



F
3025
C.2

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

REACCIÓN DE HÍBRIDOS DE MAÍZ A CEPAS GENOTIPO ESPECÍFICAS
DE HUITLACOCHÉ (*Ustilago maydis* (D.C.) Cda.) Y CARACTERIZACIÓN
FENOTÍPICA DE LOS AISLAMIENTOS INOCULADOS

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESENTA:

SAMUEL VELÁZQUEZ DÍAZ



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

Chapingo, Estado de México, Abril de 2008.



REACCIÓN DE HÍBRIDOS DE MAÍZ A CEPAS GENOTIPO ESPECÍFICAS
DE HUITLACOCHÉ (*Ustilago maydis* (D.C.) Cda.) Y CARACTERIZACIÓN
FENOTÍPICA DE LOS AISLAMIENTOS INOCULADOS

Tesis realizada por SAMUEL VELÁZQUEZ DÍAZ bajo la dirección del Comité
Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial
para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA



DR. CLEMENTE VILLANUEVA VERDUZCO
Director



DR. JAIME SAHAGÚN CASTELLANOS
Asesor



DR. JUAN MARTÍNEZ SOLÍS
Asesor

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, por brindarme la oportunidad de dar un paso más en mi formación profesional.

A la Coordinación de Posgrado en Horticultura por las facilidades brindadas para la realización de mis estudios de maestría.

Al Dr. Clemente Villanueva Verduzco, por haber hecho los trámites en tiempo y forma para mi ingreso al programa de Maestría en Horticultura y por su acertada conducción del presente trabajo de investigación.

Al Dr. Jaime Sahagún Castellanos y al Dr. Juan Martínez Solís por su valiosa participación como asesores.

Al Ing. Dionisio Castañeda Valadez por su desinteresado apoyo durante la colecta de cepas de huitlacoche y por proporcionarme semillas de los genotipos de maíz utilizados.

Al Sr. Maximino Ramírez Ayala, por el apoyo en el establecimiento y manejo del experimento en campo.

Al Sr. Alfredo Gómez Moreno, por su importante apoyo en la fase de laboratorio.

A mis compañeros y amigos de grupo, en especial a Mitzi, Águeda, Lulú, Marcela, Reynaldo, Martín, Floriberto..., que me brindaron su apoyo y amistad durante nuestra estancia como estudiantes de maestría.

A todos los profesores, que con entusiasmo y experiencia compartieron con nosotros sus conocimientos.

Al Dr. Marcelo Acosta Ramos, por su apoyo con material y equipo de laboratorio.

Al pueblo trabajador de México, que a través del CONACYT nos ha apoyado económicamente en nuestra superación.

DEDICATORIA

A mis hijos, Quetzalli Abigail y Samuel Tlacamelauac, quienes son la principal razón para continuar superándome y quienes con sus gracias infantiles hacen más agradable mi vida.

A Elisa, quien con gran sentido académico y de superación, me ha apoyado en la conclusión de mis estudios, ya que en ella ha recaído la responsabilidad de llevar hacia delante nuestro hogar.

A mi mamá, que con su amor y sus deseos por que me vaya bien, me ha dado ánimo y confianza para seguir adelante.

A mi papá, que aunque ya no existe físicamente en este mundo, en mi memoria aún permanecen las frases de superación y de cariño que algún día dirigió hacia sus hijos y que me dan fuerza en los momentos difíciles.

A mis hermanas a quien tanto quiero y que se han preocupado por el bienestar y la superación de sus hijos.

A mis hermanos a quienes admiro y respeto, por la constante lucha por la mejora y la superación de ellos y de sus familia.

A mis sobrinos que se fueron, los que aún están y los que vienen en camino.

A mis suegros, quienes son buenas personas y de gran valor moral.

A mis cuñadas y cuñados, tías, tíos, primas y primos.

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor del presente documento nació en la comunidad de Santa Catarina del Monte, Texcoco, Estado de México el 16 de febrero de 1969; sus estudios de preparatoria, licenciatura y maestría los realizó en la Universidad Autónoma Chapingo.

Ha realizado trabajos de investigación en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*) y perilla (*Symphoricarpos microphyllus*); además ha participado como ponente en foros de investigación y servicio relacionados con la agricultura orgánica, dentro y fuera de la Universidad. También ha escrito algunos artículos en la revista local "Texcoco cultural".

Desde 1996 ha trabajado como Técnico Académico en el Área de Agronomía de la Preparatoria Agrícola de la UACh.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	i
LISTA DE CUADROS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.	ix
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERTURA.....	5
2.1. Origen y distribución.....	5
2.2. Clasificación taxonómica.....	6
2.3. Usos del huitlacoche.....	6
2.4. Descripción morfológica.....	7
2.5. Mutación.....	9
2.6. Desarrollo de la enfermedad.....	11
2.7. Métodos de inoculación artificial.....	14
2.8. Factores que influyen en el desarrollo del huitlacoche	19
2.8.1. Factores ambientales.....	19
2.8.2. Características del hospedante.....	22
2.8.3. Variedad hospedante.....	26
2.8.4. La cepa	28
2.9. Metrología microscópica.....	31
2.10. Determinación del tamaño óptimo de muestra.....	32

3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
3.1. Evaluación del efecto de la inoculación cepa-híbrido específicos	35
3.1.1. Localización del sitio experimental.....	35
3.1.2. Establecimiento y manejo del experimento en campo.....	35
3.1.3. Materiales genéticos evaluados	37
3.1.3.1. Cepas de huitlacoche	37
3.1.3.2. Genotipos de maíz utilizados como hospedantes..	39
3.1.4. Tratamientos.....	39
3.1.5. Inoculación.....	40
3.1.6. Variables evaluadas.....	41
3.1.6.1. Porcentaje de Incidencia.....	41
3.1.6.2. Severidad.....	41
3.1.6.3. Rendimiento por planta infectada.....	42
3.1.6.4. Rendimiento por hectárea.....	42
3.1.6.5. Porcentaje de elotes podridos.....	42
3.1.7. Análisis estadístico	43
3.2. Estudio de caracterización de cepas de huitlacoche.....	43
3.2.1. Observación y descripción de las colonias de las cepas	43
3.2.2. Morfología de esporidios.....	45
3.2.2.1. Sistema de muestreo de esporidios.....	46
3.2.2.2. Obtención de anchura y longitud en micras.....	47
3.2.2.3. Tamaño óptimo de muestra para la medición de esporidios	48

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
4.1. Efecto de la inoculación de cepas de huitlacoche en híbridos de maíz	49
4.1.1. Análisis de varianza por año.....	50
4.1.2. Análisis de varianza combinado.....	51
4.1.3. Prueba de comparación de medias.....	52
4.1.4. Comparación de medias entre 2006 y 2007.....	59
4.1.5. Correlaciones fenotípicas entre variables.....	63
4.2. Caracterización de cepas de huitlacoche.....	65
4.2.1. Caracterización de las cepas en base a sus colonias	65
4.2.1.1. Color de las cepas	65
4.2.1.2. Relieve de las cepas.....	67
4.2.1.3. Tipo y dirección del crecimiento.....	69
4.2.1.4. Vigor del cultivo.....	72
4.2.1.5. Tipo de margen de las colonias.....	73
4.2.1.6. Grado de tinción del medio de cultivo.....	74
4.2.1.7. Observaciones a través del microscopio estereoscópico	76
4.2.2. Caracterización morfológica de esporidios.....	78
4.2.2.1. Metrología microscópica de esporidios.....	80
4.2.2.1.1. Dimensiones de esporidios a los tres días después de la siembra	82
4.2.2.1.2. Tamaño final de los esporidios	83

4.2.2.2. Tamaño óptimo de muestra para la medición de esporidios	86
5. CONCLUSIONES.....	90
6. LITERATURA CITADA.....	92
7. ANEXO.....	97

LISTA DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Características de elotes sin inocular de cada un de los cinco híbridos de maíz utilizados como hospedantes en la inoculación de huitlacoche.	49
Cuadro 2. Cuadrados medios del análisis de varianza para cinco caracteres de la reacción del maíz al huitlacoche en cinco híbridos. Chapingo, México, 2006 y 2007	51
Cuadro 3. Cuadrados medios del análisis de varianza combinado (2006 y 2007) para cinco caracteres en la inoculación de huitlacoche en maíz. Chapingo, México.	52
Cuadro 4. Comparaciones de medias de cinco caracteres de la reacción de cinco tratamientos al inocular maíz con huitlacoche. Chapingo, México. 2006 y 2007.....	53
Cuadro 5. Comparación de medias del año 2006 con las del 2007 de cinco caracteres de la reacción de cinco híbridos de maíz al huitlacoche.....	59
Cuadro 6. Correlaciones fenotípicas entre cinco variables de la reacción de cinco híbridos de maíz inoculados con huitlacoche.....	64
Cuadro 7. Calificación de los colores de cinco cepas de huitlacoche en diferentes etapas de desarrollo.....	67
Cuadro 8. Relieve del cultivo de cinco cepas de huitlacoche en diferentes fechas de observación.....	69
Cuadro 9. Tipo de crecimiento del cultivo de cinco cepas de huitlacoche en diferentes fechas de observación.....	71
Cuadro 10. Dirección del crecimiento del cultivo de cinco cepas de huitlacoche en diferentes fechas de observación.....	72
Cuadro 11. Vigor del cultivo de cinco cepas de huitlacoche en diferentes fechas de observación.....	73
Cuadro 12. Naturaleza del margen del cultivo de cinco cepas de huitlacoche en diferentes fechas de observación.....	74

Cuadro 13 . Coloración que crece en la periferia de las colonias de cinco cepas de huitlacoche en diferentes fechas de observación.....	75
Cuadro 14 . Porcentaje del medio de cultivo teñido por el halo en relación a la superficie que no fue rayada o untada con esporidios.....	76
Cuadro 15. Promedios de longitud y anchura y tamaño preliminar de muestra de esporidios de cinco cepas de huitlacoche a los tres días después de sembrar (hilera 1) y al final de sus desarrollo y crecimiento (hilera 2).	81
Cuadro 16. Tamaño de muestra preliminar y varianzas de longitud y anchura de esporidios de cinco cepas de huitlacoche, en dos etapas de desarrollo, a los tres días después de sembrar (hilera 1) y al final de su desarrollo (hilera 2).....	86
Cuadro 17. Tamaño óptimo de muestra (n_0) para medir la longitud y anchura de esporidios de cinco cepas de huitlacoche en dos etapas de desarrollo.	87
Cuadro A. Longitud y ancho en micras de esporidios de cinco cepas de huitlacoche a los tres días después de sembrarlas en medio de cultivo PDA	97
Cuadro B. Longitud y ancho de esporidios en micras de cinco cepas de huitlacoche inoculadas en maíz híbrido en etapa final de crecimiento.....	98

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Precipitación en el periodo de inoculación a cosecha.	50
Figura 2. Rendimiento en toneladas por hectárea de huitlacoche de cinco híbridos de maíz en 2006, 2007 y en promedio de los dos años.	56
Figura 3. Porcentaje de incidencia de huitlacoche inoculado en cinco híbridos de maíz en 2006, 2007 y en promedio de los dos años.....	57
Figura 4. Rendimiento de huitlacoche inoculado en híbridos de maíz en dos ciclos de cultivo y en promedio de años.	60
Figura 5. Porcentaje de elotes podridos al inocular huitlacoche en híbridos de maíz en dos ciclos de cultivo y en promedio de años.....	62
Figura 6. Color de cinco cepas de huitlacoche a los tres días después de sembrar (arriba) y a los 11(abajo)	66
Figura 7. Tipos de relieve observados a simple vista en cultivos de huitlacoche a los tres días después de la siembra.	68
Figura 8. Tipos de crecimiento en cepas de huitlacoche. A la izquierda, crecimiento micelial en la Cepa 1; a la derecha, crecimiento esporidial en la Cepa 5, a los 14 y 11 días después de sembrar, respectivamente.....	70
Figura 9. Color del halo que rodea a la colonia y porcentaje de cubrimiento por el mismo del medio de cultivo que no fue rayado con esporidios. La observación fue a los 17 días después de sembrar.....	75
Figura 10. Cultivo de la Cepa 5, colectada en el híbrido de maíz A-Oso, visto a través del microscopio estereoscópico a 10X a los tres días después de la siembra. Nótese el crecimiento cremoso como de levadura.	77
Figura 11. Cultivos de huitlacoche vistos a través del microscopio estereoscópico a los 11 días después de sembrar.	78

Figura 12. Esporidio de huitlacoche visto través del microscopio óptico a 40X a los tres días después de sembrar. La coloración azulosa es debida a la aplicación de lactofenol, ya que sin éste no se distinguiría por ser transparente.	79
Figura 13. Aspecto de los esporidios de la Cepa 5, colectada en el híbrido de maíz A-Oso, vistos a través del microscopio óptico (40X), a los 11 días después de sembrar.	80
Figura 14. Tamaño de esporidios de cinco cepas de huitlacoche, medidos a los tres días después de sembrar.	83
Figura 15. Aspecto de un esporidio de huitlacoche al final de su crecimiento y desarrollo en medio de cultivo PDA.	83
Figura 16. Tamaño final de los esporidios de cinco cepas de huitlacoche....	85
Figura 17. Tamaño óptimo de muestra al medir ancho y largo de esporidios de cinco cepas de huitlacoche a los tres días después de sembrar y en desarrollo final.	88
Figura A. Características culturales de cinco cepas de huitlacoche en diferentes etapas de desarrollo.....	101

REACCIÓN DE HÍBRIDOS DE MAÍZ A CEPAS GENOTIPO ESPECÍFICAS DE HUITLACOCHÉ (*Ustilago maydis* (D.C.) Cda.) Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS AISLAMIENTOS INOCULADOS

REACTION OF HYBRIDS OF CORN TO SPECIFIC ROOTSTOCK GENOTYPE OF HUITLACOCHÉ (*Ustilago maydis* (D.C.) Cda.) AND PHENOTYPE CHARACTERIZATION OF THE INOCULATED ISOLATIONS

Samuel Velázquez Díaz¹ y Clemente Villanueva Verduzco²

RESUMEN

El huitlacoche (*Ustilago maydis* D.C. Cda.) es muy apreciado como alimento humano en México y ha ganado importancia a nivel internacional. La creciente demanda es insatisfecha, pues aún no se tiene un paquete tecnológico definido para la producción comercial del hongo. Los objetivos fueron determinar cuál de cinco sistemas cepa-maíz específico presenta mayor producción de huitlacoche a cielo abierto y caracterizar las colonias de las cepas utilizadas como inóculo. Fueron colectadas, aisladas y descritas cinco cepas de huitlacoche. Cada cepa fue inoculada en su respectivo maíz híbrido de origen. Los tratamientos resultantes fueron establecidos en un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. El tratamiento Cepa5-A-Oso presentó significativamente mayor porcentaje de incidencia, índice de severidad y rendimiento de huitlacoche por planta y por hectárea. Las colonias del hongo presentaron características diferentes, dependiendo de la cepa y de su estado de desarrollo al cultivarlas en PDA.

Palabras clave: inoculación, maíz híbrido, esporidio, inóculo, tamaño de muestra.

ABSTRACT

The Huitlacoche (*Ustilago maydis* (D.C.) Cda.) is really appreciated as food for humans in Mexico and has gained importance in the world. The increasing demand is not being satisfied, because there isn't still a technological package defined to produce the commercial fungus. The objectives in this research were to determine which of the five rootstock-corn specific systems presents the highest production of huitlacoche in the open air and characterize the colonies of the rootstock used as inoculum. Five rootstock of huitlacoche were collected, isolated and described. Each rootstock was inoculated in its respective hybrid corn of origin. The resulting treatments were established in a design of complete blocks randomly with four repetitions. The treatment rootstock5-A-Oso presented a significantly higher percentage of incidence, severity rate and yielding of huitlacoche per plant and per hectare. The colonies of fungus presented different characteristics, depending of the rootstock and its state of development when cultivated in PDA.

Key words: inoculation, hybrid corn, sporidium, inoculum, size of sample.

¹Tesista; ²Director de tesis

REACCIÓN DE HÍBRIDOS DE MAÍZ A CEPAS GENOTIPO ESPECÍFICAS DE HUITLACOCHÉ (*Ustilago maydis* (D.C.) Cda.) Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS AISLAMIENTOS INOCULADOS

REACTION OF HYBRIDS OF CORN TO SPECIFIC ROOTSTOCK GENOTYPE OF HUITLACOCHÉ (*Ustilago maydis* (D.C.) Cda.) AND PHENOTYPE CHARACTERIZATION OF THE INOCULATED ISOLATIONS

Samuel Velázquez Díaz¹ y Clemente Villanueva Verduzco²

RESUMEN

El huitlacoche (*Ustilago maydis* D.C. Cda.) es muy apreciado como alimento humano en México y ha ganado importancia a nivel internacional. La creciente demanda es insatisfecha, pues aún no se tiene un paquete tecnológico definido para la producción comercial del hongo. Los objetivos fueron determinar cuál de cinco sistemas cepa-maíz específico presenta mayor producción de huitlacoche a cielo abierto y caracterizar las colonias de las cepas utilizadas como inóculo. Fueron colectadas, aisladas y descritas cinco cepas de huitlacoche. Cada cepa fue inoculada en su respectivo maíz híbrido de origen. Los tratamientos resultantes fueron establecidos en un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. El tratamiento Cepa5-A-Oso presentó significativamente mayor porcentaje de incidencia, índice de severidad y rendimiento de huitlacoche por planta y por hectárea. Las colonias del hongo presentaron características diferentes, dependiendo de la cepa y de su estado de desarrollo al cultivarlas en PDA.

Palabras clave: inoculación, maíz híbrido, esporidio, inóculo, tamaño de muestra.

ABSTRACT

The Huitlacoche (*Ustilago maydis* (D.C.) Cda.) is really appreciated as food for humans in Mexico and has gained importance in the world. The increasing demand is not being satisfied, because there isn't still a technological package defined to produce the commercial fungus. The objectives in this research were to determine which of the five rootstock-corn specific systems presents the highest production of huitlacoche in the open air and characterize the colonies of the rootstock used as inoculum. Five rootstock of huitlacoche were collected, isolated and described. Each rootstock was inoculated in its respective hybrid corn of origin. The resulting treatments were established in a design of complete blocks randomly with four repetitions. The treatment rootstock5-A-Oso presented a significantly higher percentage of incidence, severity rate and yielding of huitlacoche per plant and per hectare. The colonies of fungus presented different characteristics, depending of the rootstock and its state of development when cultivated in PDA.

Key words: inoculation, hybrid corn, sporidium, inoculum, size of sample.

¹Tesista; ²Director de tesis

1. INTRODUCCIÓN

El huitlacoche, cuitlacoche o carbón común (*Ustilago maydis* D.C. Cda.) es un hongo que crece en la planta de maíz y está distribuido en donde quiera que se cultive este cereal.

El huitlacoche puede ser un problema fitopatológico, ya que causa disminución en el rendimiento del grano. Las pérdidas por ataque de *Ustilago maydis* son muy variables entre años, variedades y regiones; de tal manera que los daños pueden variar desde insignificantes hasta pérdidas del 100 %, principalmente en cultivos con variedades de maíz dulce (Thankur *et al.*, 1989; Agrios, 1978). Sin embargo, lo que representa una enfermedad en unos casos, en otros es benéfico y deseable, como en la región central de México, donde el hongo es alimenticio y de alto valor económico.

Desde la época prehispánica, el huitlacoche ha sido uno de los hongos que forman parte de la alimentación humana en México. Este producto es muy apreciado como alimento principalmente en la región central del país (Martínez, 1999) y en los últimos años ha ganado importancia a nivel internacional debido a sus características culinarias. Se le ha denominado como “caviar azteca”, se ha acentuando su popularidad y con ello la demanda en países de la Unión Europea, Japón y los Estados Unidos (Villanueva, 1995).

La demanda de huitlacoche en el mercado nacional e internacional es insatisfecha. En los mercados de la Ciudad de México la oferta de este producto en fresco se concentra en los meses de julio y agosto. Para 1981 se comercializaron de 300 a 400 toneladas por año (Kealey y Kosikowsky, 1981) de la recolección del hongo producido espontáneamente en campos de maíz para la producción de grano (Arnol, 1992, citado por Villanueva *et al.*, 2007). En México el hongo alcanza precios superiores a \$300.0 por kilogramo (en abril) y 20 dólares en los Estados Unidos de América en época de recolección (Villanueva *et al.*, 2007).

A pesar del incremento en la demanda de huitlacoche como alimento humano, el abastecimiento de este hongo todavía depende fundamentalmente de la producción espontánea (Pataky, 1991). Ante esta situación han sido realizadas investigaciones orientadas a la producción controlada del hongo mediante inoculaciones artificiales. Sin embargo, aún no se tiene un paquete tecnológico definido para la producción comercial de este producto.

Por otro lado *U. maydis* ha llegado a ser el modelo biológico bajo estudio más atractivo entre los basidiomicetos patogénicos de plantas (Kahamann y Kämper, 2004).

Ustilago maydis presenta una gran diversidad por su reproducción sexual, una alta capacidad para mutar y alta interacción con el ambiente, además puede confundirse con otros organismos por su crecimiento en forma de levadura (Guevara, 2007); lo cual dificulta los intentos por producirlo de manera artificial. Por lo tanto, es necesario que sean realizados estudios más detallados o específicos para tener un mejor conocimiento del hongo y

de la relación huitlacoche-maíz-ambiente y así hacer más controlable su producción artificial.

Por lo anterior, en el presente trabajo se pretende dar contribuir en la definición de un paquete tecnológico para la producción artificial o controlada de huitlacoche, al analizar de manera específica a las cepas inoculadas sobre sus respectivos maíces híbridos hospedantes de donde fueron colectadas, con los siguientes objetivos:

Objetivos

1. Evaluar el grado de ataque y la productividad de cinco cepas genotipo específicas de *Ustilago maydis* (D.C) Cda., al ser inoculadas artificialmente en el maíz híbrido de su procedencia.
2. Determinar cuál de los cinco sistemas cepa-híbrido específico presenta mayor producción de huitlacoche (*Ustilago maydis*) a cielo abierto.
3. Caracterizar fenotípicamente las colonias de las cepas utilizadas como inóculo en diferentes tiempos después de la siembra *in vitro*.
4. Obtener el tamaño óptimo de muestra requerido para la caracterización de esporidios en cinco cepas de huitlacoche.

Hipótesis.

Al inocular una cepa de huitlacoche en el genotipo (híbrido) de maíz del cual fue aislada, se espera tener alto grado de ataque y productividad de hongo por la especificidad de la interacción maíz-huitlacoche.

Las diferentes cepas cultivadas en medio de cultivo, presentan variabilidad en las características de sus colonias y de sus esporidios, ya que hay variación genética debida a la reproducción sexual del hongo; y el tamaño óptimo de muestra está en función directa de la magnitud de la variabilidad.

2. REVISIÓN DE LITERTURA

2.1. Origen y distribución

Generalmente se cree que *Ustilago maydis* es nativo del hemisferio oeste y que de aquí fue llevado al sur de Europa por los primeros exploradores españoles (Christensen, 1963).

