



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

TESIS

**“PRODUCCIÓN DE HUITLACOCHÉ [*Ustilago maydis* (D.C) Corda] EN EL ESTADO
DE AGUASCALIENTES”**

PRESENTA

Biol. Dulce Janeth Aguayo González

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS CON OPCIÓN A
AGRONÓMICAS**

TUTOR

Dr. Alberto Margarito García Munguía

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Fidel Guevara Lara

Dra. Laura Eugenia Pérez Cabrera

Dr. Marcelo Acosta Ramos

Aguascalientes, Ags., Junio de 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M.C. Gabriel Ernesto Pallás Guzmán

Decano del Centro de Ciencias Agropecuarias

Presente

Por este medio le comunico que he revisado la versión final del escrito de tesis "**Producción de huilacoche [*Ustilago maydis* (D.C) Corda] en el Estado de Aguascalientes**", presentada por la alumna **Biol. Dulce Janeth Aguayo González** como requisito para obtener el grado de Maestra en Ciencias con opción a Agronómicas. A mi juicio, este documento contiene ya todas las correcciones solicitadas por un servidor al hacer la revisión del mismo. Por lo anterior, considero que se puede proceder ya a su impresión definitiva y a la programación del examen de grado.

ATENTAMENTE
"SE LUMEN PROFERRE"

Jesús María, Aguascalientes., 07 de Junio de 2016

Dr. Alberto Margarito García Mugía

Tutor del Trabajo de Tesis

Sinodal designado para el Examen de Grado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M.C. Gabriel Ernesto Pallás Guzmán

Decano del Centro de Ciencias Agropecuarias

Presente

Por este medio le comunico que he revisado la versión final del escrito de tesis "**Producción de huilacoche [*Ustilago maydis* (D.C) Corda] en el Estado de Aguascalientes**", presentada por la alumna **Biol. Dulce Janeth Aguayo González** como requisito para obtener el grado de Maestra en Ciencias con opción a Agronómicas. A mi juicio, este documento contiene ya todas las correcciones solicitadas por un servidor al hacer la revisión del mismo. Por lo anterior, considero que se puede proceder ya a su impresión definitiva y a la programación del examen de grado.

ATENTAMENTE

"SE LUMEN PROFERRE"

Jesús María, Ags., 07 de Junio de 2016

Dr. Fidel Guevara Lara

Miembro del Comité tutorial
Sinodal designado para el Examen de Grado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M.C. Gabriel Ernesto Pallás Guzmán

Decano del Centro de Ciencias Agropecuarias

Presente

Por este medio le comunico que he revisado la versión final del escrito de tesis "**Producción de huilacoche [*Ustilago maydis* (D.C) Corda] en el Estado de Aguascalientes**", presentada por la alumna **Biol. Dulce Janeth Aguayo González** como requisito para obtener el grado de Maestra en Ciencias con opción a Agronómicas. A mi juicio, este documento contiene ya todas las correcciones solicitadas por un servidor al hacer la revisión del mismo. Por lo anterior, considero que se puede proceder ya a su impresión definitiva y a la programación del examen de grado.

ATENTAMENTE

"SE LUMEN PROFERRE"

Jesús María, Aguascalientes., 07 de Junio de 2016

Dra. Laura Eugenia Pérez Cabrera
Miembro del Comité tutorial
Sinodal designado para el Examen de Grado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M.C. Gabriel Ernesto Pallás Guzmán

Decano del Centro de Ciencias Agropecuarias

Presente

Por este medio le comunico que he revisado la versión final del escrito de tesis "**Producción de huilacoche [*Ustilago maydis* (D.C) Corda] en el Estado de Aguascalientes**", presentada por la alumna **Biol. Dulce Janeth Aguayo González** como requisito para obtener el grado de Maestra en Ciencias con opción a Agronómicas. A mi juicio, este documento contiene ya todas las correcciones solicitadas por un servidor al hacer la revisión del mismo. Por lo anterior, considero que se puede proceder ya a su impresión definitiva y a la programación del examen de grado.

ATENTAMENTE

"SE LUMEN PROFERRE"

Jesús María, Aguascalientes., 07 de Junio de 2016

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'MA'.

Dr. Marcelo Acosta Ramos

Miembro del Comité tutorial

Sinodal designado para el Examen de Grado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

OFICIO NO. CCA-D-111500-140-16

DRA. GUADALUPE RUÍZ CUÉLLAR
DIRECTORA GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
PRESENTE.

Por medio del presente me permito comunicarle a usted que la tesis titulada "PRODUCCIÓN DE HUITLACOCHÉ [*USTILAGO MAYDIS* (D.C) CORDA] EN EL ESTADO DE AGUASCALIENTES", de la alumna **DULCE JANETH AGUAYO GONZÁLEZ**, egresada de la Maestría en Ciencias con opción a Agronómicas, respeta las normas y lineamientos establecidos institucionalmente para su elaboración y su autor cuenta con el voto aprobatorio de su tutor y comité tutorial.

Sin más por el momento aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
Jesús María, Ags., 08 de Junio del 2016.
"Se Lumen Proferre"



M. en C. GABRIEL ERNESTO PALLÁS GUZMÁN
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

c.c.p. Jefa del Departamento del Control Escolar
c.c.p. Sección de Certificados y Títulos
c.c.p. Secretario Técnico
c.c.p. Estudiante
c.c.p. Archivo

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Fidel Guevara Lara**, que pese no llevar el título de tutor se desempeñó como tal, gracias por todos sus conocimientos, paciencia, disponibilidad de tiempo y consejos que me brindó a lo largo de este proyecto, por ser quien me impulso a realizar este sueño y ser parte de el.

A la **M.C. Lorena Sandoval**, por toda su ayuda en el laboratorio, consejos y por siempre preocuparse de mi desarrollo profesional.

A la **Dra. Laura Eugenia Pérez Cabrera**, por siempre preocuparse y estar al pendiente en mis avances y trabajos pendientes por entregar.

Al **Dr. Alberto García**, por enseñarme la constancia y la dedicación que se le debe tener a todo lo que quiera realizar, por ser mi tutor y siempre apoyarme y guiarme.

Al **Dr. Marcelo Acosta**, por siempre estar en mis seminarios, por tener el tiempo para mis revisiones y retroalimentarme.

Al **M.C. Ernesto Gaona**, por ser mi evaluador externo en mis seminarios, por sus consejos que me ayudaron mucho y sus puntos de vista que hicieron mejorar el proyecto.

Al **Dr. José de Jesús Luna**, por su apoyo para la realización de la parte estadística y siempre su disponibilidad de tiempo para escucharme y ayudarme en todo.

A **Marlene Posada**, por su apoyo, disponibilidad y paciencia para ayudarme con el trabajo en campo.

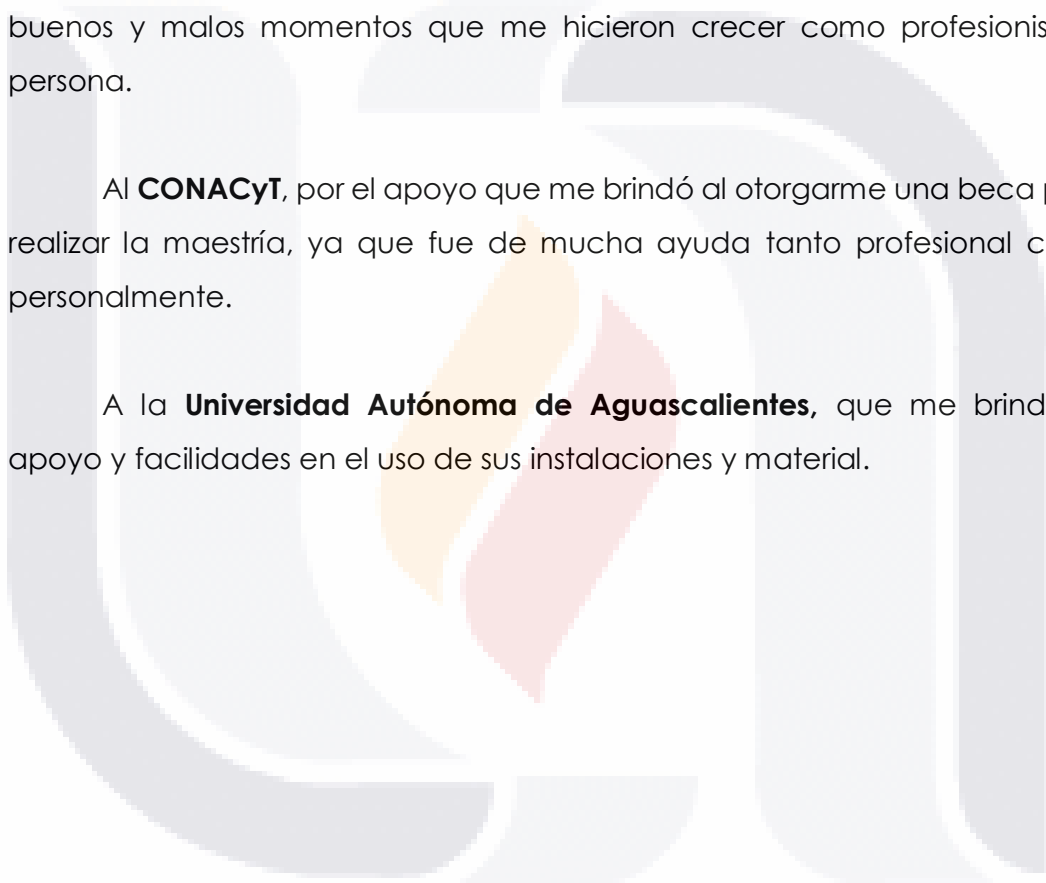
A **Alejandro Torres**, por sus conocimientos compartidos y por su apoyo en cualquier cosa que se me presentó.

Al **Dr. Jesús Meraz**, por contagiarme siempre de su alegría y buen humor, por brindarme cualquier ayuda y consejos que me hicieron crecer como profesionista.

A todos **mis compañeros de la maestría**, por compartir excelentes, buenos y malos momentos que me hicieron crecer como profesionista y persona.

Al **CONACyT**, por el apoyo que me brindó al otorgarme una beca para realizar la maestría, ya que fue de mucha ayuda tanto profesional como personalmente.

A la **Universidad Autónoma de Aguascalientes**, que me brindó su apoyo y facilidades en el uso de sus instalaciones y material.



DEDICATORIAS

A mis padres **Minerva González** y **Mario Aguayo**, por su amor y apoyo incondicional que me demostraron en cualquier situación que se presentó a lo largo de este gran sueño, por todos sus consejos y sabiduría que compartieron para nunca dejarme caer.

A mis hermanos **Minerva, Mario** y **Oscar Aguayo González**, por su porras y apoyo que me brindaron en todo momento.

A mi compañero incondicional de la vida **Luis Enrique Gallegos**, por aguantarme en todos mis días malos, mis caídas y siempre estar ahí para mí, por ser un motor para mi vida y demostrarme su amor cada día.

Y sobre todo a **Dios** por haberme dejado cumplir un sueño más y poder llegar hasta este punto de mi vida, y por darme todas las satisfacciones que tuve a lo largo de este proyecto de vida.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ACRÓNIMOS	6
RESUMEN GENERAL	7
ABSTRAC	8
INTRODUCCIÓN GENERAL	9
CAPITULO I. MARCO TEÓRICO	10
1.1 <i>Ustilago maydis</i>	10
1.1.1 Clasificación taxonómica.....	12
1.1.2 Ciclo de vida.....	13
1.1.3 Apareamiento	15
1.1.4 Cepas <i>killer</i> de <i>U. maydis</i>	15
1.1.5 Determinación de RNA de virus en cepas de <i>U. maydis</i>	16
1.2 HUITLACOICHE	16
1.2.1 Valor nutricional	17
1.2.2 Importancia económica	19
1.2.3 Evaluación de semillas de maíz para la producción de huitlacoiche mediante inoculación artificial	20
1.2.4 Evaluación de cepas de <i>U. maydis</i> en semillas de maíz	23
1.3 MAÍZ	23
1.3.1 Taxonomía.....	24
1.3.2 Ciclo de vida	24
1.3.3 Condiciones ambientales	24
1.3.4 Importancia económica	25
1.3.5 Producción nacional y local	25
1.3.6 Genotipo de maíz	27
1.3.7 Nutrición	27
1.4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
1.5 HIPÓTESIS	30
1.6 OBJETIVOS	30

1.7 BIBLIOGRAFÍA	31
CAPITULO II. RENDIMIENTO DE LA PRODUCCIÓN NATURAL DE HUITLACOCHÉ EN EL ESTADO DE AGUASCALIENTES	37
2.1 RESUMEN.....	37
2.2 INTRODUCCIÓN	38
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS	39
2.3.1 Área de estudio	39
2.3.2 Toma de datos.....	39
2.3.3 Variables a evaluar	41
2.3.4 Análisis estadístico	41
2.4 RESULTADOS Y DISCUSIONES	42
2.5 CONCLUSIONES	46
2.6 BIBLIOGRAFÍA	47
CAPITULO III. CAPACIDAD DE <i>Ustilago maydis</i> PARA INFECTAR PLANTAS DE MAÍZ EN CONDICIONES CONTROLADAS CON EL MÉTODO DE INOCULACIÓN ARTIFICIAL	49
3.1 RESUMEN.....	49
3.2 INTRODUCCIÓN	50
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS	52
3.3.1 Extracción, lavado y germinación de teliosporas	52
3.3.2 Obtención de esporidias y cepas monoesporidiales de <i>U. maydis</i>	53
3.3.3 Pruebas de apareamiento <i>in vitro</i>	54
3.3.4 Preparación del inoculo	55
3.3.5 Diseño experimental en invernadero	56
3.3.6 Inyección del inoculo	59
3.3.7 Toma de datos	59
3.3.8 Variables a evaluar	59
3.3.9 Análisis estadístico	59
3.4 RESULTADOS Y DISCUSIONES	61
3.5 CONCLUSIONES	71
3.6 BIBLIOGRAFÍA	72

CAPITULO IV. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y CORROBORACIÓN MOLECULAR DE CEPAS AISLADAS DE *U. maydis* 75

4.1 RESUMEN 75

4.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CAPAS AISLADAS DE *Ustilago maydis* 76

4.2.1 INTRODUCCIÓN 76

4.2.2 MATERIALES Y MÉTODOS 77

4.2.3 RESULTADOS Y DISCUSIONES 78

4.2.4 CONCLUSIONES 81

4.3 CORROBORACIÓN MOLECULAR DE CEPAS AISLADAS DE *U. maydis* .82

4.3.1 INTRODUCCIÓN 82

4.3.2 MATERIALES Y MÉTODOS 84

4.3.2.1 Protocolo de extracción de ADN+ARN usando el kit Wizard® Magnetic DNA 84

4.3.2.2 Prueba de inhibición para determinar cepas con RNA de virus (Puhalla, 1968) 85

4.3.2.3 Prueba de inhibición para determinar cepas con RNA de virus (Koltin, 1975) 86

4.3.2.4 Protocolo de extracción de ADN+ARN de *U. maydis* (Guevara, 1999) 87

4.3.3 RESULTADOS Y DISCUSIONES 89

4.3.4 CONCLUSIONES 92

4.4 BIBLIOGRAFÍA 93

CONCLUSION GENERAL..... 95

ANEXOS 94

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos evaluados para la producción natural de huitlacoche en municipios del Estado de Aguascalientes..... 40

Cuadro 2. Escala para evaluar el índice de severidad del huitlacoche en maíz 41

Cuadro 3. Componentes del rendimiento producido de manera natural en el Estado de Aguascalientes..... 43

Cuadro 4. Correlación entre condiciones ambientales y rendimiento por hectárea para los tratamientos con riego y temporal 45

Cuadro 5. Cepas a evaluar 55

Cuadro 6. Variedades de maíz utilizados en invernadero 57

Cuadro 7. Tratamientos colocados en el invernadero para la evaluación de producción de huitlacoche 58

Cuadro 8. Variedad-cruza evaluados para la producción de huitlacoche. 62

Cuadro 9. Correlación entre variables y cruza evaluadas 65

Cuadro 10. Efectividad biológica de las cruza del Estado de Aguascalientes 66

Cuadro 11. Cepas aisladas de diferentes municipios del Estado de Aguascalientes..... 77

Cuadro 12. Caracterización morfológica de las cepas aisladas del Estado de Aguascalientes..... 79

Cuadro 13. Comparación de la coloración de cepas con la producción obtenida..... 81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Huitlacoche en mazorca de maíz en campo.....	10
Figura 2. Ciclo patogénico del carbón del maíz producido por <i>U. maydis</i> ..	14
Figura 3. Uso del suelo en Aguascalientes	26
Figura 4. Comparación de las condiciones ambientales en los tratamientos con riego.....	44
Figura 5. Comparación de las condiciones ambientales en los tratamientos de temporal.....	44
Figura 6. Diferencias entre las intensidades de apareamiento	55
Figura 7. Comparación de las tres diferentes cruzas en la semilla híbrida y criolla	64
Figura 8. Variables evaluadas en las variedades de maíz y cruzas del hongo <i>U. maydis</i>	67
Figura 9. Agallas de huitlacoche en mazorca mediante la producción artificial de los diferentes tratamientos evaluados.....	69
Figura 10. Agallas de huitlacoche en mazorca mediante la producción natural	70
Figura 11. Prueba de inhibición para la determinación de ARN viral en cepas de <i>U. maydis</i>	86
Figura 12. Prueba de inhibición con la presencia de un halo inhibitorio entre la cepa césped sensible y la cepa contaminada con ARN de virus	87
Figura 13. Cepa con bandas de ARN viral en <i>U. maydis</i>	89
Figura 14. Extracción de ADN en gel de agarosa al 0.08%	91

ACRÓNIMOS

%	Por ciento
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado
°C	Grados centígrados
Kg	Kilogramo
g	Gramos
Kg ha ⁻¹	Kilogramos por hectárea
t ha ⁻¹	Toneladas por hectárea
s	Segundos
min	Minutos
hr	Hora
hrs	Horas
L	Litros
mL	Mililitros
mg	Miligramos
µL	Microlitros
µm	Micrometros
cm	Centímetros
mm	Milimetro
m	Metros
m ²	Metros cuadrados
Km ²	Kilometros cuadrados
ha	Hectárea
spp	Varias especies
ADN	Ácido desoxirribonucleico
DNA	Deoxyribonucleic acid
pH	Potencial hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
USD	Dólar de los Estados Unidos de America
VLPs	Virus-like particles
dsRNA	Ácido ribonucleico de doble cadena
RNA	Ribonucleic acid
ARN	Ácido ribonucleico
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ANOVA	Análisis de varianza
mg/L	Miligramos por litro
PDA	Papa dextrosa agar
PDB	Caldo papa dextrosa

RESUMEN GENERAL

El huitlacoche posee características nutrimentales como altos niveles de fibra dietaria, proteínas, aminoácidos, oligosacáridos, ácidos grasos esenciales, vitaminas, minerales y compuestos fenólicos, lo que hace que pueda aportar un beneficio importante a la nutrición. La amplia variabilidad patogénica en cepas de *Ustilago maydis* permite la evaluación en semillas de maíz híbridas y criollas para la producción de huitlacoche. La incidencia, severidad y el rendimiento de huitlacoche se ve afectado por la variabilidad patogénica, con esto se puede explicar la producción de huitlacoche que pueden generar estas variedades tanto de maíz como de cepas de *U. maydis*. Por lo anterior, los objetivos de esta investigación fueron, evaluar la producción natural del huitlacoche, evaluar la capacidad patogénica de cepas de *U. maydis* del Estado de Aguascalientes en maíces híbridos y criollos para la producción de huitlacoche en condiciones controladas con el método de inoculación artificial y realizar la caracterización morfológica y corroboración molecular de cepas aisladas de *U. maydis*. En la producción natural del Estado de Aguascalientes, la semilla criolla del Ejido Providencia en el municipio de Aguascalientes presentó el mayor rendimiento con 90.554 kg ha⁻¹. En la producción artificial con el método de inoculación artificial se evaluaron dos cruza de *U. maydis* del Estado de Aguascalientes y una cruza testigo de *U. maydis* del Estado de México contra seis variedades de semilla híbrida y criolla. Las cepas del Estado Aguascalientes presentaron un rendimiento de entre 4.9 a 15.1 t ha⁻¹, siendo una buena opción para la producción de huitlacoche en condiciones controladas. De las cepas aisladas de *U. maydis*, se realizó una caracterización morfológica encontrándose el color marrón como color predominante, representando las cepas oscuras las de menor producción de huitlacoche. Sin embargo; existen cepas llamadas *killer* que pueden inhibir o matar otras cepas de *U. maydis*, que al someterlas a la corroboración molecular se encontró una variante en el tipo de bandas que aparecen en algunas cepas.

ABSTRAC

Huitlacoche has nutritional characteristics as high levels of dietary fiber, protein, amino acids, oligosaccharides, essential fatty acids, vitamins, minerals and phenolic compounds, which makes it can bring significant benefit to nutrition. The wide variability in pathogenic strains of *Ustilago maydis* allows evaluation of hybrid seed corn and creole for the production of corn smut. The incidence, strictness and yield huitlacoche is affected by pathogenic variability, this can be explained with production of corn smut that can generate these varieties of both corn and strains of *Ustilago maydis*. Therefore, the objectives of this research were to evaluate the natural production of corn smut, evaluate the pathogenicity of strains of *U. maydis* state of Aguascalientes in hybrid corns and creole for the production of corn smut under controlled conditions in the method of inoculation artificial and perform morphologic and molecular characterization corroboration of strains isolated from *U. maydis*. In the natural production of the State of Aguascalientes, the native seed of Ejido Providencia in the municipality of Aguascalientes he had the highest performance with 90,554 kg ha⁻¹. In the artificial production method of artificial inoculation *U. maydis* two crosses of the State of Aguascalientes and a witness crosses *U. maydis* Mexico State against six varieties of hybrid and native seed were evaluated. Aguascalientes State strains showed a yield of between 4.9 to 15.1 t ha⁻¹, be a good option for the production of corn smut under controlled conditions. Strains isolated from *U. maydis*, a morphological characterization finding the brown as predominant color was made, representing the obscure strains the lower production of corn smut. Nevertheless; biotypes killer calls that can inhibit or kill other strains of *U. maydis*, which when subjected to the molecular corroboration a variant was found in the type of banding in some strains.

INTRODUCCIÓN GENERAL

U. maydis es un hongo basidiomiceto que infecta a las plantas del maíz, al hongo que crece en la mazorca se le llama "huitlacoche". El huitlacoche es un alimento con características nutrimentales muy atractivas y sabor único (Méndez-Morán y Ruiz-Herrera, 2008; Kealey y Kosikowski, 1981; Paredes y Valverde, 1999).

Las agallas que se forman en la mazorca son usadas en la preparación de diferentes platillos. Debido a su sabor único, el consumo de huitlacoche va en aumento, ya que tiene una gran demanda en Europa, Japón y Estados Unidos, principalmente. Es utilizado por chefs prestigiados en restaurantes exclusivos, preparando sopas, cremas, omelettes, budines, mousse, relleno de crepas, chiles poblanos, pechugas de pollo, ternera, escalopas de cerdo y filetes de pescado, y salsas para acompañar otros platillos (Ruiz-Herrera y Martínez-Espinosa, 1998; González-Alamillo, 2010; Jiménez de León, 2007).

En estudios previos se ha encontrado que el huitlacoche puede aportar un beneficio importante a la salud, ya que disminuye el riesgo de contraer cáncer de colon y la incidencia de enfermedades crónico degenerativas (Beas *et al.*, 2011).

Se han realizado diversas investigaciones para la producción de este hongo en variedad de maíces híbridos y criollos de diferentes partes de la República Mexicana, sin embargo algunas cepas de *U. maydis* producen una proteína letal que inhiben el crecimiento de otras cepas del mismo hongo que se encuentran cerca, esto se debe a la presencia de RNA viral de doble cadena. La presencia de este virus en algunas cepas de *U. maydis* evita que se lleve a cabo el apareamiento y se produzca la infección del hongo (Puhalla, 1968; Day y Anagnostakis, 1973; Wood y Bozarth en 1973).

CAPITULO I

MARCO TEORICO

1.1 *Ustilago maydis* (D. Corda).

U. maydis es un hongo basidiomiceto patógeno que en la naturaleza infecta dos plantas, el maíz (*Zea mays*) y teozintle (*Zea mays ssp. parviglumis*), siendo el agente etiológico de la enfermedad llamada carbón común o "huitlacoche" (figura 1) (nombre Náhuatl por el cual se conoce en México) (Méndez-Morán y Ruiz-Herrera, 2008).



Figura 1. Huitlacoche en mazorca de maíz en campo (Dulce Janeth Aguayo González).

Dada la especificidad de huésped de *U. maydis*, el hongo es un parásito que evolucionó a partir de un antecesor común con otros *Ustilago spp.* hasta

adquirir la categoría de especie diferente, al convertirse en un patógeno específico del teozintle y el maíz (Ruiz, 2008). Existen diversos factores ambientales que favorecen el desarrollo de este hongo como la temperatura, humedad relativa y el material genético del maíz. Esta enfermedad se presenta en casi todo el mundo donde se cultiva el maíz, pero con más frecuencia y mayores daños en climas templados y húmedos (Reyes, 1990; Pan *et al.*, 2008). Este hongo propicia la formación de grandes tumores o agallas que se pueden desarrollar en las partes aéreas de la planta: espiga, hoja, mazorca y tallo (Bolker, 2001). Posiblemente los estudios iniciales más serios sobre el ciclo de vida y la fisiología de *U. maydis* fueron los realizados por Christensen y Stakman en los años 1930-1950, mismos que fueron recogidos por Christensen (1963).

Pero es quizás el terreno de la genética donde *U. maydis* aportó sus más importante contribuciones iniciales como modelo ideal para la comprensión de las bases moleculares de esta ciencia. Los primeros estudios serios que se realizaron sobre la genética de *U. maydis* fue David Perkins, quien siendo estudiante de la Universidad de Columbia en Nueva York, un día de los años 40 del siglo pasado, en que recorría la propiedad Rockefeller, pasó por un sembrado de maíz, y le llamó la atención una mazorca infectada con *U. maydis*. La recogió y la llevó a su laboratorio, donde realizó un interesante estudio genético, que involucró el primer aislamiento de mutantes bioquímicas del hongo (Perkins, 1949).

Sin embargo, fue Robin Holliday quien en Inglaterra y desde la mitad del siglo pasado, realizó los estudios más profundos de la genética de *U. maydis*, estableció los modelos de recombinación genética aceptados actualmente y sentó las bases para convertir a este hongo en un modelo para el estudio de aspectos biológicos básicos. Actualmente se considera que *U. maydis* es el modelo fúngico más estudiado para el análisis de la patogénesis en plantas (Ruiz, 2008).

U. maydis ha llegado a ser uno de los modelos más importantes, interesante y ampliamente usado para el estudio de ciertos aspectos fundamentales en biología, ya que este hongo es muy fácil de cultivar e investigar en laboratorio y en invernadero así como la presencia de propiedades genéticas que lo hacen un importante candidato para explicar el mecanismo molecular de los hongos fitopatógenos y se encuentra ampliamente estudiado (Basse y Steinberg, 2004; Bolker, 2001). A través de este modelo se espera poder explicar la interrelación entre patógenos y plantas, pues se asume que lo que se aprenda de este hongo puede extrapolarse a otras enfermedades fúngicas más difíciles de estudiar (Kahmann, 2002).

Las características que han hecho de un modelo atractivo para el estudio genético molecular se pueden resumir de la siguiente manera: la existencia de una fase haploide; la posibilidad de construir diploides en el laboratorio, lo cual hace posible el llevar a cabo exámenes de dominancia y complementación; la transformación con DNA exógeno; su susceptibilidad a que un segmento genómico sea remplazado con una copia mutada del gen por recombinación homóloga; la existencia de múltiples marcadores de selección para la manipulación genética; la capacidad para completar su ciclo de vida en plantas de maíz jóvenes de tres semanas de edad o menos; la posibilidad de analizar la transición dimórfica (levadura a micelio) *in vitro* y el hecho de que su genomio haya sido totalmente secuenciado y sea accesible (Ruiz, 2008).

1.1.1 Clasificación taxonómica

Reino Fungi
División Basidiomycota
Clase Basidiomycetes
Orden Ustilaginales
Familia Ustilaginaceae
Género *Ustilago*
Especie *U. maydis*

Este hongo fue introducido en Europa por los españoles (probablemente en forma accidental con maíz infectado), pero durante siglos se pensó que la enfermedad era debida a una alteración fisiológica de la planta. En 1836 Unger identificó al huitlacoche como la infección por un hongo al que llamó *Ustilago zaeae*; y en 1883-1895 Breffeld logró la infección experimental del maíz con esporas del hongo; hasta 1927 se conoció su ciclo de vida al descubrirse su estado sexual. Su nombre fue oficialmente cambiado a *U. maydis* (De Candolle, Corda) por Stevenson y Johnson en los Estados Unidos (Christensen 1963).

Este hongo basidiomiceto pertenece al grupo de los Ustilaginales. Los Ustilaginales constituyen un importante grupo de hongos fitopatógenos con más de 50 géneros y 1200 especies, que infectan a más de 4000 plantas monocotiledóneas divididas en 75 familias en todo el mundo. Entre las especies de Ustilaginales fitopatógenos podemos citar a *Ustilago hordei* (carbón cubierto) y *U. nuda* (carbón volador), *U. nigra* (carbón volador negro) (Ruiz, 2008).

