



# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

COMPLEJO REGIONAL CENTRO-TECAMACHALCO

INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

Evaluación de inóculos de *Ustilago maydis* en maíces de  
la región de Acatzingo, Puebla para la producción de  
huitlacoche.

TESIS

REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:  
LICENCIADA EN INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

PRESENTA

VERÓNICA GÁMEZ DOMÍNGUEZ

DIRECTOR

DR. HÉCTOR BERNAL MENDOZA

CODIRECTORA

DRA. MARÍA LETICIA CALDERÓN FERNÁNDEZ

ASESOR

DR. ROLANDO RUEDA LUNA

SEPTIEMBRE 2018



**BUAP**

OFICIO No. CRC/1190/2017  
Asunto: Registro de Tema de Tesis

**C. VERONICA GAMÉZ DOMÍNGUEZ  
PASANTE DE LICENCIATURA  
EN INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL  
PRESENTE:**

Por medio del presente me permito informarle de la aprobación del Registro del Tema de Tesis Profesional de la **Licenciatura en Ingeniería Agroindustrial** cuyo título es el siguiente:

**“Evaluación de inóculos de Ustilago Maydis en maíces de la región de Acatzingo para la producción de huitlacoche.”**

**INTRODUCCIÓN**

**CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES**

**CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA**

**CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**CONCLUSIONES**

**BIBLIOGRAFÍA**

Director de Tesis: **Dr. Héctor Bernal Mendoza**

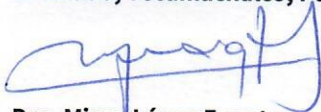
Lo cual me permito comunicarle para su conocimiento y fines consiguientes aclarando que la vigencia de este tema será **ÚNICAMENTE POR UN AÑO A PARTIR DE AHORA.**

Sin otro particular, me es grato saludarle.

**ATENTAMENTE**

**"Pensar Bien, Para Vivir Mejor"**

**El Salado, Tecamachalco, Puebla, 07 de diciembre del 2017**

  
**Dra. Mirna López Fuentes**  
**Secretaría Académica**



C.c.p Dr. Rolando Rueda Luna  
C.c.p M.C.Ramón Almazo Domínguez  
DMLF\*lmvl

**80**  **AÑOS**  
**DE UNIVERSIDAD**

Complejo Regional  
Centro

Carretera Cañada Morelos km 7.5 El Salado  
Tecamachalco, Puebla  
01 (222) 229 55 00 Ext. 3985



# Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Complejo Regional Centro  
TECAMACHALCO

**LIC. María Elena Ruíz Velasco.**  
**Directora de la Administración Escolar**  
**De la BUAP.**  
**Presente**

ASUNTO:  
**AUTORIZACIÓN**  
**IMPRESIÓN DE TESIS**

Por este conducto me permito presentar a Ud. a la C. pasante de la carrera de Ingeniería Agroindustrial

**Verónica Gámez Domínguez**

Quién presenta como tema de tesis:

**Evaluación de inóculos de *Ustilago maydis* en maíces de la región de Acatzingo, Puebla para la producción de huitlacoche.**

La cual ha sido debidamente revisada y se autoriza para su impresión correspondiente.

Sin otro particular y para los fines que se estimen conducentes reitero mi distinción.

ATENTAMENTE

**“Pensar Bien, para Vivir Mejor”**

H. Puebla de Z., a 07 de Septiembre de 2018

Director de Tesis  
Dr. Héctor Bernal Mendoza

## **DEDICATORIAS**

A mis padres Jaime Gámez Zayas que a pesar que no está ya conmigo físicamente, el ocupara siempre una parte importante de mi corazón, este logro se lo dedico por que el siempre creyó en mí, me educo con buenos valores y esto es lo que esperaba de mí. A mi madre Guillermina Domínguez Guevara, por darme la vida, el apoyo en todas las formas, la confianza que tuvo en mí para el logro de esta fase de preparación profesional. Por nunca dejarme sola, gracias.

A mi maravilloso novio Edgar que siempre ha estado conmigo y hermanos Guillermina, Hugo y Silvia que los quiero mucho, además de apoyarnos siempre, sobresaliendo en los momentos difíciles que nos tocó vivir juntos siempre les deseare lo mejor en la vida.

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos a todas las personas que hicieron posible este trabajo, agradezco mucho la ayuda brindada.

**A DIOS**, por estar siempre iluminándome en el camino correcto de mi vida.

**Dr. Héctor Bernal Mendoza**, por permitirme ser parte de sus tesis en el equipo de investigación, por toda la ayuda brindada durante el desarrollo experimental y por su gran amistad.

**A mi comité de sinodales: Dra. María Leticia Calderón Fernández y el Dr. Rolando Rueda Luna**, por la asesoría brindada, consejos académicos y personales, por su colaboración en el desarrollo de trabajo en laboratorio y campo, por la ayuda y tiempo brindado en la revisión de este escrito.

**M.C. Diego Herrera Cobian**, por su ayuda académica para definir el método de aproximación y poder determinar un número exacto en el cálculo de cobertura de huitlacoche.

**Unidad Regional Acatzingo y Complejo Regional Centro sede Tecamachalco de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**, por permitirme realizar mis estudios de licenciatura en un área muy bonita. Por prestarme los equipos de trabajo necesarios en laboratorio en tiempo y forma, para poder desarrollar mi trabajo.

**A mi novio Edgar Filomeno Marcelino**, por todo su amor, dedicación, comprensión y apoyo brindado día con día, ayudándome en la recolecta de muestras, trabajo en laboratorio, siembra de maíz, recolecta de huitlacoques, análisis de resultados, etc. Por estar siempre presente colaborando en lo necesario haciendo que el trabajo y logros fueran de ambos, compartiendo siempre metas juntos. Por su solidaridad como pareja compartiendo mis problemas, y acompañándome siempre en mis alegrías, por estar siempre pendiente de mi seguridad.

**A mi familia entera**, por todo su amor, cariño y apoyo brindado en especial a mi mamá que siempre ha estado conmigo, siempre viendo y preocupándose por que tuviera algo rico de comer después de las clases, por preocuparse por mi seguridad y que todo estuviera bien.

**A Don Carlos Marcelino Matías**, por permitirme desarrollar el trabajo de campo en su parcela, por la ayuda brindada y colaboración en este trabajo.

**¡GRACIAS A TODOS!**

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL .....	i
ÍNDICE DE CUADROS .....	v
ÍNDICE DE FIGURAS .....	v
RESUMEN .....	viii
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES.....	3
1.1 Planteamiento del problema.....	3
1.2 Justificación .....	5
1.3 Objetivos e hipótesis .....	6
1.3.1 Objetivo general .....	6
1.3.2 Objetivos particulares .....	6
1.3.3 Hipótesis .....	6
1.3.4 Hipótesis experimentales .....	6
1.4 Marco teórico y conceptual .....	7
1.4.1 Enfoques de desarrollo.....	7
1.4.1.1 Enfoque de la economía Neoclásica .....	7
1.4.2 Maíz .....	9
1.4.2.1 Clasificación taxonómica del maíz.....	9
1.4.2.2 Características botánicas del maíz .....	10
1.4.2.3 Clima para el maíz.....	11
1.4.2.4 Suelo para el desarrollo del maíz .....	11

1.4.2.5	Requerimientos de agua del maíz .....	12
1.4.2.6	Ciclo de vida del maíz .....	12
1.4.2.7	Importancia del maíz .....	13
1.4.2.8	Variedades de maíces .....	14
1.4.2.9	Clasificación de razas de maíz .....	15
1.4.3	Hongos.....	15
1.4.3.1	Generalidades de los hongos .....	15
1.4.3.2	Hongos comestibles .....	16
1.4.3.3	Importancia y beneficios de los hongos a la salud .....	17
1.4.4	Huitlacoche .....	18
1.4.4.1	Generalidades del huitlacoche .....	19
1.4.4.2	Ciclo de vida del huitlacoche .....	20
1.4.4.3	Factores que afectan el desarrollo del huitlacoche .....	21
1.4.4.4	Situación actual del huitlacoche .....	22
1.4.4.5	Importancia del huitlacoche como alimento .....	22
1.4.5	Antecedentes de la producción de huitlacoche.....	24
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA.....		25
2.1	Fases del experimento.....	25
2.2	Fase de campo: 1ª etapa.....	26
2.2.1	Recolección de muestras .....	26
Figura 14. Muestra 1 comercial Mexi hongos.....		30
2.3	Fase de laboratorio: 2ª etapa.....	30

