



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE
SONORA**

**EVALUACIÓN DE CEPAS LOCALES DE
Ustilago maydis EN MAÍZ PARA LA
PRODUCCIÓN DE HUITLACOCHÉ EN EL
VALLE DEL YAQUI. OTOÑO 2003.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO BIOTECNÓLOGO

PRESENTA

CIRIA BERENICE COTA NAVARRO

CD. OBREGÓN, SONORA

JULIO DE 2004.



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIAS ALIMENTARIAS

Los miembros del comité revisor, recomendamos que la presente tesis sea aceptada como requisito parcial para la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga.

COMITÉ REVISOR

Asesor: _____

M. C. Ruth Gabriela Ulloa Mercado

Revisor: _____

Ing. Ernesto García Méndez

Revisor: _____

M. C. Ignacio Ruiz Hernández

Revisor: _____

M. C. Luciano Castro Espinoza

Cd. Obregón, Sonora; México . Julio de 2004.

Dedicatorias

A mis padres María del Carmen Navarro y Francisco Cota

A mis hermanas Flor y Danixia

A mi Rubén

y

A mi pedacito de cielo azul ... Jesús Eduardo

Agradecimientos

Le doy gracias a Dios y la virgencita de Guadalupe por permitirme el logro de esta meta.

A mis padres y hermanas por todo el cariño y apoyo brindado. Los quiero mucho

A mi asesora la M.C. Ruth Gabriela Ulloa Mercado, por el gran apoyo en la realización de este trabajo. Gracias por las enseñanzas y conocimientos que compartió conmigo y por su amistad.

A mis revisores de tesis Ing. Ernesto García, M. C. Ignacio Ruiz y al M.C. Luciano Castro por sus atinados comentarios y grandes enseñanzas.

A todos los maestros que participaron en mi formación profesional.

A Rubén por tu amor y apoyo... Gracias Monet ... Te Amo.

A toda mi familia en especial las familias, Faz Navarro, Pérez Navarro, Navarro Leyva(mamá Chila), Torres Navarro, Félix Cota, Palafox Navarro, Navarro Valenzuela ... Y a los consentidos Jesusito, D. Israel, Rubencito y Stephany. Gracias por existir.

Para la familia Salguero Félix, a mis suegros el Dr. Marío Salguero y la Dra. Mireya Félix una agradecimiento especial e infinito.

A Laura de los servicios bibliotecarios.

A todos los almacenistas de laboratorios y a los que participaron en el desarrollo de esta investigación ... Emma, Rafa, Arturo y M. C. Raúl Holguín.

Gracias a todos mis amigos de la generación por brindarme su amistad, en especial a Marisela, Rosario, Karina, Elsa, Claudia, Esau, Vianca, Santiago, Omar, Karla, Lissete..... Gracias por ser mi amiga Juany!!

ÍNDICE GENERAL

Índice de tablas	iv
Índice de gráficas y figuras	vi
Resumen	viii
I INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del problema	2
1.3 Justificación	2
1.4 Objetivo	4
II REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 <i>Ustilago maydis</i> (DC) Corda	5
2.1.1 Clasificación taxonómica	6
2.1.2 Morfología	8
1. Basidiospora o esporidia	8
2. Micelio dicariótico	8
3. Telioespora	8
2.1.3 Ciclo biológico	9
2.1.4 Control genético de la reacción de apareamiento.....	12
2.1.5 Señales químicas	13
2.1.6 Tipos de infección y sintomatología	14
2.1.6.1 Infección haploide	15
2.1.6.2 Infección diploide	15
2.1.6.3 Infección dicariótica	16
2.1.7 Compatibilidad de cepas a nivel laboratorio	17
2.1.8 Nivel de patogenicidad de cepas	18
2.2 El huitlacoche	19
2.2.1 Producción	19
2.2.1.1 Factores que afectan la producción de huitlacoche.....	20

	<i>Página</i>
a) Humedad	20
b) Temperatura	21
c) Vigor del hospedero	21
d) Densidad de plantas	21
e) Técnicas de inoculación artificial	22
2.2.2 Importancia como alimento	24
2.2.3 demanda y consumo	25
2.3 El maíz	27
2.3.1 Origen	27
2.3.2 Importancia	27
2.2.3 Características botánicas	28
2.3.4 Ciclo Vegetativo	29
2.3.5 Características del híbrido A - 7573	31
2.4 Investigaciones con <i>Ustilago maydis</i> realizadas	
en el valle del yaqui	32
III MÉTODO	37
3.1 Localización del experimento	37
3.2 Preparación del cultivo	37
3.3 Cepas de <i>Ustilago maydis</i>	38
3.4 Diseño experimental	39
3.5 Preparación del inóculo	40
3.6 Inoculación de los tratamientos	41
3.7 Variables a evaluar	41
3.7.1 Porcentaje de infección	41
3.7.2 Cubrimiento de huitlacoche en mazorcas	42
3.7.3 Rendimiento de huitlacoche	42
a) Rendimiento de huitlacoche en mazorcas	
comercializables (RHMC)	42
b) Rendimiento de huitlacoche limpio (RHL)	43
3.7.4 Índice de severidad de la infección (ISI)	44

3.7.5 Análisis bromatológicos del huitlacoche	44
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
4.1 Cosecha de Huitlacoche	46
4.2 Porcentaje de infección	46
4.3 Grado de cubrimiento	49
4.4 Rendimiento de huitlacoche en mazorcas comercializables (RHMC)	52
4.5 Rendimiento de huitlacoche limpio (RHL)	53
4.6 Índice de severidad de la infección (ISI)	56
4.7 Análisis bromatológicos del huitlacoche	58
V CONCLUSIONES	63
VI RECOMENDACIONES	65
VII BIBLIOGRAFÍA	66
Glosario	71

ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Página</i>
Tabla 1. Comparación de precios entre elote y huitlacoche en el mercado local	3
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Ustilago maydis</i> (DC) Corda	7
Tabla 3. Composición del medio Holliday modificado por Álvarez (1999)	18
Tabla 4. Escala de valores para la determinación de la patogenicidad de <i>U. maydis</i> en plántulas (adaptada Barret,1993)	19
Tabla 5. Composición proximal del huitlacoche	24
Tabla 6. Contenido proteínico de algunos hongos comestibles	25
Tabla 7. Características del híbrido A-7573	31
Tabla 8. Actividades realizadas en la preparación del cultivo de maíz	37
Tabla 9. Número y denominación de las cepas de <i>U. maydis</i> utilizadas en la investigación	38
Tabla 10. Cruzas de las cepas de <i>U. maydis</i> utilizadas para la inoculación artificial en maíz y su tratamiento asignado	39
Tabla 11. Cepas solopatogénicas de <i>U. maydis</i> utilizadas para la inoculación artificial en maíz y su tratamiento asignado	39
Tabla 12. Calendario de eventos	41
Tabla 13. Métodos empleados en determinaciones bromatológicas	45
Tabla 14. Calendario de cosechas	46
Tabla 15. Efecto de la inoculación de <i>U. maydis</i> en mazorcas de maíz en el porcentaje de infección	47
Tabla 16. Porcentaje de cubrimiento promedio de mazorcas en cada tratamiento	49
Tabla 17. Efecto de la inoculación de <i>U. maydis</i> en mazorcas de maíz en el cubrimiento de agallas	50
Tabla 18. Efecto de la inoculación de <i>U. maydis</i> en maíz en el RHMC por hectárea	52

Tabla 19. Efecto de la inoculación de <i>U. maydis</i> en mazorcas de maíz en el RHL por hectárea	54
Tabla 20. Efecto de la inoculación de <i>U. maydis</i> en mazorcas de maíz en el ISI	56
Tabla 21. Composición del huitlacoche de los tratamientos B, C, D, E, H y L	60

ÍNDICE DE GRÁFICAS Y FIGURAS

Gráficas

	<i>Página</i>
Gráfica 1. Porcentaje de infección promedio de cada tratamiento.....	48
Gráfica 2. Mazorcas con cobertura agallas de 51-100% en cada tratamiento	51
Gráfica 3. Rendimiento de huitlacoche promedio en mazorcas comercializables de cada tratamiento.....	53
Gráfica 4. Rendimiento de huitlacoche limpio promedio de cada tratamiento.....	55
Gráfica 5. Índice de severidad de la infección promedio obtenido en cada tratamiento.....	57
Gráfica 6. Contenido humedad del huitlacoche obtenido de los tratamientos B, C, D, E, H y L	59
Gráfica 7. Composición del huitlacoche obtenido de los tratamientos B, C, D, E, H y L	61

Figuras

	<i>Página</i>
Figura 1. Mazorca con agallas producidas por la infección de <i>Ustilago maydis</i>	6
Figura 2. Estados nucleares en el ciclo de vida de <i>U. maydis</i> y procesos involucrados en la transición de un estado a otro	10
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Ustilago maydis</i>	11
Figura 4. Prueba de compatibilidad de cepas	18
Figura 5. El cultivo de maíz en etapa de crecimiento	29

Figura 6. Período promedio de floración en un cultivo de maíz híbrido	30
Figura 7. Distribución en campo de los tratamientos y sus repeticiones.....	40
Figura 8. Grados de cubrimiento de huitlacoche en la mazorca de maíz	42
Figura 9. Separación manual de agallas de huitlacoche de la mazorca de maíz.....	43

RESUMEN

Huitlacoche o cuitlacoche es el nombre que se le da a las agallas o tumores que se forman en la mazorca del maíz por la acción del hongo *Ustilago maydis*. En la actualidad, la producción de huitlacoche que se consume y comercializa en nuestro país, es producido por infecciones naturales y al azar dando como resultado un producto no homogéneo en cuanto a composición química y características físicas, lo cual repercute en la calidad del producto.

Las investigaciones actuales dirigidas a *Ustilago maydis* en el Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON) se enfocan a la evaluación de técnicas para el aumento de la producción de huitlacoche, mediante la infección inducida. En base a lo anterior se planteó la presente investigación cuyo objetivo fue evaluar cepas locales de *Ustilago 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. Obregón y en los terrenos del campo experimental ITSON ubicado en la manzana 204 del Valle del Yaqui.

En la presente investigación se evaluaron seis cruzas ($A_3 - A_9$, $A_8 - A_{14}$, $A_9 - A_{13}$, $A_5 - A_9$, y $A_3 - A_{10}$) y dos cepas individuales (solopatógenicas) (A_8 y A_{14}) de *Ustilago maydis*, seleccionadas de un trabajo previo. Dicho material fue aislado de muestras de diferentes puntos de Valle del Yaqui donde se presentaron infecciones naturales.

Comentario [LCE1]: Seleccionadas en un trabajo previo

La semilla de maíz utilizada en este estudio fue el híbrido A-7573. La siembra se efectuó terreno seco y se utilizó el sistema de riego por gravedad. La inoculación

del hongo se llevó a cabo a los 53 días después de la siembra, efectuándose en el centro de la mazorca al inicio de la fecundación, utilizándose un inóculo con concentración de 2.5×10^6 células / mililitro de cada una de las cepas.

La cosecha del huitlacoche se realizó entre 19 y 30 días después de la inoculación. Se determinó el porcentaje de plantas con infección, el grado de cubrimiento de mazorcas con huitlacoche, el rendimiento de huitlacoche comercializable en mazorcas, el rendimiento de huitlacoche limpio (sin mazorca) y el índice de severidad de la infección; además se realizó el análisis bromatológico al huitlacoche obtenido de las cepas que presentaron los más altos niveles de infección.

Comentario [LCE2]: No es necesario especificarlos.

Los mejores resultados se obtuvieron con la cruza $A_4 - A_{10}$, ya que presentó los más altos niveles en cuanto a: porcentaje de infección (56.47%), mazorcas con cubrimiento de 51-100% de huitlacoche (100 %), rendimiento de mazorcas comercializables(3,815.49 Kg / ha), rendimiento de huitlacoche limpio (2,070 Kg / ha), índice de severidad de la infección (70.48). En cuanto al análisis bromatológico del huitlacoche producido con esta misma cruza, el análisis arrojó los resultados siguientes: humedad 88.61%, ceniza 4.87%, grasas 3.40% y proteína 12.43 %. Con lo anterior se concluye que la cruza A_4-A_{10} resultó ser la mejor para ser utilizada en la producción masiva de huitlacoche.

I. INTRODUCCIÓN

Comentario [LCE3]: Lo que está en amarillo te sugiero que lo elimines y lo que está en verde es para que lo incorpores.

1.1 Antecedentes.

En México el consumo de huitlacoche como alimento se ha dado desde la época de los aztecas; éstos recolectaban las agallas formadas en la mazorca del maíz producto de la infección natural del hongo *Ustilago maydis* sobre la planta. En la actualidad la producción de huitlacoche se presenta bajo las mismas circunstancias, dando como resultado un producto no homogéneo, en cuanto a composición química y características físicas principalmente.

Por lo anterior, las investigaciones actuales dirigidas a *Ustilago maydis* se enfocan a la evaluación de técnicas para el aumento de la productividad de huitlacoche, respecto a la productividad que se obtiene con infección natural, mediante la infección inducida.

Comentario [LCE4]: Mismo comentario que en el resumen

Investigaciones realizadas en el Valle del Yaqui reportan una gran cantidad de datos y parámetros útiles para el control del cultivo de huitlacoche. También se han aislado y evaluado cruzas de cepas adaptadas a las condiciones de la región. La importancia de la evaluación de cruzas y cepas *Ustilago maydis* radica en la capacidad patogénica que éstas presentan con su hospedero. De ahí que las cruzas o cepas solopatógenicas (cepas que sin cruzarse con otras provocan enfermedad) que presentan altos niveles de patogenicidad serán aptas para ser utilizadas en la producción masiva de Huitlacoche.

En la presente investigación se utilizaron seis pares de cepas y dos cepas individuales (solopatógenicas) de *Ustilago maydis*, seleccionadas de un trabajo previo, en el cual se les evaluó su compatibilidad y patogenicidad. Dicho material fue aislado de diferentes puntos de Valle del Yaqui donde se presentaron

Comentario [LCE5]: No te puedes referir a ellas como cruzas, cuando tu las reproduces por separado y esperas que se crucen una vez dentro de la planta.

infecciones naturales. La inoculación del hongo se efectuó al inicio de la fecundación del maíz, en el centro de la mazorca, debido a que en estudios anteriores se ha demostrado que, bajo estas condiciones, se obtienen los mejores resultados. El objetivo de este estudio fue evaluar cepas locales de *Ustilago maydis* para la producción masiva del huitlacoche.

1.2 Planteamiento del problema

En 1997 se iniciaron las investigaciones enfocadas a la producción masiva de huitlacoche por parte de algunos investigadores del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON). Producto de esas investigaciones se ha logrado la recopilación de información necesaria para el establecimiento de un sistema de producción en la región del Valle del Yaqui. Publicaciones relacionadas con la forma y lugar de inoculación de mazorcas, tiempo óptimo de fecundación de maíz para efectuar la inoculación, fertilización y densidad de plantas del cultivo de maíz son algunas contribuciones para el establecimiento de dicho sistema.

Sin embargo, existe poca información referente a las cepas de *Ustilago maydis* aisladas de infecciones naturales en el valle del Yaqui ya que, desde el año de 1999 en el ITSON, las investigaciones para la inoculación artificial del hongo se han realizado con base a una sola cruz. Por lo anterior, resulta conveniente la evaluación de distintas cepas locales para buscar nuevas alternativas que conduzcan a la producción masiva del hongo con un máximo de rendimiento.

1.3 Justificación

El huitlacoche es un alimento tradicional mexicano que presenta atractivas propiedades nutritivas y un exquisito sabor característico, además de una excelente cotización en el mercado. En lo que respecta a las propiedades nutritivas, el huitlacoche contiene proteínas de muy buena calidad, minerales, vitaminas y compuestos antioxidantes que lo hacen un alimento nutracéutico.

Además se caracteriza por ser bajos en calorías, sodio y grasa. De esta última aproximadamente el 70% del total son ácidos grasos esenciales además alrededor del 90 % de la composición de huitlacoche es agua. Todas las características antes mencionadas colocan al huitlacoche como un alimento especialmente útil para el consumo en dietas reductoras de peso y dietas vegetarianas (Paredes y col., 2000; Paredes, 2001).

Resulta sorprendente la buena cotización que el huitlacoche, también llamado “caviar azteca”, tiene en el mercado. Haciendo una comparación con el elote, ya sea procesado (granos) o en fresco (mazorcas), el huitlacoche en cualquiera de sus presentaciones alcanza precios mucho más elevados, ver tabla 1.

Tabla 1. Comparación de precios entre elote y huitlacoche en el mercado local.