1.1.2 Ciclo de vida

U. maydis no es un parásito obligado, pero requiere de uno de sus dos hospederos naturales para realizar su ciclo sexual. La infección es generalmente local y no sistémica. Este hongo produce un micelio dicariótico, cuyas células se transforman en teliosporas negras, esféricas o elipsoidales que presentan protuberancias prominentes y en forma de espina. Estas teliosporas germinan produciendo un basidio de cuatro células (el promicelio), de cada una de las cuales se desarrolla una basidiospora hialina, ovalada uninucleada. La fase de patogénesis se inicia con el apareamiento de dos células que compartan *loci* de apareamiento (sexuales) compatibles. Las basidiosporas germinan sobre la superficie del hospedante y producen una hifa fina, la cual se introduce en las células epidérmicas por penetración directa, la hifa resultante aumenta su diámetro y se vuelve diacrotica. Esta hifa se desarrolla en los tejidos de la planta principalmente a nivel intracelular.

Las células que rodean a la hifa son estimuladas para que sufran hipertrofia e hiperplasia y comienzan a formarse las agallas. Las hifas adquieren formas irregulares y se fragmentan, cubriéndose finalmente con una pared gruesa equinulada y pigmentada. Durante una fase de este proceso ocurre la citocinesis con la formación del estado diploide del hongo. Las esporas maduras (teliosporas) son liberadas cuando las agallas se secan y se abren. Las teliosporas constituyen el estado diploide del hongo. Las teliosporas germinan rápidamente en un medio nutritivo e incluso en agua, la presencia de disacáridos favorece el proceso. La formación de la teliospora se inicia con la formación de un tubo germinativo denominado promicelio, el núcleo de la espора migra hacia el promicelio y en este punto ocurre la meiosis para formar cuatro basidiosporas en forma acropétala las cuales geman para reiniciar el ciclo de vida (figura 2) (Agrios, 2006; Ruiz, 2008; Valverde *et al.*, 1995).

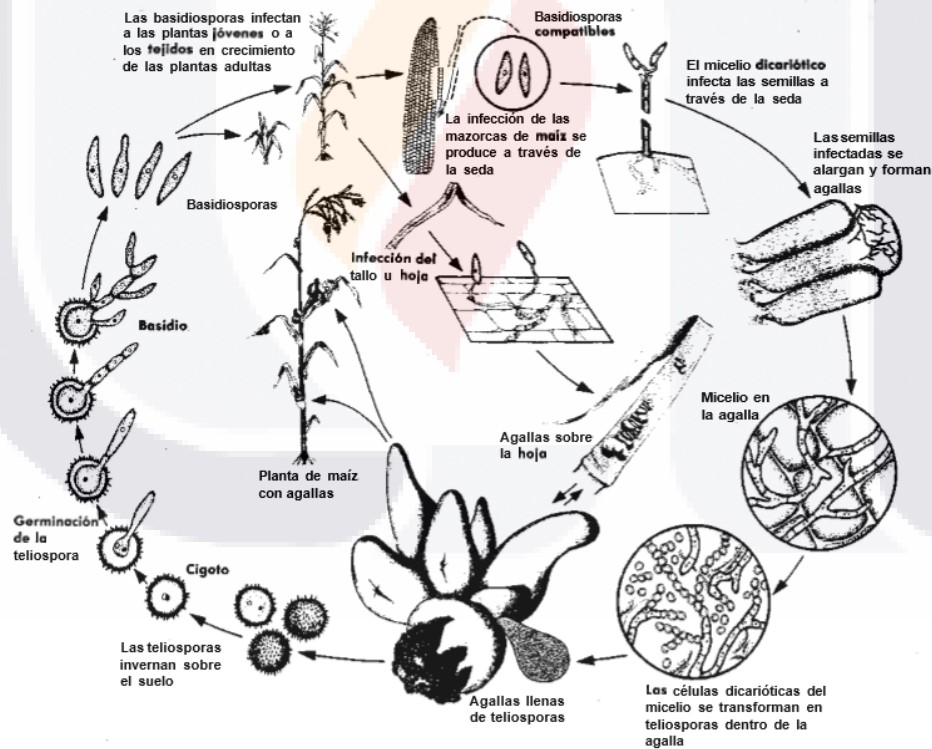


Figura 2. Ciclo patológico del carbón del maíz producido por *Ustilago maydis* (Agrios, 2006).

1.1.3 Apareamiento

El apareamiento es de tipo tetrapolar y es controlado por dos loci llamados *a* y *b*, el primero con dos alelos y el segundo con múltiples alelos (Rowell 1955a, 1955b, Holliday 1974). Solamente la unión de células haploides con diferentes loci *a* y *b* da lugar a la forma patogénica del hongo. Se ha demostrado que el locus *a* gobierna el apareamiento y la fusión celular (Trueheart y Herskowitz 1992), y que solamente las células que poseen diferentes alelos *a* pueden fusionarse. La compatibilidad del locus *b* controla el crecimiento filamentoso y la patogenicidad de *U. maydis*, independientemente del locus *a*. Varios alelos del locus *b* han sido clonados y secuenciados, demostrándose que cada uno de ellos contiene dos ORF separados que codifican dos polipéptidos de 410 y 626 aminoácidos respectivamente (*bE* y *bW*). Ambos polipéptidos contienen una región de homeodominio en la parte central, con dominios variables separados, así como una región constante con una homología del 90% entre los diferentes alelos analizados. La funcionalidad del locus *b* depende de que las células que se aparean posean diferentes alelos *b*. Las proteínas *bE* y *bW* pertenecientes a diferentes alelos se asocian para dar lugar a un heterodímero que actúa como un factor de transcripción específico para la síntesis de factores que intervienen en el proceso patogénico (Yee y Kronstad 1998).

1.1.4 Cepas Killer de *U. maydis*

Algunas cepas de *U. maydis* producen una proteína letal que inhiben el crecimiento de otras cepas del mismo hongo que se encuentran cerca. La inhibición es causada por una sustancia que se difunde fuera de las células en el medio circundante. Las cepas que producen esta sustancia inhibidora se llaman cepas P1; las que no lo hacen son cepas P2. Las cepas P2 se pueden dividir en dos tipos, cepas P2S (sensibles al inhibidor) y cepas P2r (no se ve afectada por el inhibidor). Las cepas P1 llevan ambas determinantes, asesina e inmunidad. Estos determinantes se transmiten a cepas sensibles P2 en la formación heterocarión. La inmunidad al inhibidor también se transmite como un carácter citoplasmática (cepas inmunes a P1 llamadas P3) que puede ser

heredado por separado de la función inhibidora o asesino (Puhalla, 1968; Day y Anagnostakis, 1973).

También se descubrieron otras dos cepas de *U. maydis* con capacidad inhibitoria, llamadas P4 y P6. Aunque algunas cepas inhiben el crecimiento de células sensibles mientras que otras matan a las células sensibles, a las que se les llama cepas asesinas inhibitorias. Las cepas asesinas P4 y P6 pueden matar a cepas P1 y P3 (donde P3 denota la inmunidad citoplásmicamente determinado y la especificidad del asesino en cuestión) (Puhalla (inédito) citado por Koltin y Day, 1976).

1.1.5 Determinación de RNA de virus en cepas de *U. maydis*.

Wood y Bozarth en 1973, detectaron partículas similares a virus (VLPs) en cepas P1 y P3. Cepas P2S examinadas también contenían VLPs. Se encontró que en las VLPs contenían ARN de doble cadena (dsRNA). La excreción de la toxina asesina está relacionado con la presencia de ARN de doble cadena (dsRNA) partículas similares a virus (VLPs). Cepas sin VLPs son sensibles, a menos que contengan un gen nuclear para la resistencia.

1.2 HUITLACOCHÉ

El huitlacoche es un alimento con características nutrimentales muy atractivas y sabor único que se produce en plantas de maíz por la infección del hongo *U. maydis*. Las agallas formadas en la mazorca del maíz son llamadas comúnmente huitlacoche o "cuitlacoche", palabra de origen azteca que traducida al español significa suciedad o cuervo (Kealey y Kosikowski, 1981; Paredes y Valverde, 1999).

En México, desde el periodo precolombino las agallas que se forman en la mazorca son usadas en la preparación de diferentes platillos (Ruíz-Herrera y Martínez-Espinosa, 1998). El gusto por su sabor tan peculiar que le ha valido el nombre de "trufa americana" le ha abierto las puertas en la gastronomía

(Ruiz, 2008). Debido a su sabor único, el consumo de huitlacoche va en aumento, ya que tiene una gran demanda en Europa, Japón y Estados Unidos, principalmente. Es utilizado por chefs prestigiados en restaurantes exclusivos, preparando sopas, cremas, omelettes, budines, mousse, relleno de crepas, chiles poblanos, pechugas de pollo, ternera, escalopas de cerdo y filetes de pescado, y salsas para acompañar otros platillos. Por ello se le ha reconocido como exquisitez culinaria en diversos periódicos y revistas como "Le Monde", "New York Magazine", "Country Living", "Bon Appétit", "Vogue", "The Egyptian Gazette", y otras (González-Alamillo, 2010; Jiménez de León, 2007).

1.2.1 Valor nutricional

En estudios previos se ha encontrado que los altos niveles de oligosacáridos de la familia de la rafinosa y fibra dietaria sugieren que el huitlacoche puede aportar un beneficio importante a la salud, ya que dichos componentes han demostrado estar directamente involucrados en disminuir el riesgo de contraer cáncer de colon; las concentraciones elevadas de compuestos fenólicos que se encontraron tanto en las muestras colectadas como generadas están directamente relacionadas con la actividad antioxidante que presentó el hongo; esto indica que el huitlacoche puede considerarse dentro del grupo de los nutraceuticos, además de que puede aportar un efecto farmacéutico pues dichos componentes bioactivos están relacionados con la disminución de la incidencia de enfermedades crónico degenerativas (Beas *et al.*, 2011).

Este hongo tiene bajo contenido de sodio, grasa y colesterol pero presentan proteínas (10-25 %) con niveles sobresalientes de lisina y aminoácidos, fibra (10-30%), ácidos grasos como linoleico y metionina, por lo que son considerados de calidad intermedia entre proteínas vegetales y animales. Seguido por leucina, glicina y ácido aspártico (colectivamente representan el 29.97 % del total de aminoácidos en la muestra). También presentan minerales (calcio, nitrógeno y fósforo) y vitaminas (riboflavina, niacina, biotina y ácido fólico), y

se les considera un buen suplemento alimentario, especialmente para las personas vegetarianas (Kealey y Kosikowski, 1981, Valverde *et al.*, 1993; Vanegas *et al.*, 1995; Paredes y Valverde, 1999; Lizárraga y López, 1997).

El contenido de hidratos de carbono y fibra es de 53 a 66.5 % y 7.5 a 26.6 %, respectivamente, mientras que el de grasas es de 1.0 a 6.5 %, contiene aminoácidos esenciales como la lisina, glicina, valina, leucina, y ácido glutámico, así como otros catorce aminoácidos comunes, y otros no comunes como el ácido γ -aminobutírico, ornitina y el ácido tricotómico. Su contenido de ácidos grasos es elevado, siendo los predominantes el palmítico, el oleico y linoleico (Gunasekaran *et al.*, 1972; Lizarraga-Guerra y López, 1997; Valverde *et al.*, 1995; Venegas *et al.*, 1995).

También contiene monosacáridos, siendo los más abundantes la glucosa, la fructosa, el glicerol, el sorbitol, y el manitol (Lizarraga-Guerra y López, 1998). Además contiene cantidades considerables de polifenoles, β -glucanos, azúcares libres y compuestos antioxidantes tales como lacasas y tirosinasas, las cuales tienen efectos antioxidantes sobre *p*-hidroxifenoles *in vitro* (Desentis-Mendoza *et al.*, 2006) y que lo hacen un alimento nutracéutico. Así mismo contiene niveles adecuados de vitaminas (tiamina, biotina, riboflavina, niacina, ácido fólico y ácido ascórbico) y minerales como calcio, nitrógeno, fósforo (Paredes y Valverde, 2006; Castro-Espinoza y Ruiz-Hernández, 2003), y oligoelementos como el cromo, cobre, hierro, maganeso, níquel y plomo (Serafin *et al.*, 2005).

Pimentel-González *et al.* (2011), estudiaron la influencia de la variedad de maíz usado como sustrato en las características fisicoquímicas del hongo Huitlacoche (*U. maydis*). Utilizaron tres variedades de maíz: Bengala, Tigre y QMP. Las variedades de maíz fueron producidas bajo las mismas condiciones y fueron caracterizados químicamente: almidón, proteína, lisina y triptófano. Se inocularon artificialmente las diferentes variedades de maíz con el hongo *U. maydis*. Se recolectó el huitlacoche a los 28 días y se le determinó: °Brix,

acidez titulable, vitamina C, pH, clorofila, azúcares, luminosidad, ángulo de tono, pureza de color, proteína, lisina, triptófano e índice de calidad. Los resultados mostraron que las tres variedades de maíz tuvieron diferencias significativas ($P < 0.05$) en almidón, lisina y triptófano. En el huitlacoche producido en diferentes variedades de maíz se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en °Brix, acidez titulable, vitamina C, clorofila, azúcares totales, proteína, pureza de color, lisina, triptófano e índice de calidad. Los resultados sugieren que la variedad de maíz tiene influencia en las características fisicoquímicas de *U. maydis*, encontrando mayor índice de calidad cuando es inoculado en la variedad de maíz QPM.

1.2.2 Importancia económica

El huitlacoche que se consume y se comercializa es recolectado en campos de maíz donde se presenta en infecciones naturales (Ruiz, 1999). El hecho de que el huitlacoche debe ser cosechado a mano significa que el costo de la producción de maíz dulce probablemente refleja con más precisión el costo de la producción de huitlacoche. Los costos adicionales no incluidos en el estándar de producción de maíz dulce incluirían el costo de desespigamiento, mantenimiento y preparación de inóculos y la inoculación (Tracy *et al.*, 2007). En algunas regiones de Estados Unidos, el huitlacoche se vende congelado hasta en 40 dólares por kg principalmente a restaurantes.

El huitlacoche se ha considerado como un cultivo alternativo debido al incremento de su popularidad como alimento pues es consumido y vendido enlatado por algunas empresas de alimentos ya que esto representa importantes ingresos económicos. A nivel nacional su producción se limita a la región central de México donde se comercializan de 400 a 500 toneladas por año (Villanueva, 1997; Pataky, 1991). En México, el precio por kilogramo de huitlacoche varía en torno a \$15, en la época de producción natural de julio y agosto; y entre \$60 y \$120, fuera de dichos meses; aunque de manera extraordinaria ha llegado a valer hasta \$380.00 el kilogramo en el mes de abril, esto supera a la producción de forraje verde. Existe una demanda creciente

para los mercados de U.S.A, Unión Europea y Japón, llegando a alcanzar precios superiores a los 20 USD\$/kg como producto congelado, aunque como producto fresco se comercializa en 11.16 USD\$/Kg y 3.5 USD\$/mazorca (Venegas *et al.*, 1995; Villanueva, 1997; Martínez *et al.*, 2000; Salazar *et al.*, 2013).

1.2.3 Evaluación de semillas de maíz para la producción de huitlacoche mediante inoculación artificial

Valdez *et al.* (2009), observaron un cierto efecto del material genético de maíz utilizado sobre la cobertura de la mazorca y el rendimiento del huitlacoche. La evaluación de genotipos de maíz para fines de producción de huitlacoche, permite conocer su nivel de susceptibilidad genética (Pan *et al.*, 2008).

La infección natural algunas veces no es muy confiable, ya que la aparición del hongo en el maíz depende de las condiciones ambientales que conducen a la infección del carbón y a la asociación entre la etapa en el desarrollo del hospedero durante el período de infección y el tejido de la planta en el cual se forman las agallas. Un método eficiente de inoculación es más real para poder hacer evaluaciones de la resistencia del maíz al carbón común (Pataky, 1991).

El patosistema maíz-huitlacoche ha coevolucionado desde la época prehispánica hasta mantenerse, en la actualidad, en coexistencia equilibrada. Debido a la importancia económica que el hongo ha adquirido y al desarrollo de técnicas para la inducción artificial de éste, es necesario conocer las relaciones entre la variación del patógeno, del hospedante y de las condiciones ambientales en que ambas prosperan. Se han evaluado la respuesta del porcentaje de severidad e incidencia y rendimiento del hongo por planta en familias de maíz de medios hermanos maternos combinadas con aislados de *U. maydis*. Las diferencias resultantes dificultan recomendar una combinación específica familia y aislado. Se han observado diferencias

entre familias y entre aislados, la estimación de los componentes de varianza indicaron que la significancia es atribuida a las interacciones. En consecuencia de la alta interacción genotipo-ambiente, las familias y aislados presentaron comportamientos diferentes de un ambiente a otro, lo que dificulta recomendar una combinación específica de familia-aislado (Martínez-Martínez *et al.*, 2005).

Martínez-Espinoza *et al.* (1997), evaluaron 100 aislamientos del hongo en un híbrido experimental, seleccionando 12 de ellos por su vigor, presentando en promedio 190g del hongo por planta infectada, y 135.24g por planta inoculada (8.11 t ha^{-1} , $60\,000 \text{ plantas ha}^{-1}$), índice de severidad de 36.82 y una incidencia de 70.64%. En 1998 de las 300 familias evaluadas por inoculación con la mezcla de los 12 aislamientos seleccionados de 1997, se eligieron 16 familias susceptibles, que presentaron en promedio 154.97 g del hongo por planta infectada y 112.88 g por planta inoculada (6.67 t ha^{-1}), 76.67 % de incidencia y 34.82 de índice de severidad; así como 14 familias resistentes (0 % de incidencia) al ataque del hongo.

Diversas investigaciones han permitido la producción exitosa del huitlacoche, y se ha encontrado que la técnica de inoculación por inyección produce excelentes rendimientos y buena calidad del hongo (Valdez *et al.*, 2009), el inoculo debe obtenerse en un proceso controlado. La inoculación por el canal de los estilos cuando tienen 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 es el mejor método para obtener huitlacoche a gran escala (Tracy *et al.*, 2007).

Du Toit y Pataky (1999), evaluaron el efecto de la concentración de inóculo en el desarrollo de las agallas encontrándose que el máximo desarrollo de agallas ocurre a concentraciones de inoculo de entre 10^5 y 10^6 esporas/ml. En otro estudio Ulloa (2002) menciona que el tiempo óptimo para la inoculación del hongo es antes de la fecundación del maíz hasta el inicio de la

fecundación. Se utilizó una concentración de 2.5×10^6 esporas/ml y la inoculación se realizó con jeringas hipodérmicas inoculando 1 ml a cada jilote. El mejor sitio en la mazorca donde se presenta mayor porcentaje de infección es en el centro de la mazorca al inicio de la fecundación (Ruiz y Castro, 2001).

Con la técnica de inoculación y utilizando maíces criollos, se han obtenido rendimientos de hasta 15 t ha^{-1} , para el caso de los maíces híbridos el rendimiento rebasa las 7 t ha^{-1} bajo condiciones controladas (Valdez *et al.*, 2009; Madrigal *et al.*, 2010; Salazar *et al.*, 2013).

Madrigal *et al.* (2010), evaluaron cuatro híbridos en una densidad de población de $62,500 \text{ plantas ha}^{-1}$ y siete híbridos con una densidad de población de $166,666 \text{ plantas ha}^{-1}$. Los híbridos se inocularon con su respectivo aislado del hongo, previamente obtenido de cada híbrido. El mejor híbrido fue el 30G40, con una producción en invernadero de $1,649.2 \text{ kg ha}^{-1}$ (densidad: $62,500 \text{ plantas ha}^{-1}$), $7,923.30 \text{ kg ha}^{-1}$ ($166,666 \text{ plantas ha}^{-1}$) y $4,786.20$ (combinado); derivada de sus porcentajes de incidencia de 23.67, 52.41 y 38.04 % y de sus índices de severidad 11.08, 52.48 y 49.85, respectivamente. En el análisis combinado, el rendimiento de huitlacoche fue mayor en $166,666 \text{ plantas ha}^{-1}$ de maíz ($3,592.10 \text{ kg ha}^{-1}$) que en $62,500 \text{ plantas ha}^{-1}$ (960.2 kg ha^{-1}), aunque el rendimiento de hongo por planta inoculada fue igual en ambas densidades ($0.02 \text{ kg planta}^{-1}$) del híbrido 30G40.

Salazar *et al.* (2013), reportaron que el híbrido Oso fue el más susceptible con 3.08 de IS (Índice de severidad), 133.39 GMI (gramos por mazorca infectada) y 14.402 t ha^{-1} , el Cobra presentó el mayor PI (Porcentaje de incidencia) con 85.83%. De los materiales criollos el que presentó mayor susceptibilidad fue el B6 con un PI de 66.72%, un IS de 1.23 y 8.522 t ha^{-1} de huitlacoche. Los maíces criollos que presentaron mayor susceptibilidad a *U. maydis* fueron el B6 y B3 de la raza Ancho y el B5 de la raza Cacahuacintle fue el más resistente.

1.2.4 Evaluación de cepas de *Ustilago maydis* en semillas de maíz

Cota (2003), evaluó cepas locales de *U. maydis* para la producción masiva del huitlacoche, los experimentos se llevaron a cabo en los laboratorios de la Dirección de Recursos Naturales del ITSON de Cd. Obregon y en los terrenos del campo experimental ITSON ubicados en la manzana 204 del Valle del Yaqui. Se evaluaron seis cruzas (A₃-A₉, A₈-A₁₄, A₉-A₁₃, A₅-A₉, A₃-A₁₀) y dos cepas individuales (solopatógenicas) (A₈ y A₁₄) de *U. maydis*, estas cepas las seleccionaron de un trabajo previo. Este material fue asilado de muestras de diferentes puntos de Valle del Yaqui donde se presentaron infecciones naturales. La semilla de maíz utilizada fue A-7573. Se determinó el porcentaje de plantas con infección, el grado de cubrimiento de mazorcas con huitlacoche, el rendimiento de huitlacoche limpio y el índice de severidad de la infección. La cruza A₄-A₁₀ ya que presentó los resultados más altos en porcentaje de infección (56.47%), mazorca con cubrimiento de huitlacoche (51-100%), rendimiento de huitlacoche limpio (2,070 kg ha⁻¹) e índice de severidad de la infección (70.48).

1.3 MAÍZ

El maíz es el cultivo más importante para los mexicanos. Nuestra cultura floreció gracias al aporte que ha hecho este cultivo en los aspectos sociales, económico, cultural, y principalmente alimentario. En México se identifican dos formas contrastantes de producción de maíz: de riego y temporal. En la producción de maíz mediante riego, se pretende alcanzar los máximos rendimientos a través de insumos externo las que pueden ser semillas mejoradas, fertilizantes, químicos, maquinaria, etc. La producción de maíz de temporal se fundamenta en aspectos culturales-tradicionales y se caracteriza por la siembra de semilla criolla en la mayoría de los casos, y con poca o ninguna incorporación de energía externa al sistema (Aguirre y García, 2012).

1.3.1 Taxonomía

Reino	Plantae
Orden	Poales
Familia	Poaceae
Subfamilias	Panicoideae
Género	Zae
Especie	Z. mays

1.3.2 Ciclo de vida

La planta de maíz es uno de los pocos en el reino de las plantas en el que el macho y la hembra se encuentran en diferentes partes de la planta. La borla masculina aparece en la parte superior de la planta, y produce un 2-5 millón polen asombrosa granos-hasta 20 millones en una gran borla. Estos granos de polen a la deriva hacia el aire hasta que hagan contacto con un estilo, o de la seda de la parte femenina de otra planta de maíz. En la misma planta, unos días más tarde, aparece la inflorescencia femenina, en algún lugar en medio de la madre. Esta parte femenina se compone de hasta 1,000 óvulos, que pueden ser fecundados por el polen cuando se pone en contacto de la pizca de la seda. Normalmente sólo una o dos mazorcas se desarrollan por planta, aunque algunas variedades muy prolíficas, normalmente híbridas, pueden producir varias mazorcas (Winch, 2006).

1.3.3 Condiciones ambientales

El maíz se adapta a una amplia gama de ambientes agroecológicos, pero es esencialmente un cultivo de clima cálido, se cultiva en las regiones tropicales y subtropicales. El maíz requiere una temperatura media diaria de al menos 20°C para el crecimiento y desarrollo adecuado, y las temperaturas diurnas cálidas de 25-30°C y noches frescas para crecimiento y desarrollo óptimo. Las temperaturas superiores a 35°C reducen los rendimientos; temperaturas por debajo de 8°C y superiores a 40°C son extremadamente perjudiciales, provocando el cese del crecimiento. El estrés de alta temperatura impone impacto adverso en el crecimiento (Lim, 2013).

1.3.4 Importancia económica

El maíz es uno de los tres principales cereales en el mundo, junto con el arroz y el trigo. Alrededor de la mitad de la cosecha mundial se produce en América del Norte; China es el segundo mayor productor, después de Brasil, México y Argentina (Winch, 2006). En E.U.A una cosecha de maíz puede producir aproximadamente \$7,400 pesos/ha, mientras que el maíz dulce aproximadamente \$44,436 pesos/ha. El aumento del costo para el maíz dulce incluye los costos de los insecticidas, los fungicidas y los asociados con la cosecha y post cosecha (Tracy *et al.*, 2007).

1.3.5 Producción nacional y local

En los últimos 50 años las actividades humanas han modificado los ecosistemas con mayor rapidez y amplitud que en cualquier otro periodo equivalente en la historia; esto se debe en gran medida a su necesidad de satisfacer la demanda de alimentos, agua dulce, madera, fibras y combustibles (INEGI, 2008).

En la región Norte-Centro de México (Aguascalientes, Durango y Zacatecas), las siembras de maíz de temporal constituyen una actividad importante en la agricultura social, donde el maíz es destinado para autoconsumo. En los ciclos agrícolas 2005 y 2006 se sembraron más de medio millón de hectáreas (555,822), de las cuales por efectos de sequía fueron siniestrados el 33% (210,727), con una producción de 325,474 t ha⁻¹ y un rendimiento promedio de 822 kg ha⁻¹. Estos bajos rendimientos fueron debidos principalmente a la errática precipitación a suelos delgados infértiles y a la utilización de variedades nativas de ciclo precoz (INIFAP-CONABIO, 2010).

En el estado de Aguascalientes los usos del suelo son variados, entre los que sobresalen la agricultura y la ganadería. El 43% de la superficie del Estado (243 402 ha) se dedica a la agricultura; de este porcentaje, 21% corresponde a la agricultura de temporal y 22%, a la agricultura de riego (figura 3). La agricultura de riego se desarrolla principalmente en el "corredor" que abarca

de la ciudad de Aguascalientes hacia el norte, hasta llegar a los límites con el estado de Zacatecas, mientras que la agricultura de temporal se practica en terrenos de menor aptitud y que carecen de infraestructura para riego, principalmente en los municipios de El Llano, Asientos y Tepezalá. En las zonas de temporal las prácticas agrícolas están enfocadas, por lo general, al autoconsumo de granos básicos (maíz, frijol y algunas hortalizas), así como a la venta local (elote, frijol, entre otros) (INEGI, 2008).

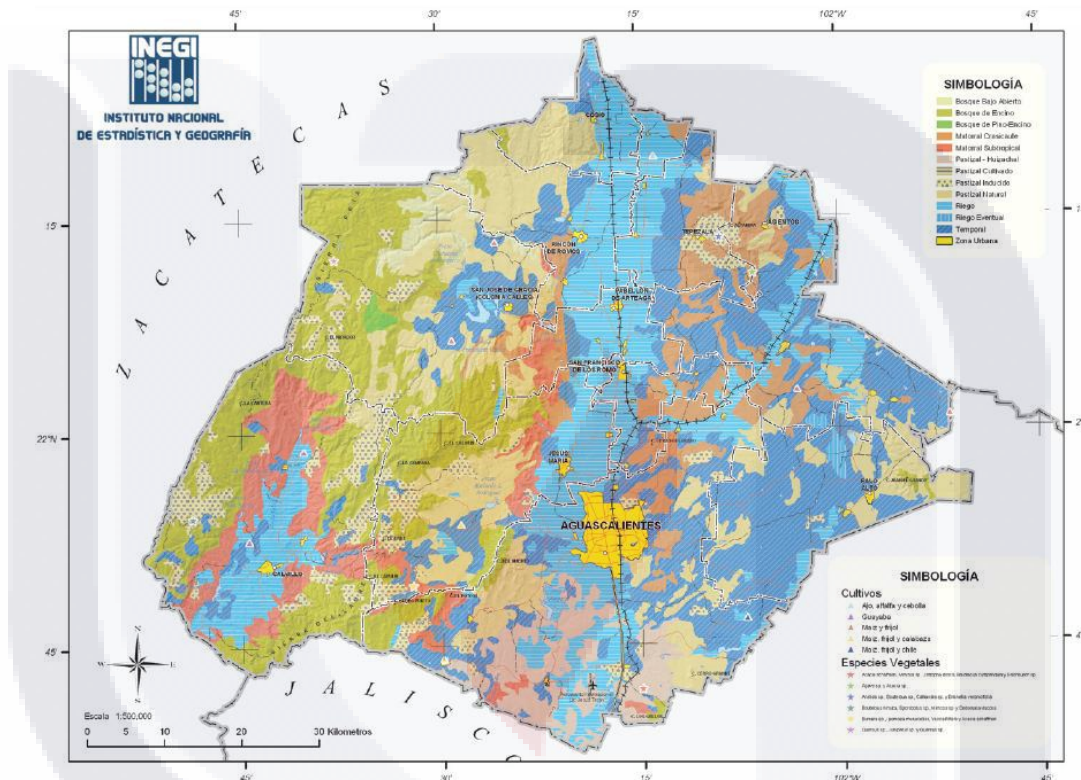


Figura 3. Uso del suelo en Aguascalientes (INEGI, 2008).

El cultivo de maíz es base de las explotaciones lecheras en el Estado de Aguascalientes, durante el ciclo 2007 se tienen sembradas 72 mil hectáreas, de las cuales 55% están destinadas a la producción de grano y el 45% para forraje, sobresale el municipio de El Llano, tanto para la producción de grano como de forraje, además el municipio de Aguascalientes para la producción de forraje (INIFAP-CONABIO, 2010).