2.3.1 Aislamiento de teliosporas.....	30
2.3.2 Criterios para elaborar los inóculos .....	33
2.3.3 Muestras para preparar los inóculos.....	34
2.3.4 Combinaciones para la elaboración de inóculos.....	35
2.3.5 Preparación del inóculo .....	35
2.4 Fase de campo: 3ª etapa.....	37
2.4.1 Ubicación de la parcela y manejo de los experimentos .....	38
2.4.2 Maíces que se utilizaron.....	39
2.4.2.1 Maíz blanco (Pepitilla) .....	39
2.4.2.2 Maíz azul.....	39
2.4.2.3 Maíces cacahuacintles .....	40
2.4.3 Siembra y preparación del cultivo de maíz .....	41
2.4.4 Inoculación por inyección .....	42
2.4.5 Inoculación por espolvoreo.....	43
2.4.6 Cosecha.....	44
2.4.7 Variables a evaluar.....	45
2.4.7.1 Porcentaje de infección .....	45
2.4.7.2 Superficie o cobertura de la mazorca .....	45
2.4.7.3 Rendimiento .....	45
2.4.8 Diseño experimental en campo .....	46
2.4.8.1 Diseño experimental para inoculación por inyección .....	46
2.4.8.2 Diseño experimental para inoculación por espolvoreo.....	49

2.4.9 Método de aproximación para determinar el porcentaje de cobertura. ....	50
2.4.10 Análisis estadístico .....	53
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	55
3.1 Comparación de los dos métodos de inoculación .....	55
3.2 Análisis por separado de cada método de inoculación.....	58
3.2.1 Porcentaje de infección para método de inoculación por inyección .....	58
3.2.2 Porcentaje de infección para método de inoculación por espolvoreo.....	60
3.2.3 Cobertura para método de inoculación por inyección .....	61
3.2.4 Cobertura para método de inoculación por espolvoreo.....	63
3.2.5 Rendimiento para método de inoculación por inyección .....	63
3.2.5.1 Rendimiento .....	63
3.2.5.2 Rendimiento de huitlacoche limpio .....	65
3.2.6 Rendimiento para el método de inoculación por espolvoreo.....	66
3.2.6.1 Rendimiento .....	66
3.2.6.2 Rendimiento de huitlacoche limpio .....	67
4. CONCLUSIONES .....	68
5. RECOMENDACIONES .....	69
6. BIBLIOGRAFÍA .....	70

## ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1. Clasificación taxonómica y características de <i>U. maydis</i> .....	20
Tabla 2. Composición proximal del Huitlacoche. ....	23
Tabla 3. Contenido proteico de algunos hongos comestibles.....	23
Tabla 4. Procedencia de las muestras recolectadas.....	27
Tabla 5. Preparación de inóculos. ....	35
Tabla 6. Conteo de esporidias.....	36
Tabla 7. Actividades realizadas en la preparación de maíz. ....	41
Tabla 8. Rendimiento de las muestras secas. ....	44
Tabla 9. Recolectas realizadas.....	45
Tabla 10. Análisis de Varianza para comparar los métodos de inoculación.....	55
Tabla 11. Prueba de Tukey para el porcentaje de infección. ....	56
Tabla 12. Prueba de Duncan para el porcentaje de infección.....	58
Tabla 13. Prueba de Duncan para porcentaje de infección. ....	60
Tabla 14. Prueba de Duncan para cobertura.....	62
Tabla 15. Prueba de Duncan para la cobertura de huitlacoche. ....	63
Tabla 16. Prueba de Duncan para rendimiento de huitlacoche. ....	64
Tabla 17. Rendimiento de huitlacoche limpio. ....	65
Tabla 18. Prueba de Duncan para rendimiento. ....	67
Tabla 19. Rendimiento de huitlacoche limpio en método de espolvoreo.....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Ustilago maydis</i> .....	21
Figura 2. Muestra 15 de huitlacoche. Procedencia Tlaxcala.....	28
Figura 3. Muestra 14. Procedencia Tehuacán.....	28
Figura 4. Muestra 4. Procedencia Atlixco. Localidad Teyuca.....	28
Figura 5. Muestra 10. Adquirida en mercado de Cholula, Puebla.....	28
Figura 6. Muestra 3. Procedencia Atlixco. ....	28
Figura 7. Muestra 8. Procedencia San Antonio Portezuelo.....	28
Figura 8. Muestra 12. Procedencia Ciudad Serdán 1. ....	29
Figura 9. Muestra 13. Procedencia Ciudad Serdán 2. ....	29

Figura 10. Muestra 11. Procedencia Santa Úrsula. ....	29
Figura 11. Muestra 7. Procedencia Ixtlahuaca (Estado de México). ....	29
Figura 12. Muestra 9. Procedencia San Antonio Portezuelo. Comercial México.....	29
Figura 13. Muestra comercial adquirida en Monte blanco.....	29
Figura 14. Muestra 1 comercial Mexi hongos. ....	30
Figura 15. Material de extracción. ....	31
Figura 16. Preparación de la solución de $\text{CuSO}_4$ .....	31
Figura 17. Lavado de agallas. ....	31
Figura 18. Extracción de teliosporas. ....	31
Figura 19. Aislamiento de teliosporas.....	32
Figura 20. Preparación del medio con cloranfenicol. ....	33
Figura 21. Extracción de esporas del sulfato de cobre. ....	33
Figura 22. Extracción en medio PDA.....	33
Figura 23. Maíz criollo blanco (Atlixco). ....	34
Figura 24. Maíz criollo blanco (Procedencia desconocida). ....	34
Figura 25. Maíz blanco (Teyuca, municipio Tepeojuma).....	34
Figura 26. Maíz azul (Teyuca, municipio Tepeojuma). ....	34
Figura 27. Maíz criollo blanco (San Antonio portezuelo).....	34
Figura 28. Variedad de maíz desconocida (Cholula). ....	34
Figura 29. Variedad de maíz desconocida (Tehuacán). ....	34
Figura 30. Variedad de maíz desconocida (Tlaxcala). ....	34
Figura 31. Preparación del inoculo. ....	35
Figura 32. Detalle de la rejilla de una cámara de Neubauer Improved.....	36
Figura 33. Lugar experimental para probar los dos métodos de inoculación. ....	38
Figura 34. Maíz blanco. ....	39
Figura 35. Maíz azul.....	39
Figura 36. Maíz cacahuacintle morado (cabeza de gorrión). ....	40
Figura 37. Maíz cacahuacintle blanco. ....	40
Figura 38. Surcado del terreno.....	41
Figura 39. Siembra de los 4 tipos de maíz. ....	41
Figura 40. Tapado del maíz con cultivadora. ....	41
Figura 41. Aplicación de fertilizante.....	41
Figura 42. Segunda labor. ....	42

Figura 43. Inóculos en frascos. ....	42
Figura 44. Inoculación en maíz cacahuacintle blanco.....	43
Figura 45. Molida manual de las agallas. ....	43
Figura 46. Polvo fino de las muestras de huitlacoche.....	43
Figura 47. Inoculación por espolvoreo en maíces.....	44
Figura 48. Distribución experimental en campo de los tratamientos de inoculación por inyección. ....	48
Figura 49. Distribución experimental de bloques en campo de la inoculación por espolvoreo. ....	49
Figura 50. Muestra recolectada para calcular % de cobertura. ....	50
Figura 51. Cuadros contabilizados de la superficie de agallas. ....	50
Figura 52. Proyección del huitlacoche maíz cacahuacintle blanco con inóculo 3.....	51

## RESUMEN

El huitlacoche (*Ustilago maydis*) es un hongo patógeno que en la naturaleza infecta dos plantas, el maíz (*Zea mays*) y teozintle (*Zea mays ssp. Parvigumis*). Este hongo infecta las partes aéreas de la planta de maíz, principalmente la mazorca donde se da la formación de grandes tumores o agallas. Sin embargo, este proceso se da esporádicamente, lo que ha obligado a buscar alternativas de producción rápida, eficiente y rentable, por ser un producto redituable debido a su valor en el mercado.

El presente estudio se realizó en la región de Acatzingo, el objetivo fue evaluar el efecto de dos métodos de inoculación:

- 1) Inoculación por inyección longitudinal en etapa de jilote con 3 mL de suspensión de esporidias ( $1 \times 10^6$  ufc/ml), probando cuatro inóculos realizados con cuatro combinaciones de muestras de huitlacoche de diferentes lugares de procedencia.
- 2) Inoculación por espolvoreo de teliosporas en etapa de jilote, donde se mezclaron las ocho muestras de huitlacoche probadas en el método de inyección.