PRODUCTO	PRESENTACIÓN	PRECIO (PESOS)
Elote en grano “Del fuerte”	Lata 215 g	\$ 4.65
Elote en grano “Del Monte”	Lata 215 g	\$ 5.30
Huitlacoche “Monte blanco”	Lata 215 g	\$25.50
Huitlacoche “San Miguel”	Lata 215g	\$19.90
Agallas de huitlacoche fresco	Kilogramo	\$ 132.90
Elote mazorca	Kilogramo	\$2.00

Fuente: Clavero, 2004

La popularidad y demanda del huitlacoche, en México y en el extranjero va en aumento día con día. Sin embargo la producción de huitlacoche para la comercialización nacional y de exportación se limita a la infección natural del hongo *Ustilago maydis* en las mazorcas de maíz. Dicha producción resulta insuficiente para cubrir la creciente demanda. Así que la búsqueda de cepas o cruza que presenten altos rendimientos resulta necesaria para que, aunado con las investigaciones previas, se logre tener un control en la producción de huitlacoche en el país. en nuestro país

Comentario [LCE6]: No es claro

Dadas las condiciones de la agricultura que prevalecen en el Valle del Yaqui, la siembra de maíz para la producción de huitlacoche presenta ventajas. Según Clavero (2004), la ventaja de sembrar maíz para la producción de huitlacoche radica en que sólo se requiere llegar hasta elote, por lo que se reduce el ciclo del cultivo a la mitad, y se ahorra agua de riego, se desocupa el terreno más rápido o se pueden programar 2 o 3 cosechas por año, lo cual repercute directamente en la mejora de la economía del productor.

1.4 Objetivos

General

Evaluar cepas locales de *Ustilago maydis* para la producción masiva del huitlacoche.

Específicos

- Evaluación de la producción de huitlacoche mediante el porcentaje de infección, cubrimiento de mazorcas con agallas, rendimiento e índice de severidad de la infección.
- Comparar la composición bromatológica de agallas de huitlacoche provenientes de diferentes cepas

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 *Ustilago maydis* (DC) Corda.

Los hongos *Ustilaginales* constituyen un grupo importante de patógenos, los cuales producen una gran variedad de enfermedades en plantas monocotiledóneas. Estos patógenos poseen el potencial de causar severas epidemias y pérdidas económicas cuantiosas, aún cuando se dan tratamientos químicos a las semillas y a las plantas, la existencia de cultivares parcialmente resistentes y los diferentes métodos de cultivo empleados. Se pueden mencionar varios hongos *Ustilaginales* patógenos como: *Ustilago maydis*, *U. hordei*, *U. nuda*, *U. niagra*, *Tilletia indica*, *T. Caries* (Martínez y Ruiz, 1998).

Ustilago maydis es el causante de la enfermedad denominada carbón común del maíz. Dicho hongo es un patógeno específico que infecta solamente al maíz (*Zea mays*) y teosinte (*Zea mexicana*) este último considerado el ancestro del maíz cultivado actualmente (Banuett, 1995). Esta enfermedad se presenta en casi todas las regiones maiceras del mundo, pero con más problemas, por daños severos causa en climas templados y húmedos que en los calientes y húmedos (Reyes, 1990). Generalmente se acepta que *U. maydis* es nativo del hemisferio occidental y que fue introducido a Europa por los primeros exploradores (Valverde y col., 1995).

Comentario [LCE7]: Falta el espacio

Comentario [LCE8]: Sobra el espacio

Este hongo se caracteriza por la presencia de tumores o agallas formadas en las partes aéreas de la planta: espiga, hoja, mazorca y tallo. Las agallas formadas en la mazorca del maíz son llamadas comúnmente huitlacoche y en México se consumen como alimento desde la época prehispánica (figura 1).



Figura 1. Mazorca con agallas producidas por la infección de *Ustilago maydis*.

2.1.1 Clasificación Taxonómica

Existe una diversidad considerable de literatura sobre el uso de nombres botánicos que se le han dado al organismo causante del carbón común de maíz. En 1760, este organismo fue llamado *Lycoperdon zae* en un documento anónimo. Más tarde Beckmann también lo llamó *Lycoperdon zae* en base al parecido a las esporas de *Lycoperdon genus*. En 1805, De Candolle llamó a este hongo *Uredo segetum*. En 1808, fue llamado *Ustilago*. Después, en 1815, fue nombrado *Uredo maydis*. En 1836, Unger usó el nombre de *Ustilago zae*. En 1944, Stevenson y Jonson declararon que *Ustilago maydis* (De Candolle) Corda (*Ustilago zae*, Beckmann, Unger) es el nombre binomial correcto, de acuerdo con las reglas botánicas de nomenclatura (Valverde y col., 1995).

Dentro del reino Myceteae, *Ustilago maydis* pertenece a la división Amastigomycota, que incluye a los hongos verdaderos (tabla 2). La clase Basidiomycete está formada por parásitos de plantas, con esporas de pared gruesa que pueden resistir largos períodos de tiempo sin germinar. Atacan principalmente a las estructuras reproductoras de las plantas pero se les puede encontrar en cualquier parte aérea de la planta: afecta a gran número de

Angiospermas, aunque en general, cada especie tiene un limitado rango de hospederos. Comúnmente se les llama Basidiomycetes levaduriformes porque crecen como levaduras en diferentes medios de cultivo en el laboratorio, es decir que presenta dimorfismo. En general, estos hongos tienen pocos caracteres morfológicos que se pueden usar como criterios taxonómicos o de separación. La especificidad sobre el hospedero junto con contados caracteres morfológicos, es lo que se ha utilizado tradicionalmente para separar las 1100 especies que se han descrito en el genero *Ustilago*. Las características sobresalientes y típicas de la especie *maydis* son: que ataca al maíz (*Zea mays*) y al teosinte (*Zea mexicana*) y que presentan teliosporas lisas, con espinas o reticuladas (Paredes y Col., 1999).

Comentario [LCE9]: Sobre espacio

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Ustilago maydis* (DC) Corda

TAXÓN	CARACTERÍSTICAS
Reino Fungi o Mycetae	<ul style="list-style-type: none"> ● No poseen clorofila. ● Alimentación por absorción. ● Eucariontes. ● Pluricelulares.
División Amastigomycota	<ul style="list-style-type: none"> ● Hongos que perdieron el estado móvil. ● No se adaptan a sistemas acuáticos. ● Producen mucho micelio. ● Hifas septadas a aseptadas.
Subdivisión Basidiomycotina	<ul style="list-style-type: none"> ● Producen basidios y basidiosporas. ● Estado diploide muy corto (basidio). ● Estado dicariótico muy prolongado. ● La mayoría heterotálicos.
Clase Basidiomycete Subclase Teliomycetidae	<ul style="list-style-type: none"> ● Parásitos de plantas. ● No forman basidiocarpo. ● Forman esporas de resistencia con pared gruesa. ● Las esporas están en grupos (soros). ● Hongos comúnmente conocidos como carbones.
Orden Ustilaginales	<ul style="list-style-type: none"> ● Atacan principalmente las estructuras reproductoras. ● Producen poco micelio. ● Promicelio septado transversalmente. ● Basidiosporas terminales y transversales. ● Soros o agallas con teliosporas café oscuros o negras.
Género <i>Ustilago</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● Atacan a plantas de importancia económica (avena, trigo, cebada, arroz). ● Teliosporas lisas, con espinas o reticuladas.
Especie <i>maydis</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● Ataca al maíz y al teosinte.

Fuente: Ainswoth, 1993.

Recientemente *U. maydis* ha llegado a ser un modelo interesante y ampliamente usado para el estudio de ciertos aspectos fundamentales en biología. Este modelo resulta atractivo tanto para los investigadores como para el arte culinario (Martínez y Ruiz, 1998).

Kahmann (2002) dice que *Ustilago maydis* es uno de los modelos más importantes en fitopatología molecular, ya que este hongo es muy fácil de cultivar e investigar en laboratorio y en invernadero, además, se pueden lograr varios experimentos en pocas semanas, lo que con otros hongos tomaría meses. A través de este modelo se espera poder explicar la interrelación entre patógenos y plantas, pues se asume que lo que se aprenda de *Ustilago* puede extrapolarse a otras enfermedades fúngicas más difíciles de estudiar.

2.1.2 Morfología

Según Valverde y col., (1995), *U. maydis* presenta tres formas en su ciclo de vida las cuales muestran diferentes condiciones nucleares:

1. Basidiospora o esporidia. Estas esporas son típicamente haploide, hialinas, fusiforme y elongadas en la base; se producen por germinación de la teliospora y se reproducen por gemación. Esta forma es saprofítica y puede ser cultivada en medios de cultivo sintético observándose su crecimiento en forma de levadura.

2. Micelio dicariótico. El micelio dicariótico resulta de una fusión de líneas haploides compatibles. Este micelio es parásito e inicialmente binucleado. Ataca a las zonas meristemáticas de la planta.

3. Teliospora. La teliospora es el estado diploide y esta contenida dentro de las agallas. La teliospora sufre meiosis y produce células haploides con forma de levadura. Dichas esporas pueden hibernar por largos períodos de tiempo y presentan la forma esférica o elipsoidal (Paredes y col., 2000).

2.1.3 Ciclo biológico

Ustilago maydis exhibe un ciclo de vida complejo y necesita a su hospedero natural, maíz, para completarlo. La figura 3 muestra el ciclo de vida de *U. maydis* y se aprecia la invasión del hongo en una mazorcas de maíz, aunque se sabe que puede afectar a cualquier parte aérea de la planta y su mecanismo biológico para inducir la infección es el mismo. Se dice que las agallas formadas en los elotes son las más prominentes y por lo tanto las que resultan ser aptas para la producción masiva de este hongo comestible.

Estudios recientes acerca del ciclo de vida de *U. maydis* y de su regulación por medio de los dos loci de apareamiento y otros genes, proporciona una serie de desafíos en la biología, genética y bioquímica de la célula. El hongo puede existir en dos estados: patogénico y no patogénico. El cambio de un estado a otro va acompañado por cambios en la morfología (levadura o filamento) y las propiedades del crecimiento (saprofítica a parásita) (Banuett, 1992; Banuett, 1995; Banuett y Herskowitz, 1994).

Comentario [LCE10]: Estudios recientes

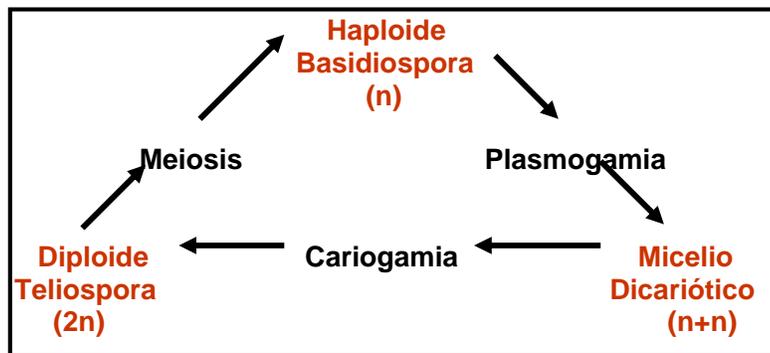
Comentario [LCE11]: Sobre espacio

El ciclo natural del hongo *U. maydis* da inicio con la liberación de las teliosporas, contenidas en las agallas de maíz infectado, al medio ambiente. Dichas esporas, por su naturaleza polvosa pueden permanecer en el aire durante todo el año; también se pueden encontrar en el suelo de cultivo, en los granos y ser transportada por la lluvia y por el estiércol cuando se alimenta al ganado con plantas infectadas. Las teliosporas poseen una pared celular gruesa es por eso que presenta resistencia a condiciones adversas del tiempo permitiéndole el estado de latencia durante largos períodos de tiempo. Cuando encuentra condiciones ambientales favorables la telioespora germina. Primeramente ocurre una división meiótica produciendo células haploides y a partir de estas células se generan otras, por el proceso de gemación, formando así el promicelio haploide tabicado.

Comentario [LCE12]: Sobre espacio

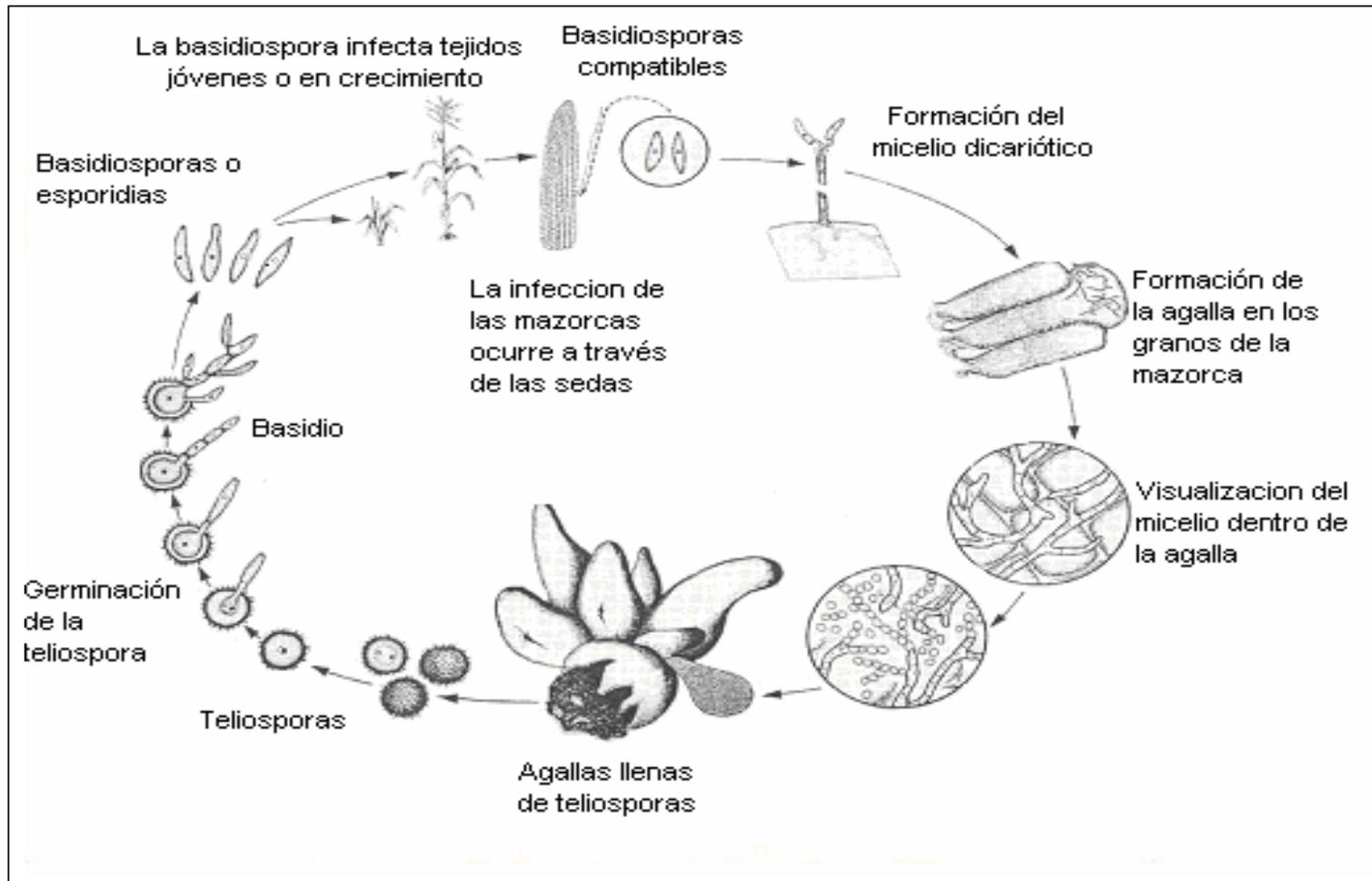
Cada una de las células que conforman el promicelio se separan formando la basidiospora hialina, ovalada y nucleada. La basidiospora germina sobre la superficie del hospedero y produce una hifa fina que en ocasiones muere ya que por si sola no tiene efecto patogénico. Sin embargo si dicho micelio se encuentra con otro producido por una basidiospora de tipo apareamiento compatible se unen (plasmogamia) formando así el micelio dicariótico. El dicarion es la forma patógena y parásita del hongo. Comúnmente en una infección natural en la mazorca, las basidiosporas penetran a esta mediante los estigmas. Los tejidos del hospedero en contacto con el micelio sufren hipertrofia e hiperplasia culminando en la formación de agallas o tumores. Cada agalla es producto de una infección separada. En la agalla se lleva a cabo la cariogamia, o fusión de núcleos, para la formación de la teliospora, se dice que en cada agalla se encuentran miles de teliosporas. Finalmente la membrana de la agalla se rompe y las teliosporas son liberadas dando inicio nuevamente el ciclo de vida de *Ustilago maydis*.