1.3.6 Genotipo de maíz

El hombre ha seleccionado durante miles de años (maíz y otros cultivos), los más adecuados para crecer en el área en particular donde se cultivaban. Sin embargo, las variedades de producción local tienen un recurso genético limitado y al introducir variedades, con años de esfuerzo de fitomejoramiento internacional, pueden muchas veces crecer aún mejor (Winch, 2006).

Las variedades nativas de maíz criollo predominantes son las que proceden de las razas Cónico Norteño y Bolita que tienen como característica su precocidad y tolerancia a sequía, algunas variedades son maíz Bonito, Temporalero, Olote Colorado, Catarineño, Cacareño, Mexicano de Junio y en la región semidesértica con auxilio de riego se producía maíz Tayahui, Argentino. La disponibilidad de variedades criollas en la región semiárida de la región norte centro de México, se ha reducido en algunos casos y en situaciones extremas se ha perdido el germoplasma, debido a la alta siniestralidad por la sequía que prevaleció durante la última década, así como a la política agropecuaria de reconversión de cultivos para sustituir al maíz por sorgo o pastos. En el estado de Aguascalientes las variedades criollas que se utilizan para la producción de grano y forraje de temporal tienen germoplasma de la raza Cónico Norteño y Pepitilla (INIFAP-CONABIO, 2010).

1.3.7 Nutrición

La composición química del grano de maíz se ve afectada por el genotipo, medioambiente y condiciones de siembra. En promedio, el contenido de proteína es de 10 % y más de 60 % son prolaminas y se conocen como zeínas. Presentan muy bajo contenido de aminoácidos esenciales, como lisina, triptofano e isoleucina, lo que provoca que el valor biológico de la proteína sea bajo y de pobre calidad nutricional. Esto motivó a los fitomejoradores a obtener nuevos materiales con mejor mensaje nutricional (Paredes y Valverde, 2006).

En términos de nutrición, el grano de maíz es principalmente útil como una fuente de hidratos de carbono y energía 100 g de maíz en grano entero, contiene en promedio 362 calorías, 71 g de carbohidratos y 4,5% de grasa (Winch, 2006).



1.5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El huitlacoche es considerado una delicadeza culinaria en algunas regiones de México, Estados Unidos y Europa; y el consumo actual se está incrementando notablemente. La disponibilidad de este hongo no está asegurada a lo largo del año, ya que la producción ocurre mediante fenómenos naturales que tienen lugar al azar; lo que se asocia a una calidad variable y fuera de control. La evaluación de genotipos de maíz para fines de producción de huitlacoche, permite conocer el nivel de susceptibilidad genética y con esto elegir la semilla más apta para la producción intensiva del hongo.

Actualmente se han realizado investigaciones como ensayos experimentales enfocadas en la producción masiva del huitlacoche en diferentes partes de la República Mexicana; como Sonora, Estado de México y Guanajuato, sin embargo no existen trabajos en el país sobre la estimación de la producción natural, así como un estudio previo sobre la susceptibilidad de la semilla para la infección del hongo de forma natural.

En Aguascalientes no existen trabajos referentes con la producción de huitlacoche, susceptibilidad de las semillas utilizadas y pruebas de patogenicidad de cepas de *U. maydis* presentes en el Estado. Es de suma importancia la evaluación de semillas criollas que existen en los diferentes municipio, así como la evaluación de cepas en pruebas de patogenicidad y corroboración molecular para determinar la presencia de ARN viral y conocer la existencia de cepas asesinas, para poder explicar de manera global la incidencia de la enfermedad de manera natural y elegir cepas efectivas para la producción masiva del hongo dentro del Estado.

1.6 HIPÓTESIS

Las combinaciones de cepas de *Ustilago maydis* y genotipos de maíz influyen en los componentes del rendimiento de huitlacoche.

1.7 OBJETIVOS

General

- Evaluar la susceptibilidad de los maíces híbridos y criollos con cepas del hongo *Ustilago maydis* para la producción de huitlacoche en el Estado de Aguascalientes.

Particulares

- Conocer la producción natural del huitlacoche en el estado de Aguascalientes.
- Evaluar la capacidad de infectar plantas de maíz en condiciones controladas con el método de inoculación artificial.
- Caracterización morfológica y corroboración molecular de cepas aisladas de *Ustilago maydis*.

1.8 BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. (2006). Fitopatología. 2ª ed. Ed. LIMUSA. México, D.F.
- Aguirre, G. J. A. y García, L. M. L. (2012). Manual de capacitación: Selección para el mejoramiento de maíz criollo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Centro de Investigación Regional Centro. Campo experimental Bajío. Celaya, Gto., México. Folleto para Productores Núm. 4.
- Basse, C. W. y Steinberg, G. (2004). *Ustilago maydis*, model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity. *Molecular Plant Pathology* 5(2): 83-92.
- Beas, F. R.; Loarca, P. G.; Guzmán, M. S.H.; Rodríguez, G. M.; Vasco, M. N.L. y Guevara, L. F. (2011). Potencial nutracéutico de componentes bioactivos presentes en huitlacoche de la zona de centro de México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C. México. Abril-Junio 42(2): 36-44.
- Bolker, M. (2001). *Ustilago maydis* a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* 147: 1395-1401.
- Castro-Espinoza, L. y Ruiz-Hernández, I. (2003). Huitlacoche: Una delicadeza alimenticia que se puede producir en el Valle del Yaqui. *Perspectiva Universitaria*. 2:27-28.
- 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, St. Paul. 41 p.
- Cota, N. C. B. (2003). Tesis: Evaluación de cepas locales de *Ustilago maydis* en maíz para la producción de huitlacoche en el Valle del Yaqui. Otoño 2003. Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias. Instituto tecnológico de Sonora.
- Day, P. R. y Anagnostakis, S. L. (1973). "The killer system in *Ustilago maydis*: Heterokaryon transfer and loss of determinants," *Phytopathology* 63, 1017-1018.

- Desentis-Mendoza, R. M.; Hernández-Sánchez, H.; Moreno, A.; Rojas, D. C. E.; Chel-Guerrero, L.; Tamariz, J. y Jaramillo-Flores, M. E. (2006). Enzymatic polymerization of phenolic compounds using laccase and tyrosinase from *Ustilago maydis*. *Biomacromolecules*. 7, 6:1845-1854.
- Du toit, L. y Pataky, J. K. (1999). Variation associated with silk cannel inoculation of common smut of sweet corn. *Plant disease*. 83:727-732.
- González-Alamillo L. G. (2010). Productos mexicanos, Regalos de México para el mundo. *Revista Virtual Gastronómica*, UAEM.
- Gunasekaran, M.; Bushnell, J. L. y Weber, D. J. (1972). Comparative studies on lipid components of *Ustilago bullota* and *Ustilago maydis* spores. *Res. Commun. Chem. Pathol Pharmacol*. 3:621-628.
- Holliday, R. (1974). *Ustilago maydis*. En: *Handbook of Genetics*, Vol. 1, pp 575-595. Ed. King, R. C. Plenum Press, N.Y.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). (2008). En: *La Biodiversidad en Aguascalientes: Estudio de Estado*. 2008. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Instituto del Medio Ambiente del Estado de Aguascalientes (IMAE), Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA). México. 389 p.
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)-Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2010). *Conocimiento de la diversidad y distribución actual del maíz nativo y sus parientes silvestres en México. Segunda Etapa 2008-2009. Región Norte Centro, Estado de Aguascalientes*. pp. 33.
- Jiménez de León, J. R. (2007). Huitlacoche. Consultada en: *La Specula.com International Weekly Magazine*. <http://www.laspecula.com>
- Kahmann, R. (2002). Fungus drains resistance. *Max Plant Research*; 4:32-39.
- Kealey, K. S. y Kosikowski (1981). Potencial del huitlacoche como posible fuente alimenticia. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 15(14):341-351.
- Koltin, Y. y Day P. R. (1976). Inheritance of killer phenotypes and double-stranded RNA in *Ustilago maydis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73 (2): 594-598.

- Lim, T. K. (2013). Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. Volumen 5, Fruits. Springer. New York. 416-447pp.
- Lizárraga-Guerra R. y López, M. G. (1997). Content of free amino acids in huitlacoche *Ustilago maydis*. J. Agric Food Chem. 44: 2556-2559
- Lizárraga-Guerra, R. y López M. G. (1998). Monosaccharide and alditol contents of huitlacoche (*Ustilago maydis*). J Food Compos Anal. 11:333-339.
- Madrigal, R. J.; Villanueva, V. C.; Sahagún, C. J.; Acosta, R. M.; Martínez, M. L. y Espinosa, S. T. (2010). Ensayos de producción de huitlacoche (*Ustilago maydis* Cda.) hidropónico en invernadero. Revista Chapingo Serie Horticultura 16(3): 177-182.
- Martínez, M. L.; Villanueva, V. C. y Sahagún, C. J. (2000). Susceptibilidad y resistencia del maíz al hongo comestible huitlacoche (*Ustilago maydis* Cda.) mejorando su virulencia. Revista Chapingo Serie Horticultura 6(2): 241-255.
- Martínez-Espinoza, A. D.; León C.; Elizarraraz G., y Ruiz-Herrera J. (1997). Monomorphic nonpathogenic mutants of *Ustilago maydis*. Phytopathology 87(3)259-265.
- Martínez-Martínez, L.; Muñoz-Orozco, A.; Mejía-Contreras, J.; Molina-Galán, J.; Zavaleta-Mejía, E.; Sandoval-Islas J. S. y Villanueva-Verduzco C. (2005). Efectos genéticos e interacciones entre familias de maíz y aislados de huitlacoche (*Ustilago maydis* D. C. Corda). Chapingo. Serie Horticultura. 11(1): 121-128.
- Méndez-Morán, L. y Ruiz-Herrera, J. (2008). Estudio de genes diferenciales durante el proceso patogénico de *Ustilago maydis* en *Arabidopsis thaliana* un huésped no natural. Avances en la Investigación Científica en el CUCBA. En: XIX Semana Nacional de la Investigación Científica. Zapopan, Jalisco. México. Pp: 407-414.
- Pan, J. J.; Baumgarten, A. M. y May, G. (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. y Valverde González M. E. (1999). Los alimentos mágicos de las culturas indígenas de México – El caso del huitlacoche. México: El colegio de Sinaloa.
- Paredes López, O. y Valverde González, M. E. (2006). Los recursos nutraceuticos y medicinales que Mesoamérica le ha dado al mundo. CINEVESTAV. 25(3):65-73pp.
- Pataky, J. K. (1991). Production of huitlacoche [*Ustilago maydis* (D. C.) Corda] on sweet corn. HortScience 26:1374-1377.
- Perkins, D. D. (1949). Biochemical mutants in the smut fungus, *Ustilago maydis*. Genetics 34, 607–626.
- Pimentel-González, D. J.; Rodríguez-Huezo, M. E.; Campos-Montiel, R. G.; Trapala-Islas A. y Hernández-Fuentes A. D. (2011). Influencia de la variedad de maíz en las características fisicoquímicas del huitlacoche (*Ustilago maydis*). Revista Mexicana de Ingeniería Química. Vol. 10, 2:171-178.
- Puhalla, E. J. (1968). Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*. Genetics 60: 461-474.
- Reyes, P. (1990). El maíz y su cultivo. AGT editor, S.A. México.
- Rowell, J. B. (1955a). Functional role of compatibility factors and in vitro test for sexual compatibility with haploid lines of *Ustilago zeae*. Phytopathology 45: 370-374.
- Rowell, J. B. (1955b). Segregation of sex factors in a diploid line of *Ustilago zeae* induced by radiation. Science 1231: 304-306.
- Ruiz, H. J. (2008). *Ustilago maydis*: ascenso de un hongo mexicano de la gastronomía local al mundo científico. Nova Scientia 1(1): 118-135.
- Ruiz, I. (1999). Producción de Huitlacoche por inoculación artificial de cepas locales de *Ustilago maydis* (D.C.) Corda, en híbridos regionales de maíz (*Zea mays* L.) en el Valle del Yaqui. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Sonora. Cd. Obregón, Sonora, México.
- Ruiz, I. y Castro L. (2001). Efecto del sitio de inoculación artificial de *Ustilago maydis* (D.C.) Corda en la producción de huitlacoche en híbridos de

- maíz (*Zea mays* L.) en el Valle del Yaqui. ITSON-DIEP. Vol III. Num. 9. Enero-junio 2001. Cd. Obregón, Sonora, México.
- Salazar, T. J. C., Martínez, T. E., Álvarez, H. R. y Méndez, L. A. (2013). Susceptibilidad de maíces híbridos y criollos al huitlacoche (*Ustilago maydis* (D.C.) CDA.), y rentabilidad de la producción, en Chapingo, México. Ciencias Agronómicas y ambientales. 1er. Congreso Internacional de Ciencias Aplicadas. Universidad Autónoma de Chapingo. pp. 84-93.
- Serafin M. A. H.; Kubachka K.; Wrobel K.; Gutierrez C. F.; Yathavakilla S. K. V.; Caruso J. A. y Wrobel K. (2005). Metallomics approach to trace element analysis in *Ustilago maydis* using celular fractionation, atomic absorption spectrometry and size exclusion chromatography with ICP-MS detection. J. Agric Food Chem. 53: 5138-5143.
- Tracy, W.F.; Vargas, C.; Zepeda, L.; Pataky, J.K. y Chandler, M. A. (2007). Production and Marketing of huitlacoche. En: Sigues in new crops and new uses. (pp: 233-236), Janick J. y Whipkey (Eds.) ASHS Press. Alexandria, VA.
- Trueheart, J. y Herskowitz, I. (1992). The *a* locus governs cytoduction in *Ustilago maydis*. J. Bacteriol. 174: 7831-7833.
- Ulloa, R. (2002). Efecto del periodo de fecundación del maíz (*Zae mays* L) en la infección artificial de *Ustilago maydis* para la producción de Huitlacoche en el Valle del Yaqui. Artículo publicado en el III Encuentro Internacional de Biotecnología UPIBI 2002. Querétaro, México.
- Valdez, M. M.; Valverde M. E. y Paredes L. O. (2009). Procedimiento tecnológico para la producción masiva de huitlacoche. CINVESTAV-Irapuato. Sinnco. pp. 10-37.
- Valverde, M. E.; Fallah M. P.; Zavala G. M.; Pataky J. K.; Paredes L. O. y Pedersen W. L. (1993). Yield and quality of huitlacoche on sweet corn inoculated with *Ustilago maydis*. HortScience 28(8): 782-785.
- Valverde, M. E.; Paredes, O.; Pataky, J. K. y Guevara, F. (1995). Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a food source-Biology, composition, and production. Critical Reviewa in Food Science and Nutrition; 35(3):191-229.

- Venegas, P. E.; Valverde, M. E.; Paredes-López, O. y Pataký, J. K. (1995). Production of the edible fungus huitlacoche (*Ustilago maydis*): Effect of maize genotype on chemical composition. Journal of fermentation and bioengineering. 80(1): 104-106.
- Villanueva, V. C. (1997). Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a food in México. Micol Neotrop. Apl. 10: 73-81.
- Winch, T. (2006). Growing Food a guide to food production. Springer. Hereford, UK. 342pp.
- Wood, H. A. y Bozarth R. F. (1973). Heterokaryon transfer of virus-like-particles associated with a cytoplasmically inherited determinant in *Ustilago maydis*. Phytopathology 63: 1019- 1021.
- Yee, A. R. y Kronstad, J. W. (1998). Dual sets of chimeric alleles identify specificity sequences for the bE and bW mating and pathogenicity genes of *Ustilago maydis*. Mol. Cell. Biol. 18: 221-232.

CAPITULO II

RENDIMIENTO DE LA PRODUCCIÓN NATURAL DE HUITLACOCHÉ EN EL ESTADO DE AGUASCALIENTES

2.1 RESUMEN

El huitlacoche posee características nutrimentales como altos niveles de fibra dietaria, proteínas, aminoácidos, oligosacáridos, ácidos grasos esenciales, vitaminas, minerales y compuestos fenólicos, lo que hace que pueda aportar un beneficio importante a la nutrición. El objetivo de esta investigación fue evaluar la producción natural del huitlacoche en el Estado de Aguascalientes, México. Se evaluó el rendimiento en siete municipios donde los muestreos se realizaron completamente al azar por conveniencia con una superficie de 500 m² por hectárea para cada tratamiento. Los datos se obtuvieron cuando el elote estaba a punto de ser cosechado y el hongo alcanzó el desarrollo de las agallas para los muestreos denominados tratamientos. Las variables evaluadas fueron: índice de severidad (IS), porcentaje de incidencia (PI), gramos de huitlacoche por mazorca infectada (GMI) y rendimiento por hectárea (RH). Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza, prueba de Tukey ($p = 0.05$) y correlación lineal de Pearson. El tratamiento 3 (semilla criolla amarilla de temporal) en la localidad del Ejido de Peñuelas en el Municipio de Aguascalientes, fue significativamente diferente a todos los demás tratamientos, ya que obtuvo el mayor rendimiento con 90.554 kg ha⁻¹ y presentó el mayor índice de severidad por mazorcas infectadas de 18.67 %. Las semillas criollas presentaron mayor producción de huitlacoche.

2.2 INTRODUCCIÓN

Huiflacoche es el nombre que se le da a las agallas o tumores que se forman en plantas de maíz (*Zea mays* ssp. *mays*) y teozintle (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) por la acción del hongo *Ustilago maydis*. La producción de este hongo no es planificada para el cultivo, se produce por infecciones naturales y al azar, ya que es considerado un patógeno y puede llegar a ser una enfermedad devastadora para el cultivo de maíz dulce. La infección natural algunas veces no es muy confiable, ya que la aparición del hongo en el maíz depende de las condiciones ambientales que conducen a la infección por el carbón y a la asociación entre la etapa en el desarrollo del hospedante durante el período de infección y el tejido de la planta en el cual se forman las agallas (Pataky, 1991).

El huiflacoche aparece en casi todas las regiones productoras de maíz; las condiciones climáticas favorables para su desarrollo son muy variadas: la producción natural de este hongo puede aumentar en ambientes húmedos (humedad relativa de 72 a 80 %) y templados (17 a 20 °C) (Villanueva *et al.*, 1999; Martínez-Martínez *et al.*, 2005), y es más frecuente en áreas cálidas (26 a 34 °C) y moderadamente secas (Agrios, 2006).

El huiflacoche es un alimento con características nutrimentales esenciales para el ser humano. Se ha encontrado que los altos niveles de fibra dietaria y oligosacáridos sugieren que el huiflacoche puede aportar un beneficio importante a la salud, ya que dichos componentes han demostrado estar directamente involucrados en disminuir el riesgo de contraer cáncer de colon. Asimismo, las concentraciones elevadas de compuestos fenólicos de este hongo proporcionan una alta actividad antioxidante; dichos componentes bioactivos están relacionados con la disminución de la incidencia de enfermedades crónicas degenerativas (Pataky, 1991; Beas *et al.*, 2011; Méndez-Morán y Ruiz-Herrera, 2008).

La evaluación de genotipos de maíz para fines de producción de huitlacoche permite conocer su nivel de susceptibilidad genética (Pan *et al.*, 2008). El Estado de Aguascalientes, México, es un buen productor de maíz y elote durante la temporada primavera-verano-otoño (marzo-noviembre). Sin embargo, no existen datos sobre los materiales genéticos de maíz susceptibles ni sobre la incidencia a la infección por *U. maydis* en la región. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue conocer la producción natural del huitlacoche en el Estado de Aguascalientes en diferentes variedades de maíz, localidades, tipo de riego y épocas de siembra.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Área de estudio

El área de estudio se ubica en el Estado de Aguascalientes, localizado en la parte central de la República Mexicana ($101^{\circ} 53'$ y $102^{\circ} 52'$ O y $22^{\circ} 27'$ y $21^{\circ} 28'$ N), con una superficie de 5,680.33 km² (568,033 ha) que representa el 0.3% del total del país. La división política consta de once municipios: Aguascalientes, Asientos, Calvillo, Cosío, Jesús María, Pabellón de Arteaga, Rincón de Romos, San José de Gracia, Tepezalá, San Francisco de los Romo y El Llano (INEGI, 2008).

2.3.2 Toma de datos

El muestreo se realizó en siete municipios del Estado de Aguascalientes: Aguascalientes, Asientos, Jesús María, Rincón de Romos, San José de Gracia, Tepezalá y El Llano, se obtuvieron 13 tratamientos cada uno conformado por un municipio, localidad, periodo de siembra, tipo de cultivo, utilidad de la semilla y tipo de semilla (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tratamientos evaluados para la producción natural de huilfacoche en municipios del Estado de Aguascalientes.

Tto.	Municipio	Localidad	PS	TC	Utilidad	Semilla
1	Aguascalientes	La Providencia	mayo -	Riego	Silo	Aspros
2			agosto			Unisem (Ares)
3		Ejido Peñuelas	junio - septiembre	Temporal	Forraje seco	Criolla
4	Jesús María	Posta UAA	mayo -	Riego	Forraje seco	Cimarrón
5			agosto			2366
6	Asientos	Francisco Villa	mayo - agosto	Riego	Grano	Cimarrón
7	Rincón de Romos	El Bajío	mayo - agosto	Riego	Grano	H9105W
8		Ejido del Bajío	junio - septiembre	Temporal	Forraje verde	Criolla de Villanueva, Zacatecas
9		Ejido del Bajío	junio - septiembre	Riego	Forraje seco	H9105W
10	San José de Gracia	Paredes	mayo - agosto	Temporal	Grano	Criolla, Pozolero blanco
11	Tepezalá	San Antonio de	junio -	Riego	Grano	NB11
12		Tepezalá	septiembre	Temporal	Grano	Criolla
13	El Llano	De la Luz	junio - septiembre	Temporal	Forraje seco	Criolla

Tto. = Tratamiento, PS = Periodo de siembra, TC = Tipo de cultivo.

La toma de muestras se realizó en formato en cinco de oros, con un total de 500 m² para cada tratamiento. Las muestras del hongo se cortaron y se colocaron en hieleras para trasladarlas al Laboratorio de Parasitología Agrícola del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes; la temperatura a las que se mantuvieron durante el traslado y manipulación fue de 25 °C ± 2 °C.

Se tomaron en cuenta las variables medioambientales de temperatura, precipitación y humedad relativa a partir de la siembra hasta la cosecha para

cada una de las localidades con la estación meteorológica del INIFAP más cercana al sitio de muestreo. Las muestras se fotografiaron, midieron y pesaron para cada repetición por tratamiento.

2.3.3 Variables a evaluar

Índice de severidad (IS). Correspondió a la proporción de los elotes cubiertos por agallas formadas por el hongo, con la siguiente escala de severidad (Cuadro 2) (Madrigal *et al.*, 2010, modificado por Aguayo se eliminó de la escala la severidad 0 y se homogenizaron las escalas).

Cuadro. 2. Escala para evaluar el índice de severidad del huiflacoche en maíz.

Grado de severidad	
Escala	Proporción de mazorca infectada
Severidad 1 (S1)	1-20%
Severidad 2 (S2)	>20-40%
Severidad 3 (S3)	>40-60%
Severidad 4 (S4)	>60-80%
Severidad 5 (S5)	>80-100%

Porcentaje de incidencia (PI): Se determinó como el número de elotes infectados con algún grado de severidad dividido entre el número de elotes evaluados multiplicado por 100 (Madrigal *et al.*, 2010).

Gramos por mazorca infectada (GMI): Se evaluó el peso total en gramos del huiflacoche desgranado de todos los elotes infectados y se dividió entre el número de elotes infectados por el hongo (Madrigal *et al.*, 2010).

Rendimiento por hectárea (RH): Se obtuvo al multiplicar la densidad de población de maíz por los GMI, el PI y el número de elotes por planta (Madrigal *et al.*, 2010).

2.3.4 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron en un diseño completamente al azar. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) con el programa estadístico SAS versión 9.1 para determinar si existían diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre

las variables IS, PI, GMI y rendimiento por hectárea de los 13 tratamientos. Cuando se detectaron diferencias estadísticas, se procedió a la comparación de medias con una prueba de Tukey ($p = 0.05$).

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIONES

El IS fluctuó de 0.17 a 18.67 %, el PI varió de 0.05 a 6.7 %, el GMI fue de 3.38 a 49.81 g y el rendimiento fluctuó de 0.728 a 90.554 kg ha⁻¹ en los 13 tratamientos evaluados (Cuadro 3). Las pruebas de significancia indicaron que al menos uno de los tratamientos fue diferente significativamente para cada una de las variables evaluadas ($p \leq 0.05$). La comparación de medias de Tukey reflejó que el tratamiento 3 que correspondió al municipio de Aguascalientes, Ejido Peñuelas, con un periodo de siembra de junio-septiembre, en cultivo de temporal y con semilla criolla, fue diferente significativamente en el IS con 18.67 %, en el PI con 6.47 % y RH de 90.554 kg ha⁻¹ con respecto a los demás tratamientos ($p = 0.05$).

Para el IS se obtuvo que los tratamientos 3 y 13 fueron diferentes significativamente con respecto a los de más tratamientos con un IS de 18.67 y 8.10 %, respectivamente, para el PI, el tratamiento 3 y el 13 también obtuvieron los porcentajes más altos con 6.47 y 2.0 % respectivamente en relación a los demás tratamientos, en los GMI los tratamientos 8 y 10 se diferenciaron del resto de los tratamientos al obtener 36.67 y 49.81 g, respectivamente; y para el RH resaltaron los tratamientos 3 y 10 con una producción natural de 90.554 y 46.500 kg ha⁻¹, respectivamente, siendo diferentes significativamente al resto de los tratamientos.

Los tratamientos 3 (Aguascalientes, Ejido Peñuelas), 8 (Rincón de Romos, Ejido el Bajío) y 13 (El Llano, Localidad De la Luz) sembrados en junio-septiembre y las semillas que se utilizaron fueron de origen criolla y el tratamiento 10 (San José de Gracia, Localidad Paredes) sembrado en mayo-agosto y con semilla criolla, en cultivo de temporal para los cuatro tratamientos. Dichos

tratamientos fueron los mejores y diferentes significativamente a los demás tratamientos en cada uno de los caracteres evaluados (Cuadro 3).

Cuadro 3. Componentes del rendimiento de huillacoche producido de manera natural en el Estado de Aguascalientes.

Tratamientos	IS (%)	PI (%)	GMI (g)	RH (kg ha ⁻¹)
1	0.17 c	0.17 c	4.03 c	1.299 c
2	0.17 c	0.10 c	3.38 c	1.027 c
3	18.67 a	6.47 a	8.68 c	90.554 a
4	0.14 c	0.14 c	3.69 c	0.728 c
5	0.89 c	0.41 bc	9.54 c	7.109 bc
6	1.79 c	0.76 bc	15.05 bc	14.027 bc
7	1.07 c	0.48 bc	17.10 bc	10.283 bc
8	0.74 c	0.26 c	36.67 ab	22.119 bc
9	1.24 c	0.48 bc	19.34 bc	11.311 bc
10	3.68 bc	0.74 bc	49.81 a	46.500 b
11	1.44 c	0.69 bc	8.99 c	12.886 bc
12	0.21 c	0.05 c	4.87 c	1.469 c
13	8.10 b	2.00 b	5.21 c	16.863 bc

IS: índice de severidad; PI: porcentaje de incidencia; GMI: gramos de huillacoche por mazorca infectada; RH: rendimiento por hectárea. Medias con la(s) misma(s) letra(s) en la misma columna son estadísticamente iguales, según la prueba de Tukey (p = 0.05).

La aparición del huillacoche en el maíz depende de varios factores como las condiciones ambientales, etapa del desarrollo de la planta del maíz, la susceptibilidad genética de la semilla y patogenicidad del hongo (Pataky, 1991; Pataky *et al.*, 1995; Pan *et al.*, 2008). Lo que se reflejó en la variabilidad de los resultados para el rendimiento por hectárea a causa de las condiciones ambientales, tipo de semilla y tipo de cultivo que se utilizaron en cada una de los tratamientos, además de las prácticas agronómicas y los tipos de patogenicidad del hongo prevalentes en las regiones evaluadas pudieron afectar significativamente los componentes del rendimiento, ya que existe una amplia diversidad genética en *Ustilago maydis*, como lo ha reportado Jiménez (2010) y Calderón (2010).

Los tratamientos bajo condición de riego (Figura 4) no reflejaron mayores rendimientos de huitlacoche en las condiciones de precipitación, a pesar de que este alimento está formado principalmente por agua (~90%; Beas *et al.*, 2011), sin embargo, en la condición de temperatura hay una relación estrecha con el rendimiento por hectárea (Cuadro 4). En los tratamientos 3 y 10 obtuvieron la mejor producción natural del hongo, las condiciones ambientales que se presentaron en los dos tratamientos son completamente diferentes (Figura 5), estas no están relacionadas con el rendimiento que se obtuvo del hongo (Cuadro 4).