En los dos métodos de inoculación, se probaron cuatro variedades de maíz (blanco, azul, cacahuacintle blanco y cacahuacintle morado). Para ello se utilizó un diseño en bloques al azar con arreglo factorial para el método de inyección con cuatro repeticiones y para el método de espolvoreo un diseño en bloques al azar con 16 repeticiones.

La cosecha de huitlacoche se realizó entre los 24, 28, 31 y 38 días después de la inoculación. Las variables que se evaluaron fueron porcentaje de infección, cobertura y rendimiento de huitlacoche.

La comparación de los métodos de inoculación solo mostro diferencias en la variable porcentaje de infección con un 32.81 para la inoculación por inyección y un 14.06 para la inoculación por espolvoreo. Como complemento se realizó un análisis por separado de cada método.

Los mejores resultados se obtuvieron al inocular por inyección longitudinal, los resultados fueron los siguientes, las mezclas que causaron mayor porcentaje de infección fueron MB I1 (maíz blanco inocular 1), MCB I1 (maíz cacahuacintle blanco inocular 1), y MCM I2 (maíz cacahuacintle morado inocular 2), con valores de infección de 100, 75 y 75% de infección, 26.64, 51.87 y 28.31% de cobertura y 0.67, 0.57 y 0.34 de rendimiento respectivamente.

Los resultados obtenidos en el método de inoculación por espolvoreo, no mostraron diferencias significativas en relación a las variables evaluadas.

De los dos métodos de inoculación probados, el que presento los mejores resultados fue el método de inoculación por inyección, siendo este el más exitoso para una producción masiva. La inoculación por espolvoreo es un método de bajo consumo energético que no requiere de tecnología costosa para su producción, sin embargo es un método con bajo porcentaje de infección. De los maíces probados en este experimento no hubo diferencias significativas, lo que indica, ser indiferente el que se use, sin embargo se recomienda usar maíces adaptados a la región como es el caso del maíz blanco.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente en el mundo existe una gran diversidad de especies de hongos comestibles, algunos han sido cultivados como es el caso del champiñón (*Agaricus bisporus*) y las setas (*Pleurotus ostreatus*), de los cuales hay una amplia información. Otros como el huitlacoche o cuitlacoche, producido por el basidiomiceto *Ustilago maydis*, que infecta al maíz tierno formando agallas en cualquiera de sus órganos, incluyendo mazorcas, espigas, tallos y hojas. Es un hongo comestible consumido desde la época prehispánica; asimismo en México es una enfermedad conocida como el “carbón del maíz”, este hongo parásito de la mazorca en etapa temprana (elote) que es consumido como alimento y también como condimento. (Agrios, 1991; Banuett, 1992; Cano-Canchola *et al.*, 2000).

Las agallas producidas por “cuitlacohtli” o “suciedad dormida” podrían no ser tan agradables a la vista para algunas personas, aunque en algunos países ha llamado la atención en gourmets, además de ser este hongo exquisito desde el punto de vista sensorial, ya que puede ser preparado de diferentes maneras (Pataky, 1991; Arnold, 1992). A este se le puede concebir desde dos puntos de vista: uno negativo como enfermedad, debido a las pérdidas significativas que puede ocasionar al cultivo del maíz para grano, llegando a ser cercanas a 100% en algunos campos de maíz dulce (Agrios, 2005); y el positivo, por la arraigada tradición de uso como alimento humano de buena calidad en la región central de México (Villanueva, 1995).

En la actualidad el huitlacoche ha causado un gran interés para muchos investigadores por ser cada vez más demandado en la gastronomía nacional, por su delicioso sabor, y especialmente por el valor nutricional y funcional. Por eso es importante conservarlo y desarrollarlo, para esto investigar y analizar cuál podría ser la mejor manera de producirlo, evaluando el tiempo, calidad y cantidad de producción, a la par de buscar alternativas que sean económicas, tanto para el productor y el consumidor, siendo este accesible.

Por ello, en este trabajo se considera importante producir este hongo, con medios que sean económicos y se puedan adquirir fácilmente, buscando la alternativa de producirlo en maíces de la región de Acatzingo de Hidalgo, Puebla, y de esta manera los productores tengan una alternativa de producción, que de ser posible realicen una reconversión de su cultivo, en el sentido de que ahora en vez de producir solo hortalizas y

maíz para grano, consideren al huitlacoche como una alternativa de cultivo, al mismo tiempo resaltando la importancia en valor nutricional y proteica.

Por ello, como Ingenieros Agroindustriales, es importante buscar la manera de cómo producirlo de manera eficiente, rápida y rentable.

## CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Planteamiento del problema

Hoy en día existe el regimiento de un modelo de desarrollo capitalista (o Neoliberal), donde solo se utiliza a la ciencia como un instrumento para plantear investigaciones en el sentido de explotar al máximo los recursos, e incrementar la producción de manera indefinida, Además de preocuparse en el caso de los alimentos por producir mucho, aunque no presente buena calidad nutrimental o en algunos casos, sin que haya mercado para estos, por lo que solo se quedan en el terreno ocasionando pérdidas y provocando el mayor consumo de energía para la producción.

Investigaciones como esta, se deben realizar porque en estos últimos años ha habido un incrementando en la demanda de huitlacoche, sin embargo no existen estadísticas publicadas al respecto. Lo que se conoce es que en México es muy apreciado y ha logrado extenderse en otros países como Estados Unidos, donde ha adoptado una gran cantidad de nombres como “Hongo del maíz”, “Trufa Mexicana”, “Caviar Azteca” o “Maizteca”. Mientras que el huitlacoche se prepara de diversas formas, las cuales han sido muy agradables para quienes lo consumen, Además también se puede encontrar a este alimento en diferentes presentaciones, la más común es en fresco, aunque también los hay de manera procesada y enlatada (Anónimo, 1989; Pataky, 1991).

De los problemas actuales que tiene México, los de alimentación y salud son de los más graves y urgentes, ya que no se han aprovechado algunos alimentos que tienen un buen potencial de solución a esta problemática, tal es el caso del huitlacoche, al cual no se le ha dado un uso adecuado, a pesar de ser un símbolo de representación nativa, por lo que se debe “estar orgullosos de tener este alimento originario de México”.

De igual manera es importante ampliar el estado del arte, y por otra parte, brindar una tecnología sencilla, como medio de sustento para muchas familias, que no tienen trabajo y estén interesados en emprender su propio negocio y así poder mejorar el estilo de vida de muchas personas, Esto basado en una producción donde la cadena de valor sea corta, el consumo energético sea bajo dejando ganancias a los productores, y donde el consumidor se vea beneficiado con un alimento de calidad, a un precio bajo.

Estas son algunas de las razones para realizar esta investigación. Buscando desarrollar un inculo de diferentes muestras de *U. maydis* para poder evaluar, el tiempo y

producción de huitlacoche, que logre desarrollarse en maíces de la región de Acatzingo de Hidalgo, Puebla, pero bajo condiciones poco controladas, como las que usualmente tiene el productor de bajos recursos.

## 1.2 Justificación

Desde tiempos ancestrales los agricultores mexicanos han intentado producir huitlacoche y para eso han utilizado muchas estrategias; sin embargo hasta el momento todavía con resultados pobres. Se han probado diferentes métodos, resultado de que se continúa investigando este tema son las investigaciones del CINVESTAV-Irapuato, donde han desarrollado una metodología para la producción masiva de este delicioso hongo. Después de probar diferentes métodos se llegó a la conclusión de que la técnica de inoculación por inyección produce excelentes rendimientos y calidad controlable del producto, por lo que es la más eficiente para su producción comercial (Valdez *et al.*, 2009).

Este fue uno de los principales problemas que se enfrentaron, pero también el impulso para seguir estudiando el tema del cual hay poco conocimiento acerca de la producción de huitlacoche de manera eficiente, rápida y rentable, por lo que se pretendió ampliar el estado del arte, además de que este puede ser un medio de sustento para muchas familias que no tienen trabajo y estén interesados en emprender su propio negocio y así poder mejorar su calidad de vida. Además de esto, el enfoque se dio en buscar alternativas de producción y aprovechamiento en maíces de la región de estudio.

Al mismo tiempo es una propuesta para que se considere a este alimento, por parte del gobierno, para ayudar a las personas que sufren problemas de desnutrición y viven en pobreza.

Mientras que productores interesados en la producción de huitlacoche, consideren el método de inoculación más apropiado, el cual este accesible y les permita obtener más ingresos económicos, debido a que actualmente el huitlacoche es producido en regiones de Estados Unidos, donde se vende congelado hasta en 40 dólares por kg principalmente a restaurantes (Tracy y col., 2007).

