

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO



Inoculación del Hongo *Ustilago maydis* en Plántulas de Maíz Reproducido en Caldos Nutritivos, Para Probar su Patogenicidad.

Por:

**LUIS GONZÁLEZ CASTRO**

TESIS

Presentada como requisito para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN**

Saltillo, Coahuila, México  
Marzo 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Inoculación del Hongo *Ustilago maydis* en Plántulas de Maíz Reproducido en  
Caldos Nutritivos, Para Probar su Patogenicidad.

Por:

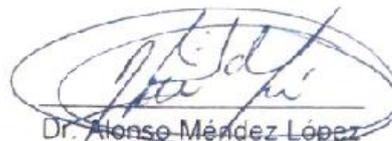
**LUIS GONZÁLEZ CASTRO**

TESIS

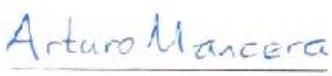
Presentada como requisito para obtener el título de.

**INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN**

Aprobada por el Comité de Asesoría:

  
Dr. Alonso Méndez López  
Asesor Principal

  
Dra. Erika Natalia Ríos Herrera  
Coasesor

  
Dr. Arturo Mancera Rico  
Coasesor

Dr. José Antonio González Fuentes  
Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México  
Marzo 2020

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por permitirme terminar mi carrera, sin olvidar por todo increíble que me ha brindado.

A mi Familia, dentro de ésta, a mis Padres: José Luis Humberto González Preciado y Rebeca Castro Ávila, por brindarme todo su confianza, amor y apoyo para que me mantuviera firme en terminar de buena forma la carrera; A mis hermanos Jorge y Juan y mi hermana Laura; a mis abuelos Elias, Eugenia, Eloisa y Luis (aunque ya no esté en este mundo) por darme ese apoyo e inspiración para terminar lo más pronto posible para volver con ellos. A mis tíos y tías que me mantenían en el camino de la investigación de temas para reforzar mis estudios; a mis primos y a esas personitas aunque no son familia de sangre me brindaron su apoyo para que saliera este trabajo lo más correcto posible.

A mis amigos en general (para no mencionar nombres y me falte alguno), a todos los de mi generación, incluyendo de otras carreras; a los que mantuvieron su amistad aun cuando no les dedicaba suficiente tiempo y a los que a pesar de compartir poco tiempo dejaron una huella en mí

A mis maestros, por enseñarme todo lo que pudieron y obligarme a adquirir muchos secretos agronómicos que me ayudarán en un futuro, no solo de la universidad, sino durante lo largo del tiempo de estudio.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro junto con todo su equipo de trabajo, por brindarme muchísimas cosas, tantas que no puedo nombrarlas en éste momento.

## **DEDICATORIA**

### **A Dios:**

Como símbolo de todo lo que ha puesto y pondrá en mi camino.

### **A mis padres:**

Rebeca Castro Ávila y José Luis Humberto González Preciado

Por dar todo de ustedes para que yo obtuviera lo mejor, por esas llamadas que me hacían sentir mejor aun cuando estuve lejos y sobre todo por su apoyo incondicional y económico claro para que no me faltara NADA.

### **A mis hermanos:**

Laura, Juan y Jorge

Por brindarme todos esos mensajes llenos de amor, alegría cotorreos y sobretodo de confianza, los cuales me ayudaron de forma increíble para seguir adelante.

### **A mis asesores:**

Por permanecer aun cuando no me di el tiempo de entregar avances de ésta tesis cuando me lo pedían (aparezcan o no en la hoja de asesores).

### **A las personas que utilizarán éste estudio:**

A todos los agricultores, productores e investigadores a los que les pueda llegar este trabajo de tesis.

## ÍNDICE GENERAL

I. RESUMEN.....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
1.1 OBJETIVO GENERAL .....	4
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	4
1.3 HIPÓTESIS.....	5
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>6</b>
2.1 Antecedentes.....	6
2.2 Importancia en la nutrición .....	7
2.3 Taxonomía.....	7
2.4 Signos y síntomas .....	8
2.5 Etapas de desarrollo.....	9
2.6 Medios de cultivo .....	11
2.7 Aislamiento del hongo.....	13
2.8 Preparación de un medio de cultivo .....	13
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
3.1 Localización del experimento.....	16
3.2 Diseño experimental.....	16
3.3 Fase de laboratorio.....	17
3.3.1 Obtención de la cepa del hongo.....	17
3.3.2 Formulación de los caldos nutritivos.....	18
3.3.3 Conteo de basidiosporas.....	19
3.3.4 Dilución de los Caldos nutritivos.....	22
3.3.5 Desinfección del sustrato .....	22
3.4 Fase de campo .....	22
3.4.1 Ubicación del invernadero.....	23
3.4.2 Preparación de los contenedores y siembra .....	23
3.4.3 Inoculación .....	23
3.4.4 Factores a evaluar.....	24
3.4.5 Toma de datos .....	24
3.4.6 Modelo estadístico.....	25
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>26</b>
4.2. Incidencia y severidad de <i>U. maydis</i> .....	26
4.2.1. Incidencia de <i>U. maydis</i> presentada en plántulas de maíz .....	27

4.3 Evaluación de la incidencia del hongo <i>U.maydis</i> , en las plántulas de los híbridos de maíz.....	27
4.4 Evaluación de la severidad del hongo <i>U.maydis</i> , en las plántulas de los híbridos de maíz.....	29
4.5 Prueba de medias de Tukey al 95%. ....	32
4.5.1 Evaluación de la prueba de medias entre los caldos nutritivos utilizados. ....	32
4.5.2 Evaluación de la prueba de medias en los híbridos de maíz. ....	34
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	36
6. LITERATURA CITADA.....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Ustilago maydis</i> (Agrios, 2009).....	11
Figura 2. Cámara de Neubauer, cuadrículas de conteo utilizadas en los conteos de las estructuras infectivas de <i>U. maydis</i> , para establecer la concentración de los caldos a las 120 h, de incubación.....	21
Figura 3. Fotografía de un cuadrante de la cámara de Neubauer, donde se resaltan en un círculo algunas de las basidiosporas del caldo CLP consideradas en el conteo. ....	21

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Formulaciones nutritivas de caldos para el desarrollo exponencial de esporas y micelio infectivo de <i>Ustilago maydis</i> .....	18
Cuadro 2. Tabla de concentración de basidiosporas evaluados en caldos nutritivos, para generar estructuras infectivas de <i>U. maydis</i> como inóculo. ....	26
Cuadro 3. Análisis de varianza (ANOVA) de la incidencia del hongo en las plántulas de los híbridos, a los 12 ddi con el hongo <i>U.maydis</i> .....	28
Cuadro 4. ANOVA de la incidencia del hongo en las plántulas de los híbridos a los 18 ddi con el hongo <i>U.maydis</i> .....	29
Cuadro 5. ANOVA de la severidad de la infección en las plántulas de los híbridos a los 12 ddi del hongo <i>U.maydis</i> . ....	30
Cuadro 6. ANOVA de la severidad de la infección de las plántulas de los híbridos a los 18 días después de la inoculación con el hongo <i>U. maydis</i> .....	30
Cuadro 7. ANOVA de la severidad de la infección de las plántulas de los híbridos a los 24 ddi con el hongo <i>U. maydis</i> . ....	31
Cuadro 8. ANOVA de la severidad de la infección en las plántulas de los híbridos a los 30 días después de la infección con el hongo <i>U.maydis</i> .....	31
Cuadro 9. Prueba de medias de Tukey al 95%, aplicado a todos los caldos nutritivos e híbridos de maíz, tomando en cuenta la incidencia y la severidad del hongo <i>U.maydis</i> . ....	32

## I. RESUMEN

La demanda del huitlacoche en el mercado ha llamado el interés de muchas personas e instituciones de investigación; su estudio ha avanzado de tal manera que los investigadores conocen perfectamente el ciclo biológico del hongo y la forma de desarrollarlo en un medio artificial. Aun cuando hay muchas formas de propagar al hongo *Ustilago maydis*, la forma más común de hacerlo es en un medio nutritivo sólido utilizando cajas Petri. El presente trabajo se llevó a cabo en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en dos fases (laboratorio e invernadero), con el objetivo de establecer un medio artificial de multiplicación acelerada y potencializada para el aislamiento y conservación del hongo *U. maydis*, a fin de producir células infectivas y efectivas en un medio líquido como fuentes de inóculos para la aplicación masiva o comercial en campo. Se formularon cinco caldos nutritivos [Caldo nutritivo (CN), Caldo de Avena (CAV), Caldo de Lactosa y Peptona (CLP), Caldo de papa (PDB) y Caldo de Malta y Levadura (CML)] y se evaluó el desarrollo de basidiosporas a los 10 días después de la incubación. Posteriormente se evaluó la efectividad de cada uno de las cepas obtenidas en los caldos. Los resultados indican que todas las formulaciones de los caldos nutritivos presentaron desarrollo del hongo, sin embargo, los caldos PDB y CAV fueron los que produjeron una mayor concentración (25 678 000 y 19 310 000 basidiosporas. mL<sup>-1</sup> de *U. maydis*, respectivamente). Los cinco caldos evaluados provocaron síntomas de incidencia y severidad en las plántulas de los cinco maíces utilizados. Sin embargo, estos se expresaron en diferente grado. Los materiales que presentaron mayor grado de severidad fue Sorento, seguido del A-7573.

Palabras clave: *Ustilago maydis*, Propagación, Caldos nutritivos, Severidad e Incidencia.

## 1. INTRODUCCIÓN

El hongo *Ustilago maydis*, también conocido comúnmente como huitlacoche y/o carbón común es una enfermedad específica del maíz y teocintle que se caracteriza por la formación de tumores, principalmente en la mazorca (Cabrera *et al.*, 2009). Sin embargo, este hongo tiene la capacidad de provocar grandes epifitias impactando sobre todo en la economía del productor aun cuando existen los tratamientos que pueden controlar esta enfermedad así como genotipos resistentes.