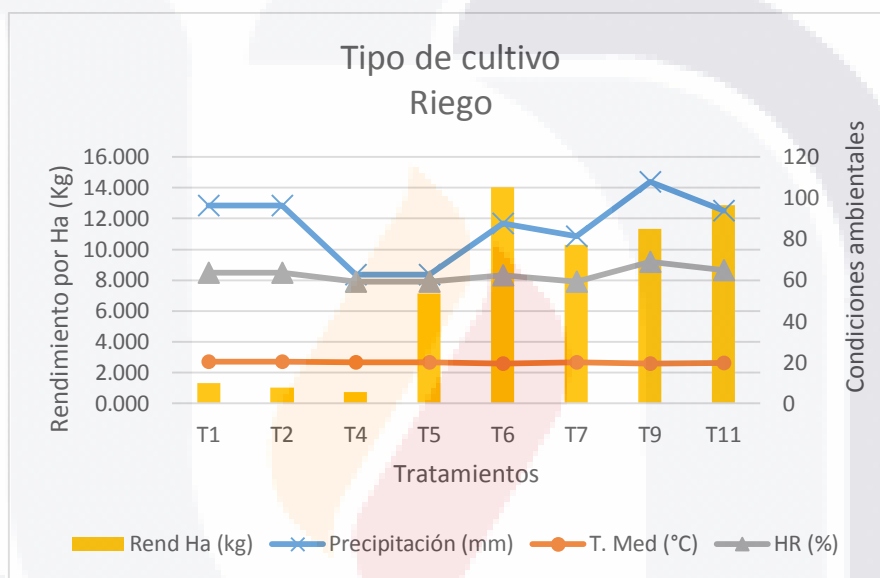


Figura 4. Comparación de las condiciones ambientales en los tratamientos con riego.

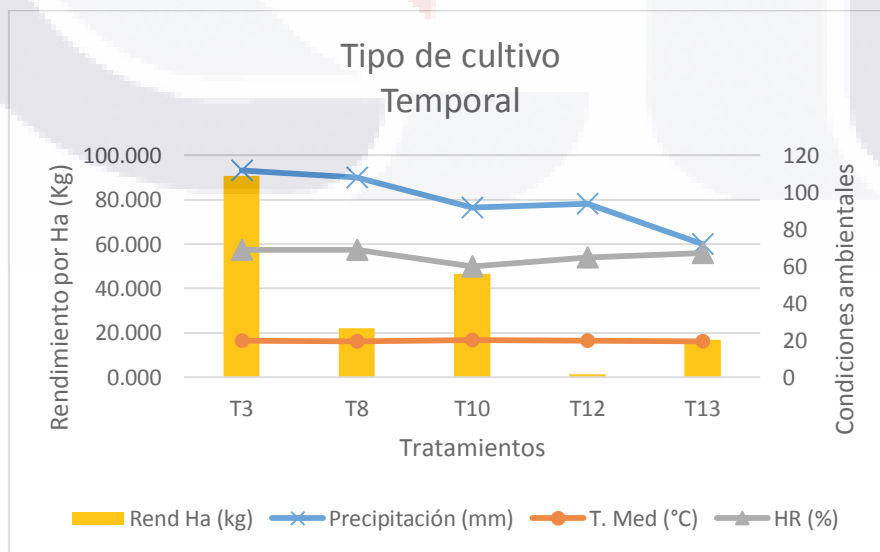


Figura 5. Comparación de las condiciones ambientales en los tratamientos de temporal.

Cuadro 4. Correlación entre condiciones ambientales y rendimiento por hectárea para los tratamientos con riego y temporal.

	Precipitación (mm)	Temperatura (°C)	Humedad relativa (HR)
RH (riego)	0.2477*	-0.8658**	0.2775*
RH (temporal)	0.5434*	0.5622*	0.1405*

RH: Rendimiento por hectárea. **Correlación significativa al nivel de 0.01. *Correlación no significativa al nivel de 0.05

Algunos autores (Valdez *et al.*, 2009; Salazar *et al.*, 2013) mencionan que con el método de inoculación artificial y bajo condiciones controladas en la producción, llegaron a obtener rendimientos de hasta 15 t ha⁻¹ con maíces criollos. La producción natural para las semillas criollas de temporal el mejor rendimiento fue de 90.554 kg ha⁻¹, lo cual la propia naturaleza del maíz criollo de temporal tiende a tener un grado de susceptibilidad por mantenerse en condiciones de estrés a comparación del cultivo de riego; la falta de agua, nutrientes, prácticas agronómicas y condiciones ambientales presentes hacen que el cultivo de temporal tenga un mayor estrés y con esto sea más susceptible al ataque de agentes patológicos.

La producción bajo el método de inoculación artificial para maíces híbridos es de 7 a 8 t ha⁻¹ (Martínez *et al.*, 2000; Madrigal *et al.*, 2010). En el presente trabajo se obtuvo que, para los maíces híbridos bajo riego, el tratamiento 6 resultó con el mejor rendimiento con cerca de 14.027 kg ha⁻¹, a comparación del tratamiento 4 en donde se utilizó la misma semilla con 0.728 kg ha⁻¹ pero en diferente localidad. La temperatura promedio pudo haber determinado el mejor rendimiento en el tratamiento 6, ya que hay una relación estrecha entre estas dos variables (Cuadro 4). En conjunto con las prácticas agronómicas hacen que el cultivo de riego sea un cultivo mejor cuidado ya que cualquier enfermedad representa pérdidas para el productor.

2.5 CONCLUSIONES

El tratamiento 3 a base de semilla criolla amarilla de temporal sembrada en junio-septiembre, en la localidad del Ejido de Peñuelas, Aguascalientes, mostró la severidad y porcentaje de incidencia del carbón del maíz (huitlacoche) más alta con 18.67 y 6.47 % respectivamente, y por tanto obtuvo el mayor rendimiento de huitlacoche con 90.554 kg ha⁻¹.

El tratamiento 10 de la localidad de Paredes, San José de Gracia; con semilla criolla pozolera blanca de temporal sembrada en mayo-agosto, obtuvo en gramos por mazorca infectada por huitlacoche el promedio más alto con 49.81 g, sin embargo por su porcentaje de incidencia bajo (0.74 %) mostró un rendimiento de 46.500 kg ha⁻¹.

Las semillas híbridas y criollas difieren en los resultados de producción natural ya que la susceptibilidad de las semillas y la patogenicidad del hongo *Ustilago maydis* están estrechamente relacionados para obtener una infección masiva en el cultivo del maíz.

Las condiciones ambientales presentes en todos los cultivos difieren en la producción natural de huitlacoche obtenida para cada uno de estos, esto se debe a las diferentes semillas utilizadas en cada uno y el cuidado que se le dio a todos los cultivos siempre va a diferir de una región a otra.

2.6 BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. (2006). Fitopatología. 2ª ed. Ed. LIMUSA. México, D.F.
- Beas, F. R.; Loarca, P. G.; Guzmán, M. S.H.; Rodríguez, G. M.; Vasco, M. N. L. y Guevara, L. F. (2011). Potencial nutracéutico de componentes bioactivos presentes en huitlacoche de la zona de centro de México. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C. México. Abril-Junio 42(2): 36-44.
- Calderón, F. M. L. (2010). Tesis: Caracterización clásica y molecular del huitlacoche [*Ustilago maydis* D.C. (Corda)], hongo de importancia social y económica en la Región Central de México. Colegio de Postgraduados. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Puebla, Puebla.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). (2008). En: La Biodiversidad en Aguascalientes: Estudio de Estado. 2008. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Instituto del Medio Ambiente del Estado de Aguascalientes (IMAE), Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA). México. 389 p.
- Jiménez, B. M. F. (2010). Tesis: Estudio de la diversidad genética y análisis molecular del locus b de *Ustilago maydis*. Instituto Politécnico Nacional-CBG. Reynosa, Tamaulipas.
- Madrigal, R. J.; Villanueva, V. C.; Sahagún, C. J.; Acosta, R. M.; Martínez, M. L. y Espinosa, S. T. (2010). Ensayos de producción de huitlacoche (*Ustilago maydis* Cda.) hidropónico en invernadero. Revista Chapingo Serie Horticultura 16(3): 177-182.
- Martínez, M. L.; Villanueva, V. C. y Sahagún, C. J. (2000). Susceptibilidad y resistencia del maíz al hongo comestible huitlacoche (*Ustilago maydis* Cda.) mejorando su virulencia. Revista Chapingo Serie Horticultura 6(2): 241-255.
- Martínez-Martínez, L.; Muñoz-Orozco, A.; Mejía-Contreras, J. A.; Molina-Galán, J. D.; Zavaleta-Mejía, E.; Sandoval-Islas, J. S. y Villanueva-Verduzco, C. (2005). Efectos genéticos e interacciones entre familias de maíz y

- aislados de huitlacoche (*Ustilago maydis* D. C. Corda). Chapingo. Serie Horticultura. 11(1): 121-128.
- Méndez-Morán, L. y Ruiz-Herrera, J. (2008). Estudio de genes diferenciales durante el proceso patogénico de *Ustilago maydis* en *Arabidopsis thaliana* un huésped no natural. Avances en la Investigación Científica en el CUCBA. En: XIX Semana Nacional de la Investigación Científica. Zapopan, Jalisco. México. Pp: 407-414.
- Pan, J. J.; Baumgarten, A. M y May, G. (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.
- Pataky, J. K. (1991). Production of huitlacoche [*Ustilago maydis* (D. C.) Corda] on sweet corn. *HortScience* 26:1374-1377.
- Salazar, T. J. C.; Martínez, T. E.; Álvarez, H. R. y Méndez, L. A. (2013). Susceptibilidad de maíces híbridos y criollos al huitlacoche (*Ustilago maydis* (D.C.) CDA.), y rentabilidad de la producción, en Chapingo, México. Ciencias Agronómicas y ambientales. 1er. Congreso Internacional de Ciencias Aplicadas. Universidad Autónoma de Chapingo. pp. 84-93.
- Valdez, M. M.; Valverde M. E. y Paredes L. O. (2009). Procedimiento tecnológico para la producción masiva de huitlacoche. CINVESTAV-Irapuato. Sinnco. pp. 10-37.
- Villanueva, C.; Cruz, D.; Molina, J. D.; Castillo, F. y Zavaleta, E. (1999). Artificial induction of huitlacoche (*Ustilago maydis*): influence of different conditions in the field. *Micol. Neotrop.* 12: 41-57.

CAPITULO III

CAPACIDAD DE *U. maydis* PARA INFECTAR PLANTAS DE MAÍZ EN CONDICIONES CONTROLADAS CON EL MÉTODO DE INOCULACIÓN ARTIFICIAL

3.1 RESUMEN

La amplia variabilidad patogénica en cepas de *Ustilago maydis* permite la evaluación en semillas de maíz híbridas y criollas para la producción de huitlacoche. Por lo anterior, el objetivo en este estudio fue evaluar la capacidad patogénica de cepas de *U. maydis* del Estado de Aguascalientes en maíces híbridos y criollos para la producción de huitlacoche en condiciones controladas con el método de inoculación artificial. Se evaluaron cuatro cepas originarias del Estado de Aguascalientes y dos cepas testigos originarias del Estado de México en tres híbridos y tres criollos. El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones en arreglo factorial 6x4. Se obtuvieron diferencias significativas entre variedades de maíz y las tres cruzas evaluadas. La craza 2 para el Estado de Aguascalientes presentó la mayor patogenicidad con 59.6 % (criollos) y 76.9 % (híbridos) para índice de severidad, en la incidencia con 82.2 % (criollos) y 93.3 % (híbridos), para gramos por mazorca infectada con 73.9 g (criollos) y 134.0 g (híbridos) y para el rendimiento por hectárea fue de 4.1 t ha⁻¹ (criollos) y 7.7 t ha⁻¹ (híbridos). El híbrido A7573 presentó la mayor susceptibilidad para las tres cruzas evaluadas. Las cepas del Estado Aguascalientes presentan patogenicidad, siendo una buena opción para la producción de huitlacoche en condiciones controladas.

3.2 INTRODUCCIÓN

El hongo *U. maydis* es un hongo basidiomiceto conocido en el mundo por causar la enfermedad llamada carbón común del maíz (*Zea mays*), esta infección propicia la formación de grandes tumores o agallas que al desarrollarse en la mazorca se le conoce como "huitlacoche" o "cuitlacoche" y son usadas en la preparación de diferentes platillos (Ruiz-Herrera y Martínez-Espinosa, 1998; Bolker, 2001; Pataky y Chandler, 2003).

El huitlacoche aparece en casi todas las regiones productoras de maíz, aunque las condiciones climáticas favorables para su desarrollo son muy variadas, algunos autores afirman que el ataque de este patógeno puede ser más severo en ambientes húmedos (humedad relativa de 72 a 80 %) y templados (17 a 20 °C) (Villanueva *et al.*, 1999; Martínez-Martínez *et al.*, 2005), otros autores indican que el ataque es más frecuente en áreas cálidas (26 a 34 °C) y moderadamente secas (Agrios, 2006), sin embargo Salazar *et al.* (2013), mencionan que para cada variedad de maíz existe una relación de temperaturas y humedad óptimas para el desarrollo de *U. maydis*.

La infección forma un filamento dicarión como resultado de las interacciones de apareamiento. Este proceso es controlado por el *locus a* y *b*. El *locus a* regula la formación de filamentos de apareamiento o tubos de conjugación, la transcripción de proteínas codificada por el *locus b* entra en juego después de la fusión para mantener el crecimiento filamentosos del dicarión infeccioso y para promover el desarrollo de patógenos en el planta. Uno de los aspectos de apareamiento en *U. maydis* es que hay múltiples especificidades en el *locus b* con estimaciones que van desde 25 hasta 33 diferentes tipos (Banuett, 1992; Banuett, 1995; Kronstad, 2003).

U. maydis presenta una variabilidad genética en la virulencia del hongo, este tiene gran cantidad de líneas o biotipos con diferentes características fisiológicas y patogénicas, las cuales se pueden considerar razas fisiológicas.

La característica principal de este hongo es ser heterotálico lo que provoca que surjan nuevos biotipos por hibridación en cada nueva generación sexual, por esto, de una sola agalla es posible aislar una gama de líneas haploides que difieren en su patogenicidad. También 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 y agentes químicos (Martínez *et al.*, 2000; Martínez-Martínez *et al.*, 2005).

Programas de reproducción actuales se basan en la infección natural de carbón en parcelas de campo y la eliminación de las líneas de mejoramiento más susceptibles a fin de mantener la resistencia a tizón, sin embargo numerosos informes están disponibles en la influencia de las diversas técnicas de inoculación, la etapa de desarrollo del huésped y las condiciones ambientales para la patogénesis (Kealey y Kosikowski, 1981; Pataky, 1991).

En la producción artificial de huitlacoche existe la técnica de inoculación artificial sobre híbridos comerciales de maíz dulce y variedades de polinización abierta (Martínez-Martínez *et al.*, 2000) esta técnica se ha desarrollado desde el siglo 18 (Walter, 1935; Christensen, 1963). En diferentes partes de México se han evaluado la patogenicidad de algunas cepas de *U. maydis* y la susceptibilidad y resistencia en variedades de maíz; sin embargo, para el Estado de Aguascalientes no existe información sobre la patogenicidad de las cepas silvestres, así como la susceptibilidad y resistencia en variedades de maíz adaptadas en el Estado. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar diferentes cepas de *U. maydis* del Estado de Aguascalientes para infectar plantas de maíz, bajo condiciones controladas con el método de inoculación artificial.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

La obtención de cepas se realizó para los 13 tratamientos evaluados. La metodología se llevó a cabo con el procedimiento de Guevara (1999).

3.3.1 Extracción, lavado y germinación de teliosporas

Se molió 1.25 g de material vegetal (agallas) conteniendo teliosporas de *U. maydis* e un mortero estéril con 25 ml de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) 1.5 % estéril. Se molió hasta deshacer perfectamente el tejido o agallas y obtener una suspensión homogénea. Se filtró con gasa estéril, colectando la suspensión de teliosporas en un matraz estéril. Se recuperó el tejido molido y se resuspendió en 50ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 1.5 % estéril nuevamente. Se filtró nuevamente con gasa estéril y se descartó el bagazo. Se colectó y se juntó la suspensión de teliosporas. Se colocó 1.5 ml en tubos Eppendorf de la suspensión de teliosporas. Se centrifugó la suspensión de teliosporas en una microcentrifuga a 14,100 rpm durante 2 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1.5 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 1.5 % estéril.

Se centrifugó nuevamente la nueva suspensión de teliosporas como se hizo anteriormente. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1.5 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 1.5 % estéril. Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 48 horas. Se centrifugó a 14,100 rpm durante dos minutos. Se descartó el sobrenadante; se lavó la pastilla obtenida añadiendo 1.5 ml de agua destilada estéril. Se centrifugó a 14,100 rpm durante dos minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1.5 ml de agua destilada estéril. Se realizó una dilución en la concentración 1:100. Se inoculó la suspensión de teliosporas en medio sólido agar papa dextrosa adicionado con el antibiótico cloranfenicol al 0.05 mg/L en la siguiente concentración:

- a. 1 caja de Petri con 20 μl de la dilución 1:100.
- b. 1 caja de Petri con 100 μl de la dilución 1:100.
- c. 1 caja de Petri con 20 μl de la concentrada.

Se distribuyó la suspensión de teliosporas de cada caja con ayuda de un asa de vidrio; es importante esterilizar el asa antes y después de utilizarla colocándola en alcohol al 96 % y flameándola. Se incubaron las cajas de Petri invertidas, a 28 °C por 4 días.

3.3.2 Obtención de esporidias y cepas monoesporidiales de *U. maydis*

Al sembrar teliosporas germinadas en PDA Cloramfenicol al 0.5 mg/L, cada una de ellas produce 4 basidiosporas o esporidias con constitución genética diferentes; por lo tanto cada colonia de teliosporas germinada tiene cuatro genotipos diferentes de esporidias que es necesario separar. Una vez que se comienza a observar el crecimiento de las colonias de teliosporas aisladas a partir de material fúngico-vegetal, se toma con un palillo estéril una muestra de varias colonias de teliosporas y se colocan en un tubo de Eppendorf con agua destilada.

Se disolvieron completamente las colonias hasta obtener un líquido homogéneo. De los cultivos líquidos de las teliosporas germinadas de *U. maydis* se realizan diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , con la finalidad de separar cada una de las esporidias o basidiosporas producidas en cada una de las colonias.

- a. Dilución 10^{-2} = 990 μ L de H₂O + 10 μ L de cultivo líquido.
- b. Dilución 10^{-3} = 900 μ L de H₂O + 100 μ L de la dilución 10^{-2} .
- c. Dilución 10^{-4} = 900 μ L de H₂O + 100 μ L de la dilución 10^{-3} .

Se plaquearon en cajas de Petri con PDA las diluciones 10^{-2} y 10^{-4} de la siguiente forma:

- d. 1 caja de Petri con 20 μ L de la dilución 10^{-2} .
- e. 1 caja de Petri con 20 μ L de la dilución 10^{-4} .
- f. 1 caja de Petri con 100 μ L de la dilución 10^{-4} .

Para cada caja, se distribuyó la suspensión de manera homogénea con 300 μ L de agua destilada para ayudar a la distribución de las teliosporas con ayuda de un asa de vidrio; es importante esterilizar el asa antes y después de utilizarla, colocándola en alcohol al 96 % y flameándola. Se incubaron invertidas las cajas de Petri, a 28 °C por 2-3 días. Después de este periodo se

espera observar colonias separadas, cada una proveniente de una esporidia; se tomó de forma aleatoria 6 colonias que se encontraran separadas de las demás colonias de las tres cajas sembradas.

3.3.3 Pruebas de apareamiento *in vitro*

Estas pruebas sirven para determinar la compatibilidad genética (sexual) de una capa monoesporidial con otra, y se llevó acabo de la siguiente manera:

Se realizaron cultivos líquidos de PDB para cada una de las colonias esporidiales elegidas con anterioridad, se tomó cada colonia elegida con un palillo estéril y se colocó en un matraz con 10 ml de PDB. Se enumeraron los matraces para tener un mayor control de las cepas. Los matraces se colocaron en agitación en un periodo de 12-18 hrs para promover su crecimiento hasta que el medio se enturbio. Una vez completado el periodo de agitación se procedió a realizar las pruebas de apareamiento en cajas de Petri con medio doble completo de Holliday, bajo condiciones de esterilidad.

En el medio se realizaron 36 puntos (6x6) para realizar la confrontación de cepas. Con una micropipeta se tomaron 100 µl del matraz número 1 y se colocaron 6 gotas de forma horizontal y 6 gotas de forma vertical en las primeras líneas. Con una nueva punta estéril se tomaron 100 µl del matraz número 2 y se colocaron 6 gotas de forma horizontal y 6 gotas de forma vertical en las segundas líneas. El paso anterior se realizó para cada uno de los matraces restantes confrontando todas las cepas. Se esperó a que las gotas secaran completamente y se selló la caja de Petri con parafilm evitando que entrara oxígeno a la caja.

Se incubaron a 28 °C por 24 hrs. Se identificaron las cepas que presentaron compatibilidad por medio de un color blanquecino con apariencia algodonosa. Las cepas compatibles se sembraron en cajas de Petri con PDA, por duplicado. Estas colonias son las cepas monoesporidiales. Se resembraron

cada mes en PDA y se conservaron a 4 °C en el refrigerador en espera de ser elegidas para la inoculación artificial en invernadero.

3.3.4 Preparación del inoculo.

Se aislaron 46 cepas de los 13 tratamientos evaluados, 20 cepas se eliminaron por contaminación, todas las cepas se confrontaron para obtener la mejor cruz. De las cruces obtenidas se clasificaron por intensidad de apareamiento (Figura 6).

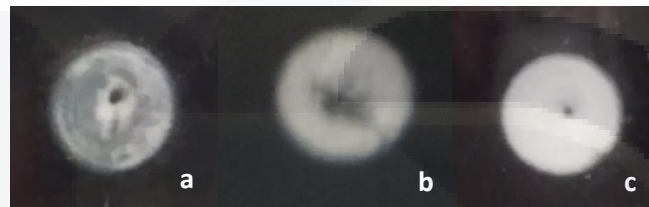


Figura 6. Diferencias entre las intensidades de apareamiento. a) Baja, b) Media y c) Alta

Se eligieron las intensidades más altas, de estas cepas se eligieron las que presentaran mayor cantidad de compatibilidad con otras cepas; al final se eligieron 4 cepas de las 46 aisladas del Estado de Aguascalientes y 2 cepas propiedad del Dr. Fidel Guevara Lara que fueron utilizadas como testigos (cuadro 5).

Cuadro 5. Cepas a evaluar

Cruzas	Nombre	Localidad	Municipio	Estado
Cruza 1	1B	Providencia	Aguascalientes	Aguascalientes
	3B	UAA Posta	Jesús María	
Cruza 2	13B	Fco. Villa	Asientos	
	16B			
Cruza 3	ch1		Edo. De México	
Testigo*	Q318			

De las cepas monoesporidiales aisladas y conservadas en refrigeración, se procedió a realizar el inoculo con el siguiente procedimiento:

Se prepararon 6 matraces con 10 ml de PDB cada uno y se esterilizaron. Bajo condiciones de esterilidad, con un palillo estéril se tomó una pequeña muestra de la cepa y se colocó en el matraz. Los matraces se colocaron en agitación durante 24 hrs para promover su crecimiento. Se prepararon 6 matraces con 75 ml de PDB cada uno y se esterilizaron. Se tomó 1.5 ml del matraz de 10 ml y se colocó en el matraz de 75 ml y se colocaron en agitación; cabe aclarar que las cepas testigo se colocaron durante 24 hrs y las cepas del Estado de Aguascalientes se colocaron durante 12 hrs. Una vez completado el tiempo de agitación y las muestras presentaban turbidez, se tomó 1.5 ml y se colocó en tubos de Eppendorf. Se tomaron 100 μ l para el conteo de células y se colocó en otros tubos de Eppendorf; el sobrante del tubo Eppendorf se centrifugó a 14,100 rpm por 2 minutos, se descartó 1.30 ml, se homogenizó y con esto se realizó la prueba de apareamiento para confirmar su compatibilidad. En 6 tubos de Eppendorf se colocó 900 μ l de agua destilada estéril y se colocaron los 100 μ l de la concentración del cultivo para realizar el conteo de células con la cámara de Neubauer.

La concentración de células para el inóculo se estableció en 10×10^6 . Se utilizaron botellas de agua purificada de 600 ml, con la fórmula de volúmenes se estableció la cantidad de agua se utilizó para diluir los inóculos y dejarlos a la concentración deseada y en donde se vaciaron las dos cepas compatibles. Se conservó el inóculo resultante a 4 °C hasta su aplicación.

3.3.5 Diseño experimental en invernadero

El experimento 2 se llevó a cabo en el invernadero ubicado en la Posta que pertenece al Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes; el invernadero cuenta aproximadamente con 80 m². Se colocaron 360 bolsas negras con aproximadamente 15 kg de suelo cada una. Se colocaron 5 surcos dobles con 36 macetas cada uno. Se colocó riego por goteo. Las plantas quedaron colocadas completamente al azar en unidades experimentales de 5 plantas cada una, se eligieron 6 variedades de maíz, 3 criollos y 3 híbridos (cuadro 6).

Cuadro 6. Variedades de maíz utilizadas en invernadero.

Características	Variedades					
	Criollo 1	Criollo 2	Criollo 3	AS-822, Aspros	A-7573, Asgrow	H-383, INIFAP
Localidad	Paredes	Ejido del Bajío	Ejido Peñuelas			
Municipio	San José de Gracia	Rincón de Romos*	Aguascalientes		Semilla certificada	
Estado de Origen	Aguascalientes	Zacatecas	Aguascalientes	Jalisco	Bajío	Aguascalientes
Tipo de híbrido	-	-	-	Triple	Triple	Simple
Ciclo	-	-	-	Intermedio	Intermedio Precoz	Intermedio
Condiciones de siembra	Temporal	Temporal	Temporal	Buen temporal riego	Riego	Buen temporal riego
Días de floración	75-80**	80-85**	80-85**	77-80	60-70	80-85
Días de madurez	130-136**	115-120**	115-120**	142-148	100-110	110-115
Altura de planta (m)	2.30-2.50**	1.30-1.50**	2.00-2.10**	2.15-2.25	2.10-2.50	3.0
Altura de mazorca (m)	1.90**	90-110**	1.40-1.50**	1.40-1.55	1.10-1.50	-
Tipo de grano	Blanco	Blanco	Amarillo	Blanco semidentado	Blanco	Blanco semidentado

*Lugar de colecta de la semilla. **Datos obtenidos en campo y/ entrevista con el productor, todos son datos aproximados.

Se colocaron 24 tratamientos los que corresponden a las 6 variedades por las 3 pares de cepas se obtienen 18 tratamientos, más 6 testigos para cada una de las variedades dan el total de 24 tratamientos (cuadro 7). Cada tratamiento consta de 5 plantas por unidad experimental con 3 repeticiones y da un total de 360 plantas (anexo A).

Cuadro 7. Tratamientos colocados en el invernadero para la evaluación de producción de huiflacoche.

Tratamiento	Variedad (Factor A)	Cruza (Factor B)	Tratamiento	Variedad (Factor A)	Cruza (Factor B)
1	Criollo 1	1	13	Aspros	1
2	Criollo 1	2	14	Aspros	2
3	Criollo 1	3	15	Aspros	3
4	Criollo 1	Sin inocular	16	Aspros	Sin inocular
5	Criollo 2	1	17	Asgrow	1
6	Criollo 2	2	18	Asgrow	2
7	Criollo 2	3	19	Asgrow	3
8	Criollo 2	Sin inocular	20	Asgrow	Sin inocular
9	Criollo 3	1	21	INIFAP	1
10	Criollo 3	2	22	INIFAP	2
11	Criollo 3	3	23	INIFAP	3
12	Criollo 3	Sin inocular	24	INIFAP	Sin inocular

La siembra se realizó el 24 de febrero del 2015; con anterioridad las semillas se colocaron en agua corriente durante 24 hrs para promover la germinación anticipada. Se colocaron 3 semillas por maceta, esto para asegurar una planta por maceta, cuando las plántulas emergieron se realizó el conteo de germinación para cada una de las variedades, y cuando llegaron a la etapa vegetativa solo se dejó la planta más fuerte y grande en cada maceta.

Se programaron 4 riegos por goteo de 15 min cada uno en la etapa de germinación durante 15 días, se suspendió el riego durante 15 días y se reinició en la etapa vegetativa la misma programación, una vez que se inocularon los jilotes se aumentó a 6 riegos con 15 min cada uno.

3.3.6 Inyección del inoculo

La inoculación se realizó con una jeringa (figura 1A, anexo B), se inyectaron 2 mL de inoculo correspondiente al tratamiento, se inoculó por el canal de los estilos cuando presentaron una longitud de 5 a 10 cm (figura 1B, anexo B) y antes de que ocurriera la polinización. Para retrasar la polinización en algunas variedades, se colocó una bolsa de papel en las espigas (figura 1C, anexo B), una vez inoculado el jilote se polinizó manualmente para evitar la hibridación con las variedades presentes en el invernadero.

3.3.7 Toma de datos

Los datos se comenzaron a registrar (cosecha) a los 22 días después de la inoculación estén o no presentes las agallas del hongo.

3.3.8 Variables a evaluar

Se tomaran en cuenta las siguientes variables:

Índice de severidad (IS): corresponderá a la proporción de los elotes cubiertos por agallas formadas por el hongo. Se tomaran cinco grados de severidad (Madrigal, *et al.*, 2010).

Porcentaje de incidencia (IP): corresponde al número de jilotes infectados con algún grado de severidad dividido entre el número de jilotes inoculados multiplicado por 100 (Madrigal, *et al.*, 2010).

Gramos por mazorca infectada (GMI): corresponde al peso total en gramos del huitlacoche desgranado de todos los elotes infectados dividido entre el número de elotes infectados por el hongo (Madrigal, *et al.*, 2010).

Rendimiento por hectárea: Se obtendrá al multiplicar la densidad de población de maíz por los GMI, el PI y el número de jilotes por planta (Madrigal, *et al.*, 2010).

3.3.9 Análisis estadísticos

El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones en arreglo factorial 6x4 donde el factor A fueron las variedades de maíz: 1) criollo

1; 2) criollo 2; 3) criollo 3; 4) Híbrido A-7573; 5) Híbrido AS-822; 6) Híbrido H-383. Y el factor B fueron las cruza: 1) cruza 1; 2) cruza 2; 3) cruza 3; 4) Sin inocular. Los datos obtenidos del índice de severidad de huítlacoche, se transformaron a porcentaje de infección mediante la fórmula de Townsend y Heuberger. Los datos se pudieron evaluar mediante ANOVA, prueba Tukey y correlación, mediante el paquete de análisis estadístico Statistica. Además, se realizó el cálculo de efectividad de los tratamientos mediante la prueba de eficacia de Abbott.