El conocimiento de este hongo en México data desde la época prehispánica. En el Vocabulario de Fray Alonso de Molina elaborado en 1571 se encuentra el término *cuítlacochin* para referirse a “mazorca de maíz degenerada y diferente a las otras”. Los aztecas lo tenían bien identificado por su buen sabor y como uno de los alimentos exquisitos. En la actualidad, en las zonas rurales del país, principalmente entre los grupos étnicos, su nombre es muy diversificado (López, 1988).

El Centro de origen de *Ustilago maydis* es desconocido; sin embargo, como es un patógeno que sólo parasita al cultivo de maíz (*Zea mays* L.) y al teocintle, puede aceptarse que es originario del mismo lugar que éstos; es decir del Centro Sur mexicano mesoamericano.

El carbón del maíz aparece donde quiera que se cultive maíz. Sin embargo aparece con mayor frecuencia en las áreas cálidas y moderadamente secas, donde ocasiona daños a las variedades susceptibles (Agrios, 1978).

2.2. Clasificación taxonómica

En 1944 Stevenson y Johson establecieron que *Ustilago maydis* (D.C.) Cda. es el binomial correcto, de acuerdo a las Reglas Internacionales de Nomenclatura Botánica. Este binomial es actualmente usado por la mayoría de los fitopatólogos (Christensen, 1963).

Según Herrera y Ulloa (1998), la clasificación taxonómica de *Ustilago maydis* (D.C) Cda., es la siguiente:

Reino: Fungi

División: Eumycota

Clase: Euascomycetes

Subclase: Discomycetidae (discomicetes)

Orden: Ustilaginales

Familia: Ustilaginaceae

Género: Ustilago

2.3. Usos del huitlacoche

En los estados del centro del país como: Puebla, Tlaxcala, Hidalgo, México, Morelos, Oaxaca y Distrito Federal, el huitlacoche es consumido tradicionalmente en diferentes platillos típicos, como quesadillas, crepas y sopas, entre otros. El huitlacoche es rico en minerales, principalmente en calcio y fósforo (6.0 g y 39 mg/100 g de hongo, respectivamente); así como en vitaminas, sobresaliendo el ácido ascórbico con un valor de 3.7 mg/100g de huitlacoche (Villanueva *et al.*, 2007).

Algunos mutantes de huitlacoche han sido utilizados en la producción industrial de aminoácidos como lisina, valina, arginina, treonina y de algunas vitaminas como riboflavina, niacina, biotina y ácido fólico (Kealey y Kosikowski, 1981; Hirschhorn, 1986, citados por Villanueva *et al.*, 2007).

El huitlacoche se usa como modelo biológico para dilucidar las bases genético-moleculares de la patogenicidad de los hongos fitopatógenos sobre plantas cultivadas y de la respuesta genéticamente controlada a factores de estrés. Se espera que el entendimiento de los mecanismos genéticos de la interacción maíz-huitlacoche tenga aplicación en el control de enfermedades económicamente más importantes, como son las royas y los tizones de diferentes plantas cultivadas (Villanueva *et al.*, 2007).

2.4. Descripción morfológica

Este hongo lleva a cabo un número importante de transiciones morfológicas a través de su ciclo de vida, la más prominente es el cambio dimórfico de crecimiento por brotación a crecimiento filamentoso que es prerequisite para entrar a la fase biotrófica (Kahamann y Kämper, 2004).

Ustilago maydis (D.C.) Cda. produce un micelio dicariótico, que se fragmenta y se transforma en teliosporas después de ocasionar una necrosis en el tejido de la planta hospedante (Ulloa y Herrera, 1994, citados por Martínez, 1999).

Clinton (1904) citado por Christensen (1963) describió las clamidosporas de *U. maydis* como elipsoidales a esféricas, más o menos irregulares, con abundantes espinas pero con sus puntas recortadas, y normalmente ente 8-

11 μ , pero ocasionalmente arriba de 15 μ de longitud. Fischer (1953) citado por Christensen (1963) consideró la espora principalmente globosa a subglobosa, café olivo claro, y principalmente de 7-10 μ de diámetro.

La longitud de las clamidosporas varió, desde 4.8 μ hasta 30.7 μ . Las clamidosporas producidas por diferentes aislamientos variaron en el tamaño promedio de 7.8 x 8.5 μ a 9.1 x 10 μ (Christensen, 1963).

La teliospora (clamidospora) es un tipo de espora esférica o elipsoidal de color café oscuro a negro, con protuberancias prominentes en forma de espinas, de 7 a 11 μ de diámetro, con capacidad de resistir condiciones adversas del ambiente (es la estructura de resistencia del hongo); posee dos núcleos y al germinar presenta cariogamia, meiosis y mitosis; la pared se abre emitiendo un cuerpo tubular llamado basidio o promicelio, generalmente con cuatro células haploides que se transforman en basidiosporas (Herrera y Ulloa, 1998, citados por Villanueva *et al.*, 2007).

La longitud de esporidios difiere en gran medida, especialmente cuando las líneas son cultivadas sobre sustratos artificiales. Christensen (1963) midió los esporidios de tres líneas diploides y cuatro haploides. El promedio en longitud de esporidios de una línea dada varió desde 13.4 hasta 28.9 μ dependiendo de su fuente

El esporidio es ovalado, hialino, con núcleo haploide y constituye la fuente de inóculo primario; puede dividirse por gemación produciendo esporidios secundarios o puede germinar en la superficie del hospedante, produciendo una hifa haploide (Agrios, 1999).

El micelio haploide está formado básicamente por hifas haploides provenientes de la germinación del esporidio (De la Garza, 1974; Carroll, 1998; citados por Martínez, 1999).

Los soros o agallas se forman principalmente en la inflorescencia femenina, carecen de columela y pueden ser desnudos o estar cubiertos por un peridio. Las esporas son generalmente equinuladas y no están dispuestas en cadenas o forman bolas, se producen en gran cantidad dentro de cada soro, constituyendo masas negras pulverulentas en la madurez (Ulloa y Herrera, 1949, citados por Martínez, 1999).

2.5. Mutación

Los cultivos masivos de *U. maydis* frecuentemente llegan a ser no patogénicos después de muchas transferencias sobre un sustrato sólido artificial. Ahora se sabe que esto es debido a la selección unisexual de líneas a partir de una población mezclada más que debido a los mutantes.

La mutación es una de las causas primarias de variación genética en organismos carbón y *U. maydis* parece ser la especie más mutable de los hongos estudiados hasta ahora. Los tipos de mutaciones más comúnmente observados son: 1) Caracteres culturales, incluyendo color, topografía, consistencia de colonias, dirección del crecimiento, naturaleza del margen, zonación, tasa de crecimiento y tipo de crecimiento (esporidial o micelial); 2) Caracteres fisiológicos, incluyendo producción de enzimas, reacción a sustancias químicas (incluyendo tientes) y tóxicas, respuestas a

temperaturas, y tendencia a mutar; 3) caracteres monológicos, incluyendo tamaño, forma, y color de esporidio. 4) Compatibilidad sexual y virulencia.

La magnitud de las diferencias en características culturales entre mutantes y sus padres es a menudo llamativo, pero en algunos casos es casi imperceptible (Christensen, 1963).

Las mutaciones en forma y tamaño de esporidios no son insólitas en cultivos creciendo sobre medio nutritivo; por ejemplo, una línea mutante formó esporidios irregulares de diversas formas, otra produjo esporidios en forma de pesas, y aun otra produjo esporidios que normalmente fueron redondeados en sus extremos. Algunos mutantes tienen una tendencia a desarrollar pigmento oscuro en sus esporidios. Puede haber cambios pronunciados en compatibilidad entre líneas haploides. En *U. maydis*, la mayoría de las mutaciones de genes para virulencia ha involucrado pérdida de factores para patogenicidad. Como en otros caracteres mutantes, puede haber muchos cambios en los grados de virulencia. Las líneas diploides ocasionalmente producen mutantes que fallan para causar infección cuando son inyectados solos en plantas de maíz por medio de jeringas hipodérmicas (Christensen, 1963).

La mutación en *U. maydis* es fácilmente detectada cuando los organismos son cultivados sobre un sustrato nutritivo sólido. Sobre tal medio, los mutantes aparecen más frecuentemente como un sector en forma de cuña o de abanico en la colonia. Un alto porcentaje de los sectores normalmente se desarrolla cerca del final de una colonia; aunque ellos pueden también originarse cerca del centro. Los sectores varían grandemente en tamaño, forma, color, y caracteres culturales; y también en agudeza del contorno.

Algunas veces pequeños sectores distintos pueden ocurrir entre sectores primarios. Obviamente muchos mutantes no son observados debido a que pueden ser similares a sus padres sobre el medio de cultivo sobre el cual ellos surgieron pero a veces ellos son muy diferentes cuando crecen en un ambiente diferente. Además, pueden ocurrir cambios en factores para compatibilidad, virulencia, y fisiología sin obvia modificación de caracteres culturales.

Con respecto a la frecuencia de la mutación se ha demostrado que la tasa de mutación de una línea monosporidial negra a blanca fue alrededor de 1-1000.

Algunos mutantes permanecen relativamente constantes a través de muchas generaciones de cultivos sucesivos, mientras que otros producen nuevos mutantes y esos a su vez pueden producir aún otros mutantes y así sucesivamente.

De acuerdo con Stakman *et. al.*, citados por Christensen, 1963, las altas temperaturas, 25°C o más, son conductivos para la mutación. La alta temperatura, como otros agentes mutagénicos, no solamente incrementa la frecuencia de mutación, sino que induce cambios genéticos pronunciados y diversos. Por lo tanto es deseable almacenar los cultivos del hongo a 17°C o menos para inhibir cambios genéticos.

2.6. Desarrollo de la enfermedad

El hongo inverna en forma de teliosporas en los restos del cultivo y en el suelo, donde se mantiene viable durante muchos años. En la primavera y el

verano, las teliosporas germinan y producen basidiosporas que son llevadas por las corrientes de aire y son salpicadas por la lluvia hasta los tejidos jóvenes y en proceso de desarrollo de las plantas de maíz. Las basidiosporas germinan sobre la superficie del hospedero y producen una hifa fina, la cual se introduce en las células epidérmicas por penetración directa. Sin embargo, después de un desarrollo inicial, el crecimiento se detiene y la hifa por lo común se marchita y en ocasiones muere, a menos que entre en contacto y se fusione con una hifa haploide proveniente de una basidiospora del tipo de apareamiento compatible (Agrios, 1999).

El proceso de apareamiento de los esporidios es regulado por un sistema de apareamiento tetrapolar que consiste en el apareamiento de los loci *a* y *b*. El locus bialélico *a* codifica componentes de un sistema de reconocimiento de célula/célula consistiendo de precursores y receptores de feromonas lipopéptidas.

La compatibilidad del apareamiento es regulada por genes productos de los loci *a* y *b* en el nivel de pre y postfusión, respectivamente. El dicarion filamentososo resultante del apareamiento depende de la planta hospedante para su desarrollo completo. En contacto con la planta, características estructuras de infección, llamadas apresorios, permiten la penetración directa y la subsecuente proliferación en el órgano de la planta infectada. La planta hospedante reacciona con la formación de tumores en los cuales el hongo prolifera y eventualmente produce teliosporas diploides. Hasta ahora no ha sido posible generar estructuras de infección *in vitro* lo cual puede indicar la necesidad de ciertas señales de plantas o señales superficiales

que necesiten ser reconocidas para desencadenar esta diferenciación (Kahamn y Kämper, 2004).

Snetselaar y Mims en 1993, al documentar la infección de los estigmas con micrografías, reportaron que cuando el inóculo consistió de cepas haploides individuales, no fueron observados ni apareamiento ni estructuras de infección. Cuando los estigmas fueron inoculados con esporidios que tuvieron alelos compatibles en ambos loci de apareamiento (*a*, *b*), el esporidio se apareó usando un tubo de conjugación, y cada par formó una hifa de infección dicariótica que creció rápidamente atravesando la superficie del estigma, desarrolló un apresorio, y penetró el estigma. Cuando el esporidio fue compatible a *a* pero no a *b*, el apareamiento ocurrió irregularmente, y la hifa resultante creció lentamente y no penetró el estigma. Los esporidios incompatibles a *a* no se aparearon o formaron estructuras de infección sin importar los alelos *b* que ellos llevaban. El esporidio diploide con alelos compatibles *a* y *b* no se apareó pero formó hifa infectiva directamente. Las hifas dicarióticas y diploides formaron apresorios hialinos, ligeramente hinchados sobre los cruces de la pared celular. La hifa penetrante surgió del apresorio y penetró los estigmas creciendo entre células epidermales.

El micelio en la agalla permanece intercelularmente durante la formación de la misma, pero antes de la esporulación, las células alargadas del maíz son invadidas por el micelio, por lo que se colapsan y mueren. El micelio del hongo utiliza los contenidos de la célula para desarrollarse, y la agalla consiste entonces principalmente de micelio dicariótico y restos de células. La mayoría de las células dicarióticas posteriormente se transforman en

teliosporas y durante el proceso parecen absorber y utilizar el protoplasma de las demás células miceliales, las cuales quedan vacías. Sólo la membrana que cubre a la agalla no es afectada por el hongo, pero finalmente se rompe y las teliosporas son liberadas. La mayoría de las teliosporas cae sobre el suelo o permanece en los restos del maíz, donde pueden sobrevivir durante muchos años (Agrios, 1978).

Kahman y Kämper, en 2004 al hacer una revisión de la relación de la biología con el desarrollo patogénico encontraron que entre 3 y 4 días post infección, las hifas comienzan a ramificar y se llenan con citoplasma. El dramático cambio en el modo de crecimiento coincide con el comienzo del desarrollo de tumor alrededor de 5 días post infección. En estados subsecuentes, la ramificación incrementa profusamente y ocurre a intervalos más cercanos, señalando el comienzo de la formación de teliosporas. A los 9 días post infección las hifas fúngicas están rodeadas por material mucilaginoso, y tienden a torcerse una contra otra. La fragmentación de hifas en segmentos de una a varias células alargadas también ocurre en este punto dando una apariencia de un “saco lleno de gusanos”. La cariogamia probablemente ocurre en este estado, y es seguido por la maduración de células individuales redondeadas para producir las teliosporas diploides ornamentadas.

2.7. Métodos de inoculación artificial

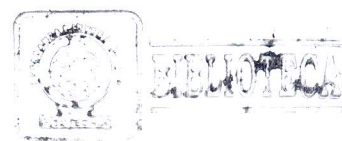
Muchos investigadores han inoculado semillas de maíz con clamidosporas de *U. maydis* y obtuvieron resultados negativos. La inoculación artificial de

maíz no fue exitosa hasta que Brefeld en 1888 asperjó la planta de maíz con una suspensión de esporidios producidos en un medio de cultivo. Este método de aspersión ha sido empleado subsecuentemente por muchos investigadores. Las clamidosporas secas también han sido espolvoreadas sobre plantas. Las dos técnicas han sido usadas extensivamente en el campo para probar líneas y variedades de maíz para resistencia al hongo (Christensen, 1963).

En 1988 López observó que cuando se inyectaron las basidiosporas en el tallo y el cogollo a plantas de 30 días de edad se originó el porcentaje de infección más alto y se formó la mayor cantidad de agallas del hongo.

Thakur *et al.* (1989), obtuvieron que las agallas de jilote fueron inducidas en alta frecuencia en las plantas del maíz Tastyvee sweet en las cuales la suspensión esporidial fue inyectada entre la vaina de la hoja y el tallo en el sexto, séptimo, y octavo nudos por abajo de la punta de la planta 0-8 días antes de la emergencia de la espiga. El desarrollo de las agallas fue más variable en tallos o brotes axilares que en jilotes. Se obtuvo que la técnica de inyección es adecuada para estudios de interacción hospedante-patógeno entre maíz y huitlacoche.

Pataky (1991) probó las siguientes técnicas de inoculación para inducir agallas de mazorca en maíz dulce: 1) asperjando suspensiones esporidiales entre las vainas de las hojas y los tallos del sexto al octavo nudo; 2) inyectando suspensiones esporidiales dentro del sexto al octavo entrenudo; 3) hiriendo las vainas de las hojas del sexto al octavo nudos con arena, seguido por una aspersión de una suspensión esporidial en las heridas; 4) hiriendo las vainas de las hojas del sexto al octavo nudo con arena en la



cual iban mezcladas las teliosporas. Solamente la técnica de la inyección esporidial incrementó sustancialmente la incidencia de hongo, pero esta incrementó la incidencia de agallas de tallo, espiga y hoja más que las agallas de jilote.

Zimmerman y Pataky (1992) evaluaron varios métodos de inoculación de huitlacoche en maíz dulce. La inyección de esporidios dentro de los canales de estigmas en los estados de plenos estigmas y estigmas tempranos resultó en 50 % y 20 % de incidencia de agallas de jilote, respectivamente, sobre Sweetie Bicolor 76 y Yankee Belle. La inyección de teliosporas en los estados de plenos y tempranos estigmas resultó en 24 y 21 % de jilotes con hongo. Menos del 5 % de los jilotes tuvieron agallas cuando los esporidios o teliosporas fueron inyectados dentro de jilotes antes de la emergencia de los estigmas o dentro de los brotes antes de la emergencia de los tallos de jilote. Asperjando esporidios o teliosporas sobre tallos de jilote heridos por raspado con arena no incrementó sustancialmente el hongo. En otra prueba, la incidencia de agallas de jilote fue 40 y 44 % en Sweetie Bicolor 76 cuando las teliosporas o esporidios fueron asperjados sobre tallos de jilotes heridos en los estados de temprano y medio estigma, respectivamente. Otros tratamientos, incluyendo el testigo, tuvieron alrededor del 20 % de agallas de mazorca.

Villanueva y su equipo de trabajo fijaron la densidad de inóculo en 10^6 esporidios por mililitro de suspensión y la edad de los jilotes en estigmas de 3 a 5 cm de longitud por fuera de las brácteas de la mazorca (Villanueva *et al.*, 2007).

Pope y McCarter (1992) evaluaron métodos de inoculación para inducir huítlacoche en jilotes de maíz. El inóculo, que consistió de una mezcla de seis líneas de esporidios a 10^6 células por mililitro, fue aplicado (3 ml por jilote) a estigmas intactos, a estigmas parcial o totalmente removidos con tijeras de podar, o a los extremos expuestos de jilotes de los cuales fueron removidos 1.5-2 cm del elote por medio de poda, o este fue inyectado a través de las brácteas dentro el elote. La inoculación de estigmas intactos o parcialmente removidos resultó en poca o nula enfermedad. La inoculación de las puntas de los jilotes de los cuales los estigmas fueron totalmente removidos o donde 1.5-2 cm del elote fueron removidos fue moderadamente exitosa. Los métodos de inyección de elotes y de inyección en puntas resultaron consistentemente en la más alta incidencia (97 %) y la más alta severidad de la enfermedad.

Leal en 1996 trabajó sobre evaluación de metodologías para la inducción artificial de huítlacoche llegando a las siguientes conclusiones: Se observó que estadísticamente es preferible usar basidiosporas como inóculo en lugar de teliosporas. Es posible inducir artificialmente la infección de *Ustilago maydis* en jilotes de maíz mediante la técnica de inoculación. No se encontró diferencia estadística entre hacer una o dos aplicaciones de inóculo. No se encontraron diferencias entre el empleo de una concentración de 10^5 esporas por ml y de 10^6 esporas por ml. Se observó que estadísticamente es mejor aplicar en forma endógena que exógena inyectando el inóculo a través del canal por el que emergen los estigmas.

Villanueva (1995) encontró que los mejores resultados se obtuvieron aplicando 10^6 basidiosporas por ml de agua destilada estéril, inoculadas en

con mazorca totalmente agallada (33.4 %) e índice de severidad (49.28 %), superando a los otros tratamientos evaluados con inóculo producido en medio sólido. También encontró que los jilotes con estigmas próximos a emerger fueron los mejores y que el tratamiento con una densidad de 2.5 millones de basidiosporas ml^{-1} , fue el mejor para el caso del índice de severidad.

2.8. Factores que influyen en el desarrollo del huitlacoche

Villanueva *et al.* (2007) indican que en general, para que ocurra el desarrollo del huitlacoche se requiere de: tejido tierno de la planta susceptible de maíz, hongo virulento específico para la planta susceptible, una técnica adecuada de inoculación y condiciones ambientales favorables.

2.8.1. Factores ambientales

Villanueva *et al.* (2007) indican que en campo abierto, cuando se tiene una variedad de maíz susceptible y un inóculo de huitlacoche virulento específico para dicha variedad, el clima adquiere un papel permisivo e incontrolable. Por lo cual no existen actualmente tecnologías seguras de producción controlada de huitlacoche a cielo abierto.

Es usualmente asumido que la lluvia y el clima húmedo son los factores ambientales más críticos y esenciales para la infección. La humedad es definitivamente necesaria para la germinación del tubo germinativo hasta que el hospedante es penetrado (Christensen, 1963).

Si la mayoría de la infección natural ocurre en regiones meristemáticas del cogollo, entonces parecería improbable que la humedad fuera un factor limitante después de que el inóculo ha logrado la infección. Cuando las plantas son inoculadas por el método de la jeringa hipodérmica y colocadas en un invernadero relativamente seco, han resultado siempre excelentes resultados. Se han obtenido resultados que indican que el clima seco, expresado por un bajo número de días de precipitación y un alto porcentaje de sol, condujo al desarrollo del hongo.

Burger (1809) citado por Christensen (1963), reportó que la alta densidad de población de maíz favoreció el desarrollo del hongo. Se estableció que las plantaciones densas promovieron el desarrollo del hongo debido a que estas mantuvieron mayor humedad del aire. También se cree que las plantaciones densas incrementaron la cantidad de hongo debido a que las plantas permanecieron succulentas por periodos más largos. También se ha reportado mayor porcentaje de incidencia de plantas infectadas cuando las plantas están más juntas que cuando están más separadas. Sin embargo, algunos autores obtuvieron resultados opuestos a los anteriores; las siembras más espaciadas no sólo dieron un mayor porcentaje de plantas con hongo, sino que la severidad fue tres veces mayor sobre el maíz con menor densidad de población.

Leal (1996), al evaluar metodologías para la inducción artificial de huitlacoche, no obtuvo diferencias entre emplear densidades de 35,000 y 55,000 plantas por hectárea.

En 1999, Martínez, al inocular diferentes patotipos de huitlacoche sobre maíz de genotipo uniforme concluyó que la humedad relativa afectó notablemente

el desarrollo del huitlacoche, ya que en maíz híbrido establecido en la misma fecha de siembra (5 de abril de 1997), en la primera inoculación (26-30 de junio) con 64 % de humedad relativa resultó 0 % de incidencia; mientras que en la segunda inoculación (15-18 de julio) con 72.2 % de humedad relativa, hubo teliosporas con un alto porcentaje de incidencia (83.33 y 87.5 %).

Hay considerables diferencias de opinión sobre la predominancia del hongo en maíz sembrado en diferentes fechas. Muchas pruebas han sido hechas; algunos investigadores reportaron más hongo en siembras tempranas, otros menos, otros no obtuvieron diferencias en cantidad de hongo al sembrar en diferentes fechas.