En condiciones normales *U. maydis* infecta del 1-5 % de la producción total mundial de maíz (Ruíz, 2008); de acuerdo con el “Atlas agroalimentario 2018” tan solo en el año 2017 en México se produjeron 27,762,481 toneladas de maíz, dando como resultado un aproximado de 277,624 - 1,388,124 toneladas de maíz afectado por este patógeno. Sin embargo, para que esta enfermedad pueda desarrollarse es necesario que se den las condiciones ambientales óptimas, éstas son cuando hay poca precipitación pluvial durante la floración de la planta de maíz y temperaturas elevadas.

La presencia de esta enfermedad en el cultivo de maíz no es del todo negativo, ya que en la gastronomía de México, parte de Europa y Estados Unidos, este hongo es conocido con el privilegiado nombre de “Caviar mexicano”. Si bien es cierto, en otros países el huitlacoche es consumido por lo general en platillos gourmet, mientras que en el centro y sur de México es donde se consumen de forma regular en comidas como quesadillas, tacos, sopas, rellenos de tamales, crepas, salsas, bebidas y un sinnúmero de platillos ya que es muy versátil su preparación y combinación. (INTAGRI, 2017).

La popularidad de este hongo como alimento hoy en día, se ha dado debido a que posee un elevado valor nutricional, pues en distintas investigaciones realizadas se menciona que puede llegar a tener más del 8% de proteína, variando los resultados

según el tipo de maíz que se utilice para la producción de *U. maydis* (Pimentel *et. al.*, 2011).

Paredes (2001), menciona que “algunas razas y maíces son más susceptibles que otros”, sin embargo, indica que el mejor maíz para la producción de *U. maydis* es el maíz dulce, esto se debe a que es uno de los materiales genéticos de este cultivo con los valores nutricionales más altos.

La demanda del huitlacoche en el mercado ha llamado el interés de muchas personas e instituciones de investigación; su estudio ha avanzado de tal manera que los investigadores conocen perfectamente el ciclo biológico del hongo y la forma de desarrollarlo en un medio artificial, aun cuando hay muchas formas de propagar al hongo *U. maydis*, la forma más común de hacerlo es en un medio de cultivo sólido utilizando cajas Petri. Pero ahora, con todos estos conocimientos adquiridos se está llevando a cabo la producción comercial de huitlacoche en los estados del sur y centro de México, un ejemplo de ello es el Estado de Puebla, que junto con investigadores del Colegio de Posgraduados están manejando todo el ciclo de producción (Martínez 2017).

Barrero (2016) define un medio de cultivo como “aquel que contiene agua y una serie de nutrientes necesarios para el metabolismo”, además, dice que los medios de cultivo sólidos son los que tienen una proporción de agar, permitiendo que el crecimiento se desarrolle en la superficie del medio, provocando colonias aisladas y una mejor manipulación del microorganismo (Martínez., *et al.* 2000).

Lo que se pretende probar en esta investigación es el desarrollo de una nueva manera de incrementar el hongo *U. maydis* manteniendo su patogenicidad, favorecer la velocidad de reproducción y su conservación por un periodo prolongado a diferencia a que si se hiciera en medios de cultivos sólidos como comúnmente se realiza.

Los caldos nutritivos son también llamados caldos de cultivo y medios de cultivo líquidos; se les denomina “caldos” por la consistencia que tienen. Este medio se define como aquel que “no contiene algún agente gelificante”, y es adecuado para la manipulación del microorganismo (Quistián-García, 2014), el más comúnmente

usado es el que contiene agua de peptona, sin embargo, existen muchos más con los que se ha experimentado, pero no se ha tenido el mismo resultado que este (Méndez., *et al.* 2018).

Además, la técnica de inoculación y el inóculo a utilizar es de gran importancia puesto que los resultados cambian totalmente de acuerdo a lo que se utilice. Leal (1996) e Hidalgo (1995), mencionan que la inoculación por basidiosporas es mucho más efectiva que la inoculación por teliosporas. Así mismo en los resultados obtenidos por Leal (1996), se encontró que la aplicación endógena es la mejor, ya que obtuvo mayor proporción de plantas infectadas, mismas que se obtienen utilizando la inyección como forma de inoculación endógena, obteniendo hoy en día hasta un 95% de incidencia en las parcelas inoculadas.

Con base a lo anterior, en este trabajo se pretende probar nuevas formulaciones de caldos nutritivos e identificar cuál de ellos es el más beneficioso en la producción artificial de inóculo de *U. maydis* y obtener así un método más efectivo y rápido para el desarrollo del hongo. Además de evaluar la efectividad de los inóculos obtenidos inyectados en plántulas de cinco híbridos de maíz comúnmente utilizados para la producción de huitlacoche.

## 1.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer un medio artificial de multiplicación acelerada y potencializada para el aislamiento y conservación del hongo *Ustilago maydis* a fin de producir células infectivas y efectivas en un medio líquido como fuentes de inóculos para la aplicación masiva o comercial en campo.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Demostrar que el hongo *Ustilago maydis* puede completar su desarrollo en sustrato diferente a su hospedero.
- Evaluar y comparar la patogenicidad del hongo desarrollado en los diferentes caldos nutritivos.

### 1.3 HIPÓTESIS

Los caldos nutritivos son formulaciones a base de materiales como carbohidratos y minerales con el propósito de proveer un medio adecuado para el desarrollo de microorganismos, por tal razón, las formulaciones definidas para el desarrollo de *Ustilago maydis* propiciarán las condiciones adecuadas para un rápido crecimiento y alta patogenicidad.

### 3. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1 Antecedentes

Actualmente muchos de los estudios disponibles orientados a obtener producción artificial de huitlacoche, se encuentran a nivel del ensayo para obtener metodologías y encontrar la mejor técnica de inoculación sobre híbridos comerciales comunes, híbrido de maíz dulce y variedades de polinización abierta (Martínez *et al.*, 2000).

La enfermedad causada por *Ustilago maydis* (DC) Corda, es considerada en casi todo el mundo una plaga y generalmente se destruyen las plantas infectadas para evitar la contaminación de plantas sanas, sin embargo, en la parte sur y centro de México se considera un manjar e incluso inducen la enfermedad mediante la inoculación artificial tanto artesanal como comercialmente para su propagación (Lira, 2019).

Sin embargo, la inducción de forma artesanal como lo es mezclar la semilla del maíz con esporas del hongo no ha dado buenos resultados, es así, que uno de los mejores resultados para inocular este hongo es por inyección de esporas directamente en la planta del maíz (Quiroz, 2019).

Además, es común poder encontrar este alimento considerado como hortaliza, en los mercados del centro del país en mazorca, por kilo o desgranado, así mismo, se encuentra en alimentos ya preparados en los establecimientos de comida y en restaurantes de alta gastronomía de México, Estados Unidos y algunos países de Europa, como Francia es conocido con el nombre de “trufa mexicana” o “caviar azteca” con un precio mucho mayor de lo común. (Quiroz, 2019)

## 2.2 Importancia en la nutrición

El huitlacoche posee cantidades importantes de nutrientes como fibra dietaria, proteína, ácidos grasos, aminoácidos, vitaminas, minerales y ácidos fenólicos que pueden ser aportados a nuestra nutrición si es consumido (Aguayo *et al.*, 2016).

La demanda de los alimentos hoy en día, además de ser por su sabor, también lo es por tendencia, ya que en pleno siglo XXI se está consumiendo un mayor número de alimentos naturales que proporcionan niveles adecuados de nutrientes y así llevar una dieta equilibrada; el huitlacoche siendo una combinación única en el mundo del hongo comestible *U. maydis* y la semilla de maíz ha sido reconocido por diversas culturas, desde los tiempos prehispánicos hasta las de hoy en día establecidas principalmente en México y en varias partes del mundo por su increíble valor nutricional y como un alimento tradicional (Martínez, 2017).

## 2.3 Taxonomía

Reino: Fungi

División: Basidiomycota

Clase: Ustilaginomycetes

Orden: Ustilaginales

Familia: Ustilaginaceae

Género: *Ustilago*

Especie: *Ustilago maydis*

## 2.4 Signos y síntomas

El desarrollo de la enfermedad se ve favorecida por las altas temperaturas que van de 26°C-34°C y por las condiciones de sequía, además la incidencia es mayor en cultivos no resistentes que se desarrollan en condiciones con suelos sin drenaje, con altos niveles de nitrógeno y donde las plantas fueron dañadas con labores culturales (SINAVIMO, 2019)

El desarrollo de la enfermedad en general se caracteriza por clorosis, disminución del tamaño y formación de agallas en tallos, hojas, y mazorcas (González, 2016). Sin embargo los síntomas se pueden clasificar en dos formas de afectación, tanto en planta como en la mazorca:

- En la planta:

La infección por el hongo en plántula ocasiona pequeñas agallas en tallos y hojas, deteniendo el crecimiento ocasionando achaparramiento e incluso la muerte de la misma; en plantas adultas las infecciones se producen en tejidos jóvenes (Agrios, 2009).

Ruiz (2008) menciona además la acumulación de antocianinas, distorsiones e incluso presencia de agallas en los tejidos afectados.

- En la mazorca:

En los granos de la mazorca el tejido es remplazado por teliosporas cubiertas por una membrana blanco-verdosa, que al madurarse se oscurece y forma una masa polvorienta color café (González, 2016).

Así mismo, el número, tamaño y localización de las agallas varían según sea la severidad de la infección, sin embargo, las agallas pequeñas comúnmente se forman en la base de la mazorca y las agallas grandes se ubican en la parte superior de la ésta (Agrios, 2009).

## 2.5 Etapas de desarrollo

Según Agrios (2009) todas las enfermedades infecciosas se llevan a cabo en una serie de pasos en donde se desarrolla y se mantiene la enfermedad, a estos pasos se le denominan ciclo de la enfermedad, en este caso, también, se relaciona mucho con su ciclo de vida, en caso de *U. maydis* se compone de siete etapas:

### Inoculación

1. Las basidiosporas germinan sobre la superficie del hospedante y producen una hifa fina.

### Penetración

2. La hifa fina se introduce en las células epidérmicas directamente, después de un desarrollo inicial detienen su crecimiento en donde a veces mueren si no entra en contacto con una hifa haploide proveniente de otra basidiospora de apareamiento compatible.

### Establecimiento de la infección

3. Cuando ocurre una fusión entre dos hifas compatibles, ésta aumenta su tamaño, volviéndose dicariótica la cual se desarrolla de forma intracelular.