Formula de Townsend y Heuberger. Para transformar el índice de severidad a porcentaje de infección:

$$PI = \frac{\sum_{i=1}^{n=5} (n \cdot V)}{\text{Categoría mayor} \cdot N} \cdot 100$$

Donde:

PI = Porcentaje de infección

n = número de hojas en cada categoría

V = valor numérico de cada categoría

N = número total de hojas en la muestra

Formula de Abbott. Para calcular la eficacia biológica de cepas del Estado de Aguascalientes:

$$ET = 100 - \left[\frac{IT - it}{IT} \times 100 \right]$$

Donde:

ET= Eficacia de las cepas del Estado de Aguascalientes

IT= Porcentaje de infección en cepas testigo por variedad

it = Porcentaje de infección de cepas del Estado de Aguascalientes por variedad.

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIONES

En los análisis de varianza individuales se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$) para las variables registradas:

En el porcentaje de incidencia (PI), se observa que las cepas utilizadas tuvieron un alto potencial infectivo, dado que todas las variedades estudiadas presentaron algún grado de infección. La cruz 2 del Estado de Aguascalientes presentó el mayor PI en la variedad Criolla 3 con 100 %; en el caso de los híbridos, la cruz 2 alcanzó un 93.3 % en los tres híbridos estudiados. El criollo 2 presentó la menor incidencia en la cruz 2 (60 %) (Cuadro 8).

Para el índice de severidad (IS), la cruz 2 en los criollos 1 y 3 obtuvo un 68 %, y para los menores valores se obtuvieron en la cruz 2 con el criollo 2 (42.7 %). En los híbridos AS822 y A7573 se obtuvo un 81.3 % con las dos cruza del Estado de Aguascalientes, y el menor IS se obtuvo en la cruz 1 con el híbrido H383 (49.3 %) (Cuadro 8) (anexo C).

Los rendimientos por mazorca (GMI) más altos se obtuvieron en la cruz 2 con el criollo 3 (94.7 g), y los menores rendimientos se obtuvieron en la cruz 1 con el Criollo 1 (32.9 g). El híbrido A7573 obtuvo el mejor rendimiento con la cruz 2 (178.8 g) y el menor rendimiento se obtuvo con la cruz 1 y el híbrido H383 (76.2 g) (Cuadro 8).

El mejor rendimiento por hectárea de las cepas del Estado de Aguascalientes se obtuvo en la cruz 2 con el híbrido A7573 (10.5 t ha^{-1}) y el menor rendimiento fue con la cruz 1 y el criollo 1 (1.6 t ha^{-1}) (Cuadro 8). Los cálculos para esta variable se realizaron con una población de 60,000 semillas por hectárea.

Cuadro 8. Variedad-Cruza evaluados para la producción de huilacoche.

Tto.	Variedad	Cruza	IS (%)		PI		GMI		RH (t)	
1	Criollo 1	1	57.3 ± 7.4	ab	73.3 ± 13.3	ab	32.9 ± 11.6	de	1.6 ± 0.8	cd
5	Criollo 2	1	48.0 ± 4.6	b	66.7 ± 6.7	ab	53.1 ± 16.6	cde	2.3 ± 0.9	cd
9	Criollo 3	1	65.3 ± 1.3	ab	93.3 ± 6.7	ab	91.5 ± 17.1	bcde	5.1 ± 1.1	abcd
13	Aspros	1	81.3 ± 7.1	ab	93.3 ± 6.7	ab	96.2 ± 16.5	abcde	5.5 ± 1.2	abcd
17	Asgrow	1	78.7 ± 11.6	ab	93.3 ± 6.7	ab	122.0 ± 31.0	abcde	7.0 ± 2.1	abcd
21	INIFAP	1	49.3 ± 7.4	b	80	ab	76.2 ± 9.2	cde	3.7 ± 0.4	bcd
2	Criollo 1	2	68.0 ± 6.1	ab	86.7 ± 6.7	ab	75.5 ± 11.7	cde	3.8 ± 0.4	bcd
6	Criollo 2	2	42.7 ± 17.6	b	60.0 ± 23.1	b	51.4 ± 33.1	cde	2.6 ± 2.2	bcd
10	Criollo 3	2	68.0 ± 6.1	ab	100	a	94.7 ± 12.8	bcde	5.7 ± 0.8	abcd
14	Aspros	2	74.7 ± 4.8	ab	93.3 ± 6.7	ab	93.3 ± 12.5	bcde	5.3 ± 1.0	abcd
18	Asgrow	2	81.3 ± 10.9	ab	93.3 ± 6.7	ab	178.8 ± 65.6	abc	10.5 ± 4.6	abc
22	INIFAP	2	74.7 ± 2.7	ab	93.3 ± 6.7	ab	129.9 ± 15.3	abcde	7.2 ± 0.7	abcd
3	Criollo 1	3	94.7 ± 1.3	a	100	a	131.4 ± 5.9	abcde	7.9 ± 0.4	abcd
7	Criollo 2	3	76.0 ± 4.0	ab	80	ab	159.9 ± 7.0	abcd	7.7 ± 0.3	abcd
11	Criollo 3	3	74.7 ± 8.1	ab	86.7 ± 6.7	ab	165.9 ± 24.6	abcd	8.8 ± 1.9	abcd
15	Aspros	3	89.3 ± 10.7	a	93.3 ± 6.7	ab	163.4 ± 23.5	abcd	9.3 ± 1.9	abc
19	Asgrow	3	90.7 ± 9.3	a	93.3 ± 6.7	ab	230.9 ± 39.4	a	13.2 ± 3.0	a
23	INIFAP	3	73.3 ± 11.4	ab	86.7 ± 6.7	ab	216.1 ± 63.2	ab	11.7 ± 4.2	ab
4	Criollo 1	SN	0	c	0	c	0	e	0	c
8	Criollo 2	SN	0	c	0	c	0	e	0	c
12	Criollo 3	SN	0	c	0	c	0	e	0	c
16	Aspros	SN	0	c	0	c	0	e	0	c
20	Asgrow	SN	0	c	0	c	0	e	0	c
24	INIFAP	SN	0	c	0	c	0	e	0	c

Medias con la(s) misma(s) letras(s) son estadísticamente iguales, según la prueba de Tukey ($p < 0.05$); diferencia mínima significativa honesta. Tto.= tratamiento, IS (%)= Índice de severidad en porcentaje, PI= Porcentaje de incidencia, GMI= Gramos por mazorca infectada, RH (t)= Rendimiento por hectárea en toneladas, SN= sin inocular (control).

Los rendimientos obtenidos con el híbrido A7573 inoculado con la cruza 3 (13.2 t ha⁻¹) se aproximan a los rendimientos obtenidos por Martínez-Martínez *et al.* (2000), donde reportan que en ensayos experimentales y comerciales a cielo abierto, alcanzaron hasta una producción máxima de 14 t ha⁻¹. Por otro lado

la cruz 1 con el híbrido H383 (3.7 t ha^{-1}) y con la criolla 3 (5.1 t ha^{-1}) están cercanos a los reportados por Madrigal *et al.* (2010), donde obtuvieron que el híbrido 30G40 presentó el mayor rendimiento con $4,786.20 \text{ kg ha}^{-1}$. Sin embargo Salazar *et al.* (2013) evaluaron al híbrido A7573 inoculado con la cepa IM409 alcanzando 11.841 t ha^{-1} , lo que se aproximan a los resultados obtenidos con este mismo híbrido y con la cruz 2 (10.5 t ha^{-1}).

Las cruzas que se utilizaron se conforman sólo por dos cepas para cada cruz; donde la cruz 2 presentó el mayor PI (93.3 %) y la cruz 3 obtuvo los valores más altos para IS (84.4 %), GMI (203.4 g) y RH (11.4 t ha^{-1}) (Figura 7). Utilizando dos cepas por inóculo los resultados superaron a los de Carrillo *et al.* (2011), donde determinaron el rendimiento del huiflacoche (*U. maydis*) cultivado en ocho variedades de maíz, utilizaron dos inóculos de *U. maydis* conformado por cuatro y diez cepas. El porcentaje de infección mayor se obtuvo con la variedad Bida-54 y el inóculo de diez cepas (78.8 %), seguida del inóculo con cuatro cepas en la misma variedad de maíz (52.8 %). La variedad Bengala, obtuvo un grado de infección de 27 %, y rendimiento de huiflacoche de 6.3 t ha^{-1} .

Los resultados obtenidos en las semillas criollas para la incidencia (PI) fue 77.8 a 88.9 %, en IS fue entre 56.9 a 81.8 %, para GMI 59.2 a 152.4 g y con un RH de 3.0 a 8.1 t ha^{-1} (Figura 7), estos resultados varían respecto a los reportados por Valdez *et al.* (2009), donde obtuvieron en 15 genotipos de maíz criollo variaciones en los porcentajes de infección en mazorcas desde 31 a 92 % (promedio 72 %), para los porcentajes de cobertura del hongo sobre la mazorca oscilaron entre el 46 al 97 %, con un valor promedio de 77 %, y el peso de huiflacoche por mazorca, varió considerablemente en las líneas de maíz (80 hasta 450 g); y rendimientos de aproximadamente 15 t ha^{-1} .

Las diferencias significativas que se obtuvieron entre los resultados concuerdan con los autores Christenses (1963), Villanueva *et al.* (1999), Pataky y Chandler (2003) y Salazar *et al.* (2013) donde mencionan que existe una

variación patogénica del hongo; la infección está en función de la habilidad del patógeno, la susceptibilidad del huésped y su interacción con el ambiente y que para cada variedad de maíz existe una relación de temperaturas y humedad óptimas para el desarrollo de *U. maydis*. Se puede observar en el cuadro 9 que no hay correlación entre el IS y GMI; PI y GMI para la crusa 3 ya que la patogenicidad de esta crusa en particular puede producir más GMI independiente a la severidad e incidencia que pueda presentar en las variedades, esto se debe a la capacidad de producir hipertrofia e hiperplasia en la fase de patogénesis y así obtener mejores rendimientos de huillacoche por mazorca infectada.

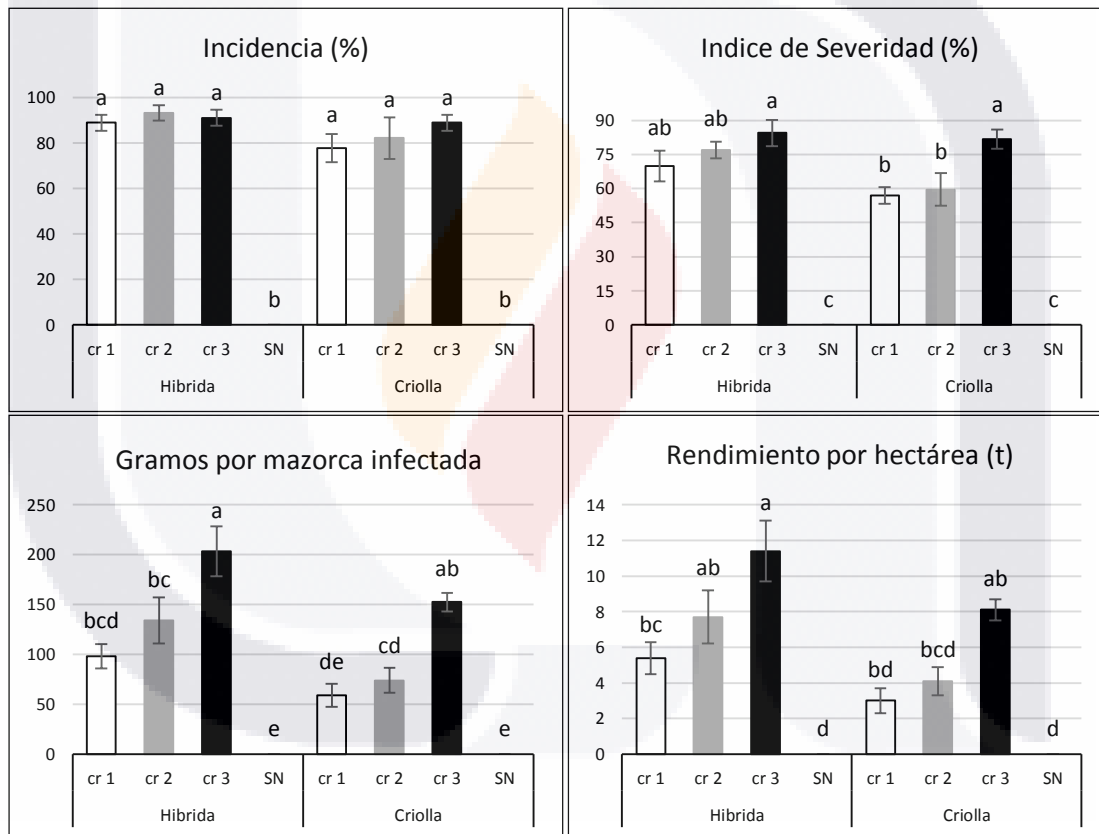


Figura 7. Comparación de las tres diferentes cruza en las semilla híbrida y criolla. cr 1=cruza del municipio de Aguascalientes y Jesús María, cr 2= crusa del municipio de Asientos y cr 3= crusa del Edo de México, SN= sin inocular. Medias con la(s) misma(s) letra(s) son estadísticamente iguales, según la prueba de Tukey (p<0.05); diferencia mínima significativa honesta.

Cuadro 9. Correlación entre las variables y cruza evaluadas.

	Cruza 1				Cruza 2				Cruza 3			
	IS	PI	GMI	RH	IS	PI	GMI	RH	IS	PI	GMI	RH
IS	1	0.78	0.76	0.82	1	0.81	0.79	0.79	1	0.92	0.45*	0.62
PI	0.78	1	0.71	0.79	0.81	1	0.52	0.59	0.92	1	0.43*	0.62
GMI	0.76	0.71	1	0.99	0.79	0.52	1	0.99	0.45*	0.43*	1	0.97
RH	0.82	0.79	0.99	1	0.8	0.59	0.99	1	0.62	0.62	0.97	1

*Correlación no significativa al nivel de 0.05. IS= índice de severidad, PI= porcentaje de incidencia, GMI= gramos por mazorca infectada, RH= rendimiento por hectárea.

Martínez *et al.* (2000), evaluaron 100 aislamientos del hongo en un híbrido experimental, seleccionando 12 de ellos por su vigor, presentando en promedio 190 g del hongo por planta infectada, y 135.24 g por planta inoculada (8.11 t ha⁻¹), índice de severidad de 36.82 y una incidencia de 70.64 %. De las 300 familias de medios hermanos maternos evaluadas (1998) por inoculación con la mezcla de los 12 aislamientos seleccionados (1997), se eligieron 16 familias susceptibles, que presentaron en promedio 154.97 g del hongo por planta infectada y 112.88 g por planta inoculada (6.67 t ha⁻¹), 76.67 % de incidencia y 34.82 de índice de severidad; así como 14 familias resistentes (0 % de incidencia) al ataque del hongo. Los resultados obtenidos en IP, IS, GMI y RH en las variedades híbridas inoculadas con la cruz 2 superan a los obtenidos por estos autores (Figura 7).

Las cepas evaluadas del Estado de Aguascalientes presentaron valores en IS altos en comparación con algunos autores mencionados lo que concuerda con Calderón (2010), donde reporta que el valor del IS generado por cada cepa de huilacoche no está totalmente relacionado con la variedad ni el color del maíz, lo que indica que aun cuando las variedades de maíz blanco son las más susceptibles, esto más bien depende de la virulencia de la cepa. Con esto se evaluó la efectividad biológica de las cruza del Estado de Aguascalientes comparada con la cruz del Estado de México resultando las cruza del Estado de Aguascalientes altamente efectivas para las tres variedades (cuadro 10).

Cuadro 10. Efectividad biológica de las cruzas del Estado de Aguascalientes

Tratamiento	Varietal	Cruza	EFBIO
1	Criollo 1	1	60.6 %
2	Criollo 1	2	71.8 %
5	Criollo 2	1	63.2 %
6	Criollo 2	2	56.1 %
9	Criollo 3	1	87.5 %
10	Criollo 3	2	91.1 %
13	Aspros	1	91.0 %
14	Aspros	2	83.6 %
17	Asgrow	1	86.8 %
18	Asgrow	2	89.7 %
21	INIFAP	1	67.3 %
22	INIFAP	2	101.8 %

Formula corregida de Abbott. EFBIO= Efectividad biológica en porcentaje.

El periodo de incubación del hongo varía de 12 a 25 días, sin embargo en invernadero y campo abierto puede haber diferencias por las condiciones que se pueden presentar para cada uno de los dos ambientes, en invernadero se puede presentar un periodo de incubación más rápida (7 a 16 días) y en campo más lenta (17 a 19 días) (Thakur *et al.*, 1989; Pope y McCarter, 1992; Valverde *et al.*, 1993; Pataky *et al.*, 1995; Villanueva, 1995; Carrol, 1998). Los resultados obtenidos en la variable GMI (figura 8C) varió para todos los tratamientos, dado que el periodo de incubación y crecimiento del hongo difiere para cada una de las variedades y cruza que se utilizaron, algunas presentaron menor producción y otras variedades presentaron un óptimo desarrollo del hongo a los 22 días de incubación.

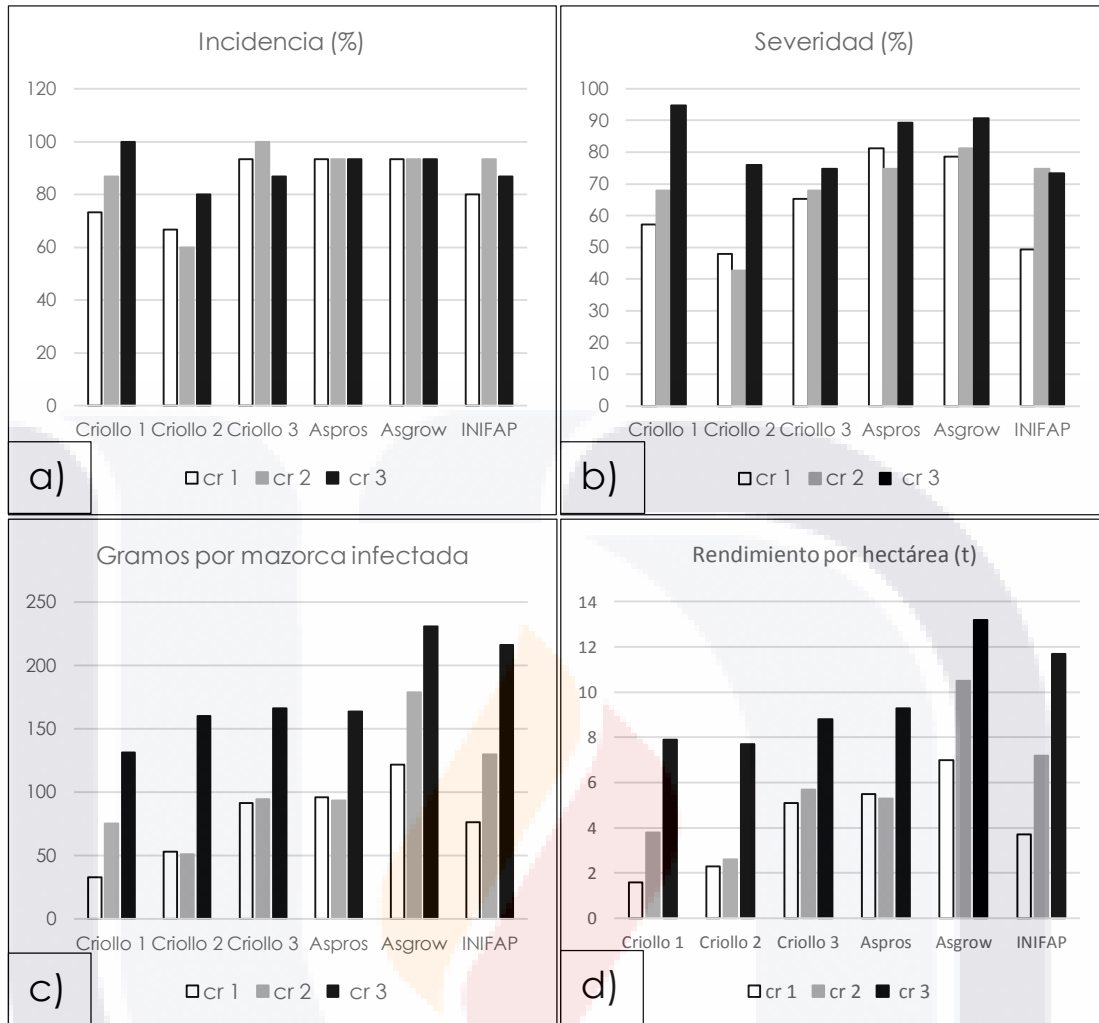


Figura 8. Variables evaluadas en las variedades de maíz y cruza del hongo *U. maydis*. a) Incidencia en porcentaje, b) Severidad en porcentaje, c) Gramos por mazorca infectada, d) Rendimiento por hectárea en toneladas.

Para realizar una determinante de la calidad del hongo producido por las diferentes variedades y cruza evaluadas, se puede tomar en cuenta el IS, PI, GMI y RH, donde el tratamiento 18 (Asgrow- cruza 2) obtuvo los valores más altos en las variables evaluadas, esto es en cuanto a la producción artificial. Sin embargo para asegurar una calidad de las agallas se requiere determinar un parámetro fundamental que es el tiempo de incubación del hongo ya sea dentro de un invernadero o a campo abierto. Por esto el método de inoculación artificial puede asegurar una producción y una calidad a la vista agradable del cliente, y así poder asegurar la venta; ya que en la producción

natural del hongo esto no pasa en la mayoría de las veces como se pudo observar en el primer objetivo de esta investigación. Si comparamos la calidad de las agallas encontradas en la producción natural y la producción artificial hay una diferencia muy marcada como lo podemos observar en las figuras 9 y 10.



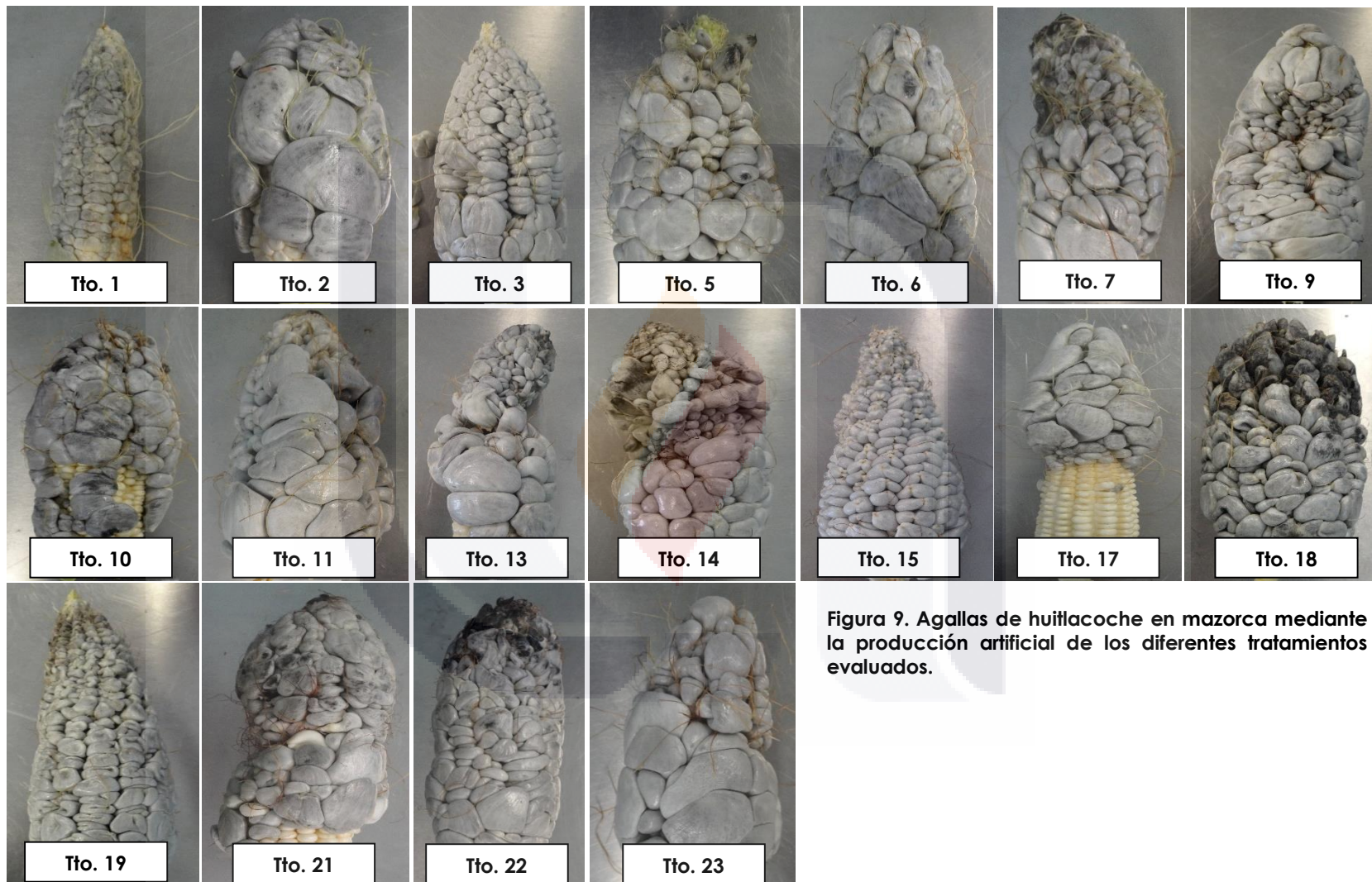


Figura 9. Agallas de huillacoche en mazorca mediante la producción artificial de los diferentes tratamientos evaluados.

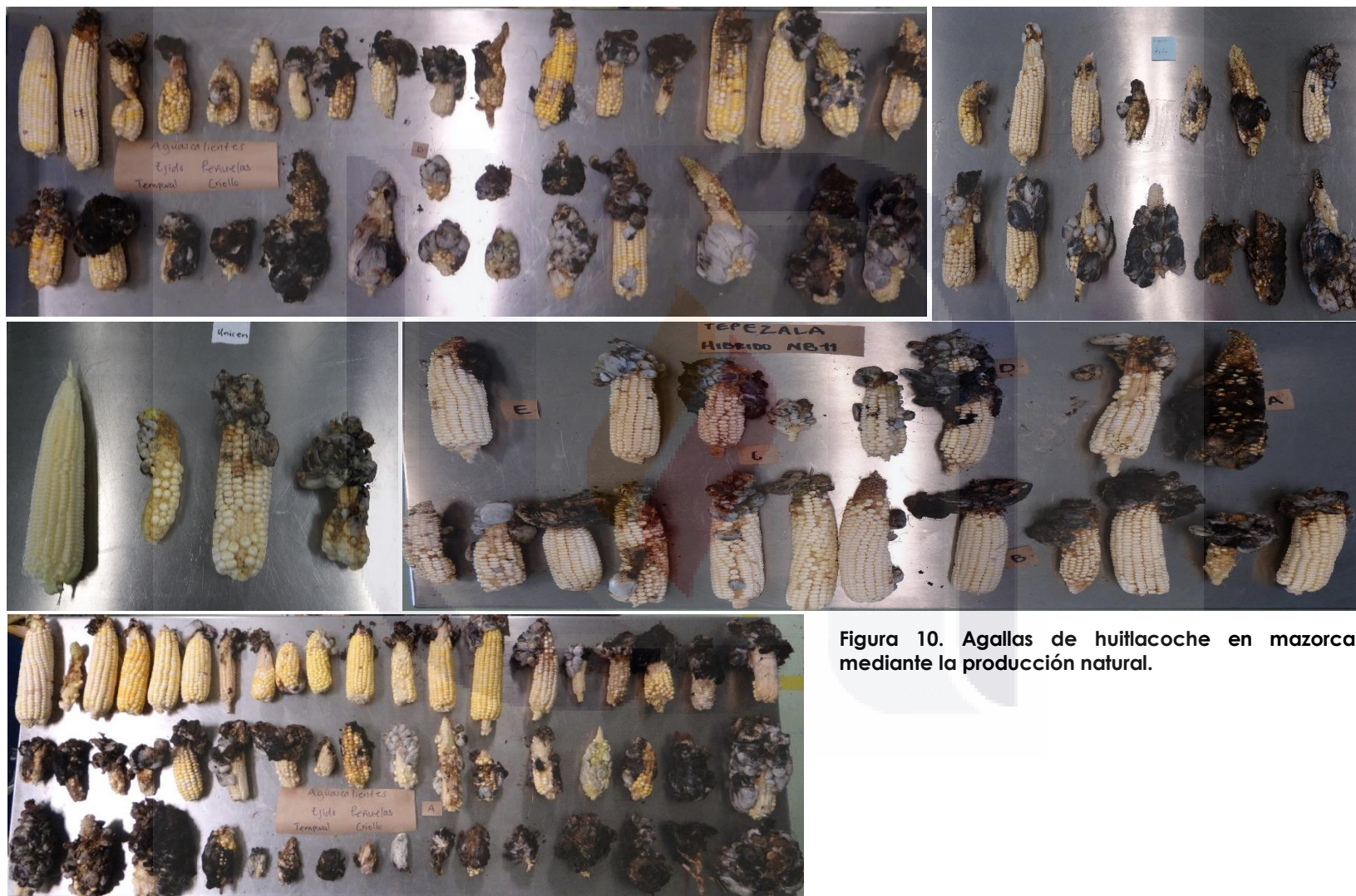


Figura 10. Agallas de huilacoche en mazorca mediante la producción natural.

