][545] <sub>24</sub>	T	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	
21	[545] <sub>3x24</sub>	AAS 100 $\mu$ M	Dicarión intra nativo	
22	[437][545] <sub>15</sub>	T	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	
23	[436][545] <sub>13</sub>	T	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	
24	[545] <sub>15x12</sub>	T	Dicarión intra nativo	
25	[437][545] <sub>15</sub> (HR)	AAS 100 $\mu$ M	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	
26	[437][545] <sub>24</sub>	T	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	

27	[545] <sub>19x13</sub>	T	Dicarión intra nativo	
28	[545] <sub>13</sub>	AAS 100 μM	Monoesporidia	
29	[545] <sub>8x22</sub>	T	Dicarión intra nativo	
30	[436][545] <sub>24</sub>	AAS 100 μM	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	
31	[545] <sub>12</sub>	T	Monoesporidia	
32	[437][545] <sub>15</sub>	T	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	
33	[437][545] <sub>24</sub>	AAS 100 μM	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	
34	CP-437	T	Tipo de referencia	
35	[545] <sub>19x13</sub> (HR)	AAS 100 μM	Dicarión intra nativo	

36	[545] <sub>24</sub>	T	Monoesporidia	
37	[545] <sub>3</sub>	T	Monoesporidia	
38	[545] <sub>8x22</sub> (HR)	T	Dicarión intra nativo	
39	[436][545] <sub>8</sub>	AAS 100 $\mu$ M	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	
40	CP-437	AAS 100 $\mu$ M	Tipo de referencia	
41	[545] <sub>19</sub>	AAS 100 $\mu$ M	Monoesporidia	
42	[436][545] <sub>15</sub>	AAS 100 $\mu$ M	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	
43	[545] <sub>22</sub>	T	Monoesporidia	
44	[545] <sub>3x24</sub> (HR)	AAS 100 $\mu$ M	Dicarión intra nativo	
45	[437][545] <sub>8</sub> (HR)	AAS 100 $\mu$ M	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	

46	[437][545] <sub>13</sub> (HR)	AAS 100 μM	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	
47	[545] <sub>15</sub>	T	Monoesporidia	
48	[437][545] <sub>24</sub> (HR)	AAS 100 μM	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	
49	[545] <sub>19x13</sub> (HR)	T	Dicarión intra nativo	
50	[545] <sub>24</sub>	AAS 100 μM	Monoesporidia	
51	[545] <sub>12</sub>	AAS 100 μM	Monoesporidia	
52	[436][545] <sub>13</sub>	AAS 100 μM	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	
53	[545] <sub>8x22</sub> (HR)	AAS 100 μM	Dicarión intra nativo	
54	[545] <sub>15</sub>	AAS 100 μM	Monoesporidia	

55	[437][545] <sub>8</sub>	AAS 100 μM	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	
56	[437][545] <sub>13</sub>	T	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	
57	[545] <sub>3x24</sub> (HR)	T	Dicarión intra nativo	
58	[437][545] <sub>15</sub>	AAS 100 μM	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	
59	[545] <sub>15x12</sub> (HR)	T	Dicarión intra nativo	
60	[545] <sub>8</sub>	T	Monoesporidia	
62	[545] <sub>13</sub>	T	Monoesporidia	
63	[545] <sub>22</sub>	AAS 100 μM	Monoesporidia	
64	[545] <sub>3</sub>	AAS 100 μM	Monoesporidia	
65	[437][545] <sub>24</sub> (HR)	T	Dicarión inter (nativo vs. extranjera)	

66	[545] <sub>19</sub>	T	Monoesporidia	
67	[545] <sub>15x12</sub>	AAS 100 $\mu$ M	Dicari3n intra nativo	
68	[437][545] <sub>13</sub> (HR)	T	Dicari3n inter (nativo vs. extranjera)	
69	[437][545] <sub>8</sub>	T	Dicari3n inter (nativo vs. extranjera)	
70	CP-545	AAS 100 $\mu$ M	Multiesporidia	
71	[437][545] <sub>8</sub> (HR)	T	Dicari3n inter (nativo vs. extranjera)	
72	[545] <sub>15x12</sub> (HR)	AAS 100 $\mu$ M	Dicari3n intra nativo	
73	[545] <sub>8</sub>	AAS 100 $\mu$ M	Monoesporidia	
74	[437][545] <sub>13</sub>	AAS 100 $\mu$ M	Dicari3n inter (nativo vs. extranjera)	

75	CP-545	T	Multiesporidia	
----	--------	---	----------------	---

AAS= Ácido acetilsalicílico. T= Testigo.

Las cepas parentales nativas de *U. maydis*, el testigo I (Malta 3%), testigo II (Malta al 3% + AAS100  $\mu$ M) y el blanco (sin inocular), inoculados en el maíz se muestran en el Cuadro 29.

**Cuadro 29.** Relación de la infección de las cepas nativas de referencia CP-545, CP- 774 y CP-585 de *Ustilago maydis*. Se presentan imágenes de las mazorcas cuando se inyectaron con los inóculos utilizados como testigo 1 (Malta al 3%), testigo 2 (Malta al 3% + AAS 100  $\mu$ M) y el blanco, sin inocular.

 CP-545 MALTA 3%	 CP-545 MALTA 3% +AAS100 $\mu$ M
 CP-774 MALTA 3%	 CP-774 MALTA 3% +AAS100 $\mu$ M
 CP-585 MALTA 3%	 CP-585 MALTA 3% +AAS100 $\mu$ M
 MALTA 3%	 MALTA 3% +AAS100 $\mu$ M
 Blanco	

## IX. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudiaron cuatro cepas nativas del hongo comestible *Ustilago maydis*, aisladas de diferentes regiones del país y se compararon con dos cepas de referencia en presencia de ácido acetilsalicílico (AAS). Del ciclo de vida de *U. maydis* se reconocen dos fases, una haploide y unicelular con forma levaduriforme no patogénica y una dicariótica filamentosa patogénica (Banuett, 2015).

No se observó un efecto significativo del AAS sobre la morfología de las cepas estudiadas. Sin embargo, donde se observó un efecto fue en las diluciones y germinaciones de las monoesporidias en presencia del AAS. Las diluciones con AAS presentaron mejor dispersión comparadas con el testigo (Cuadro 11). Asimismo, la germinación de las monoesporidias tuvo un efecto similar, se notó una mayor germinación presencia del AAS (Cuadro 14), sobretodo en las dilución D3 y D4 con AAS, en donde la germinación fue en promedio 10 veces mayor que en el testigo. El uso del AAS de forma exógena se ha estudiado en plantas, en donde se ha observado que incrementa la biomasa de soja (*Glicine max* L., Merr.), el rendimiento de trigo (*Triticum* spp.) (López Tejeda *et al.*, 1998) y hortalizas (Gutiérrez, 1998); en pretratamiento con semillas de melón (*Citrullus vulgaris* Schrat) aumenta la germinación. En el arroz ejerce un efecto estimulante sobre la germinación (González *et al.*, 2005).

Las 24 monoesporidias haploides nativas aisladas a partir de un aislamiento multiespórico de *U. maydis*, fueron obtenidas a partir de diluciones realizadas en agua destilada estéril y ácido acetilsalicílico (AAS) 100  $\mu$ M. Con este procedimiento fue posible aislar monoesporidias haploides, lo cual coincide con Cervantes y Moncada (2015), quienes aislaron 24 monoesporidias a partir de teliosporas por medio de diluciones realizadas en agua con el fin de obtener cepas patogénicas para producir de huitlacoche. Las monoesporidias aisladas en esta investigación, se caracterizaron mediante la prueba del fenotipo *fuz* que identifica los alelos (*a1* o *a2*) del locus *a*, y la compatibilidad de los alelos de locus *b* del tipo de apareamiento. La transición dimórfica de *U. maydis* ocurre durante el apareamiento de dos monoesporidias sexualmente compatibles, contrastando dicha reacción en medio de cultivo sólido con carbón activado, para observar fenotípicamente colonias blancas de aspecto algodonoso, usada rutinariamente para determinar el tipo sexual de las monoesporidias haploides de *U. maydis*. En base a esto se pudo observar en el control (dicarion de referencia) en ambas condiciones (PDA y PDA +AAS 100  $\mu$ M), presentó una reacción positiva ya que por separado presentaban

un aspecto levaduriforme, lo cual al realizar la cruce presentó micelio. Para este ensayo utilizamos cepas de referencia, cuyo genotipo *a* y *b* se conoce, las cepas utilizadas fueron: FB1 (*a1*, *b1*), FB2 (*a2*, *b2*) (Banuett, 1989). Para determinar el tipo de apareamiento o patrón de sexualidad se realizaron entrecruzamientos, ya que según Esser (1970), puede darse una compatibilidad tanto en la fase sexual y en la vegetativa. En la compatibilidad sexual, se puede dar una incompatibilidad del heterocarión y una incompatibilidad parcial en la fase sexual, esto provoca la aparición parcial del micelio en el reconocimiento el cual desaparece rápidamente al no darse una compatibilidad entre núcleos, dando una compatibilidad parcial o de vigor débil. Este reconocimiento incompleto se da porque este hongo es un heterocarión (célula o micelio que contiene más de un tipo de núcleos genéticamente distintos en un citoplasma común) por lo cual si hay dos núcleos iguales no se lleva a cabo el siguiente paso del ciclo, manteniéndose en dormancia.

Su condición sexual de reproducción heterotálica del micelio de este hongo hace posible la conjugación únicamente a través de la interacción de diferentes tipos de cruces, los cuales son cepas similares morfológicamente. La combinación de tipos de esporas compatibles es esencial para producir descendencia fértil (auto-esterilidad).

En cuanto a la caracterización de cruces de este hongo en presencia de AAS no se tienen reportes de estudios previos. Los híbridos reaislados son dicariones formados que se sembraron como tal, con el fin de caracterizarlos en ambas condiciones y observar el comportamiento de estos al mantenerlos como dicariones, comprobándose una interacción positiva entre sus núcleos que infectaron las mazorcas de maíz, lo cual abre paso a la producción de inóculos a partir de dicariones ya formados. Cabe mencionar que los híbridos sembrados (HR) en AAS presentaron en la caracterización de laboratorio una velocidad de crecimiento mayor que lo HR sin AAS, y también infectaron las plantas de maíz produciendo huitlacoche.