En 1988 López estudió los factores que determinan el desarrollo del huitlacoche y concluyó que los periodos donde se formó la mayor cantidad de agallas coincidieron con las humedades relativas más altas (estando éstas entre 80.36 % y 72.31 %); también se encontró cierta tendencia a incrementar la cantidad de agallas conforme aumentó la precipitación (53.0-48.0 mm). La velocidad del viento no tuvo influencia alguna.

Las temperaturas relativamente altas favorecen la formación y la germinación de clamidosporas, la brotación de esporidios y el crecimiento del micelio. La mayoría de los investigadores está de acuerdo en que las temperaturas de 25°C o más conducen al desarrollo del hongo en el hospedante. También se ha encontrado que las temperaturas arriba de 25 °C son propicias para la infección, mientras que las temperaturas de 20 °C o menos son de los principales factores limitantes. Es bien sabido que las agallas de huitlacoche desarrollan clamidosporas maduras mucho más rápido a temperaturas relativamente altas que a bajas.

En 1988 López estudió los factores que determinan el desarrollo del huitlacoche y encontró que el hongo se aisló favorablemente sembrando las clamidosporas y/o basidiosporas mediante el método de siembra de rayado con PDA a temperaturas de 25 a 28 °C. También concluyó que los periodos donde se formó la mayor cantidad de agallas coincidieron con la temperatura media más alta (18.72-17.17 °C)

Leal en 1996 al evaluar metodologías para la inducción artificial no encontró diferencias entre fertilizar y no fertilizar el maíz en el que se inoculó.

Villanueva *et al.* (2007), indican que la producción artificial de huitlacoche al aire libre no es segura pese a contar con variedades susceptibles y cepas virulentas del hongo, ya que ésta depende de las condiciones ambientales.

2.8.2. Características del hospedante

Se ha considerado por algunos autores que ciertos caracteres fisiológicos y morfológicos del maíz están relacionados con su resistencia al huitlacoche, (Villanueva *et al.*, 2007).

Villanueva (1995) señaló que la ausencia de lígula en las hojas de maíz está asociada con la susceptibilidad; la buena cobertura de la mazorca está relacionada con la resistencia, porque aporta protección contra las infecciones naturales y que el número de granos en la mazorca presenta una relación inversa con la resistencia. Este mismo autor indicó que Hirschhorn (1986) y Zimmerman y Pataky (1992), señalan que la compactación de las hojas de mazorca es un carácter que favorece la resistencia.

En estudios relacionados con el vigor del hospedante en relacion al desarrollo del hongo, se ha concluido que el desarrollo rápido y sostenido de la planta de maíz desde estado de plántula a tamaño final, les permitió a las plantas resistir o escapar al hongo (Walter, 1935 citado por Christensen, 1963).

Frecuentemente las agallas son grandes y normalmente mucho más conspicuas en plantas de maíz vigorosas. Cuando las plantas son extremadamente bajas en vigor, el número de agallas por planta puede ser reducido debido a un decremento en el desarrollo de brotes de nudo (Walter, 1935 citado por Christensen, 1963).

En cuanto a los daños al hospedante, ha habido varios reportes contradictorios. La infección del hongo desarrolla por si misma sobre partes dañadas. La mutilación (por ejemplo el desespigado) parece tener un efecto indirecto, ya que éste estimula el desarrollo de agallas del hongo en meristemas laterales e internodales.

Villanueva (1995) basado en pruebas realizadas en variedades criollas de maíz de la raza Chalqueño indica que cuando los jilotes son inoculados muy jóvenes (sin estigmas), mediante inyección con jeringa hipodérmica, tienden a abortar y a mostrar pudriciones por patógenos sistémicos; en cuyo caso, la planta no produce grano ni huitlacoche, existiendo diferencias notables a esta reacción entre variedades criollas de polinización abierta. Según este autor, el mejor tamaño para la inoculación del jilote, es aquel que haya logrado un crecimiento tal que evite la detención de su desarrollo a consecuencia de las heridas ocasionadas al inyectarle el inóculo.

El autor anteriormente citado, experimentó con varios tamaños de jilote y encontró que la inoculación de jilotes con estigmas que están a punto de brotar, fue numéricamente mejor que la inoculación de jilotes con estigmas de 3 cm de longitud, por su mayor porcentaje de incidencia, índice de severidad y de plantas con mazorca totalmente agallada; lo mismo ocurrió en otro experimento con los jilotes sin estigmas que superaron significativamente a los que tienen estigmas.

En 1999, do Toi y Pataky encontraron que los jilotes fueron susceptibles a la infección por *U. maydis* desde el momento de la emergencia de los estigmas hasta 8-14 días después de esta. Durante este periodo de susceptibilidad, la incidencia de jilotes con agallas decreció significativamente conforme envejecieron los estigmas, siendo 85, 66, 26, y 7 % cuando los jilotes fueron inoculados a los 0, 4, 8 y 12 días después de la emergencia de los estigmas, respectivamente. El periodo en que los jilotes fueron susceptibles a la infección por huitlacoche fue más corto y la incidencia de jilotes con agallas decreció más rápidamente cuando los estigmas fueron expuestos al polen que cuando no lo fueron.

Por otro lado, la relación entre la incidencia de jilotes con agallas y la edad de los estigmas varió entre híbridos, lo cual puede estar asociado con la variación en el periodo de tiempo en la emergencia de los estigmas entre híbridos de maíz dulce. Un prolongado periodo de emergencia de estigmas extendería el periodo de infección por *U. maydis*, debido a que los estigmas de emergencia tardía no son polinizados y permanecen susceptibles a la infección del hongo (do Toi y Pataky, 1999).

Pataky y Chandler (2003) al estudiar la época de inoculación y el control de la polinización, encontraron que el rendimiento de huitlacoche y severidad de agallas de jilotes estuvieron cercanamente relacionados; dichas variables fueron más grandes cuando los jilotes fueron inoculados 4-8 días después del estado de crecimiento de media-seda (estigmas comenzando a emerger en el 50 % de plantas en una parcela).

Dichos autores también encontraron que las agallas de jilote fueron 5-15 % más grandes sobre jilotes que no fueron polinizados, comparadas con los que fueron polinizados. El rendimiento máximo de huitlacoche fue de 131 g por jilote de maíz dulce desespigado inoculado 6 días después de la etapa de media-seda. Alrededor del 25 % del peso total del huitlacoche fue considerado comercial cuando los rendimientos fueron más altos. La calidad de huitlacoche no fue afectada por los tratamientos de tiempo de inoculación o polinización, pero la calidad de huitlacoche cosechado 12-14 días después de la inoculación fue inaceptable principalmente debido a la falta de teliosporas, lo cual afectó el color y sabor.

Para que ocurra la máxima incidencia y severidad de huitlacoche, se requiere que la inoculación sea realizada en el tamaño óptimo de jilotes, el cual también depende del tipo de variedad ya que existen variedades donde resulta mejor inocular jilotes antes de que sus estigmas expuestos alcancen la máxima longitud (Villanueva, 1995; Villanueva *et al.*, 2007)

2.8.3. Variedad hospedante

La gran mayoría de las variedades de maíz presenta algún grado de susceptibilidad al ataque de *Ustilago maydis*; las variedades de maíz dulce son las más susceptibles a esta enfermedad (Pataky *et al.*, 1995).

Cada variedad de maíz puede responder de diferente manera a la fecha de siembra, densidad de inóculo aplicado y tamaño de jilote inoculado. Esto implica que para cada variedad susceptible y localidad con clima favorable para el desarrollo del huitlacoche, deben definirse también de manera específica la edad óptima de inoculación del jilote y la mejor fecha de siembra, Villanueva *et al.* (2007).

Los autores anteriormente citados indican que los híbridos resistentes al carbón han sido producidos en programas de mejoramiento, pero que la naturaleza y durabilidad de la resistencia han permanecido desconocidas. Corcuera y Sandoval (1999), citados por Villanueva *et al.* (2007), indicaron que 78 líneas endogámicas de maíz fueron probadas para evaluar su comportamiento al huitlacoche y que sólo un 7.9 % del total fueron atacadas por este patógeno; además indicaron que Corcuera probó 37 líneas endogámicas de maíz y encontró que *Ustilago maydis* se presentó sólo en cinco (13.5 %) de ellas con sus síntomas clásicos en inflorescencias masculinas y femeninas.

Orona (1995), al evaluar la magnitud de la incidencia y severidad inducida y natural de algunas variedades mexicanas de maíz, encontró que la mayor incidencia de huitlacoche se presentó en las variedades Hidalgo 8 (36.03 %) e híbrido H-129 (35.13 %). Con respecto a la incidencia natural que se

presentó en la mazorca y el tallo, se obtuvieron los más altos índices de infección en la mazorca de la variedad Cafime SM₁₂ Seq. (25.68 %) y Zacatecas 218 Original (14.17 %). Mientras que los más bajos ocurrieron en el híbrido H-129 (0.83 %) y V-7 original (0.93 %).

El autor anteriormente citado también encontró que hubo diferencias significativas para la severidad inducida, no así para la severidad natural. La mayor severidad inducida se observó en las variedades Cónico compuesto original (33.09 %) y México 208 (19.23 %) y la más baja en las variedades V-7 original (0.94 %) e Híbrido H-30 (1.81 %) y H-28 (1.81 %). En general, la severidad fue mayor cuando la infección ocurrió de manera natural que cuando se hizo inoculación. La mayor cantidad de huitlacoche por parcela con huitlacoche inducido (34.85 g) y espontáneo (217.5 g) se tuvo en la variedad Cafime SM₁₂ Seq.

Leal (1996), al evaluar metodologías para la inducción artificial de huitlacoche, no detectó diferencias entre el empleo de las variedades H-422 y el Blanco Alemán, por lo que ambas presentaron una respuesta similar a la inducción artificial del carbón.

En 1988 López estudió los factores que determinan el desarrollo del huitlacoche y concluyó que no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos probados, en cuanto a susceptibilidad a *Ustilago maydis*.

Villanueva *et al.* (2007) indican que se debe considerar que para lograr buenos resultados de incidencia, severidad y rendimiento de huitlacoche artificialmente inducido, el uso de variedades criollas de polinización abierta de maíz es una desventaja crucial, ya que su heterogeneidad genética es

otro órgano de la planta representan un problema para la producción porque al no estar cubiertas por el totomoxtle, como en el caso de la mazorca, producen agallas pequeñas y endurecidas propensas al deterioro por daños físicos durante la cosecha y manejo posterior y facilitan contaminaciones e

infecciones no deseadas por diseminación hacia otros cultivos de maíz sembrados para cosechar grano (Villanueva *et al.*, 2007).

Melches en 1921, citado por Christensen (1963), encontró que los cultivos de *U. maydis* fueron diferentes en su habilidad para causar infección al inocularlos artificialmente en plantas. Indicó que las líneas de autocruza y los híbridos difirieron en resistencia al cultivarlos en diferentes localidades. Por estos tiempos, Stakman y Christensen hicieron aislamientos de clamidosporas y los inocularon en 10 variedades de maíz que difirieron grandemente en susceptibilidad al hongo. Todos los cultivos causaron infección en todas las variedades, pero las diferencias en severidad de infección en ciertas líneas de maíz fueron a veces muy grandes.

Bartolón *et al.* (1999) evaluaron tres fuentes de inóculo en la producción artificial de huitlacoche en los Valles Altos de México. Las fuentes inoculadas fueron: Chapingo, Cholula y Chapingo+Cholula en una variedad experimental susceptible. Se inocularon 1868, 2269 y 474 plantas con las correspondientes cepas, aplicando 1.5 ml de una suspensión con 10^6 basidiosporas ml^{-1} . El testigo consistió de 1500 plantas que se dejó sin inoculación. El testigo presentó 0 % de incidencia del hongo. Las tres cepas probadas de *Ustilago maydis* (Chapingo, Cholula y Chapingo+Cholula) fueron estadísticamente iguales para rendimiento de huitlacoche (4.26, 5.0 y 5.41 toneladas ha^{-1} , respectivamente).

En 1999, Martínez al inocular diferentes patotipos de huitlacoche sobre maíz de genotipo uniforme concluyó que la teliospora número 70, fue significativamente superior en las variables índice de severidad (50.6), rendimiento del hongo por planta infectada (279.7 g) e inoculada (215.2 g), lo

que representa un rendimiento extrapolado de 12.91 ton ha⁻¹ (60,000 plantas ha⁻¹). El valor más alto de incidencia del hongo fue para la teliospora número 71 con 87.50 %. De las 300 familias evaluadas, la familia 79 presentó el mayor peso promedio del hongo por planta inoculada (151.87 g) estimándose un rendimiento de 9.11 ton ha⁻¹, con base en a una muestra de 19 plantas inoculadas. De igual manera, las familias 38 y 75 obtuvieron el más alto porcentaje de incidencia del hongo, 92.86 % .

Villanueva *et al.* (2007) indican que no es problema encontrar variedades susceptibles, patógeno virulento, ni clima favorable; lo difícil es garantizar que en cultivo a cielo abierto coincidan a voluntad las condiciones de temperatura y humedad relativa favorables para el desarrollo del hongo en los días subsiguientes a la inoculación. Además indican que las discrepancias sobre el nivel de humedad y temperatura que más afectan la incidencia y el desarrollo del huitlacoche, pueden deberse a las diferencias genéticas del material vegetal utilizado por los diferentes autores en sus estudios.

Un aspecto importante a considerar para llevar a mayor escala la producción artificial de huitlacoche es la pureza de la cepa a utilizar en la inoculación. Existe la posibilidad de que en los aislamientos de este hongo estén presentes levaduras (*Pichia* y *Candida*) y bacterias que pueden tener efectos antagónicos sobre el crecimiento de *U. maydis* (Guevara, 2007). El crecimiento de estos contaminantes y el del huitlacoche es muy similar en forma (levaduriforme) y color, por lo que se dificulta la diferenciación entre ellos en las primeras etapas de desarrollo (Villanueva *et al.*, 2007).

Especies de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* así como algunas bacterias, pueden colonizar a las agallas maduras de huitlacoche (Christensen, 1963).

2.9. Metrología microscópica

La medición del tamaño de las células y organelos en el microscopio óptico requiere necesariamente de dos reglillas; una grabada sobre un pequeño círculo de vidrio que se coloca dentro del ocular que se llama micrómetro ocular, y la otra se encuentra grabada en una placa de cristal con divisiones muy precisas, esta placa de cristal es muy similar a un portaobjeto y se le conoce como micrómetro del objeto, micrómetro objetivo o de platina.

Esta última reglilla tiene por lo general un segmento grabado de 2 mm dividido en 200 partes, o de 1mm dividido en 100 partes, es decir divisiones de 1/100 micras. Cuando se observa a través del microscopio con ambas reglillas colocadas se les puede ver superpuestas en el campo visual, y se puede saber cuántas líneas del micrómetro ocular concuerdan con cuántas líneas del micrómetro del objeto (Barrera y Cárdenas, 1997).

Para obtener las dimensiones de los objetos vistos al microscopio en micras, es necesario que los valores de longitud obtenidos por medio de la reglilla del micrómetro ocular sean multiplicados por un factor de conversión, el cual es obtenido como a continuación se describe (Kohashi, 1967; French y Hebert, 1980; Barrera y Cárdenas, 1997).

- a) Sustituir el ocular del microscopio por el ocular micrométrico.
- b) Enfocar la escala del micrómetro de platina a través del microscopio.

- c) Girar el ocular hasta que las dos escalas estén paralelas.
- d) Mover el micrómetro de platina hasta que el comienzo (extremo izquierdo) de su escala coincida con el de la escala del micrómetro ocular.
- f) Se calcula el valor micrométrico (VM) en micras:

$$VM = \frac{\text{Medida del micrómetro de platina, en micras}}{\text{Unidades del micrómetro ocular}}$$

Una vez calibrado el microscopio y obtenido el VM se procede a medir el ancho y la longitud del objeto de interés.

2.10. Determinación del tamaño óptimo de muestra

En muestreo, al tomar una muestra de tamaño n sólo se revisa una fracción n/N de una población de tamaño N , y con base en ella, se infiere el valor del parámetro en la población completa. Es evidente que en estas condiciones existirá un error, el investigador no puede estar exento de él; pero éste es controlable (Abad y Servín, 1982).

Uno de los criterios que se usan para determinar el tamaño óptimo de muestra necesario para estimar un parámetro, es mediante la fijación de la precisión y la confiabilidad del estimador.

La precisión se refiere al máximo alejamiento o error que el investigador está dispuesto a aceptar entre el estimador y el parámetro correspondiente.

La confiabilidad está dada por la seguridad o confianza que se desea tener de que el estimador conserve la precisión deseada.

La ecuación para obtener el tamaño de muestra para una población infinita o muy grande es:

Donde,

n_0 = tamaño óptimo de la muestra; el cual depende de:

$Z_{\alpha/2}^2$: confiabilidad deseada (valor de tablas)

S_N^2 : varianza de la media, estimada en una muestra preliminar.

d^2 : precisión de nuestro estimador.

Si se desea un tamaño de muestra que garantice una confiabilidad de 95%,

entonces $\alpha=0.05$ ($Z_{\alpha/2}^2 = (-1.96)^2 = 3.8416$) y se cuenta con s_n^2 , estimador de

S_N^2 , se tiene una estimación del tamaño de muestra mediante la ecuación:

$$n_0 = \frac{3.84 s_n^2}{d^2}$$

Los factores que determinan el tamaño de muestra n_0 son los siguientes.

Precisión (d). La precisión d aparece como denominador, por lo que si se desea una precisión alta, entonces el valor de d será pequeño con lo cual tendremos un n_0 de tamaño relativamente grande, es decir que a medida que se requiera mayor precisión, se requerirá un mayor tamaño de muestra (n_0).

Confiabilidad. En la ecuación que se ha venido analizando, la confiabilidad $(1-\alpha)$ está expresada en términos de $Z_{\alpha/2}$ que se encuentra en el numerador, por lo que a mayor confiabilidad, o sea, a mayor valor de $Z_{\alpha/2}$, se tendrá un mayor tamaño de muestra.

Varianza o variabilidad de la población. La variabilidad de una población se mide a través de la varianza y ésta, que se identifica como S_N^2 forma parte

del numerador de la ecuación para n_0 ; es por esto, que a mayor valor de S_N^2 se tendrá un mayor tamaño de n_0 . Cuando se tienen poblaciones homogéneas, los valores de S_N^2 son pequeños, por lo que al aumentar la variabilidad de una población, se tendrá un tamaño de S_N^2 mayor y por lo mismo se requerirá de un mayor tamaño de muestra (Gómez, 1977).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Evaluación del efecto de la inoculación cepa-híbrido específicos

3.1.1. Localización del sitio experimental

El experimento fue establecido en el Campo Agrícola Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, durante los ciclos primavera-verano de los años 2006 y 2007, ubicado en el Campus Chapingo a los 19° 29' de latitud Norte y a los 98° 53' de longitud Oeste, a una altura de 2240 msnm (García, 1988).

3.1.2. Establecimiento y manejo del experimento en campo

El experimento fue establecido en los años 2006 y 2007. La siembra de los híbridos de maíz en el año 2006 fue realizada el día 27 de marzo. Fueron sembradas manualmente una y dos semillas por cepa de manera alternada, con separación de 20 cm entre cepas, en surcos de 5 m de largo y una separación entre éstos de 80 cm, con lo que se obtuvo una densidad de población de 62,500 plantas ha⁻¹.

En el año 2007, la siembra de los híbridos de maíz fue realizada de la misma manera que en el 2006, excepto que en éste hubo dos fechas de siembra; los híbridos de ciclo largo (30G40, A-791 y A-oso) fueron sembrados

el 27 de marzo y las de ciclo corto (Cóndor y Gavilán) el 12 de abril. Esto fue con base en observaciones del año 2006 sobre una notable diferencia entre variedades en cuanto a días a emisión de estigmas y con el fin de lograr mejor coincidencia de la inoculación con la época de mayor lluvia.

Inmediatamente después de sembrar, se aplicó riego por gravedad con el objeto de promover la germinación. El segundo riego fue aplicado una semana después del primero con la finalidad de facilitar la emergencia de las plántulas. Los siguientes riegos fueron aplicados cada 15 días y sólo en el caso en el que las lluvias no fueron suficientes para mantener con humedad al cultivo.

A los 11 días después de sembrar las variedades precoces y a los 15 en las tardías fue realizado un transplante en los sitios donde no había plántulas, éstas últimas fueron tomadas de los sitios que tenían dos, labor hecha coincidiendo con un riego.

Entre los 20 y 22 días después de sembrar, cuando la plántulas presentaron de 4 a 5 hojas extendidas, fue realizado un aclareo para dejar una planta por mata.

Las labores culturales realizadas fueron una escarda y un aporque utilizando implementos tirados por el tractor. La escarda fue realizada a los 31 días después de sembrar, mientras que el aporque fue realizado a los 40 y 44 días después de la siembra, dependiendo de la fecha de siembra.

La fórmula total de fertilización fue 120-60-00 en dos aplicaciones manuales. La primera fue realizada al momento de la siembra, donde se aplicó la mitad del nitrógeno y todo el fósforo; la segunda al momento de realizar el aporque, donde se aplicó la otra mitad del nitrógeno.

deshierbes manuales. Se utilizó la mezcla de 1 kg de Hierbamina® (479 g de ácido 2, 4-D) más 1 litro de Gesaprim® (445 g de atrazina) ha⁻¹, aplicados en húmedo y en preemergencia. Las escardas, el aporque del cultivo y los deshierbes manuales complementaron el control químico de malezas.

El diseño experimental fue el de bloques completos al azar con cuatro repeticiones, en donde la unidad experimental estuvo conformada por cuatro surcos de 5 m de largo y 80 cm de ancho. El número de plantas por parcela varió de 90 a 100, lo que equivale a una densidad aproximada de 62,500 plantas ha⁻¹.

3.1.3. Materiales genéticos evaluados

3.1.3.1. Cepas de huitlacoche

Durante los meses de julio y agosto de 2005 fue realizada una colecta de mazorcas con agallas de huitlacoche producidas naturalmente en plantas de los cultivos de maíz híbrido, localizados en los campos Lomas de San Juan y Xaltepa pertenecientes al Campo Agrícola Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo en Chapingo, Estado de México.

La Cepa 1 estuvo formada por dos huitlacoques (mazorcas infectadas) producidos en plantas diferentes del híbrido de maíz 30G40; uno de los cuales presentó una severidad de 90 % de y el otro del 100 %.

La cepa 2 estuvo formada por tres huitlacoques obtenidos de tres plantas del híbrido Gavilán, dos de ellos presentaron 50 % de severidad y el otro 100 %.

3.1.3.2. Genotipos de maíz utilizados como hospedantes

Los materiales de maíz utilizados como hospedantes en esta investigación fueron los híbridos 30G40, Gavilán, A-791, Cóndor y A-Oso.

3.1.4. Tratamientos

En cada bloque fueron asignados de manera aleatoria los siguientes tratamientos:

- 1). La Cepa 1 colectada e inoculada en el híbrido 30G40 (Cepa1-30G40).
- 2). La Cepa 2 colectada e inoculada en el híbrido Gavilán (Cepa2-Gavilán).
- 3). La Cepa 3 colectada e inoculada en el híbrido A-791 (Cepa3-A-791).
- 4). La Cepa 4 colectada e inoculada en el híbrido Cóndor (Cepa4-Cóndor).
- 5). La cepa 5 colectada e inoculada en el híbrido A-oso (Cepa 5-A-Oso).