3.5 CONCLUSIONES

Las cepas del Estado de Aguascalientes presentaron una efectividad biológica alta, siendo una opción para la producción de huitlacoche en el Estado.

Las variedades híbridos presentaron mayor susceptibilidad con las tres cruzas evaluadas a comparación de las variedades criollas.

La variedad criollo 2 utilizada en el municipio de Rincón de Romos y originaria del Estado de Zacatecas presentó una resistencia a las tres cruzas utilizadas para la producción de huitlacoche.

Es de importancia observar el comportamiento de cada variedad y con esto establecer un periodo de incubación homogéneo en cada una de estas para obtener la mayor producción de huitlacoche. Así como considerar el porcentaje de germinación para cada una de las variedades a utilizar.

El método de inoculación artificial asegura una producción estable y la calidad del hongo mediante periodos de incubación establecidos, tomando en cuenta la variedad, la crusa y las condiciones medioambientales.

3.6 BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. (2006). Fitopatología. 2ª ed. Ed. LIMUSA. México, D.F.
- Banuett, F. (1992). *Ustilago maydis*, the delightful blight, *Tig Trends In Genetics* May. 8:174-180.
- Banuett, F. (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize, *Annual Review Genetics*. 29:179-208.
- Bolker, M. (2001). *Ustilago maydis* a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* 147: 1395-1401.
- Calderón Fernández, M. L. (2010). Tesis: Caracterización clásica y molecular del huitlacoche [*Ustilago maydis* D.C. (Corda)], hongo de importancia social y económica en la Región Central de México. Colegio de Postgraduados. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Puebla, Puebla.
- Carrillo, M. I.; Tirado, G.; Guevara, L.F.; Silos, H.; Tirado, D.N. y Miranda, L.A. (2011). Conferencia: Potencial productivo y caracterización nutrimental de dos inóculos de huitlacoche (*Ustilago maydis*) en variedades de maíz. XXXIX Reunión anual de la Asociación Mexicana de Producción Animal y Seguridad Alimentaria, A. C. Chapingo, México del 4 al 6 de abril de 2011.
- Carroll, J. E. (1998). Corn smut. Cornell University in Cooperation with the National Association of Biology Teachers.
- 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, St. Paul. 41 p.
- Guevara, L. F. (1999). Relación del ácido Indol-3-ácetico con la capacidad de *Ustilago maydis* (Huitlacoche) de inducir tumores en maíz. Tesis de Doctorado en Ciencias de los Alimentos. Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República (PROPAC), Facultad de Química, Santiago de Querétaro, Qro.

- Kealey, K. S. y Kosikowski F. Y. (1981) Corn smut as a food source – Perspectives on biology, composition and nutrition, CRC Crit. Rev. Food Sci. Nut., 15, 321-351.
- Kronstad, JW (2003). Castles and cuitlacoche: the first international *Ustilago maydis* conference. Fungal Genetics and Biology 38: 265-271.
- Madrigal, R. J.; Villanueva, V.C.; Sahagún, C. J.; Acosta, R. M.; Martínez, M. L. y Espinosa, S. T. (2010). Ensayos de producción de huitlacoche (*Ustilago maydis* Cda.) hidropónico en invernadero. Revista Chapingo Serie Horticultura 16(3): 177-182.
- Martínez-Martínez, L.; Villanueva-Verduzco, C. y Sahagún-Castellanos, J. (2000). Susceptibilidad y resistencia del maíz al hongo comestible huitlacoche (*Ustilago maydis* Cda.) mejorando su virulencia. Revista Chapingo Serie Horticultura 6 (2): 241-255.
- Martínez-Martínez, L.; Muñoz-Orozco, A.; Mejía-Contreras, J.; Molina-Galán, J.; Zavaleta-Mejía, E.; Sandoval-Islas, J. S. y Villanueva-Verduzco, C. (2005). Efectos genéticos e interacciones entre familias de maíz y aislados de huitlacoche (*Ustilago maydis* D. C. Corda). Chapingo. Serie Horticultura. 11(1): 121-128.
- Pataky J. K. (1991). Production of cuitlacoche (*Ustilago maydis* [DC] Corda) on sweet corn. HortScience 26:1374– 1377.
- Pataky, J. K.; Nankam, C. y Kerns, M. R. (1995). Evaluation of a silkinoculation technique to differentiate reactions of sweet corn hybrids to common smut. Phytopathology 85(10): 1323-1328.
- Pataky, J. K. y Chandler, M. A. (2003). Production of huitlacoche, *Ustilago maydis* Cda.: timing inoculation and controlling pollination. Mycologia 95: 1261-1270.
- Pope, D. D. y McCarter, S. M. (1992). Smut incidence and severity after inoculating developing corn ears with *Ustilago maydis* using different methods. Phytopathology 82(4): 500.
- Ruiz-Herrera, J. y Martínez-Espinosa, A. D. (1998). The fungus *Ustilago maydis*, from the aztec cuisine to the research laboratory. Internatl Microbiol. 1: 149-158.

- Salazar, T. J. C.; Martínez, T. E.; Álvarez, H. R. y Méndez, L. A. (2013). Susceptibilidad de maíces híbridos y criollos al huitlacoche (*Ustilago maydis* (D.C.) CDA.), y rentabilidad de la producción, en Chapingo, México. Ciencias Agronómicas y ambientales. 1er. Congreso Internacional de Ciencias Aplicadas. Universidad Autónoma de Chapingo. pp. 84-93.
- Thakur, R. P.; Leonard, K. J. y Pataky J. K. (1989). Smut gall development in adult corn plants inoculated with *Ustilago maydis*. Plant Dis. 73: 921-925.
- Valdez, M. M.; Valverde, M. E. y Paredes L. O. (2009). Procedimiento tecnológico para la producción masiva de huitlacoche. CINVESTAV-Irapuato. Sinnco. pp. 10-37.
- Valverde, M. E.; Fallah, M. P.; Zavala, G. M.; Pataky, J.K.; Paredes, L. O. y Pedersen, W. L. (1993). Yield and quality of huitlacoche on sweet corn inoculated with *Ustilago maydis*. HortScience 28(8): 782-785.
- Villanueva, V. C. (1995). Estudios de la reacción del maíz al carbón común o huitlacoche (*Ustilago maydis*). Tesis de Doctor en Ciencias. Programa de Genética. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 133 p.
- Villanueva, C.; Cruz, D.; Molina, J. D.; Castillo, F. y Zavaleta E. (1999). Artificial induction of huitlacoche (*Ustilago maydis*): influence of different conditions in the field. Micol. Neotrop. Apl. 12: 41-57.
- Walter, J. M. (1935). Factors affecting the development of corn smut, *Ustilago zae* (Beckm.) Unger. Minn. Agr. Expt. Sta. Tech. Bull. 111.

CAPITULO IV

CARACTERIZACIÓN MORFÓLOGICA Y CORROBORACIÓN MOLECULAR DE CEPAS AISLADAS DE *U. maydis*

4.1 RESUMEN

Cepas de *U. maydis* fueron aisladas de plantas de maíz. Se realizó una descripción macroscópica encontrándose que el color predominante de la mayoría de las colonias fue de color marrón, representando las cepas de menor producción de huitlacoche. Sin embargo a pesar del color y comparación con el rendimiento, se realizó una corroboración molecular de estas cepas para determinar si existe la presencia de RNA viral. Este virus acompañado al hongo desde su adaptación al hospedero que es el maíz y puede inhibir o matar otras cepas de *U. maydis*. Estas cepas son llamadas cepas *killer* o cepas "asesinas". La presencia de dicho virus puede tener repercusión en la producción o infección del hospedero. Se realizaron cuatro diferentes metodologías para la corroboración molecular, siendo la más efectiva el protocolo de Extracción de ADN+RNA de *Ustilago maydis*. Las cepas 1B, 3B, 13B, 16B, ch1 y Q318 utilizadas en el Capítulo III fueron sometidas a la extracción de ADN mediante este método, siendo las cepas 1B y 13B donde aparecen dos bandas extras y posiblemente puedan representar RNA viral. Sin embargo falta por analizar otras cepas para determinar si existe RNA viral por medio de estas dos bandas que solo aparecen en estas cepas de *U. maydis*.

4.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CEPAS AISLADAS DE *U. maydis*

4.2.1 INTRODUCCIÓN

U. maydis pasa por una serie de etapas en su ciclo de vida en las que se presentan cinco estructuras que lo caracterizan. Inicia como teliospora dicariótica, sigue como basidiospora, luego como micelio haploide y por último como micelio dicariótico, que se transforma nuevamente en teliospora (Agrios, 2006; Ruiz, 2008).

En la etapa de micelio dicariótico que se presenta en el hospedero es cuando ocurre la formación de agallas, síntoma característico de la enfermedad. La teliospora (algunos autores la nombran clamidospora o brandespora) es un tipo de espora esférica o elipsoidal, de color café oscuro a negro, con protuberancias en forma de espinas, de siete a once micrómetros de diámetro, con capacidad para resistir las condiciones adversas del ambiente; posee dos núcleos haploides y al germinar presenta cariogamia, meiosis y mitosis; la pared se abre emitiendo un cuerpo tubular llamado basidio o promicelio, generalmente con cuatro células haploides que se transforman en basidiosporas (Agrios, 2006; Christensen, 1963).

La basidiospora, también llamada esporidio, es ovalada, hialina, de tamaño muy variado entre 13 a 28 μm , con núcleo haploide, y constituye la fuente de inóculo primario; puede dividirse por gemación produciendo esporidios secundarios o puede germinar en la superficie del hospedero, produciendo una hifa haploide. El micelio haploide está formado básicamente por hifas haploides provenientes de la germinación del esporidio; al fusionarse con otra hifa haploide compatible se forma una hifa dicariótica (Agrios, 2006; Christensen, 1963; De la Garza, 1974).

El micelio dicariótico está formado por hifas dicarióticas, con dos núcleos haploides compatibles, de mayor diámetro que la anterior, con capacidad

para desarrollarse en los tejidos de la planta. Estimula a las células del hospedero para que sufran hipertrofia e hiperplasia (Agrios, 2006).

La agalla es un tumor que se presenta en la planta infectada; es el síntoma característico de la enfermedad. Puede presentarse en el tallo, hojas, espigas o en los granos de elote. Se forma con el crecimiento desmesurado de las células del tejido infectado. Inicialmente están cubiertas por una membrana blanca encerrando a las células hipertrofiadas del hospedero y el micelio del hongo. Conforme maduran, la membrana se torna gris plateado o plumizo, al final, el micelio que ha invadido a las células del hospedero se transforma en teliosporas, mismas que son liberadas al romperse la membrana de la agalla. La cantidad de teliosporas en una agalla de tamaño regular puede ser poco más de 200 mil millones (Agrios, 2006; Christensen, 1963; De la Garza, 1974).

4.2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

La obtención de cepas se realizó para los 13 tratamientos evaluados. La metodología se llevó a cabo con el procedimiento de Guevara (1999), descrito en el Capítulo III. Se lograron obtener 27 cepas en total para el Estado de Aguascalientes, de 3 municipios diferentes (cuadro 11). Se les colocó un número consecutivo con terminación en letra B, conforme se lograban obtener. Algunas cepas se desecharon por presentar algún tipo de contaminación.

Cuadro 11. Cepas aisladas de diferentes municipios del Estado de Aguascalientes.

Nombre asignado	Localidad (Semilla)	Municipio	Estado
1B	Providencia (Unicen)	Aguascalientes	Aguascalientes
36B			
37B			
38B			
42B			
43B			
39B	Providencia (Aspros)		
40B			
41B			
44B			
45B			

Continuación del cuadro 11...

Nombre asignado	Localidad (Semilla)	Municipio	Estado
46B	Providencia (Aspros)	Aguascalientes	
2B			
3B	Área agrícola, Posta (2366)	Jesús María	Aguascalientes
4B			
5B			
6B			
7B	Área agrícola, Posta (Cimarrón)		Aguascalientes
8B			
9B			
11B	Francisco Villa (Cimarrón)	Asientos	
12B			
13B			
14B			
15B			
16B			
17B			


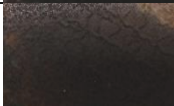

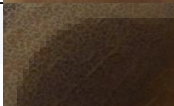
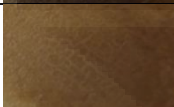


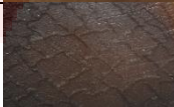
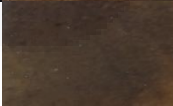
Se describió la gama de color que presentó en la colonia aislada de *U. maydis* en fase de basidiosporas colocadas en cajas Petri con medio PDA para cada una de las cepas aisladas.

4.2.3 RESULTADOS Y DISCUSIONES






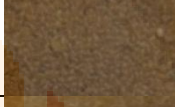




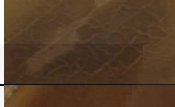



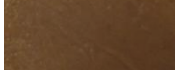
Las cepas aisladas de *U. maydis* presentaron diferencias en la tonalidad de color, mostrando una gama de tonalidades que se clasificaron en: color marrón, color marrón con tonalidades negras, color marrón oscuro a negro, color negro y color marrón claro cremoso (cuadro 12).

El resultado de la siembra de las cepas en medio PDA, se observó que todas formaron colonias con morfología similar, de color claro cremoso a los tres días de crecer la cepa, sin embargo en un lapso de una semana aproximadamente las cepas adquirieron un color marrón, característica de las cepas de *U. maydis* (Guevara-Vásquez et al., 2009).

Cuadro 12. Caracterización morfológica de las cepas aisladas del Estado de Aguascalientes.

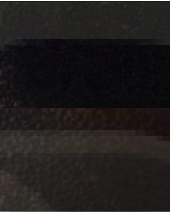

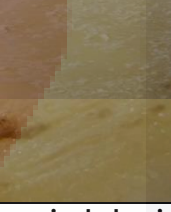
Nombre asignado	Localidad/Municipio (Semilla)	Cepa	Observaciones
1B			Color negro
36B			Color marrón oscuro a negro
37B	Providencia, Aguascalientes (Unicen)		Color marrón
38B			Color marrón con tonalidades negras
42B			Color marrón
43B			Color marrón oscuro a negro
39B			Color marrón con tonalidades negras
40B			Color marrón
41B	Providencia, Aguascalientes (Aspros)		Color marrón
44B			Color marrón oscuro a negro
45B			Color marrón con tonalidades negras
46B			Color marrón con tonalidades negras

Continuación del cuadro 12...

Nombre asignado	Localidad/Municipio (Semilla)	Color	Observaciones
2B			Color marrón claro cremoso
3B			Color negro
4B	Área agrícola, Posta Zootécnica, Jesús María (2366)		Color marrón
5B			Color marrón claro
6B			Color marrón con tonalidades negras
7B			Color marrón con tonalidades negras
8B	Área agrícola, Posta Zootécnica, Jesús María (Cimarrón)		Color marrón
9B			Color marrón
11B			Color marrón
12B			Color marrón con tonalidades negras
13B			Color marrón
14B	Francisco Villa, Asientos. (Cimarrón)		Color marrón
15B			Color marrón
16B			Color marrón con tonalidades negras
17B			Color marrón

Las cruza 1 y 2 utilizadas en el Capítulo III para la evaluación de producción de huitlacoche en el Estado de Aguascalientes, conformaron las coloraciones más oscuras a comparación de la cruza del Estado de México. Las cepas del Estado de Aguascalientes obtuvieron el rendimiento por hectárea más bajos en comparación de las originarias del Estado de México (cuadro 13).

Cuadro 13. Comparación de la coloración de cepas con la producción obtenida.

Cruza	Cepas	Coloración	RH (t)
1	1B		1.594*
	3B		
2	13B		3.839*
	16B		
3	ch1		7.885*
	Q318		

* Resultado mediante la prueba Tukey HSD con un nivel de significancia del 0.05. RH (t)= rendimiento por hectárea en toneladas.

4.2.4 CONCLUSIONES

Las cepas con color marrón oscuro a negro presentaron una mayor compatibilidad con otras cepas en las pruebas de apareamiento, sin embargo en la producción de huitlacoche y porcentaje de infección presentaron menor patogenicidad.

4.3 CORROBORACIÓN MOLECULAR DE CEPAS AISLADAS DE *U. maydis*

4.3.1 INTRODUCCIÓN

Algunas cepas de *U. maydis* producen una proteína letal que inhiben el crecimiento de otras cepas del mismo hongo que se encuentran cerca. La inhibición es causada por una sustancia que se difunde fuera de las células en el medio circundante. Las cepas que producen esta sustancia inhibidora se llaman cepas P1; las que no lo hacen son cepas P2. Las cepas P2 se pueden dividir en dos tipos, cepas P2S (sensibles al inhibidor) y cepas P2r (no se ve afectada por el inhibidor). Las cepas P1 llevan ambas determinantes, asesina e inmunidad. Estos determinantes se transmiten a cepas sensibles P2 en la formación heterocarión. La inmunidad al inhibidor también se transmite como un carácter citoplasmática (cepas inmunes a P1 llamadas P3) que puede ser heredado por separado de la función inhibidora o asesino (Puhalla, 1968; Day y Anagnostakis, 1973).

También se descubrieron otras dos cepas de *U. maydis* con capacidad inhibitoria, llamadas P4 y P6. Aunque algunas cepas inhiben el crecimiento de células sensibles mientras que otras matan a las células sensibles, a las que se les llama cepas asesinas inhibitorias. Las cepas asesinas P4 y P6 pueden matar a cepas P1 y P3 (donde P3 denota la inmunidad citoplásmicamente determinado y la especificidad del asesino en cuestión) (Puhalla (inédito) citado por Koltin y Day, 1976).

Wood y Bozarth (1973), detectaron partículas similares a virus (VLPs) en cepas P1 y P3. Cepas P2S examinadas también contenían VLPs. Se encontró que en las VLPs contenían ARN de doble cadena (dsRNA). La excreción de la toxina asesina está relacionado con la presencia de ARN de doble cadena (dsRNA) partículas similares a virus (VLPs). Cepas sin VLPs son sensibles, a menos que contengan un gen nuclear para la resistencia.

Al igual que muchos hongos, *U. maydis* tiene virus residentes. Estos virus segmentados de ARN son de doble cadena y no infecciosos (Day y Dodds, 1979; Koltin, 1988). La presencia de algunos dsRNA viral confiere a las células huésped la capacidad de producir toxinas asesinas secretadas.

Teliosporas no germinadas de *U. maydis*, así como esporas germinadas en diversos períodos de 0 a 16 hr, contenía las siguientes especies de ácido ribonucleico (RNA): citoplasmáticos pesados 25S; citoplasmática ligero 18 S; mitocondriales pesados, 23S; y mitocondrial ligeros 16S. También había un ARN que probablemente fue una mezcla de 5S y 4S, indicando la presencia de ARN de transferencia (ARNt). La incubación de las esporas de 2 hrs o más dió como resultado la formación de un ARN que era más pesado que 25S. Un RNA extremadamente ligero podría ser separado de otras especies de ARN en extractos de ARN total mediante el uso de un gel de poliacrilamida 7.5 %. La presencia de ARNt funcional en esporas no germinadas también se demuestra por la capacidad de aislado ARNt para aceptar aminoácidos. Se necesita la adición de 160 µg/ml de estreptomycin a los medios de germinación para detener el crecimiento bacteriano y por lo tanto evitar la inclusión de su ARN en el extracto de hongos (Lin *et al.*, 1971).

Dada la especificidad de huésped de *U. maydis*, es de presumirse que el hongo es un parásito que evolucionó a partir de un antecesor común con otros *Ustilagos spp* hasta adquirir la categoría de especie diferente, al convertirse en un patógeno específico del teozintle y el maíz. Esta hipótesis ha sido recientemente confirmada al analizar la variabilidad del virus de *U. maydis* (UMV-H1) en muestras de huillacoche obtenidas de diferentes localidades de México, Estados Unidos y Sudamérica. Los resultados demostraron que el virus acompañó al patógeno durante la introducción del maíz proveniente de nuestro país en Norte y Sudamérica, fenómeno que ocurrió en varias ocasiones durante el periodo pre-hispánico (Ruiz, 2008).

El aislamiento y las propiedades del virus específico de doble cadena dsRNA a partir del tejido infectado con ARN de virus ya han sido documentados. El análisis a menudo implica un procedimiento de aislamiento largo y se han obtenido pequeñas cantidades de dsRNA. Esto se ha analizado mediante geles de electroforesis y purificación (Morris y Dodds, 1979)

4.3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron cuatro procedimientos diferentes para la identificación de cepas contaminadas con ARN de virus:

4.3.2.1 Protocolo de Extracción de ADN+ARN usando el kit Wizard® Magnetic DNA

Se preparó un cultivo fresco de basidiosporas (esporidias) del hongo. Se tomó con un palillo estéril una muestra del cultivo en PDA, y se sembró en 10 mL de caldo papa-dextrosa (PDB) estéril en matraz Erlenmeyer de 250 mL. Se incubó con agitación orbital a 27 °C durante 12 hrs. Se concentraron las células por medio de centrifugación (13,000 x g por 10 min). Se eliminó el sobrenadante y se le colocó 1.5 mL de agua destilada estéril. Se realizó una vez más el paso anterior antes de trabajar con el kit.

Se pesaron 200 mg de muestra y se colocó en un tubo Eppendorf de 2 mL. Se le agregó 500 µL de buffer de lisis A al tubo inclinado que contiene la muestra. Se tapó el tubo y se mezcló vigorosamente en vortex. Se añadió 250 µL de buffer de lisis B y se agitó de 10-15 s en el vortex. Se recostó el tubo y se dejó reposar. Se incubó por 10 min a temperatura ambiente (22-25 °C). Se agregó 750 µL de solución de precipitado. Se agitó vigorosamente en vortex hasta que la muestra se volvió color verde. Se centrifugó por 10 min a alta velocidad (13,000 x g). Se transfirió el sobrenadante a un tubo de 2 mL con cuidado de pipetear por debajo del material flotando en caso de presentar. Se mezcló con cuidado el MagneSil®PMPs por 15-30 s, para asegurar que las partículas estén resuspendidas. Se le añadió 50 µL del sobrenadante de MagneSil®PMPs.

Se mezcló con cuidado. Se registró el volumen del líquido del tubo. Se añadió un volumen de 0.8 de isopropanol. Se invirtió el tubo de 10-15 veces para mezclarlo. Se incubó por 5 min a temperatura ambiente, agitando ocasionalmente lavando las paredes internas del tubo así como las partículas. Se insertó el tubo en un soporte de separación magnética MagneSphere® por un minuto. Con el tubo en el soporte se descartó la fase líquida por pipeteo. Se removió el tubo del soporte y se agregó 250 µL de buffer de lisis B. Se invirtió el tubo de 2-3 para mezclar.

Se colocó el tubo en el soporte de separación magnética MagneSphere® por un minuto. Con el tubo en el soporte descartar la fase líquida por pipeteo. Se resuspendieron las partículas en 1 mL de Etanol 70 % y se regresó al soporte de separación magnética por un minuto. Se removió y se descartó la solución por medio de pipeteo. Se repitió el paso anterior dos veces para un total de tres lavados. Se removió la mayor cantidad de fase líquida posible en el último lavado. Se secó la muestra a temperatura ambiente por aprox. 20 min a 65 °C. Se añadió 100 µL de agua libre de nucleasa. Se mezcló en vortex y se incubó por 5 min a 65 °C. Se colocó el tubo en el separador magnético por un minuto. Se colectó el DNA dejando el tubo en el separador y cuidadosamente se transfirió el líquido a un tubo nuevo. Si el volumen final era menor a 100 µL se aforó a 100 µL con agua inyectable. El ADN se congeló a -15 °C hasta su lectura en gel.

4.3.2.2 Prueba de inhibición para determinar cepas con ARN de virus (Puhalla, 1968)

Se utilizó agar completo (anexo D) con 2 % de glutamato de sodio. Las pruebas para la inhibición del crecimiento de las cepas se realizaron como sigue; se colocó con un palillo una pequeña muestra y se depositó en el matraz de 50 mL con 5 mL de medio PDB y se colocó en agitación por 8 hrs. Se colocó una cepa A para confrontar cuatro cepas B. Se incubaron por 27 °C por un día y se anotó la pareja inhibitoria (Figura 11).

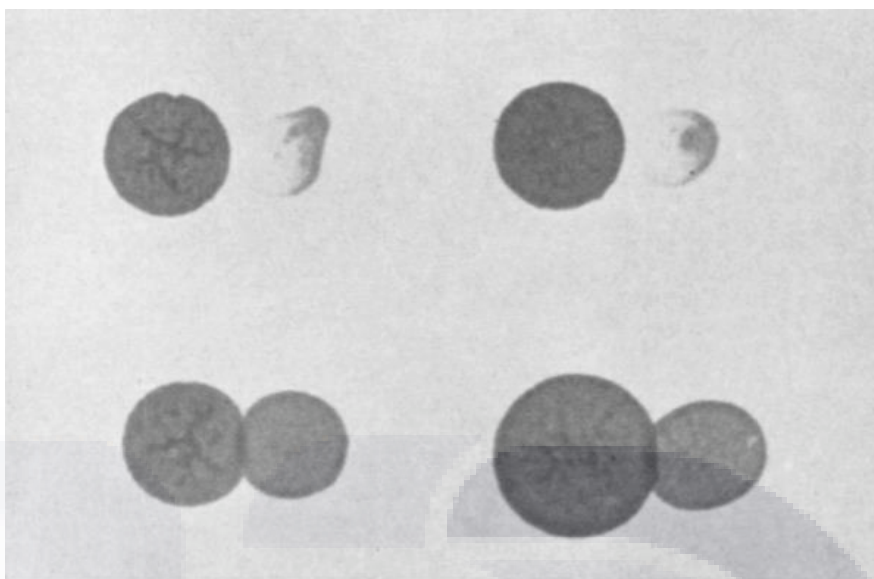


Figura 11. Prueba de inhibición para la determinación de ARN viral en cepas de *U. maydis*. Cepas superior izquierda y derecha prueba positiva para cepa con ARN de virus (cepa oscura) y cepa sensible (cepa blanca). Cepas inferior derecha e izquierda compatibles.

4.3.2.3 Prueba de inhibición para determinar cepas con ARN de virus (Koltin & Day, 1976)

Se utilizó agar completo (anexo D) con 2 % de glutamato de sodio. Las pruebas para la inhibición y formación del halo inhibitorio se realizaron de la siguiente manera: se colocó con un palillo una pequeña muestra y se depositó en el matraz de 50 mL con 5 mL de medio PDB y se colocó en agitación por 8 hrs. Se tomaron 2 mL del matraz y se colocaron en 8 mL de medio completo a 40 °C antes de solidificarse. Se vertió en una caja de Petri y se esperó a que solidificara completamente. Una vez solidificado el medio se colocó una gota de cada una de las cepas encima de la cepa césped o tapete. Se esperó a que secan completamente. Se incubaron a 27 °C o temperatura ambiente de 24-48 hrs. Se anotaron las cepas que presentaron el halo de inhibición como se muestra en la figura 12.

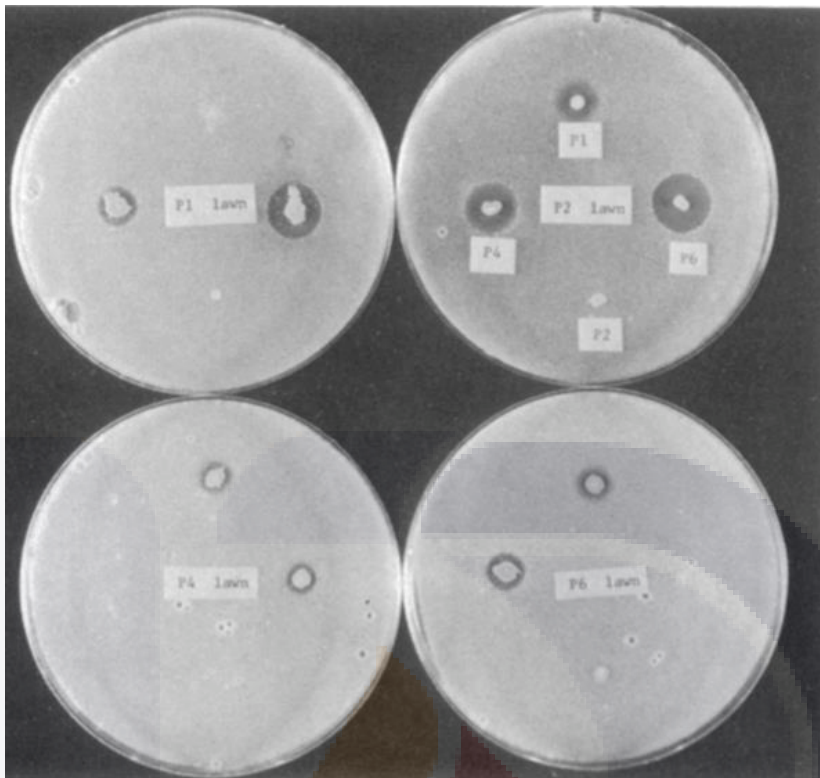


Figura 12. Pruebas de inhibición con la presencia de un halo inhibitorio entre la cepa césped sensible y la cepa contaminada con ARN de virus.