## X. CONCLUSIONES

1. Hubo un efecto del ácido acetilsalicílico 100  $\mu\text{M}$  (tratamiento) en las emulsiones realizadas en las cuatro cepas nativas de *U. maydis*, ya que los conteos de monoesporidias fueron mayores a los realizados solo en agua (testigo).
2. En cuanto a la viabilidad de monoesporidias, se observó un aumento considerable en la germinación de UFE/mL en todos los materiales biológicos estudiados en presencia de ácido acetilsalicílico 100  $\mu\text{M}$ , con respecto al testigo.
3. Fue factible aislar monoesporidias de cepas nativas de *U. maydis* a partir de los recursos genéticos previamente aislados y conservados en el laboratorio.
4. Se aislaron monoesporidias nativas sexualmente compatibles.
5. Se formó el patrón de sexualidad de la cepa nativa CP-545 de *U. maydis*, procedente de Huaquechula, Puebla.
6. Se determinaron las condiciones necesarias para inducir el proceso dimórfico (levaduriforme y micelio) de *U. maydis* bajo condiciones *in vitro*.
7. Se realizaron cruza intra e interespecíficas con las monoesporidias nativas y con las cepas de referencia, cruza en paralelo (método de alternativo), mostrando desarrollo de micelio.
8. Se reaislaron dicariones ya formados (híbridos reaislados) en dos condiciones PDA y PDA + AAS 100  $\mu\text{M}$ , los cuales infectaron la planta de maíz a diferentes niveles de severidad.
9. Los híbridos reaislados interespecíficos [436]x[545]<sub>15</sub>, [436]x[545]<sub>24</sub>, [436]x[545]<sub>13</sub> y [436]x[545]<sub>8</sub> cultivados en PDA + C.A. 1% + AAS 100  $\mu\text{M}$  presentaron una velocidad de crecimiento mayor que las cruza e híbridos reaislados en PDA + C.A. 1%.
10. En tercer grupo de infección quedó la cruza nativa intraespecífica [545]<sub>8x22</sub> cultivada en PDA + C.A 1% + AAS 100  $\mu\text{M}$ , según el análisis estadístico. Siendo los primeros dos grupos los integrados por híbridos reaislados interespecíficos cultivados en las mismas condiciones.
11. En la prueba piloto en el invernadero del CP, *Campus* Puebla, se confirmó que los híbridos reaislados interespecíficos que tuvieron una velocidad de crecimiento más rápida fueron las que infectaron las mazorcas, produciendo huitlacoche.
12. Casi las tres réplicas realizadas en el invernadero infectaron el maíz en ambas condiciones.
13. Se obtuvieron cuatro híbridos reaislados (HR) inter-cepas [436]x[545]<sub>15</sub>, [436]x[545]<sub>24</sub>, [436]x[545]<sub>13</sub>, [436]x[545]<sub>8</sub> infectivos, cuyo inóculo suplementado con AAS 100  $\mu\text{M}$  presentó una velocidad de crecimiento mayor que los inoculados con EM 3% sin ácido.

14. De las cuatro cruzas (C) inter-cepas [436]x[545]<sub>24</sub>, [436]x[545]<sub>8</sub>, [436]x[545]<sub>15</sub> y [436]x[545]<sub>13</sub> que formaron micelio e infectaron en la prueba piloto con AAS, solo dos ([436]x[545]<sub>24</sub> y [436]x[545]<sub>13</sub>) de estas infectaron las mazorcas en inóculos sin AAS.
15. Se obtuvieron un total de 20 materiales infectivos de los cuales 11 fueron con AAS y 9 sin AAS.
16. Las mazorcas inoculadas con el dicarion de referencia (extranjero) con AAS produjeron huitlacoche aparentemente 3 días antes que el inóculo sin AAS.
17. El AAS mejora la dispersión, germinación, crecimiento e infección de *Ustilago maydis* por lo cual la implementación de este en la búsqueda de producción masiva de huitlacoche es factible y requiere de más estudios a nivel de campo con al menos dos ciclos agrícolas del maíz.
18. La fase micelial de los híbridos reaislados (HR) se mantuvo durante el experimento, facilitando la elaboración del inóculo al momento de infectar el maíz, evitando la formación de la cruz a al momento de elaborar el inóculo respectivo.

### **Contrastación de hipótesis**

El conteo de las diluciones y pruebas de viabilidad del hongo *Ustilago maydis* utilizando ácido acetilsalicílico (AAS) 100  $\mu$ M fue en promedio 10 veces mayor que los obtenidos en el testigo (agua y PDA). En cuanto a las cruzas y sus híbridos reaislados, se observó una velocidad de crecimiento mayor en los híbridos en presencia de AAS que en las cruzas, siendo el híbrido inter-cepas [CP-436]x[CP-545]<sub>15</sub> el que presentó una velocidad de 0.773  $\text{cm}^2/\text{día}$  en comparación con la cruz formada por las cepas [436]x[545]<sub>15</sub>, con una velocidad de 0.399  $\text{cm}^2/\text{día}$ , demostrando el efecto del AAS en el desarrollo de colonias. El efecto del ácido acetilsalicílico también se observó en la prueba piloto de infección de mazorcas, confirmando que los materiales biológicos que mostraron velocidades de crecimiento mayores en presencia de AAS a nivel de laboratorio fueron los que mayoritariamente infectaron las mazorcas. En función de lo anterior, se aceptó la hipótesis planteada.

## **XI. ESTRATEGIA PARA APROVECHAR LOS RECURSOS GENÉTICOS MEJORADOS DE *USTILAGO MAYDIS* (HUITLACOCHE) PARA SU PRODUCCIÓN EN MÉXICO**

### **Introducción**

La agricultura en México desde décadas anteriores se observa en crisis, misma que se agrava y profundiza bajo el neoliberalismo; modelo en cual el Estado transforma su participación en la economía; bajo una política de ajuste o cambio estructural donde se privilegia la privatización y la desregulación, se observa su retiro de sus funciones económicas, como principal orientador, regulador y promotor del desarrollo económico y el bienestar social. Con la política de modernización del campo se manifiesta la casi ausencia de éste en el sector agrícola; así, desaparecieron los principales programas y se afectó al sistema institucional que proporciona apoyo a la producción agrícola, (Calva, 1995). Lo anterior ha puesto a la mayoría de los productores ejidatarios y pequeños propietarios que practican una agricultura tradicional de temporal, basada en la producción de granos básicos para el autoconsumo familiar, e inclusive a aquellos con mayor solvencia económica, en una situación precaria; es decir, se ha subordinado a una agricultura con severas desventajas a la competencia en el mercado mundial. A diferencia de las actividades agrícolas, ganaderas, y forestales que llevan siglos de practicarse en México, el Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles (SPC-HC) tiene alrededor de 70 años de desarrollo relativamente consistente. Sin embargo, la desarticulación de la política pública en apoyo del sector primario es una de las causas principales de su débil crecimiento, así como de la incapacidad nacional para promover sistemas emergentes de producción-consumo con gran potencial en las nuevas condiciones socioeconómicas internacionales. Es paradójico que, aunque existen experiencias exitosas de producción comercial de hongos comestibles y una gran demanda por el producto a nivel nacional e internacional, se carece de financiamiento estratégico para lograr un mayor desarrollo. En este contexto, se describe la experiencia generada por la Institución, a través de un modelo eficiente de vinculación y retroalimentación entre los Centros Públicos de Investigación y el Sector Productivo (e.g., SPC-HC), adaptado a las condiciones del país y basado en un diagnóstico constante de las necesidades de los productores, recolectores y consumidores de hongos comestibles (Morales *et al.*, 2007). Haciendo énfasis en el concepto

de estrategia se puede decir que una estrategia se refiere una manera de cómo se resolverían los problemas o se alcanzaría un objetivo (Mintzberg, 1988). Las estrategias se diseñan para el futuro, tienen un profundo sentido metodológico y aplicado, están respaldadas por una filosofía y contienen un sentido político. En el terreno de las ciencias agrícolas, el concepto es utilizado como guía de acciones y decisiones (García-Herrera *et al.*, 2004): así mismo el propósito de la estrategia es proveer un mapa de la realidad, lo suficientemente preciso a fin de que quien la instrumente pueda efectuar cambios en el sistema (Felstehausen, 1992).

Este trabajo, constituyó una etapa parcial del proceso de producción del huitlacoche. Los componentes para su producción comercial involucran otros aspectos para su ejecución ya sea en campo, invernadero y laboratorio; para los que se sugiere dar continuidad por otros estudiantes de licenciatura. Son múltiples los trabajos que pudieran ser llevados a cabo por un equipo de trabajo que involucrara a productores de maíz que permitieran el uso de sus parcelas, profesores de experiencias educativas como fitopatología, genética, biotecnología y sistemas de producción y estudiantes de experiencia interesados en el tema. Los temas a abordar involucrarían: la evaluación de variedades locales e introducidas para determinar la resistencia o susceptibilidad que pueden presentarse ante este hongo, la recolección de cepas de huitlacoche de diferentes regiones, para así poder analizar la que posea un mayor índice de virulencia, determinar fechas de inoculación tomando en cuenta tamaños de jilote, etapas fisiológicas de la planta y el estudio de incorporación de técnicas tradicionales para el óptimo desarrollo del *U. maydis*. Por otro lado, es de suma importancia el estudio sobre la inoculación como: formas de inoculación, dosificación de la suspensión y concentración de inóculo. Asimismo es importante investigar sobre los procesos nutricionales requeridos para el desarrollo óptimo del hongo y el hospedante. Métodos de siembra en un sistema intensivo que contemple la inoculación mantenimiento de poblaciones de maíz bajo condiciones de hidroponía en invernadero.

### **Potencial y viabilidad del cultivo de huitlacoche en México**

En México y en algunos otros países de Latinoamérica las mazorcas infectadas por el hongo *Ustilago maydis*, llamado comúnmente Huitlacoche, se han consumido como alimento desde los tiempos de los aztecas. No obstante la apariencia poco atractiva de la enfermedad en el maíz ha atraído la atención de los chefs y comensales nacionales como internacionales, quienes les han dado diferentes nombres como “hongo del maíz”, “maizteca”, “trufa

mexicana” y “caviar Azteca” (Paredes-López, 2000). El huitlacoche es el nombre étnico que se le da al cuerpo fructífero del hongo *U. maydis*, y el cual se manifiesta en forma de mancha oscura en el maíz (*Zea mays* L.). El *U. maydis* ataca potencialmente todas las porciones de la planta, pero ocurre con más frecuencia en las mazorcas. Las plantas atacadas desarrollan malformaciones en la forma de agallas abultadas, en un principio de color gris pálido, pero que se oscurecen al aproximar la maduración, y que contienen en su interior esporas reproductivas en un tejido esponjoso de color negro. Económicamente el huitlacoche presenta una doble característica, ya que puede causar pérdidas en el rendimiento del cultivo y por otro lado, en algunas partes del centro y sur de México es usado como alimento, (Chávez-Ontiveros *et al.*, 2000). En vista de los problemas económicos, políticos, sociales y técnicos que existen para satisfacer los requerimientos de nutrientes vitales, recientes investigaciones se han enfocado a la diversificación de fuentes nutritivas, poniendo especial atención a la proteína de origen fúngico (Falanghe, 1967). Los hongos comestibles poseen un sabor exquisito y el contenido de proteínas, vitaminas y minerales los hace un excelente alimento. Potencialmente el huitlacoche puede ser aprovechado como alimento ya que es fuente de algunos nutrientes esenciales al ser humano. Se ha reportado que el hongo es fuente de algunos aminoácidos esenciales como la lisina y de algunos ácidos grasos insaturados como el linoléico, conocido como omega 3 (Valverde *et al.*, 1995), además se han determinado 27 carbohidratos del huitlacoche, de los cuales 16 han sido identificados completamente, teniendo a la glucosa en mayor porcentaje continuando en forma descendente la fructuosa, glicerol, sorbitol y manitol. Actualmente la mala nutrición por el excesivo consumo de alimentos (curioso, antes desnutrición era igual a no comer lo suficiente) no es sólo un efecto de los malos hábitos individuales, también colabora el ambiente en el que nos desarrollamos, la falta absoluta de educación y orientación nutricional entre la población; el predominio de la comida chatarra en las escuelas y centros de trabajo (El Sol de Hidalgo. 3 de abril de 2008), por lo que requerimos generar alternativas para el consumir alimentos nutritivos como ejemplo el huitlacoche, y darle mayor valor agregado. La deshidratación solar puede ser una alternativa para crear desarrollo local a partir de la determinación de la variación de las propiedades nutricionales del huitlacoche deshidratado, realizando transferencia de tecnología e innovación en la producción a cielo abierto y viveros (Lobato-Salinas *et al.*, 2010).