### Invasión

4. Las células que rodean a la hifa son estimuladas para que sufran hipertrofia e hiperplasia y comiencen a formarse las agallas, esto puede ocurrir antes de que invada los tejidos.

### Crecimiento

5. Las infecciones sistémicas rara vez suceden y si lo hacen en plantas jóvenes, por lo tanto, en los tejidos jóvenes es frecuente que tengan bastantes agallas, pero de tamaño diminuto que apenas se alcanzan a observar.

## Reproducción

6. El micelio en la agalla durante su formación y antes de la esporulación permanece intercelularmente, mientras que las células alargadas del maíz son invadidas por el micelio, lo que ocasiona que colapsen y mueran. La mayoría de las células dicarióticas posteriormente se transforman en teliosporas y durante el proceso parecen absorber el protoplasma de las demás células miceliales. Solo la membrana que cubre la agalla no es afectada, pero finalmente se rompe y libera las teliosporas iniciando nuevas infecciones, las cuales pueden producir nuevas agallas o repetir el ciclo de la enfermedad.

## Dispersión y supervivencia

7. El hongo inverna en forma de teliosporas en el suelo y en los restos de cultivos, donde se mantiene viable; durante el periodo de primavera-verano las teliosporas germinan llamándose ahora basidiosporas, las cuales se dispersan con ayuda del aire y la lluvia, llegan hasta los tejidos susceptibles (tejidos jóvenes o en crecimiento) de las plantas de maíz.

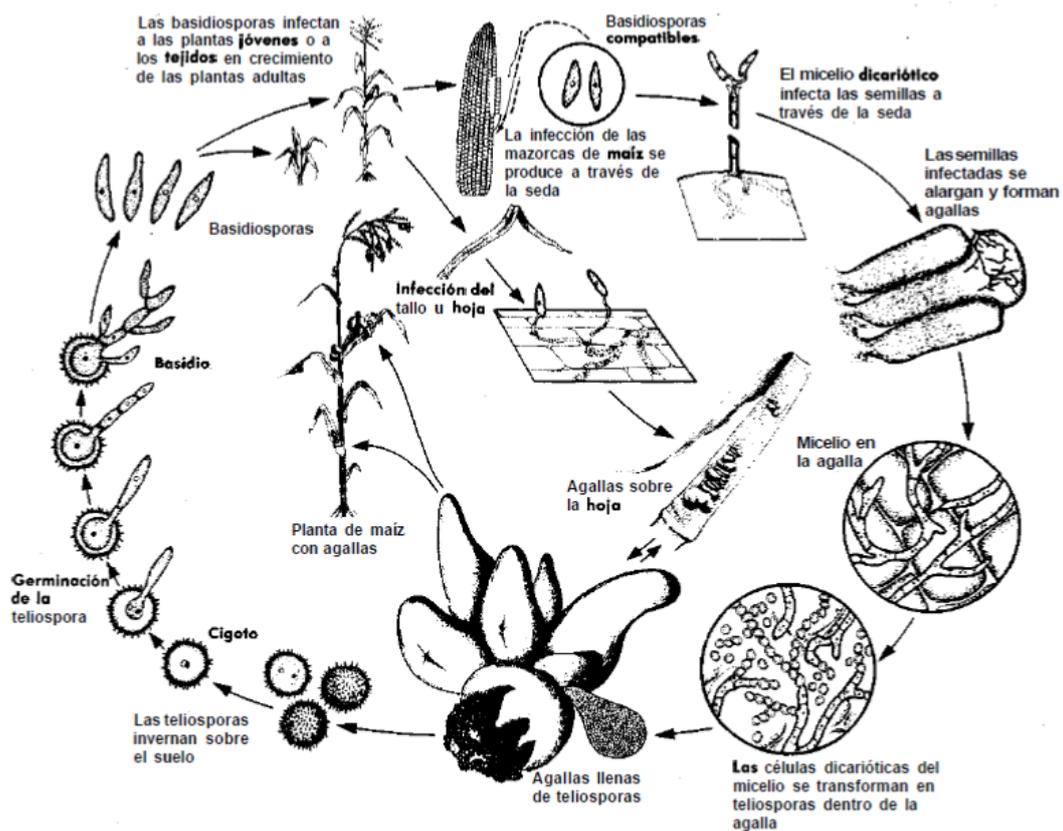


Figura 1. Ciclo biológico de *Ustilago maydis* (Agrios, 2009).

## 2.6 Medios de cultivo

Los medios de cultivo son mezclas de sustancias que se usan para el aislamiento de hongos, bacterias y otros microorganismos; la mayoría de los hongos fitopatógenos pueden ser cultivados en medios apropiados. Tales medios nutritivos deben de cumplir con ciertas condiciones para que el hongo se desarrolle adecuadamente como: contener elementos nutritivos, no debe deshidratarse fácilmente, debe esterilizarse, debe incubarse a temperaturas adecuadas (20-35°C), requieren pH ácidos (5-6) e Iluminación dependiendo el microorganismo a desarrollar. (Curvelo *et al.*, 2010).

Curvelo *et al.* (2010) clasifican los medios de cultivos por su composición en:

- Medios naturales: Son hechos de materiales completamente naturales como plantas, malta, levaduras, etc., se dice que estos son pocos usados, pero son superiores a los demás para desarrollar hongos de difícil esporulación.
- Medios semisintéticos: Como se dice en el nombre, son materiales naturales mezclados con sintéticos, como lo es (PDA), Agar V8, Agar de Harina de maíz, entre otros. (son de los más usados).
- Medios sintéticos: Son los que se conoce perfectamente su composición, por ejemplo "AGAR KLEMMER Y LENNY" que se compone de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  680.0 mg,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.07 mg,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  250.0 mg,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.05 mg,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.08 mg,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.07 mg,  $\text{CaCl}_2$  50.0 mg,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4.4 mg,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0 mg,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.34 mg, L-asparagina 708.0 mg, Tiamina HCl 100.0 mg, Glucosa 15.0 mg Agar 15.0 g y Agua 1 L. (Curvelo, 2010)

Además, los medios nutritivos anteriores pueden ser preparados de tres formas diferentes, variando solo en su consistencia:

- Sólidos: son los que contienen agentes solidificantes, como Agar en una concentración del 1-3%.
- Semilíquidos: Estos se obtienen bajando solo la concentración de Agar.
- Líquidos: Se preparan sin agentes solidificantes, los cuales son usados para conseguir altas concentraciones de esporas.

Cañedo *et al.* (2004) menciona que el medio de cultivo PDA funciona para aislar todo tipo de hongos (a excepción de patógenos obligados) incluyendo los hongos de plantas u hongos saprofitos resaltando que crecen bien y esporulan sin problemas.

En diferentes tipos de investigaciones realizadas con hongos los autores emplean como uno de los métodos de aislamiento estándar el uso de medios generales como el PDA, el cual contiene una fuente de nutrientes sintética y es de los mayormente probados (Ruíz, 2008, Curvelo *et al.*, 2010, González, 2016).

## 2.7 Aislamiento del hongo

El aislamiento puede realizarse desde el material infectado o mediante la siembra de signos; para el aislamiento de hongos existen medios de cultivos generales (Papa Dextrosa Agar y Agar Agar), no obstante, la mayoría de las enfermedades pueden diagnosticarse mediante observaciones a simple vista; pero también hay ocasiones en donde se tienen que observar con equipo más especializado como microscopios (Delgado, 2014).

## 2.8 Preparación de un medio de cultivo

Para la preparación de medio de cultivo PDA (semisintético) según Cañedo *et al.* (2004) se utiliza la siguiente formulación:

### Materiales

- Papa sin pelar 200 g
- Dextrosa 10 g
- Agar 18 g
- Agua destilada un litro

### Procedimiento:

“Lavar las papas, cortarlas y hacerlas hervir en un litro de agua destilada por 20 minutos, colar y disolver en el líquido la dextrosa y el agar. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión”.

Y para la preparación de medio de cultivo PDA (sintético) según el manual de “Laboratorio de biología de hongos” Ortega *et al.* (2017) lo prepara de la siguiente manera:

## Materiales.

- PDA 7.8 g (existen ya varias marcas que lo distribuyen, en este caso es la marca BD®).
- Agua 200 ml.

## Procedimiento.

Pesar 7.8 g del PDA marca BD® y disolver en 200 mL de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 libras de presión, durante 15 min. Posteriormente, vaciar 20-25 mL del medio PDA en placas de Petri de 10 cm x 10 cm. Esperar a que solidifique el medio. Sellar las placas. Almacenar a 4°C.

## 2.9 Efectividad de la inoculación

Para el caso de *U.maydis* la forma de aplicación del inóculo independientemente sea cual sea el modo de producción Leal (1996) señala que la aplicación endógena es mucho mayor que la aplicación exógena, más sin embargo de forma natural la infección por basidiosporas no puede ser posible, lo es solo mediante la inoculación artificial.

No obstante, Leal (1996) e Hidalgo (1995) demostraron que la inoculación utilizando basidiosporas como fuente de infección, se llegan a obtener mejores resultados de incidencia de los que se obtuvieran utilizando teliosporas.

Sin embargo, estos resultados se atribuyen a la aplicación de basidiosporas como fuente de inóculo ya que agiliza el proceso, y las basidiosporas pueden germinar e iniciar la invasión del tejido inmediatamente, dando lugar a mayores probabilidades de infección, sin embargo al utilizar teliosporas estas tienen que pasar por un proceso de germinación, meiosis, producción de basidiosporas, germinar de nuevo e iniciar la invasión, además este proceso puede ser afectado por las condiciones ambientales en cualquier momento, adicionalmente utilizando las basidiosporas se previenen contaminaciones por otros patógenos. (Leal, 1996)

(Leal, 1996) comparó los resultados obtenidos sobre el número de aplicaciones de basidiosporas, en el cual no se obtuvieron diferencias significativas, sin embargo el aplicar dos veces el inoculo en lugar de una dio una diferencia estadística de 4.79 veces mayor que si solo se aplicara una vez. Sin embargo, si se usaran teliosporas en su lugar no habría suficiente tiempo para que pudieran desarrollarse y causar una infección, las mazorcas ya estarían lo suficientemente maduras.