Obsérvese que cada cepa fue inoculada en su respectivo híbrido de donde anteriormente fue colectada. Es decir, el sistema huitlacoche-maíz (genotipo) específico ya se había presentado naturalmente en campo, de lo cual se asume que cada cepa es virulenta a su respectivo híbrido hospedante. Así, cada tratamiento es una pareja que se complementa en susceptibilidad y virulencia conforme a la generalización de la hipótesis gene a gene.

3.1.5. Inoculación

Cuando los jilotes primarios o superiores presentaron estigmas de tres a cinco centímetros de longitud fuera de las brácteas, se realizó la inoculación con las cepas de *Ustilago maydis* (C.D.) Cda. previamente activadas e incrementadas en el laboratorio. La aplicación del inóculo fue con jeringa de 10 ml y con aguja pediátrica, inyectando de manera transversal 1 ml de la suspensión con 10^6 esporidios, en la parte central de cada uno de los tres tercios en que se puede dividir el jilote.

En cada unidad experimental fueron inoculados entre 90 y 100 jilotes (el jilote primario de la planta) dando un total de casi 400 jilotes inyectados por cada tratamiento (maíz híbrido).

La inoculación fue realizada conforme iban apareciendo los jilotes listos para inocular ya que no todos desarrollan estigmas al mismo tiempo en las plantas del mismo híbrido, de tal manera que en cada genotipo fueron realizadas de cinco a siete inoculaciones.

Cabe aclarar que el híbrido Cóndor fue inoculado cuando los estigmas tuvieron una longitud entre 5 y 10 centímetros de largo, ya que con una longitud menor el jilote era muy delgado y de escaso desarrollo lo que favorecía la caída del mismo y/o parte del tallo. Contrario a lo anterior los jilotes de A-791 eran gruesos y vigorosos aunque los estigmas tuvieran menos de tres centímetros de longitud.

3.1.6. Variables evaluadas

3.1.6.1. Porcentaje de incidencia

El porcentaje de incidencia (PI) es el cociente del número de jilotes infectados entre el número de jilotes inoculados multiplicado por 100.

3.1.6.2. Severidad

De los elotes infectados, se definieron cinco categorías de severidad y el índice de severidad:

Severidad 1. Es donde el porcentaje de cubrimiento de la mazorca por agallas es cero o cercano a cero.

Severidad 2. Es cuando la mazorca presenta alrededor de un 25 % de cubrimiento por el hongo.

Severidad 3. La mazorca presenta alrededor de 50 % de cubrimiento por el hongo.

Severidad 4. En este caso la mazorca presenta alrededor de 75 % de cubrimiento por el hongo.

Severidad 5. Es el cubrimiento de la mazorca cercano al 100 %, por agallas del hongo.

El índice de severidad (IS) es la media ponderada de los grados de severidad, donde el factor de ponderación es el número de plantas en cada grado de severidad y fue obtenido con la siguiente fórmula (Villanueva, 1995):

$$IS = \frac{\sum_{i=1}^{n=5} XiWi}{\sum_{i=1}^{n=5} Wi}$$

Donde:

Xi = la severidad ($Xi = 1, 2, 3, 4, 5$)

Wi = el número de mazorcas con severidad Xi

3.1.6.3. Rendimiento por planta infectada

El rendimiento en gramos por planta o por mazorca infectada (RP), es el cociente del peso de huitlacoche con calidad comercial por parcela, en gramos, entre el número de mazorcas infectadas.

3.1.6.4. Rendimiento por hectárea

El rendimiento en kilogramos por hectárea fue calculado por medio de la siguiente formula, $RHa = 62500(RP) (PI)$, donde:

RP= rendimiento en kilogramos por mazorca infectada y PI= porcentaje de incidencia.

3.1.6.5. Porcentaje de elotes podridos

El porcentaje de elotes podridos (PEP) fue obtenido al dividir el número de elotes podridos entre el número de jilotes inoculados.

El registro de datos fue realizado alrededor de 30 días después de la inoculación o cuando las mazorcas infectadas por huitlacoche se mostraron abultadas y las agallas ya contenían teliosporas, que es cuando en el peridio de las agallas se aprecia un color blanco plateado y con tonalidades oscuras o negras en su superficie.

3.1.7. Análisis estadístico

Se realizó análisis de varianza, análisis de correlación y prueba de comparación de medias de Tukey con una $P \leq 0.05$. El análisis se hizo por año y combinado.

3.2. Estudio de caracterización de cepas de huitlacoche

3.2.1. Observación y descripción de las colonias de las cepas

La caracterización cultural de las cinco cepas de huitlacoche utilizadas como inóculo, se realizó con base en un examen e inspección a simple vista y con microscopio estereoscópico, mientras crecían en medio de cultivo PDA (papa, dextrosa y agar).

Las observaciones fueron hechas diariamente en los primeros 4 días y después a los 7, 9, 11, 14 y 17 días después de que los esporidios fueron transferidos a un nuevo medio de cultivo.

Al hacer las observaciones de las colonias fueron registradas las siguientes características culturales:

Color. Se definió una escala de colores que va del 1 al 7 y en forma progresiva, como sigue: 1: cremoso, 2: café claro, 3: café con micelio gris, 4: café, 5: café oscuro, 6: negro con micelio gris y 7: negro, respectivamente.

Relieve. Se establecieron tres calificaciones: 1: Relieve bajo, cuando en el relieve superficial de la colonia se apreciaron más o menos bien las figuras o porciones que sobresalían al plano de la colonia; 2: Relieve medio, si se apreciaban bien las formas de la textura superficial de la colonia y 3: Relieve alto, cuando las formas fueron muy evidentes, diferenciadas y pronunciadas.

Tipo de crecimiento. Se detectaron dos tipos de crecimiento de la colonia en PDA: 1: esporidial y 2: corto-micelial. Cuando sobre la superficie de la colonia o en el margen del cultivo creció algo parecido a micelio corto, se le llamó crecimiento micelial; y cuando no, se designó como esporidial.

Dirección del crecimiento. Cuando el crecimiento avanzó en el sentido radial, la dirección del crecimiento fue designada como 1: horizontal y cuando creció en espesor se le llamó 2: vertical.

Vigor del crecimiento. Se refiere al grado en que la masa esporidial cubrió la superficie del medio de cultivo en la que fue sembrada.

Cuando la “costra” de esporidios cubrió más o menos la superficie en la que estos fueron rayados y esta fue delgada y poco densa, se designó como 1: vigor bajo, cuando la cubrió casi o en su totalidad mostrándose densa y compacta, se le llamó 2: vigor alto.

Tipo de margen. Cuando el margen no estaba bien definido y era como mancha o como el crecimiento micelial se le llamó 1: difuso; si estaba bien definido pero sin poderse apreciar las formas o figuras que lo constituían se

designó como 2: liso; cuando las formas se aprecian sin dificultad se le llamó 3: semiliso y si las formas fueron muy evidentes, al margen se le llamó 4: rugoso o áspero.

Grado de tinción del medio de cultivo. Se refiere a la tonalidad que adquiere el medio de cultivo por efecto del color que libera la colonia; 1: amarillo-café claro; 2: ámbar tenue y 3: ámbar.

Superficie teñida. Es la porción (%) del medio de cultivo teñida por el color que libera la colonia, con respecto al total de la superficie no rayada con esporidios en el momento de la siembra.

3.2.2. Morfología de esporidios

Los caracteres morfológicos observados fueron: tamaño (largo y ancho en μ), forma y color de los esporidios; para lo cual fue utilizado el microscopio óptico con objetivo de 40X.

La medición de los caracteres mencionados fue realizada en dos etapas de desarrollo: a los tres días después de sembrar y la otra cuando ya no había cambios en el desarrollo y crecimiento de los mismos, lo cual ocurrió entre los 15 y 20 días después de sembrar.

La forma de los esporidios se estableció con referencia a objetos comunes típicos: 1: forma de fruto de cacahuete, 2: forma de pepino y 3: forma ovoide.

Los colores registrados de los esporidios fueron: 1: translúcido-incoloro y 2: café claro.

De cada una de las cinco cepas se preparó una suspensión de esporidios en agua destilada. Posteriormente de cada suspensión esporidial fueron

realizadas preparaciones en portaobjetos, teñidas con lactofenol para ser observadas al microscopio.

3.2.2.1. Sistema de muestreo de esporidios

A partir de la parte superior del campo del microscopio se hizo coincidir la escala del micrómetro ocular con el eje longitudinal del esporidio que se encontraba a su paso al mover la preparación de derecha a izquierda. En seguida se medía la longitud contando las divisiones abarcadas por el esporidio. Una vez medida la longitud se giró 90° el micrómetro ocular para medir el ancho del esporidio en turno.

La siguiente medición se hacía recorriendo la preparación de derecha a izquierda hasta lograr que la escala del micrómetro ocular quedara paralela al eje longitudinal del esporidio interceptado de manera aleatoria y así sucesivamente hasta llegar al extremo derecho del campo. En este punto se recorría la preparación hacia la parte superior del campo para evitar regresar sobre la misma línea; enseguida se continuó con las mediciones pero ahora el recorrido fue de derecha a izquierda.

Con este procedimiento fueron medidos entre 25 y 142 esporidios por cada una de las cinco cepas, en las dos etapas de desarrollo mencionadas. Cuando la población de esporidios muestreada era más o menos homogénea, el número de mediciones era menor y cuando era heterogénea, el número era mayor.

3.2.2.2. Obtención de anchura y longitud en micras

Las dimensiones de los esporidios en micras (μ), se obtuvieron al multiplicar los valores de anchura y longitud, tomados por medio de la reglilla del micrómetro ocular, por un factor de conversión conocido como valor micrométrico (VM).

El VM, para este caso en particular y de acuerdo con Kohashi (1967), French y Hebert (1980) y Barrera y Cárdenas (1997), fue calculado de la siguiente manera:

Medida del micrómetro de platina en micras = 260 μ

Unidades del micrómetro ocular = 100

Sustituyendo los valores en la fórmula siguiente

$$VM = \frac{mmp}{umo}$$

Donde:

mmp = medida del micrómetro de platina, en μ

umo = unidades del micrómetro ocular

se obtuvo que:

$$VM = 260 (\mu) / 100 = 2.6 \mu.$$

Para el análisis de las dimensiones de las diferentes cepas en las diferentes etapas de desarrollo fueron realizadas pruebas de comparación de dos medias de dos poblaciones mediante muestras aleatorias independientes, con el estadístico t de Student ($P \leq 0.05$).

3.2.2.3. Tamaño óptimo de muestra para la medición de esporidios

Utilizando los datos obtenidos de la medición de anchura y longitud de los esporidios fue obtenido el tamaño óptimo de muestra utilizando la fórmula de Gómez (1977), tanto para anchura como para longitud:

$$n_o = \frac{Z_{\alpha/2}^2 S_n^2}{d^2}$$

Donde:

n_o = tamaño óptimo de muestra estimado

$Z_{\alpha/2}^2$ = valor de Z^2 de tablas de la distribución normal estandar con $\alpha=0.05$

d = precisión que se desea tener (5% de la media muestral, como desviación máxima de la media paramétrica).

S_n^2 = varianza de la muestra preliminar.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto de la inoculación de cepas de huitlacoche en híbridos de maíz.

Para lograr una mejor interpretación del efecto de la inoculación, se realizó una descripción de los elotes sin inocular de los maíces híbridos utilizados como hospedantes. La descripción se hizo cuando los jilotes estaban en estado lechoso-masoso (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características de elotes sin inocular de cada un de los cinco híbridos de maíz utilizados como hospedantes en la inoculación de huitlacoche.

Híbrido	PEE (%)	PEEM (%)	PMD (%)	PEU (%)	BPE	Ciclo (Días)
30G40	30	0	100	0	15.7	100
Gavilán	70	0	90	0	11.7	80
A-791	60	0	80	0	15.6	100
Cóndor	60	20/pájaros	90	0	9.8	85
A-Oso	30	20	90	0	14.3	95

PEE: porcentaje de elotes con algún síntoma exterior de enfermedad; PEEM: porcentaje de elotes que exponen la punta de la mazorca; PMD: porcentaje de mazorcas con algún tipo de daño causado por plagas y enfermedades; PEU: porcentaje de mazorcas con presencia de *Ustilago maydis*; BPE: número promedio de brácteas por elote; y Ciclo: días desde siembra a 1ª inoculación.

La precipitación pluvial (Figura 1) fue de gran importancia en el crecimiento y desarrollo del huitlacoche ya que al combinarse con algunas características de la mazorca influyó de manera importante en la obtención de diferentes rendimientos de huitlacoche de un año a otro.

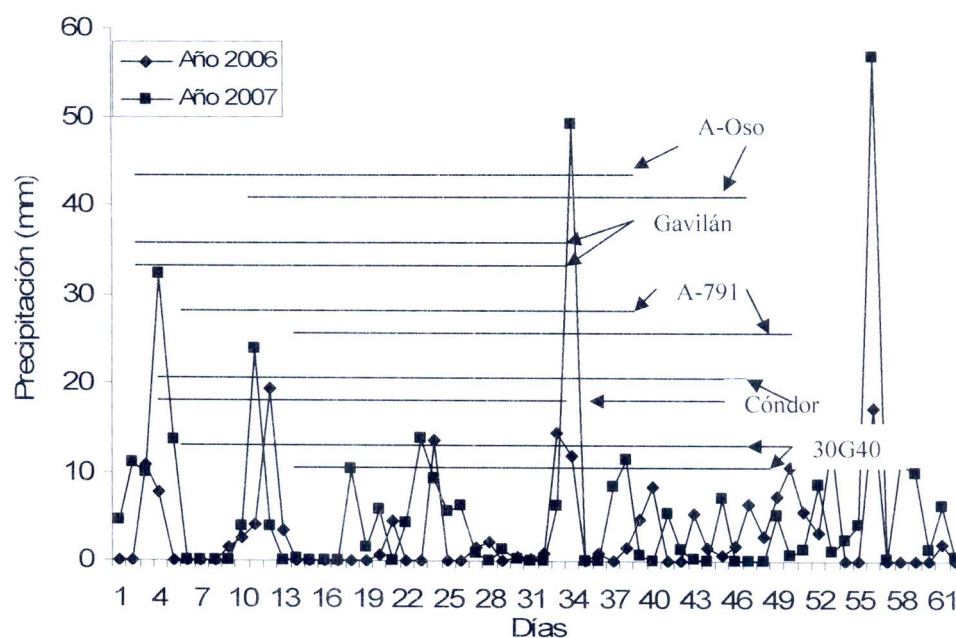


Figura 1. Precipitación en el periodo de inoculación a cosecha. En los híbridos, línea horizontal superior: periodo de inicio de inoculación a inicio de cosecha en 2007; línea horizontal inferior: periodo de inicio de inoculación a inicio de cosecha en 2006. Fuente: Elaboración propia con datos de la Estación meteorológica de la Universidad Autónoma Chapingo.

4.1.1. Análisis de varianza por año

Se encontró diferencias altamente significativas entre las medias de tratamientos en todas las variables, en los dos años de evaluación del experimento (Cuadro 2). Este resultado era de esperarse por tratarse de diferentes genotipos, tanto de maíz como de huitlacoche y por el consabido efecto del ambiente sobre el desarrollo del hongo en campo

Cuadro 2. Cuadrados medios del análisis de varianza para cinco caracteres de la reacción del maíz al huitlacoche en cinco híbridos. Chapingo, México, 2006 y 2007.

FV	GL	PI	IS	RP	RHa	PEP
Tratami- entos	4	4558.28**	929.73**	2752.82**	7797121.82**	1826.27**
Bloques	4	4600.25**	746.10**	755.09**	2758695.74**	2490.73**
	3	38.60	4.43	21.06	19355.52	83.20
	3	13.50	8.54	180.52	45986.88	28.18
Error	12	21.60	7.90	54.69	26254.56	28.30
	12	12.80	8.86	49.32	30189.06	17.26
Total	19	979.37	201.42	617.41	1661137.29	415.49
	19	978.69	164.02	218.62	607105.91	539.71
CV (%)	-	21.48	37.31	47.67	25.16	26.86
		16.74	41.25	49.84	41.96	13.48
Media	-	21.63	7.53	15.51	644.08	19.81
		21.37	7.21	14.09	414.07	30.80

Hilera 1: análisis de varianza del año 2006; hilera 2: análisis de varianza del año 2007; FV: fuente de variación; GL: grados de libertad; PI: porcentaje de incidencia; IS: índice de severidad; RP: rendimiento por planta en gramos; RHa: rendimiento por hectárea en kilogramos; PEP: porcentaje de elotes podridos; **: diferencia altamente significativa ($\alpha \leq 0.01$).

4.1.2. Análisis de varianza combinado

Al promediar los dos años de prueba, se obtuvieron diferencias altamente significativas entre las medias de tratamientos para todas las variables medidas (Cuadro 3). Las diferencias entre tratamientos encontradas al analizar los años por separado, se mantuvieron al combinar la información de los dos años.

Cuadro 3. Cuadrados medios del análisis de varianza combinado (2006 y 2007) para cinco caracteres en la inoculación de huitlacoche en maíz. Chapingo, México.

FV	GL	PI	IS	RP	RHa	PEP
Años	1	0.69ns	1.01ns	20.19ns	529025.30**	1209.89**
Bloques/A ^z	6	26.05ns	6.48ns	100.79ns	32671.20ns	55.69ns
Trats.	4	9152.88**	1669.77**	3085.35**	9912355.95**	4062.47**
Años*trats.	4	5.64ns	6.05ns	422.57**	643461.61**	254.53**
Error	24	17.20	8.38	52.00	28221.81	22.78
Total	39	953.95	178.06	407.81	1118606.31	496.38
CV (%)	-	19.29	39.26	48.72	31.75	18.86
Promedio	-	21.50	7.37	14.80	529.08	25.31

FV: fuente de variación; GL: grados de libertad; PI: porcentaje de incidencia; PEP: porcentaje de elotes podridos; RP: rendimiento por planta infectada en gramos; RHa: rendimiento por hectárea en kilogramos; IS: índice de severidad; ^zbloques anidados en años; CV: coeficiente de variación. **: diferencia altamente significativa; ns: no significativa.

Se observó interacción altamente significativa entre tratamientos y años en las variables porcentaje de elotes podridos, rendimiento por planta y en rendimiento por hectárea, aspecto ya bien conocido en el fenómeno de la reacción del maíz al huitlacoche.

4.1.3. Prueba de comparación de medias

El mayor promedio ($\alpha = 0.05$) de rendimiento por planta, rendimiento por hectárea, porcentaje de incidencia e índice de severidad fue obtenido con el tratamiento Cepa-5-A-Oso, en los dos años y en promedio de ambos; dichos valores fueron significativamente diferentes a los de los otros cuatro tratamientos (Cepa1-30G40, Cepa2-Gavilán, Cepa3-A-791 y Cepa4-Cóndor).

Cuadro 4. Comparaciones de medias de cinco caracteres de la reacción de cinco tratamientos al inocular maíz con huitlacoche. Chapingo, México. 2006 y 2007.

Tratamiento	Incidencia (%)	Rendimiento (g/planta)	Rendimiento (Kg/hectárea)	Índice de Severidad	Elotes podridos (%)
Cepa1-30G40	0.00 d	0.00 b	0.0 b	0.00 b	56.86 a
	0.56 c	7.25 b	5.0 b	0.14 b	65.39 a
	0.28 c	3.62 b	2.5 b	0.07 b	61.13 a
Cepa2-Gavilán	14.46 b	4.03 b	47.7 b	1.84 b	6.43 cb
	12.28 b	15.38 b	101.4 b	1.80 b	16.49 c
	13.37 b	9.71 b	74.6 b	1.82 b	11.46 dc
Cepa3-A-791	10.69 cb	3.34 b	21.6 b	0.85 b	12.63 cb
	12.64 b	8.08 b	64.3 b	2.40 b	17.66 c
	11.67 b	5.71 b	42.9 b	1.62 b	15.14 c
Cepa4-Cóndor	1.95 cd	8.02 b	9.6 b	0.19 b	18.13 b
	0.30 c	2.50 b	1.9 b	0.15 b	48.35 b
	1.13 c	5.26 b	5.8 b	0.17 b	33.24 b
Cepa5-A-Oso	81.06 a	62.16 a	3141.4 a	34.77 a	4.97 c
	81.07 a	37.24 a	1897.8 a	31.58 a	6.13 d
	81.07 a	49.70 a	2519.6 a	33.18 a	5.55 d
DMS	10.47	16.67	365.19	6.33	11.99
	8.06	15.83	391.60	6.71	9.36
	6.11	10.62	247.46	4.26	7.03

Hilera 1: año 2006; hilera 2: año 2007; hilera 3: promedio de 2006 y 2007; DMS: diferencia mínima significativa honesta según prueba de Tukey, con $\alpha=0.05$. Medias con las mismas letras en columnas y en cada año de análisis no son significativamente diferentes.

En orden descendente, las medias de rendimiento por planta, rendimiento por hectárea (Figura 2) e índice de severidad, entre los tratamientos cuyas medias fueron estadísticamente iguales ($\alpha \leq 0.05$), correspondieron a Cepa2-Gavilán, Cepa3-A-791, Cepa4-Cóndor y Cepa1-30G40 (Cuadro 4).

Los valores del porcentaje de incidencia (PI) en 2006 de los tratamientos Cepa2-Gavilán y Cepa3-A-791 fueron estadísticamente iguales; el tratamiento Cepa3-A-791 fue estadísticamente igual a los tratamientos Cepa4-Cóndor y Cepa1-30G40. En 2007 y a través de años, las medias de PI de los tratamientos Cepa2-Gavilán y Cepa3-A-791 fueron nuevamente estadísticamente iguales, pero significativamente diferentes y superiores a

los valores de los tratamientos Cepa4-Cóndor y Cepa1-30G40 (Cuadro 4; Figura 3).

El tamaño final de los esporidios de la Cepa 5 sembrados en PDA, fue más grande que el de las demás cepas. Esta cepa presentó las siguientes características culturales: relieve medio y margen semiliso en casi todo el periodo de observación; fue la única que no presentó coloración grisácea sino solamente negra y la única en la que no hubo crecimiento cortomiceliar; además, la coloración que rodeó a la colonia se observó hasta los 7 días después de sembrar y fue una de las dos cepas en las que la coloración amarilla no cubrió el 100 % de la superficie no rayada con esporidios (Figura A del Anexo).

Con lo anterior se puede decir que el efecto del tratamiento Cepa5-A-Oso es diferente del de los demás, tanto en las medias de las variables anteriormente mencionadas como en las características de las cepas.

Es probable que la Cepa 5 sea genéticamente más diversa debido a que fue transferida un menor número de veces por no presentar casos de contaminación durante el proceso de cultivo e incremento; lo que ha permitido una mayor compatibilidad entre esporidios y por consecuencia una mayor patogenicidad, lo que no ocurrió con las otras cuatro cepas.