Los objetivos de esta investigación están encaminados a la generación de conocimiento a partir los datos y resultados analizados sobre *U. maydis*. Por lo cual se puede proponer.

- Crear una red de generación de conocimiento sobre la producción masiva de huitlacoche, con el fin de dar a conocer, ampliar y optimizar el conocimiento obtenido y generado por académicos e investigadores de las diversa instituciones y centros de investigación en México, con el fin de estar en sintonía para mejorar el cultivo y así poder transmitir el conocimiento a asiéndolo de dominio público.
- Contribuir al desarrollo agrícola regional del estado de Puebla en primer lugar, estableciendo un método sistemático y de fácil manejo para la producción de huitlacoche.

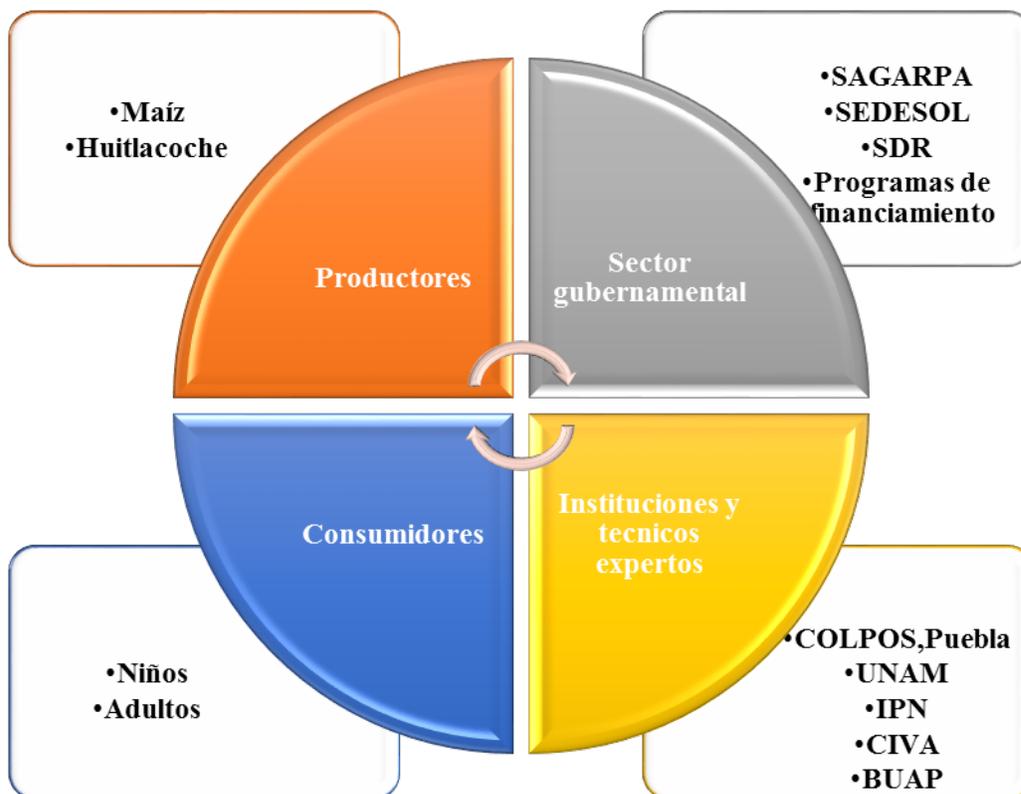
### **Actores principales en la propuesta de estrategia**

Los productores de maíz, ya que es el sustrato necesario para la producción de huitlacoche puesto que se le dará una valor agregado., los productores de huitlacoche y personas interesadas en la explotación de dicho producto.

Las instituciones de investigación y organizaciones encargadas de proporcionar alternativas en paquetes tecnológicos viables con visión de mejorar la calidad de vida en el entorno social, político, económico, cultural y ecológico. Como es el caso del Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla con su programa de biotecnología en hongos comestibles, universidades, institutos, centros de investigación y escuelas, así como los técnicos expertos en el manejo de esta tecnología, ya que tendrán oportunidades de trabajo mediante la contratación de productores o instituciones gubernamentales involucradas en el desarrollo del campo.

El sector gubernamental, a través de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), SEDESOL, SDR, entre otras y fundaciones de otros organismos que están en posibilidades de brindar apoyos técnicos, financieros y administrativos.

Los consumidores que finalmente son los segundos beneficiados más importantes del producto generado a través del paquete tecnológico así como la industrias farmacéuticas, procesadoras de alimentos, centros comerciales, Centrales de abasto así como mercados regionales de diversas regiones del país (Fig. 59).



**Figura 59.** Actores y sectores involucrados en la estrategia.

### **Algunas definiciones de estrategia**

Las estrategias militares y políticas existen desde los tiempos prehistóricos. De hecho, una de las funciones de los primeros historiadores y poetas era testimoniar y recopilar conocimientos acumulado, relativos a la vida y a la muerte, tanto en de las estrategias exitosas, como de las fallidas, transformadas en una sabiduría que sirviera de guía para el futuro. Con el crecimiento de las sociedades y la creciente complejidad de los conflictos sociales, generales, hombres de estado y capitanes estudiaron, codificaron y probaron los conceptos estratégicos esenciales hasta lograr una estructura coherente de principios. Las instituciones modernas fueron las primeras en modificar esos conceptos para adaptarlos a sus particulares entornos (Mintzberg y Brian, 1993). Se considera que la estrategia es la columna vertebral de los planes y programas de desarrollo, dado que estas son acciones que se realizan en forma ordenada, sistemática y dirigida para conseguir el fin deseado (Baltazar, 2002).

Independientemente del campo de aplicación de una estrategia, esta se concibe mejor si se analiza su concepto según López (2005), quien la define como un proceso regulable, un

conjunto de reglas que aseguran una decisión óptima en cada momento. Donde el término proceso, incorpora la idea, las etapas y los tiempos para el logro de los objetivos, el término regulable, indica la existencia de normas que pueden ser aplicables al proceso y justifica su objeto de estudio.

En el caso del desarrollo agrícola regional, la estrategia ha sido definida por varios autores como por ejemplo Matus (1972), dice que una estrategia es un análisis y propósito de futuro que integra lo económico y lo político-social con el fin de dirigirlos a objetivos a objetivos determinados. Para Matus (1980), el plan de la estrategia puede modificarse cuando se lleva a cabo, con el fin de cumplir su objetivo. Por lo que una estrategia parte de una síntesis entre realidad y proyecto, con lo que se obtiene una imagen preliminar (diagnostico). García-Herrera (2004), menciona que para que se lleve a cabo una estrategia deben estar presentes tres sectores como elementos fundamentales, con tareas específicas y complementarias estos son: los productores y sus familias, los técnicos y científicos, y los representantes y miembros de instituciones de apoyo para la producción y desarrollo agrícola regional y rural. Obteniendo así logros económico-sociales, promoviendo así el desarrollo agrícola regional y rural de una región. El término de estrategia fue incluido en la agricultura en el año 1967 en el plan puebla, siendo este el primer Proyecto de Desarrollo Agrícola Regional que involucra al concepto de estrategias como guía para sus acciones y decisiones (Casas, 1994).

### **Estrategia para generar una red de conocimiento sobre la producción masiva de *Ustilago maydis***

Los proyectos de investigación que se vienen desarrollando y han desarrollado con el paso del tiempo se reinventan con cada alumno e investigador los cuales abordan temas diferentes y muchas veces sin compartir información, esto sucede porque muchos generan proyectos de investigación de acuerdo a la visión de los representantes de investigación y a la educación de cada de cada gobierno , así como por parte de los investigadores e instituciones, para conseguir recursos, para tener alumnos participantes en las investigaciones particulares, o por intereses aislados de estos dos últimos. Lo cual provoca que se realicen estudios aislados y discontinuos de temas específicos que en su mayoría no están relacionados.

Esto se torna complicado ya que es un tema complicado ya que involucra diversos actores y no puede ser resuelto de manera individual, por este motivo se busca se busca unificar y generar en su caso mejorar las redes de investigación con temas en común, logrando así proponer

estrategias que encajen de manera adecuada al mundo real, logrando si un trabajo conjunto y de colaboración multidisciplinaria (Fig. 60).

### **Objetivo general de la estrategia**

Generar una red multidisciplinaria entre diferentes centros de investigación e instituciones del país para contribuir a la producción de un masiva de *Ustilago maydis*.

### **Objetivos particulares**

Convocar instituciones y centros de investigación de México que han generado conocimiento sobre la producción masiva de huitlacoche.

Generar un manual de producción de inóculo, manejo e infección de *Ustilago maydis* al alcance de cualquier persona que dese cultivar este hongo.