La figura 2 muestra los estados genéticos que presenta *U. maydis* en su ciclo de vida y procesos involucrados en la transición de un estado a otro.



Fuente: Banuett y Herskowitz, 1988.

Figura 2. Estados nucleares en el ciclo de vida de *U. maydis* y procesos involucrados en la transición de un estado a otro.



Fuente: Agrios, 1991

Figura 3. Ciclo de vida de *Ustilago maydis*.

2.1.4 Control genético de la reacción de apareamiento

Los factores genéticos que gobiernan el comportamiento sexual de los hongos se han llamado loci de incompatibilidad (Holliday, 1961, citado por Paredes y col., 2000). En *U. maydis* la compatibilidad está gobernada por dos loci: el locus *a* con dos alelos y el *b* por lo menos con 25 alelos (Paredes y col., 2000).

Se ha demostrado que el locus *a* gobierna el apareamiento y la fusión de cepas compatibles (Trueheart y Herskowitz, 1992, citados por Martínez y Ruiz 1998). Solamente aquellas células que poseen diferentes alelos pueden fusionarse (Martínez y Ruiz, 1998). Sin embargo Banuett y Herskowitz (1988) propusieron que este locus también regula algunos de los procesos que se presentan después de la unión de las cepas compatibles, como son la estabilidad del dicarion y/o el crecimiento de filamento dicariótico. También se ha postulado que este locus controla el vigor y la estabilidad del filamento dicariótico y que el locus *b* no es importante en los pasos tempranos de la formación del mismo. Al clonar el locus *a* se reportó que el genoma haploide contiene una copia de *a1* o *a2* con segmentos de DNA no homólogos limitados por secuencias de nucleótidos similares. Además se concluyó que los alelos de *a* son idiomórficos. Cada alelo codifica para dos componentes en una ruta de feromonas: un factor de apareamiento o feromona *mfa1* y *mfa2* que contienen un marco de lectura abierto (MLA) de 40 aminoácidos, y el receptor de cada feromona (*pra1* y *pra2*), los cuales codifican polipéptidos que contienen siete dominios transmembranales. Así el alelo *a1* codifica una feromona de 13 aminoácidos, mientras que *a2* de nueve aminoácidos. Los precursores de ambas feromonas contienen un grupo conservado de cinco aminoácidos en el amino terminal (Froelieger y Leong, 1991 citados por Paredes y col., 2000).

En relación a el locus *b* se ha propuesto que regula el crecimiento de la hifa, la patogenicidad del dicarion y el ciclo sexual del hongo (Paredes y col., 2000). Cada alelo del locus *b* consiste de dos genes, designados *bE* y *bW*, los cuales

Comentario [LCE13]: Falta un espacio

codifican para dos diferentes polipéptidos *bE* para el de 410 aminoácidos y *bW* para el de 626 aminoácidos (Martínez y Ruiz, 1998). Schulz y col., (1990), citados por Paredes y col., 2000, clonaron y analizaron cuatro alelos de *b* y reportaron que un MLA de 410 aminoácidos, llamado mas tarde *bE*, era el responsable de la actividad de *b*. El gen *bE* tiene una porción amino-terminal variable de 120 aminoácidos y una región carboxi-terminal constante. Posteriormente se reportó el gen *bW*, el cual codifica para una proteína de 626 aminoácidos que presenta una organización similar a *bE*, tiene una región amino-terminal variable de 130 aminoácidos y una región carboxi-terminal conservada. El heteromultímero *bE-bW* funcional parece ser un regulador positivo de genes para el crecimiento filamentoso del hongo y la inducción de agallas (Schulz y col., 1990 citados por Paredes y col., 2000).

Por otro lado, se han identificado otros genes que intervienen en la patogenicidad de *U. maydis*: *fuz1* y *fuz2* son necesarios para la formación de la hifa filamentosa en un medio nutritivo; *fuz1* se necesita para la inducción del tumor y *fuz2* para la germinación de la teliospora. Estos genes no presentan ligamento con *a* o *b*. El gen *rft* puede ser un regulador negativo de la inducción del tumor y está ligado al gen *b* (Banuett, 1992, citado por Paredes y col., 2000). Banuett y Herskowitz (1994) reportaron el gen *fuz7* que interviene en procesos tales como: formación del tubo de germinación, formación y mantenimiento del filamento, inducción del tumor y germinación de la teliospora. Éste es el primer gen distinto al locus *b* que se necesita para la patogenicidad del hongo (Paredes y col., 2000).

2.1.5 Señales químicas

Kahmann (2002), reportó que las esporidias secretan feromonas para inducir a otras células fúngicas, las cuales constantemente están alertas a las sustancias atrayentes emitidas por sus potenciales parejas. Las dos células pueden fusionarse si el receptor, en una de ellas ("la antena de la feromona") es atraída

por la señal de la feromona de la otra. De esta manera se previene el entrecruzamiento, pues solo las esporidias genéticamente diferentes pueden fusionarse. Después de recibir la señal correcta de la feromona, las células empiezan a producir una estructura filamentosa (hifa haploide) dirigida directamente hacia su pareja. Si estos tubos se encuentran, las dos células se fusionan para formar una nueva célula. Cuando las células se fusionan, el comportamiento del hongo cambia radicalmente: en vez de dividirse por gemación, las células se desarrollan como un verdadero micelio, el cual crece en la superficie de la planta de maíz. Mientras que la parte superior del filamento crece, el citoplasma se retira de la parte posterior, dejando un tubo hueco. Es en éste estado cuando *Ustilago maydis* busca un sitio débil de la planta para invadirla, al encontrarlo, una vez dentro de la hoja, la mazorca o las espigas del maíz, la hebra fúngica se desarrolla fácilmente hasta formar una red densa, tomando agua y nutrientes de los tejidos de la planta.

U. maydis no mata a su hospedero (si está en etapa adulta), puesto que la planta de maíz le provee el suplemento alimenticio, en vez de eso, el hongo debe imitar las señales hormonales de la planta, asegurando de este modo la proliferación del tejido el cual, por ejemplo, habilita a la mazorca a hincharse muy por arriba de su talla normal. En estos tumores el hongo encuentra un ambiente ideal para su reproducción. Inicialmente, aun en este estado, todas las células presentan dos núcleos separados. Es sólo después cuando ambos núcleos se fusionan para completar el proceso de cruza. Subsecuentemente las células dividen los fragmentos de hebra, y nuevas esporas se diferencian de los fragmentos. El tumor por su parte, se seca y se desintegra, permitiendo que las esporas sean arrastradas y llevadas por el viento a su próximo hospedero (Kahmann, 2002).

2.1.6 Tipos de infección y sintomatología

La infección es generalmente local y no sistémica; apareciendo agallas en cualquier parte aérea de la planta: tallo, espigas, hojas y mazorcas. Mientras

estén disponibles los tejidos suculentos y meristemáticos, las plantas de maíz son susceptibles a nuevas infecciones. Las plantas jóvenes son particularmente susceptibles y pueden tener una alta mortalidad durante la infección (Valverde y col., 1995).

2.1.6.1 Infección haploide

Aunque la hifa haploide puede penetrar los tejidos del hospedero, su crecimiento es limitado y es un parásito muy débil. Además de que no induce la formación de tumores ni el desarrollo de teliosporas. La infección en plántulas de maíz con cepas haploides provoca distorsiones en la morfología de la planta, reduce la elongación de las hojas y los vástagos, incrementa su diámetro basal, reduce el peso y aumenta la producción de etileno. La cantidad de crecimiento haploide y el nivel de distorsión del hospedero depende de la línea de *U. maydis*. Algunas líneas haploides inducen rizado y distorsión del hospedero similares a la infección normal (Banuett y Herskowitz, 1988; Valverde y col., 1995).

2.1.6.2 Infección diploide

Probablemente la infección diploide ocurre en la naturaleza como resultado del fracaso de la teliospora al no llevar a cabo la primera división meiótica en el proceso de germinación; o bien, que dos de los núcleos haploides se fusionen después de la meiosis formando un núcleo diploide. Las células diploides exhiben algunas características de haploides y dicarióticas: en algunos medios, forman colonias levaduriformes compactas y se reproducen por gemación. En otros medios (p.e. agar carbón nutritivo) presentan un crecimiento filamentoso. Cuando la planta es infectada por una cepa diploide produciéndose agallas y teliosporas, se dice que son cepas solopatogénicas (Banuett y Herskowitz, 1988).

2.1.6.3 Infección dicariótica

La forma dicariótica filamentosa es el estado patogénico de *U. maydis* (Banuett y Herskowitz, 1994). Las diferencias entre las condiciones del desarrollo del hongo *in vivo* e *in vitro* se desconocen. Muchos de los eventos observados en la planta no ocurren en los medios de cultivo: ausencia de ramificaciones de la hifa, la hifa vive muy poco, la fusión nuclear es rara y no hay producción de teliosporas. Las diferencias del comportamiento del hongo en la planta y en los medios de cultivo permiten proponer que la planta provee alguna señal que domina los diferentes aspectos del desarrollo del hongo (Banuett y Herskowitz, 1996).

Si la infección resulta de la fusión de células haploides compatibles, la hifa dicariótica crece rápidamente. El micelio solo penetra una corta distancia, pero se ramifica libre y rápidamente en el área infectada. En los tejidos invadidos las células del hospedero empiezan a multiplicarse y alargarse extraordinariamente. El dicarion es capaz de crecer intra e intercelularmente. El mecanismo por el cual se induce la formación de agallas no es bien conocido pero es posible que el dicarion cause una alteración en el balance hormonal de la planta, produciendo su formación (Valverde y col., 1995).

En relación con los síntomas que se desarrollan en la planta, el más importante es la formación de tumores; sin embargo, también son característicos: la clorosis, las distorsiones morfológicas y la acumulación de antocianinas. Otros síntomas comunes son el desarrollo de flores femeninas en espigas y de estructuras parecidas a espigas en los elotes. Los tumores se pueden formar en cualquier tejido meristemático de la planta, sin embargo los más impresionantes son los que se desarrollan en los elotes. Estos tumores son los que se utilizan en la cocina mexicana para la preparación de diversos platillos (Ruiz y Martínez, 1998).

2.1.7 Compatibilidad de cepas a nivel laboratorio

La compatibilidad de cepas de *U. maydis* se determina al sembrar en una misma placa dos cepas diferentes, una cerca de la otra (figura 4). Con la ayuda de un asa de platino estas cepas se unen y la compatibilidad se hace evidente por la formación del fenotipo Fuz⁺, es decir, por la formación de un micelio blanco, algodonoso y pequeño, producto de la unión de las esporidias haploides que al unirse forman el micelio dicariótico. Las cruzas que resulten compatibles corresponden a las cruzas que desarrollaran la enfermedad en plantas de maíz (Álvarez, 1999). El medio de cultivo que se utiliza para la evaluación de la compatibilidad es el propuesto por Holliday y modificado por Álvarez (1999) ver tabla 3.

Comentario [LCE14]: Sobra espacio

Tabla 3. Composición del medio Holliday modificado por Álvarez (1999).

COMPONENTE	CANTIDAD
Agua destilada	1000 ml
Glucosa	10 g
Extracto de levadura	1.0 g
Nitrato de amonio	1.5 g
Agar bacteriológico	1 %
Harina de maíz	1.7 %
Carbón activado	1 %
Solución de sales	62.5 ml

Composición	Cantidad
Solución de sales	
Agua destilada	1000 ml
Fosfato dibásico de potasio (KH ₂ PO ₄)	16 g
Sulfato de sodio (Na ₂ SO ₄)	4 g
Cloruro de potasio (KCl)	8 g
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	2 g
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	1 g
Solución de elementos traza	8 ml

Composición	Cantidad
Solución de elementos traza	
Agua destilada	1000 ml
Ácido bórico	60 mg
Cloruro de manganeso (MnCl ₂ · 4H ₂ O)	140 mg
Cloruro de Zinc (ZnCl ₂)	400 mg
Molibdato de sodio (Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O)	40 mg
Cloruro de hierro III (FeCl ₃ · 6H ₂ O)	100 mg
Sulfato de cobre II (CuSO ₄ · 5H ₂ O)	400 mg

Fuente: Clavero. 2004.



Figura 4. Prueba de compatibilidad de cepas.

2.1.8 Nivel de patogenicidad de las cepas.

El nivel de patogenicidad de las cepas y cruzas de *U. maydis* se determina en plántulas de maíz bajo condiciones controladas (invernadero). La inoculación se efectúa cuando las plántulas tienen aproximadamente 9 días de emergidas. La inoculación se realiza en el tallo a una distancia aproximada de 1 cm de la base del suelo. La cantidad de inóculo es de 100µl a una concentración celular de 2.5 x10⁶ células / ml por cada cepa. Después de dos semanas se puede determinar el grado de patogenicidad (tabla 4) mediante los síntomas presentados.

Comentario [LCE15]: Sobra espacio

Tabla 4. Escala de valores para la determinación de la patogenicidad de *U. maydis* en plántulas (adaptada por Barret, 1993).

VALOR	GRADO DE ENFERMEDAD
0	Planta sana o sin síntomas de la enfermedad
1	Pigmentación por presencia de antocianinas (color rojo)
2	Agallas pequeñas y/o escasas en hoja y/o tallo
3	Agallas medianas y/o abundantes en hoja y/o tallo
4	Agallas grandes y/o muy abundantes en hojas y/o tallo
5	Muerte de plántula con síntomas severos de la infección

Fuente: Álvarez, 1999

2.2 El Huitlacoche

Lo que se conoce como huitlacoche son las agallas o tumores que se forman en la mazorca del maíz por la acción del hongo *Ustilago maydis*. En México el huitlacoche se consume desde la época de los aztecas (Paredes y col., 1999). Al huitlacoche también se le conoce como *cuitlacoche*, palabra de origen azteca que traducida al español significa suciedad prieta o de cuervo. Los aztecas presuntamente atribuían la incidencia del hongo negro a la presencia de cuervos volando sobre sus campos de maíz (Kealey and kosikowski, 1981).

Comentario [LCE16]: Sobra espacio

2.2.1 Producción

En los últimos años se ha observado un marcado interés por la producción de hongos comestibles en México. Encabeza la lista el champiñón (*Agaricus bisporus*) y las setas (*Pleurotus ostreatus*) (Paredes y Valverde, 1999). Otro hongo que se produce en la actualidad es el huitlacoche (*Ustilago maydis*) el cual ha representado una fuente alimenticia muy cotizada y altamente apreciada desde tiempos prehispánicos. Recientemente el huitlacoche ha sido considerado como una alternativa de cultivo debido al incremento de la popularidad que ha adquirido como alimento (Vanegas y col., 1995).

Comentario [LCE17]: Sobra espacio

Comentario [LCE18]: Falta espacio

El huitlacoche que se produce para el consumo y comercialización es el recolectado en campos de maíz donde se presentan infecciones naturales, que se dejan a propósito; dándose esto mayormente en las regiones del centro y sur del país. El producto se ofrece en mercados al aire libre y/o tiendas de autoservicio. Una gran parte de la cosecha es adquirida por compañías procesadoras de alimentos enlatados para su comercialización interna y de exportación, por lo que últimamente la producción es insuficiente para la demanda existente (Ruiz, 1999).

Comentario [LCE19]: Sobra espacio

Comentario [LCE20]: El párrafo siguiente debe seguir aquí con un punto y seguido.

A este respecto la producción de huitlacoche mediante técnicas de inoculación artificial (con cepas altamente infectivas) aunado con el control de parámetros como lo son: la forma y lugar de inoculación de mazorcas, tiempo optimo de fecundación de maíz para efectuar la inoculación, fertilización y densidad de plantas de maíz representa una buena alternativa para garantizar que la producción en forma masiva del hongo se traduzca a altos rendimientos y así poder satisfacer la demanda creciente.

2.2.1.1 Factores que afectan la producción de huitlacoche

El crecimiento micelial y la fructificación de los hongos se ve afectada por una gran variedad de factores. Entender las respuestas de las diferentes especies a estos factores es primordial para el diseño de tecnologías para su producción (Paredes y Valverde, 1999).

Comentario [LCE21]: Falta espacio

Comentario [LCE22]: Falta espacio

a) Humedad

Algunos autores mencionan que es necesaria la presencia de humedad para el desarrollo e *U. maydis*. Según Valverde y col., (1995), la humead es necesaria para la para la germinación y el mantenimiento del tubo germinativo en crecimiento hasta que el hospedero es penetrado. López (1988), citado por Garibaldi (2003), observó que se formaron mayores cantidades de agallas con la humedad relativa entre 72 y 80% además menciona que existe cierta tendencia a incrementar la cantidad de agallas formadas conforme aumenta la precipitación pluvial. Sin embargo, otros investigadores definen que condiciones secas conducen a la preservación del hongo. Walter mostró que las teliosporas secas son forzadas a germinar en la región meristemática y causar infección sin la adición de agua (Valverde y col., 1995).