Por otro lado, la planta del híbrido A-oso es de tallo grueso con abundantes hojas anchas de color verde intenso, de porte mediano y con dos elotes gruesos y vigorosos aún antes de que emerjan los estigmas. Este genotipo es el más vigoroso de todos los estudiados. En relación a esto, Villanueva (1995) indicó que el mejor tamaño para la inoculación del jilote, es el mínimo

con que se evite la detención de su desarrollo a consecuencia de las heridas ocasionadas al inyectarle el inóculo.

Villanueva (1995) experimentó con varios tamaños de jilote y encontró que la inoculación de jilotes con estigmas que están a punto de brotar, fue numéricamente mejor que la inoculación de jilotes con estigmas de 3 centímetros de longitud, por su mayor porcentaje de incidencia, índice de severidad y de plantas con mazorca totalmente agallada; en otro experimento con otra variedad lo mismo ocurrió con los jilotes sin estigmas superando significativamente a los que sí tenían estigmas.

El híbrido A-Oso fue inoculado cuando los estigmas presentaron cerca de 3 cm de longitud. Esta etapa de desarrollo está cercana a la etapa de estigmas próximos a brotar.

En estudios relacionados con el vigor del hospedante en relación al desarrollo del hongo, se ha concluido que las agallas son grandes y normalmente mucho más conspicuas en plantas de maíz vigorosas. Cuando las plantas son extremadamente bajas en vigor, el número de agallas por planta puede ser reducido debido a un decremento en el desarrollo de brotes de nudo (Walter (1935), citado por Christesen, 1963).

Es probable que los altos valores obtenidos de porcentaje de incidencia, índice de severidad, rendimiento por planta, y rendimiento por hectárea con el tratamiento Cepa5-A-Oso se deban a que la Cepa 5 es más virulenta que las demás y a que A-oso sea más susceptible que los otros cuatro híbridos.

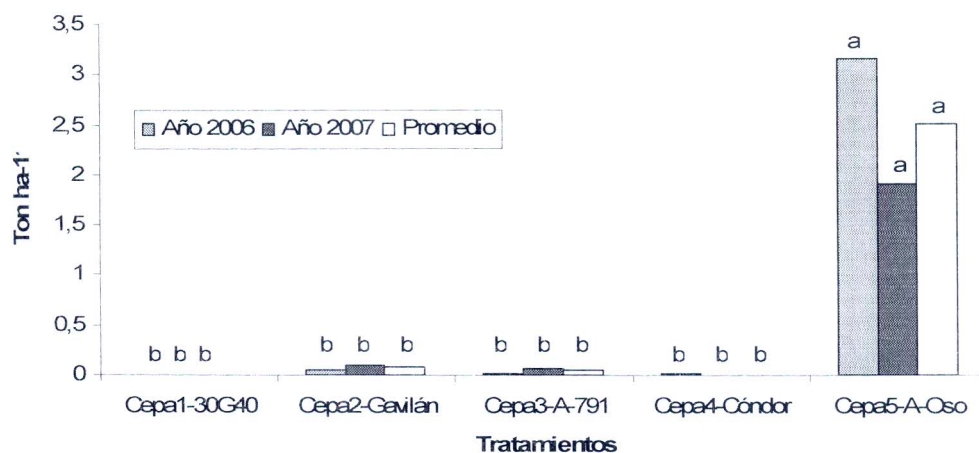


Figura 2. Rendimiento en toneladas por hectárea de huitlacoche de cinco híbridos de maíz en 2006, 2007 y en promedio de los dos años. Columnas con las mismas letras en cada año son estadísticamente iguales, de acuerdo con la prueba de Tukey con $\alpha=0.05$.

El hecho de que el valor medio más alto y significativamente superior del porcentaje de incidencia (PI) haya sido obtenido por el sistema Cepa 5-A-Oso, pudo deberse a la diferencia en cuanto a susceptibilidad de los diferentes hospedantes y a la virulencia de las cepas inoculadas en cada tratamiento, resultados que fueron consistentes con los de Melches (1921), Orona (1995) y Martínez (1999).

Por otro lado, se encontró que, en general, a mayor longitud final de esporidios, fue mayor el porcentaje de incidencia (Cuadros 4 y 15 y Figura 16), de tal manera que con la Cepa 5 se obtuvo el mayor tamaño de esporidios y el mayor valor de porcentaje de incidencia, mientras que con la Cepa 1 se obtuvo la menor longitud de esporidios y el menor valor en incidencia.

Por lo tanto, a mayor longitud final de esporidios, la tendencia fue obtener mayor ataque del hongo y, en parte tal vez a esto se deba la diferencia entre tratamientos.

Parece ser que algunas características culturales del hongo desarrollado en medio de cultivo PDA también están relacionadas con la incidencia del mismo.

Al respecto se observó que la Cepa 5, la que produjo mayor incidencia (81 %) presentó una colonia color café oscuro a negro, relieve medio, crecimiento esporidial y principalmente vertical, margen semliso, vigor alto y con una tinción amarillenta o ámbar tenue del medio de cultivo; mientras que la Cepa 1, que presentó la menor incidencia (0.28 %, promedio de dos años) mostró colonias color café claro, margen difuso, relieve alto y muy característico (reticulado) y con marcado crecimiento micelial y horizontal; las otras tres cepas están dentro del intervalo delimitado por estos extremos.

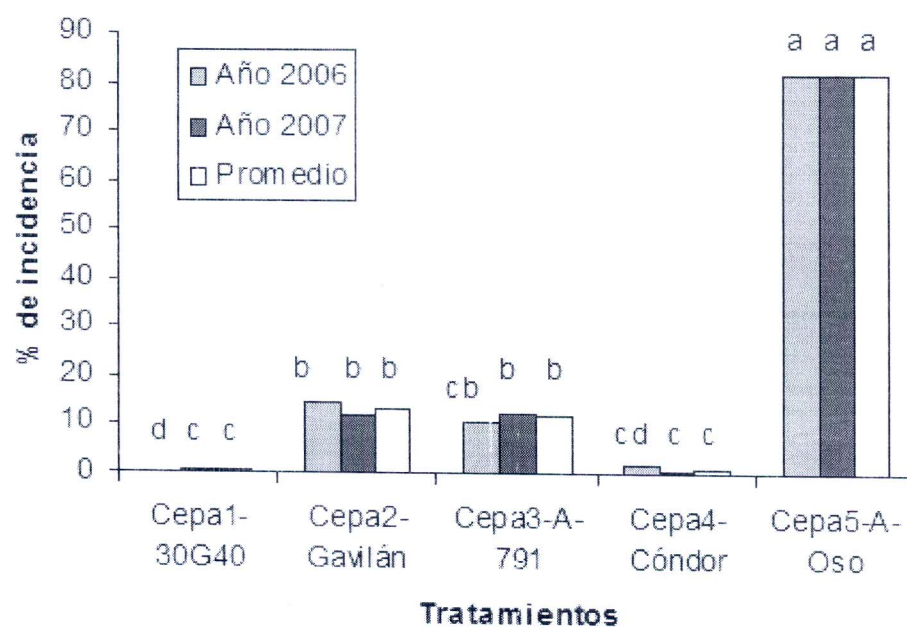


Figura 3. Porcentaje de incidencia de huitlacoche inoculado en cinco híbridos de maíz en 2006, 2007 y en promedio de los dos años. Columnas con las mismas letras en cada año son estadísticamente iguales, de acuerdo con la prueba de Tukey con $\alpha=0.05$.

En cuanto al porcentaje de jilotes podridos, el valor medio más alto fue obtenido con el sistema Cepa1-30G40 en 2006, 2007 y en promedio de los dos años (61.13 %), siendo significativamente superior a todos los demás tratamientos (Cuadro 4).

Después estuvo el tratamiento Cepa4-Cóndor que, en 2006, fue estadísticamente igual a los tratamientos Cepa3-A-791 y Cepa2-Gavilán, pero significativamente superior a Cepa5-A-Oso.

El menor porcentaje de elotes podridos se obtuvo con el tratamiento Cepa5-A-Oso y fue significativamente menor a los tratamientos Cepa1-30G40 y Cepa4-Cóndor en el análisis por año y combinado.

El mayor porcentaje de elotes podridos correspondió a la mayor presencia de micelio, topografía en forma de red y coloración café claro de la colonia, así como al menor tamaño de esporidios (Cuadro 7 y Figura 8).

El tratamiento Cepa4-Cóndor produjo más jilotes podridos que los tratamientos 2, 3 y 5, probablemente, entre otras causas, porque al momento de inocular, sus jilotes fueron muy tiernos, pequeños y con un reducido número de brácteas (9.8 en promedio) frágiles y succulentas, que al picarlos con la aguja pudo haberse suspendido su crecimiento por el daño mecánico.

En relación a esto, Villanueva (1995) indica que en pruebas realizadas en variedades criollas de maíz de la raza Chalqueño los jilotes inoculados muy jóvenes (sin estigmas) mediante inyección con jeringa hipodérmica, tienden a abortar y a mostrar pudriciones por patógenos sistémicos y la planta no produce grano ni huitlacoche, y se observan diferencias notables a esta reacción, entre variedades criollas de polinización abierta. Según este autor,

el mejor tamaño para la inoculación del jilote, es el mínimo que evite la detención de su desarrollo a consecuencia de las heridas ocasionadas al inyectarle el inóculo.

A pesar de que Cóndor es un híbrido, éste no es muy homogéneo, pues presentó variación en cuanto a precocidad (diferencia en días a floración), coloración del tallo y porte de planta.

4.1.4. Comparación de medias entre 2006 y 2007

Al comparar el año 2006 con el 2007, se detectaron diferencias altamente significativas entre las medias de rendimiento por hectárea de huitlacoche con calidad comercial y porcentaje de elotes podridos (Cuadro 3); mientras que en las otras variables las medias no fueron significativamente diferentes de un año a otro, aunque fueron mayores en 2006 (Cuadro 5).

Cuadro 5. Comparación de medias del año 2006 con las del 2007 de cinco caracteres de la reacción de cinco híbridos de maíz al huitlacoche.

Año	Incidencia (%)	Rendimiento (g/planta)	Rendimiento (kg/hectárea)	Índice de severidad	Elotes podridos (%)
2006	21.63 a ^z	15.51a	644.08a	7.53a	19.81b
2007	21.37a	14.09a	414.07b	7.21a	30.81a
DMSH	2.71	4.71	109.64	1.89	3.11

DMSH: diferencia mínima significativa honesta; ^zmedias con las mismas letras en columnas no son significativamente diferentes, según prueba de Tukey, con $P = 0.05$.

El rendimiento por hectárea de huitlacoche fue significativamente mayor en el año 2006 (Figura 4).

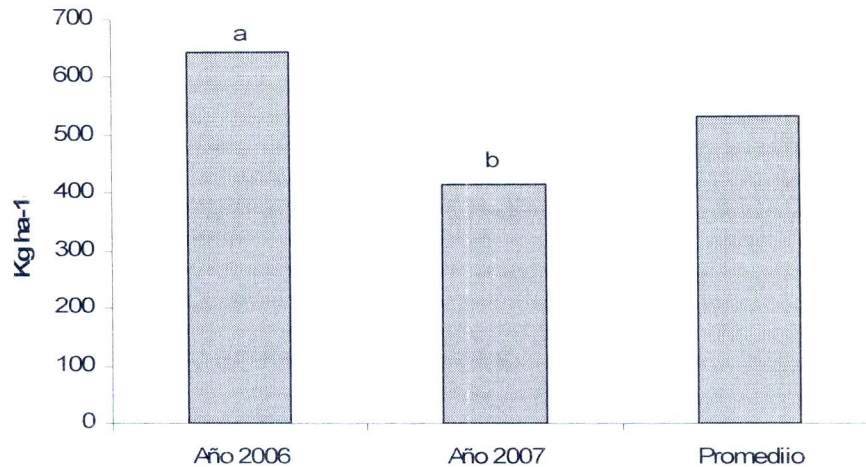


Figura 4. Rendimiento de huitlacoche inoculado en híbridos de maíz en dos ciclos de cultivo y en promedio de años. Columnas con las mismas letras son estadísticamente iguales, de acuerdo con la prueba de Tukey con $P = 0.05$.

El mayor rendimiento en el año 2007 de los tratamientos Cepa1-30G40, Cepa2-Gavilán y Cepa3-A-791 probablemente se debió a que en 2006 la cosecha por lo general fue realizada diez días antes que en 2007, lo que permitió que en este año se produjera un mayor crecimiento de las agallas y por consecuencia un mayor rendimiento, puesto que el porcentaje de incidencia y el índice de severidad se mantuvieron iguales en los dos años.

En los tratamientos Cepa4-Cóndor y Cepa5-A-Oso, el rendimiento por hectárea fue mayor en el año 2006 y menor en el 2007.

La disminución del rendimiento por hectárea de huitlacoche en el caso particular del tratamiento Cepa5-A-Oso en 2007 ($1897.8 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$) con respecto a 2006 ($3141.4 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$), se debió a una mayor incidencia de pudriciones en el huitlacoche.

La mayor incidencia de pudriciones en el tratamiento Cepa5-A-Oso en 2007 se debió a que los elotes de A-oso permanecieron más o menos erectos

durante la formación del hongo y con el crecimiento del mismo y aún sin inoculación, la punta del elote se abre exponiendo a las agallas antes de que estén listas para la cosecha (Cuadro 1). Tales características al combinarse con la presencia de una precipitación pluvial mucho mayor (167 mm más en 2006 que en el 2007 (Figura 1), se produjo una concentración excesiva de agua junto a las agallas, favoreciendo su pudrición y la disminución de su crecimiento y desarrollo.

La disminución del rendimiento por hectárea en el tratamiento Cepa4-Cóndor en 2007 pudo deberse también a la abundante precipitación, y aunque en este caso el jilote sí se inclinó al ser inoculado y no expone la punta de la mazorca naturalmente, los pájaros abrieron la punta del elote exponiendo la mazorca a la lluvia. En favor de esta idea está el hecho de que en un muestreo de elotes sin inocular se encontró hasta un 20 % con daño causado por pájaros (Cuadro 1).

Tal vez para los pájaros les sea más fácil abrir los elotes del híbrido Cóndor ya que de los cinco genotipos de maíz utilizados, éste fue el que presentó el menor número de brácteas por elote (Cuadro 1).

El porcentaje de elotes podridos fue significativamente menor (19.81 %) en 2006 que en 2007 (30.81 %) (Cuadro 5 y Figura 5). Es posible que esto también se deba a las condiciones meteorológicas (principalmente a la precipitación pluvial) que prevalecieron durante el periodo de desarrollo del huitlacoche inoculado en cada año, pues en 2006 precipitaron 193.9 mm, mientras que en 2007 fueron 360.9 mm (Figura 5).

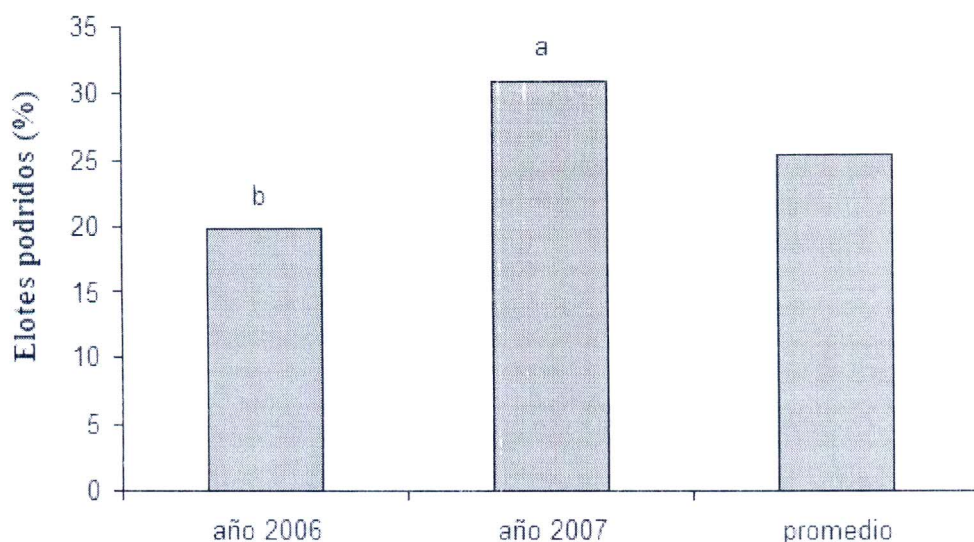


Figura 5. Porcentaje de elotes podridos al inocular huitlacoche en híbridos de maíz en dos ciclos de cultivo y en promedio de años. Columnas con las mismas letras son estadísticamente iguales, de acuerdo con la prueba de Tukey con $\alpha=0.05$.

Otra probable explicación al mayor porcentaje de elotes podridos en 2007, es que en este año hubo, antes y después de la inoculación, más granizadas y más fuertes que en 2006, que provocaron mayores daños físicos a la parte aérea de la planta favoreciendo un mayor desarrollo de enfermedades diferentes al huitlacoche, principalmente las causadas por *Fusarium* y por bacterias.

Con una mayor cantidad de contaminantes en la parte superior de la planta por arriba del jilote y al haber mayor cantidad de agua de lluvia que escurría sobre las heridas de los jilotes hechas con la jeringa, es probable que dicho líquido haya introducido enfermedades en los sitios de inoculación, trayendo como consecuencia que en el año 2007, la presencia de una mayor pudrición y menor rendimiento de huitlacoche.

El hecho de que los valores de incidencia y severidad hayan resultado relativamente bajos (sobre todo en los tratamientos Cepa1-30G40, Cepa2-

Gavilán, Cepa3-A-791 y Cepa4-Cóndor) fue contrario a lo esperado, según la generalización de hipótesis gene a gene de Flor ("por cada gene de resistencia en el hospedante hay un gene de virulencia en el patógeno"). Cada cepa usada se definió como genotipo específica porque se colectó del mismo híbrido que se uso como su correspondiente hospedante y por lo tanto de antemano lo esperado era que resultara susceptible, de ahí lo inconsistente entre lo observado y lo esperado.

Es probable que los factores ambientales como la precipitación, la humedad ambiental y la temperatura presentes durante el periodo de desarrollo del huitlacoche inoculado sean los responsables de este resultado contradictorio, porque es sabido que el ambiente desfavorable presenta un rol impeditivo, aún en sistemas con cepa virulenta y hospedante susceptible.

4.1.5. Correlaciones fenotípicas entre variables

Las variables porcentaje de incidencia, rendimiento por planta, e índice de severidad presentaron una alta correlación positiva y altamente significativa ($\alpha \leq 0.01$), en los dos años de prueba y en sus promedios, con el rendimiento por hectárea (Cuadro 6). Esto significa que tales variables son componentes del rendimiento de huitlacoche.

El porcentaje de elotes podridos estuvo inversamente correlacionado y con valores bajos con todas las demás variables.

Cuadro 6. Correlaciones fenotípicas entre cinco variables de la reacción de cinco híbridos de maíz inoculados con huitlacoche.

	Incidencia (%)	Elotes podridos (%)	Rendimiento (g/planta)	Rendimiento (kg/hectárea)	Índice de severidad
Incidencia (%)	-	-0.50*	0.94**	0.97**	0.97**
	-	-0.67**	0.82**	0.97**	0.98**
	-	-0.57**	0.87**	0.94**	0.97**
Elotes podridos (%)	-	-	-0.43ns	-0.37ns	-0.39ns
	-	-	-0.59**	-0.57**	-0.59**
	-	-	-0.46**	-0.44**	-0.47**
Rendimiento (g/planta)	-	-	-	0.97**	0.97**
	-	-	-	0.84**	0.83**
	-	-	-	0.94**	0.90**
Rendimiento (kg/hectárea)	-	-	-	-	0.99**
	-	-	-	-	0.997**
	-	-	-	-	0.97**

Hilera 1: correlaciones con datos de 2006; hilera 2: correlaciones con datos de 2007 e hilera 3: correlaciones en promedio de 2006 y 2007; *: correlación significativa ($\alpha \leq 0.05$); **: correlación altamente significativa ($\alpha \leq 0.01$); ns: correlación no significativa.

El porcentaje de incidencia, rendimiento por planta e índice de severidad estuvieron estrechamente ligados con el rendimiento por hectárea. Pataky (2003) encontró que el rendimiento de huitlacoche y severidad de agallas de jilotes estuvieron cercanamente relacionados.

Una mayor cantidad de elotes infectados con alta severidad (mayor cubrimiento de mazorcas por agallas de huitlacoche) necesariamente produjo un mayor rendimiento por unidad de superficie. Una mayor cantidad de huitlacoche por mazorca también se manifestó en un mayor rendimiento por hectárea.

A mayor cantidad de elotes podridos, menor porcentaje de incidencia de huitlacoche, menor índice de severidad, menor rendimiento por planta y menor rendimiento por hectárea. La explicación a este resultado es simple: al presentarse otras enfermedades en el jilote donde fue inoculado el huitlacoche es obvio que este último no tendrá lugar para su desarrollo y por

consecuencia disminuirá la incidencia del mismo y la severidad bajará generando una disminución en el rendimiento.

La correlación no significativa del porcentaje de elotes podridos en el año 2006 con rendimiento (por planta y por ha) e Índice de severidad, en comparación con la correlación altamente significativa en 2007 (Cuadro 6), seguramente se debió al menor número de elotes podridos causado por la menor humedad ambiental, de tal forma que la relación inversa de esta variable con las demás fue más evidente en el segundo año que en el primero.

4.2. Caracterización de cepas de huitlacoche

De las cinco cepas de huitlacoche colectadas en campo, se tomaron teliosporas contenidas en las agallas y fueron sembradas en medio de cultivo PDA, dichas siembras fueron mantenidas en una cámara incubadora a 28 °C.

Una vez que las cepas sembradas presentaron colonias de esporidios libres de contaminación, fueron conservadas en aceite mineral y posteriormente de ellas fueron tomados los esporidios para ser estudiados.

4.2.1 Caracterización de las cepas en base a sus colonias

4.2.1.1. Color de las cepas

Durante el crecimiento en medio de cultivo PDA, todas las colonias de las cepas cambiaron de color conforme pasó el tiempo (Figura 6 y Figura A del Anexo y Cuadro 7).

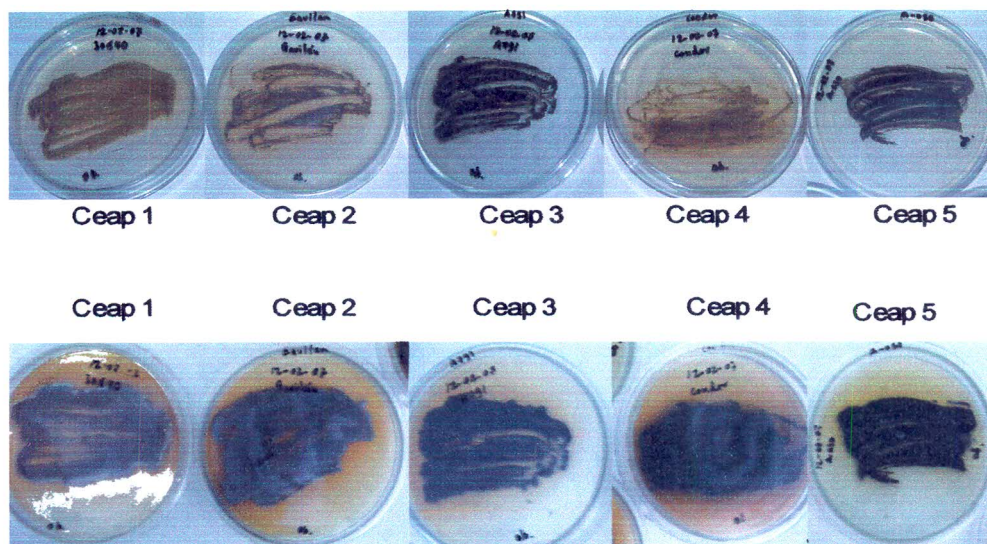


Figura 6. Color de cinco cepas de huitlacoche a los tres días después de sembrar (arriba) y a los 11(abajo).