### **Implementación de la estrategia para crear una red de generación de conocimiento sobre la producción masiva de huitlacoche.**

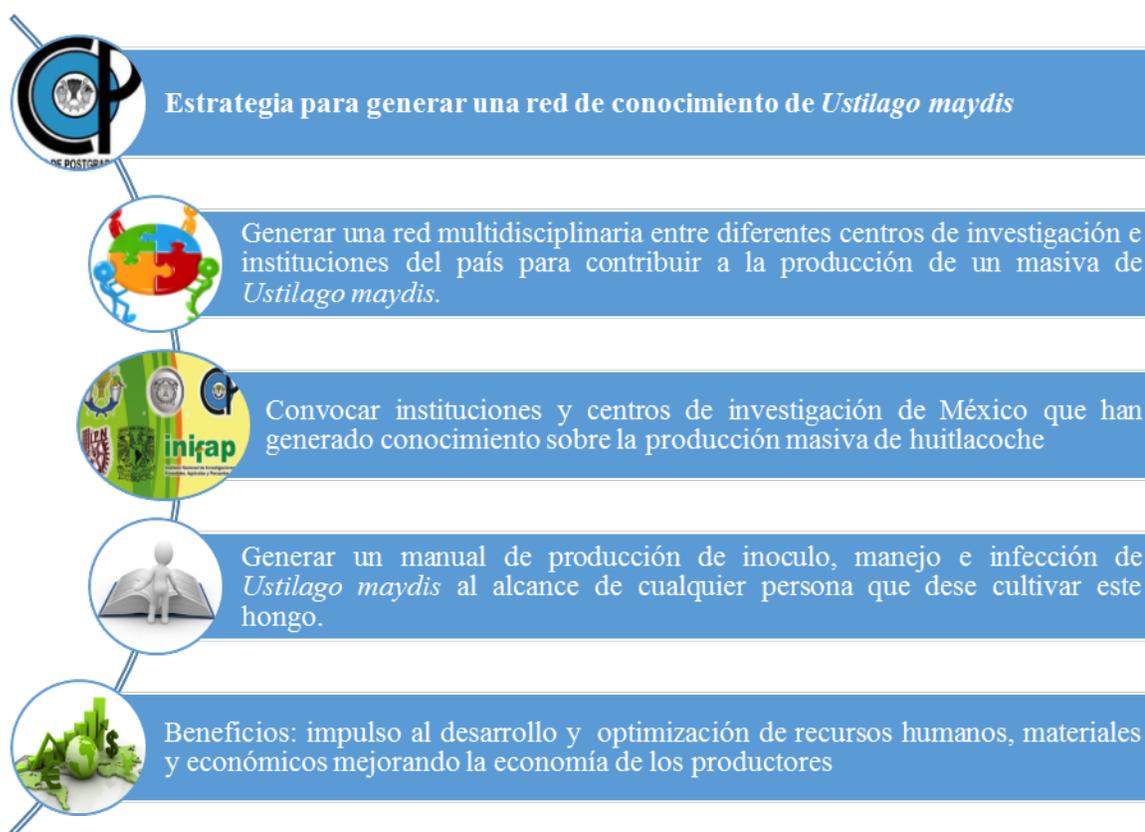
Para esto o primero que se debe realizar es convocar a las instituciones y centros de investigación de México que han generado conocimiento en las diferentes áreas acerca de *Ustilago maydis*, esto por medio de la invitación directa a los investigadores más prestigiados del país para conformar un comité (Valverde, Ruiz, Villa nueva, Leal, etc.). En segundo lugar formar una mesa directiva para establecer estrategias para formar líneas de generación multidisciplinarias.

Tres establecer en conjunto con instituciones los proyectos y líneas de investigación que serán apoyadas de acuerdo a los requisitos que se acordaron por ambas partes, con el compromiso de llegar a la meta establecida.

A largo plazo algunos de los beneficios de esta estrategia será el incremento en la productividad de las investigaciones encaminadas a una meta específica con el apoyo de investigadores, estudiantes de licenciatura, maestría y doctorado. Se llevara a cabo intercambio de información lo cual fortalecerá a las áreas involucradas asegurando así el llegar a la meta establecida. Los integrantes de cada línea, cuerpo académico o similar de todas las instituciones participantes en conjunto con el sector gobierno, deberán formar comités que establezcan los lineamientos para determinar las estrategias para el desarrollo agrícola regional en cada área de interés: capacitación a productores, optimización de procesos de producción, producción de huitlacoche, procesamiento de huitlacoche, producción de inóculos, investigación de cadenas de distribución.

En base a todo esto se podrá conformar un manual que describa el cultivo de huitlacoche desde su descripción hasta su consumo, lo cual se lograra con los estudios multidisciplinarios llevaos acabo, con el fin de aportar un conocimiento técnico y académico a la sociedad.

Los beneficios de esta red de conocimiento resultan importantes puesto que dará un gran impulso al desarrollo y se optimizaran recursos humanos, materiales y económicos que puedan afectar la economía de los productores de huitlacoche y le darán un valor agregado a su maíz.



**Figura 60.** Estrategia para generar una red de conocimiento de *Ustilago maydis*.

**Contribuir al desarrollo agrícola regional del estado de Puebla en primer lugar, estableciendo un método sistemático y de fácil manejo para la producción de huitlacoche.**

Con los resultados obtenidos en esta investigación, se desea establecer un método sistemático para producción de huitlacoche en el en el Valle de Puebla contribuyendo así al desarrollo agrícola regional. Por lo cual se fijaron los siguientes objetivos.

### **Objetivos**

#### **Objetivo general**

Contribuir al desarrollo de las regiones de los valles altos del estado de Puebla y posteriormente a la región central de México al generar un método específico para la producción sistemática de huitlacoche de cada región específica.

#### **Objetivos particulares**

Seleccionar cepas nativas compatibles de *Ustilago maydis* que presenten un vigor fuerte.

Diseñar inóculos a partir de la formación de híbridos las cepas nativas seccionadas usando malta 3% con AAS 100  $\mu$ M y malta 3%.

Capacitar a productores de maíz para evaluar los inóculos diseñados de *Ustilago maydis*, para determinar los mejores inóculos.

Realizar tres replicas durante tres ciclos agrícolas mínimo del experimento con el o los inóculos seleccionados para evaluar y proponer un método específico de producción sistemática de huitlacoche para dicha región.

#### **Implementación de la estrategia para crear una red de generación de conocimiento sobre la producción de inóculos para producción masiva de huitlacoche.**

Gracias a la demanda que se presenta hoy en día de huitlacoche a nivel nacional e internacional, todos los sectores y actores involucrados que se han venido mencionando anteriormente se encuentran interesados y convencidos de los beneficios que se obtienen al desarrollar un proyecto de producción de huitlacoche. Por otro lado en el laboratorio de biotecnología de hongos comestibles del Colegio de Postgraduados, *Campus Puebla*, se han seleccionado algunas cepas compatibles para la generación de híbridos inter-cepas ([436]X[545]<sub>15</sub>, [436]X[545]<sub>24</sub>, [436]X[545]<sub>13</sub>, [436]X[545]<sub>8</sub>), por medio de pruebas de compatibilidad a nivel laboratorio con el fin de producir inóculos en malta 3% con AAS 100  $\mu$ M los cuales fueron probados de manera preliminar en invernadero del COLPOS. Con los resultados positivos a nivel laboratorio, con velocidades de crecimiento más altas en las cruza y en la prueba de infección donde a pesar de la calidad del cultivo de maíz la de réplicas por híbrido presentaron un nivel de infección de 60-100%, otro resultado favorable de la

inoculación de estos híbridos con ácido fue la aparición más temprana de huitlacoche, a diferencia de las que se inocularon sin ácido.

Una vez seleccionado el material patogénico y a ver desarrollado las habilidades requeridas de cada actor y sector involucrado se realizarán capacitaciones a las organizaciones de productores. Se seleccionarán voluntarios de las organizaciones o grupos, quienes dispondrán una parte de sus parcelas de maíz susceptible a *U. maydis* para evaluar los inóculos adicionados con ácido y sin ácido en campo o invernadero, donde se realizarán por triplicado en varios ciclos agrícolas evitando contaminaciones en campos aledaños. Una vez alcanzado el grado de madurez específico de las mazorcas, se procederá a inocular estas con diferentes inóculos (n= 3). En todo momento se llevará a cabo una interacción con los productores con el fin de retroalimentarse de manera conjunta. Una vez transcurrido el tiempo se recolectará la producción obtenida en base al buen manejo en cosecha y postcosecha, para obtener producto de calidad sin daños mecánicos. Para lo anteriormente mencionado se requerirá de la participación del gobierno, el cual por medio de sus dependencias, podrá brindar apoyos técnicos, financieros y administrativos para realizar capacitaciones de manera sistemática. Una vez encaminados y abasteciendo los mercados nacionales e internacionales, el sistema nacional de información e integración de mercados (SNIM), apoyará las gestiones necesarias para la mercadotecnia a nivel nacional e internacional, y la Procuraduría General del Consumidor (PROFECO) deberá publicar el precio al consumidor de huitlacoche en los estados consumidores de este producto.

Esta estrategia tiene como beneficio principal evitar la inconsistencia del cultivo de este hongo, logrando producciones masivas de calidad ya que estará sujeta a condiciones prevalecientes en cada temporada de cultivo. Gracias a los resultados obtenidos se podrá innovar en la tecnología para la producción sistemática de huitlacoche lo que permitirá una mayor cantidad y calidad de este producto en cualquier época del año, en primera instancia en los valles del Estado de Puebla y aplicarlo en toda la región central del México (Fig. 61).

### **Recomendaciones técnicas**

Se recomienda contar con centros de acopio de huitlacoche donde se supervise el producto durante su recepción, limpieza, empaque, almacenamiento y embalaje. Las mazorcas infectadas en un 100% serán de primera calidad con agallas gris-platinado e integras, y de segunda con un 50 a 75% con agallas gris-platinado e integras. Estas estrategias diseñadas

buscan encaminar la formación de grupos de trabajo multidisciplinarios, con el fin de desarrollar soluciones que se presentan en el sector agronómico diariamente y con el apoyo y financiamiento adecuado del gobierno se puedan llevar a cabo, y así generar incrementos en el aporte económico para las familias de escasos recursos, pequeños y medianos productores agrícolas.



**Figura 61.** Método sistemático y de fácil manejo para la producción de huitlacoche.

## XII. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 1991. Fitopatología. Limusa S.A de C.V. Mexico. Pp 438-443.
- Agrios, G. N. 1998. Fitopatología. Segunda edición. Ed. Limusa, S.A de C.V. pp 495-498.
- Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. 5th ed. Academic Press. USA. Pp 922.
- Agripedia, 2000. Corn Smut Life Cycle. Plant Pathogenic Fungi, <http://frost.ca.uky.edu/agripedia/ppa652/smutcycl.htm>
- Álvarez Cabrales, D. N. 1999. Aislamiento y evaluación de la patogenicidad de cepas del hongo *Ustilago maydis* (huitlacoche) del valle del Yanqui en plantas de maíz. Instituto Tecnológico de Sonora. México.
- Arnold, C. 1992. Postharvest and marketing of huitlacoche, the maize mushroom (*Ustilago maydis*-corn smut). Acta Hort. 318:321-324.
- Baltazar, F. 2002. Papel de las organizaciones tradicionales para el desarrollo de comunidades marginadas en la Sierra Norte de Puebla. Tesis de maestría. Colegio de Posgraduados Campus Montecillo. Estado de México.
- Banuett, F. 1995. Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. Annu. Rev. Genetics 29: 179-208
- Banuett, F. 2002. Pathogenic Development in *Ustilago maydis*. A progression of morphological transitions that result in tumor formation and teliospore production. Molecular Biology of Fungal Development. Editado por Heinz, D. O. Dekker, New York. pp 349-398.
- Banuett, F. 2015. From dikarion to diploid. Fungal Biology Reviews XXX: 1-15.
- Banuett, F. e I. Herskowitz. 1988. *Ustilago maydis*, smut of maize. Advances in plant pathology. Chapter. USA 6: 428-452.
- Banuett, F. e I. Herskowitz. 1989. Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but no for meiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 5878- 5882.
- Banuett, F. e I. Herskowitz. 1994. Identification of Fuz7, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for a-locus dependent and-independent steps in the fungal life cycle. Department of Biochemistry and Biophysics, School of Medicine, University of California San Francisco, San Francisco, California 94143-0448 USA. GENES & DEVELOPMENT 8: 1367-1378.
- Banuett, F. e I. Herskowitz. 1996. Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. Development 122: 2965-2976.
- Bölker, M., S. Genin, C. Lehmler y R. Kahmann. 1995. Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. Can J Bot 73: 320-325.
- Bourbouloux, A., P. Raymond y S. Delrot. 1998. Effects of salicylic acid on sugar and amino acid uptake. J. Exp. Bot. 49: 239-247.
- Brachmann, A., G. Weinzierl, J. Kämper y R. Kahmann. 2001. Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. Mol. Microbiol. 42: 1047-1063.
- Brefeld, O. 1895. Die Brandkrankheiten des Getreides. Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie. XI. Die Brandpilze. 2 Münster. 98.