Comentario [LCE23]: Este párrafo debe juntarse con el anterior, porque continua sobre el mismo tópico.

b) Temperatura

Según Paredes y Valverde (1999), las temperaturas relativamente altas favorecen la germinación de las teliosporas, gemación de esporidias, crecimiento del micelio filamentosos y la formación de nuevas teliosporas. La mayoría de los investigadores coinciden que el hongo se desarrolla muy bien entre 25 -30 °C.

Comentario [LCE24]: No está claro si la cita es de ambas publicaciones o que parte es de cada cual.

c) Vigor del hospedero

El desarrollo de la planta es de vital importancia en el crecimiento del hongo. Varios autores han observado que las plantas más vigorosas y suculentas presentan más agallas y que éstas son mucho más grandes; por lo tanto el vigor de la planta está directamente asociado con la susceptibilidad, mientras que la incidencia de la enfermedad está relacionada con la nutrición de la planta. Sin embargo la incidencia de la enfermedad no solo depende del vigor de la planta, sino también de la susceptibilidad y de las condiciones de crecimiento (Paredes y Valverde, 1999).

Varios investigadores coinciden que los tratamientos que estimulan la producción y el vigor en la planta, como las altas dosis de nitrógeno y materia orgánica, también incrementan la enfermedad significativamente. Garibaldi (2003), en el Valle del Yaqui obtuvo un aumento en la producción de huitlacoche de 46.2% al incrementar la dosis de fertilizante nitrogenado de 150 a 300 Kg/ha .

e) Densidad de plantas

La densidad de plantas está directamente relacionada con el rendimiento que presente el huitlacoche en su cosecha. Según Kostandi (1992), citado por Garibaldi (2003), la incidencia de la infección es menor en un 6.6% al utilizar

alta densidad (56,000 plantas/ha) en comparación al uso de baja densidad (35,000 plantas /ha). Sin embargo, Garibaldi (2003), probó tres diferentes densidades de plantas (31,000, 46,500 y 62,000 plantas /ha) para la inoculación artificial de *U. maydis* en maíz maíz en el Valle del Yaqui, no encontrando diferencias estadísticas significativa en el porcentaje de plantas infectadas entre las diferentes densidades.

f) Técnica de inoculación artificial

El aumento del consumo de huitlacoche ha dado pie a que se considere su producción a gran escala. Desde siempre, los agricultores han buscado la forma de producir huitlacoche utilizando para esto varias estrategias no obstante los avances más significativos se han dado en años recientes.

Flores del Campo (1991), citado por Ulloa (2002), comparó tres técnicas de inoculación los cuales consistieron en; 1).- Mezcla de teliosporas de *U. maydis* con la semilla de maíz; 2).- asperjar teliosporas al cogollo en etapa de 6 a 8 hojas; 3).-Inyectando teliosporas al jilote al presentarse el 50% de la polinización. El mejor método fue el de inyección en el jilote, ya que al inocular el patógeno, se hace una herida en la planta por donde puede penetrar más fácilmente dicho organismo. Christensen, 1963 citado por Paredes y Valverde, 1999, quien reporta que la inyección de esporidias en la planta de maíz produce un alto índice de infección. Comúnmente la inyección del hongo se efectúa en la mazorca ya que se ha visto que las agallas más grandes y prominentes son las que se encuentran en dicho lugar.

Otros investigadores concuerdan que la técnica de inoculación por inyección puede ser útil para la producción comercial del huitlacoche, pero consideran sumamente importante la evaluación de factores que contribuyan a una producción óptima y calidad del producto. Tal es el caso de la agresividad de las líneas esporidiales del hongo que se utilicen en la inoculación, el tiempo optimo

de fecundación del maíz, además el lugar y forma de efectuar la inoculación en la mazorca.

Snetselaar y Mims, 1993; citado por Álvarez, 1999, sugieren que los estigmas sin polinizar son más susceptibles a la infección que los polinizados.

Comentario [LCE25]: Unir este párrafo al anterior

Du Toit y Pataky (1999), evaluaron el efecto de la polinización del maíz en la infección a través de las sedas. Para este estudio se cubrieron las pequeñas mazorcas con bolsas de papel antes de que emergieran las sedas para evitar la polinización y otras mazorcas no fueron cubiertas para permitir que las sedas fueran polinizadas normalmente. Las bolsas fueron removidas de las mazorcas una vez efectuada la inoculación para permitir la polinización. Las inoculaciones se efectuaron desde estadios tempranos de emergencia de las sedas hasta los 16 días después de la emergencia de estas. Su conclusión fue que las mazorcas de maíz fueron susceptibles a la infección por *U. maydis* desde la emergencia de las sedas hasta los 8 a 14 días después de haber emergido las éstas. Después de este período de susceptibilidad, la incidencia de mazorcas con agallas decreció conforme envejecían las sedas. En el mismo año, los investigadores Du Toit y Pataky realizaron otro estudio en el cual, evaluaron el efecto de la concentración de inóculo en el desarrollo de las agallas. Las concentraciones evaluadas fueron cuatro (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6) encontrándose que el máximo desarrollo de agallas ocurre a concentraciones de inóculo de entre 10^5 y 10^6 esporas/ml.

Comentario [LCE26]: Sobra espacio

Comentario [MSOFFICE27]:

Comentario [MSOFFICE28]:

Comentario [LCE29]: Dar espacio entre cada uno

Ulloa (2002), cita que el tiempo óptimo de la fecundación de maíz para la inoculación artificial del hongo *U. maydis* fue desde antes de la fecundación (antes de que emerjan las sedas o estilos del jilote) hasta el inicio de la fecundación (cuando las sedas empiezan a emerger del jilote hasta que alcanzan una longitud de 6 cm.) Para este estudio el inóculo fue a una concentración de 2.5×10^6 células por mililitro la suspensión de esporas (cepas ITSON C₂ y C₃) y la inoculación se llevó a cabo mediante jeringas hipodérmicas

inoculando 1ml de dicha suspensión a cada jilote. En este mismo estudio Ulloa, también determinó el sitio en la mazorca en donde se presentó un mayor porcentaje de infección evaluando la base y centro del jilote encontrando un porcentaje de infección del 76.73 para el tratamiento de inoculación ubicado en el centro de la mazorca al inicio de la fecundación. Ruiz y Castro, 2001 encontraron que la inoculación artificial de *U. maydis* en el centro del jilote es el mejor sitio.

Comentario [LCE30]: Falta acento

2.2.2 Importancia como alimento

México y otros países latinoamericanos, desde épocas prehispánicas, las agallas jóvenes del maíz infectado con *U. maydis* son usadas como alimento sin que se conociera mucho sobre su valor nutricional. El valor que se le da a un alimento se basa en su composición proximal. El huitlacoche contiene carbohidratos, proteínas, grasas, minerales y vitaminas (tabla 5) que contribuyen a su valor nutricional (Valverde y col., 1993).

En cuanto a la proporción de proteínas contenidas en el huitlacoche respecto a otros hongos comestibles (tabla 6), se tiene que en comparación con el champiñón, el huitlacoche presenta una cantidad de proteína moderada; sin embargo ésta resulta superior a las cantidades presentes en el maíz y otros vegetales.

Comentario [LCE31]: Sobre espacio

Tabla 5. Composición proximal del huitlacoche.

COMPONENTE	PESO SECO (g/100g)
Proteína	11.5-16.4
Grasa	1.6-2.3
Ceniza	5.2-7.0
Fibra	16.0-23.5
Carbohidratos	55.1-66.5

Fuente: Paredes y Valverde , 1999.

Tabla 6. Contenido proteínico de algunos hongos comestibles.

HONGO	NOMBRE COMÚN	PROTEÍNA (g/100g Base seca)
<i>Agaricus bisporus</i>	champiñón	26.9
<i>Pleorotus ostreatus</i>	setas	15
<i>Ustilago maydis</i>	huitlacoche	11.5-16.4

Fuente: Paredes y Valverde , 1999.

Las proteínas del huitlacoche contienen cantidades apropiadas de todos los aminoácidos esenciales para la dieta de los adultos. Se considera por lo tanto que este hongo contiene proteínas de buena calidad. Dichas proteínas cuentan con un extraordinariamente alto contenido de lisina (6.3 a 7.3 g/100g de proteína), el cual resulta ser elevado en relación a lo que se ha reportado para maíz y otros vegetales. Aquí vale la pena destacar que la lisina, es el componente esencial de las proteínas deficiente por excelencia en el maíz. Es decir, es un inteligente acierto nutricional la complementación histórica que han hecho las distintas culturas mexicanas al consumir huitlacoche con tortilla. Aunado a lo anterior, este hongo presenta cantidades importantes de ácido oleico y linoleico (ácidos grasos esenciales) sumando del 72.1 al 73.6% del total de los ácidos grasos presentes (Valverde y Paredes, 1993; Vanegas y col., 1995; Paredes y Valverde, 1999; Paredes y col., 2000).

Se ha comprobado que el *U. maydis* no segrega ningún tipo de toxinas que puedan afectar la salud (Valverde y Paredes, 1993; Kealey and Kosikowski, 1981), por lo anterior se afirma que el consumo de huitlacoche como alimento, a este respecto, es seguro.

2.2.3 Demanda y consumo

La popularidad del huitlacoche como comida típica mexicana de origen prehispánico ha rebasado las fronteras de México, no obstante su aspecto poco

agradable a la vista. Recientemente, la demanda de este exquisito hongo ha aumentado considerablemente y se ha introducido a los Estados Unidos y Europa, donde se le ha asignado deferentes nombres como: “Caviar azteca”, “Trufa Mexicana” o “Maizteca”, entre otros. Su descripción como delicadeza culinaria ha sido el tema de periódicos y revistas importantes como: New York Magazine, Food Arts, Science News, Bon Appetit, Vogue, por mencionar algunas (Paredes y Valverde, 1999). En México el huitlacoche se comercializa en tres formas:

- En estado fresco
- Congelado
- Enlatado

En los mercados de la ciudad de México se venden, anualmente, de 4 a 500 toneladas de agallas frescas de huitlacoche (Kealey and Kosikoski, 1981). En los estados unidos el huitlacoche fresco o congelado se ha cotizado hasta por \$20 dólares por kilogramo (Valverde y col., 1993).

La compañía mexicana Herdez S.A. patentó el procedo de enlatado del huitlacoche. Cerca de 100 toneladas de huitlacoche son procesadas al año por Herdez; sin embargo la demanda de este exquisito hongo es mayor de la que puede suplir esta compañía con la producción natural (Paredes y Valverde, 1999). Existen otras presentaciones de huitlacoche en el mercado; aparte del enlatado en salmuera, se encuentra preparado con chile y cebolla por la compañía Monteblanco o por la San Miguel y también como crema de huitlacoche elaborada por la compañía Cremissima de Querétaro (Paredes y Valverde, 1999).

Actualmente, en México se cuenta con una gran variedad de deliciosos platillos preparados a base de huitlacoche tales como la sopa de huitlacoche, crepas de huitlacoche, sufle de huitlacoche, helado de huitlacoche entre muchos otros. Sin embargo la manera más tradicional de consumir este hongo es en forma de quesadillas.

2.3 El maíz

2.3.1 Origen

Maíz, palabra de origen indio caribeño, significa literalmente «lo que sustenta la vida». El cultivo del maíz tuvo su origen, con toda probabilidad, en América Central, especialmente en México, de donde se difundió hacia el norte hasta el Canadá y hacia el sur hasta la Argentina. La evidencia más antigua de la existencia del maíz, de unos 7 000 años de antigüedad, ha sido encontrada por arqueólogos en el valle de Tehuacán (México) pero es posible que hubiese otros centros secundarios de origen en América. Este cereal era un artículo esencial en las civilizaciones Maya y Azteca y tuvo un importante papel en sus creencias religiosas, festividades y en la nutrición; ambos pueblos afirmaban que la carne y la sangre estaban formadas por maíz. La supervivencia del maíz más antiguo y su difusión se debió a los seres humanos, quienes recogieron las semillas para posteriormente plantarlas. A finales del siglo XV, tras el descubrimiento del continente americano por Cristóbal Colón, el grano fue introducido en Europa a través de España (FAO, 1993).

Comentario [LCE32]: Falta acento

Comentario [LCE33]: espacio

2.3.2 Importancia

Con una superficie que varía de 7.8 a 9.1 millones de hectáreas sembradas anualmente a nivel nacional (VADEMECUM AGRÍCOLA: Agroquímicos y semillas, 1999) el maíz ocupa el primer lugar en importancia agrícola a nivel mundial. El maíz suministra elementos nutritivos a los seres humanos y a los animales y es una materia prima básica de la industria de transformación, con la que se producen almidón, aceite y proteínas, edulcorantes alimenticios y, desde hace poco, combustible. La planta tierna, empleada como forraje, se ha utilizado con gran éxito en las industrias lácteas y cárnicas y, tras la recolección del grano, las hojas secas y la parte superior, incluidas las flores, aún se utilizan hoy

en día como forraje de calidad relativamente buena, para alimentar a los rumiantes de muchos pequeños agricultores de los países en desarrollo (FAO, 1993).

2.3.3 Características botánica

El maíz (*Zea mays* L) pertenece a la familia de las gramíneas. Se trata de un cereal que presenta una gran cantidad de variedades clasificadas en las siguientes categorías atendiendo a la estructura de sus granos:

- Maíz dentado; caracterizado por una depresión en el grano
- Maíz duro; granos duros y de aspecto liso
- Maíz azucarado
- Maíz harinoso
- Maíz palomero

El sistema radicular de esta planta es fasciculado, de gran potencia y de rápido desarrollo. El tallo puede elevarse a alturas de hasta 4m, incluso más en algunas variedades. Las hojas son anchas y abrasadoras. La planta es diclina y monoica. Las flores femeninas aparecen en las axilas de algunas hojas y están agrupadas en una espiga rodeadas de largas brácteas. A esta espiga se le suele llamar mazorca. La mazorca esta formada por una parte llamada zuro, este representa del 15 al 30% del peso de la espiga. El grano se dispone en hileras longitudinales, teniendo cada mazorca varios centenares. Las flores masculinas aparecen en la extremidad del tallo y están agrupadas en panículas. En la extremidad de la espiga aparecen largos estilos en forma de pincel, los cuales se denominan vulgarmente barbas o sedas, y que se obscurecen después de la fecundación. La fecundación de las flores femeninas pueden hacerse por polen de la misma planta o de otras. El número de hojas varia de 8 a 48. El número de mazorcas, casi siempre una por planta, se puede duplicar o triplicar. El tamaño de la mazorca puede cambiar hasta más de 60 centímetros de largo y el tamaño

de los granos o semillas tiene un rango de variación extrema entre las diferentes variedades (Guerrero, 1987).

2.3.4 Ciclo vegetativo

Según Guerrero, 1987 en el ciclo vegetativo del maíz pueden destacarse cinco fases:

Emergencia de plántulas. La emergencia de plántulas comprende el período que transcurre desde la siembra hasta la aparición del coleóptilo, cuya duración aproximada es de seis a ocho días.

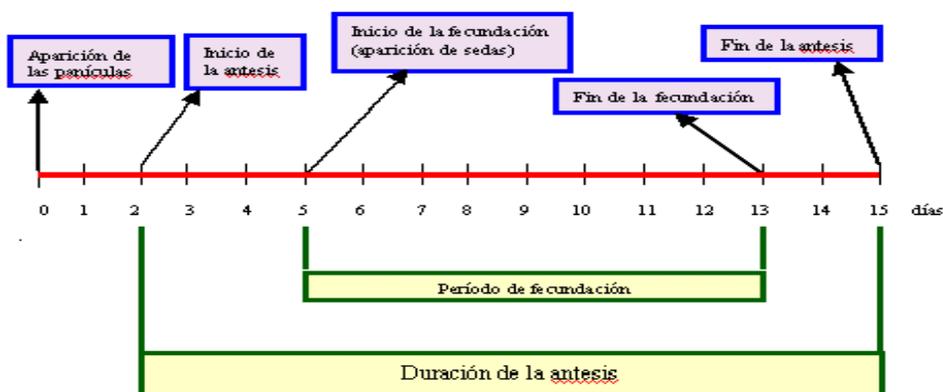
La germinación es un estado crítico en la vida de una planta. Una germinación lenta, producida por condiciones desfavorables, puede dar lugar a la incidencia de patógenos que comprometen el futuro del cultivo.