Estudios previos mencionan que el tipo de maíz tiene influencia sobre la incidencia y severidad de las infecciones por *U. maydis*, siendo las variedades e híbridos de maíz dulce, las que más afecta y que mejor genera huitlacoche, además de desarrollarlo con mejor calidad nutricional. (Paredes, 2001, Ruíz, 2008)

# 1. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación forma parte del Proyecto de Desarrollo, registrado en las Subdirección de Difusión Científica y Tecnológica, de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, titulado: “*Susceptibilidad y producción de huitlacoche por inoculación artificial*”, el cual, estudia a *U. maydis* como una alternativa de producción en la zona norte del país, por tal motivo se buscan diferentes formas de reproducción de cepas, de forma exponencial y manteniendo el inóculo para la aplicación y producción en invernadero y campo.

## 3.1 Localización del experimento

La investigación se realizó dentro de las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo Coahuila. La UAAAN está situada en la colonia Buenavista, municipio de Saltillo, Coahuila; se localiza en la carretera Calzada Antonio Narro y a un costado de la carretera Saltillo-Zacatecas, con coordenadas geográficas N 25°21'13.1436" W 101°1'51.1392, a una altura de 1770 msnm, aproximadamente.

## 3.2 Diseño experimental

El diseño experimental fue establecido bajo condiciones de invernadero, con temperatura, humedad y luz controladas, mientras que las condiciones del suelo fueron homogenizadas por el uso de sustrato estéril. Se empleó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 5x5 con tres repeticiones; los factores fueron: cinco Caldos nutritivos (en los cuales se incrementaron las estructuras infectivas de una cepa local de *U. maydis*) y se probaron cinco Híbridos de maíz (los materiales genéticos fueron tomados al azar, según la disponibilidad de semilla que se tenía en almacén), además se consideró la interacción de estos dos factores,

dando como resultado 25 interacciones establecidas en el diseño experimental, constando que la unidad experimental consistió de un vaso con dos plantas, dando un total de 75 unidades. El estudio se realizó en dos fases, una de laboratorio y otra de campo, las cuales se describen en los siguientes apartados.

### 3.3 Fase de laboratorio.

Consistió en el aislamiento de las cepas del hongo, preparar las formulaciones de los caldos nutritivos, inocularlos con la cepa del hongo *U. maydis* y mantenerlos bajo condiciones controladas, así como de realizar el conteo de basidiosporas y posteriormente hacer la dilución de los caldos a la concentración infectiva de  $10^6$  basidiosporas·mL<sup>-1</sup>, también incluyó la desinfección del sustrato, que se empleó en la segunda fase de campo. Las actividades de esta etapa se realizaron en los laboratorios de Parasitología (Laboratorio de Fitopatología de Postgrado) los cuales se encuentran dentro de la UAAAN.

#### 3.3.1 Obtención de la cepa del hongo

Las agallas de *U. maydis*, provenientes de los campos de la UAAAN fueron desinfectadas en hipoclorito de sodio al 6% por 3 minutos y enjuagadas en agua destilada estéril. Posteriormente se dejaron secar en papel estéril durante 20 min encampana de flujo laminar. Con un asa bacteriológica desinfectada se tomaron teliosporas y se colocaron en placas de PDA con gentamicina de uso veterinario (Gentomicyn Super® de 100 mg), como antibiótico a una concentración de 1.0 mL·L<sup>-1</sup>. Se incubaron durante cinco días a una temperatura de 25 a 28°C.

### 3.3.2 Formulación de los caldos nutritivos

Se elaboraron cinco Caldos nutritivos: Caldo Nutritivo Comercial (CN, el cual fungió como testigo), Caldo de Avena (CAV), Caldo de Papa (PDB), Caldo de Malta y Levadura (CML) y Caldo de Lactosa y Peptona (CLP) (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Formulaciones nutritivas de caldos para el desarrollo exponencial de esporas y micelio infectivo de *Ustilago maydis*.

Tratamientos Caldos nutritivos		Nutriente	Peso g·L <sup>-1</sup>
1	Caldo Nutritivo Comercial	Almidón de papa	4
		Dextrosa	20
		Agar	15
2	Caldo de Papa (PDB)	Papa pelada y cortada	200
		Dextrosa	10
3	Caldo de Avena (CAV)	Avena molida	30
		Dextrosa	10
4	Caldo Malta-Levadura (CML)	Extracto de malta	30
		Extracto de levadura	2
		Fosfato de Potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.5
		Sulfato de Magnesio (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.5
5	Caldo Levadura y Peptona (CLP)	Extracto de levadura	2
		Peptona de Carne	23
		Cloruro de sodio	5
		Dextrosa	10

Se llevaron a cabo ensayos para establecer cuatro diferentes formulaciones nutritivas de caldos, seleccionando nutrientes comúnmente sintetizados por los microorganismos aislados de forma tradicional. Estableciendo los componentes y concentraciones con mejor desarrollo de *U. maydis* en condiciones de laboratorio. Agregando a este ensayo caldos de nueva formulación, como un caldo de papa suplementado y comúnmente usado para la multiplicación de microorganismos.

Los Caldos nutritivos fueron formulados y esterilizados en autoclave a 121°C durante 20 min. Una vez estériles y templados a temperatura ambiente, fue agregado antibiótico Gentamicin Super ® (Gentamicina 100 mg·mL<sup>-1</sup>), bajo condiciones asépticas en campana de flujo laminar. Cada caldo fue inoculados con cinco bocados de 0.5 cm de la cepa de *U. maydis* con 7 a 14 días de desarrollo en caja

Petri en medio de cultivo al 1% de antibiótico. Los matraces con caldos inoculados fueron incubados a temperatura ambiente y en movimiento en VWR Shaker® modelo 3500, a 140 rpm durante 120 horas.

### 3.3.3 Conteo de basidiosporas

Los conteos de las basidiosporas se realizaron sin diluir y con ayuda de la cámara de Neubauer y un microscopio, anotando los resultados en hojas con apartados especiales.

Los conteos de las basidiosporas se realizaron directamente de los caldos desarrollados después de 120 h; por lo que de cada caldo se tomaron tres alícuotas de 2000  $\mu\text{L}$  y se colocaron en tubos Eppendorf y con ayuda de la cámara de Neubauer se colocaron de 500 a 1000  $\mu\text{L}$  del caldo en los surcos laterales de la cámara hasta cubrir todo el porta objetos. Bajo microscopio óptico, se colocó la cámara de Neubauer y se montó la muestra. Se enfocó inicialmente desde el objetivo 4X, para ubicar los cuadrantes con los que cuenta esta cámara, hasta colocarse en el cuadrante central y de acuerdo al tamaño de las celular, enfocar e iniciar el conteo de cinco cuadrantes por muestra y tres repeticiones por caldo.

La cuadrícula de recuento está formada por nueve cuadrados grandes, cada uno de ellos con una superficie de 1.0  $\text{mm}^2$ .

El cuadrado grande central (que se puede ver en su totalidad con el objetivo 10X; ver Figura 2), está dividido en 25 cuadrados medianos (con el objetivo 40X se pueden ver los cuadrados medianos completamente; ver Figura 2), cada uno de ellos con 16 cuadrados pequeños en su interior. Los cuatro cuadrados grandes de las esquinas (no se muestran en la Figura 2), están formados por 16 cuadrados medianos.

El recuento se puede realizar tanto en el cuadrado grande central como en los de las esquinas, dependiendo del tamaño de las células en estudio. En este ejemplo realizaremos el recuento en el cuadrado central.

Cuando colocamos la muestra bajo el cubreobjetos, la suspensión celular alcanza una altura de 0,1 mm. Teniendo estos datos en cuenta, y si consideramos uno de los cuadrados grandes, el volumen contenido en éste será de:

$$1 \times 1 \times 0,1 = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ mL}$$

Con el objetivo 10X del microscopio hay que localizar la zona de recuento (uno de los cuadrados grandes). Para contar las células se cambia al objetivo 40X. Se cuentan las células contenidas en todos los cuadrados medianos (25 si hemos elegido como zona de recuento el cuadrado grande central o 16 si hemos elegido una de las esquinas) de acuerdo con el siguiente criterio:

Hay que contar todas las células que están dentro de cada cuadrado mediano y aquellas que están tocando los lados superior y derecho de dicho cuadrado (aunque estén parcialmente fuera). Siguiendo este criterio, en la figura se contarían las células en color verde, y no se contarían las células en color rojo.

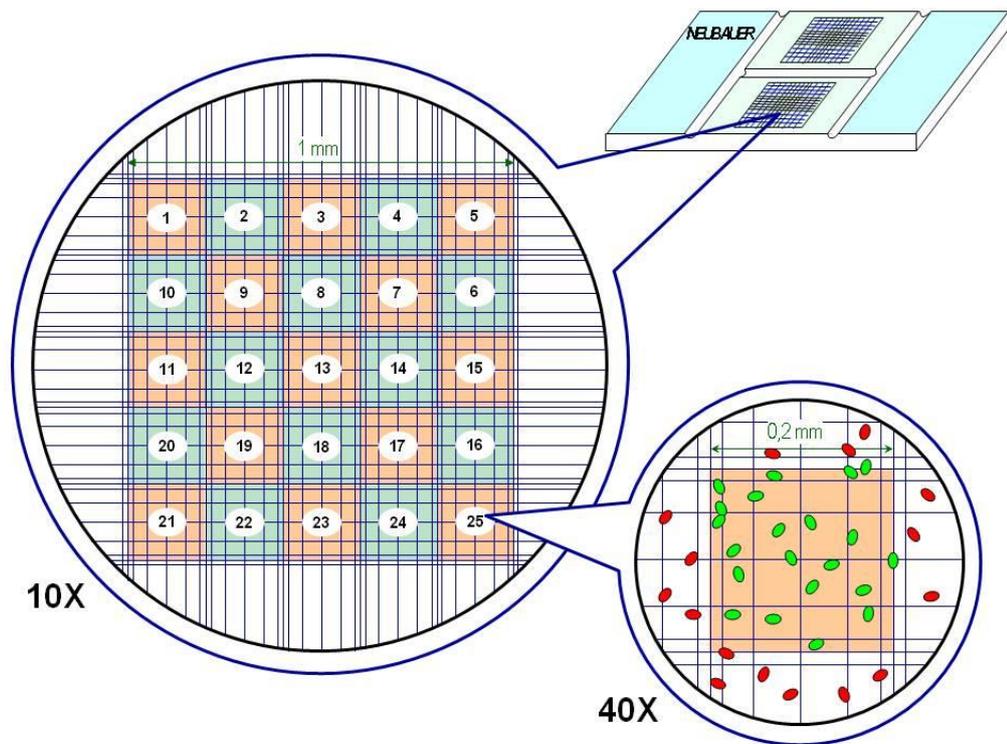
Si hemos contabilizado N células en uno de los cuadrados grandes (o sea, en 25 cuadrados medianos), la concentración de nuestra muestra será:

$$N \times 10^4 \text{ cel/mL}$$

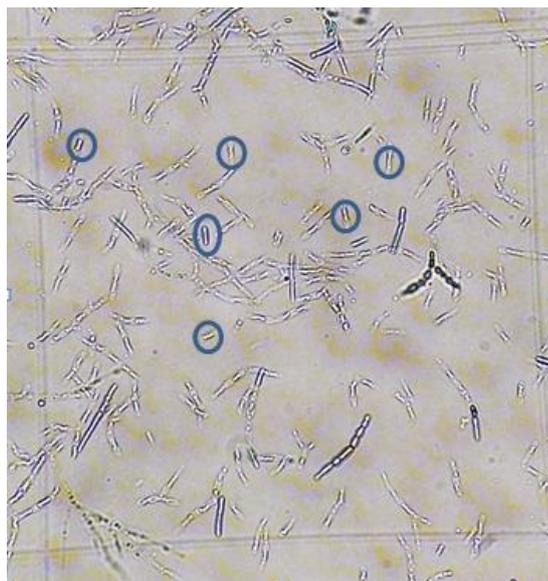
Si para hacer el recuento hemos tenido que concentrar o diluir la muestra inicial, hemos de tener en cuenta este factor de concentración-dilución (f):

$$N \times 10^4 \times f \text{ cel/mL}$$

suspensión celular inicial = suspensión celular diluida x factor de concentración-dilución.



**Figura 2.** Cámara de Neubauer, cuadrículas de conteo utilizadas en los conteos de las estructuras infectivas de *U. maydis*, para establecer la concentración de los caldos a las 120 h, de incubación.



**Figura 3.** Fotografía de un cuadrante de la cámara de Neubauer, donde se resaltan en un círculo algunas de las basidiosporas del caldo CLP consideradas en el conteo.

### 3.3.4 Dilución de los Caldos nutritivos

Para la dilución de los Caldos nutritivos a una misma concentración se procedió a tomar solo una repetición de cada uno de los caldos (CAV, CLP, PDB, CML y CN) conservando las repeticiones a 4°C y bajo condiciones asépticas, la concentración establecida fue de un millón de basidiosporas ( $1 \times 10^6$ )·mL<sup>-1</sup> de agua destilada. Los datos obtenidos del conteo se usaron para los cálculos. La fórmula empleada fue la siguiente:

$$C_1V_1=C_2V_2$$
$$V_1= \frac{C_2V_2}{C_1}$$

Una vez preparados los caldos a la concentración de un millón de esporas, se guardaron en refrigeración, esto con el fin de parar el desarrollo del hongo y mantener a concentración deseada.

### 3.3.5 Desinfección del sustrato

También en el laboratorio y con ayuda del autoclave, se realizó la desinfección del sustrato, con la finalidad de asegurar que la semilla y posteriormente la plántula de maíz no fuese infectada por patógenos externos a la investigación. El procedimiento fue llenar bolsas de plástico transparentes (con suficiente resistencia a temperaturas altas, polipapel) con 2.0 Kg de sustrato aproximadamente. Las bolsas con el sustrato se colocaron dentro de una autoclave y se esterilizaron durante 30 min a una temperatura de 121°C.

## 3.4 Fase de campo

A continuación, se presenta el procedimiento que se llevó en la fase de campo.

#### 3.4.1 Ubicación del invernadero

La fase de campo se desarrolló en el invernadero No. 2 perteneciente al Departamento de Fisiología Vegetal, de la UAAAN.

#### 3.4.2 Preparación de los contenedores y siembra

Una vez esterilizada la cantidad suficiente de sustrato a utilizar, fueron preparadas las unidades experimentales, colocando el sustrato estéril y humedecido en los vasos de unicel #14, posteriormente se sembraron dos semillas por vaso o contenedor y se regó para alcanzar la humedad adecuada. Una vez que se dio la emergencia y después de la aplicación de los tratamientos correspondientes se manejó el cultivo adecuadamente, para el buen desarrollo de las plantas y la mejor expresión de la enfermedad, el cual consistió en riegos una vez por día, la fertilización fue mediante solución nutritiva, la temperatura fue homogénea, debido a que se estableció el experimento en invernadero se sembraron por tanto dos semillas por vaso en total 15 vasos de cada uno de los cinco Híbridos de maíz (Sorento, Antílope, Aquiles, Berrendo y A-7573, el cual fungió como testigo).

#### 3.4.3 Inoculación

La inoculación se hizo cuando las plantas tenían 15 días de edad después de la emergencia. Se utilizaron para este procedimiento, las diluciones de los caldos nutritivos que se prepararon en la etapa de laboratorio, se llevaron al área del invernadero; y con ayuda de jeringas hipodérmicas se comenzó a inyectar 1.0 mL de cada solución respetando las plantas de cada tratamiento y unidad experimental, según correspondiera y se utilizó una jeringa para cada caldo nutritivo.

La inyección fue en diagonal de acuerdo al tallo de la plántula, tratando de que la punta de la aguja de la jeringa no atravesara el tallo y llegara al centro de la misma. Todas las plantas de todos los tratamientos fueron inoculadas el mismo día para evitar variaciones en los síntomas.

#### 3.4.4 Factores a evaluar

Los factores que se evaluaron durante el desarrollo del experimento fueron:

- a) Incidencia se midió en función a los síntomas visibles y externos del hongo apreciados en las plántulas, por tanto se contaron las plantas totales y las plantas que manifestaban síntomas, como: manchas y líneas cloróticas, y malformaciones en los márgenes de las láminas foliares. Para determinar la incidencia de *U. maydis* se dividió el número de plántulas con síntomas del patógeno entre el número de plantas totales y se multiplico por 100. Además, se contabilizó el número de plantas enfermas y plantas sanas
- b) Severidad del hongo fue calificada con una escala de 1 a 5, las cuales se describen a continuación:
  - (1) Plantas sanas.
  - (2) Plántulas con síntomas de clorosis o baja presencia de antocianinas en la lámina de las hojas verdaderas uno o dos.
  - (3) Manchas cloróticas y producción de antocianinas en la lámina de al menos dos hojas verdaderas.
  - (4) Clorosis en láminas foliares y deformaciones iniciales en tallo y en las hojas número tres y cuatro.
  - (5) Deformaciones severas o protuberancias menores, en tallos, aurículas y láminas de las hojas tres y cuatro.

#### 3.4.5 Toma de datos

La toma de datos se llevó a cabo a los 12 y 18 días después de la inoculación (ddi), para la variable incidencia del hongo; mientras que para la severidad se consideró a

los 12, 18, 24 y 30 ddi, manteniendo siempre seis días entre toma de datos, posteriormente los datos fueron pasados a Excel 2016 para un mejor y más exacto manejo de ellos a la hora de analizarlos.

Los datos de incidencia y severidad de cada planta fueron registrados junto con la información del híbrido, el caldo inoculado y la fecha en que fue tomada, además que se tomaron algunas fotos para llevar un correcto control.

Para analizar los datos obtenidos se usó el programa SAS versión 9.0, y se obtuvo un análisis de varianza y las pruebas de medias para de los caldos nutritivos e híbridos de maíz usados.

#### 3.4.6 Modelo estadístico

El experimento se estableció bajo un diseño completos al azar, con un arreglo factorial, el cual corresponde al siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + r_k + \epsilon_{ijk}$$

$Y_{ijk}$  = Valor de la  $i$ -ésima respuesta de la infección del hongo *U. maydis*

$\mu$  = Media general

$\alpha_i$  = Caldos nutritivos

$\beta_j$  = Híbridos de maíz

$\alpha\beta_{ij}$  = Interacción entre caldos e híbridos

$r_k$  = Repeticiones

$\epsilon_{ijk}$  = Error experimental

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Desarrollo del hongo en los caldos nutritivos

Los resultados obtenidos en cuanto a la concentración de basidiosporas de *U. maydis* después de 10 días de incubación y agitación constante en cada uno de los Caldos nutritivos mostró importantes diferencias, siendo los caldos PDB y CAV los que produjeron una mayor concentración (25 678 000 y 19 310 000 basidiosporas·mL<sup>-1</sup>, respectivamente) (Cuadro 2). El caldo CLP presentó la concentración más baja con 1 224 000 basidiosporas·mL<sup>-1</sup>. Estos resultados indican que todos los caldos proveyeron las condiciones apropiadas para el desarrollo y reproducción del hongo *U. maydis*, sin embargo, los caldos nutritivos más apropiados para este fin, por la cantidad de esporas reproducidas fueron PDB y CAV.

**Cuadro 2.** Tabla de concentración de basidiosporas evaluados en caldos nutritivos, para generar estructuras infectivas de *U. maydis* como inóculo.

Caldos nutritivos	Concentración de basidiosporas inicial	mL para obtener una concentración de 1x10 <sup>6</sup>	mL de agua para aforar a 100 mL
CN	9 260 000	10.799	89.201
PDB	25 678 000	3.894	96.106
CAV	19 310 000	5.178	94.822
CML	7 132 000	14.021	85.979
CLP	1 224 000	81.699	18.301

CN= Caldo Nutritivo, PDB= Caldo de Papa, CAV= Caldo de Avena, CML= Caldo de Malta y Levadura y CLP= Caldo de Lactosa y Peptona

### 4.2. Incidencia y severidad de *U. maydis*

Después los 15 días de la emergencia de las plántulas se realizó la inoculación planta por planta y se mantuvo el monitoreo a diario con la finalidad de detectar síntomas en las plántulas, y antes de la fecha programada para la primera toma de datos (12 ddi) se comenzaron a observar algunos síntomas relacionados a la presencia del patógeno en las plantas. Pineda *et al.* (2005) indican que la evaluación de la incidencia y severidad de la enfermedad de *U. maydis* en plántulas se debe evaluar a los 15 días de edad, después de la emergencia, debido a que la plántula

tiene el tamaño adecuado para poder apreciar el desarrollo de síntomas en la misma.