### **1.3 Objetivos e hipótesis**

#### **1.3.1 Objetivo general**

Evaluar dos métodos de inoculación, (inyección y espolvoreo), en cuatro variedades de maíz (blanco, azul, cacahuacintle blanco y cacahuacintle morado) para la producción de huitlacoche (*Ustilago maydis* (DC) Corda), mediante la determinación de porcentaje de infección, cobertura y rendimiento.

#### **1.3.2 Objetivos particulares**

- ❖ Diseñar y evaluar cuatro inóculos en las cuatro variedades de maíz a través del método de inyección.
- ❖ Diseñar y evaluar una mezcla en polvo de las muestras recolectadas para probarla en las cuatro variedades de maíz a través del método de inoculación por espolvoreo.
- ❖ Determinar al mejor método de inoculación desde una perspectiva sustentable y económica.

#### **1.3.3 Hipótesis**

Al menos un tratamiento de cada método de inoculación mostrara mejores resultados en relación al porcentaje de infección, cobertura y rendimiento para la producción de huitlacoche.

#### **1.3.4 Hipótesis experimental**

H<sub>0</sub>: No existe efecto significativo entre las  $\mu T$  (medias de los tratamientos), para la producción de huitlacoche.

H<sub>a</sub>: Al menos la  $\mu T$  (media de un tratamiento), será significativamente mejor para la producción de huitlacoche.

## **1.4 Marco teórico y conceptual**

### **1.4.1 Enfoques de desarrollo**

El desarrollo de un país, se puede analizar desde dos puntos de vista, cada uno plantea ideas diferentes, siendo muy opuestos.

#### **1.4.1.1 Enfoque de la economía Neoclásica**

Actualmente en la mayor parte del mundo los países están regidos por un sistema de producción y distribución de la riqueza denominado Capitalismo, donde los medios de producción no son de propiedad pública. La tierra, las materias primas, las fábricas, la maquinaria, pertenecen a individuos particulares, a los capitalistas o burgueses. Es éste un hecho de importancia donde la clase capitalista puede vivir sin trabajar. En cambio, el amplio grupo social que no posee los medios de producción, la clase trabajadora, ha de trabajar necesariamente mucho para vivir. Mientras la clase capitalista consigue sus ingresos empleando a otros que trabajan para ella; la clase trabajadora obtiene sus ingresos en forma de salarios mediante el trabajo que realizan para el capitalista. Lo justo sería que el que realiza el trabajo, se viera ampliamente recompensado según su esfuerzo, pero en la sociedad capitalista los trabajadores no son los que más poseen. En este modelo lo único que se visualiza es la pobreza, marginación, desigualdad e injusticia (Huberman, 1976).

Un enfoque marxista/ambientalista es la oposición al sistema Capitalista, donde el enfoque es un sistema filosófico, político y económico basado en las ideas de Karl Marx (1818-1883) y de Friedrich Engels (1820-1895), que rechaza los postulados del Capitalismo. El Marxismo es la ciencia de la lucha de clase proletaria contra la explotación capitalista, en todas sus formas, económica, política y teórica (Montúfar, 2013 citado por León, 2015). Dentro de esta perspectiva se enuncian cuatro enfoques para analizar el desarrollo rural de un país y que se ocupan como base orientativa en esta investigación, son: el Buen vivir, la Permacultura, la teoría del Decrecimiento y la Agroecología (Bernal, 2017).

El buen vivir, visión emergente desde los pueblos indígenas de América, es hoy una alternativa civilizatoria, que implica una filosofía particular y una práctica distinta a la planteada por el mundo occidental capitalista; un vivir diferente, contrario a la “vida buena”

que ofrece el Capitalismo, no se equipara con el “cuánto tienes” (Vanhulst y Beling, 2013). Buen vivir se define entonces, como una oportunidad para construir otra sociedad sustentada en la convivencia del ser humano, en diversidad y armonía con la naturaleza, a partir del reconocimiento de los diversos valores culturales existentes en cada país y en el mundo (Gudynas y Acosta, 2011).

La permacultura se define como un sistema de diseño para la creación de medios ambientes humanos sostenibles. Se basa en la observación e imitación de los patrones de la naturaleza y los principios de diseño para satisfacer las necesidades humanas, así como velar por el “capital natural” para las generaciones futuras (Holmgren, 2013).

Así, la agricultura y la construcción de casas por ejemplo, se consideran que en cuanto más se semejen a elementos de la naturaleza, son mejores. La construcción de algunas herramientas como por ejemplo, los sanitarios secos que a su vez implementan tecnologías como las composteras que sirven de abono a las plantas, las cuales son consideradas buenas por los beneficios obtenidos. Por otra parte el manejo integrado de la naturaleza por ejemplo, los huertos de frutales considerados importantes no solo por la proporción de frutos comestibles, sino también valorados por los servicios ambientales que brindan, la tierra y materia orgánica ocupadas para otras necesidades. Por otra parte la implementación de una educación y cultura que se preocupa por enseñar el respeto al medio ambiente por ejemplo, en las escuelas la elaboración de huertos, estos temas considerados dentro de la flor de la permacultura (Bernal, 2017).

El decrecimiento es una corriente de pensamiento político, económico y social favorable a la disminución controlada de la producción y el consumo, con el objetivo de establecer una nueva relación de equilibrio entre el ser humano y la naturaleza, pero también entre los propios seres humanos. Rechaza el objetivo de crecimiento económico del liberalismo y el productivismo (Latouche, 2008). El decrecimiento propone una disminución del consumo y la producción controlada y racional, permitiendo respetar el clima, los ecosistemas y los propios seres humanos. El decrecimiento es una nueva forma de vida que plantea vivir mejor con menos (Latouche, 2008).

González (2008), señala que la Agroecología es una estrategia para la producción con criterios ecológicos que promueve la conservación de los agros ecosistemas en el largo plazo, es al mismo tiempo un proceso social inserto en las luchas de cada comunidad por

la apropiación racional de los recursos y de su riqueza. Entre los fundamentos que podemos resaltar de la Agroecología están que busca reducir el consumo de agroquímicos a cero, y reconoce que conservar el material genético y correcto proceso productivo depende del conocimiento campesino. La Agroecología se opone al mercado convencional agroindustrial y a los intereses de las productoras de semillas transgénicas. En otras palabras, la Agroecología tiene una lógica de clase (Holt-Gimenez, 2010).

#### **1.4.2 Maíz**

El maíz (*Zea mays*) tiene su origen indio caribeño con toda probabilidad en América Central, especialmente en México, de aquí se distribuyó hacia el norte hasta Canadá y al sur hasta Argentina. Hay evidencias de la existencia del maíz que han sido encontrados por arqueólogos en el Valle de Tehuacán (Puebla, México), y se cree que tiene una antigüedad de unos 7000 años. A finales del siglo XV, después del inicio de la invasión de América por Cristóbal Colón, éste introdujo el grano a Europa a través de España (FAO, 1993).

El centro de origen para *Zea mays sub sp. mays* comprende la región de Mesoamérica, localizada entre el centro y sur de México hasta América Central. Existen muchos esfuerzos por parte de arqueólogos, botánicos, lingüistas, antropólogos, entre otros, por descifrar su origen, evolución y dispersión. Los restos arqueobotánicos de maíz que se han descubierto en cuevas del Valle de Tehuacán, se calcula que tienen una antigüedad de entre 4500 a 7000 años. Asimismo, se han encontrado en la cueva de Guilá Naquitz en los valles centrales de Oaxaca, restos con una antigüedad de 6200 años aproximadamente (Benz, 2001; Piperno & Flannery, 2001). Por otra parte en el Noroeste de México, norte de Sinaloa y suroeste de Estados Unidos, los restos arqueológicos denotan una antigüedad aproximada de 4500 años (Carpenter *et al.*, 2005; Carpenter *com pers.*, 2006).

##### **1.4.2.1 Clasificación taxonómica del maíz**

El Centro Nacional para la Información Biotecnológica o National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2015) establece la siguiente clasificación para el maíz:

Reino: Eucaryota

Reino: Viridiplantae

División: Streptophyta  
Clase: Liliopsida  
Subclase: Commelinids  
Orden: Poales  
Familia: Poaceae  
Subfamilia: Panicoideae  
Tribu: Andropogoneae  
Subtribu: Tripsacinae  
Género: *Zea*  
Especie: *Zea Mays*.