Crecimiento. Una vez nacido el maíz, aparece una nueva hoja cada tres días, si las condiciones climáticas y agronómicas son las adecuadas. Entre los quince y veinte días siguientes a la emergencia de la plántula, la planta debe tener ya cinco o seis hojas (figura 5), y entre la cuarta y quinta semana la planta deberá tener formadas todas sus hojas.



Figura 5. El cultivo de maíz en etapa de crecimiento

Floración. Se considera como floración el momento en que la panoja se encuentra emitiendo polen y se producen los alargamiento de los estilos (figura 6). El período más crítico de la planta de maíz es el que transcurre desde tres semanas previas a la floración, acusando más adelante cualquier deficiencia producida en este momento de manera irreparable. Es importante en este espacio de tiempo que no carezca la planta de agua ni de nitrógeno.



Fuente: López, 1991.

Figura 6. Período promedio de floración en un cultivo de maíz híbrido.

Fructificación. Con la fecundación de los óvulos por el polen se inicia la fructificación. Una vez realizada la fecundación, los estilos de la mazorca cambian de color, volviéndose castaños. Transcurrida la tercera semana después de la polinización, la mazorca toma el tamaño definitivo, se forman los granos y aparece en ellos el embrión. Los granos se llenan de una sustancia lechosa, rica en azúcares, los cuales se transforman al final de la quinta semana en almidón.

Maduración y secado. Hacia al final de la octava semana después de la polinización, el grano alcanza su máximo de materia seca pudiéndose considerar que ha llegado a su madurez fisiológica (humedad alrededor de

35%). A medida en que el grano va perdiendo humedad se acerca a su madurez comercial.

2.3.5 Características del híbrido A-7573

A-7573 Híbrido de ASGROW Mexicana S.A. de C.V. fue desarrollado para la producción de maíz grano-elote-forraje. Este fácilmente adaptable a las condiciones del noroeste de México. En la tabla 7 se presenta algunos datos y características importantes del híbrido.

Tabla 7. Características del híbrido A-7573

CARACTERÍSTICA	CARACTERÍSTICAS DEL HÍBRIDO
Uso	Maíz grano-Elote-Forraje
Fecha de siembra para el valle del Yaqui y Mayo	Ciclo O/I : Agosto 1 al 31 Primavera: Marzo 15 al 31 Verano: Mayo 15 a Julio 15
Densidad de siembra	60,000 a 65,000 plantas por hectárea
Días a floración a partir de la siembra	60 a 70
Días a cosecha	85 a 100
Color del grano	Blanco
Color del elote	Blanco
Madurez	Intermedio precoz
Potencial de rendimiento	Excelente
Altura de la planta a la punta de la espiga (cm)	230 a 260
Altura de la mazorca (cm)	110 a 130
Desarrollo inicial	Excelente
Tallos	Bueno
Raíces	Excelente
Cobertura de mazorca	Excelente
Retención de mazorca	Excelente
Sanidad de mazorca	Buena
<i>Resistencia</i>	
Resistente	Virus (MDMV y MCDV), Mancha foliar (<i>C. maydis</i>).
Moderadamente resistente	Roya común (<i>Puccinia graminis</i>), Pudrición del tallo (<i>Fusarium ssp.</i>), Carbón común (<i>Ustilago maydis</i>).
Bajo nivel de resistencia	Tizón foliar (<i>E. turcicum-Raza1</i>).

Fuente: VADEMECUM AGRÍCOLA: Agroquímicos y semillas, 1999.

2.4 Investigaciones con *Ustilago maydis* realizadas en el Valle del Yaqui

Álvarez (1999), llevó a cabo una investigación la cual consistió en el aislamiento y evaluación de la patogenicidad de cepas de *Ustilago maydis* recolectadas a partir de infecciones naturales presentadas en distintas localidades del Valle del Yaqui en el período Diciembre de 1997 a Diciembre de 1998. De este experimento se obtuvieron ocho cepas puras a las cuales se les procedió a realizar las pruebas de compatibilidad *in vitro* e *in vivo* en plántulas de maíz en invernadero resultando las cruza formadas por las cepas C₂-C₃ y C₆-C₈ las capaces de producir la enfermedad del carbón del maíz con un grado de infección adecuada para la inducción de tumores en las plantas.

Ruiz (1999), en el Valle del Yaqui probó diferentes etapas del maíz y sitios de inoculación en plantas adultas de híbridos regionales de maíz bajo condiciones de campo en siembra de invierno con una densidad de 31250 plantas por hectárea, fertilización con abonos químicos y orgánicos y riegos por gravedad. Los híbridos de maíz evaluados fueron: CIANO H-431 y PNS-4019. Utilizó la cruza de cepas (C₂-C₃) de *U. maydis* previa prueba de compatibilidad para ocasionar la infección llevada a cabo en laboratorio e invernadero en plántulas. Los sitios de inoculación probados fueron: en tallo a la altura del 6º y 7º nudo antes de la floración, y en la floración cuando los estigmas se encontraban entre 3 y 6 cm fuera de las espatas, inoculando en la punta, centro y base del jilote. Se usaron jeringas hipodérmicas de 20mm., depositando un mililitro de la suspensión de esporas por la planta a una concentración aproximada de 3.0 x 10⁶ células por mililitro. Se midió el porcentaje de infección y la producción de huitlacoche limpio determinándose el porcentaje de infección de entre 31.9 a 75.8% en el híbrido PNS-4019 y de 26.6 a 57.5% en el híbrido CIANO H-431 cuando la inoculación fue en el jilote. Los índices de severidad de la infección oscilaron entre 21.32 a 33.88 para los tratamientos con inoculación en el tallo en el 7º nudo antes de la floración y los tres sitios de inoculación del jilote. Los

máximos rendimientos de huitlacoche se obtuvieron con el híbrido PNS-4019 (1937 Kg/ha) con la inoculación en el centro del jilote, superando significativamente a CIANO H-431 el cual presentó una producción de 767 Kg/ha con el mismo tratamiento de inoculación.

De esta investigación el autor concluye que es posible producir huitlacoche en híbridos regionales de maíz blanco induciendo la infección de *U. maydis* en siembras de invierno en el Valle del Yaqui, siendo el híbrido PNS-4019 y el tratamiento de infección en el centro del jilote los mejores para este propósito.

Ulloa (2002), evaluó el efecto del período de fecundación del maíz en la infección de *Ustilago maydis* inoculado artificialmente para la producción de huitlacoche. Este estudio se realizó en la dirección de investigación y estudios de postgrado del ITSON durante el período de enero a agosto de 2000. El híbrido de maíz utilizado para este estudio fue el PNS-4019 al cual, en investigaciones anteriores, se le había probado sus susceptibilidad a la enfermedad. Se utilizó la crusa de cepas locales (C2-C3) obtenida en 1998 por Álvarez. Los jilotes de maíz fueron inoculados con 1 ml de una suspensión de esporas con una concentración de 2.5×10^6 células por mililitro, en la base y centro de estos en los diferentes períodos de fecundación del maíz, el cual se clasifico en cuatro etapas: 1) antes de la fecundación; 2) inicio de la fecundación (en la emergencia de sedas hasta longitud de 6cm fuera de las espatas y su color es verde tierno); 3) mitad de la fecundación (sedas con 7 a 13 cm fuera de las espatas); 4)final de la fecundación (sedas mayores de 14 cm fuera de las espatas y con color oscuro).

La cosecha de huitlacoche se realizó entre los 12 a 23 días después de la inoculación y se determinó el índice de severidad de la infección, el porcentaje de plantas infectadas, el rendimiento de huitlacoche y el grado de cubrimiento de mazorcas. Los mejores resultados se obtuvieron al inocular en el centro del jilote al inicio de la fecundación, con un 76.73% de plantas infectadas, un índice de

severidad de la infección de 57.6 y un rendimiento de 1678 Kg/ha de huitlacoche; además fue el tratamiento que mayor porcentaje de mazorcas con cubrimiento de huitlacoche en grado de 50 a 100%, con un 76.8%. La cosecha de huitlacoche fue en un estado tierno de buena calidad para el consumo.

El autor llega a la conclusión que el mejor sitio para la inoculación artificial de *Ustilago maydis*, fue el centro del jilote; que el tiempo de óptimo para la inoculación del maíz fue desde antes hasta el inicio de la fecundación. Así mismo, el mayor rendimiento, mayor grado de infección y mayor porcentaje de cubrimiento del 50 al 100% de huitlacoche se obtuvo con la inoculación en el centro del jilote al inicio de la fecundación coincidiendo con los resultados obtenidos por Ruiz y col., en el año 2001.

Garibaldi (2003), realizó una investigación en el Campo Experimental del ITSON, localizado en la manzana 910 del Valle del Yaqui cuyo objetivo fue evaluar el efecto de las dos dosis de fertilización nitrogenada (150 y 300 Kg/ha) y tres densidades de plantas de maíz por hectárea (62,000, 46,500 y 231,000), bajo el sistema de fertigación y acolchonado plástico, en el rendimiento de huitlacoche. Para esto, se utilizó la cruz de cepas de *Ustilago maydis* ITSON C₂-C₃ inoculadas artificialmente en el centro del jilote el inicio de la fecundación del maíz (híbrido PNS-4019). Se evaluó el porcentaje de infección, rendimiento de huitlacoche y mazorcas comercializables.

El mayor rendimiento de mazorcas comercializables fue de 7,396 Kg/ha y el mayor rendimiento de huitlacoche limpio fue de 3,854 Kg/ha al usar altas dosis de fertilizante nitrogenado. La dosis de 300 Kg/ha de nitrógeno incrementó el porcentaje de infección 5.02 %, el rendimiento de huitlacoche en 1 Ton. y el rendimiento de mazorcas comercializables en 2,296.48 Kg/ha respecto a la dosis de 150 Kg/ha. Además, el mayor rendimiento de huitlacoche respecto a la densidad de plantas se obtuvo que al sembrar con altas densidades (61,000 y 45,500 plantas por hectárea) y el uso de acolchonado plástico incrementó el porcentaje de las mazorcas comercializables en un 8.21 %. De lo cual el autor

concluye que se pueden incrementar significativamente el rendimiento de huitlacoche al aumentar las dosis de nitrógeno.

Clavero (2004), realizó una investigación con el objetivo de evaluar la compatibilidad *in vitro* e *in vivo* y el grado de patogenicidad de cepas de *Ustilago maydis* aisladas en el Valle del Yaqui.

Comentario [LCE34]: A como está redactado el objetivo, indica que tu solo aislarás las cepas, sin que tengas el compromiso de evaluarlas, cuando lo fueite del trabajo es la evaluación de la patogenicidad. Entonces ¡cuál deberá ser el verbo del objetivo?.

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Ecodesarrollo en la Dirección de Recursos Naturales y en el invernadero del Instituto Tecnológico de Sonora, la cual se dividió en dos experimentos: evaluación de la compatibilidad *in vitro* y evaluación de la compatibilidad y patogenicidad *in vivo* de cepas locales de *U. maydis*.

La primera parte consistió en evaluar la compatibilidad genética de las cepas de *U. maydis* en un medio de cultivo especial para este propósito, donde la compatibilidad se manifiesta mediante la aparición de un micelio blanco algodonoso al combinarse ambas cepas.

En la segunda parte se evaluó en plántulas de maíz la compatibilidad y el grado de patogenicidad según la escala propuesta por Barret, en donde las plántulas fueron inoculadas con las cruza obtenidas. Se determinó como cepas compatibles y capaces de inducir la enfermedad a aquellas cruza que presentaran un nivel de patogenicidad igual o mayor a 2 según la escala antes citada.

En cuanto a los resultados arrojados por el análisis en plántulas de maíz se presentaron diferentes y variados grados de patogenicidad. De las 117 cruza estudiadas 25 de ellas estuvieron dentro del rango deseado, donde los tratamientos 49, 91 y 97 (cruza A₄-A₁₀, A₈-A₁₄ y A₉-A₁₃) resultaron ser los mejores. Así mismo se encontraron cuatro cepas solopatogénicas, una de ellas con el grado de patogenicidad deseado y las otras tres con grados de

Comentario [LCE35]: Sobra espacio

patogenicidad por debajo del nivel buscado, pero con grandes posibilidades de producción de la enfermedad.

III. MÉTODO

3.1 Localización del experimento

Los experimentos de esta investigación se llevaron a cabo en los laboratorios de la Dirección de Recursos Naturales del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON) de Cd. Obregón y en terrenos del ITSON ubicados en la manzana 204 del Valle del Yaqui, Sonora, México

3.2 Preparación del cultivo de maíz

La semilla de maíz utilizada para la siembra fue un híbrido de la empresa ASGROW S.A. variedad denominada A-7573 cuyas características se muestran en la tabla 7 de la sección de revisión de literatura.

La siembra se efectuó el 01 de Septiembre de 2003, sobre un terreno previamente labrado y utilizando el método de siembra en seco y el sistema de riego por gravedad. En la tabla 8 se muestran actividades realizadas al cultivo con sus correspondientes fechas.

Tabla 8. Actividades realizadas en la preparación del cultivo de maíz

ACTIVIDAD	DDS*	FECHA (día/mes/año)
Fertilización ^a	presiembra	01/09/2003
Riego de germinación	01	03/09/2003
Aplicación de insecticida ^b	14	16/09/2003
Aplicación de herbicida ^c	24	26/09/2003
Primer riego de auxilio ^d	38	10/10/2003
Segundo riego de auxilio	60	01/11/2003

*DDS: días después de la siembra

^a Se aplicó en suelo antes de la siembra 300 Kg/ha de urea (46% N₂), 100 Kg/ha de fosfato monoamónico.

^b Aplicación de insecticida contra gusano cogollero (ingrediente activo clorpirifos) 1 l/ha.

^c Aplicación de herbicida contra maleza de hoja ancha (banvel 12-24) 1 l/ha.

^d En agua de riego se aplicó 80 Kg/ha de nitrógeno en forma de agua amoniacal.

3.3 Cepas de *Ustilago maydis*

Las cepas utilizadas para esta investigación fueron aisladas de distintos puntos del Valle del Yaqui por Clavero en el año 2004 (tabla 9).

Tabla 9. Número y denominación de las cepas de *U. maydis* utilizadas en la investigación.

NÚMERO	CEPA
1	A ₃
2	A ₄
3	A ₅
4	A ₈
5	A ₉
6	A ₁₀
7	A ₁₃
8	A ₁₄

Las cruces y cepas solopatogénicas evaluadas (tabla 10 y 11 respectivamente) fueron las que según Clavero, (2004) mostraron mayor grado de patogenicidad en plántulas.

Tabla 10. Cruzas de las cepas de *U. maydis* utilizadas para la inoculación artificial en maíz y su respectivo tratamiento asignado.

CRUZAS	TRATAMIENTO ASIGNADO
A ₃ - A ₉	A
A ₈ - A ₁₄	C
A ₄ - A ₁₀	D
A ₉ - A ₁₃	E
A ₅ - A ₉	F
A ₃ - A ₁₀	G
Testigo	T

Tabla 11. Cepas solopatogénicas de *U. maydis* utilizadas para la inoculación artificial en maíz y su tratamiento asignado

CEPA	TRATAMIENTO ASIGNADO
A ₈	B
A ₁₄	H

3.4 Diseño experimental

El diseño utilizado para el estudio fue el de parcelas divididas, con arreglo en bloques completamente al azar con 9 tratamientos y 3 repeticiones. La parcela experimental consistió de 9 surcos de 17 m de longitud (dividido en 3 secciones de 5 m y 1 m de espacio entre ellos) separados a 0.80 m. Las dimensiones de la parcela experimental y la distribución de los tratamientos se muestra en la figura 7.

Se efectuó el análisis de varianza de una sola vía con un nivel de significancia estadística del 0.05, para este fin se utilizó el paquete Statgraphics Plus 3.0. El factor evaluado corresponde a las cruzas y cepas solopatogénicas de *U. maydis*.