Galicia (2014) menciona que los síntomas de la infección de *U. maydis*, por inoculación artificial en plántulas de maíz puede apreciarse una vez que la severidad se comienza a observar, este autor clasificó la severidad en escalas o grados del 1-5, al inicio la severidad (siendo 1) la planta se considera sana, enseguida en la severidad 2, las plántulas tienen síntomas de clorosis o baja presencia de antocianinas en la lámina de una o dos hojas; en la severidad 3, existen manchas cloróticas y producción de antocianinas, en la lámina de al menos dos hojas; en la severidad 4, aparece una clorosis en láminas foliares y hay deformidades iniciales en tallo y en las hojas tres y cuatro y por último la severidad grado 5, hay deformidades severas o protuberancias menores en tallos, aurícula y lamina de las hojas tres y cuatro.

#### 4.2.1. Incidencia de *U. maydis* presentada en plántulas de maíz

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza de la primera evaluación de incidencia del hongo sobre las plántulas de maíz (12 ddi), mostraron diferencias altamente significativas ( $\alpha \leq 0.01$ ) para los Híbridos de maíz y la interacción entre los Híbridos y los Caldos nutritivos; mientras que para el factor de Caldos nutritivos, analizados en forma independiente, no presentaron diferencias significativas. Estos resultados indican que los maíces presentan diferente grado de susceptibilidad al hongo y que al menos una combinación entre los caldos nutritivos y los maíces está generando una respuesta más rápida al efecto de las esporas infectivas (Cuadro 3).

#### 4.3 Evaluación de la incidencia del hongo *U. maydis*, en las plántulas de los híbridos de maíz.

Posteriormente se presentan los resultados y datos obtenidos del presente experimento, dando una explicación lógica y exacta de estos para su correcta interpretación.

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza de la primera evaluación de incidencia del hongo sobre las plántulas de maíz (12 ddi), muestran diferencias altamente significativas para el factor “b” (Híbridos de maíz y la interacción de factores axb), mientras que para el factor “a” (Caldos nutritivos) no hubo diferencias significativas. Estos resultados indican que los maíces presentan diferente grado de susceptibilidad al hongo y que al menos una combinación entre los caldos nutritivos y los maíces está generando una respuesta más rápida.

Con respecto a los resultados anteriores, García *et al.* (2015) mencionan que la importancia de conocer la incidencia de una enfermedad se basa en que esa variable provee una estimación de la cantidad de plantas infectadas en un área determinada, misma que se considera al evaluar los síntomas y signos característicos de una enfermedad. Por otro lado, INTAGRI (2017) menciona que la interacción entre la variedad (en este caso los híbridos utilizados) y el ambiente en el que se desarrolle el hongo son factores importantes para que éste pueda manifestarse. En este sentido, las condiciones en las que se desarrolló el experimento fueron estables debido a que se estableció dentro de un invernadero, sin embargo, no se consideró el monitoreo de la temperatura durante toda la investigación.

**Cuadro 3.** Análisis de varianza (ANOVA) de la incidencia del hongo en las plántulas de los híbridos, a los 12 ddi con el hongo *U.maydis*.

FV	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	24	3.34909910	0.13954580	2.51	0.0005**
faca	4	0.23875427	0.05968857	1.07	0.3722 <sup>NS</sup>
facb	4	0.80354570	0.20088642	3.62	0.0080**
INTER	16	2.30679913	0.14417495	2.60	0.0016**
Error	123	6.83333333	0.05555556		

faca= caldos nutritivos, facb= híbridos e INTER= interacción entre caldos nutritivos e híbridos.

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza de la segunda evaluación de incidencia del hongo sobre las plántulas de maíz (18 ddi), mostraron diferencias significativas ( $\alpha \leq 0.05$ ) para el factor Híbridos de maíz, mientras que para el factor Caldos nutritivos y la interacción no hubo diferencias significativas (Cuadro 3). Estos

resultados indican que los maíces presentaron una respuesta diferente a la inoculación del hongo. Esta respuesta es independiente del tipo de inoculo y/o cepa inyectada.

**Cuadro 4.** ANOVA de la incidencia del hongo en las plántulas de los híbridos a los 18 ddi con el hongo *U.maydis*.

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>F-Valor</b>	<b>Pr &gt; F</b>
Modelo	24	1.30090090	0.05420420	1.06	0.3944 <sup>NS</sup>
faca	4	0.03998136	0.00999534	0.20	0.9400 <sup>NS</sup>
facb	4	0.59268513	0.14817128	2.91	0.0244*
INTER	16	0.66823441	0.04176465	0.82	0.6612 <sup>NS</sup>
Error	123	6.26666667	0.05094851		

faca= caldos nutritivos, facb= híbridos e INTER= interacción entre caldos nutritivos e híbridos.

#### 4.4 Evaluación de la severidad del hongo *U.maydis*, en las plántulas de los híbridos de maíz.

La severidad de una enfermedad es el porcentaje de daño del total de la planta, además es un parámetro que refleja con precisión la relación de la enfermedad con el daño provocado (Lavilla *et al.*, 2016).

Sin embargo, los resultados obtenidos en el análisis de varianza de la primera evaluación de severidad del hongo sobre las plántulas de maíz (12 ddi)(Cuadro 5), muestran diferencias significativas para el factor “a” (Caldos nutritivos) y el factor “b” (híbridos de maíz), pero obteniendo diferencias no significativas para la interacción, estos resultados representan que al menos uno de los caldos y uno de los híbridos se está comportando de una manera distinta, ya que no está repercutiendo en la interacción de éstas combinaciones.

**Cuadro 5.** ANOVA de la severidad de la infección en las plántulas de los híbridos a los 12 ddi del hongo *U.maydis*.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	24	32.2824324	1.3451014	2.02	0.0069**
faca	4	8.29622554	2.07405638	3.11	0.0176*
facb	4	7.65164117	1.91291029	2.87	0.0257*
INTER	16	16.33456573	1.02091036	1.53	0.0984 <sup>NS</sup>
Error	123	81.9000000	0.6658537		

faca= caldos nutritivos, facb= híbridos e INTER= interacción entre los caldos nutritivos y los híbridos.

Independientemente con ésta primera evaluación no se puede decidir si la hipótesis planteada en este experimento se acepta o se rechaza.

Arenas (1998) al experimentar con *Phytophthora cinnamomi* evaluando los tiempos después de la exposición del hongo, se encontró que mientras más se estaba el hongo en contacto con la planta, mayor son los síntomas de incidencia y severidad en la planta, este mismo autor, también inoculó plantas con distintas edades, en donde las más afectadas fueron las que tenían menor edad.

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza de la segunda evaluación de severidad del hongo sobre las plántulas de maíz (18 ddi), no mostraron diferencias significativas, tanto los Caldos nutritivos como la interacción. Pero para el caso del factor Híbridos de maíz, sí hubo diferencias significativas ( $\alpha \leq 0.05$ ). Estos resultados representan, que al menos uno de los híbridos se está comportando de una manera distinta con la característica de susceptibilidad, ya que sigue siendo el único factor que muestra diferencias.

**Cuadro 6.** ANOVA de la severidad de la infección de las plántulas de los híbridos a los 18 días después de la inoculación con el hongo *U. maydis*.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
faca	4	2.20240758	0.55060189	0.80	0.5303 <sup>NS</sup>
facb	4	7.66070012	1.91517503	2.77	0.0304*
INTER	16	17.94274816	1.12142176	1.62	0.0730 <sup>NS</sup>
Error	123	85.1333333	0.6921409		

faca= caldos nutritivos, facb= Híbridos e INTER= interacción entre caldos nutritivos e híbridos.

Así mismo, los resultados obtenidos en el análisis de varianza de la tercera evaluación de severidad del hongo sobre las plántulas de maíz (24 ddi) (Cuadro 7), no muestran diferencias significativas para el factor “a” (Caldos nutritivos), mientras que ahora las diferencias fueron altamente significativas para el factor “b” (híbridos de maíz) y significativas para la interacción.

**Cuadro 7.** ANOVA de la severidad de la infección de las plántulas de los híbridos a los 24 ddi con el hongo *U. maydis*.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
fac a	4	0.76961108	0.19240277	0.93	0.4497 <sup>NS</sup>
fac b	4	2.97982890	0.74495722	3.60	0.0083 <sup>**</sup>
INTER	16	6.42361938	0.40147621	1.94	0.0229 <sup>*</sup>
Error	121	25.06666667	0.20716253		

fac a= caldos nutritivos, fac b= híbridos e INTER= interacción entre caldos nutritivos e híbridos.

En comparación con los datos de severidad anteriores, se dio a entender que en la tercera toma de datos de severidad la susceptibilidad de los maíces seguía siendo distinta aún después de la infección.

Además, los resultados obtenidos en el análisis de varianza de la cuarta y última evaluación de severidad del hongo sobre las plántulas de maíz (30 ddi) (Cuadro 8), no muestran diferencias significativas para el factor “a” (Caldos nutritivos) y mientras que se mantienen los resultados anteriores siendo para el factor “b” (híbridos de maíz) diferencias altamente significativas y significativas para la interacción, estos resultados representan los híbridos se están comportando de una manera distinta durante el desarrollo de la infección, incidiendo estos resultados directamente en la interacción.

**Cuadro 8.** ANOVA de la severidad de la infección en las plántulas de los híbridos a los 30 días después de la infección con el hongo *U. maydis*.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	24	13.55159817	0.56464992	3.48	<.0001 <sup>**</sup>
fac a	4	0.67803496	0.16950874	1.04	0.3871 <sup>NS</sup>
fac b	4	7.68546798	1.92136700	11.84	<.0001 <sup>**</sup>
INTER	16	5.18809524	0.32425595	2.00	0.0182 <sup>*</sup>
Error	121	19.63333333	0.16225895		

fac a= caldos nutritivos, fac b= híbridos e INTER= interacción entre los caldos nutritivos e híbridos.