#### **1.4.2.2 Características botánicas del maíz**

El maíz es un cereal que presenta gran cantidad de variedades, clasificadas en las siguientes categorías de acuerdo a la estructura de sus granos:

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

El sistema radicular de esta planta es fasciculado, con gran potencia y rápido desarrollo. El tallo puede llegar a tener una altura de 4 m, o incluso más depende de la variedad. La planta es diclina y monoica. Las flores femeninas aparecen en las axilas de algunas hojas y están agrupadas en una espiga rodeadas de largas brácteas. Las flores masculinas aparecen en la extremidad del tallo y están agrupadas en panículas. En la extremidad de la espiga aparecen largos estilos delgados a los que se les conoce como barbas, “pelos” o sedas y estos se oscurecen después del proceso de fecundación. La cantidad de hojas varía de 8 a 48. La cantidad de mazorcas es una por planta pero algunas veces pueden ser dos o tres. El tamaño de la mazorca es diferente y el tamaño de los granos es variado, que depende de las diferentes variedades (Guerrero, 1987).

### **1.4.2.3 Clima para el maíz**

Galarza (1996), considera sobre el clima que es más favorable sobre los 12°C de temperatura y entre los 2 200 y 2 800 msnm, con precipitaciones de 600 a 1 500 mm. Mientras que Garcés (1999), indica, que la temperatura ejerce una influencia decisiva en la germinación de la semilla y en los procesos vegetativos de la planta, la luz es importante para la formación de la clorofila y la actividad de ésta, la humedad es necesaria para que haya una buena cosecha de maíz, siendo las primeras fases de crecimiento hasta la floración, las de mayor necesidad de agua.

Según Torregrosa; (1997) citado por Chango Amaguña (2012), señala que para su adecuado desarrollo vegetativo, el maíz requiere abundante agua especialmente en las etapas de su crecimiento inicial. En general, el maíz utiliza para su normal crecimiento de 600 a 800 mm de agua. Por tanto, zonas de baja precipitación pluvial o de lluvias irregularmente distribuidas se necesitan riegos que deben suministrarse en las épocas más oportunas.

El Maíz requiere una temperatura de 25 a 30°C, así como bastante incidencia de luz solar, para que se produzca la germinación en la semilla la temperatura debe situarse entre los 15 a 20°C, la planta de maíz llega a soportar temperaturas mínimas de 8°C y a partir de los 30°C, pueden aparecer problemas serios debido a mala absorción de nutrientes minerales y agua; para la fructificación se requieren temperaturas de 20 a 32°C (SDA, 2005).

### **1.4.2.4 Suelo para el desarrollo del maíz**

Para tener una buena cosecha, el maíz debe cultivarse en suelos fértiles que tengan un buen drenado los cuales se deben rastrarse anticipadamente; esto es para que las semillas se encuentren en una tierra suelta y libre de terrones, lo que puede garantizar una buena germinación y normal crecimiento de las plántulas ya que el maíz es muy sensible a los suelos mal aireados (Torregrosa, 1997).

Se adapta muy bien a todo tipo de suelo pero suelos con pH entre 6 a 7 son a los que mejor se adaptan. También requieren suelos profundos, ricos en materia orgánica, buena circulación del drenaje para no producir encharques que originen asfixia radicular (SDA, 2005).

#### 1.4.2.5 Requerimientos de agua del maíz

Para el buen desarrollo del maíz el suelo debe tener un buen estado de humedad, ya que si el suelo presenta sequedad se produce un engrosamiento en los tejidos y por consecuencia hay una pérdida en la calidad. Cuando el maíz se encuentra en las fases de desarrollo es importante que haya abundante agua y esté regulada para que la plántula tenga un crecimiento continuo y no sufra estrés (Galarza, 1996).

Según Robles, (1982) citado por Palacio Sañudo (2006), menciona que los requerimientos óptimos de humedad son diferentes si se consideran variedades precoces (alrededor de 80 días) o variedades tardías (alrededor de 140 días). Bajo condiciones de “temporal” (sin riego) y con variedades adaptadas, se puede tener buenos rendimientos con más o menos 500 mm de precipitación pluvial distribuida durante el ciclo vegetativo (no durante el año). Desde luego existen regiones con variedades criollas que prosperan con pocos menos de 500 mm, pero no con menos de 400 mm, debido a que se abaten los rendimientos a medida que se acerca a los 300 mm de precipitación pluvial.

Este cultivo exigente en agua en el orden de unos 5 mm al día, cuando las plantas comienzan a nacer se requiere menos cantidad de agua por lo que es necesario mantener una humedad constante (Martínez *et al.*, 2004).

#### 1.4.2.6 Ciclo de vida del maíz

Según algunos autores como Guerrero (1987), dice que el ciclo vegetativo del maíz consiste en cinco etapas que se describen a continuación:

**Emergencia de plántulas:** primera etapa que empieza desde que el maíz es sembrado y aparece el primer coleóptilo, y la duración es aproximadamente de seis a ocho días. Aunque es importante destacar que cuando el maíz, tiene una germinación lenta, a causa de condiciones que no le son favorables pueden generarse una serie de problemas en el cultivo, como son la aparición de patógenos lo que impide que el maíz tenga un buen desarrollo.

**Crecimiento:** una vez que el maíz ha nacido y si este cuenta con las condiciones climáticas y los cuidados adecuados, la planta debe ir presentando cada tres días la aparición de una hoja, para que ya aproximadamente entre los quince y veinte días, la planta deba contar con cinco o seis hojas, y ya en la cuarta y quinta semana presentará

ya todas sus hojas, por eso es importante que no haya factores que perjudiquen o pongan en riesgo su ciclo.

**Floración:** en esta etapa se considera a la floración, como el momento en el que la panoja se encuentra emitiendo polen y se producen los alargamientos de los estilos (“pelos de elote”), es aquí donde se considera que el maíz está en la etapa de jilote. Posteriormente cuando todos los granos han sido fecundados se da la etapa de llenado, que presenta un estado llamado lechoso, y en este momento es donde se considera “elote”, el cual puede ser ya cortado para comer hervido, asado o preparado de diferentes maneras. La floración es una etapa muy importante ya que la planta no debe carecer de agua ni de nitrógeno.

**Fructificación:** una vez que se ha dado la fecundación de los óvulos con el polen, inicia esta etapa donde los estilos del elote cambian de color volviéndose castaños y una vez que se dio el proceso de polinización a las tres semanas, se define el tamaño definitivo de nuestra mazorca, se empiezan a formar los granos y aparece en ellos el embrión. Los granos se empiezan a llenar de una sustancia lechosa que es rica en azúcares los cuales a la quinta semana se transforman en almidones.

**Maduración y secado:** es la última etapa, donde todos los granos se han secado presentándose duros por la pérdida de humedad. Se da en la octava semana después de la polinización donde los granos de maíz alcanzaron su máximo de madurez fisiológica presentando una humedad alrededor del 35% y a medida que el grano va perdiendo humedad alcanza la madurez final. Es cuando ya está listo para el desgranado y almacenaje o consumo.

#### **1.4.2.7 Importancia del maíz**

Una de las plantas más importantes y útiles para el ser humano ha sido el maíz, al cual lo podemos analizar desde diferentes puntos de vista como son (Reyes, 1990):

- I. Académico: el maíz es caracterizado por su amplia utilidad y como medio de ayuda en cursos de biología, química y agronomía.
- II. Científico: este puede ser un recurso biológico para explicar teorías, principios y leyes que han ayudado en los avances de las ciencias biológicas y las aplicaciones que se les da en agronomía, así como en la creación de nueva tecnología.

- III. Social: el maíz significa trabajo, pan, moneda y religión para grandes conglomerados humanos.
- IV. Económico: este puede ser un elemento de bienestar económico para los países que son autosuficientes y que se dedican a exportar; los variados usos que se les da como alimento humano directo o transformado en carne, huevo, leche y derivados; su uso como insumo en la industria; la amplia área geográfica del cultivo, ya que en todo el mundo lo encontramos distribuido en 134 países y la importancia por el alto volumen de producción.