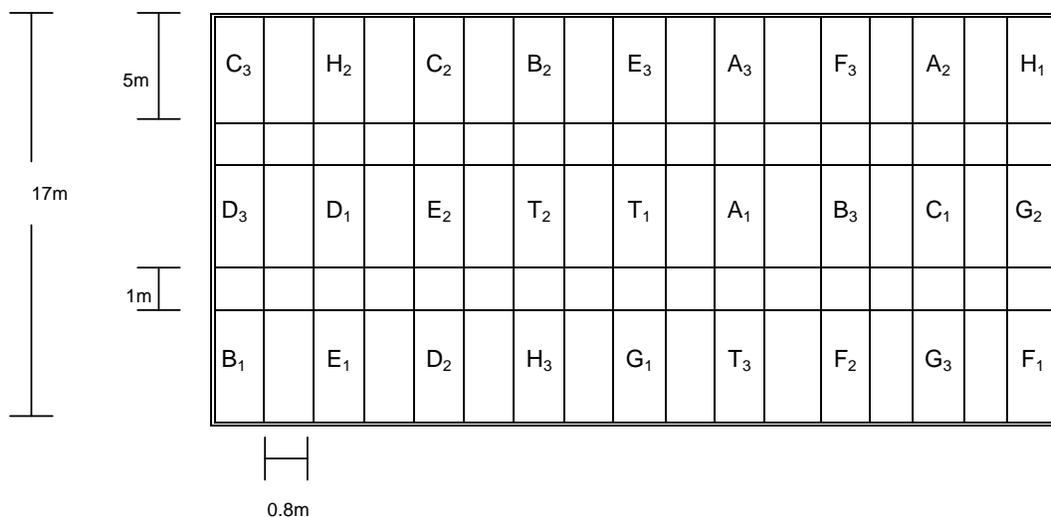


Figura 7. Distribución en campo de los tratamientos y sus repeticiones.

3.5 Preparación del inóculo

En el laboratorio se sembraron por separado cada una de las ocho cepas de *U. maydis*, en tubos de ensayo los cuales contenían 5 ml de caldo dextrosa de papa (CDP). Estos se incubaron por 18 a 20 horas a $28 \pm 2^\circ$ C en baño maría con agitación a 200 rpm.

Posteriormente se realizó un segundo paso de inóculo a matraces de 250 ml que contenían 125 ml de CDP los cuales se incubaron a las mismas condiciones que el cultivo anterior solo que dejándose por 36 horas. A estos últimos cultivos se les evaluó la concentración celular mediante diluciones y conteo de células con la ayuda de la cámara de Neubauer. Una vez determinadas dichas concentraciones de cada cultivo, se determinó, mediante cálculos analíticos, el volumen necesario de cada cepa para obtener una concentración final de 2.5×10^6 células por mililitro en un volumen conocido. En matraces estériles, etiquetados con sus respectivos tratamientos, se agregaron los volúmenes calculados (V_1) de las dos cepas correspondientes a la cruce determinada y se aforó con agua destilada estéril hasta obtener el volumen final deseado (120 ml).

Para el caso de las cepas solopatógenicas solamente se determinó un volumen (V_1) y se procedió a aforar a 120 ml. A continuación se muestra la fórmula empleada para dichos cálculos:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

Donde:

C_1 = Concentración evaluada para el cultivo

V_1 = Volumen desconocido

C_2 = Concentración deseada = 2.5×10^6 células por mililitro

V_2 = Volumen deseado (120 ml)

3.6 Inoculación de los tratamientos

La inoculación se llevó a cabo a los 7 días después de la fecha en que se presentó la floración masculina (tabla 12). Utilizando jeringas hipodérmicas de 20 ml se inyectó, de manera transversal en el centro de la mazorca, 1ml de suspensión de cada uno de los tratamientos en el campo experimental.

Tabla 12. Calendario de eventos.

EVENTO	DDS*	FECHA (día/mes/año)
Emergencia de plántulas	5	07/09/2003
Floración masculina	46	23/10/2003
Inoculación del hongo	53	30/10/2003

*DDS: días después de la siembra

3.7 Variables a evaluar

3.7.1 Porcentaje de infección

Para determinar esta variable se contabilizaron las plantas de maíz inoculadas con esporas de *U. maydis* en cada tratamiento y después las mazorcas infectadas. Se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de infección} = \frac{\# \text{ de plantas infectadas}}{\# \text{ de plantas inoculadas}} \times 100$$

3.7.2 Cubrimiento de huitlacoche en mazorcas

El grado de cubrimiento se determinó visualmente a cada mazorca infectada por cada tratamiento (figura 8). El grado cubrimiento de agallas se agrupó en rangos de 1 – 25%, 26 – 50%, 51 – 75%, 76 – 100%.



Figura 8. Grados de cubrimiento de huitlacoche en la mazorca de maíz.

3.7.3 Rendimiento de huitlacoche

a) Rendimiento de huitlacoche en mazorcas comercializables (RHMC).

Las mazorcas de cada tratamiento que presentaron un grado de cubrimiento mayor al 50% se les determinó el rendimiento huitlacoche en mazorcas comercializables (RHMC). Para el cálculo de RHMC, primeramente se contabilizó el número de plantas inoculadas en cada tratamiento. Posteriormente se registró el peso de las mazorcas (incluyendo sus hojas) con cubrimiento mayor de 50%. Finalmente se aplicó la fórmula siguiente:

$$\text{RHMC} = \frac{\text{Peso de mazorcas con cubrimiento mayor al 50\% (Kg)}}{\text{Plantas inoculadas por tratamiento}} \times \sigma p$$

Donde:

RHMC = Kg/ ha

σp = densidad de plantas = 45,000 plantas por hectárea

b) Rendimiento de huitlacoche limpio (RHL).

Para el cálculo del RHL se tomaron las mazorcas infectadas en cada tratamiento y se procedió a separar sus agallas. Esta operación se realizó manualmente (figura 9) y/o utilizando un cuchillo de cocina. Se obtuvo el peso de las agallas por tratamiento y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{RHL} = \frac{\text{Peso de gallas por tratamiento (Kg)}}{\text{Plantas inoculadas por tratamiento}} \times \sigma p$$

Donde:

RHL = Kg/ha

σp = densidad de plantas = 45,000 plantas por hectárea



Figura 9. Separación manual de agallas de huitlacoche de la mazorca de maíz.

Las agallas obtenidas de cada tratamiento se vaciaron en bolsas de plástico etiquetadas y se sometieron a congelado. Estas muestras se utilizaron para los análisis bromatológicos del huitlacoche.

3.7.4 Índice de severidad de la infección (ISI).

Esta variable representa el grado de infección producida en la mazorca por efecto de la inoculación artificial de hongo y se determinó en función del rendimiento de huitlacoche limpio (RHL) y el rendimiento de huitlacoche de mazorcas (RHM). El índice de severidad se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$ISI = \frac{RHL}{RHM} \times 100$$

El RHM se determina aplicando la siguiente fórmula:

$$RHM = \frac{\text{Peso de mazorcas infectadas, sin hojas, por tratamiento (Kg)}}{\text{Plantas inoculadas por tratamiento}} \times \sigma$$

3.7.5 Análisis bromatológicos del huitlacoche

Las muestras de huitlacoche analizadas fueron seleccionadas con base al porcentaje de infección, eligiendo a los cinco mejores tratamientos. Primeramente, se descongelaron, a temperatura ambiente, las muestras de huitlacoche de los tratamientos seleccionados, posteriormente se efectuó la determinación de humedad. A partir de huitlacoche seco y triturado (maza 30) se procedió con la determinación de ceniza, grasa y proteína. La determinación de fibra se realizó a partir de huitlacoche seco y desgrasado. Todas las determinaciones bromatológicas, antes mencionadas, se realizaron por triplicado para cada tratamiento evaluado. Los métodos analíticos empleados en esta investigación fueron obtenidos del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater y de Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes (Tabla 13).

Tabla 13. Métodos empleados en determinaciones bromatológicas.

DETERMINACIÓN	MÉTODO*
Humedad	Aplicación de calor en horno a presión atmosférica
Cenizas	Cenizas totales
Grasa	Soxhlet
Proteína	Nitrógeno total, método según Wieninger
Fibra	Fibra cruda

* Métodos estandarizados

Para las determinaciones bromatológicas se incluyó el tratamiento “L” que corresponde a la craza ITSON C₂ - C₃ . Lo anterior se realizó para establecer un punto de comparación entre de la calidad nutritiva del huitlacoche obtenido en esta investigación, con respecto al producido por dicha craza estudiada en otras investigaciones.

Resulta importante mencionar que, para la realización del análisis de varianza, los datos reales para las variables de porcentaje de infección, RHMC, RHL e ISI, fueron transformados . Para este fin se utilizó la herramienta estadística de $\sqrt{x+1}$, recomendada para el ajuste de este tipo de resultados. Donde “ x ” es el valor real de la variable.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Cosecha de huitlacoche

Entre los 19 y 30 días después de la inoculación se efectuaron 5 cosechas (tabla 14) en forma manual, cortando las mazorcas infectadas de los diferentes tratamientos.

Tabla 14. Calendario de cosechas.

NÚMERO DE COSECHA	FECHA	DDI*	% DEL TOTAL DE MAZORCAS RECOLECTADAS
1º	18/11/2003	19	2.0
2º	19/11/2003	20	13.7
3º	22/11/2003	23	20.0
4º	27/11/2003	28	16.5
5º	29/11/2003	30	49.8

*DDI: días después de la inoculación

4.2 Porcentaje de infección

El porcentaje de infección se determina contabilizando las mazorcas de maíz con síntomas de infección (agallas) por cada 100 plantas inoculadas con *U. maydis* en cada tratamiento.

En la tabla 15 se presenta el efecto de la inoculación de *U. maydis* en mazorcas de maíz en el porcentaje de infección. Como se puede ver en esta tabla, los porcentajes de infección promedio para cada tratamiento variaron desde 0% para el tratamiento T, hasta 56.47% para el tratamiento D.

El análisis de varianza para el efecto de la inoculación de *U. maydis* en mazorcas de maíz en el porcentaje de infección, denota diferencia significativa entre el tratamiento T con respecto a los tratamientos A, B, C, D, E, G, H y también entre el tratamiento F con respecto a los tratamientos B, C, D y H (tabla 15).

En la gráfica 1 se muestran los porcentajes de infección obtenidos en los tratamientos. Según la gráfica 1, de las dos cepas solopatogénicas evaluadas en esta investigación la cepa A₈, correspondiente al tratamiento H, resultó ser la mejor con un 46.92 % de infección. Aunado a lo anterior, el tratamiento H fue el segundo mejor tratamiento de los nueve evaluados, resultando ser estadísticamente igual al tratamiento D (cruza A₄-A₁₀) (gráfica 1).

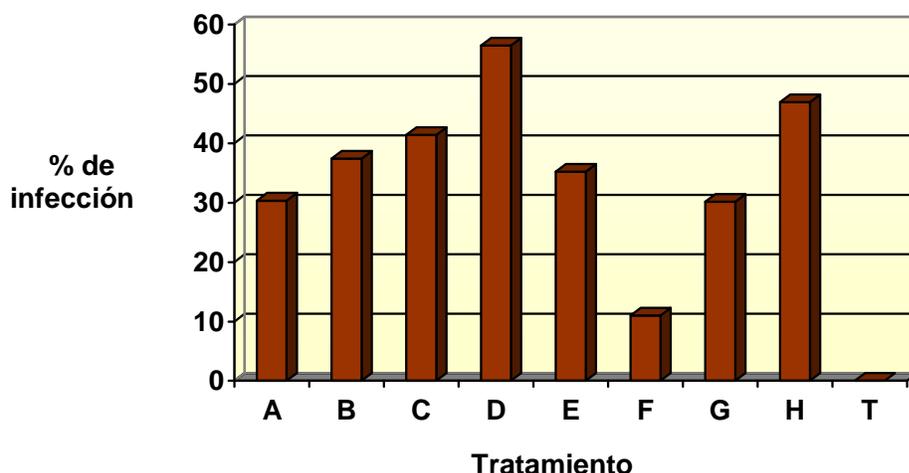
Tabla 15. Efecto de la inoculación de *U. maydis* en mazorcas de maíz en el porcentaje de infección

TRATAMIENTO	% INFECCIÓN		
	DR*	DT**	SE***
D	56.47	6.57	a
H	46.92	6.53	a
C	41.4	6.29	a
B	37.40	6.16	a
E	35.21	5.74	a b
G	30.17	5.56	a b
A	30.33	5.50	a b
F	11.03	3.40	b c
T	0	1.0	c

DR* Datos reales

DT** Datos transformados ($\sqrt{x+1}$)

SE*** Significancia estadística (0.05). Valores con la misma letra son estadísticamente iguales.



Gráfica 1. Porcentaje de infección promedio de cada tratamiento.

En lo que respecta al porcentaje de infección de *U. maydis* en el maíz, Valverde y col., en el verano de 1993, obtuvo un porcentaje de infección de 96%, con el híbrido Jasper, inoculando el hongo por el canal de las sedas, cuando estas empezaban a emerger. Du Toit y Pataky (1999), utilizando el mismo método de inoculación de Valverde (1993), solo que efectuándola cuatro días después de la emergencia de las sedas, obtuvieron un 85% de infección con el híbrido Dazzle. En la región del Valle del Yaqui, se han realizado algunas investigaciones enfocadas a la producción de huitlacoche. Ruiz (1999), obtuvo un 75% de infección, inoculando con la cruz ITSON C₂ – C₃ en el centro del jilote, utilizando el híbrido PNS- 4019 en el ciclo otoño - invierno. Ulloa (2002), en el ciclo primavera - verano, logró obtener un 76.73% de infección y Garibaldi (2003), con fertigación y acolchado plástico logró un 77.73% de infección. Ambos utilizaron la misma cruz, el mismo híbrido de maíz y el mismo sitio y misma etapa para la inoculación que Ruiz (1999).

El mayor porcentaje de infección obtenido fue de 56.47% con el tratamiento D (cruza A₄-A₁₀), este resultado se relaciona estrechamente con los resultados obtenidos por Clavero (2004), quien evaluó la patogenicidad en plántula de esta

y otras cruzas, concluyendo que la A₄-A₁₀ resultó ser una de las tres cruzas más patogénicas. Sin embargo, éste porcentaje de infección resulta ser bajo en comparación con los obtenidos en las referencias anteriores los cuales varían de 75 a 96%. Lo anterior se puede atribuir a las características del híbrido utilizado (A-7573). Según Agroquímicos y semillas (1999), presenta resistencia moderada al Carbón común del maíz (*Ustilago maydis*).

4.3 Grado de cubrimiento

El grado de cubrimiento se determinó de manera visual en las mazorcas infectadas.

La tabla 16 muestra los diferentes grados de cubrimiento de agallas en los tratamientos evaluados y en ella se puede visualizar que en el tratamiento D se presentó el mayor porcentaje de cubrimiento grado IV con un 92% de las mazorcas, seguido por el tratamiento F con el 50%, mientras que en el grado de cubrimiento I, el tratamiento A fue el que presentó mayor cantidad con un 54% de las mazorcas en ese rango.

Comentario [LCE37]: espacio

Tabla 16. Porcentaje de cubrimiento promedio de mazorcas en cada tratamiento.

TRATAMIENTO	CUBRIMIENTO*			
	I	II	III	IV
A	54	16	15	15
B	22	11	56	11
C	25	20	20	35
D	0	0	8	92
E	20	13	40	27
F	0	34	16	50
G	18	27	9	46
H	21	14	29	36
T	0	0	0	0

* Cubrimiento: **Grado I** = 1- 25%, **Grado II** = 26-50%, **Grado III** =51-75%,**Grado IV** =76-100%

La tabla 17 muestra el efecto de la inoculación de *U. maydis* en el cubrimiento de agallas en la mazorca de maíz y la gráfica 2 presenta el porcentaje de mazorcas con cobertura agallas de grado III y IV en cada tratamiento. Según los resultados que se muestran en la tabla 18 y la gráfica 2, los tratamientos B, D, E, F y H fueron los mejores, ya que más del 60 % de las mazorcas de dichos tratamientos presentaron grado de cubrimiento III y IV.

Para el análisis de estadístico se consideraron los porcentajes de cubrimiento de 51-75 y 76-100% (grado III y IV). Como se puede ver en la tabla 17, el análisis estadístico para el efecto de la inoculación de *U. maydis* en mazorcas de maíz en el cubrimiento de agallas, muestra diferencia significativa entre los tratamientos: T y el resto de los tratamientos; D respecto a A, B, C, E, F, G y H. Existieron otras diferencias, que resultaron ser significativas, sin embargo, destacan las establecidas entre el tratamiento D con respecto al T y el tratamiento D respecto al A, por presentar un alto nivel de significancia.

Tabla 17. Efecto de la inoculación de *U. maydis* en mazorcas de maíz en el cubrimiento de agallas.