#### 4.5 Prueba de medias de Tukey al 95%.

Después de concluir las evaluaciones de incidencia (dos evaluaciones) y severidad (cuatro evaluaciones), se realizó un análisis de comparación de medias de Tukey ( $P \geq 0.05$ ), dicho análisis identificó diferencias estadísticas entre los maíces utilizados en las dos evaluaciones, en tanto que para los caldos nutritivos no mostro diferencias. En cuanto a las variables de severidad, el análisis de comparación de medias mostró diferencias claras para el factor “b” (híbridos de maíz) en las cuatro evaluaciones, mientras que para el factor caldos nutritivos las diferencias únicamente se presentaron en la primera evaluación de severidad (SEV1) (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Prueba de medias de Tukey al 95%, aplicado a todos los caldos nutritivos e híbridos de maíz, tomando en cuenta la incidencia y la severidad del hongo *U.maydis*.

VARIABLE	INC1	INC2	SEV1	SEV2	SEV3	SEV4
CN	1.033 a	1.066a	2.466ab	2.633a	3.172a	3.413a
CML	1.100 a	1.033a	2.633ab	2.466a	3.233a	3.300a
PDB	1.137 a	1.068 <sup>a</sup>	2.172b	2.344a	3.241a	3.275a
CLP	1.068 a	1.034 <sup>a</sup>	2.862a	2.344a	3.069a	3.310a
CAV	1.033a	1.066 <sup>a</sup>	2.733ab	2.600a	3.275a	3.448a
Sorento	1.103 ab	1.034ab	2.586ab	2.827a	3.310a	3.724a
Antilope	1.206 a	1.172 <sup>a</sup>	2.137b	2.172b	3.103ab	3.103c
Aquiles	1.033 b	1.066 ab	2.666ab	2.300ab	2.965b	3.137c
A-7573	1.000 b	1.000b	2.833a	2.600ab	3.275ab	3.482ab
Berrendo	1.033b	1.000b	2.633ab	2.500ab	3.333a	3.300bc

CN= Caldo Nutritivo, CML= Caldo de Malta y Lactosa, PDB= Caldo de papa, CLP= Caldo de Lactosa y Peptona, CAV= Caldo de Avena, INC1= Incidencia a los 12 días después de la inoculación, INC2= Incidencia a los 18 días después de la inoculación, SEV1= Severidad del hongo hacia la plántula del híbrido a los 12 días de inoculación, SEV2= Severidad del hongo hacia la plántula del híbrido a los 18 días de inoculación, SEV3= Severidad del hongo hacia la plántula del híbrido a los 24 días de inoculación y SEV4= Severidad del hongo hacia la plántula del híbrido a los 30 días de inoculación.

##### 4.5.1 Evaluación de la prueba de medias entre los caldos nutritivos utilizados.

Con el análisis de comparación de medias Tukey ( $P \geq 0.05$ ) fue posible comprobar que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los caldos nutritivos para la variable “incidencia” en la primera y segunda evaluación, las medias tuvieron un rango de variación desde 1.03333 hasta 1.06897, respectivamente (Cuadro 9). Este resultado sugiere que todos los caldos nutritivos manifestaron síntomas en las plántulas de los cinco híbridos de maíz por la infección del hongo.

Méndez-López (2014) evaluaron la incidencia del hongo *U. maydis* inoculado jilotes de 12 híbridos de maíz y obtuvieron un 70% como el mayor valor; mientras que al compararlo con inoculaciones en plántulas de cinco híbridos, se presentó una incidencia del 100%.

Aguayo (2016) experimentó con tres dosis diferentes de concentraciones, en donde las tres presentaron incidencias en la mazorca inoculada con el hongo *U. maydis*, pero como era de esperarse, la concentración que causó más severidad y como consecuencia más rendimiento de huitlacoche fue el inóculo que estaba más concentrado, siendo de  $2.5 \times 10^6$  basidiosporas·mL<sup>-1</sup>.

No obstante, se observó la presencia de diferencias estadísticas entre caldos nutritivos para la primera toma de datos de la severidad, En esta variable fue el caldo CLP el que presentó la mayor severidad con 2.8621, seguido por CAV (2.7333) y CML (2.6333), distinta a los otros, dicho resultado pudo ser porque el hongo que se creció en este caldo nutritivo tardó más en infectar a las plantas dando como consecuencia que el rango de tiempo en el que los síntomas aparecieran aumentarían también, pero al término pudo establecerse la enfermedad causando los mismos daños que los demás. Mientras que, para el resto de las evaluaciones de la severidad, no hubo diferencias entre ninguno de los caldos nutritivos, estando las medias entre los rangos en SEV2 de 2.6333 y 2.3448, en SEV3 de 3.2759 a 3.069 y en SEV 4 de 3.4483 a 3.3 respectivamente.

Méndez L. *et al.* (2018) en su cartel, reportaron que experimentaron con 3 de los 5 caldos nutritivos utilizados en este experimento y obtuvieron como resultado que todos los caldos utilizados (CN, CAV y PDB) fueron buenos para desarrollar e incrementar las basidiosporas de *U. maydis* proveyendo además, las condiciones adecuadas para la conservación de cepas.

#### 4.5.2 Evaluación de la prueba de medias en los híbridos de maíz.

En la misma prueba de comparación de medias (Cuadro 9), se analizaron los híbridos utilizados; el híbrido “antílope” fue el que presentó el mayor grado de incidencia a los 12 y 18 días con medias de 1.2069 y 1.17241 respectivamente, seguido de Sorento con medias de 1.10345 para la incidencia inicial y 1.03448 para la incidencia final. Sin embargo, los demás híbridos también presentaron los síntomas, pero en menor grado de severidad.

Lo anterior se debe al grado de susceptibilidad o de resistencia de los mismos, ya que no todos tienen la misma base genética, no están hechos para las mismas condiciones ambientales y/o atmosféricas y mucho menos para soportar cualquier tipo de estrés.

En este sentido, Martínez *et al.* (2000) probó la virulencia del hongo *U. maydis* y concluyeron que la variabilidad en la incidencia en la planta es debido a que el hongo después de ser inoculado no se encontraba en las condiciones adecuadas para su desarrollo, las cuales en este experimento no pudieron ser monitoreadas ya que no se consideró el monitoreo de la temperatura debido a que la investigación se condujo dentro de un invernadero, espacio en el cual se consideró que mantenía las condiciones adecuadas para la incubación y desarrollo del hongo, pudiendo ser una causa importante del comportamiento de la incidencia a lo largo del experimento.

Además, el grado de severidad fue muy variable a lo largo del experimento, siendo en la primera evaluación el híbrido A-7573 el más afectado seguido por Aquiles, Berrendo, Sorento y Antílope con medias de 2.8333, 2.6667, 2.6333, 2.5862 y 2.1379, respectivamente. Sin embargo, en las evaluaciones de severidad 2, 3 y 4 el que presentó mayor susceptibilidad fue Sorento habiendo una correspondencia entre el híbrido y los caldos nutritivos, seguido por el material A-7573, Berrendo, Aquiles y Antílope con las medias 3.7241, 3.4828, 3.3, 3.1379, 3.1034 respectivamente.

Méndez-López *et al.* (2014), en un experimento donde probaron la susceptibilidad de maíces híbridos también probaron el maíz A-7573, el cual en ese experimento fue uno de los que presentó mayor grado de severidad, por lo que es un buen material para evaluar la patogenicidad y la severidad de cepas de huitlacoche.

## 5. CONCLUSIONES

Los medios de cultivo líquidos o caldos nutritivos son una alternativa para el crecimiento, desarrollo y aumento de basidiosporas del hongo *U. maydis* manteniendo su patogenicidad.

Todas las formulaciones de los caldos nutritivos utilizados presentaron desarrollo del hongo, sin embargo, los caldos PDB y CAV fueron los que produjeron una mayor concentración (25 678 000 y 19 310 000 basidiosporas. mL<sup>-1</sup>, respectivamente) por lo que se consideran los más aptos para la reproducción de *U. maydis*.

Los cinco caldos evaluados provocaron síntomas de incidencia y severidad similares en las plántulas de los cinco híbridos de maíz utilizados.

Todos los híbridos de maíz utilizados manifestaron síntomas de incidencia y severidad en diferente grado, por lo que cada uno manifiesta una susceptibilidad diferente a la inoculación con *U. maydis*. Sin embargo, los que presentaron mayor grado de severidad fue Sorento, seguido del A-7573.

## 6. LITERATURA CITADA

- Barrero L. (2016). Microbiología Clínica. Editorial Síntesis. España. P.P 37-52. Isbn: 978-84-9077-318-5. Recuperado De: <https://www.Sintesis.Com/Data/Indices/9788490773185.Pdf>
- Cabrera-Ponce, J.L., León-Ramírez, C.G. Verver Y Vargas, A., Y Ruiz-Herrera, J. (2009). “*Ustilago maydis*. Estudios En Maíz”. Cinvestav-Ipn. Recuperado De: [https://www.Researchgate.Net/Profile/Jose\\_Cabrera-Ponce/Publication/263581561\\_Ustilago\\_Maydis\\_Estudios\\_En\\_Maiz/Links/555fcab908ae6f4dcc9272eb.Pdf](https://www.Researchgate.Net/Profile/Jose_Cabrera-Ponce/Publication/263581561_Ustilago_Maydis_Estudios_En_Maiz/Links/555fcab908ae6f4dcc9272eb.Pdf)
- Carlos Delgado. (2014). Practica No. 5\_Ahf\_C. Delgado. Centro Universitario Regional Del Litoral Atlántico. Honduras. Recuperado De: [https://www.Academia.Edu/7587301/Aislamiento\\_De\\_Hongos\\_Fitopatogenos](https://www.Academia.Edu/7587301/Aislamiento_De_Hongos_Fitopatogenos)
- Carlos Federico Lira Gómez. (2019). Huitlacoche: Características, Hábitat, Ciclo De Vida, Propiedades. Lifeder.Com. Recuperado De: <https://www.Lifeder.Com/Huitlacoche>
- Carlos Reyes. (2015). Carbón Común O Huitlacoche - *Ustilago maydis*. 25/11/2019. *Panorama Agro.Com*. Recuperado De: <https://Panorama-Agro.Com/?P=719>
- Cuauhtémoc González Trinidad. (2016). “Producción De Huitlacoche Por Inducción De La Infección En Maíz Con *Ustilago maydis* Bajo Condiciones controladas”. (Tesis). Ciudad De México, México. Recuperado De: <https://Tesis.Ipn.Mx/Bitstream/Handle/123456789/25812/Gonz%C3%81lez%20trinidad%20cuauht%C3%89moc.Pdf?Sequence=1&Isallowed=Y>
- Cúvelo-Gutiérrez, L.; Rojas Barreto, J.A. (2010). Revisión Preliminar De Medios De Cultivo Empleados En Estudios De Microorganismos De Los Phylums Ascomycetes, Deuteromycetes y Oomycetes Como Agentes Causantes De Enfermedades En Plantas. (Tesis Licenciatura). Bogotá. Recuperado De: <https://Repository.Javeriana.Edu.Co/Bitstream/Handle/10554/8741/Tesis680.Pdf;jsessionid=4b84fb448d65f07b4a65c32311bea925?Sequence=1>