#### **1.4.2.8 Variedades de maíces**

México es un lugar donde existen miles de variedades de maíz distribuidas en toda la región, aunque la mayoría de las variedades que se han recolectado son mezclas de dos o más razas de maíz. En Tamaulipas, Ortega (1979) encontró dos razas de maíz, el Ratón y Tuxpeño Norteño. En el estado de Veracruz, Coscomatepec y en Chiapas Motozinteco y Negro de Chimaltenango, en Michoacán el Mushito, en Chihuahua el Palomero de Chihuahua, en Morelos Ancho y en Sinaloa la raza Elotero de Sinaloa. Finalmente, en Oaxaca, Benz (1986) encontró seis razas, que son: Chatino Maizón, Choapaneco, Dzit Bacal, Mixeño, Mixteco y Serrano Mixe. Como parte del proceso de revisar las razas de maíz de México descritas por Wellhausen *et al.*, (1951) y de otros investigadores, así como el de investigar las relaciones de parentesco de éstas con grupos raciales del Norte, Centro y Sudamérica, Sánchez y Goodman (1993) reportaron que en México existían 59 razas de maíz. Recientemente, Carrera *et al.*, (en prensa) encontraron que Palomero Jalisciense reportado por Wellhausen como una sub raza del Palomero Toluqueño y por Ron *et al.*, (2006) como raza, ésta se asoció con la raza Palomero debe ser considerada como raza. Otro maíz, el Negrito (Sánchez *et al.*, 2000a) ha sido reconocido como raza sin haber demostrado que cumple con los requisitos (Benson, 1962); por tal razón, en México sólo se debe reconocer 57 razas de maíz. Actualmente, Carrera *et al.*, (en prensa), con taxonomía numérica, encontraron cinco nuevas razas de maíz a saber: P'urhépecha, Maizón de Chinicuila, Tsiri Charhápiti y Tamaulipas en el estado de Michoacán, y Tamazula Amarillo en Jalisco, por lo que en México deben reconocerse 62 razas de maíz.

#### **1.4.2.9 Clasificación de razas de maíz**

México es muy importante, ya que presenta una gran diversidad de climas, lo cual permite que el maíz se pueda adaptar a diferentes condiciones, y por medio de la polinización es que pueden surgir diferentes razas de maíces.

Según Ramírez (2006), las razas de maíz en México se pueden dividir de la siguiente manera:

- Indígenas o antiguas: Palomero, Toluqueño, Arrocillo amarillo, Chapalote y Naltel.
- Exóticas precolobinas: Cacahuacintle, Harinoso de ocho, Glotón, y maíz dulce.
- Mestizas prehistóricas: Cónico, Reventador, Tabloncillo, Tehua, Tepecintle, Comiteco, Jala, Zapalote chico, Zapalote grande, Pepitilla, Olotillo, Tuxpeño y Vandefío.
- Modernas insipientes: Chalqueño, Celaya, Cónico norteño y Bolita.
- Serranas occidentales: Tablilla de ocho, Bofo, Gordo, Azul y Apachito.
- Razas pobremente definidas: Conejo, Mushito, Zamarano amarillo, Maíz blando de Sonora, Onaveño y Dulcillo del noroeste.

#### **1.4.3 Hongos**

De acuerdo con Whittaker (1969), citado por Alexopoulos *et al.*, (1996), se consideraba a mediados del siglo XX que los hongos pertenecían al reino vegetal, ya que estos se alimentan por absorción de nutrientes y no tienen órganos locomotores, aunque por otro lado, se creía también que debían pertenecer al reino animal, por sus similitudes a su naturaleza heterotrófica y a su incapacidad de efectuar la fotosíntesis. Posteriormente, fueron desechadas estas teorías, y también fueron eliminados del reino Mónica por ser organismos eucariontes y con ribosomas tipo 80S. Sobre las bases de las ideas expuestas, Whittaker propuso la creación de un nuevo reino al que se le denominó Fungi.

##### **1.4.3.1 Generalidades de los hongos**

Los hongos son un reino importante y uno de los más diversos que podemos encontrar en la naturaleza. Se cree que existen cerca de 250,000 especies. Estos son organismos heterótrofos y pueden vivir como parásitos, simbioses o saprófitos, son eucariontes sin clorofila, su forma de reproducirse puede ser sexual y asexual, son pluricelulares de

aspecto filamentosos y las células presentan una pared que contiene quitina y/o celulosa (Alexopoulos y col., 1996).

Según Martínez Carrera *et al.*, (1993) citado por Valdez *et al.*, (2009, p. 2), menciona que dentro de la división Eumycota se encuentran los llamados hongos verdaderos, existen alrededor de 80,000 especies y comprenden levaduras, ciertos mohos, royas, tizones y setas. Hay variedades micro y macroscópicas. Los hongos macroscópicos conforman un enorme grupo de más o menos 10,000 especies, cuya apariencia es diferente en color, forma y tamaño; pueden ser comestibles o no comestibles. Entre estos últimos están los hongos tóxicos, alucinógenos (o enteógenos), o que simplemente no son usados para este fin gastronómico.

#### **1.4.3.2 Hongos comestibles**

Es importante recalcar que el deficiente abastecimiento de proteínas es un problema vital en la nutrición, sobre todo en países en desarrollo, si se toma en cuenta que el suministro proteico es muy importante en la niñez debido a que tiene efectos directos e indirectos en la salud del adulto. Dados los problemas económicos, políticos, sociales y técnicos a los que se enfrenta la humanidad para satisfacer los requerimientos de una población en crecimiento, las investigaciones y descubrimientos se han enfocado a la diversificación de las fuentes de proteína con atención especial a la proteína de origen fúngico (Vanegas, 1995).

Por otra parte los hongos comestibles han sido apreciados como parte de la dieta humana en muchas culturas debido a sus atributos sensoriales y nutricionales.

Se consumen principalmente en el sureste de Asia, Europa y Mesoamérica. Actualmente se conocen cerca de 2000 especies de hongos comestibles; pero sólo aproximadamente 22 han sido cultivadas comercialmente y sólo 10 se producen a escala industrial según Paredes *et al.*, (1999) citado por Valdez *et al.*, (2009, p. 2).

La producción de hongos comestibles se ha incrementado a nivel mundial cerca de 20 veces en las últimas 3 décadas (Tracy *et al.*, 2007). Este incremento ha sido más notable en los últimos 15 años debido a cambios en el sistema de producción, que permitieron introducir al mercado otras especies comunes y exóticas de hongos comestibles. A finales de la década de los 70's y principios de los 80's *Agaricus bisporus* representaba

cerca del 70% del abastecimiento mundial de hongos comestibles y para 1997 solo fue el 32% (Pataky y Chandler, 2003).

Las especies más cultivadas en el mundo son *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus sp.*, *Auricularia sp.*, *Volvariella volvacea* y *Cantharellus cibarius* (Garibay-Origel *et al.*, 2007); las trufas (*Tuber melanosporum*) y los hongos del tipo morel (*Morchella esculenta*) debido a su rareza y sabor exquisito, son recolectados de su medio ambiente y exportados a precios elevados (Lizárraga, 1995).

En México, la producción comercial de hongos comestibles ofrece notables ventajas sociales, económicas y ecológicas. Se estima que la producción comercial en fresco es de aproximadamente 47 mil 468 toneladas anuales. La importancia ecológica de esta actividad económica radica en la utilización y reciclaje de más de 474 mil toneladas de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales. El cultivo de hongos en México ha evolucionado a diferencia de otros países donde se ha desarrollado como un negocio netamente privado, bajo dos vertientes principales: el desarrollo industrial privado y la producción rural. Esta última es la más reciente, ya que se generó a partir de 1989 mediante el desarrollo del modelo sostenible de producción rural de hongos comestibles. Sin embargo, en este contexto es importante señalar que las setas, como se conoce comercialmente a los hongos del género *Pleurotus*, sólo representan cerca de 4.62% de la producción comercial de hongos comestibles en México. Su cultivo es de hecho bastante reciente, empezó en 1974 en Cuajimalpa, D.F. La producción anual estimada de setas en México fue de 360 toneladas. A partir de ese año su producción se incrementó notablemente, alcanzando alrededor de mil 825 toneladas en 2005 (Ruan- Soto *et al.*, 2006; <http://hypatia.morelos.gob.mx>).

#### **1.4.3.3 Importancia y beneficios de los hongos a la salud**

Los hongos comestibles han adquirido un papel importante en la vida de muchas personas y se pretende integrarlos (o reintegrarlos) a más, debido a que antes había un consumo más elevado, por el conocimiento sobre ellos en las diferentes culturas y pueblo originarios mexicanos, presentan muchos beneficios como la composición nutricional y sus propiedades medicinales (Reshetnikov, Wasser y Tan, 2001).