Después de unas 24 a 48 horas después de la siembra, y a simple vista, todas las cepas presentaron coloración entre cremosa a café muy claro.

Las cepas 2, 3 y 4 pasaron del color café claro al café oscuro, después al negro y finalmente fueron negro grisáceo, debido al crecimiento de micelio muy corto y gris en la superficie de la colonia (Cuadro 7 y Figura A del Anexo).

La cepa 5 a los tres dds fue color café oscuro, desde los siete hasta los 17 dds presentó color negro. Esta cepa se caracterizó por ser de color negro en casi todo su desarrollo en PDA, a diferencia de las otras cuatro cepas que presentaron varios cambios en coloración (Cuadro 7). La cepa 5 fue la de mayor incidencia, severidad y rendimiento de huitlacoche al inocularla en el híbrido A-Oso.

La cepa 1 se caracterizó por presentar color café claro en casi todo el periodo de observación; fue café claro desde los tres hasta los nueve días

después de sembrar (dds) y a partir de entonces fue café grisáceo debido a la presencia de crecimiento micelial en la superficie de la colonia (Cuadro 7). Esta cepa fue la que presentó los valores más bajos de incidencia, severidad y rendimiento de huitlacoche al ser inoculada en el maíz híbrido 30G40.

Cuadro 7. Calificación de los colores de cinco cepas de huitlacoche en diferentes etapas de desarrollo.

Cepa	Origen de la cepa	Días después de la siembra						
		1-2	3	7	9	11	14	17
1	30G40	1	2	2	2	3	3	3
2	Gavilán	1	2	5	7	6	6	6
3	A-791	1	5	7	7	7	6	6
4	Cóndor	1	2	5	7	7	6	6
5	A-Oso	1	5	7	7	7	7	7

Clave de colores. 1: cremoso; 2: café claro; 3: café grisáceo debido al micelio corto y gris; 4: café; 5: café oscuro; 6: negro grisáceo debido al micelio gris; 7: negro.

4.2.1.2. Relieve de las cepas

Los relieves observados en función del grado de apreciación de las formas que sobresalen en la superficie de la colonia fueron: relieve bajo, medio y alto (Figura 7).

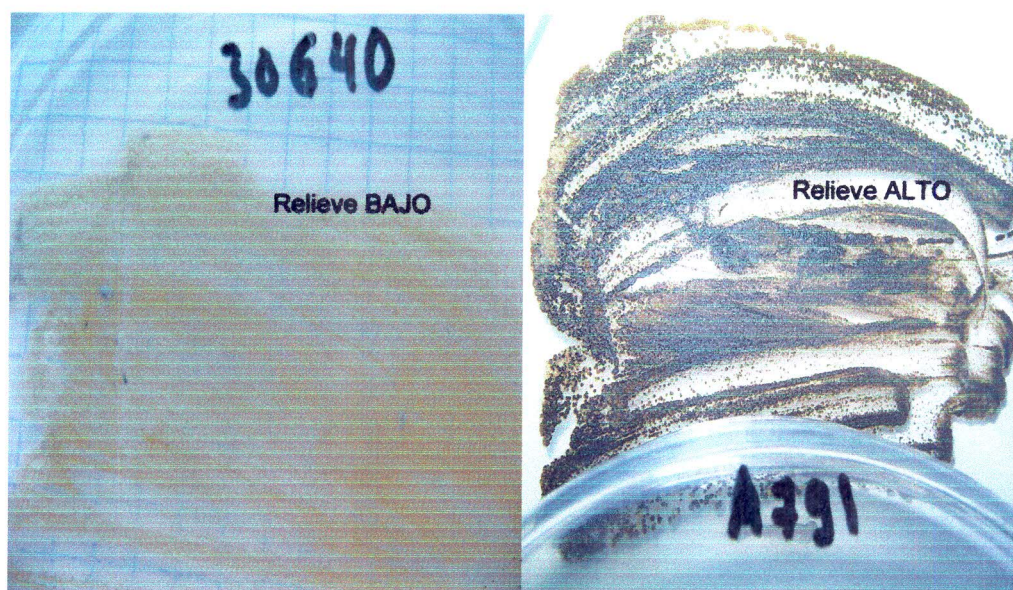


Figura 7. Tipos de relieve observados a simple vista en cultivos de huitlacoche a los tres días después de la siembra. A la izquierda cultivo con relieve bajo (cepa 1), a la derecha con relieve alto (cepa 3).

A excepción de la cepa 3, el relieve bajo se presentó en todas las cepas a los tres dds, ya que la superficie de los cultivos fue como una capa pastosa y delgada, untada sobre el medio de cultivo.

En las cepas 1 y 2, al principio el relieve fue bajo, después pasó a alto y finalmente quedó en medio, debido a que el micelio corto y blanquecino cubrió lo sinuoso de la superficie dejando un relieve más suave a la vista.

Aunque la cepa 3 también desarrolló micelio, el relieve se mantuvo alto debido a que los gránulos eran muy notorios. Las cepas 4 y 5 a los tres dds tuvieron relieve bajo, pero de ahí en adelante éstas conservaron relieve medio, es decir, los grumos fueron más o menos evidentes (Cuadro 8).

Parece ser que no existe relación entre el tipo de relieve y el grado de ataque de huitlacoche, ya que, por ejemplo, aunque las cepas 4 y 5 se caracterizaron por presentar relieve medio, la cepa 5 fue la que presentó los mayores valores de incidencia, severidad y rendimiento de huitlacoche,

mientras que la cepa 4 fue una de las que presentaron los valores más bajos de dichas variables.

Los relieves de los cultivos constituidos principalmente por gránulos presentaron mayores valores de incidencia, severidad y rendimiento de huitlacoche, que el de la cepa 1 que presentó relieve en forma de red.

Cuadro 8. Relieve del cultivo de cinco cepas de huitlacoche en diferentes fechas de observación.

Cepa	Origen de la cepa	Días después de la siembra					
		3	7	9	11	14	17
1	30G40	bajo ^r	alto ^r	alto ^{gr}	medio ^{gm}	medio ^{gm}	medio ^{gm}
2	Gavilán	bajo ^g	alto ^g	alto ^g	medio ^{gm}	medio ^{gm}	medio ^{gm}
3	A-791	alto ^g	alto ^g	alto ^g	alto ^g	alto ^{gm}	alto ^{gm}
4	Cóndor	bajo ^g	medio ^g	medio ^g	medio ^g	medio ^{gm}	medio ^{gm}
5	A-Oso	bajo ^g	medio ^g	medio ^g	medio ^g	medio ^g	medio ^g

r: relieve en forma de red; g: gránulos; gr: gránulos y red; gm: gránulos con micelio.

4.2.1.3. Tipo y dirección del crecimiento

Los tipos de crecimiento observados fueron: el esporidial y el crecimiento corto-micelial (Figura 8). Christensen (1963) indica que uno de los tipos más comunes de mutación, en cuanto a caracteres culturales, es el tipo de crecimiento, y éste puede ser esporidial o micelial.

El desarrollo del crecimiento tipo micelio se presentó solamente en las cepas 1, 2, 3 y 4.

En la cepa 1 el crecimiento micelial fue desarrollado principalmente en los bordes de la colonia, siendo claramente observable a simple vista su color blanquecino y su avance vigoroso como hilos finos.

En las cepas 2, 3 y 4 el crecimiento micelial a simple vista fue como si sobre la superficie del cultivo se le hubiera espolvoreado una ligera capa de ceniza y debido a ella el color inicial cambió y tomó una tonalidad grisácea. Las

estructuras que constituían esta capa no fueron distinguidas a simple vista; a través del microscopio estereoscópico se observó una cubierta con pubescencia muy fina y corta de color gris.

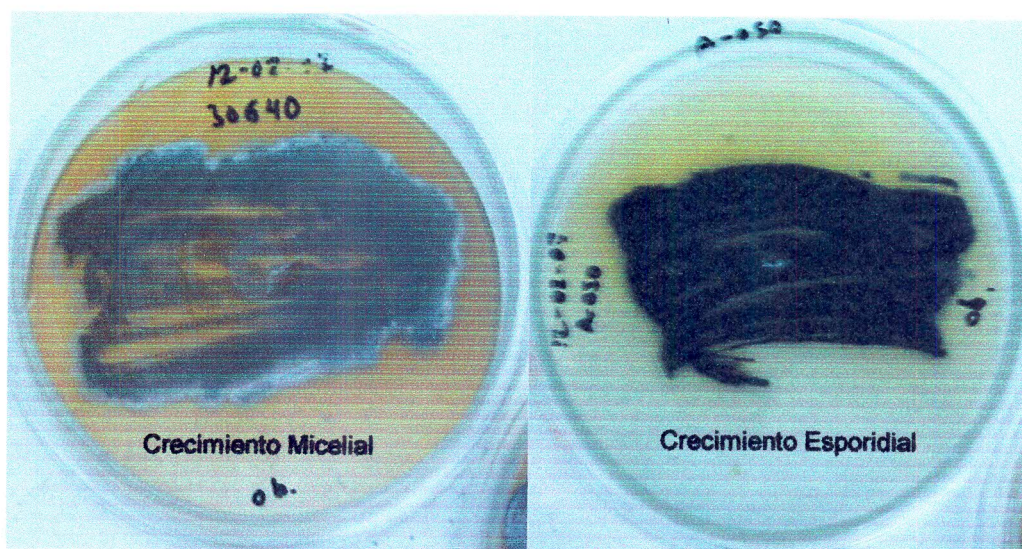


Figura 8. Tipos de crecimiento en cepas de huitlacoche. A la izquierda, crecimiento micelial en la Cepa 1; a la derecha, crecimiento esporidial en la Cepa 5, a los 14 y 11 días después de sembrar, respectivamente.

En los primeros tres días después de sembrar (dds) el crecimiento en todas las cepas fue esporidial. Posteriormente, en las cepas 1, 2, 3 y 4, el crecimiento fue esporidial y micelial al mismo tiempo, y a los 14 y 17 dds sólo presentaron crecimiento micelial (Cuadro 9).

La cepa 5 fue la única que no presentó crecimiento micelial y la que al ser inoculada en el híbrido A-Oso presentó los mayores valores de incidencia, severidad y rendimiento de huitlacoche. Por el contrario, la cepa 1 que presentó el crecimiento micelial más vigoroso y evidente, presentó los menores valores de dichas variables al ser inoculada en el híbrido 30G40.

Cuadro 9. Tipo de crecimiento del cultivo de cinco cepas de huitlacoche en diferentes fechas de observación.

Cepa	Origen de la cepa	Días después de la siembra					
		3	7	9	11	14	17
1	30G40	esporidial	esporidial y miceliar	esporidial y miceliar	micelial	micelial	micelial
2	Gavilán	esporidial	esporidial	esporidial y miceliar	micelial	micelial	micelial
3	A-791	esporidial	esporidial	esporidial y miceliar	micelial	micelial	micelial
4	Cóndor	esporidial	esporidial	esporidial y miceliar	esporidial y micelial	micelial	micelial
5	A-Oso	esporidial	esporidial	esporidial	esporidial	esporidial	esporidial

Todas las cepas presentaron crecimiento vertical y horizontal en los primeros siete días después de la siembra (dds). Estos tipos de crecimiento aún se observaron a los nueve dds en las cepas 1, 2 y 3; mientras que las cepas 3 y 4 solamente presentaron crecimiento vertical. A partir de entonces la cepa 1 únicamente creció de manera horizontal; mientras que las cepas 2, 3 y 4 sólo crecieron verticalmente.

La cepa 5 fue la primera que detuvo su crecimiento (a los 11 dds); mientras que en las demás, ya no hubo crecimiento de ningún tipo de los 14 a los 17 dds (Cuadro 10).

Probablemente a los 14 dds, a los 11 en la cepa 5, el medio de cultivo ya se había agotado, con lo que se hizo imposible la continuación del crecimiento de la colonia.

El crecimiento horizontal fue aproximadamente de 10 mm en la cepa 1, de unos 5 mm en la cepa 2 y de unos 2 mm en las otras tres.

Se encontró que la cepa 5 que creció principalmente en forma vertical y fue la que presentó los mayores valores de incidencia, severidad y rendimiento de huitlacoche; mientras que la colonia de la cepa 1 que presentó principalmente crecimiento horizontal, mostró los valores más bajos de las variables ya indicadas. Tal vez exista una relación directa entre la dirección

del crecimiento y las variables incidencia, severidad y rendimiento de huitlacoche.

Cuadro 10. Dirección del crecimiento del cultivo de cinco cepas de huitlacoche en diferentes fechas de observación.

Cepa	Origen de la cepa	Días después de la siembra					
		3	7	9	11	14	17
1	30G40	vertical y horizontal	vertical y horizontal	vertical y horizontal	horizontal	horizontal	ya no hay
2	Gavilán	vertical y horizontal	vertical y horizontal	vertical y horizontal	vertical	vertical	se detuvo
3	A-791	vertical y horizontal	vertical y horizontal	vertical	vertical	vertical	se detuvo
4	Cóndor	vertical y horizontal	vertical y horizontal	vertical	vertical	vertical	se detuvo
5	A-Oso	vertical y horizontal	vertical y horizontal	vertical y horizontal	se detuvo	se detuvo	se detuvo

4.2.1.4. Vigor del cultivo

A los tres días después de sembrar (dds) los cultivos de las cepas 1, 2 y 4 presentaron vigor bajo, es decir la cubierta o capa formada por la masa esporidial fue delgada y poco densa, mientras que las cepas 3 y 5 presentaron cultivos con vigor alto, en donde la costra formada por los esporidios fue espesa y oscura (Cuadro 11).

A partir de los siete dds las cepas 2 y 4 presentaron cultivo vigoroso, la cepa 1 fue también vigorosa pero únicamente en los bordes de la colonia y así permaneció hasta los 17 dds.

Durante casi todo su desarrollo la cepa 1 presentó vigor bajo y al ser inoculada en el híbrido 30G40, fue la que presentó menor incidencia, severidad y rendimiento de huitlacoche.

Aunque las cepas 2, 3, 4 y 5 fueron muy similares en vigor de cultivo, la cepa 5 superó significativamente a todas las demás en incidencia, severidad y

rendimiento de huitlacoche al inocularlas en su respectivo maíz híbrido en el que fueron colectadas.

Por lo anterior, parece ser que el bajo vigor de la colonia esta relacionado con valores bajos de incidencia, severidad y rendimiento de huitlacoche.

Cuadro 11. Vigor del cultivo de cinco cepas de huitlacoche en diferentes fechas de observación.

Cepa	Origen de la cepa	Días después de la siembra					
		3	7	9	11	14	17
1	30G40	bajo	alto en bordes	alto en bordes	alto en bordes	alto en bordes	alto en bordes
2	Gavilán	bajo	alto	alto	alto	alto	alto
3	A-791	alto	alto	alto	alto	alto	alto
4	Cóndor	bajo	alto	alto	alto	alto	alto
5	A-Oso	alto	alto	alto	alto	alto	alto

4.2.1.5. Tipo de margen de las colonias

Se observaron diferentes tipos de márgenes entre cepas y dentro de cepas en las diferentes fechas de observación, de tal forma que no se observaron cambios progresivos o secuenciados en la aparición de dichos márgenes. (Cuadro 12).

Al final del crecimiento y desarrollo, las colonias de las cepas 1, 2 y 4 presentaron margen difuso debido a que el crecimiento del micelio fino hizo menos apreciables las formas o figuras que conformaban la periferia de la colonia. Aunque la cepa 3 también tuvo crecimiento micelial, éste no atenuó la evidente irregularidad que el margen presentó (Cuadro 12).

Parece ser que los mayores valores de incidencia, severidad y rendimiento de huitlacoche están relacionados con márgenes bien definidos: lisos, semilisos y rugosos y no con los márgenes difusos.

En relación a esto, la cepa 5, que presentó principalmente margen semiliso y bien definido, superó significativamente en producción de huitlacoche a la cepa 1, ésta última presentó margen difuso.

Cuadro 12. Naturaleza del margen del cultivo de cinco cepas de huitlacoche en diferentes fechas de observación.

Cepa	Origen de la cepa	Días después de la siembra					
		3	7	9	11	14	17
1	30G40	liso	difuso	difuso	difuso	difuso	difuso
2	Gavilán	liso	semiliso	semiliso	semiliso	difuso	difuso
3	A-791	semiliso	rugoso	rugoso	rugoso	sinuoso	sinuoso
4	Cóndor	difuso	liso	liso	liso y difuso	difuso	difuso
5	A-Oso	liso	semiliso	semiliso	semiliso	semiliso	semiliso

4.2.1.6. Grado de tinción del medio de cultivo

Todas las cepas al estar creciendo en medio de cultivo PDA desarrollaron una especie de halo alrededor de la colonia; al principio éste fue color café muy claro o amarillento, luego cambió a ámbar tenue y finalmente a ámbar (Figuras 9 y A del Anexo).

A los tres días después de la siembra solamente desarrollaron la tinción las cepas 2, 3 y 4; mientras que las cepas 1 y 5 la presentaron a partir de los siete dds.

No se observó relación entre la presencia y color de la tinción con incidencia severidad y rendimiento de huitlacoche (Cuadro 13).

Cuadro 13 . Coloración que crece en la periferia de las colonias de cinco cepas de huitlacoche en diferentes fechas de observación.

Cepa	Origen de la cepa	Días después de la siembra					
		3	7	9	11	14	17
1	30G40	sin halo	amarillento	ámbar	ámbar	ámbar	ámbar
2	Gavilán	café muy claro	amarillento	ámbar tenue	ámbar	ámbar	ámbar
3	A-791	café muy claro	amarillento	ámbar tenue	ámbar tenue	ámbar tenue	ámbar
4	Cóndor	amarillento	ámbar tenue	ámbar	ámbar	ámbar	ámbar
5	A-Oso	sin halo	amarillento	ámbar tenue	ámbar tenue	ámbar	ámbar

La tinción del medio de cultivo que no se rayó o untó con esporidios fue diferente entre cepas y entre fechas en una misma cepa (Figura 9 y A del anexo).

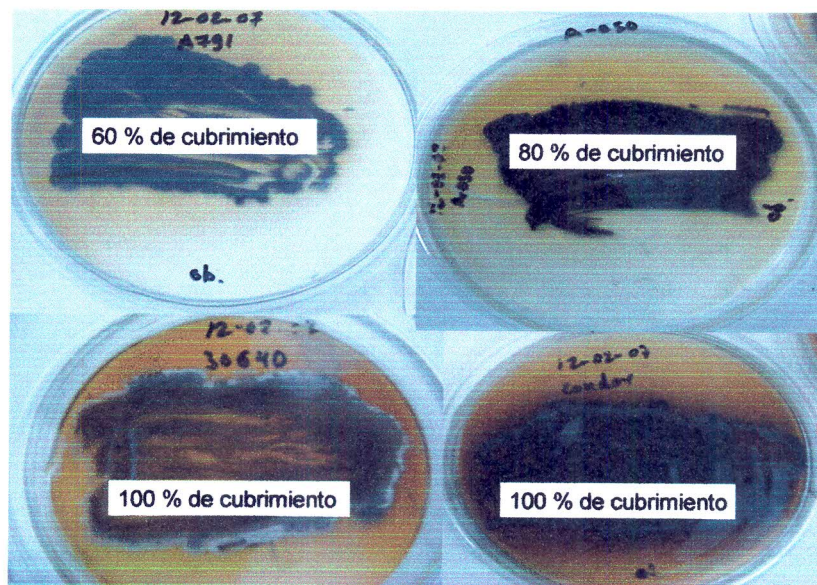


Figura 9. Color del halo que rodea a la colonia y porcentaje de cubrimiento por el mismo del medio de cultivo que no fue rayado con esporidios. La observación fue a los 17 días después de sembrar.

A los tres días después de sembrar (dds) las cepas 1 y 5 no presentaron coloración alrededor de la colonia, mientras que en la cepa 4, la coloración cubrió el 100 % del medio que no fue rayado con esporidios.

La tinción del medio de cultivo fue incrementando de manera diferente entre cepas conforme pasó el tiempo, de tal manera que la coloración cubrió el

100 % del medio a los tres dds, en la cepa 4, a los nueve en la 3 y a los 17 en la cepa 1. En las cepas 3 y 5 la tinción sólo cubrió el 60 y el 80 %, respectivamente (Cuadro 14).

No se observó alguna relación clara entre el porcentaje del medio de cultivo cubierto por la tinción de las diferentes cepas y la incidencia, severidad y rendimiento de huitlacoche.

Cuadro 14 . Porcentaje del medio de cultivo teñido por el halo en relación a la superficie que no fue rayada o untada con esporidios.

Cepa	Origen de la cepa	Días después de la siembra					
		3	7	9	11	14	17
1	30G40	0	70	75	75	80	100
2	Gavilán	60	90	100	100	100	100
3	A-791	40	40	40	50	60	60
4	Cóndor	100	100	100	100	100	100
5	A-Oso	0	50	50	60	70	80

4.2.1.7. Observaciones a través del microscopio estereoscópico

Vistos a través del microscopio estereoscópico, en los primeros 3 a 4 días después de la siembra, los cultivos fueron muy parecidos entre ellos presentando una coloración cremosa o café amarillento muy claro y brillante; el relieve estuvo representado por una aglomeración de pústulas que se fusionaban conforme crecían llegando a formar una especie de masa grasienta, parecida a la formada por las levaduras (Figura 10); dicha característica también fue reportada por Snetselaar y Mims (1993).

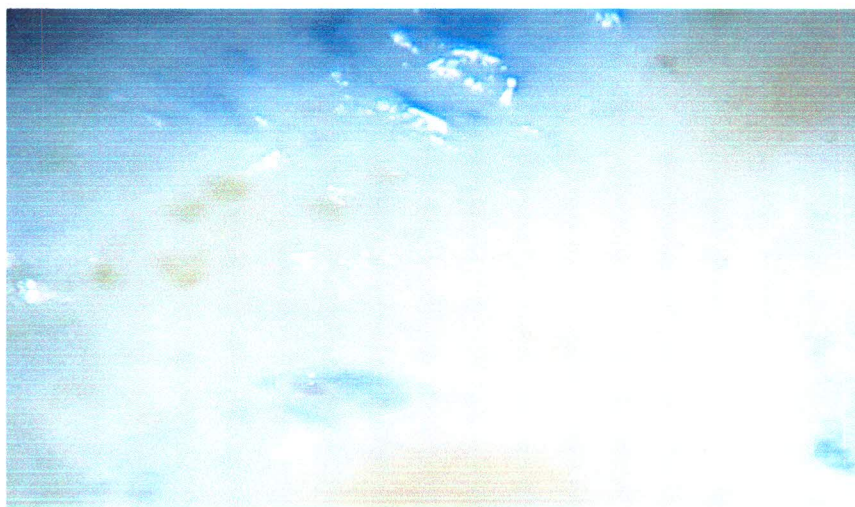


Figura 10. Cultivo de la Cepa 5, colectada en el híbrido de maíz A-Oso, visto a través del microscopio estereoscópico a 10X a los tres días después de la siembra. Nótese el crecimiento cremoso como de levadura.