- Cynthia Jocelyn Arenas Zamorano. (1998). Evaluación De La Incidencia Y Severidad De La Enfermedad Tristeza Del Palto Causada Por *Phytophthora Cinnamomi* En Plantas De Palto Cv. Mexícola Cultivadas En Maceta, En Relación A Distintos Períodos De Inundación Del Suelo. (Tesis Licenciatura) Quillota, Chile.
- Dulce Yaneth Aguayo González. (2016). "Producción De Huitlacoche [*Ustilago maydis* (D.C) Corda] En El Estado De Aguascalientes. (Tesis Maestría). Aguascalientes, México. En Línea: [Http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/11317/880/410301.pdf?sequence=1&isallowed=Y](http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/11317/880/410301.pdf?sequence=1&isallowed=Y)
- Galicia-Gracia, P. R. (2014). Caracterización Morfológica y Molecular De Cepas "Solopathogenic" De *Ustilago maydis*, Incidencia y Severidad De Genotipos De Maíz En Condiciones De Invernadero y Campo. (Tesis De Doctorado). Colegio De Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. De México.
- García Q. H. (2014). Tipos Y Funciones De Los Medios De Cultivo. Microbiología. Recuperado De [Http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/09/tipos-y-funciones-de-los-medios-de.html](http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/09/tipos-y-funciones-de-los-medios-de.html)
- García-León, E.1 ; Leyva-Mir, S.G.2 ; Villaseñor-Mir, H.E.3 ; Rodríguez-García, M.F.3 ; Tovar-Pedraza, J.M.1. (2015). Diversidad E Incidencia De Hongos Asociados A Enfermedades Foliares De La Avena (Avena Sativa L.) En Los Valles Altos De México. *Ria*, 41, 53-56
- George N Agrios. (2009). Plant Pathology. Amsterdam : Elsevier. Academic Press. 5 Ed.
- González Pimentel. D.J., M.E. Rodríguez H., R.G. Campos M., A. Trapala I. Y A.D. Hernandez F. (2011). Influencia De La Variedad De Maíz En Las Características Fisicoquímicas Del Huitlacoche (*Ustilago maydis*). *Revista Mexicana De Ingeniería De Química*. Recuperado De [Http://www.scielo.org.mx/pdf/rmiq/v10n2/v10n2a3.pdf](http://www.scielo.org.mx/pdf/rmiq/v10n2/v10n2a3.pdf)
- Hidalgo C. , H. 1995. Desarrollo De Una Metodología Para La Producción Comercial De Huitlacoche De Alta Calidad. Tesis De Doctor En Ciencias, I Tesm. Monterrey» México. 102p.
- Intagri. 2017. El Huitlacoche En El Maíz: Organismo Patógeno O Benéfico. Serie Fitosanidad. Núm. 77. Artículos Técnicos De Intagri. México. 3 P. Extraído De

<https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/el-huitlacoche-en-el-maiz-organismo->

- Juan Pineda, Alexander Hernández, Alex González, Venancio Barrietos, Herman Nass Y Elizabeth Gil. (2005). Técnicas De Inoculación Rápida Y Eficiente Para La Evaluación De Materiales De Maíz Ante *Rhizoctonia Solani Kühn*. 10/12/2019. Bioagro, Recuperado De: [http://bibvirtual.ucla.edu.ve/db/psm\\_ucla/edocs/bioagro/vol17nro2/articulo4.pdf](http://bibvirtual.ucla.edu.ve/db/psm_ucla/edocs/bioagro/vol17nro2/articulo4.pdf)
- L. Martínez-M.; C. Villanueva-Verduzco; J. Sahagún-Castellanos. (2000). Susceptibilidad Y Resistencia Del Maíz Al Hongo Comestible Huitlacoche (*Ustilago maydis* Cda.) Mejorando Su Virulencia. Revista Chapingo Serie Horticultura, 6, 241-255.
- Lavilla, Miguel E Ivancovich, Antoni. (2016). Propuestas De Escalas Para La Evaluación, A Campo Y En Laboratorio, Del “Tizón Foliar” Y La “Mancha Púrpura De La Semilla”, Causadas Por *Cercospora kikuchii* En Soja. 06/12/2019, Inta. Recuperado De: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta\\_pergamino\\_propuestas\\_de\\_escalas\\_para\\_la\\_evaluacion\\_a\\_campo\\_y\\_en\\_laboratorio\\_del\\_tizon\\_foliar\\_y\\_la\\_mancha\\_purpura\\_de\\_la\\_semilla\\_en\\_soja.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_pergamino_propuestas_de_escalas_para_la_evaluacion_a_campo_y_en_laboratorio_del_tizon_foliar_y_la_mancha_purpura_de_la_semilla_en_soja.pdf)
- Leal, C. M. A. (1996). Evaluación De Metodologías Para La Inducción Artificial De Huitlacoche (Tesis De Maestría). Universidad Autónoma De Nuevo León. Nuevo León. Recuperado De: <http://eprints.uanl.mx/6214/1/1080071991.pdf>
- Martínez D. (2017). El Campus Puebla Promueve La Producción Controlada y Comercialización De Huitlacoche. Colegio De Postgraduados (Colpos). Recuperado De: <https://www.colpos.mx/wb/index.php/notas-informativas/el-campus-puebla-promueve-la-produccion-controlada-y-comercializacion-de-huitlacoche>
- Méndez-López, A.; Ríos-Herrera, E. N.; Sánchez-Vega, M. 2018. Medios De Cultivos Líquidos Para La Producción De Esporas De *Ustilago maydis*. México. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Ortega Amaro, A.; Rodríguez, M.; Domínguez Kessler. (2017). Manual De Prácticas Del Laboratorio Del Curso De “Biología De Hongos”. 23/11/2019, Recuperado

- De: [Http://Www.Fc.Uaslp.Mx/Informacion-Para/Material-Didactico/Manualdelaboratoriobiologiadehongos.Pdf](http://www.fc.uaslp.mx/informacion-para/material-didactico/manual-del-laboratorio-biologiadehongos.pdf)
- Paola Quiroz. (2019). El Hongo Del Maíz Que Cautivó Al Mundo Culinario, El Huitlacoche.26/11/2019, Larousse Cocina. Recuperado De: [Https://Laroussecocina.Mx/Nota/El-Hongo-Del-Maiz-Que-Cautivo-Al-Mundo-Culinario-Ei-Huitlacoche/](https://laroussecocina.mx/nota/el-hongo-del-maiz-que-cautivo-al-mundo-culinario-el-huitlacoche/)
- Paredes L. O. (2001). Alimentos Mesoamericanos. Caviar De Los Pobres, Exquisitez Culinaria. Lunes En La Ciencia. Recuperado De [Https://Www.Jornada.Com.Mx/2001/09/10/Cien-Paredes.Html](https://www.jornada.com.mx/2001/09/10/cien-paredes.html)
- Ruiz Herrera, José. (2008) *Ustilago maydis*: Ascenso De Un Hongo Mexicano De La Gastronomía Local Al Mundo Científico. *Nova Scientia*, Vol. 1, Núm. 1, Pp. 118-135
- Salazar-Torres; Martínez Trejo, E.; Álvarez Hernández, R.; Méndez-López, A.. (2014). Susceptibilidad De Maíces Híbridos Y Criollos Al Huitlacoche (*Ustilago maydis* (D.C.) Cda.), Y Rentabilidad De La Producción, En Chapingo, México. 06/12/2019, De C. Agro y Ambientales Lindd Sitio Web: [Https://Www.Researchgate.Net/Profile/Alonso\\_Mendez-Lopez/Publication/326782357\\_Susceptibilidad\\_De\\_Maices\\_Hibridos\\_Y\\_Criollos\\_Al\\_Huitlacoche\\_Ustilago\\_Maydis/Links/5b6318080f7e9b00b2a22761/Susceptibilidad-De-Maices-Hibridos-Y-Criollos-Al-Huitlacoche-Ustilago-Maydis.Pdf](https://www.researchgate.net/profile/Alonso_Mendez-Lopez/publication/326782357_Susceptibilidad_De_Maices_Hibridos_Y_Criollos_Al_Huitlacoche_Ustilago_Maydis/links/5b6318080f7e9b00b2a22761/Susceptibilidad-De-Maices-Hibridos-Y-Criollos-Al-Huitlacoche-Ustilago-Maydis.Pdf).
- Siap.2018. Atlas Agroalimentario 2012-2018. Ciudad De México. Publicaciones Siap. Recuperado De [Https://Nube.Siap.Gob.Mx/Gobmx\\_Publicaciones\\_Siap/Pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/atlas-agroalimentario-2018)
- Sinavimo. (2019). *Ustilago maydis*. 25/11/2019, Sinavimo. Recuperado De: [Https://Www.Sinavimo.Gov.Ar/Plaga/Ustilago-maydis](https://www.sinavimo.gov.ar/plaga/ustilago-maydis)
- Verónica Cañedo, Teresa Ames. (2004). Manual De Laboratorio Para El Manejo De Hongos Entomopatógenos. 23/11/2019, Centro Internacional De La Papa. Perú. Recuperado De: [Http://Cipotato.Org/Wp-Content/Uploads/2014/09/An65216.Pdf](http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/An65216.Pdf)