Los hongos comestibles son importantes nutricionalmente, ya que la mayoría de ellos tienen un elevado contenido en proteínas (19-35%), en comparación con el trigo (13.3%)

y leche (25.2%). La proteína es uno de los nutrientes más importantes en la alimentación. Los hongos con un contenido de proteína del 25 al 40% (base seca), pueden jugar un papel importante en el enriquecimiento de la dieta humana cuando el suministro de carne es limitado. El contenido de proteína es casi igual al del maíz, la leche y las legumbres, aunque es más bajo que el de la carne, pescado y huevos (Chang, 1999). Los hongos también contienen todos los aminoácidos esenciales, así como las amidas y los aminoácidos no esenciales más comunes. La lisina, cuyo contenido es bajo en la mayoría de los cereales, es el aminoácido más importante en los hongos. La proteína de los hongos, es por ello un importante aporte en la dieta humana (Feeney, 2006). Además, son alimentos bajos en calorías y su fracción grasa está compuesta principalmente por ácidos grasos insaturados, lo que corresponde a 4.0% en peso seco. Por otra parte, los hongos aportan vitaminas como la C y B (B1, B2, B12 y niacina) (León-Guzmán y col., 1997).

Se han descubierto notables propiedades medicinales en los hongos (anticancerígenas, antibióticas, que reducen el nivel de colesterol y la hipertensión, antitrombóticas, antidiabéticas), lo cual ya brinda un impulso adicional al desarrollo de este campo (Chang, 1999; Kues y Liu, 2000; Chang y Miles, 2004).

#### **1.4.4 Huitlacoche**

De acuerdo con Valadez (2012), la más temprana mención al huitlacoche la encontramos en una obra del siglo XVI: “Historia General de las Cosas de Nueva España”, escrita por Fray Bernardino de Sahagún, con el objetivo de salvaguardar el conocimiento indígena ante la llegada de la cultura europea y solo se hace una muy breve mención al respecto, indicando que es una anomalía del maíz que lleva a que la mazorca adquiera un color negruzco y se transforme en algo como lodo. Es aquí donde encontramos la más antigua denominación del hongo “cuitlacoche”, que significa algo como mugre que crece encima (del maíz) y que es molesto. En otros lugares, por ejemplo en la zona maya, se le conocía como “Ta’wa nal chaak”, es decir, excremento del dios Chaak (de la lluvia).

*U. maydis*, es el causante de la enfermedad conocida como huitlacoche o cuitlacoche; en México, su consumo como alimento humano proviene desde la época prehispánica, los aztecas lo llamaban como “cuitlacohtli”, cuitla (tl) (suciedad, basura o excremento) y cochtli (dormido) (López, 1988). Por otro lado Martínez (2000), menciona que el

huitlacoche era reconocido por los aztecas como “popoyotl” (maíz quemado) o cuitlacoचितli (suciedad dormida).

#### **1.4.4.1 Generalidades del huitlacoche**

Se han identificado aproximadamente 300 especies de *Ustilago*, las más importantes económicamente son las que causan pérdidas en maíz (*U. maydis*), avena (*U. avenae*), cebada (*U. nuda*) y trigo (*U. tritici*) según Gold y col. (1999) citado por Valdez *et al.*, (2000).

Dentro de los hongos patógenos más importantes en plantas podemos encontrar a *U. maydis*, siendo este un hongo fitopatógeno causante de la enfermedad conocida como carbón común que afecta solamente al maíz (*Zea mays*) y teosintle (*Zea mexicana*). *U. maydis* puede existir en forma haploide no patógena y como dicariótico patogénico como resultado de la fusión de dos células haploides que son compatibles. Estas dos formas son importantes para varias funciones que se llevan a cabo en el ciclo de vida de este hongo (Kamper, 2003; Banuett, 1995 y Herskowitz, 1988).

Esta enfermedad está presente en todas las regiones dedicadas a la producción del maíz, aunque para que este hongo se desarrolle de manera incontrolable, los climas más aptos son templados y húmedos, mientras que en los climas calientes y húmedos su desarrollo es muy poco (Reyes, 1990).

El desarrollo de este hongo lo podemos observar en forma de tumores o agallas que se forman en las partes aéreas de la planta: espiga, hoja, mazorca y tallo. Y estas agallas que se forman en la mazorca de maíz, son a las que se conocen como huitlacoche. En la tabla 1, se puede ver la clasificación taxonómica de *Ustilago maydis*.

Tabla 1. Clasificación taxonómica y características de *U. maydis*.

TAXÓN	CARACTERÍSTICAS
División: Amastigomycota	Hongos que perdieron el estado móvil. No se adaptan a sistemas acuáticos. Producen mucho micelio. Hifas septadas o aceptadas.
Subdivisión: Basidiomycotina	Producen basidios y basidiosporas. Estado diploide muy corto (basidio). Estado dicarótico muy prolongado.
Clase: Teliomycetes	No forman basidiocarpó. Forman esporas de resistencia con pared gruesa. Las esporas están en grupos (soros). Hongos conocidos comúnmente como carbones. Parásitos de plantas.
Orden: ustilaginales	Atrapan principalmente las estructuras reproductoras. Producen poco micelio. Promicelio septado transversalmente. Basidiosporas terminales y transversales. Soros con teliosporas café oscuro o negras.
Género: <i>Ustilago</i>	Esporas lisas, con espinas o reticuladas.
Especie: <i>maydis</i>	Atacan al maíz y al teosinte.

Fuente: Ainsworth, 1973, (citado por Paredes y Valverde, 1999).

#### 1.4.4.2 Ciclo de vida del huitlacoche

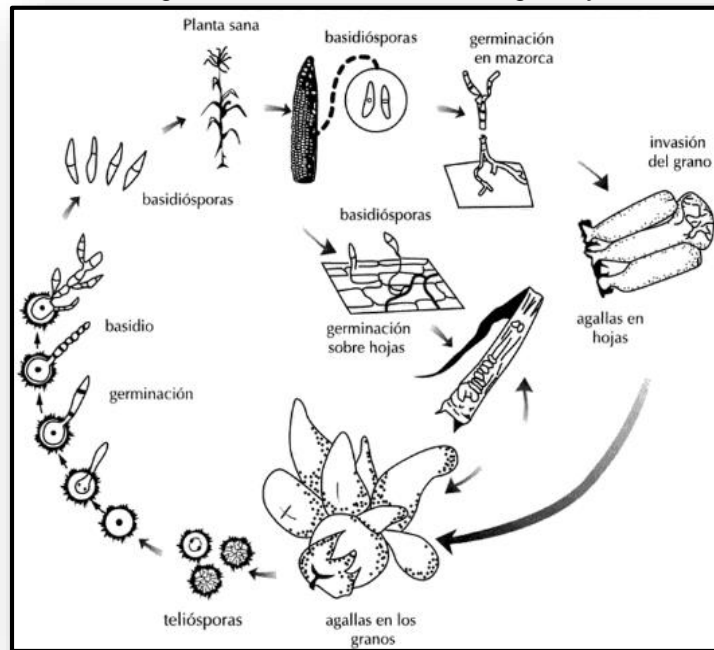
El ciclo de vida que presenta *Ustilago maydis* es muy complejo, además de que requiere de un hospedero para llevar a cabo la infección y reproducirse.

El tiempo adecuado para inocular plantas y obtener progenie haploide es de aproximadamente tres semanas (Banuett y Heerkowitz, 1994).

En la Figura 1, se observa el ciclo de vida de *U. maydis*. Primero la basidiospora o esporidia germina y produce una hifa que infecta la planta de maíz; las hifas compatibles se fusionan, ocurre la plasmogamia y se forma el micelio dicariótico (dos núcleos) que

crece y ataca las zonas meristemáticas de la planta; formándose agallas en cualquier parte aérea de ésta (Christensen, 1963). La fusión nuclear o cariogamia ocurre antes de que se formen las teliosporas que son las esporas de color negro que forman las agallas (Banuett, 1992).

Figura 1. Ciclo de vida de *Ustilago maydis*.



Fuente: Tomada de Agrios, G. M, 1988.

#### 1.4.4.3 Factores que afectan el desarrollo del huitlacoche

Actualmente no se han podido crear técnicas apropiadas que sean eficientes para la producción de huitlacoche, debido a la cantidad de factores que lo pueden afectar, ya sean físicos, químicos, biológicos y ambientales, que afectan el crecimiento de este hongo.

Con referencia a la humedad es necesaria para el proceso de germinación de las esporas y crecimiento del tubo germinativo antes de que el hongo invada la planta de maíz (Christensen, 1963 y Valverde, 1992).

En cuanto al desarrollo de este hongo, de acuerdo a muchos investigadores que coinciden en estos aspectos, mencionan que el hongo se desarrolla entre 25 y 30°C, las cuales son las temperaturas adecuadas para poderlo producir (Valverde, 1992).

Hay que tomar en cuenta que el desarrollo que presente la planta de maíz es muy importante para el crecimiento del hongo, ya que si la planta está muy vigorosa, las agallas que esta presentara van a ser más grandes. Así mismo, altas dosis de nitrógeno y materia orgánica, incrementan la producción de huitlacoche significativamente (Guevara y Col., 2000).