A los 11 días después de sembrar y vistos a través del microscopio estereoscópico los cultivos de las cepas presentaron diferentes características (Figura 11).

El relieve de la Cepa 1 estuvo formado por una especie de laberinto constituido por figuras parecidas a murallas; la Cepa 2 desarrolló un relieve formado por una masa de pústulas no bien definidas; el relieve de la Cepa 4 fue un conglomerado de donas color café; mientras que la Cepa 5 presentó una agregación de estructuras parecidas a gusanos negros.

El margen de la cepa 1 fue difuso y formado por las puntas de los filamentos miceliales; el de la Cepa 3 fue muy irregular presentando crecimientos que sobresalieron claramente al resto del margen; los márgenes de las cepas 4 y 5 estuvieron formados por la sucesión de las estructuras que conformaron su relieve.

El crecimiento micelial fue muy evidente en la Cepa 1; en las cepas 2, 3 y 4 fue muy corto y sólo creció en la superficie del cultivo.

La cepa 2 fue parecida a la cepa 3, aunque en este caso su margen fue como el de la Cepa 5.

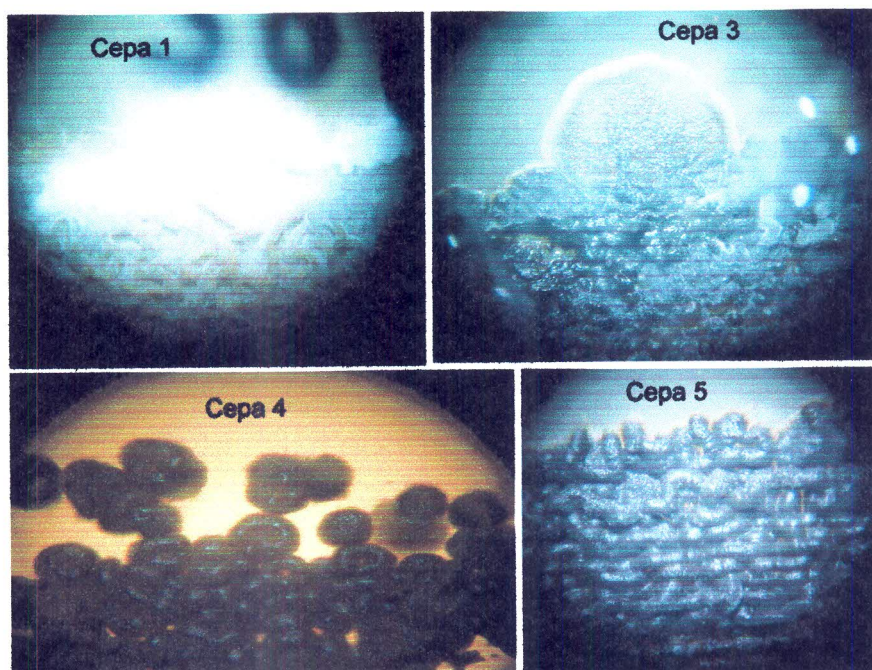


Figura 11. Cultivos de huitlacoche vistos a través del microscopio estereoscópico a los 11 días después de sembrar.

4. 2. 2. Caracterización morfológica de esporidios

Al transferir los esporidios a cajas Petri con PDA, cuando el cultivo fue de color café claro o negro (dependiendo de la cepa), después de unas 24 a 48 horas, lo que se observó, a través del microscopio óptico a 40X, fueron esporidios transparentes y de forma alargada con los extremos más o menos puntiagudos (Figura 12); estas características fueron conservadas por unos dos días más, lo cual coincide con Agrios (1999) y anónimo (1980).

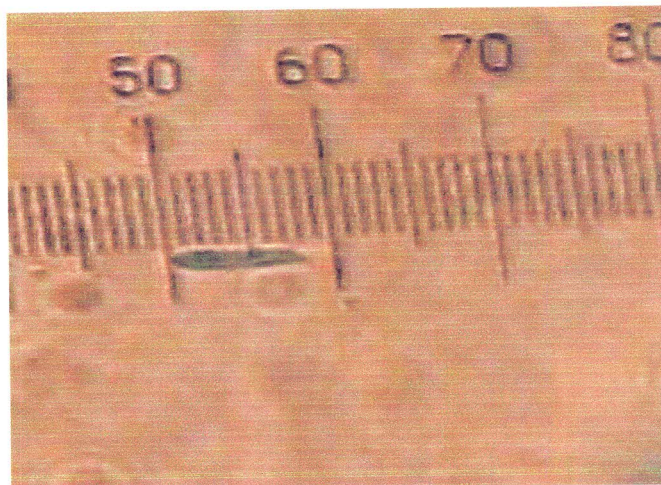


Figura 12. Esporidio de huitlacoche visto través del microscopio óptico a 40X a los tres días después de sembrar. La coloración azulosa es debida a la aplicación de lactofenol, ya que sin éste no se distinguiría por ser transparente.

A los cuatro días después de sembrados, los esporidios comenzaron a engrosarse presentando extremos menos agudos y más redondeados o achatados e inició la aparición de algunos esporidios con coloración café claro, pero la gran mayoría aún se mostraron transparentes.

A los siete días después de sembrados, los esporidios se presentaron en masas o conglomerados de color café claro; sus formas predominantes fueron más o menos como la del fruto de un cacahuate con una ligera constricción, o la de un pepino con sus extremos redondeados.

A los 14 a 15 días después de sembrar, ya no se apreciaron cambios considerables en los esporidios en tamaño y color (Figura 13). En este estado de desarrollo en la Cepa 5 fue muy común una segmentación transversal a la mitad del esporidio; en la Cepa 4 predominó la forma de fruto de cacahuate con una constricción muy marcada; mientras que en los esporidios de la Cepa 1 predominó la forma ovoide y sin constricciones. Esta última forma también fue reportada por Agrios (1999). Al respecto

Crhistense (1963) indica que los esporidios pueden tener diversas formas, sobre todo cuando crecen en medio de cultivo artificial.

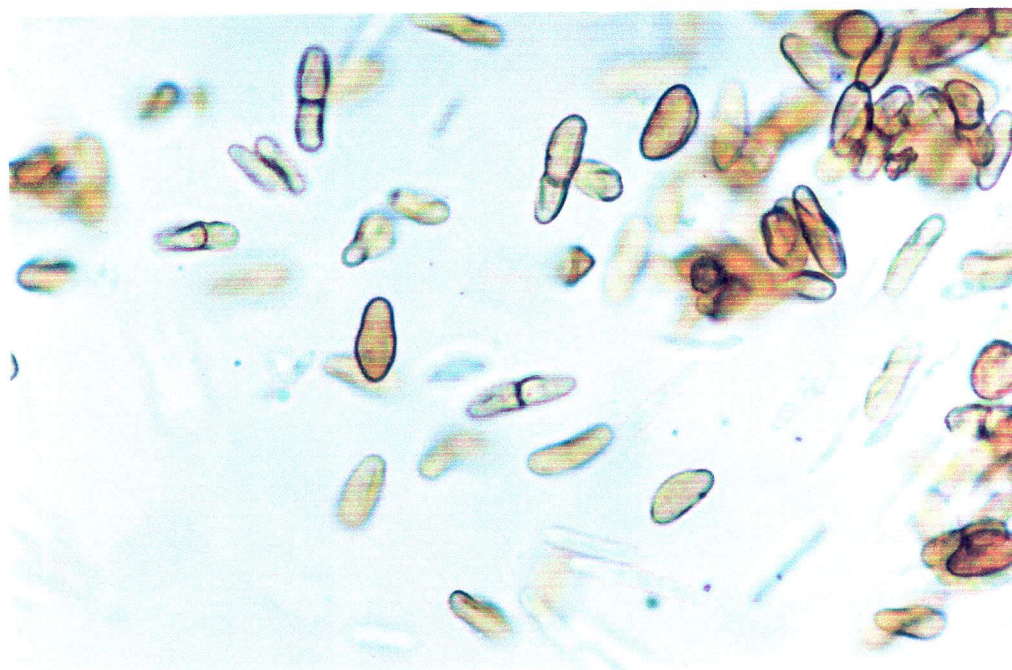


Figura 13. Aspecto de los esporidios de la Cepa 5, colectada en el híbrido de maíz A-Oso, vistos a través del microscopio óptico (40X), a los 11 días después de sembrar.

Los esporidios de la Cepa 1 fueron muy homogéneos y parecidos entre sí, en su forma, a diferencia de las demás cepas

4.2.2.1. Metrología microscópica de esporidios

La medición fue realizada a los 3 y a los 15-20 días después de sembrar los esporidios en PDA. Con dicha medición se obtuvo los promedios de longitudes y anchuras del Cuadro 15.

Cuadro 15. Promedios de longitud y anchura y tamaño preliminar de muestra de esporidios de cinco cepas de huitlacoche a los tres días después de sembrar (hilera 1) y al final de sus desarrollo y crecimiento (hilera 2).

Cepa	Origen de la cepa	dds	Longitud (μ)			Anchura (μ)		
			n	Promedio	S ²	n	Promedio	S ²
1	30G40	3	26	22.50 a ^z	57.29	26	3.80 b	1.75
		18	51	22.74 a	10.77	51	9.38 a	1.64
2	Gavilán	3	25	31.82 b	31.14	25	4.78 b	1.51
		16	52	37.35 a	60.98	52	11.00 a	1.75
3	A-791	3	26	27.90 b	41.94	26	4.80 b	0.91
		16	52	37.25 a	69.65	52	10.80 a	2.22
4	Cóndor	3	26	33.30 a	79.51	26	5.60 b	1.46
		20	52	36.20 a	52.18	52	11.45 a	2.19
5	A-Oso	3	35	30.68 b	46.05	35	5.27 b	0.19
		15	142	44.42 a	89.22	142	11.70 a	2.08

dds: días después de sembrar; n: tamaño de muestra preliminar; S²: varianza; ^zPromedios con las mismas letras en cada cepa no son significativamente diferentes, según prueba de comparación de dos medias de dos poblaciones mediante muestras aleatorias independientes, con el estadístico t de Student ($P \leq 0.05$).

La longitud de los esporidios fue significativamente mayor al final de su desarrollo que a los tres días después de sembrar en las cepas 2, 3 y 5; mientras que en las cepas 1 y 4 los esporidios presentaron la misma longitud en las dos diferentes fechas. Es decir, la longitud de los esporidios de las cepas 2, 3 y 5 aumentó significativamente de una etapa a otra, mientras que la de las otras dos no; aunque dicho aumento no fue mayor del 45 %.

En todas las cepas, la anchura de los esporidios fue significativamente mayor en la etapa de desarrollo final que a los tres días después de sembrar, aumentando más del 100 % de una etapa a otra.

4.2.2.1.1. Dimensiones de esporidios a los tres días después de la siembra

Cuando los esporidios habían cumplido tres días después de su siembra en medio de cultivo PDA, la longitud de estos estuvo dentro del intervalo entre 22.5 y 33.3 μ . El valor más bajo correspondió a la Cepa 1 y el más alto a la Cepa 4 (Cuadro 15 y Figura 14). La Cepa 4 fue estadísticamente igual a las cepas 2 y 5 y diferente a las cepas 3 y 1. Las cepas 2, 3, 4 y 5 fueron significativamente superiores a la cepa 1 (Figura 14).

La anchura de esporidios, a los tres días después de sembrar (Cuadro 15 y Figura 14), estuvo entre 3.8 (Cepa 1) y 5.6 μ (Cepa 4). En esta etapa de desarrollo las cepas 4 y 5 fueron estadísticamente iguales entre sí y superiores a las cepas 2 y 3. Las cepas 2 y 3 fueron iguales entre sí y significativamente superiores a la Cepa 1; es decir la mayor anchura de esporidios fue alcanzada por las cepas 4 y 5 seguidas de las cepas 2 y 3, siendo la Cepa 1 la que presentó los esporidios más angostos de todas las cepas (Figura 14).

A los tres días después de sembrar, los mayores tamaños de esporidios se presentaron en la Cepa 4 (33.3 x 5.6 μ) y en la Cepa 5 (30.68 x 5.27 μ), mientras que el menor tamaño (22.5 x 3.8 μ) fue obtenido por la Cepa 1 (Figura 14).

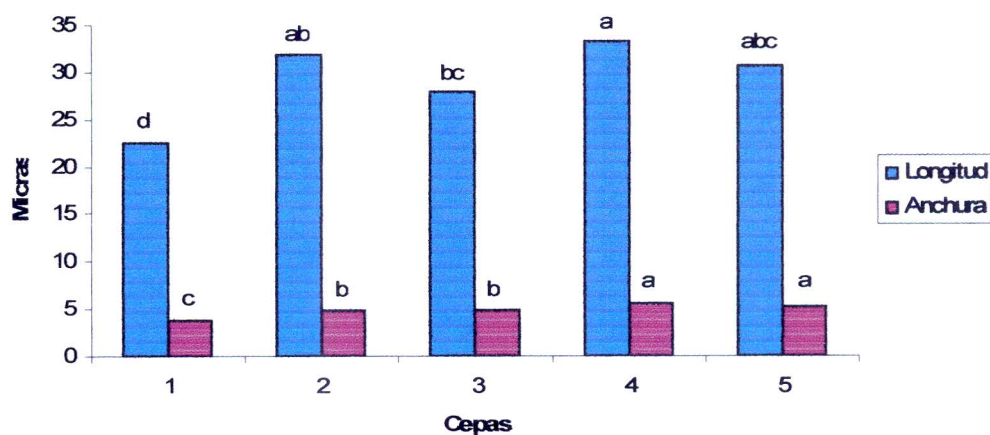


Figura 14. Tamaño de esporidios de cinco cepas de huitlacoche, medidos a los tres días después de sembrar. Columnas con las mismas letras son estadísticamente iguales, según prueba de comparación de dos medias con el estadístico t de Student ($P \leq 0.05$).

4.2.2.1.2. Tamaño final de los esporidios

Al final del crecimiento y desarrollo de los esporidios, que en general ocurrió a los 15 días después de sembrarlos (Figura 15), la longitud de éstos estuvo entre 22.74 y 44.42 μ .



Figura 15. Aspecto de un esporidio de huitlacoche al final de su crecimiento y desarrollo en medio de cultivo PDA.

En esta etapa (al final del crecimiento y desarrollo) los esporidios más largos (44.42 μ) los presentó la Cepa 5 mientras que los más cortos (22.74 μ)

fueron los de la cepa 1 (Cuadro 15). La Cepa 1 fue significativamente menor que las cepas 2, 3, 4 y 5; siendo la cepa 5 significativamente superior a la 2, 3 y 4, éstas tres fueron estadísticamente iguales entre sí (Figura 16).

La longitud de esporidios dentro de una cepa y entre éstas puede ser muy diferente. Al respecto Christensen (1963) encontró que el promedio en longitud de esporidios de una línea dada varió desde 13.4 hasta 28.9 μ dependiendo de su fuente.

La anchura de esporidios, en la etapa final, estuvo entre 9.38 y 11.7 μ (Cuadro 15). La anchura de las cepas 2, 3, 4 y 5 fue significativamente superior a la de la Cepa 1. La Cepa 5 fue estadísticamente igual a la Cepa 4 y superior a las cepas 1, 2 y 3 (Figura 16).

En esta etapa de desarrollo los esporidios más anchos se presentaron en las cepas 4 y 5 (11.7 μ) y los más angostos en la Cepa 1 (9.38 μ).

En etapa de desarrollo final (aproximadamente a los 15 días después de sembrar) el mayor tamaño de esporidios (44.42 x 11.7 μ) se presentó en la Cepa 5 y el menor (22.74 x 9.38 μ) en la Cepa 1 (Figura 16). Las cepas 2, 3 y 4 fueron similares en cuanto a tamaño de esporidios.

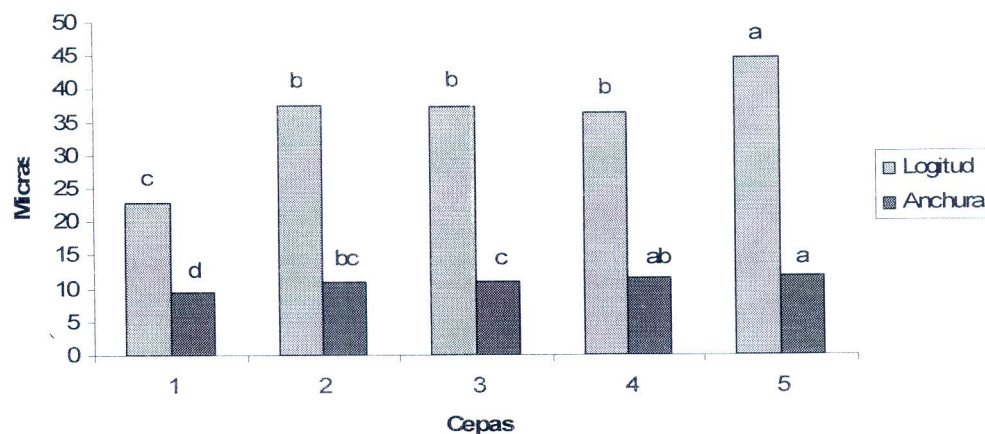


Figura 16. Tamaño final de los esporidios de cinco cepas de huitlacoche. Columnas con las mismas letras son estadísticamente iguales, según prueba de comparación de dos medias con el estadístico t de Student ($P \leq 0.05$).

El mayor tamaño de los esporidios, a los tres días después de sembrados fue obtenido con las cepas 4 y 5 mientras que al final de su desarrollo, este se presentó en la Cepa 5. Los esporidios más pequeños se presentaron en la Cepa 1, a los tres días después de sembrar y en la etapa final de su desarrollo (Cuadro 15, Figuras 14 y 16).

Las diferencias encontradas entre las diferentes cepas en cuanto a tamaño de esporidios se deben a que son diferentes en información genética. Al respecto, Agrios (1999) indica que en huitlacoche existe una variabilidad extrema y una aparición constante de nuevas razas.

La cepa 5 que presentó el mayor tamaño final de esporidios, también mostró los mayores valores de incidencia, severidad y rendimiento de huitlacoche; por el contrario, la Cepa 1 que presentó el menor tamaño de esporidios, mostró los valores más bajos de incidencia, severidad y rendimiento de huitlacoche.

4.2.2.2. Tamaño óptimo de muestra para la medición de esporidios

En el cálculo del tamaño óptimo de muestra para la medición de la longitud y la anchura de los esporidios fueron utilizados los datos del Cuadro 16.

Cuadro 16. Tamaño de muestra preliminar y varianzas de longitud y anchura de esporidios de cinco cepas de huitlacoche, en dos etapas de desarrollo, a los tres días después de sembrar (hilera 1) y al final de su desarrollo (hilera 2).

Cepa	Origen de la cepa	dds	Longitud			Anchura		
			n	S ²	C.V. (%)	n	S ²	C.V. (%)
1	30G40	3	26	57.29	33.6	26	1.75	34.8
		18	51	10.77	14.4	51	1.64	13.6
2	Gavilán	3	25	31.14	17.5	25	1.51	25.7
		16	52	60.98	20.9	52	1.75	12.0
3	A-791	3	26	41.94	23.2	26	0.91	19.9
		16	52	69.65	22.4	52	2.22	13.8
4	Cóndor	3	26	79.51	26.8	26	1.46	21.6
		20	52	52.18	19.9	52	2.19	12.9
5	A-Oso	3	35	46.05	22.1	35	0.19	8.3
		15	142	89.22	21.3	142	2.08	12.3

dds: días después de la siembra; n: tamaño de muestra preliminar; S²: varianza; C.V.: coeficiente de variación.

A manera de ejemplo, se presenta el cálculo del tamaño óptimo de muestra de la longitud de esporidios de la Cepa 1 a los 3 días después de sembrar.

Datos:

$Z_{\alpha/2}^2$ = valor de Z^2 de tablas de la distribución normal estandarizada con $\alpha=0.05$

$$Z_{\alpha/2} = -1.96$$

$$Z_{\alpha/2}^2 = (-1.96)^2 = 3.8416$$

S_n^2 = varianza de la muestra = 57.29 (Cuadro 16)

d = precisión que se desea tener (5% de la media preliminar)

media = 22.5 (Cuadro 15)

$$d = (22.5) (0.05) = 1.125$$

$$d^2 = 1.27$$

Sustituyendo los valores:

$$n_0 = \frac{Z_{\alpha/2}^2 S_n^2}{d^2} = \frac{(3.84)(57.29)}{1.27} = 173 \text{ esporidios}$$

El tamaño de muestra resultó ser diferente entre cepas, entre etapas de desarrollo y entre longitud y anchura. Es decir, el tamaño de muestra fue específico para cada cepa y dentro de ésta para cada etapa de desarrollo (Cuadro 17).

Cuadro 17. Tamaño óptimo de muestra (n_0) para medir la longitud y anchura de esporidios de cinco cepas de huitlacoche en dos etapas de desarrollo.

Cepa	Origen de la cepa	Días después de sembrar	Longitud	Anchura
1	30G40	3	173	187
		18	37	29
2	Gavilán	3	48	102
		16	68	23
3	A-791	3	83	61
		16	78	30
4	Cóndor	3	111	72
		20	62	26
5	A-Oso	3	76	11
		15	70	24

Los mayores tamaños de muestra ($n_0 = 187$, para anchura y $n_0 = 173$ para longitud) correspondieron a la Cepa 1 a los tres días después de sembrar, mientras que el menor ($n_0 = 11$) fue para la anchura de la Cepa 5 en esta misma etapa de desarrollo (Cuadro 17 y Figura 17).

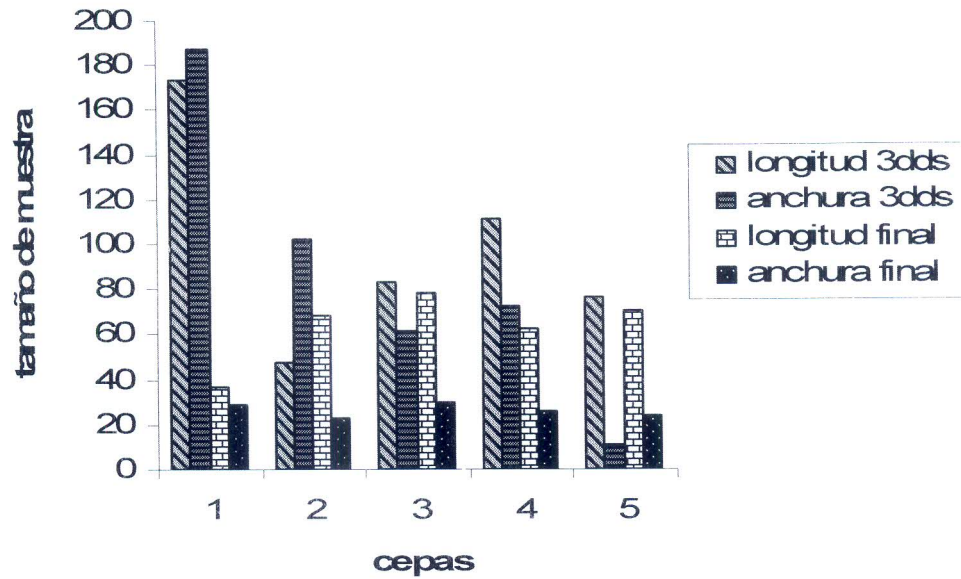


Figura 17. Tamaño óptimo de muestra al medir ancho y largo de esporidios de cinco cepas de huitlacoche a los tres días después de sembrar y en desarrollo final.