- Cabrera-Ponce, J. L., C. G. León-Ramírez, A. Verver-Vargas, L. Palma-Tirado y Ruiz-Herrera, 2012. Metamorphosis of the Basidiomycota *Ustilago maydis*: Transformation of yeast-like cells into basidiocarps. *Fungal Genetics and Biology* 49: 765–771.
- Calderón-Fernández, M. L. 2010. Caracterización clásica y molecular del huitlacoche, hongo de importancia social y económica en la región central de México. Tesis de Doctorado, Programa de Postgrado en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional, *Campus Puebla*.
- Calva, J. L. 1995. El modelo neoliberal mexicano: costos, vulnerabilidad, alternativas. 2da. Edición. Juan Pablos Editor, S.A. México, D.F. Pp. 49.
- Casas, R. 1994. Estrategias para el desarrollo agrícola regional en proyectos con enfoque de sistemas: caso del proyecto prototipo agropecuario del Plan Puebla. Tesis de maestría Programa de Postgrado en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional, *Campus Puebla*.
- Castañeda de León, V. T. y H. Leal Lara. 2012. Logros y desafíos de la producción masiva de “cuitlacoche” *Ustilago maydis* en México. *Hongos Comestibles en Iberoamérica*. El Colegio de la Frontera Sur, México, D.F. Pp. 193-206.
- Castañeda de León, V. T., J. K. Pataky y H. Leal-Lara. 2008. Susceptibility to infection of different varieties of corn hybrids with *Ustilago maydis* under conditions of commercial production of “Cuitlacoche” for food purposes in Mexico. 4rd. International Ustilago Conference. Universitat Giessen Justus-Liebig and Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG). Schloss Rauischholzhausen, Hessen, Alemania.
- Castañeda de León, V., D. Martínez-Carrera, P. Morales, M. Sobal, A. Gil y H. Leal-Lara. 2016. Contribución de los hongos comestibles, funcionales y medicinales a la construcción de un paradigma sobre la producción, la dieta, la salud y la cultura en el sistema agroalimentario de México. *En: Ciencia, Tecnología e Innovación en el Sistema Agroalimentario de México*. Eds. D. Martínez-Carrera & J. Ramírez Juárez. Biblioteca Básica de Agricultura, IICA, Academia Mexicana de Ciencias, México, D.F
- Cervantes González, M. A. y D. Moncada. 2015. Aislar teliosporas de *U. maydis* para encontrar cepas patogénicas para producir huitlacoche. Universidad Politécnica de Pénjamo. 8º verano estatal de investigación. CONCYTEG. Pp 3.
- Chávez-Ontiveros, J., A. D. Martínez-Espinoza y J. Ruiz-Herrera. 2000. Double chitin synthetase mutans from the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *New Phytol.* 146: 335-341.
- Christensen, J. J. 1963. Corn Smut caused by *Ustilago maydis* Cda. *The American Phytopathological Society. Department of Plant Pathology and Botany. Institute of Agriculture, University of Minnesota* 2: 41. 5.
- du Toit, L. J. y J. K. Pataky. 1999a. Effects of silk maturity and pollination on infection of maize ears by *Ustilago maydis*. *Plant Disease* 83: 621-626.
- du Toit, L. J. y J. K. Pataky. 1999b. Variation associated with silk channel inoculation for common smut of sweet corn. *Plant Disease* 83: 727-732.
- Durrenberger, F., K. Wong y J. Kronstad. 1998. “Identification of a CAMP-dependent protein kinase catalytic subunit for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95: 5684-5689.

- El cuitlacoche un invento mexicano reciente. 19 de noviembre del 2011  
<http://noticias.universia.net.mx/enportada/noticia/2011/12/19/899423/cuitlacocheinvento-mexicano.html> o <http://archivo.eluniversal.com.mx/articulos/68006.html>
- El sol de Hidalgo. 2008. Nota periodística de José Armando Aguilar Pachuca, Hidalgo.  
<http://www.oem.com.mx/elsoldehidalgo/notas/n650182.htm>
- Esser, K. 1970. Breeding Systems in Fungi and their Significance for Genetic Recombination. *Molec. Gen. Genetics*: 110: 86-100.
- Falanghe, H. 1967. Mushroom mycelium as another ptencial source of protein. *Food Technology* 21: 53-57.
- Felstehausen, H. 1988. The Strategy of Rural Development Program. Principles from Mexico's Plan Puebla. The Land Tenure Center. University of Wisconsin. Madison, Wis., U.S.A.
- Ferrarese, L., P. Moretto, L. Trainotti, N. Rascio y G. Casadoro. 1996. Cellulase involvement in the abscission of peach and pepper leaves is affected by salicylic acid. *J. Exp. Bot.* 47: 251-257.
- Flores del Campo, R. J. 1991. Producción de huitlacoche (*Ustilago maydis*) (D.C.) Cda.) probando tres métodos de inoculación en tres variedades de maíz (*Zea mayz* L.) Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM), Monterrey, Nuevo León, México. Pp. 18-21.
- Fuchs, U., G. Hause, I. Schuchardt y G. Steinberg. 2006. Endocytosis Is Essential for Pathogenic Development in the Corn Smut Fungus *Ustilago maydis*. *The Plaant Cell* 18: 2066-2081.
- Gaffney, T., L. Friedrich, B. Vernooij, D. Negrotto, G. Nye, S. Uknes, E. Ward, H. Kessman y J. Ryals. 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261: 754-756.
- Galarza-Mercado, J. M. 2012. Situación actual y perspectivas del maíz en México 1996-2012. Supervisión y coordinación César Ulises Miramontes Piña. SIAP. <http://www.financierarural.gob.mx>.
- García-Herrera, E. 2004. Componente de una estrategia para el desarrollo agrícola regional en pinos, zacateca: el nopal tunero como su elemento central. *Comunicaciones en socioeconomía, estadística e informática* 8: 83-102.
- Gold, J., L. L. Good, A. Herrera-Estrella, T. Diener y J. P. Martínez-Soriano. 1999. Plant-pathogen interecctions in plant biotechnology. Chapter 4.
- Gold, S. E., G. Bakkeren, J. E. Davies y J. W. Kronstad. 1994. Three selectable markers for transformation of *Ustilago maydis*. *Gene* 142: 225-230.
- González, T. A., Y. López y I. Franco. 2005. Efecto del ácido acetil salicílico sobre la germinación y el crecimiento de la planta de arroz (*Oryza sativa* L.).Departamento de Agrofisiología. La Habana, Cuba. *Revista Granos del Instituto de investigación de granos* 7:39-41.
- Guevara-Lara, F., M. E. Valverde y O. Paredes-López. 2000. "Is pathogenicity of *Ustilago maydis* (huitlacoche) strains on maize related to in vitro production of indole-3-acetic acid?" *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16 (5): 481-490.

- Gutiérrez-Coronado, M., C. Trejo-López y A. Larqué-Saavedra. 1998. Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. *Plant Physiol. Biochem.* 36: 563-565.
- Hennig, J., J. Malamy, G. Gryniewicz, J. Indulski y D. F. Klessig. 1993. Interconversion of the salicylic acid signal and its glucoside in tobacco. *Plant J.* 4: 593-600.
- Holliday, R. 1974. *Ustilago maydis*. In *Handbook of Genetics*, Edited by R.C. King. New York Plenum: 575-595.
- Huitlacoche, caviar azteca o trufa mexicana, 2013. <http://www.directopaladar.com.mx/ingredientes-y-alimentos/huitlacoche-caviar-azteca-o-trufa-mexicana> 17 de octubre de 2013.
- Jiménez de León, J. R. 2008. De la plaga a manjar. <http://www.elsiglodetorren.com.mx/noticia/267016.de-plaga-a-manjar.html>.
- Jiménez, P. y C. Collada. 2000. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Ivest. Agr. Sist. For* 2: 237-248.
- Jordan, M. y J. Casaretto. 2006. Hormonas y reguladores de crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. *Fisiología Vegetal* (F.A. Squeo & Cardemil, eds.). Ediciones universidad de la Serena, La Serena, Chile. 15: xx-xx.
- Juárez-Montiel, M., S. Ruiloba de León, G. Chávez, C. Hernández y L. Villa. 2011. Huitlacoche (corn smut), caused by the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*, as a functional food. *Revista Iberoamericana de Micología* 28: 69-73.
- Kämper, J., M. Reicmann, T. Romeis, M. Böcker y R. Khamann. 1995. Multiallele recognition: non-self dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell.* 81: 73-83.
- Kealey, K. S. y F. V. Kosikowski. 1981. Corn smut as a food source, perspectives on biology, composition and nutrition. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 15: 321-351.
- Klose, J., M. M. De Sá y W. Kronstad. 2004. Lipid-induced filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol.* 52: 823-835.
- Knörzera, O., B. Lederera, J. Durnerb y P. Bögera. 1999. Antioxidative defense activation in soybean cells. *Physiol. Plant.* 107: 294-302.
- Kronstad, J. W y S. A. Leong. 1990. The b mating-type locus of *Ustilago maydis* contain variables and constant regions. *Genes Dev.* 4: 1384-1395.
- Lobato-Salinas, V., H. Martínez Flores, S. Lucas Huacuz, R. Ruiz Corro y J. Vargas Medina. 2010. Alternativa tecnológica para el uso del hongo huitlacoche (*Ustilago maydis*). Universidad Guanajuato. División Ciencias de la Vida Campus Irapuato-Salamanca.
- López, F. 2005. Elementos para el diseño de estrategias de gestión de la información agraria. Fundación General de la UNED.
- López, R., V. Camacho y M. Gutiérrez-Coronado. 1998. Aplicación de ácido salicílico para incrementar el rendimiento agronómico en tres variedades de trigo. *Terra* 16: 43-48.
- Madrigal-Rodríguez, J., C. Villanueva-Verduzco, J. Sahagún-Castellanos, M. Acosta-Ramos, L. Martínez-Martínez y T. Espinosa-Solares. 2010. Production test of greenhouse hydroponic huitlacoche (*Ustilago maydis* Cda.). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 16 (3): 177-182.
- Malamy, J. y Klessig. 1992. Salicylic acid and plant disease resistance. *Plant J.* 2: 643-654.