TRATAMIENTO	% DE MAZORCAS CUBRIMIENTO GRADO III y IV		
	DR*	DT**	SE***
D	100	10.04	a
B	67	8.24	b
E	67	8.24	b
F	66	8.18	b
H	65	8.12	b
C	55	7.46	c
G	55	7.46	c
A	30	5.56	d
T	0	1	e

DR*

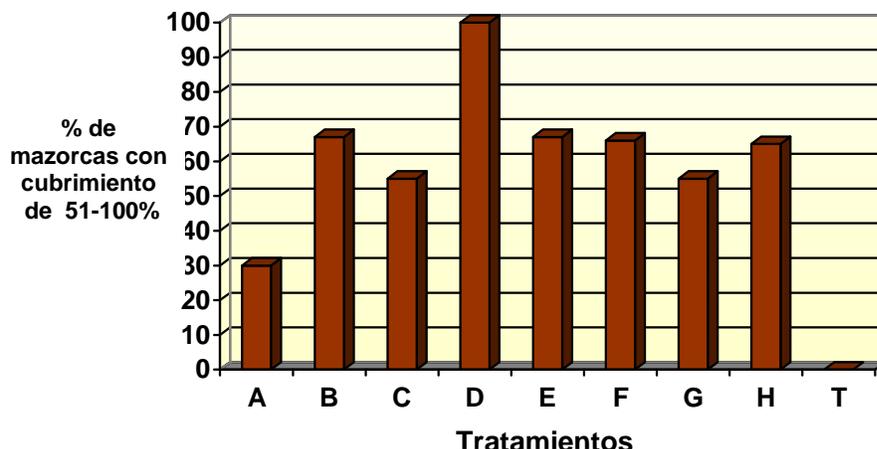
DT**

$(\sqrt{x+1})$

SE*** Significancia estadística (0.05). Valores con la misma letra son estadísticamente iguales.

Datos
Datos

reales
transformados



Gráfica 2 . Mazorcas con cobertura agallas de 51-100% en cada tratamiento.

Ruiz en 1999, obtuvo el 74% de las mazorcas con agallas en grado de cubrimiento del 50-100% al inocular *U. maydis* en la base del jilote con el híbrido de maíz PNS-4019 . Ulloa (2002), al inocular *U. maydis* en el centro del jilote, al inicio de la fecundación obtuvo el 76.84% de mazorca con un grado de cubrimiento del 50-100%.

Comentario [LCE38]: sobra espacio

En esta investigación, con el tratamiento D(cruza A₄-A₁₀) se obtuvo el 100% de las mazorcas con grado de cubrimiento en el rango 51-100%. En este mismo tratamiento el 92% de las mazorcas presentaron grado de cubrimiento del 76-100%. Con este resultado y debido a la estrecha relación que guarda el cubrimiento de mazorcas con el índice de severidad de la infección se espera que este tratamiento presente altos valores de dicho Índice. Cabe mencionar que el tratamiento B, correspondiente a la cepa solopatógena A₈, presentó el segundo mejor valor del cubrimiento de mazorcas (67%) en el rango 51-100%.

4.4 Rendimiento de huitlacoche en mazorcas comercializables (RHMC)

El RHMC representa los Kilogramos de mazorcas (con hojas), con cubrimiento de agallas superior al 50%, en una hectárea de terreno sembrado con maíz.

La tabla 18 exhibe efecto de la inoculación de *U. maydis* en maíz sobre el RHMC. Según los resultados obtenidos que se muestran en dicha tabla, se observa que los valores promedio de RHM para cada tratamiento variaron desde cero a 3,815.49 Kg/ ha para los tratamientos T y D respectivamente.

En el análisis de varianza, para el efecto de la inoculación de *U. maydis* en mazorcas de maíz sobre el RHMC, se observa diferencia estadísticamente significativa entre los siguientes tratamientos: T con respecto a B, C, D, E, F, G y H; el tratamiento D respecto a A, F y G (tabla 18).

Comentario [LCE39]: sobra espacio

Tabla 18. Efecto de la inoculación de *U. maydis* en maíz en el RHMC por hectárea.

TRATAMIENTO	RHMC		
	DR* (Kg/ ha)	DT**	SE***
D	3,815.49	61.03	a
C	2,423.05	47.24	a b
E	1,722.45	41.50	a b c
B	1,848.10	39.42	a b c
H	1,964.60	36.66	a b c
G	893.71	28.81	b c
F	656.46	24.10	b c d
A	345.51	18.41	c d
T	0	1.0	d

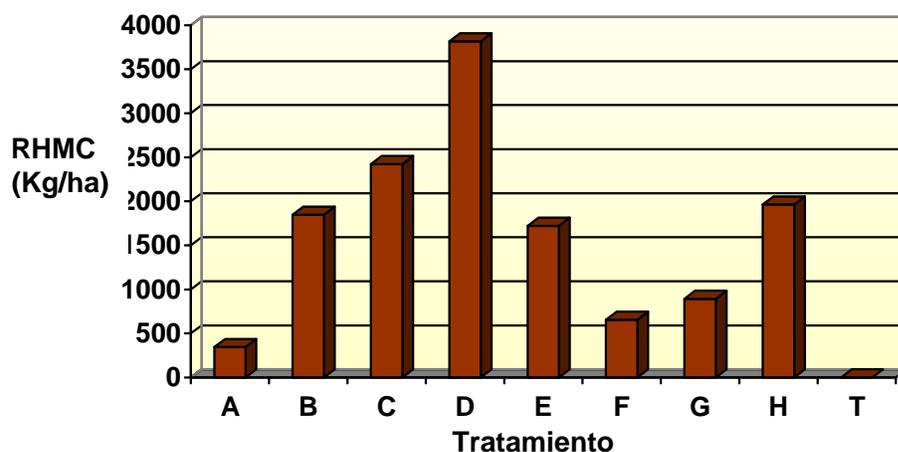
DR* Datos reales

DT** Datos transformados ($-\sqrt{x+1}$)

SE*** Significancia estadística (0.05). Valores con la misma letra son estadísticamente iguales.

La gráfica 3 muestra los rendimientos en mazorcas comercializables obtenidos en los distintos tratamientos evaluados. Tratamiento. En la gráfica 3 se observa

que con los tratamientos C y D se obtuvieron rendimientos que sobrepasaron las 2 Ton /ha .



Gráfica 3. Rendimiento de huitlacoche promedio en mazorcas comercializables de cada tratamiento.

Garibaldi, en el año de 2003, obtuvo en su estudio un RHMC de 7,396 Kg/ha utilizando altas densidades de plantas y dosis elevadas de fertilizante nitrogenado.

El tratamiento D (cruza A₄-A₁₀) fue el que presentó la mayor cantidad de mazorcas comercializables con 3,815.49 Kg/ha. Este rendimiento conseguido fue bastante aceptable, tomando en cuenta el bajo porcentaje de infección obtenido con el tratamiento D y la densidad de plantas usada.

4.5 Rendimiento de huitlacoche limpio (RHL)

El RHL representa los Kilogramos de agallas producidas en una hectárea de terreno sembrado con maíz.

La tabla 19 presenta el efecto de la inoculación de *U. maydis* en mazorcas de maíz en el RHL por hectárea y la gráfica 4 muestra los rendimientos de agallas obtenidos en los tratamientos evaluados. Según los resultados mostrados en la tabla 19 y gráfica 4 en el RHL se presentó un valor máximo de 2,070.71 Kg/ ha con el tratamiento D seguido por los tratamientos H con 1360.30 Kg/ ha y el H con 1,360.30 Kg/ ha. El tratamiento T, no presentó rendimiento de agallas de huitlacoche.

Comentario [LCE40]: sobra espacio

Comentario [LCE41]: ¿no hubo infección?

El análisis de varianza para el efecto de la inoculación de *U. maydis* en mazorcas de maíz en el RHL muestra diferencia significativa entre los siguientes tratamientos: T con respecto a A, E, B, H C, D y D con respecto a los tratamientos F y G (tabla 19).

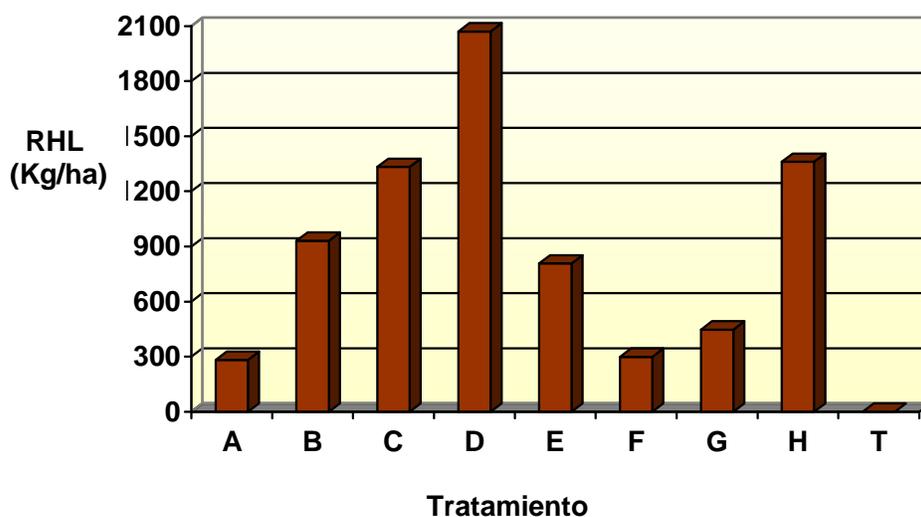
Tabla 19. Efecto de la inoculación de *U. maydis* en mazorcas de maíz en el RHL por hectárea .

TRATAMIENTO	RHL		
	DR* (Kg/ ha)	DT**	SE***
D	2,070.71	45.15	a
C	1,332.93	34.73	a b
H	1,360.30	30.92	a b
B	931.43	29.85	a b
E	807.14	28.34	a b
A	282.48	25.17	a b
G	447.39	20.47	b C
F	299.00	16.39	b c
T	0	1.00	c

DR* Datos reales

DT** Datos transformados ($\sqrt{x+1}$)

SE*** Significancia estadística (0.05). Valores con la misma letra son estadísticamente iguales.



Gráfica 4. Rendimiento de huitlacoche limpio promedio de cada tratamiento.

Ruiz (1999), obtuvo un rendimiento de huitlacoche limpio de 1,973 kg/ha con el 75% de las plantas infectadas y utilizando una densidad de plantas por hectárea de 31,250. Ulloa, en el año 2002, obtuvo un rendimiento de agallas huitlacoche de 1,678 Kg/ha con el 76.73% de las plantas infectadas en una densidad de plantas por hectárea 20,800. Garibaldi (2003), logró producir 3,854 Kg/ha de huitlacoche limpio con el 77.73% de infección de plantas y utilizando una densidad de plantas por hectárea de 62,000.

El mejor rendimiento de huitlacoche limpio obtenido de esta investigación estuvo dado por el tratamiento D (cruza A₄-A₁₀) con 2,070 Kg/ha de agallas de huitlacoche, y se logró con tan solo el 56.47 % de plantas infectadas y una densidad de 45,000 plantas/ha. La cepa solopatógena A₁₄, tratamiento H, presentó el segundo valor más importante de rendimiento de huitlacoche limpio, con 1,360.30 Kg/ha

4.6 Índice de severidad de la infección (ISI)

El ISI representa el grado de infección producida en la mazorca por efectos de la inoculación artificial del hongo.

En la tabla 20 se presenta el efecto de la inoculación de *U. maydis* en mazorcas de maíz en el ISI. Según los resultados obtenidos que se muestran en esta tabla, se observa que los valores promedio de ISI para cada tratamiento variaron desde cero a 70 para los tratamientos T y D respectivamente.

El análisis de varianza para el índice de severidad muestra diferencia significativa entre el tratamiento T con respecto a los tratamientos A, B, C, D, E, F, G y H también se observa diferencia entre los tratamientos: A respecto B y H ; D respecto a A y G (tabla 20).

Tabla 20. Efecto de la inoculación de *U. maydis* en mazorcas de maíz en el ISI.

TRATAMIENTO	ISI		
	DR*	DT**	SE***
D	70.48	8.51	a
H	66.59	7.40	a b
B	51.76	7.37	a b
C	55.66	7.36	a b c
F	50.15	7.22	a b c
E	42.84	6.69	a b c
G	43.15	6.53	b c
A	25.00	5.49	b c
T	0	1.00	d

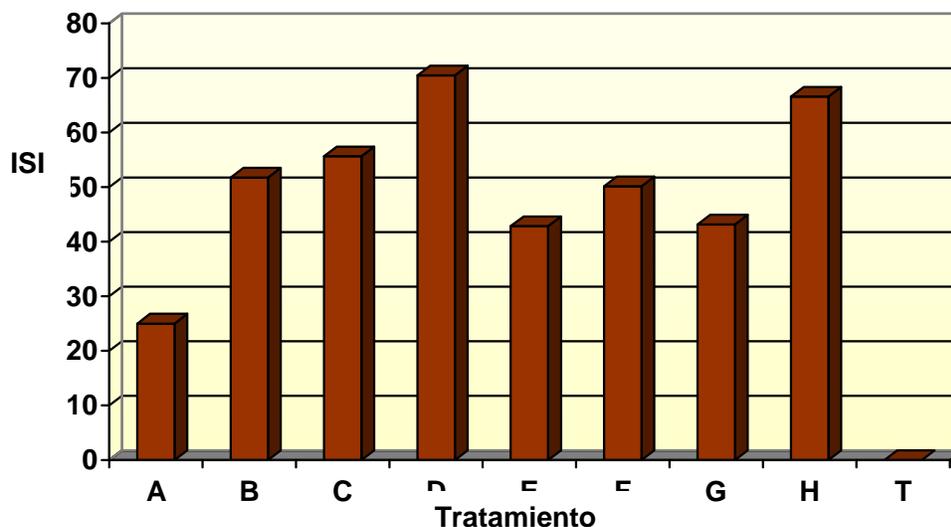
DR* Datos reales

DT** Datos transformados ($\sqrt{x+1}$)

SE*** Significancia estadística (0.05). Valores con la misma letra son estadísticamente iguales.

La gráfica 5 muestra los índices de severidad de los tratamientos evaluados y se observa que los tratamientos B, C, D, F y H presentaron ISI superiores a 50, destacando el tratamiento D y H con los mayores valores.

Comentario [LCE42]: Sobra espacio



Gráfica 5. Índice de severidad de la infección promedio obtenido en cada tratamiento.

Valverde y col., en 1993, obtuvieron un índice de severidad de la infección de 46 cuando inocularon a *U. maydis* en la mazorca (híbrido Sweetie) por el canal de las sedas, cuando esta empezaban a emerger. Ruiz en el año de 1999, obtuvo un índice de severidad de la infección de 24.65 efectuando la inoculación de *U. maydis* en el jilote con el híbrido PNS - 4019. En el año 2002, Ulloa alcanzó un índice de severidad de 57.63 inoculando al hongo en el centro del jilote al inicio de la fecundación del maíz (PNS - 4019). Garibaldi, en 2003, utilizó fertigación nitrogenada y el mismo método de inoculación de Ulloa (2002) y reportó un índice de severidad de infección de 41.78.

En este estudio el valor de índice de severidad de la infección más elevado estuvo dado por el tratamiento D (cruza A_4-A_{10}) con 70.48. Sin embargo el tratamiento H (cepa solopatogénica A_{14}) presentó el segundo valor más importante con un índice de 66.59 siendo los tratamientos C y H estadísticamente iguales.

Comentario [LCE43]: Mucho espacio

4.7 Análisis bromatológico del huitlacoche

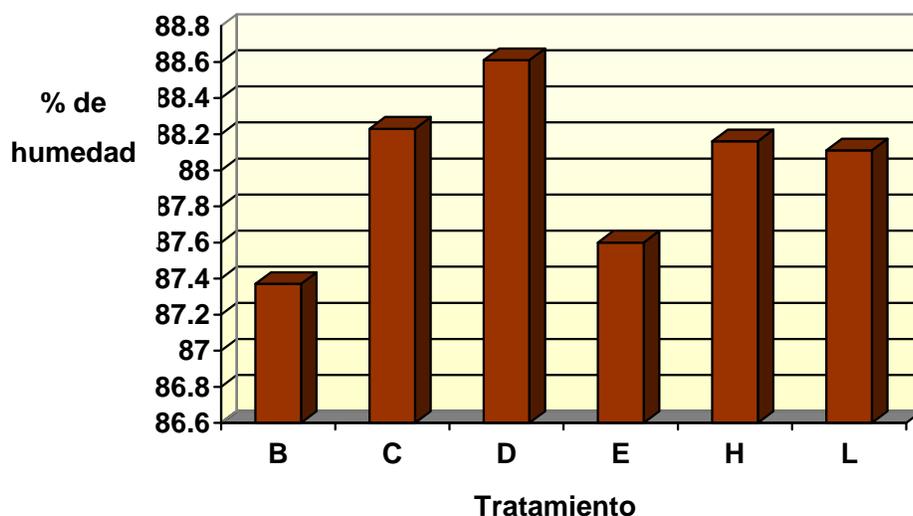
Para el análisis bromatológico del huitlacoche, se seleccionaron los cinco mejores tratamientos en cuanto al porcentaje de infección presentado, además se incluyó el tratamiento "L" que corresponde al huitlacoche obtenido de la cruce ITSON $C_2 - C_3$ estudiada en otras investigaciones. Estos análisis bromatológicos consistieron en la determinación de grasa proteína y fibra, empleándose para esto métodos estandarizados de análisis.