A excepción de las cepas 2 (en longitud) y 5 (en anchura), el tamaño de muestra en longitud y anchura de esporidios fue mayor a los tres días después de sembrar que en la etapa de desarrollo final. La variabilidad de los esporidios en los primeros días de desarrollo fue mayor que al final de su desarrollo, tal como lo muestran los coeficientes de variación en el cuadro 16, y como al aumentar la variabilidad también aumenta n (Gómez, 1977), a esto se debió el mayor tamaño de muestra cuando los esporidios fueron más heterogéneos. El caso contrario ocurrió con las cepas 2 (en longitud) y 5 (en anchura); es decir, presentaron una mayor variabilidad, en estado de desarrollo final que a los tres días después de sembrar y consecuentemente un tamaño de muestra mayor.

Otra posible causa de que se haya obtenido un mayor tamaño de n a los tres días después de sembrar, fue que las medias de longitud y anchura fueron menores y como a partir de éstas fueron obtenidas precisiones

relativamente bajas y como a menor valor de d mayor valor de n , entonces los tamaños de muestra fueron mayores en esta etapa (Cuadros 15 y 17).

Se encontró que el tamaño óptimo de muestra generalmente fue mayor para la longitud de esporidios que para la anchura de los mismos, el cual siempre estuvo directamente relacionado con la variabilidad (Cuadros 16 y 17).

El tamaño óptimo de muestra requerido para medir esporidios depende de la etapa de desarrollo en la que se encuentre y de la medición que se haga (longitud o anchura) y de la cepa en estudio.

Parece ser que la incidencia, severidad y rendimiento de huitlacoche, productos de la inoculación artificial, están relacionados con algunas características de las colonias y de los esporidios de las cepas utilizadas como inóculo.

Los valores más altos de las variables porcentaje de incidencia, índice de severidad, rendimiento por planta y rendimiento por hectárea de huitlacoche, obtenidos con el análisis combinado (datos de 2006 y 2007), coincidieron con aquellas cepas cuyas colonias al estar creciendo en PDA presentaron color café oscuro o negro, relieve granular, poco o nulo crecimiento micelial, vigor alto y margen bien definido. Además se observó que a mayor tamaño final de esporidios, mayor fue la incidencia, severidad y el rendimiento de huitlacoche.

Por lo anterior, en subsiguientes estudios sobre inoculación de huitlacoche en maíz, es necesario realizar la correlación cuantitativa entre los caracteres de las colonias y de los esporidios y la incidencia, severidad y rendimiento de huitlacoche.

5. CONCLUSIONES

Los tratamientos constituidos por la inoculación de cepas de huitlacoche sobre los mismos híbridos de maíz en los que fueron colectadas, fueron estadísticamente diferentes en porcentaje de incidencia, severidad y rendimiento de huitlacoche.

El tratamiento del híbrido A-oso inoculado con la cepa 5 fue significativamente superior en porcentaje de incidencia, índice de severidad y rendimiento de huitlacoche; dicha cepa también fue significativamente mayor en longitud final de esporidios; mientras que el híbrido 30G40 inoculado con su propia cepa (1) produjo los valores más bajos

En el mejor tratamiento (cepa 5- A-Oso), la mala cobertura de mazorca que presenta el híbrido puede limitar el rendimiento y la calidad de huitlacoche cuando el crecimiento de las agallas coincide con una alta precipitación pluvial.

El porcentaje de incidencia y el índice de severidad estuvieron altamente correlacionados de manera directa con el rendimiento por planta y por hectárea de huitlacoche.

Las cepas estudiadas de huitlacoche, cultivadas en medio de cultivo papa dextrosa agar presentaron características diferentes, dependiendo de la cepa y del estado de desarrollo.

Se observó que a mayor longitud final de esporidios, mayor fue el porcentaje de incidencia, índice de severidad, y rendimiento por planta y por hectárea de huitlacoche.

Los mayores valores de porcentaje de incidencia, índice de severidad y rendimiento de huitlacoche, coincidieron con las cepas cuyas colonias presentaron color café oscuro o negro, relieve granular, poco o nulo crecimiento micelial, vigor alto y margen bien definido.

El tamaño óptimo de muestra para estimar la longitud y la anchura de los esporidios varió desde 11 hasta 187 dependiendo de la cepa, del estado de desarrollo y del carácter (longitud o anchura).

6. LITERATURA CITADA

- Abad, A. y L. A. Servín. 1982. Introducción al muestreo. 2ª edición. Editorial Limusa. Distrito Federal, México. 216 p.
- Agrios, G. N. 1978. Plant Pathology. 2th edition. Academic Press, Inc. New York, U.S.A. 703 p.
- Agrios, G. N. 1999. Fitopatología. 5ª reimpresión de la 2ª edición. Editorial Limusa. S.A. de C. V. UTEHA Grupo Noriega Editores. Distrito Federal, México. 838 p.
- Anónimo. 1980. Compendio de enfermedades del maíz. Editorial Hemisferio sur. The American Phytopathological Society. Bueno Aires, Argentina 102 p.
- Barrera E., H. y R Cárdenas R. 1997. El microscopio óptico. Escuela Nacional de estudios profesionales Iztacala, UNAM. Editorial Plaza y Valdés S. A. de C.V. Distrito Federal, México. 86 p.
- Bartolón H., A. A. 1999. Evaluación de fuentes de inóculo en la producción de huitlacoche (*Ustilago maydis* Cda.). Tesis de licenciatura. Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 53 p.
- Christensen, J. J. 1963. Corn Smut caused by *Ustilago maydis*. Published by The American Phytopathological Society. Departament of Plant Pathology and Botany. Institute of Agriculture, University of Minnesota, St. Paul. 41 p.

- De Molina, A. 1571. Vocabulario en lengua mexicana y castellana. Editorial Casa de Antonio Spinois. Distrito Federal, México. 162 p.
- Do Toit, L. J. and J. K. Pataky. 1999a. Variation associated with silk channel inoculation for common smut of sweet corn. *Plant Disease* 83:727-732.
- Do Toit, L. J. and J. K. Pataky. 1999b. Effects of silk maturity and pollination on infection of maize ears by *Ustilago maydis*. *Plant Disease* 83:621-626.
- French, E. y T. T. Hebert. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. Editorial IICA. Instituto interamericano de ciencias agrícolas. San José Costa Rica. 289 p.
- García, E. 1998. Modificación al sistema de clasificación climática de Köppen. Ed. Offset Larios S.A. de C.V. México. 217 p.
- Gómez A., J. R. 1977. Introducción al muestreo. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados, Escuela Nacional de Agricultura. Chapingo, México. 259 p.
- Guevara V., E. 2007. Aislamiento, caracterización e identificación de microorganismos tipo levadura asociados a *Ustilago maydis*. Tesis de Maestría en Protección vegetal. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 64 p.
- Herrera, T. y M. Ulloa. 1998. El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. 2ª edición. Ed. Fondo de Cultura Económica. Instituto de Biología de la UNAM. 552 p.
- Kahmann, R. and J. Kämper. 2004. *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. *New Phytologist* 164:31-42.

- Kealey, S. and V. F. Kosikowski. 1981. Corn smut as a food source. Perspectives on biology composition and nutrition. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 15: 321-351.
- Kohashy S., J. 1967. El microscopio. Su descripción, manejo y cuidado. Preparatoria Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 17 p.
- Leal C., M. A. 1996. Evaluación de metodologías para la inducción artificial de huitlacoche. Facultad de Agronomía de la UANL. Nuevo León, México. 76 p.
- López A., G. F. 1988. Factores que determinan el desarrollo de *Ustilago maydis* (D.C) Cda; agente causal del huitlacoche del maíz. Centro de Fitopatología, Colegio de Posgraduados, Chapingo, México. 83 p.
- Martínez M., L. 1999. Mejoramiento de la virulencia del hongo y la susceptibilidad y resistencia del maíz al huitlacoche (*Ustilago maydis* Cda.). Tesis de Maestría en Horticultura. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 101 p.
- Orona M., A. 1995. Reacción de variedades de maíz representativas de cinco razas mexicanas al ataque de huitlacoche (*Ustilago maydis* (D.C.) Cda. Departamento de Fitotecnia Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 50 p.
- Pataky, J. K. 1991. Production of huitlacoche (*Ustilago maydis* (DS) Corda) on sweet corn. Hort Science 26: 1374-1377.
- Pataky, J. K., C. Nankam and M. R. Kerns. 1995. Evaluation of silk-inoculation technique to differentiate reactions of sweet corn hybrids to common smut. Phytopathology 85(10): 1323-1328.

- Pataky, J. K. and M. A. Chandler. 2003. Production of huitlacoche, *Ustilago maydis*: timing inoculation and controlling pollination. *Mycologia* 95: 1261-1270.
- Pérez M., A. 1999. Evaluación de la reacción de 300 familias de maíz (*Zea mays*) al huitlacoche (*Ustilago maydis*). Tesis de licenciatura. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- Pope, D. D. and S. M. McCarter. 1992. Evaluation of inoculation methods for inducing common smut on corn ears. *Phytopathology* 82: 950-955.
- Snetselaar, K. M., and C. W. Mims. 1993. Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: Light and electron microscopy. *Phytopathology* 83: 843-850.
- Thakur, R. P., K. J. Leonard, and J. K. Pataky. 1989. Smut gall development in adult corn plants inoculated with *Ustilago maydis*. *Plant Disease* 73: 921-925.
- Vildózola T., J. L. 1998. Caracterización y selección *in situ* de una población de calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma* Huber var. *Stenosperma*) en Achichipico, Morelos. Tesis de Licenciatura. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 62 p.
- Villanueva, V. C. 1995. Estudios de la reacción del maíz al huitlacoche (*Ustilago maydis*). Tesis de Doctorado en Ciencias. Programa de Genética. Colegio de Posgraduados. México. 133 p.

- Villaneva, V. C., D. Cruz, J. D. Molina, F. Castillo and E. Zavaleta. 1999. Artificial induction of "huitlacoche" (*Ustilago maydis*): influence of different conditions in the field. *Micol. Neotrop. Apl.* 12: 41-57.
- Villanueva, V. C., R. E. Sánchez y E. Villanueva S. 2007. El huitlacoche y su cultivo. Editorial Mundi Prensa. Distrito Federal, México. 96 p.
- Zimmerman, S. A. and J. K. Pataky. 1992. Inoculation techniques to produce galls of common smut on ears of sweet corn. *Phytopathology* 82: 995.

7. ANEXO

Cuadro A. Longitud y ancho en micras de esporidios de cinco cepas de huitlacoche a los tres días después de sembrarlas en medio de cultivo PDA.

Cepa 1		Cepa 2		Cepa 3		Cepa 4		Cepa 5	
largo	ancho	largo	ancho	largo	ancho	largo	ancho	largo	ancho
15,6	5,2	36,4	5,2	26	5,2	41,6	7,8	28,6	5,2
15,6	5,2	23,4	5,2	26	5,2	36,4	5,2	26	5,2
26	2,6	28,6	5,2	28,6	5,2	18,2	5,2	31,2	5,2
15,6	2,6	26	5,2	39	5,2	28,6	2,6	41,6	5,2
15,6	5,2	26	5,2	20,8	5,2	33,8	5,2	28,6	5,2
23,4	2,6	33,8	5,2	39	5,2	31,2	5,2	28,6	5,2
23,4	5,2	31,2	2,6	23,4	5,2	28,6	5,2	26	5,2
23,4	2,6	33,8	5,2	31,2	5,2	20,8	5,2	28,6	5,2
41,6	5,2	36,4	5,2	23,4	5,2	41,6	5,2	28,6	5,2
26	5,2	31,2	5,2	26	5,2	18,2	5,2	26	5,2
15,6	2,6	31,2	5,2	23,4	5,2	23,4	5,2	23,4	5,2
18,2	5,2	36,4	5,2	20,8	5,2	39	5,2	31,2	5,2
23,4	2,6	23,4	7,8	31,2	5,2	44,2	5,2	31,2	5,2
20,8	2,6	49,4	2,6	39	5,2	26	5,2	41,6	5,2
23,4	2,6	31,2	5,2	26	2,6	54,6	7,8	28,6	5,2
26	5,2	26	5,2	36,4	2,6	31,2	5,2	26	5,2
39	2,6	36,4	2,6	28,6	5,2	39	5,2	31,2	5,2
23,4	2,6	31,2	5,2	28,6	5,2	26	5,2	26	5,2
15,6	2,6	28,6	5,2	18,2	5,2	33,8	5,2	44,2	5,2
15,6	2,6	36,4	5,2	20,8	2,6	26	7,8	36,4	5,2
39	2,6	33,8	5,2	28,6	2,6	28,6	7,8	26	5,2
23,4	5,2	26	5,2	18,2	5,2	44,2	5,2	18,2	5,2
18,2	5,2	36,4	2,6	31,2	5,2	39	5,2	26	5,2
15,6	5,2	31,2	5,2	20,8	5,2	41,6	7,8	36,4	5,2
26	5,2	31,2	2,6	33,8	5,2	39	5,2	23,4	5,2
15,6	2,6			36,4	5,2	31,2	5,2	31,2	5,2
								39	5,2
								33,8	5,2
								23,4	5,2
								23,4	5,2
								39	5,2
								49,4	7,8
								31,2	5,2
								26	5,2
								33,8	5,2

Cuadro B. Longitud y ancho de esporidios en micras de cinco cepas de huitlacoche inoculadas en maíz híbrido en etapa final de crecimiento.

Cepa 1 a los 18 dds		Cepa 2 a los 16 dds		Cepa 3 a los 16 dds		Cepa 4 a los 26 dds		Cepa 5 a los 15 dds	
largo	ancho	largo	ancho	largo	ancho	largo	ancho	largo	ancho
26	7,8	39	10,4	36,4	10,4	39	13	39	13
23,4	7,8	26	10,4	28,6	7,8	33,8	10,4	39	10,4
23,4	10,4	39	10,4	41,6	13	36,4	13	52	10,4
26	10,4	31,2	13	33,8	13	39	13	67,6	10,4
20,8	7,8	33,8	10,4	31,2	10,4	28,6	10,4	39	13
26	10,4	33,8	10,4	31,2	10,4	41,6	13	31,2	10,4
20,8	7,8	44,2	10,4	36,4	13	44,2	10,4	65	10,4
20,8	10,4	44,2	10,4	41,6	13	31,2	10,4	41,6	10,4
23,4	10,4	41,6	10,4	44,2	13	41,6	10,4	65	13
26	10,4	44,2	13	31,2	10,4	26	7,8	39	13
26	7,8	28,6	10,4	49,4	10,4	39	13	49,4	13
15,6	7,8	41,6	10,4	28,6	10,4	52	10,4	39	13
23,4	10,4	44,2	10,4	36,4	13	26	10,4	41,6	10,4
18,2	7,8	36,4	10,4	57,2	10,4	26	13	44,2	13
23,4	10,4	44,2	7,8	54,6	10,4	28,6	10,4	67,6	10,4
20,8	10,4	31,2	10,4	20,8	10,4	36,4	10,4	39	13
23,4	10,4	39	10,4	39	7,8	39	13	49,4	13
26	10,4	39	13	41,6	10,4	33,8	10,4	39	10,4
26	10,4	44,2	13	52	10,4	39	10,4	39	10,4
28,6	10,4	41,6	10,4	52	10,4	39	10,4	39	13
23,4	10,4	52	10,4	26	10,4	36,4	10,4	41,6	10,4
23,4	10,4	31,2	10,4	52	10,4	49,4	13	39	10,4
26	10,4	28,6	10,4	41,6	10,4	39	13	39	10,4
18,2	10,4	31,2	10,4	39	10,4	39	13	65	13
18,2	10,4	39	10,4	39	10,4	26	13	33,8	10,4
18,2	10,4	41,6	10,4	33,8	10,4	26	10,4	49,4	13
23,4	10,4	41,6	10,4	31,2	13	26	13	28,6	13
20,8	7,8	31,2	13	46,8	10,4	46,8	13	41,6	13
20,8	7,8	36,4	13	36,4	13	39	10,4	62,4	13
18,2	7,8	36,4	13	31,2	10,4	31,2	10,4	52	10,4
20,8	10,4	39	13	44,2	13	31,2	10,4	52	10,4
20,8	7,8	26	13	39	13	36,4	10,4	44,2	10,4
23,4	10,4	44,2	10,4	44,2	10,4	39	10,4	46,8	10,4
23,4	10,4	39	10,4	31,2	10,4	31,2	10,4	26	13
26	7,8	52	13	26	10,4	31,2	10,4	44,2	10,4
23,4	7,8	52	13	41,6	10,4	36,4	10,4	44,2	13
20,8	7,8	52	7,8	33,8	10,4	49,4	13	44,2	13
26	7,8	39	10,4	31,2	7,8	36,4	10,4	41,6	15,6
20,8	10,4	26	10,4	49,4	10,4	26	7,8	52	10,4
20,8	10,4	31,2	10,4	26	10,4	52	13	49,4	13
26	10,4	31,2	10,4	31,2	10,4	39	13	46,8	13

Continuación del Cuadro B

Cepa1a los 18 dds		Cepa2 a los 16 dds		Cepa 3 a los 16 dds		Cepa 4 a los 26 dds		Cepa 5 a los 15 dds	
largo	ancho	largo	ancho	largo	ancho	largo	ancho	largo	ancho
26	7,8	23,4	10,4	36,4	10,4	41,6	10,4	46,8	15,6
31,2	10,4	28,6	10,4	36,4	13	26	13	54,6	10,4
26	10,4	39	10,4	31,2	10,4	41,6	10,4	36,4	13
23,4	7,8	18,2	13	23,4	10,4	33,8	13	26	10,4
18,2	7,8	41,6	10,4	44,2	13	26	10,4	26	13
26	7,8	41,6	10,4	31,2	7,8	28,6	13	31,2	13
23,4	10,4	44,2	10,4	28,6	13	36,4	10,4	26	15,6
18,2	7,8	26	10,4	36,4	7,8	46,8	13	31,2	13
18,2	10,4	28,6	13	31,2	10,4	33,8	13	36,4	10,4
18,2	10,4	44,2	13	36,4	10,4	36,4	13	44,2	13
		39	10,4	39	10,4	44,2	13	54,6	13
								39	13
								39	13
								41,6	13
								41,6	10,4
								36,4	13
								52	10,4
								52	10,4
								41,6	13
								39	13
								52	13
								49,4	13
								39	10,4
								39	10,4
								41,6	13
								52	10,4
								39	13
								49,4	13
								44,2	13
								41,6	10,4
								41,6	10,4
								52	13
								44,2	10,4
								36,4	13
								44,2	13
								41,6	10,4
								49,4	13
								39	10,4
								52	10,4
								28,6	10,4
								41,6	13

Continuación del Cuadro B

Cepa 1 a los 18 dds		Cepa 2 a los 16 dds		Cepa 3 a los 16 dds		Cepa 4 a los 20 dds		Cepa 5 a los 15 dds			
largo	ancho	largo	ancho	largo	ancho	largo	ancho	largo	ancho	largo	ancho
										67,6	13
								57,2	13	31,2	10,4
								52	10,4	41,6	10,4
								52	10,4	52	10,4
								39	10,4	62,4	10,4
								41,6	10,4	59,8	10,4
								41,6	10,4	41,6	10,4
								26	13	39	10,4
								52	10,4	44,2	10,4
								49,4	10,4	33,8	10,4
								39	10,4	33,8	10,4
								44,2	10,4	28,6	10,4
								41,6	10,4	41,6	10,4
								52	10,4	39	13
								46,8	13	52	13
								44,2	10,4	52	10,4
								26	15,6	39	13
								52	10,4	54,6	13
								54,6	10,4	54,6	10,4
								36,4	13		
								44,2	10,4		
								52	10,4		
								41,6	13		
								49,4	10,4		
								39	10,4		
								36,4	13		
								49,4	10,4		
								41,6	10,4		
								44,2	10,4		
								44,2	10,4		
								41,6	10,4		
								33,8	13		
								33,8	13		
								44,2	13		
								44,2	13		
								52	13		
								44,2	13		
								49,4	13		
								67,6	10,4		
								52	13		
								33,8	13		
								70,2	10,4		

dds: días después de sembrar.

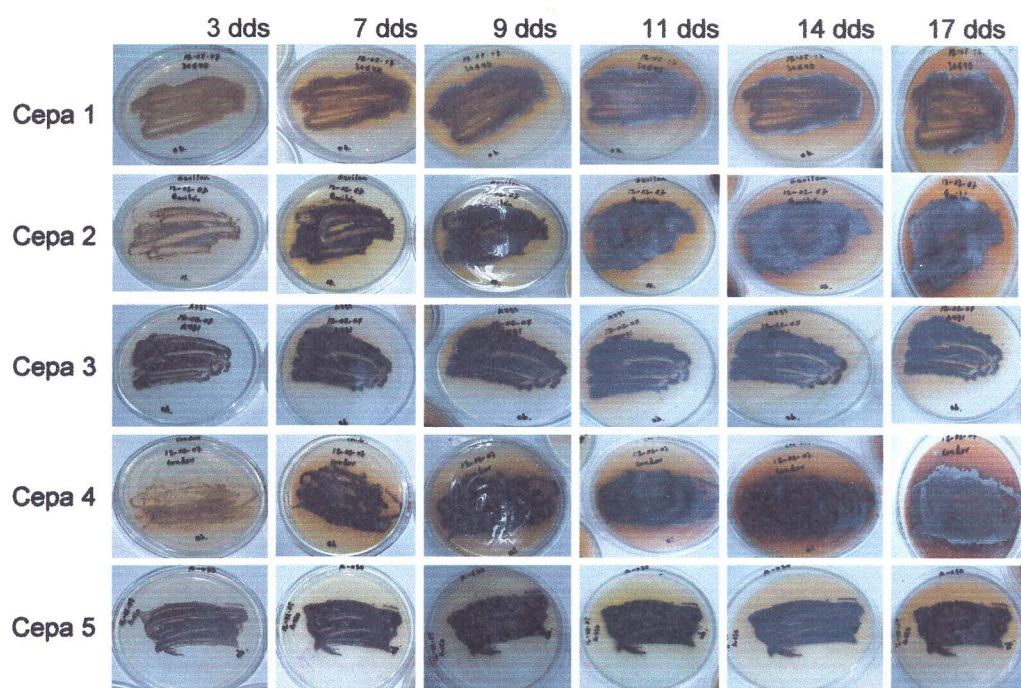


Figura A . Características culturales de cinco cepas de huitlacoche en diferentes etapas de desarrollo.