- Martínez-Carrera, D., P. Morales, M. Sobal, M. Bonilla, W. Martínez y Y. Mayett. 2012. Los hongos comestibles, funcionales y medicinales: su contribución al desarrollo de las cadenas agroalimentarias y la seguridad alimentaria en México. En: Memorias Reunión General de la Academia Mexicana de Ciencias: Ciencia y Humanismo (Agrociencias). Academia Mexicana de Ciencias, México, D.F. Pp. 449-474.
- Martínez-Espinoza, A. D., J. Ruiz-Herrera, C. G. León-Ramírez y S. E. Gold. 2004. MAP kinase and cAMP signaling pathways modulate the pH-induced yeast-to-mycelium dimorphic transition in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Curr Microbiol.* 49: 274-281.
- Martínez-Martínez, L., C. Villanueva-Verduzco y J. Sahagún-Castellanos. 2000. Susceptibility and resistance of maize to the edible fungus huitlacoche (*Ustilago maydis* Cda.) improving its virulence. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 6 (2): 241-255.
- Matus, C. 1972. Estrategia y Plan. Siglo XXI. México. 11a Edición.
- Matus, C. 1980. Planificación de situaciones. Estrategia y Plan. 1a Edición. Fondo de cultura Económica. México.
- Métraux, J. P., H. Signer, J. Ryals, E. Ward, M. Wyss-Benz, J. Gaudin, K. Raschdorf, E. Schmid, W. Blum y B. Inverardi. 1990. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250: 1004-1006.
- Mier, T., C. Toriello y M. Ulloa. 2002. Hongos microscópicos saprobios y parásitos: métodos de laboratorio. División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana - Xochimilco e Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal, México: 90.
- Mintzberg, H. 1988. Las Cinco Ps de la Estrategia. *En: El proceso estratégico; conceptos, contextos y casos.* Mintzberg H. y Q. Brian. (Editores). Prentice Hall, México. Pp: 21-30.
- Mintzberg, H. y J. Brian. 1993. El proceso estratégico, conceptos, contextos y casos. Segunda edición. Prentice Hall Hispanoamericana, S.A. PP 7-20.
- Morales, P., M. Sobal, M. Bonilla, W. Martínez y D. Martínez-Carrera. 2007. El Centro de Vinculación con el Sistema de Producción Consumo de los Hongos Comestibles (CVINHCO) del Colegio de Postgraduados. Capítulo 3.9, 10 pp.
- Pan, J. J., A. M. Baumgarten y G. May. 2008. Effects of host plant environment and *U. maydis* Cda. Infection on the fungal endophyte community of maize (*Zea mays* L.) *New Phytologist* 178: 147-156.
- Paredes-López, O., S. S. Serna y O. Guzmán. 2000. Los alimentos Mágicos de las culturas Indígenas de México- El caso de la Tortilla. INIFAP. Tecnológico de Monterrey, Culiacán Sinaloa. Pp 107.
- Paredes-López, O. 2000. Tecnología para la producción masiva de huitlacoche. SEPCONACYT. Cuaderno de trabajo: sistema de investigación Miguel Hidalgo. Area de alimentos. pp. 11-33.
- Paredes-López, O. y M. E. Valverde. 1999. Los alimentos Mágicos de las culturas Indígenas de México- El caso del huitlacoche. Culiacán Sinaloa. Pp 50.
- Pataký, J. K. y M. A. Chandler. 2003. Production of huitlacoche, *Ustilago maydis* Cda.: timing inoculation and controlling pollination. *Mycologia* 95: 1261-1270.

- Pataky, J. K., C. Nankam y M. Kerns. 1995. Evaluation of a silk-inoculation technique to differentiate reactions of sweet corn hybrids to common smut. *Phytopathology* 35: 1323-1328.
- Pataky, J. K. 1991. Production of cuitlacoche (*Ustilago maydis* (DS) Corda) on sweet corn. *HortSci.* 26: 1374-1377.
- Pope, D. D. y S. M. McCarter. 1991. The effect of inoculation method on disease incidence and severity of the corn smut caused by *U. maydis*. *Phytopathology* 81: 814-819.
- Pope, D.D.; M. McCARTER. S. 1992a. Smut incidence and severity after inoculating developing corn ears with *Ustilago maydis* using different methods. *Phytopathology* 82(4): 500
- Raskin, I. 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 439-463.
- Ruiz Herrera, J. 1995. Dimorfismo y patogenia de *Ustilago maydis*. Memorias del XXVI Congreso Nacional de Microbiología. Veracruz, México. Pp 25.
- Ruiz-Herrera, J., C. G. León, L. Guevara-Olvera y A. Cáravez-Trejo. 1995. Yeast-micelial dimorphisms of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis* in liquid culture. *Microbiology* 141: 695-703.
- Ruiz-Herrera, J., C. León-Ramírez y A. D. Martínez-Espinoza. 2000. Morphogenesis and pathogenesis in *Ustilago maydis*. *Recent Res. Develop. Microbiol.* 4: 585-598.
- Ruiz-Herrera, J., L. Ortiz-Castellanos, A. I. Martínez, C. León-Ramírez y R. Sentandreu. 2008. "Analysis of the proteins involved in the structure and synthesis of the cell wall of *Ustilago maydis*". *Fungal Genetics and Biology.* 45: 571-576.
- Ruiz-Herrera, J. y A. D. Martínez-Espinoza. 1998. The Fungus *Ustilago maydis*, from the Aztec cuisine to the research laboratory. *International Microbiology* 1: 149-158.
- Ruíz, J. 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 en Ciencias. Instituto Tecnológico de Sonora. Cd. Obregón, Sonora, México. Pp 47-78.
- Salvador, R. J. 2001. *Maíz*. Universidad Autónoma Chapingo. Publicaciones del Programa Nacional de Etnobotánica Serie: Traducciones Número: 15. Chapingo, México.
- Sánchez Martínez, C. y J. Pérez-Martín. 2001. Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*-similar inputs, different outputs. *Curr. Opin. Microbiol.* 4: 214-221.
- Sánchez-Medina, M. A., E. Villagómez, A. D. Pérez-Santiago y F. Córdoba-Alva. 2005. Inducción de Dimorfismo en *Ustilago maydis*. Unidad de Bioquímica e Inmunología, Instituto Tecnológico de Oaxaca, Av. Ing. Víctor Bravo Ahuja No. 125, Esq. Calzada Tecnológico, Oaxaca, Oax. 68030,
- Spelling, T., M. Bölker, F. Lottspeich, R. W. Frank y R. Kahmann. 1994. Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* 13: 1620-1627.
- Thakur, R. P., K. J. Leonard y J. K. Pataky. 1989. Smut gall development in adult plants inoculated with *Ustilago maydis* Cda. *Plant Disease* 73: 921-925.
- Tillet, M. 1766. Observation sur la maladie du Mais ou ble de Turquie. *Mémoires Académies Sciences Paris* 1760: 254-261.

- Tisdale, W. H. y C. O. Johnston. 1926. A study of smut resistance in corn seedlings grown in the greenhouse. *Journal of Agricultural Research* 32(7): 649-668.
- Tracy, W. F., C. Vargas-Zepeda, J. K. Pataky y M. A. Chandler. 2007. Production and marketing of huitlacoche. *In: Issues in new crops and new issues*. J. Janick, y A. Whipkey (Eds). ASHS Press. Alexandria, VA.p:233.
- Urban, M., R. Kahmann y M. Bölker. 1996. Identification of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* 25: 31-37.
- Valadez-Azua, R. 2012. “El huitlacoche, un recurso alimentario mexicano no tan milenario”. *Antropológicas Boletín* 5: 1-9.
- Valadez-Azua, R., A. Moreno y G. Gómez. 2011. *Cujtlacocho: El Cuitlacoche*. UNAM, Instituto de Investigaciones Antropológicas, México, D.F. 150 pp.
- Valdez-Morales, M. 2010. “Producción y evaluación de la calidad de huitlacoche en diferentes tipos de maíz, e identificación de compuestos con actividad nutracéutica”. Tesis de Doctorado. Universidad de Querétaro Facultad de Química. Programa de Alimentos del Centro de la República.
- Valdez-Morales, M., M. E. Valverde y O. Paredes-López. 2009. Procedimiento tecnológico para la producción masiva de huitlacoche. *Sinco*: 16.
- Valverde, M. E. 1992. Estudios sobre la infección de *Ustilago maydis* (Huitlacoche) y sus características alimentarias. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Unidad Irapuato. Pp: 10-37.
- Valverde, M. E. 1998. Caracterización molecular de la biodiversidad de *Ustilago maydis*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Unidad Irapuato. Pp: 11-16,84.
- Valverde, M. E., O. Paredes-López, J. K. Pataky y F. Guevara-Lara. 1995. Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a food source—biology, composition, and production. *Critical. Food Science and Nutrition* 35(3): 191-229.
- Valverde, M. E., P. F. Moghaddam, M. S. Zavala-Gallardo, J. K. Pataky, O. Paredes-López y W. L. Pedersen. 1993. Yield and quality of huitlacoche on sweet corn inoculated with *Ustilago maydis*. *Horticultural Science* 28: 782-785.
- Valverde, M. E. y O. Paredes-López. 1993. Production and evaluation of some food properties of huitlacoche (*Ustilago maydis* Cda.). *Food Biotechnology* 7 (3): 207-219.
- Vanegas, P. E., M. E. Valverde, O. Paredes-López y J. K. Pataky. 1995. “Production of the Edible Fungus Huitlacoche *Ustilago maydis* Effect of Maize Genotype on Chemical Composition”. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 80:104-106.
- Villanueva, C., D. Cruz, J. D. Molina, F. Castillo y E. Zavaleta. 1999. Artificial induction of “huitlacoche” (*Ustilago maydis* Cda.): influence of different conditions in the field. *Micología Neotropical Aplicada* 12: 41-47.
- Villanueva, V. C. 1997. Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a food in Mexico. *Micol. Neotrop. Apl.* 10:73-81.
- Villanueva, V. C., R. E. Sánchez y S. E. Villanueva. 2007. El huitlacoche y su cultivo. Editorial Mundi Prensa. Distrito Federal, México. Pp 96.