4.3.2.4 Protocolo de Extracción de ADN+ARN de *Ustilago maydis* (Guevara, 1999)

Se preparó un cultivo fresco de basidiosporas (esporidias) del hongo. Se tomó con un palillo estéril una muestra del cultivo en PDA, y se sembró en 125 mL de caldo papa-dextrosa (PDB) estéril en matraz Erlenmeyer de 500 mL. Se incubó con agitación orbital a 27 °C durante aprox. 10-24 hrs, hasta que el cultivo alcanzara una absorbancia de ~0.8 a 600 nm. Se utilizó PDB para calibrar el espectrofotómetro a cero de absorbancia. Con esto se obtuvo células jóvenes que se encuentran al final de la fase exponencial de la curva de crecimiento. El cultivo se centrifugó en botes de centrifuga estériles a 6 °C, a 5,000 x g por 15 min, se eliminó el sobrenadante (medio de cultivo gastado). Se lavó una vez con 125 mL buffer de lavado (anexo E), centrifugando como en el paso anterior, se eliminó el lavado. La pastilla resultante se traspasó a tubos falcon de 15 mL y se le colocó nuevamente 11 mL de buffer de lavado. Se centrifugaron a 1,950 g en centrifuga y se eliminó el sobrenadante.

La pastilla se congelo $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por dos días. Se liofilizaron las células hasta sequedad. Ya secas, se pesaron las células en balanza analítica y se guardaron a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se registró los pesos de las células secas. Por cada gramo de células secas, se colocaron 10 mL de buffer de lisis (anexo E) en un tubo de centrífuga estéril y se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por aprox. 20 min. Se enfriaron las células secas en N_2 líquido. Se colocó un poco de N_2 líquido en un mortero y se molieron rápidamente las células con la precaución de no derramar nada. Se transfirió con cuidado el polvo de células molidas a un tubo de centrifuga de 30 mL estéril y se le añadió rápidamente el buffer de lisis previamente incubado al polvo de células molidas. Se tapó el tubo y se agitó suavemente por inversión. Se incubó de $45\text{-}50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 h con agitación ocasional.

Se centrifugó a $5,000\text{ x g}$ por 10 min a $6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de centrífuga de 30 mL estéril. Se eliminó el precipitado. Se añadió al sobrenadante un volumen de fenol saturado con Tris-HCl pH 8.0. Se tapó el tubo y se agitó suavemente por inversión. Se dejó reposar por 2 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 8-10 krpm por 5 min a $6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se recuperó el sobrenadante y se eliminó el precipitado. Se añadió al sobrenadante 1 volumen de mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1v/v). Se agitó suavemente por inversión y se dejó reposar por 2 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 8-10 krpm por 5 min a $6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se recuperó el sobrenadante y se eliminó el precipitado. Se repitió los tres pasos anteriores. Al sobrenadante se le añadió 1 volumen de isopropanol frío ($-15\text{ }^{\circ}\text{C}$) o 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Se agitó suavemente por inversión. Se dejó reposar 2 horas en baño de hielo.

Se centrifugó a 10 krpm por 15 min a $6\text{ }^{\circ}\text{C}$. El precipitado es DNA+ARN; se descartó el sobrenadante. Se secó perfectamente la pastilla de DNA+ARN a temperatura ambiente (en campana de flujo laminar) con el tubo invertido en ángulo de 45 ° . Una vez que la pastilla o el tubo no tenga olor a alcohol, se disolvió la pastilla de DNA+RNA seco en 100 μL de buffer TE pH 8.0 (anexo E),

agitando muy suavemente y se guardó en congelación a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su lectura en el gel.

En el gel se deben observar bandas distintivas de RNA de virus como se muestra en la figura 13. Se utilizó el marcador molecular de 1kb DNA ladder del laboratorio de Promega.

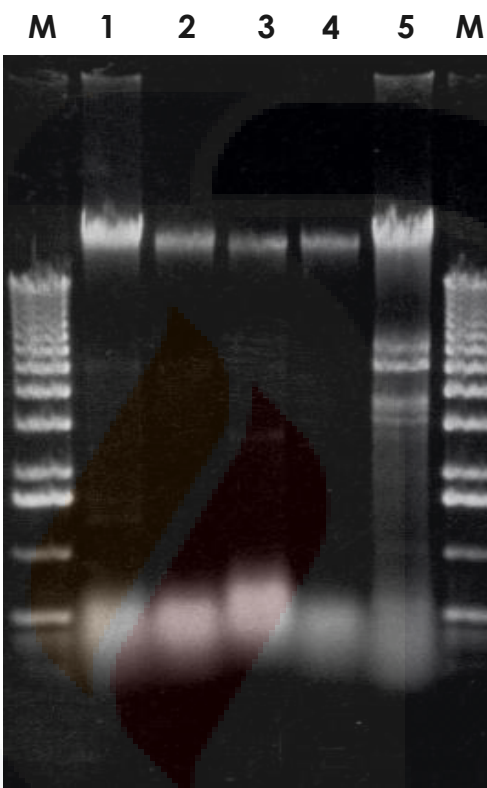


Figura 13. Cepa con bandas de ARN viral en *U. maydis*. Carril 5 cepa con presencia de RNA de virus.

4.3.3 RESULTADOS Y DISCUSIONES

Las 27 cepas que se obtuvieron fueron sometidas a los cuatro diferentes Protocolo de Extracción de ADN+ARN para la determinación de presencia de ARN viral, obteniendo los siguientes resultados:

En el protocolo de Extracción de ADN+ARN de kit Wizard® Magnetic DNA se lograron observar en un gel de electroforesis dos bandas muy pequeñas al

inicio de los carriles, sin embargo es solo una pequeña cantidad de ADN y con muy poca calidad para poder ser observada con facilidad (anexo F - Fig. 1).

En la prueba de inhibición para determinar cepas con ARN de virus de Puhalla (1968), ninguna de las pruebas dio positivo, ya que todas las cepas crecieron sin ningún problema una a lado de la otra, sin observarse el fenómeno (anexo F-Fig. 2).

En la prueba de inhibición para determinar cepas con ARN de virus de Koltin y Day (1976), ninguna de las pruebas dio positivo, ya que todas las cepas crecieron sin ningún problema una encima de la otra, sin observarse el fenómeno donde aparece un halo alrededor de las cepas *killer* (anexo F-Fig.3).

Las cepas 1B, 3B, 13B y 16B utilizadas en el Capítulo III para la evaluación de la producción de huitlacoche, se sometieron a la determinación de presencia de ARN de virus mediante el protocolo extracción de ADN+ARN de *U. maydis* (Guevara, 1999). El marcador molecular que se utilizó tiene un rango de 250 - 10,000 bp, los tamaños de los fragmentos son 250, 253, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp. En la figura 14 se pueden observar dos bandas en las cepas 1B y 13B estas bandas tienen un peso molecular muy alto con relación al marcador que se utilizó. El peso de estas bandas podría corresponder entre 5000 a 8000 bp, las cuales son más grandes en comparación con las obtenidas en la figura 13 en el carril 5 donde también se observan unas bandas pero con un peso molecular más pequeño (Guevara, 1999).

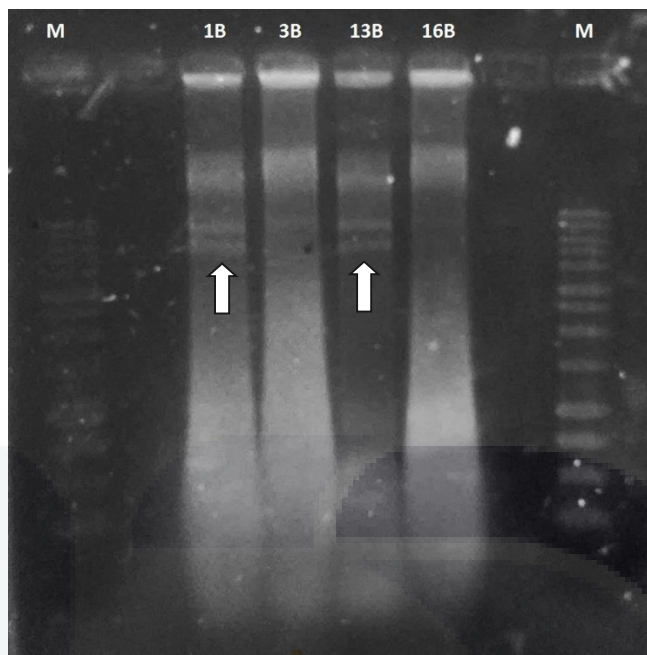


Figura 14. Extracción de ADN en gel de agarosa al 0.8 %. Cepas de *Ustilago maydis* 1B, 3B, 13B y 16B utilizadas en la evaluación de producción de huillacoche en invernadero (Capítulo III). Flechas indican posibles bandas de RNA de virus. M= marcador molecular.

Sin embargo se ha encontrado en el genoma del *U. maydis* que se compone de tres grupos de tamaños diferentes de ARN de doble cadena (dsRNA) segmentos: H (pesado), M (medio), y L (ligero). Los segmentos de H se han sugerido para codificar todas las proteínas virales esenciales, pero sin evidencias moleculares (Jeong-Gu *et al.*, 2001).

Por otro lado una electroforesis de ARN de doble cadena de *U. maydis* de la cepa P4 a 5-10 °C dio lugar a la resolución arrugada entre los segmentos, se ha encontrado que un segmento de ARN de doble cadena, que anteriormente se consideraban homogéneas, realmente contiene dos segmentos de ARN de doble cadena, que migra conjuntamente en el gel a temperatura ambiente. Una de estas bandas contiene el gen de una toxina codificada por el virus y la otra contiene un marco de lectura abierto para un producto de gen desconocido. Los segmentos que se pueden encontrar son para los pesados H1, H2a, H2b, H3 y H4; para los medios son M2a, M2b y M3 y para los ligeros L1 y L2. Estos segmentos a diferentes concentraciones de gel

de agarosa y poliacrilamida, temperaturas, pueden migrar en diferentes posiciones a lo largo del gel (Khimani et al, 1995).

El método de extracción que se utilizó en la figura 13 y en la figura 14 se realizaron de igual manera con una electroforesis, sin embargo al momento de correr el gel en la cámara no se realizó a la misma concentración de agarosa, ni se utilizó el mismo voltaje y tampoco se registró la temperatura, pudiendo afectar posiblemente la ubicación de las bandas en el gel de las dos figuras, además que el tipo de cepa es diferente y no se tiene el conocimiento si pudiese pertenecer a los diferentes tipos de cepas con característica *killer*.

4.3.4 CONCLUSIONES

Los protocolos de Extracción de ADN+ARN con el kit Wizard® Magnetic DNA, la prueba de inhibición para determinar cepas con ARN de virus de Puhalla (1968), y la prueba de inhibición para determinar cepas con ARN de virus de Koltin y Day (1976); no son una opción para realizar extracción de ADN para *U. maydis*.

En el protocolo de Guevara (1999), posiblemente se pudo afectar la ubicación de las bandas por las diferentes parámetros que se manejaron al realizar la electroforesis, así como también la falta de tiempo para examinar más muestras y poder determinar si existe diferencia entre cada una de ellas y a qué tipo de cepa *killer* pertenecen.

4.3.5 BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. (2006). Fitopatología. 2ª ed. Ed. LIMUSA. México, D.F.
- 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, St. Paul. 41 p.
- Day, P. R. y Anagnostakis, S. L. (1973). The killer system in *Ustilago maydis*: heterokaryon transfer and loss of determinants. *Phytopathology* 63:1017-1018.
- Day, P. R. y Dodds, J. A. (1979). Viruses of plant pathogenic fungi. In "Viruses and plasmids of fungi" (P.A. Lemke, ed.), Maecel Dekker, New York. 210-238pp.
- De la Garza, G. J. L. (1974). Curso de Fitopatología. UANL. México. 1 Q2p. p.
- Guevara, L. F. (1999). Relación del ácido Indol-3-ácetico con la capacidad de *Ustilago maydis* (Huitlacoche) de inducir tumores en maíz. Tesis de Doctorado en Ciencias de los Alimentos. Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República (PROPAC), Facultad de Química, Santiago de Querétaro, Qro.
- Guevara-Vázquez, E.; Valadez-Moctezuma, E.; Acosta-Ramos, M.; Espinosa-Solares, T. y Villanueva-Verduzco, C. (2009). Identificación de levaduras asociadas al huitlacoche. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* Vol 15(3): 225-230.
- Jeong-Gu Kang; Jae-Chang Wu; Jeremy A. Bruenn y Chung-Mo Park (2001). The H1 double-stranded RNA genome of *Ustilago maydis virus-H1* encodes a polyprotein that contains structural motifs for capsid polypeptide, papain-like protease, and RNA-dependent RNA polymerase. *Virus Research* 76:183-189.
- Khimani, H. A.; Flurkey, H. W.; Bozarth, F. R. (1995). Enhanced resolution of viral double-stranded RNA segments by electrophoresis at low temperatures. *Analytical biochemistry* 229, 352-354.
- Koltin Y. y Day P. R. (1976). Inheritance of killer phenotypes and double-stranded RNA in *Ustilago maydis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (73)2:594-598.

- Koltin, Y. (1988) The killer system of *Ustilago maydis*: secreted polypeptides encoded by viruses, in Viruses of Fungi and Simple Eukaryotes. Koltin, Y., and Leibowitz. M. (eds). New York; Marcel Dekker. pp. 209-243.
- Lin, F. K.; Davies, F. L.; Tripathi, R. K.; Raghu, K. & Gottlieb, D. (1971). Ribonucleic acids in spore germination of *Ustilago maydis*. *Phytopathology* 61: 645-648.
- Morris T. J. y J. A. Dodds. (1979). Isolation and Analysis of Double-Stranded RNA from Virus-Infected Plant and Fungal Tissue. *Phytopathology* 69(8):854-858.
- Puhalla, J. E. (1968). Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*. *Genetics* 60: 461-474.
- Ruiz, H. J. (2008). *Ustilago maydis*: ascenso de un hongo mexicano de la gastronomía local al mundo científico. *Nova Scientia* 1(1): 118-135.
- Wood, H. A. y Bozarth R. F. (1973). Heterokaryon transfer of virus-like-particles associated with a cytoplasmically inherited determinant in *Ustilago maydis*. *Phytopathology* 63: 1019- 1021.

CONCLUSIÓN GENERAL

Las semillas híbridas y criollas obtuvieron diferentes resultados en la producción natural ya que la susceptibilidad de las semillas y la patogenicidad del hongo *Ustilago maydis* están estrechamente relacionados para obtener una infección masiva en el cultivo del maíz.

Las condiciones ambientales presentes en todos los cultivos difieren en la producción natural de huitlacoche obtenida para cada uno de estos, esto se debe a las diferentes semillas utilizadas en cada uno y el cuidado que se le dio a todos los cultivos siempre va a diferir de una región a otra.

Las variedades híbridas presentaron en la producción artificial mayor susceptibilidad con las tres cruces evaluadas a comparación de las variedades criollas.

Las cepas con color marrón oscuro a negro presentaron una mayor compatibilidad con otras cepas en las pruebas de apareamiento, sin embargo en la producción de huitlacoche y porcentaje de infección presentaron menor patogenicidad.

En el protocolo de Guevara (1999), posiblemente se pudo afectar la ubicación de las bandas por las diferentes parámetros que se manejaron al realizar la electroforesis, así como también la falta de tiempo para examinar más muestras y poder determinar si existe diferencia entre cada una de ellas y a qué tipo de cepa *killer* pertenecen.

ANEXO A

Esquema del acomodo de los tratamientos dentro del invernadero

1 (t4r1)	37 (t6r1)	73 (t7r1)	109 (t10r2)	145 (t15r2)	181 (t3r2)	217 (t24r3)	253 (t12r2)	289 (t8r3)	325 (t2r3)
2	38	74	110	146	182	218	254	290	326
3	39	75	111	147	183	219	255	291	327
4	40	76	112	148	184	220	256	292	328
5	41	77	113	149	185	221	257	293	329
6 (t14r1)	42 (t16r1)	78 (t5r1)	114 (t18r2)	150 (t1r2)	186 (t20r2)	222 (t4r3)	258 (t7r3)	294 (t23r3)	330 (t11r3)
7	43	79	115	151	187	223	259	295	331
8	44	80	116	152	188	224	260	296	332
9	45	81	117	153	189	225	261	297	333
10	46	82	118	154	190	226	262	298	334
11 (t3r1)	47 (t21r1)	83 (t20r1)	119 (t17r2)	155 (t9r2)	191 (t23r2)	227 (t22r2)	263 (t13r3)	299 (t16r3)	335 (t5r3)
12	48	84	120	156	192	228	264	300	336
13	49	85	121	157	193	229	265	301	337
14	50	86	122	158	194	230	266	302	338
15	51	87	123	159	195	231	267	303	339
16 (t19r1)	52 (t12r1)	88 (t11r1)	124 (t14r2)	160 (t21r2)	196 (t8r2)	232 (t15r3)	268 (t18r3)	304 (t1r3)	340 (t14r3)
17	53	89	125	161	197	233	269	305	341
18	54	90	126	162	198	234	270	306	342
19	55	91	127	163	199	235	271	307	343
20	56	92	128	164	200	236	272	308	344
21 (t13r1)	57 (t10r1)	93 (t2r1)	129 (t22r1)	165 (t13r2)	201 (t24r1)	237 (t6r3)	273 (t17r3)	309 (t19r3)	345 (t9r3)
22	58	94	130	166	202	238	274	310	346
23	59	95	131	167	203	239	275	311	347
24	60	96	132	168	204	240	276	312	348
25	61	97	133	169	205	241	277	313	349
26 (t1r1)	62 (t17r1)	98 (t23r1)	134 (t15r1)	170 (t7r2)	206 (t19r2)	242 (t11r2)	278 (t20r3)	314 (t12r3)	350 (t21r3)
27	63	99	135	171	207	243	279	315	351
28	64	100	136	172	208	244	280	316	352
29	65	101	137	173	209	245	281	317	353
30	66	102	138	174	210	246	282	318	354
31 (t9r1)	67 (t8r1)	103 (t4r2)	139 (t6r2)	175 (t16r2)	211 (t5r2)	247 (t10r3)	283 (t2r2)	319 (t22r3)	355 (t3r3)
32	68	104	140	175	212	248	284	320	356
33	69	105	141	177	213	249	285	321	357
34	70	106	142	178	214	250	286	322	358
35	71	107	143	179	215	251	287	323	359
36 (t18r3)	72	108	144	180	216 (t24r2)	252	288	324	360

PUERTA



Plantas de maíz sobre macetas dentro del invernadero.



ANEXO B



Figura 1. Método de inoculación artificial realizado dentro del invernadero. A: Jeringa utilizada para la inyección del inoculo. B: Inyección del inoculo en el canal de los estilos en plantas de maíz. C: Bolsas de papel cubriendo las espigas para evitar la polinización.

ANEXO C

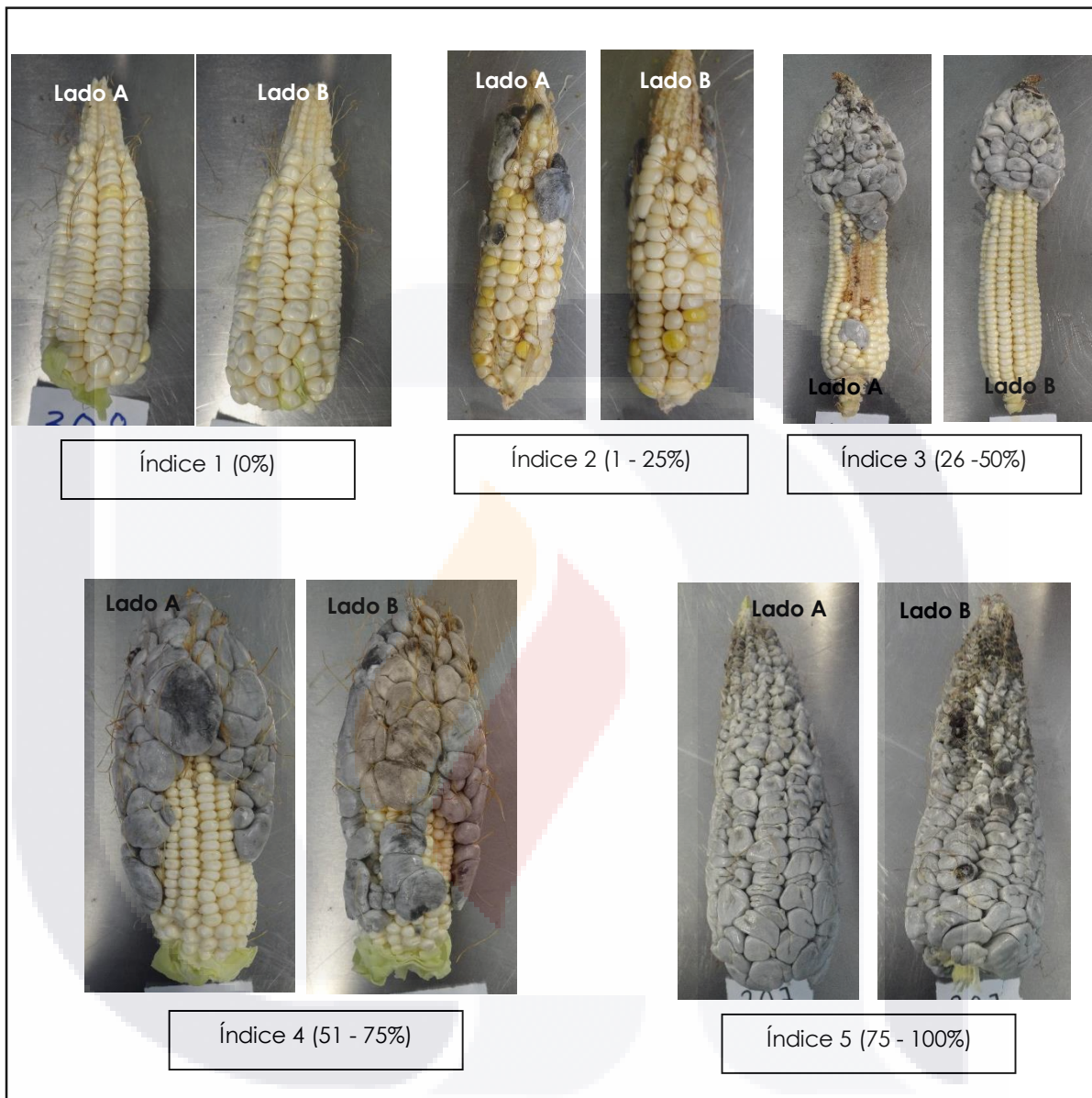


Figura 2. Índice de severidad manejado en todos los tratamientos.

ANEXO D

MEDIO DE CULTIVO (Puhalla, 1968)

Medio completo

- Glucosa 10 g
- Caseína hidrolizada 10 ml (2g directos para 1 litro de medio completo)
 - 200g de caseína hidrolizada en 1 litro de agua purificada
- Extracto de levadura 'Difco' 1 g
- Solución de sal 250 ml
 - 24g Nitrato de amonio (NH_4NO_3).
 - 16g Fosfato de potasio dibasico (KH_2PO_4).
 - 4g sulfato de sodio (Na_2SO_4)
 - 8g Cloruro de potasio (KCl)
 - 2g Sulfato de magnesio penta hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
 - 1g Cloruro de sodio (CaCl_2)
 - Aforar a 2 litros con agua purificada
 - 8ml Solución de elementos trasa
 - 30mg Ácido bórico (H_3BO_3)
 - 70mg Cloruro de manganeso (MnCl_2)
 - 200mg Cloruro de zinc (ZnCl_2)
 - 20mg Molibdato de sodio (NaMoO_4)
 - 50mg Cloruro férrico (FeCl_3)
 - 200mg Sulfato cúprico (CuSO_4)
 - Aforar a 500ml con agua purificada
 - Aforar a 2 litros con agua purificada
- Agua destilada hasta 1 litro.
- Agar 2% (12g en 1 litro).
- pH 7.0 (antes de esterilizar).

En todos los medios sólidos contienen 2% de agar. Medio completo fuerza doble es un medio completo en el que se han duplicado todos los

ingredientes excepto el agar y agua destilada. Los suplementos se añadieron al medio mínimo antes de la esterilización durante 10 min en una autoclave a presión de 15 libras. Todos los medios se ajustaron a pH 7,0 antes de la esterilización en autoclave.



ANEXO E**REACTIVOS****Preparar 100 mL de Tris-HCl 2 M pH 8.0**

Pesar 24.22 g de Tris-(hidroximetil)-aminometano base libre (Trizma™ Base, Sigma No. Cat. T1503). Disolver en aprox. 60 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 8.0 usando HCl 6 M (o concentración similar). Aforar a 100 mL con agua destilada. Colocar en un frasco con tapa de rosca y esterilizar en autoclave a 121 °C (15 psi) por 20 min. Dejar enfriar y almacenar a temperatura ambiente.

Preparar 100 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0

Pesar 18.612 g de sal disódica dihidrato del ácido etilendiaminotetraacético (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate 99+%, EDTA Molecular Biology Tested, Sigma No. Cat. E5134). Disolver en aprox. 60 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 8.0 usando NaOH 2M (o concentración similar). Aforar a 100 mL con agua destilada. Colocar en un frasco con tapa de rosca y esterilizar en autoclave a 121 °C (15 psi) por 20 min. Dejar enfriar y almacenar a temperatura ambiente.

Preparar 100 mL de NaCl 5M

Pesar 29.22 g de cloruro de sodio (Sodium chloride, ACS reagent, >=99.0%, Sigma No. Cat. S9888). Disolver en aprox. 80 mL de agua destilada y aforar a 100 mL. Colocar en un frasco con tapa de rosca y esterilizar en autoclave a 121 °C (15 psi) por 20 min. Dejar enfriar y almacenar a temperatura ambiente.

Sarkosyl™: N-Lauroylsarcosine, sodium salt, for molecular biology, 94%, Sigma No. Cat. L9150.

Proteinase K™: From *Tritirachium album*. Sigma-Aldrich No. Cat. P2308.

Agua destilada estéril: Esterilice agua destilada en autoclave a 121 °C (15 psi) por 20 min. Dejar enfriar y almacenar a temperatura ambiente.

Buffer de lavado				
Componente	Use estos volúmenes de componente para preparar y obtener estos volúmenes de buffer de lavado			
	100 mL	500 mL	1 L	Concentración final del componente
Tris-HCl 2 M pH 8.0	0.5 mL	2.5 mL	5 mL	10 mM
EDTA 0.5 M pH 8.0	0.2 mL	1 mL	2 mL	1 mM
NaCl 5 M	1 mL	5 mL	10 mL	50 mM
Agua destilada estéril	Aforar a 100 mL	Aforar a 500 mL	Aforar a 1 L	

Buffer de lisis				
Componente	Use estos volúmenes de componente para preparar y obtener estos volúmenes de buffer de lavado			
	100 mL	500 mL	1 L	Concentración final del componente
Tris-HCl 2 M pH 8.0	1 mL	5 mL	10 mL	0.2 M
EDTA 0.5 M pH 8.0	2 mL	10 mL	20 mL	0.1 M
Sarkosyl™ (añadir en polvo)	0.1 g	0.5 g	1 g	1%(p/v)
Proteinase K™ (añadir al momento de usar)	1 mg	5 mg	10 mg	100 µg/mL
Agua destilada estéril	Aforar a 10 mL	Aforar a 50 mL	Aforar a 100 mL	

Preparar 100 mL de Buffer Tris-EDTA (TE) pH 8.0, 1.0x

Se disuelven 5 mL de Tris-HCl 2M pH 8.0 y 2 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0 en aprox. 80 mL de agua destilada en un vaso de precipitados de 100 mL. Ajuste el pH a 8.0 con HCl o NaOH diluido. Se transfieren cuantitativamente a un matraz de aforación de 100 mL y afore a 100 mL con agua destilada. Coloque en

frasco con tapa de rosca y esterilice en autoclave a 121 °C (15 psi) por 20 min. Se deja enfriar y se almacena a temperatura ambiente. Antes de usar para disolver DNA o RNA, diluya 1:10 con agua destilada estéril para obtener el buffer TE 1x.

Mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v):

Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (25:24:1, v/v/v), Sigma No. Cat. 2060.



ANEXO F

Resultados negativos de las pruebas realizadas para la extracción de RNA viral en cepas de *U. maydis*.



Figura 1. Protocolo de Extracción de ADN+ARN usando el kit Wizard® Magnetic DNA. Fechas: se observan dos bandas pequeñas de ADN.

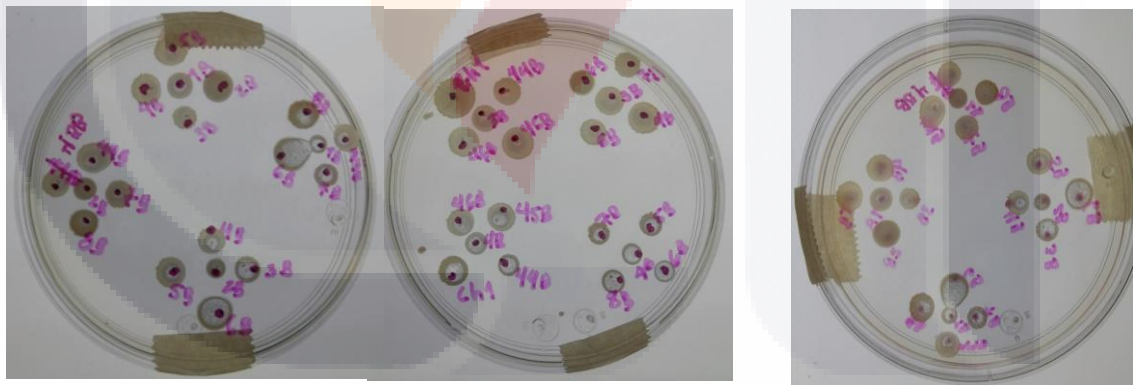


Figura 2. Prueba de inhibición negativas para determinar cepas con ARN de virus (Puhalla, 1968).