La tabla 21 se exhibe el análisis de varianza y composición del huitlacoche de los tratamientos B, C, D, E, H y L. En base a los resultados que se muestran en la tabla 21, se observa que para el contenido de humedad del huitlacoche los valores oscilaron entre el 87.37%, para el tratamiento B, al 88.61% para el tratamiento D. El contenido de cenizas sufrió cambios que van del orden de 3.08% para el tratamiento E, a 4.87% para el tratamiento D. El porcentaje de grasa fluctuó entre 2.04% para el tratamiento L, y 3.40% para el tratamiento D. En lo que respecta al contenido de proteína los resultados variaron desde un mínimo de 9.35% para el tratamiento L, hasta un valor máximo de 12.43% con el tratamiento D. El contenido de fibra varió de 3.08 a 4.47%, para los tratamientos E y C respectivamente.

Aunque las diferencias que se observan en la composición del huitlacoche (tabla 21) son mínimas estas resultan ser significativas en todos los casos. Las diferencias altamente significativa se establecieron como sigue: para el porcentaje de humedad la diferencia se presentó entre los tratamientos D y B;

en el porcentaje de ceniza la diferencia se estableció entre el tratamiento D respecto al tratamiento B; en el porcentaje de grasa se estableció entre los tratamientos D y E; en el porcentaje de proteína se observó diferencia entre el tratamiento D y L; y en el porcentaje de fibra la diferencia más marcada estuvo dada por los tratamientos C y L.

En las gráficas 6 y 7 muestran la composición de huitlacoche obtenido en los tratamientos B, C, D, E, H y L. En la grafica 6 se observa el contenido de humedad del huitlacoche y en ella destaca el tratamiento D con el mayor porcentaje de humedad. La grafica 7 muestra el contenido de cenizas, grasa, proteína y fibra del huitlacoche analizado, en ella el Tratamiento D es el sobresale, ya que se presenta los más altos valores de % de cenizas, % de grasa y % de proteína. El tratamiento C es el que presenta el más alto valor en cuanto al % de fibra.



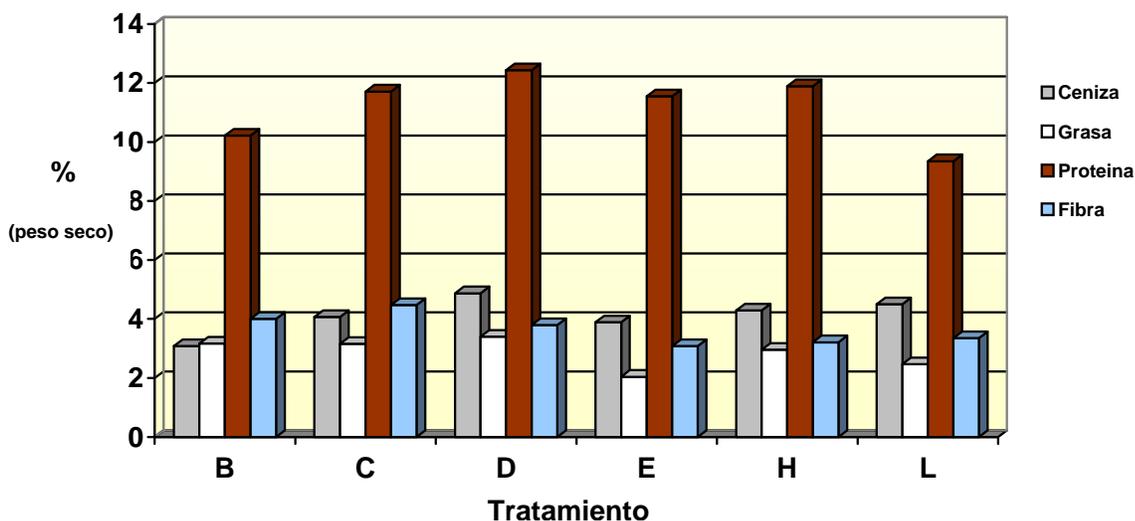
Gráfica 6. Contenido humedad del huitlacoche obtenido de los tratamientos B, C, D, E, H y L.

Tabla 21. Composición del huitlacoche de los tratamientos B, C, D, E, H y L.

Tratamiento	% DE HUMEDAD		Tratamiento	% DE CENIZAS (Base seca)		Tratamiento	% GRASA (Base seca)		Tratamiento	% PROTEINA* (Base seca)		Tratamiento	% FIBRA CRUDA (Base seca)	
	Promedio	SE		Promedio	SE		Promedio	SE		Promedio	SE		Promedio	SE
D	88.61	a	D	4.87	a	D	3.40	a	D	12.43	a	C	4.47	a
C	88.23	b	L	4.50	b	B	3.17	a b	H	11.89	a	B	4.00	a b
E	88.16	b	H	4.29	b	C	3.16	a b	C	11.71	a	D	3.79	a b c
L	88.11	b	C	4.07	b c	H	2.96	a b	E	11.56	a	L	3.35	b c
H	87.60	c	E	3.89	c d	L	2.47	b c	B	10.22	b	H	3.21	b c
B	87.37	c	B	3.08	c	E	2.04	c	L	9.35	b	E	3.08	c

* Factor de conversión de proteína N x 6.25

SE = Significancia estadística (0.05). Valores con la misma letra son estadísticamente iguales.



Gráfica 7. Composición del huitlacoche obtenido de los tratamientos B, C, D, E, H y L.

Vanegas y col., (1993), evaluaron el efecto del genotipo de maíz en la composición química del huitlacoche. Como resultados obtuvo contenidos de proteína en el rango de 10-14.5% (base seca), ceniza de 3.4 a 6.2% y de grasa 2.7 a 6.5%, concluyendo que la composición proximal del huitlacoche depende del híbrido de maíz en que es producido. Valverde y Paredes en 1993, determinaron la composición de huitlacoche de tres localidades de México, reportando; un contenido de humedad en el rango de 91.6 a 93.2%; el porcentaje de proteína estuvo en el rango de los 11.5 y 16.4%; grasa de 1.6 a 2.3 %. Concluyendo que la composición proximal del huitlacoche varía entre distintas localidades donde es producido.

El tratamiento D correspondiente a la cruz A_4-A_{10} , fue el que presentó los mayores contenidos de humedad, ceniza, grasa y proteína con 88.61%, 4.87%, 3.40% y 12.43 % respectivamente siendo estos valores superiores a los obtenidos con la cepa ITSON C_2-C_3 .

V. CONCLUSIONES

- El mayor porcentaje de plantas con infección de huitlacoche fue de 56.47% y se obtuvo con la cruzada A_4 - A_{10} . La cepa solopatógena A_{14} , fue el segundo mejor con 46.92%.
- El 100% de las mazorcas infectadas con la cruzada A_4 - A_{10} , presentaron grado de cubrimiento de 51-100% . En este mismo tratamiento el 92% de las mazorcas presentaron grado de cubrimiento del 76-100%.
- El mayor rendimiento de huitlacoche en mazorca comercializable (más de 50% de agallas en la mazorca) registrado fue de 3,815.49 kg/ha y se obtuvo con la cruzada A_4 - A_{10} .
- El mayor rendimiento de huitlacoche limpio (solo agallas) fue de 2,070 kg/ha y se obtuvo con la cruzada A_4 - A_{10} . El segundo mejor valor estuvo dado por la cepa solopatógena A_{14} , con 1,360.30 Kg/ha.
- El mayor índice de severidad de la infección fue de 70.48 y se obtuvo con la cruzada A_4 - A_{10} , La cepa solopatógena A_{14} presentó el segundo mejor índice con 66.59.
- La cruzada A_4 - A_{10} , fue la que presentó los mayores contenidos de humedad, ceniza, grasa y proteína con 88.61%, 4.87%, 3.40% y 12.43 % respectivamente.

Comentario [LCE44]: Sobra espacio

Conclusiones

- La cruce A_4-A_{10} resultó ser la mejor cruce para ser utilizada para la producción masiva de huitlacoche.

VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda que:

- La inoculación de *Ustilago maydis* en la mazorca de maíz se realice en la misma etapa de fecundación (emergencia inicial de los estigmas). Generalmente en el maíz, esta etapa no se presenta en forma uniforme, por lo que se deberá inocular a medida que se vaya presentando ésta, aunque se tengan que realizar dos o mas labores de inoculación, esto con el fin de obtener mejores resultados de infección y producción del hongo.
- La cruza A₄-A₁₀, así como las cepas solopatógenicas A₁₄ y A₈, sean probadas en otros híbridos o variedades de maíz, en otras épocas de siembra y con dosis más altas de fertilización nitrogenada.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Agroquímicos y semillas. 1999. VADAMECUM AGRÍCOLA. Colombia.

Álvarez, D. 1999. Aislamiento y evaluación de la patogenicidad de cepas del hongo *Ustilago maydis* (Huitlacoche) del Valle del Yaqui en plantas de maíz. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Sonora. Cd. Obregón, Sonora, México.

Banuett, F. 1992. *Ustilago maydis*, the delightful blight. Elsevier Science Publishers;18(5):174-180

Banuett, F. 1995. Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. Annual Reviews Genetics; 29:179-208.

Banuett, F. y I. Herskowitz. 1988. *Ustilago maydis*, smut of Maize. Advances in Plant Pathology; 6: 427-455.

Banuett, F. y I. Herskowitz. 1994. Morphological transition in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the a and b loci. Experimental Mycology; 18: 247-266.

Banuett, F. y I. Herskowitz. 1996. Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. Development; 122: 2965-2976.

- Clavero, S. 2004. Evaluación de la compatibilidad y patogenicidad de cepas de *Ustilago maydis* (d.c.) *corda*, recolectadas en el valle del yaqui, primavera 2003. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Sonora. Cd. Obregón, Sonora, México.
- Du toit, L and Pataky, J.K. 1999. Effects of silk maturity and pollination on infection of maize ears by *Ustilago maydis*. Plant disease. 83:621– 626.
- Du toit, L and Pataky, J.K. 1999. Variation associated with silk channel inoculation of common smut of sweet corn. Plant disease. 83:727-732.
- FAO. 1993 .El maíz en la nutrición humana. Colección FAO: Alimentación y nutrición, N°25. ISBN 92-5-303013-5. Roma, Italia.
- Garibaldi, C.J.M. 2003. Fertilización nitrogenada y densidad de plantas de maíz (*zea mays*) L. con fertigación y acolchado plástico en la producción de huitlacoche *Ustilago maydis* (D.C.) *Corda*, en el Valle del Yaqui. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Sonora. Cd. Obregón Sonora.
- Guerrero, A. 1987. cultivos herbáceos extensivos. Cuarta edición revisada y ampliada. Mundi prensa. España.
- Kahmann , R. 2002. Fungus drains resistance. Max Plant Research; 4:32-39.
- Kealey, K. S. and Kosikowski. 1981. Potencial del huitlacoche como posible fuente alimenticia. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 15(14): 341–351.
- Martínez, A. y J. Ruiz. 1998. El hongo *Ustilago maydis*, de la época prehispánica al tercer milenio. Fitopatología; 33(4): 194-206.

Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes. 1983. United States Environmental Protection Agency. USA.

Paredes, O. y M.E. Valverde. 1999. Los alimentos mágicos de las culturas indígenas de México - El caso del Huitlacoche. Editorial Once Ríos Editores. Sinaloa, México.

Paredes, O., Guevara, L., Vanegas, P. y M.E. Valverde. 2000. Tecnologías para la producción masiva de Huitlacoche. Cuaderno de trabajo, sistema de investigación Miguel Hidalgo. CONACYT. México.

Paredes, O. 2001. Alimentos mesoamericanos: el Huitlacoche. Caviar de los pobres, exquisitez culinaria. Lunes en la Ciencia, La jornada, 10 de septiembre del 2001.

Reyes, P. 1990. El maíz y su Cultivo. AGT editor, S.A. México.

Ruiz, J. y A. Martínez. 1998. The fungus *Ustilago maydis*, from the Aztec cuisine to the research laboratory. International Microbiology; 1: 149-158.

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 L. Castro. 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.

- Ruiz, I., L. Castro y Ulloa, R. 2002. Efecto del período de inoculación artificial en maíz (*zea mays*) en la infección y producción de huitlacoche (*Ustilago maydis*) en el Valle del Yaqui. ITSON-DIEP. Vol. III. Num. 11. Enero-junio 2002 . Cd. Obregón, Sonora, México.
- Standard Methods for the Examination of Water And Wastewater 1995. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federatio. 19ed.,New York. Pp 4-65 to 4-69
- Statgraphics Plus Ver. 3.0 para Windows. Stat Graphics Corp. 1994-1997.
- Ulloa, R. 2002. Efecto del periodo de fecundación del maíz (*Zea 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.
- Valverde, M. E. y O. Paredes. 1993. Production and evaluation of some food properties of Huitlacoche (*Ustilago maydis*). Food Biotechnology; 7(3):207-219.
- Valverde, M.E., Fallah Moghaddam, P., Zavala-Gallardo, M., Pataky, J., Paredes. O y W. Pedersen. 1993. Yield and quality of huitlacoche on sweet corn inoculated whit *Ustilago maydis*. Hort Science; 28 (8):782-785.
- Valverde, M.E., O. Paredes, J.K. Pataky y F. Guevara. 1995. Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a food source- Biology, composition, and production. Critical Reviews in Food Science and Nutrition; 35(3):191-229.
- Vanegas, P., M.E. Valverde, O. Paredes y J.K. Pataky.1995. Production of the edible fungus Huitlacoche (*Ustilago maydis*): Effect of maize genotype on

chemical composition. Journal of Fermentation and Bioengineering; 80
(1):104-106.

Glosario

Agalla	Dilatación o crecimiento excesivo que se produce en un tejido de las plantas causado por hongos o insectos parásitos.
Basidio	Estructura en forma de mazo que porta las basidiosporas.
Basidiospora	(Basidion = base pequeña; sporos = semilla) espora que se forma sexualmente y se localiza sobre un basidio, generalmente formada en números de cuatro.
Carbón	Enfermedad ocasionada por los hongos Ustilaginales, se caracteriza por la formación de masas de esporas polvorientas y oscuras.
<i>Cariogamia</i>	Fusión de dos núcleos.
<i>Cepa</i>	Progenie de un solo aislamiento en un cultivo puro, aislado; conjunto de aislados semejantes, una raza.
Ciclo de vida	Sucesión de estados, siguiendo fases particulares de desarrollo de una espora, con culminación en alguna fase de la espora.
Compatible	Parejas sexuales de hongos que son capaces de producir un cultivo fértil el uno con el otro.
Cultivo	Crecimiento de organismos, usualmente en un medio artificial para uso experimental o industrial.
Dicarión	Célula o hifa haploide, con núcleos de dos tipos genéticamente diferentes y estrechamente asociados en pares.
Diploide	Célula que tiene el doble número de cromosomas (2n).
Espora	Unidad reproductiva de los hongos, constituida por una o varias células. Es análoga a las semillas de las plantas.
Estigma	Pelos o sedas de los elotes.
Haploide	Tiene un grupo o número reducido de cromosomas en un núcleo.

Hialina	Incoloro, transparente.
Hifa	Unidad estructural filamentosa de los hongos, usualmente septada y consiste de varias células en sucesión lineal.
Hiperplasia	Aumento excesivo del volumen de una planta debido a un aumento en su división celular
Hipertrofia	Desarrollo anormal de una planta debido a una elongación celular.
Hospedero	Organismo vivo que provee alimento y protección a un parásito que vive en o sobre él.
Infección	Establecimiento del patógeno en un hospedero después de una invasión.
<i>Inocular</i>	Introducción de microorganismos o sustancias que contienen microorganismos en un sistema.
Jilote	Inflorescencia pistilada del maíz, antes de la fecundación.
Micelio	Masa de hifas, que constituye el soma de un hongo.
Parásito	Organismo que obtiene su alimento y vive a expensas de otro organismo vivo.
Patógeno	Parásito que causa enfermedad o muerte al hospedero.
Plasmogamia	Fusión del citoplasma de dos protoplastos.
Promicelio	Hifa corta que se produce por la germinación de una teliospora, constituye un basidio.
Teliospora	Espora sexual de resistencia y de pared gruesa que sufre cariogamia y produce el basidio.
Tumor	Crecimiento excesivo, desordenado y maligno que sufren los tejidos.