### XIII. ANEXOS



Sistema  
SAS

Obs	MEDIO	CEPA	D2	D3	D4	D5	D6
1	AAS	CP-626	.	186	26	4	0
2	AAS	CP-626	.	188	26	4	0
3	AAS	CP-626	.	187	27	4	0
4	AAS	CP-774	318	28	3	2	1
5	AAS	CP-774	319	29	3	2	2
6	AAS	CP-774	319	28	3	2	0
7	AAS	CP-585	.	130	16	2	0
8	AAS	CP-585	.	132	14	3	0
9	AAS	CP-585	.	130	15	2	0
10	AAS	CP-545	279	57	7	1	0
11	AAS	CP-545	277	60	7	0	0
12	AAS	CP-545	288	65	8	0	0
13	TESTIGO	CP-626	23	5	1	0	0
14	TESTIGO	CP-626	24	4	1	0	0
15	TESTIGO	CP-626	25	4	0	0	0
16	TESTIGO	CP-774	237	19	2	2	0
17	TESTIGO	CP-774	238	18	2	1	0
18	TESTIGO	CP-774	238	19	2	2	0
19	TESTIGO	CP-585	110	10	1	0	0
20	TESTIGO	CP-585	110	10	1	0	0
21	TESTIGO	CP-585	113	10	1	0	0
22	TESTIGO	CP-545	98	16	1	0	0
23	TESTIGO	CP-545	77	9	2	0	0
24	TESTIGO	CP-545	116	14	1	0	0

Información de nivel de clase		
Clase	Niveles	Valores
MEDIO	2	AAS TESTIGO

Datos para el análisis de D2	
Número de observaciones leídas	24
Número de observaciones usadas	18

Datos para el análisis de D3 D4 D5 D6

Número de observaciones leídas	24
Número de observaciones usadas	24

Procedimiento ANOVA  
Variable dependiente: D2

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	1	133346.69	133346.69	28.88	<.0001
Error	16	73864.917	4616.5573		
Total corregido	17	207211.61			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	D2 Media
0.643529	38.11201	67.94525	178.2778

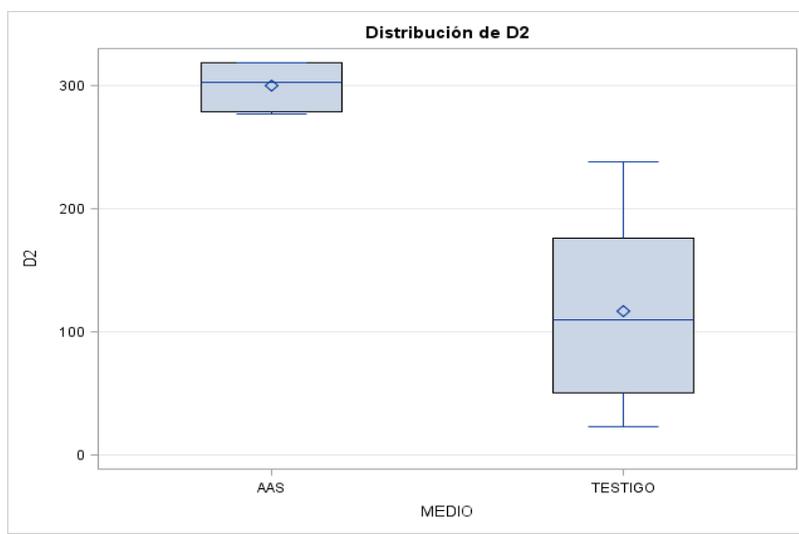
Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
MEDIO	1	133346.69	133346.69	28.88	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para D2

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	16
Error de cuadrado medio	4616.557
Valor crítico del rango estudentizado	2.99786
Diferencia significativa mínima	72.015
Media armónica de tamaño de celdas	8

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	MEDIO
A	300	6	AAS
B	117.42	12	TESTIGO



AREA PARA VELOCIDAD

data sinCruza;							data sinCruza;	
Input Clave\$	Dia2	Dia4	Dia8	Dia12	Dia16	Dia24;	Input Clave\$	Vel (velocidad)
cards;	2	4	8	12	16	24	cards;	
Clave1	0.532	0.932	3.332	4.21	6.527	12.626	Clave1	0.52608333
Clave1	0.579	0.955	2.34	5.392	4.893	10.803	Clave1	0.450125
Clave1	0.468	0.998	2.346	4.891	5.298	11.565	Clave1	0.481875
Clave2	0.551	0.851	2.897	4.197	6.766	12.224	Clave2	0.50933333
Clave2	0.485	0.985	2.634	3.869	4.844	11.388	Clave2	0.4745
Clave2	0.523	0.899	2.295	2.753	5.999	10.788	Clave2	0.4495
Clave3	0.503	0.802	2.68	4.049	6.228	9.736	Clave3	0.40566667
Clave3	0.612	0.811	3.412	4.112	6.501	10.98	Clave3	0.4575
Clave3	0.423	0.423	2.764	4.003	6.467	10.734	Clave3	0.44725
Clave4	0.619	0.819	3.688	5.596	6.951	13.615	Clave4	0.56729167
Clave4	0.597	0.847	3.625	5.661	6.038	14.69	Clave4	0.61208333
Clave4	0.958	0.856	4.575	5.434	6.906	14.797	Clave4	0.61654167
Clave5	0.686	0.886	2.745	5.272	7.749	13.811	Clave5	0.57545833
Clave5	0.738	0.938	4.232	6.733	7.697	14.308	Clave5	0.59616667
Clave5	0.762	0.762	3.398	6.255	8.751	14.936	Clave5	0.62233333
Clave6	0.249	0.546	1.906	3.981	9.381	12.552	Clave6	0.523
Clave6	0.246	0.667	1.971	4.545	8.279	11.394	Clave6	0.47475
Clave6	0.262	0.457	1.688	3.683	9.593	12.634	Clave6	0.52641667
Clave7	0.466	0.867	1.916	3.623	6.767	10.725	Clave7	0.446875
Clave7	0.383	0.833	1.692	3.685	5.731	12.488	Clave7	0.52033333
Clave7	0.408	0.862	2.126	3.626	5.796	11.872	Clave7	0.49466667
Clave8	0.464	0.818	2.218	3.117	5.064	8.878	Clave8	0.36991667
Clave8	0.409	0.806	2.139	2.994	5.301	8.689	Clave8	0.36204167
Clave8	0.584	0.889	2.346	3.327	5.689	7.073	Clave8	0.29470833
Clave9	1.253	1.999	3.75	3.512	9.992	15.828	Clave9	0.6595
Clave9	1.775	1.989	4.731	4.312	9.425	14.373	Clave9	0.598875
Clave9	0.826	0.826	3.218	4.235	8.225	14.425	Clave9	0.60104167
Clave10	0.212	0.458	1.688	3	4.978	6.985	Clave10	0.29104167
Clave10	0.209	0.455	1.49	3.008	4.976	7.266	Clave10	0.30275
Clave10	0.215	0.456	1.36	2.919	3.935	7.517	Clave10	0.31320833
Clave11	0.33	0.645	2.297	5.213	6.841	11.897	Clave11	0.49570833
Clave11	0.321	0.684	3.064	6.089	8.049	13.473	Clave11	0.561375
Clave11	0.39	0.629	2.454	5.855	6.359	12.976	Clave11	0.54066667
Clave12	0.583	0.898	2.164	4.362	7.195	11.983	Clave12	0.49929167
Clave12	0.635	0.895	2.138	4.364	6.288	10.928	Clave12	0.45533333
Clave12	0.361	0.875	2.491	5.97	7.455	11.968	Clave12	0.49866667
Clave13	0.755	0.955	2.341	5.527	11.78	15.538	Clave13	0.64741667
Clave13	0.811	0.891	2.658	4.226	10.644	15.249	Clave13	0.635375
Clave13	0.499	0.9	2.075	4.022	11.388	15.249	Clave13	0.635375
Clave14	0.018	0.057	0.686	2.376	3.382	3.826	Clave14	0.15941667
Clave14	0.026	0.039	0.765	1.975	2.893	3.836	Clave14	0.15983333
Clave14	0.017	0.035	0.584	2.841	2.047	5.159	Clave14	0.21495833
Clave15	0.103	0.399	1.608	3.746	4.233	8.282	Clave15	0.34508333
Clave15	0.098	0.344	1.858	4.595	4.424	9.383	Clave15	0.39095833

Clave15	0.083	0.273	1.556	3.717	5.579	9.446	Clave15	0.39358333
Clave16	0.514	0.814	1.379	2.336	3.853	9.979	Clave16	0.41579167
Clave16	0.319	0.869	1.482	2.908	5.326	9.934	Clave16	0.41391667
Clave16	0.231	0.799	0.98	2.135	4.306	10.964	Clave16	0.45683333
Clave17	0.323	0.823	1.512	2.716	5.04	6.59	Clave17	0.27458333
Clave17	0.271	0.718	1.417	2.517	5.416	7.855	Clave17	0.32729167
Clave17	0.304	0.699	1.422	2.42	5.459	7.862	Clave17	0.32758333
Clave18	0.694	0.894	2.825	3.686	6.285	8.777	Clave18	0.36570833
Clave18	0.354	0.894	1.744	3.43	4.975	7.561	Clave18	0.31504167
Clave18	0.324	0.964	1.696	2.841	5.472	7.698	Clave18	0.32075
Clave19	0.463	0.943	1.408	2.05	4.879	7.698	Clave19	0.32075
Clave19	0.449	0.789	1.288	3.246	6.016	8.507	Clave19	0.35445833
Clave19	0.34	0.872	1.669	3.237	6.18	8.082	Clave19	0.33675
Clave20	0.311	0.827	2.576	4.051	7.096	9.984	Clave20	0.416
Clave20	0.336	0.836	1.684	2.958	6.059	9.434	Clave20	0.39308333
Clave20	0.429	0.899	1.137	2.562	5.66	8.923	Clave20	0.37179167
Clave21	0.471	0.876	1.98	2.911	6.114	9.936	Clave21	0.414
Clave21	0.657	0.856	2.783	3.069	6.45	9.946	Clave21	0.41441667
Clave21	0.85	0.785	3.119	4.525	7.73	9.73	Clave21	0.40541667
Clave22	0.566	0.856	2.616	3.328	6.338	9.535	Clave22	0.39729167
Clave22	0.452	0.752	2.018	3.133	6.226	10.384	Clave22	0.43266667
Clave22	0.436	0.889	1.855	2.897	6.256	9.843	Clave22	0.410125
Clave23	1.104	1.2	3.088	5.433	8.542	16.946	Clave23	0.70608333
Clave23	0.297	0.789	1.591	4.786	8.332	15.454	Clave23	0.64391667
Clave23	0.263	0.869	1.285	4.313	7.278	17.342	Clave23	0.72258333
Clave24	0.123	0.577	1.981	3.931	5.993	10.901	Clave24	0.45420833
Clave24	0.123	0.507	1.76	3.742	5.409	9.309	Clave24	0.387875
Clave24	0.124	0.511	2.008	4.184	5.166	10.176	Clave24	0.424
Clave1A	0.366	0.967	1.105	2.933	4.419	8.419	Clave1A	0.35079167
Clave1A	0.489	0.989	1.143	3.331	4.332	7.695	Clave1A	0.320625
Clave1A	0.456	0.973	1.762	2.493	4.228	.	Clave1A	0.25307317
Clave2A	0.34	0.841	1.483	2.146	3.757	12.781	Clave2A	0.53254167
Clave2A	0.294	0.799	1.603	2.114	3.925	12.975	Clave2A	0.540625
Clave2A	0.557	0.857	1.188	2.301	4.999	13.991	Clave2A	0.58295833
Clave3A	0.424	0.924	3.469	4.078	7.268	16.982	Clave3A	0.70758333
Clave3A	0.879	0.879	3.058	3.485	7.64	16.251	Clave3A	0.677125
Clave3A	0.557	0.997	4.612	3.682	6.151	17.755	Clave3A	0.73979167
Clave4A	0.572	0.872	3.643	5.415	6.908	12.33	Clave4A	0.51375
Clave4A	0.495	0.899	2.314	3.532	7.463	13.052	Clave4A	0.54383333
Clave4A	0.599	0.994	2.104	4.62	7.447	12.268	Clave4A	0.51116667
Clave5A	0.496	0.916	2.176	4.443	6.171	9.218	Clave5A	0.38408333
Clave5A	0.382	0.893	2.252	4.299	6.266	9.043	Clave5A	0.37679167
Clave5A	0.453	0.938	2.208	4.424	6.264	10.501	Clave5A	0.43754167
Clave6A	0.544	0.943	2.285	3.924	5.407	8.869	Clave6A	0.36954167
Clave6A	0.772	0.892	2.288	3.911	6.361	8.322	Clave6A	0.34675
Clave6A	0.617	0.917	2.363	3.674	6.949	7.333	Clave6A	0.30554167
Clave7A	0.366	0.966	1.404	3.319	4.84	9.531	Clave7A	0.397125
Clave7A	0.283	0.985	1.889	3.178	5.611	7.861	Clave7A	0.32754167
Clave7A	0.308	0.808	2.314	3.917	5.867	8.736	Clave7A	0.364
Clave8A	0.325	0.924	1.137	1.811	3.787	5.55	Clave8A	0.23125
Clave8A	0.385	0.965	1.728	2.42	3.763	5.638	Clave8A	0.23491667
Clave8A	0.374	0.964	1.499	1.774	3.691	5.017	Clave8A	0.20904167
Clave9A	0.419	0.837	2.431	4.881	7.389	9.182	Clave9A	0.38258333
Clave9A	0.386	0.881	2.535	3.792	6.368	10.548	Clave9A	0.4395
Clave9A	0.467	0.837	2.284	4.706	6.368	9.36	Clave9A	0.39
Clave10A	0.419	0.9998	2.101	3.361	5.079	8.024	Clave10A	0.33433333
Clave10A	0.655	0.945	3.484	3.6	5.428	8.312	Clave10A	0.34633333
Clave10A	0.567	0.979	2.024	2.395	4.372	8.312	Clave10A	0.34633333