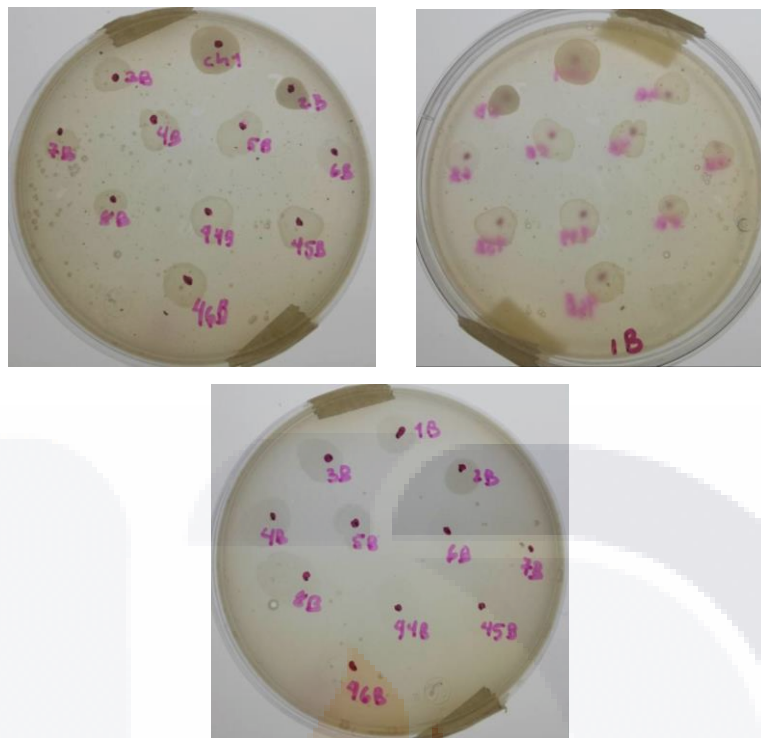


Figura 3. Prueba de inhibición para determinar cepas con ARN de virus (Koffin & Day, 1976).

Sólo se colocaron algunas fotografías representativas.

ANEXO G

**ARTICULO ACEPTADO EN LA REVISTA MEXICANA DE CIENCIAS AGRICOLAS
VOL. 7 NÚM 5, DEL 30 DE JUNIO – 13 DE AGOSTO DE 2016**

**PRODUCCIÓN NATURAL DE HUITLACOICHE [*Ustilago maydis* (DC) Corda] EN
EL ESTADO DE AGUASCALIENTES.**

**NATURAL PRODUCTION OF CORN SMUT [*Ustilago maydis* (DC) Corda] IN THE
STATE OF AGUASCALIENTES.**

Dulce J. Aguayo-González¹; Marcelo Acosta-Ramos²; Laura E. Pérez-Cabrera³; Fidel Guevara-Lara⁴; Alberto M. García-Munguía⁵.

¹Centro de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad N. 940 C.P. 20131, Aguascalientes, Aguascalientes. México.

²Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México. C. P. 56230.

³Departamento de Tecnología de Alimentos, Centro de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México. C. P. 20900.

⁴Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad 940, Ciudad Universitaria, Aguascalientes, Aguascalientes, México. C. P. 20131.

⁵Departamento de Parasitología, Centro de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México. C. P. 20900. Correo-e: almagamu@hotmail.com
Tel.: +52(449) 910 74 00 (Autor de correspondencia).

**PRODUCCIÓN NATURAL DE HUITLACOQUE [*Ustilago maydis* (DC) Corda] EN
EL ESTADO DE AGUASCALIENTES**

RESUMEN

El huitlacoche posee características nutrimentales como altos niveles de fibra dietaria, proteínas, aminoácidos, oligosacáridos, ácidos grasos esenciales, vitaminas, minerales y compuestos fenólicos, lo que hace que pueda aportar un beneficio importante a la nutrición. Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la producción natural del huitlacoche en el Estado de Aguascalientes, México. Se evaluaron siete municipios donde los muestreos se realizaron completamente al azar por conveniencia con una superficie de 500 m² por hectárea para cada tratamiento, los datos se obtuvieron cuando el elote estaba a punto de ser cosechado y el hongo alcanzó el desarrollo de las agallas para los muestreos denominados tratamientos. Las variables evaluadas fueron: índice de severidad (IS), porcentaje de incidencia (PI), gramos de huitlacoche por mazorca infectada (GMI) y rendimiento por hectárea (RH). Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza, prueba de Tukey ($p = 0.05$) y correlación lineal de Pearson. El tratamiento 3 (semilla criolla amarilla de temporal) en la localidad del Ejido de Peñuelas en el Municipio de Aguascalientes, fue el mejor y significativamente diferente a todos los demás tratamientos, ya que obtuvo el mayor rendimiento por hectárea (90.554 kg ha⁻¹) y presentó un mayor índice de severidad por mazorcas infectadas (18.67 %). Las semillas criollas presentaron mayor producción de huitlacoche.

PALABRAS CLAVE

Severidad, incidencia, temporal, riego, carbón común del maíz.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

NATURAL PRODUCTION OF CORN SMUT [*Ustilago maydis* (DC) Corda] IN THE STATE OF AGUASCALIENTES.

ABSTRAC

Huitlacoche has nutritional characteristics as high levels of dietary fiber, protein, amino acids, oligosaccharides, essential fatty acids, vitamins, minerals and phenolic compounds, which means they can provide an important nutritional benefit. This research aimed to evaluate the natural production of corn smut in the State of Aguascalientes, Mexico. Were evaluated seven municipalities where the samples are completely made randomly by convenience with an area of 500 m² per hectare for each treatment, data were obtained when the corn was about to be harvested and the fungus reached the development of the galls for the samplings called treatments. The variables evaluated were: severity index (IS), percentage of incidence (PI), grams per infected ear of corn smut (GMI) and yield per hectare (RH). The results were analyzed by analysis of variance, Tukey test ($p = 0.05$) and Pearson linear correlation. Treatment 3 (yellow native seed temporary) in of Ejido Peñuelas in the Municipality of Aguascalientes was the best and significantly different from all other treatments, since I obtained the highest yield per hectare (90 554 kg ha⁻¹) and he presented a greater severity index infected ears (18.67%). Native seeds showed higher production of corn smut.

KEY WORDS

Severity, incidence, time, irrigation, common corn smut.

INTRODUCCIÓN

Huitlacoche es el nombre que se le da a las agallas o tumores que se forman en plantas de maíz (*Zea mays* ssp. *mays*) y teozintle (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) por la acción del hongo *Ustilago maydis*. La producción de este hongo no es planificada para el cultivo, se produce por

infecciones naturales y al azar, ya que es considerado un patógeno y puede llegar a ser una enfermedad devastadora para el cultivo de maíz dulce. La infección natural algunas veces no es muy confiable, ya que la aparición del hongo en el maíz depende de las condiciones ambientales que conducen a la infección por el carbón y a la asociación entre la etapa en el desarrollo del hospedante durante el período de infección y el tejido de la planta en el cual se forman las agallas (Pataky, 1991). El huitlacoche aparece en casi todas las regiones productoras de maíz; las condiciones climáticas favorables para su desarrollo son muy variadas: la producción natural de este hongo puede aumentar en ambientes húmedos (humedad relativa de 72 a 80 %) y templados (17 a 20 °C) (Villanueva, C. V, Cruz, Molina, D., J. D., Castillo, F. & Zavaleta, E., 1999; Martínez-Martínez *et al.*, 2005), y es más frecuente en áreas cálidas (26 a 34 °C) y moderadamente secas (Agrios, 2006).

Existen diversos factores que favorecen el desarrollo del hongo *U. maydis*, como la temperatura, la humedad relativa y el material genético. La gran mayoría de las variedades de maíz presentan algún grado de resistencia al ataque del hongo, siendo las variedades de maíz dulce las más susceptibles a esta enfermedad (Pataky, J. K., Nankam, C., Kerns, M. R, 1995). El huitlacoche es un alimento con características nutrimentales esenciales para el ser humano. Se ha encontrado que los altos niveles de fibra dietaria y oligosacáridos sugieren que el huitlacoche puede aportar un beneficio importante a la salud, ya que dichos componentes han demostrado estar directamente involucrados en disminuir el riesgo de contraer cáncer de colon. Asimismo, las concentraciones elevadas de compuestos fenólicos de este hongo proporcionan una alta actividad antioxidante; dichos componentes bioactivos están relacionados con la disminución de la incidencia de enfermedades crónicas degenerativas (Pataky, 1991; Beas *et al.*, 2011; Méndez-Morán y Ruiz-Herrera, 2008).

La evaluación de genotipos de maíz para fines de producción de huitlacoche permite conocer su nivel de susceptibilidad genética (Pan, J. J, Baumgarten, A. M & May, G., 2008). El Estado de Aguascalientes, México, es un buen productor de maíz y elote durante la temporada primavera-verano-otoño (mazo-noviembre). Sin embargo, no existen datos sobre los materiales genéticos de maíz susceptibles ni sobre la incidencia a la infección por *Ustilago maydis* en la región. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue conocer la producción natural del huitlacoche en el Estado de Aguascalientes en diferentes variedades de maíz, localidades, tipo de riego y épocas de siembra.

MATERIALES Y MÉTODOS

El área de estudio se ubica en el Estado de Aguascalientes, localizado en la parte central de la República Mexicana (101° 53' y 102° 52' O y 22° 27' y 21° 28' N), con una superficie de 5,680.33 km² (568,033 ha) que representa el 0.3% del total del país. La división política consta de once municipios: Aguascalientes, Asientos, Calvillo, Cosío, Jesús María, Pabellón de Arteaga, Rincón de Romos, San José de Gracia, Tepezalá, San Francisco de los Romo y El Llano (Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI], 2008).

El muestreo se realizó en siete municipios del Estado de Aguascalientes: Aguascalientes, Asientos, Jesús María, Rincón de Romos, San José de Gracia, Tepezalá y El Llano, se obtuvieron 13 tratamientos cada uno conformado por un municipio, localidad, periodo de siembra, tipo de cultivo, utilidad de la semilla y tipo de semilla (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tratamientos evaluados en cuanto a producción natural de huitlacoche en municipios del Estado de Aguascalientes.

Tto.	Municipio	Localidad	PS	TC	Utilidad	Semilla
1	Aguascalientes	La Providencia	mayo - agosto	Riego	Silo	Aspros
2	Aguascalientes	La Providencia	mayo - agosto	Riego	Silo	Unices (Ares)
3	Aguascalientes	Ejido Peñuelas	junio - septiembre	Temporal	Forraje seco	Criolla
4	Jesús María	Posta UAA	mayo - agosto	Riego	Forraje seco	Cimarrón
5	Jesús María	Posta UAA	mayo - agosto	Riego	Forraje seco	2366
6	Asientos	Francisco Villa	mayo - agosto	Riego	Grano	Cimarrón
7	Rincón de Romos	El Bajío	mayo - agosto	Riego	Grano	H9105W
8	Rincón de Romos	Ejido del Bajío	junio - septiembre	Temporal	Forraje verde	Criolla de Villanueva, Zacatecas
9	Rincón de Romos	Ejido del Bajío	junio - septiembre	Riego	Forraje seco	H9105W
10	San José de Gracia	Paredes	mayo - agosto	Temporal	Grano	Criolla, Pozolero blanco
11	Tepezalá	San Antonio de Tepezalá	junio - septiembre	Riego	Grano	NB11
12	Tepezalá	San Antonio de Tepezalá	junio - septiembre	Temporal	Grano	Criolla
13	El Llano	De la Luz	junio - septiembre	Temporal	Forraje seco	Criolla

Tto. = Tratamiento, PS = Periodo de siembra, TC = Tipo de cultivo.

La toma de muestras se realizó en formato en cinco de oros, con un total de 500 m² para cada tratamiento. Las muestras del hongo se cortaron y se colocaron en hieleras para trasladarlas al Laboratorio de Parasitología Agrícola del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes; la temperatura a las que se mantuvieron durante el traslado y manipulación fue de 25 °C ± 2 °C. Se tomaron en cuenta las variables medioambientales de temperatura, precipitación y humedad relativa a partir de la siembra hasta la cosecha para cada una de las localidades con la estación meteorológica del INIFAP más cercana al sitio de muestreo. Las muestras se fotografiaron, midieron y pesaron para cada repetición por tratamiento. Se evaluaron las siguientes cuatro variables:

Índice de severidad (IS). Correspondió a la proporción de los elotes cubiertos por agallas formadas por el hongo, con la siguiente escala de severidad (cuadro 2) (Madrigal *et al.*, 2010, modificado por Dulce J. Aguayo Glz.).

Cuadro. 2. Escala para evaluar el índice de severidad del huitlacoche en maíz.

Grado de severidad	
Escala	Proporción de mazorca infectada
Severidad 1 (S1)	1-20%
Severidad 2 (S2)	>20-40%
Severidad 3 (S3)	>40-60%
Severidad 4 (S4)	>60-80%
Severidad 5 (S5)	>80-100%

Porcentaje de incidencia (PI). Se determinó como el número de elotes infectados con algún grado de severidad dividido entre el número de elotes evaluados multiplicado por 100 (Madrigal *et al.*, 2010).

Gramos por mazorca infectada (GMI). Se evaluó el peso total en gramos del huitlacoche desgranado de todos los elotes infectados y se dividió entre el número de elotes infectados por el hongo (Madrigal *et al.*, 2010).

Rendimiento por hectárea (RH). Se obtuvo al multiplicar la densidad de población de maíz por los GMI, el PI y el número de elotes por planta (Madrigal *et al.*, 2010).

Los resultados se analizaron en un diseño completamente al azar. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) con el programa estadístico SAS versión 9.1 para determinar si existían diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las variables IS, PI, GMI y rendimiento por hectárea de los 13 tratamientos. Cuando se detectaron diferencias estadísticas, se procedió a la comparación de medias con una prueba de Tukey ($p = 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

El IS fluctuó de 0.17 a 18.67 %, el PI varió de 0.05 a 6.7 %, el GMI fue de 3.38 a 49.81 g y el rendimiento fluctuó de 0.728 a 90.554 kg ha⁻¹ en los 13 tratamientos evaluados (Cuadro 3). Las pruebas de significancia indicaron que al menos uno de los tratamientos fue diferente significativamente para cada una de las variables evaluadas ($p \leq 0.05$). La comparación de medias de Tukey reflejó que el tratamiento 3 que correspondió al municipio de Aguascalientes, Ejido Peñuelas, con un periodo de siembra de junio-septiembre, en cultivo de temporal y con semilla criolla, fue diferente significativamente en el IS con 18.67 %, en el PI con 6.47 % y RH de 90.554 kg ha⁻¹ con respecto a los demás tratamientos ($p = 0.05$).

Para el IS se obtuvo que los tratamientos 3 y 13 fueron diferentes significativamente con respecto a los de más tratamientos con un IS de 18.67 y 8.10 %, respectivamente, para el PI, el tratamiento 3 y el 13 también obtuvieron los porcentajes más altos con 6.47 y 2.0 % respectivamente en relación a los demás tratamientos, en los GMI los tratamientos 8 y 10 se

diferenciaron del resto de los tratamientos al obtener 36.67 y 49.81 g, respectivamente; y para el RH resaltaron los tratamientos 3 y 10 con una producción natural de 90.554 y 46.500 kg ha⁻¹, respectivamente, siendo diferentes significativamente al resto de los tratamientos.

Los tratamientos 3 (Aguascalientes, Ejido Peñuelas), 8 (Rincón de Romos, Ejido el Bajío) y 13 (El Llano, Localidad De la Luz) sembrados en junio-septiembre y las semillas que se utilizaron fueron de origen criolla y el tratamiento 10 (San José de Gracia, Localidad Paredes) sembrado en mayo-agosto y con semilla criolla, en cultivo de temporal para los cuatro tratamientos. Dichos tratamientos fueron los mejores y diferentes significativamente a los demás tratamientos en cada uno de los caracteres evaluados (Cuadro 3).

Cuadro 3. Componentes del rendimiento de huitlacoche producido de manera natural en el Estado de Aguascalientes, México.

Tratamientos	IS (%)	PI (%)	GMI (g)	RH (kg ha ⁻¹)
1	0.17 ^c	0.17 ^c	4.03 ^c	1.299 ^c
2	0.17 ^c	0.10 ^c	3.38 ^c	1.027 ^c
3	18.67 ^a	6.47 ^a	8.68 ^c	90.554 ^a
4	0.14 ^c	0.14 ^c	3.69 ^c	0.728 ^c
5	0.89 ^c	0.41 ^{bc}	9.54 ^c	7.109 ^{bc}
6	1.79 ^c	0.76 ^{bc}	15.05 ^{bc}	14.027 ^{bc}
7	1.07 ^c	0.48 ^{bc}	17.10 ^{bc}	10.283 ^{bc}
8	0.74 ^c	0.26 ^c	36.67 ^{ab}	22.119 ^{bc}
9	1.24 ^c	0.48 ^{bc}	19.34 ^{bc}	11.311 ^{bc}
10	3.68 ^{bc}	0.74 ^{bc}	49.81 ^a	46.500 ^b
11	1.44 ^c	0.69 ^{bc}	8.99 ^c	12.886 ^{bc}

12	0.21 ^c	0.05 ^c	4.87 ^c	1.469 ^c
13	8.10 ^b	2.00 ^b	5.21 ^c	16.863 ^{bc}

IS: índice de severidad; PI: porcentaje de incidencia; GMI: gramos de huitlacoche por mazorca infectada; RH: rendimiento por hectárea. Medias con la(s) misma(s) letra(s) en la misma columna son estadísticamente iguales, según la prueba de Tukey ($p = 0.05$).

La aparición del huitlacoche en el maíz depende de varios factores como las condiciones ambientales, etapa del desarrollo de la planta del maíz, la susceptibilidad genética de la semilla y patogenicidad del hongo (Pataky, 1991; Pataky *et al.*, 1995; Pan *et al.*, 2008). Lo que se reflejó en la variabilidad de los resultados para el rendimiento por hectárea a causa de las condiciones ambientales, tipo de semilla y tipo de cultivo que se utilizaron en cada una de los tratamientos, además de las prácticas agronómicas y los tipos de patogenicidad del hongo prevalentes en las regiones evaluadas pudieron afectar significativamente los componentes del rendimiento, ya que existe una amplia diversidad genética en *Ustilago maydis*, como lo ha reportado Jiménez Becerril (2010) y Calderón Fernández (2010).

Los tratamientos bajo condición de riego (Fig. 1) no reflejaron mayores rendimientos de huitlacoche en las condiciones de precipitación, a pesar de que este alimento está formado principalmente por agua (~90%; Beas *et al.*, 2011), sin embargo, en la condición de temperatura hay una relación estrecha con el rendimiento por hectárea (Cuadro 4). En los tratamientos 3 y 10 obtuvieron la mejor producción natural del hongo, las condiciones ambientales que se presentaron en los dos tratamientos son completamente diferentes (Fig. 2), estas no están relacionadas con el rendimiento que se obtuvo del hongo (Cuadro 4).

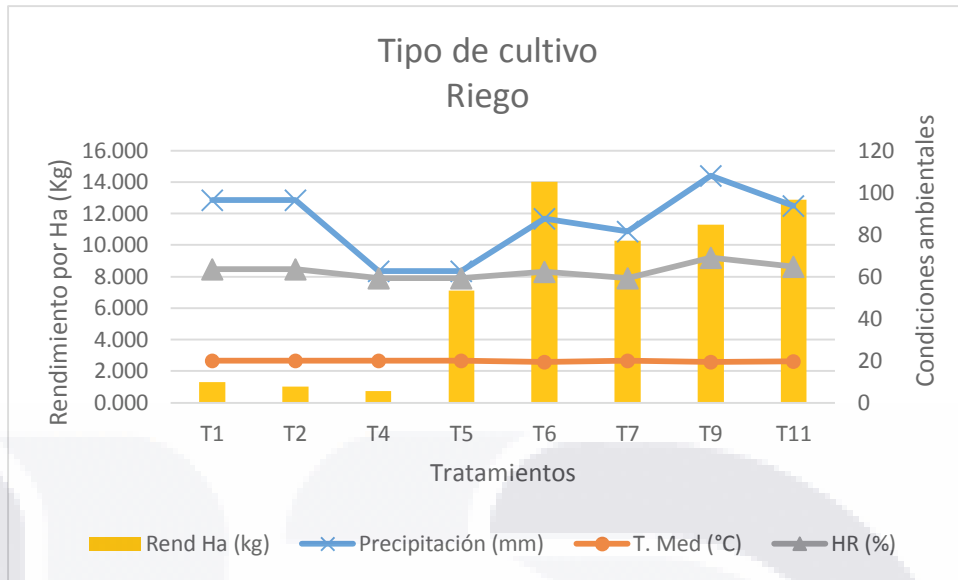


Figura 1. Comparación de las condiciones ambientales en los tratamientos con riego.

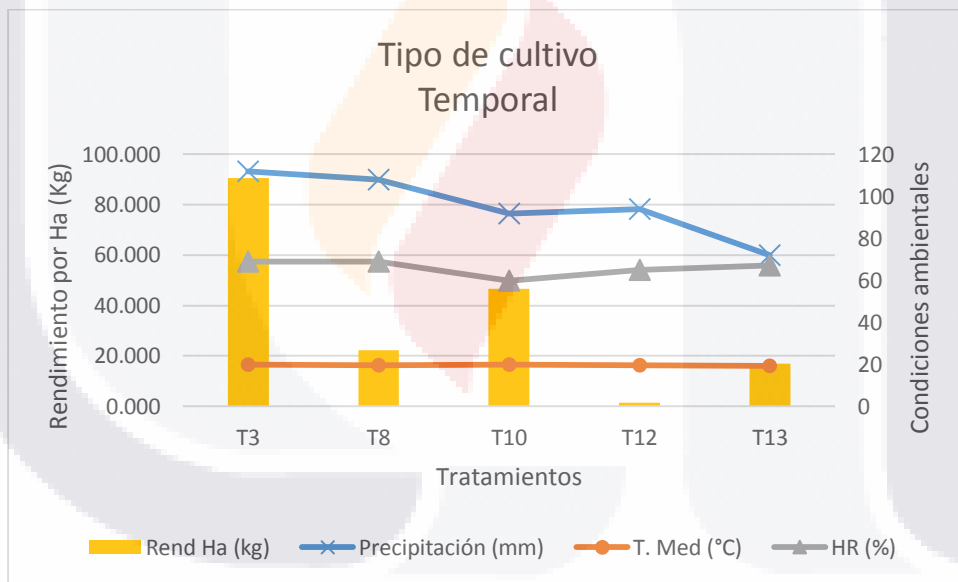


Figura 2. Comparación de las condiciones ambientales en los tratamientos de temporal.

Cuadro 4. Correlación entre condiciones ambientales y rendimiento por hectárea para los tratamientos con riego y temporal.

	Precipitación (mm)	Temperatura (°C)	Humedad relativa (HR)
RH (riego)	0.2477*	-0.8658**	0.2775*
RH (temporal)	0.5434*	0.5622*	0.1405*

RH: Rendimiento por hectárea. **Correlación significativa al nivel de 0.01. *Correlación no significativa al nivel de 0.05.

Algunos autores (Valdez *et al.*, 2009; Salazar *et al.*, 2013) mencionan que con el método de inoculación artificial y bajo condiciones controladas en la producción, llegaron a obtener rendimientos de hasta 15 t ha⁻¹ con maíces criollos. La producción natural para las semillas criollas de temporal el mejor rendimiento fue de 90.554 kg ha⁻¹.

La producción bajo el método de inoculación artificial para maíces híbridos es de 7 a 8 t ha⁻¹ (Martínez *et al.*, 2000; Madrigal *et al.*, 2010). En el presente trabajo se obtuvo que, para los maíces híbridos bajo riego, el tratamiento 6 resultó con el mejor rendimiento con cerca de 14.027 kg ha⁻¹, a comparación del tratamiento 4 en donde se utilizó la misma semilla con 0.728 kg ha⁻¹ pero en diferente localidad. La temperatura promedio pudo haber determinado el mejor rendimiento en el tratamiento 6, ya que hay una relación estrecha entre estas dos variables (Cuadro 4).

CONCLUSIONES

El tratamiento 3 a base de semilla criolla amarilla de temporal sembrada en junio-septiembre, en la localidad del Ejido de Peñuelas, Aguascalientes, mostró la severidad y porcentaje de incidencia del carbón del maíz (huitlacoche) más alta con 18.67 y 6.47 % respectivamente, y por tanto obtuvo el mayor rendimiento de huitlacoche con 90.554 kg ha⁻¹.

El tratamiento 10 de la localidad de Paredes, San José de Gracia con semilla criolla pozolera blanca de temporal sembrada en mayo-agosto, obtuvo en gramos por mazorca infectada por huitlacoche el promedio más alto con 49.81 g, sin embargo por su porcentaje de incidencia bajo (0.74 %) mostró un rendimiento de 46.500 kg ha⁻¹.

Las semillas híbridas y criollas difieren en los resultados de producción natural ya que la susceptibilidad de las semillas y la patogenicidad del hongo *Ustilago maydis* están estrechamente relacionados para obtener una infección masiva en el cultivo del maíz.

Las condiciones ambientales no están estrechamente relacionadas con el rendimiento por hectárea para las semillas criollas de temporal.

LITERATURA CITADA

Agrios, G. N. (2006). Fitopatología. 2ª ed. Ed. LIMUSA. México, D.F.

Beas, F. R., Loarca, P. G., Guzmán, M. S.H., Rodríguez, G. M., Vasco, M. N.L. y Guevara, L. F. (2011). Potencial nutracéutico de componentes bioactivos presentes en huitlacoche de la zona de centro de México. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C. México. Abril-Junio 42(2): 36-44. Obtenido en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57922749006>

Calderón Fernández, M. L. (2010). Tesis: Caracterización clásica y molecular del huitlacoche [*Ustilago maydis* D.C. (Corda)], hongo de importancia social y económica en la Región Central de México. Colegio de Postgraduados. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Puebla, Puebla. Obtenido en: http://www.biblio.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/10521/319/Calderon_Fernandez_ML_DC_EDAR_2010.pdf?sequence=1

INEGI). 2008. En: La Biodiversidad en Aguascalientes: Estudio de Estado. 2008. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Instituto del Medio Ambiente del Estado de Aguascalientes (IMAE), Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA). México. 389 p.

Jiménez Becerril, M. F. (2010). Tesis: Estudio de la diversidad genética y análisis molecular del locus *b* de *Ustilago maydis*. Instituto Politécnico Nacional-CBG. Reynosa, Tamaulipas.

Obtenido en: <http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/7944/60.pdf?sequence=1>

Madrigal, R. J., Villanueva, V. C., Sahagún, C. J., Acosta, R. M., Martínez, M. L. y Espinosa, S. T. (2010). Ensayos de producción de huitlacoche (*Ustilago maydis* Cda.) hidropónico en invernadero. Revista Chapingo Serie Horticultura 16(3): 177-182. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/rcsh/v16n3/v16n3a5.pdf>

Martínez, M. L., Villanueva, V. C. y Sahagún, C. J. (2000). Susceptibilidad y resistencia del maíz al hongo comestible huitlacoche (*Ustilago maydis* Cda.) mejorando su virulencia. Revista Chapingo Serie Horticultura 6(2): 241-255. Obtenido en <http://chapingo.mx/noticias/img/revistas/articulos/doc/d874487234f683b7d319fc38fe2015d7.pdf>

Martínez-Martínez, L., Muñoz-Orozco, A., Mejía-Contreras, J. A., Molina-Galán, J. D., Zavaleta-Mejía, E., Sandoval-Islas, J. S. y Villanueva-Verduzco, C. 2005. Efectos genéticos e interacciones entre familias de maíz y aislados de huitlacoche (*Ustilago maydis* D. C. Corda). Chapingo. Serie Horticultura. 11(1): 121-128 Obtenido en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60912502018>

Méndez-Morán, L. y Ruiz-Herrera, J. (2008). Estudio de genes diferenciales durante el proceso patogénico de *Ustilago maydis* en *Arabidopsis thaliana* un huésped no natural. Avances en la Investigación Científica en el CUCBA. En: XIX Semana Nacional de la Investigación Científica. Zapopan, Jalisco. México. Pp: 407-414.

Pan, J. J., Baumgarten, A. M & May, G. (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. Obtenido en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.2007.02350.x/pdf>

Pataky, J. K. (1991). Production of cuitlacoche [*Ustilago maydis* (D. C.) Corda] on sweet corn. *HortScience* 26:1374-1377. Obtenido de: <http://www.mycologia.org/content/95/6/1261.full.pdf+html>

Pataky, J. K., Nankam, C. & Kerns, M. R. (1995). Evaluation of a silk-inoculation technique to differentiate reactions of sweet corn hybrids to common smut. *Phytopathology* 85(10): 1323-1328. Obtenido en: http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1995Articles/Phyto85n10_1323.pdf

Salazar, T. J. C., Martínez, T. E., Álvarez, H. R. y Méndez, L. A. (2013). Susceptibilidad de maíces híbridos y criollos al huitlacoche (*Ustilago maydis* (D.C.) CDA.), y rentabilidad de la producción, en Chapingo, México. *Ciencias Agronómicas y ambientales*. 1er. Congreso Internacional de Ciencias Aplicadas. Universidad Autónoma de Chapingo. pp. 84-93. Obtenido en http://chapingo.mx/dicea/contenido/eventos/congreso_icba/archivos/publicaciones/Libro_Mesa_4_Part1.pdf#page=84

Valdez, M. M., Valverde M. E. y Paredes L. O. (2009). Procedimiento tecnológico para la producción masiva de huitlacoche. CINVESTAV-Irapuato. Sinnc. pp. 10-37. Obtenida de http://www.concyteg.gob.mx/formulario/MT/MT2009/MT1/SESION2/MT12_MVALDEZ_010.pdf

Villanueva, C. V, Cruz, Molina, D., J. D., Castillo, F. & Zavaleta, E. (1999). Artificial induction of huitlacoche (*Ustilago maydis*): influence of different conditions in the field. *Micol. Neotrop. Apl.* 12: 41-57.