<b>Modelo</b>	73	4.5347217	0.0621195	72.38	<.0001
<b>Error</b>	148	0.1270179	0.0008582		
<b>Total corregido</b>	221	4.6617396			

<b>R-cuadrado</b>	<b>Coef Var</b>	<b>Raíz MSE</b>	<b>Vel Media</b>
0.972753	6.478865	0.029296	0.452171

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Anova SS</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>F-Valor</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Clave</b>	73	4.5347217	0.0621195	72.38	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Vel (velocidad de crecimiento)

**Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.**

Tukey Agrupamiento					Media	N	Clave	
				A	0.77318	3	Clav5RA	
				A				
				A	0.76611	3	Clav5R	
				A				
				A	0.75478	3	Clav11RA	
				A				
				A	0.75081	3	Clav9RA	
				A				
	B			A	0.73426	3	Clav11R	
	B			A				
	B			A	C	0.71243	3	Clav13RA
	B			A	C			
	B			A	C	0.70817	3	Clave3A
	B			A	C			
	B	D		A	C	0.69086	3	Clave23
	B	D		A	C			
	B	D		A	C	0.67626	3	Clav9R
	B	D			C			
	B	D		E	C	0.64472	3	Clav7RA
	B	D		E	C			
	B	D		E	C	0.63939	3	Clave13
	B	D		E	C			
	F	B	D	E	C	0.63408	3	Clav7R
	F		D	E	C			
	F	G	D	E	C	0.61981	3	Clave9
	F	G	D	E				

F	G	D	E	H	0.59864	3	Clave4			
F	G	D	E	H						
F	G	D	E	H	0.59799	3	Clave5			
F	G	D	E	H						
F	G	D	E	H	0.59693	3	Clav13R			
F	G	D	E	H						
F	G	D	E	H	0.59674	3	Clave23A			
F	G		E	H						
F	G	I	E	H	0.55204	3	Clave2A			
F	G	I	E	H						
F	G	I	E	H	0.54621	3	Clave13A			
F	G	I		H						
F	G	I	J	H	0.53258	3	Clave11			
	G	I	J	H						
K	G	I	J	H	0.52292	3	Clave4A			
K		I	J	H						
K	L	I	J	H	0.50806	3	Clave6			
K	L	I	J							
K	L	I	J	M	0.48729	3	Clave7			
K	L	I	J	M						
K	L	I	J	M	0.48603	3	Clave1			
K	L	I	J	M						
K	L	I	J	M	0.48481	3	Clav6RA			
K	L	I	J	M						
K	L	I	J	M	0.48443	3	Clave12			
K	L	I	J	M						
K	L	I	J	M	N	0.47778	3	Clave2		
K	L		J	M	N					
K	L	O	J	M	N	0.44347	3	Clave18A		
K	L	O	J	M	N					
K	L	O	J	P	M	N	0.43681	3	Clave3	
K	L	O	J	P	M	N				
K	L	O	Q	J	P	M	N	0.43161	3	Clave11A
K	L	O	Q		P	M	N			
K	L	O	Q	R	P	M	N	0.42885	3	Clave16
K	L	O	Q	R	P	M	N			

	K	L	S	O	Q	R	P	M	N	0.42629	3	Clav6R	
	K	L	S	O	Q	R	P	M	N				
	K	L	S	O	Q	R	P	M	N	0.42501	3	Clave12A	
	K	L	S	O	Q	R	P	M	N				
	K	L	S	O	Q	R	P	M	N	0.42203	3	Clave24	
		L	S	O	Q	R	P	M	N				
		L	S	O	Q	R	P	M	N	0.41744	3	Clav2RA	
		L	S	O	Q	R	P	M	N				
		L	S	O	Q	R	P	M	N	0.41336	3	Clave22	
		L	S	O	Q	R	P	M	N				
	T	L	S	O	Q	R	P	M	N	0.41128	3	Clave21	
	T	L	S	O	Q	R	P	M	N				
	T	U	L	S	O	Q	R	P	M	N	0.40843	3	Clav3R
	T	U		S	O	Q	R	P	M	N			
	T	U	V	S	O	Q	R	P	M	N	0.40403	3	Clave9A
	T	U	V	S	O	Q	R	P	M	N			
	T	U	V	S	O	Q	R	P	M	N	0.40192	3	Clave24A
	T	U	V	S	O	Q	R	P	M	N			
	T	U	V	S	O	Q	R	P	M	N	0.40131	3	Clave17A
	T	U	V	S	O	Q	R	P	M	N			
	T	U	V	S	O	Q	R	P	M	N	0.39947	3	Clave5A
	T	U	V	S	O	Q	R	P	M	N			
<b>W</b>	T	U	V	S	O	Q	R	P	M	N	0.39363	3	Clave20
<b>W</b>	T	U	V	S	O	Q	R	P	M	N			
<b>W</b>	T	U	V	S	O	Q	R	P	M	N	0.38626	3	Clav4RA
<b>W</b>	T	U	V	S	O	Q	R	P		N			
<b>W</b>	T	U	V	S	O	Q	R	P	X	N	0.37918	3	Clav10RA
<b>W</b>	T	U	V	S	O	Q	R	P	X	N			
<b>W</b>	T	U	V	S	O	Q	R	P	X	N	0.3791	3	Clav8RA
<b>W</b>	T	U	V	S	O	Q	R	P	X	N			
<b>W</b>	T	U	V	S	O	Q	R	P	X	N	0.37654	3	Clave15
<b>W</b>	T	U	V	S	O	Q	R	P	X				
<b>W</b>	T	U	V	S	O	Q	R	P	X		0.37542	3	Clav12RA
<b>W</b>	T	U	V	S	O	Q	R	P	X				
<b>W</b>	T	U	V	S	O	Q	R	P	X		0.37114	3	Clav2R
<b>W</b>	T	U	V	S	O	Q	R	P	X				

W	T	U	V	S	O	Q	R	P	X	0.37026	3	Clave22A
W	T	U	V	S	O	Q	R	P	X			
W	T	U	V	S	O	Q	R	P	X	0.36817	3	Clave16A
W	T	U	V	S	O	Q	R	P	X			
W	T	U	V	S	O	Q	R	P	X	0.36289	3	Clave7A
W	T	U	V	S	O	Q	R	P	X			
W	T	U	V	S	O	Q	R	P	X	0.35444	3	Clav3RA
W	T	U	V	S	O	Q	R	P	X			
W	T	U	V	S	O	Q	R	P	X	0.35378	3	Clave15A
W	T	U	V	S	O	Q	R	P	X			
W	T	U	V	S	O	Q	R	P	X	0.34233	3	Clave10A
W	T	U	V	S	O	Q	R	P	X			
W	T	U	V	S	O	Q	R	P	X	0.34222	3	Clave8
W	T	U	V	S		Q	R	P	X			
W	T	U	V	S		Q	R	P	X	0.34107	3	Clav4R
W	T	U	V	S		Q	R	P	X			
W	T	U	V	S		Q	R	P	X	0.34061	3	Clave6A
W	T	U	V	S		Q	R	P	X			
W	T	U	V	S		Q	R	P	X	0.33804	3	Clav1R
W	T	U	V	S		Q	R	P	X			
W	T	U	V	S		Q	R	P	X	0.33732	3	Clave19
W	T	U	V	S		Q	R		X			
W	T	U	V	S		Q	R		X	0.33383	3	Clave18
W	T	U	V	S		Q	R		X			
W	T	U	V	S		Q	R		X	0.33313	3	Clave20A
W	T	U	V	S			R		X			
W	T	U	V	S			R		X	0.32935	3	Clave21A
W	T	U	V	S					X			
W	T	U	V	S		Y			X	0.32444	3	Clav12R
W	T	U	V			Y			X			
W	T	U	V			Y			X	0.30982	3	Clave17
W		U	V			Y			X			
W		U	V			Y			X	0.30816	3	Clave1A
W			V			Y			X			
W			V			Y			X	0.30322	3	Clav8R
W			V			Y			X			

W	V		Y		X	0.30233	3	Clave10
W			Y		X			
W			Y	X		0.29728	3	Clave14A
W			Y	X				
W			Y	X		0.29421	3	Clav10R
			Y	X				
			Y	X		0.28052	3	Clav1RA
			Y	X				
	Z		Y	X		0.28022	3	Clave19A
	Z		Y					
	Z		Y			0.22507	3	Clave8A
	Z							
	Z					0.17807	3	Clave14