De igual forma, la variedad del maíz también afecta el desarrollo de este hongo, por ejemplo, el maíz dulce es el más susceptible (Christensen, 1963; Vanegas, 1995).

#### **1.4.4.4 Situación actual del huitlacoche**

En México, huitlacoche se ha utilizado desde la época prehispánica como alimento, su sabor es indescriptible y su color es atractivo. Con el paso del tiempo se han realizado diversos platillos en la cocina mexicana, desde empanadas, canapés, cremas, quesadillas, crepas, pizza, sopa y un sin fin de alimentos sofisticados. No obstante la apariencia poco atractiva de la enfermedad en el maíz ha atraído la atención de los chefs y comensales nacionales como internacionales, quienes les han dado diferentes nombres como “hongo del maíz”, “trufa mexicana” y “caviar Azteca”. (Paredes., 2000).

En México no es considerado como una plaga debido a que solo afecta una parte muy pequeña al cultivo del maíz, de un 1 al 5% de las plantas en un cultivo. Además de ser actualmente muy solicitado por sus características extraordinarias de sabor en platillos típicos de México, y tener las puertas abiertas en la alta gastronomía del extranjero, teniendo este precios impresionantes en diferentes platillos (Bernal, 2011:29).

#### **1.4.4.5 Importancia del huitlacoche como alimento**

Según Lizárraga (1995), en *U. maydis* predomina la glucosa y fructuosa, también contiene carbohidratos, proteínas, grasas, minerales y vitaminas que constituyen a su valor nutricional. En cuanto a vitaminas que se encuentran en el huitlacoche son: riboflavina, niacina, biotina, y ácido fólico (Kealey y Kosikowski, 1981).

Desde épocas prehispánicas en México y en países latinoamericanos, era apreciado el consumo de las agallas de *Ustilago maydis* producidas en el maíz, las cuales eran muy consumidas por su sabor agradable, ya que aún no se sabía nada acerca del valor nutricional que este hongo podría tener. Actualmente ya se conoce una considerable

aproximación a su contenido nutricional (Valverde y Col., 1993). En la tabla 2 se puede ver una composición proximal de los componentes del huitlacoche.

Tabla 2. Composición proximal del Huitlacoche.

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

Fuente: Paredes y Valverde (1999).

El huitlacoche es considerado un hongo que presenta proteínas de buena calidad, por contener cantidades apropiadas de todos los aminoácidos esenciales en la dieta de los adultos. Este a comparación del maíz y otros vegetales, presenta un contenido alto de lisina (6.3 a 7.3 g/100g de proteína). Sin embargo en el maíz la lisina es un componente deficiente. Al respecto se considera relevante que las culturas mexicanas hacían una buena combinación nutricional al consumir el huitlacoche con tortilla, en diferentes combinaciones gastronómicas (quesadillas, empanadas, guisados), donde los elementos del maíz más huitlacoche se mezclan, y son excelentes en la nutrición.

Aunado a lo anterior, este hongo presenta cantidades importantes de ácido oleico y linoleico (ácidos grasos esenciales) sumando del 72.1 al 73.6% del total de los ácidos grasos presentes (Valverde y Paredes, 1993; Vanegas y col., 1995; Paredes y Valverde, 1999; Paredes y col, 2000).

En cuanto a la proporción de proteínas contenidas en el huitlacoche respecto a otros hongos comestibles (tabla 3).

Tabla 3. Contenido proteico de algunos hongos comestibles.

<b>HONGO</b>	<b>NOMBRE COMÚN</b>	<b>PROTEÍNA (g/100g Base seca)</b>
<i>Agaricus bisporus</i>	Champiñón	26.9
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Setas	15
<i>Ustilago maydis</i>	Huitlacoche	11.5-16.4

Fuente: Paredes y Valverde, 1999.

#### **1.4.5 Antecedentes de la producción de huitlacoche**

Durante mucho tiempo, algunos investigadores, se han encargado de desarrollar diferentes métodos de inoculación para producir huitlacoche. El desarrollo de estos métodos ayuda a tener conocimiento de la interacción planta-patógeno (Royer y Rytter, 1985; Pataky y Chandler, 2003).

Desde 1766 sea estudiado métodos de inoculación de *U. maydis*. Por ejemplo, Tillet espolvoreó granos de maíz con teliosporas antes de la siembra y se concluyó que no hubo desarrollo. Después se inocularon semillas de maíz con teliosporas, pero los resultados fueron negativos. En 1895 Brefeld no pudo obtener infección por inoculación de semilla, pero logró la infección mediante la aspersion a la planta de maíz con una suspensión de esporidias producidas en caldo nutritivo, también se obtuvieron buenos resultados espolvoreando teliosporas secas sobre las plantas, pero tiempo después se observaron resultados negativos.

En otros ensayos con resultados positivos, se probó la inoculación de una suspensión de aislados compatibles de *U. maydis*, mediante inyección en el nudo apical de 3 a 10 días antes de la emergencia de la espiga, y llegaron a obtener 100% de plantas infectadas (Thakur y col., 1989).

Por lo tanto, parece ser que el método que ha incrementado la infección es la inyección, sin embargo las agallas han crecido en tallo, hoja y espiga más que en mazorca. Después de esta experiencia se realizó inoculación en maíz dulce, incluyendo la variación de combinaciones de cepas; la inyección fue transversal en las mazorcas, donde por el canal de los estilos fue la más exitosa, ya que registro un 97% de infección (Pataky, 1991; Pope y Mc Carter, 1991; Pope y McCarter 1992).

A partir de esto se han evaluado diferentes métodos de inoculación en diferentes etapas de desarrollo de la planta de maíz. Así, algunos trabajos mencionan que cuando se inyectó el inoculo en etapa que los estilos habían emergido completamente, presentaron un 50% de infección (Zimmerman y Pataky, 1992). Según Pope (1992) inyectó 3 mL de una suspensión de esporidias a través del canal de los estilos, cuando éstos medían 10 cm aproximadamente y se obtuvo un 97% de infección, y que al menos el 60% de los granos de cada una de las mazorcas estaban infectados al final del experimento.

## CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA

### 2.1 Fases del experimento

La presente investigación constó de dos fases:

La primera fue el trabajo en laboratorio desarrollado en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (Laboratorios de Microbiología del Complejo Regional Centro-Tecamachalco y Facultad de Ingeniería Química), dónde se realizó el aislamiento de *Ustilago maydis* de muestras de procedencias distintas (Puebla, Ciudad de México y Tlaxcala), para poder preparar los inóculos que se utilizaron en la fase de campo.

La segunda fue el trabajo en campo que consto con la recolección de muestras de huitlacoche, la siembra de cuatro tipos de maíces y la aplicación de inóculos en campo, donde cada uno de estos (1, 2, 3 y 4) fue empleado en los cuatro tipos de maíz, utilizando el método de inyección longitudinal a través del canal de los estilos, además se hizo una mezcla en polvo de todas las muestras de huitlacoche recolectadas que se utilizaron en los inóculos esto para probarla a través del método de espolvoreo empleando en los cuatro tipos de maíz.

El trabajo se realizó en tres etapas:

Etapa 1: fase de campo, recolección de las muestras.

Etapa 2: fase de laboratorio, que consto desde el aislamiento de esporidias hasta la preparación de los inóculos.

Etapa 3: fase de campo, ubicación de la parcela, siembra de maíces, preparación del cultivo de maíz, la inoculación por inyección y espolvoreo hasta la recolección de huitlacoche producido con el método de inyección y de espolvoreo.



## 2.2 Fase de campo: 1ª etapa

Esta etapa consistió solo en la recolecta de las muestras de huitlacoche, las cuales se recolectaron de distintos lugares.



### 2.2.1 Recolección de muestras

La recolección de muestras fueron huitlacoques, que presentaran agallas completas y sin algún daño mecánico; la procedencia de estas muestras fue de diferentes zonas, a continuación se describen.



De Atlixco, se recolectaron 3 muestras:

-  1 adquirida en el mercado Benito Juárez, de un maíz criollo tipo blanco.
-  2 recolectadas en terrenos de la localidad Tepeyuca, municipio Tepeojuma; de maíces criollos, blanco y azul respectivamente.

Del Estado de México se recolectaron 2 muestras:

-  1 proveniente de la Central de abastos de Toluca.
-  1 de Ixtlahuaca.

San Antonio Portezuelo, municipio de General Felipe Ángeles del estado de Puebla, se recolectaron 2 muestras:

-  1 de parcelas cultivadas de maíz criollo blanco.
-  1 comprada con vendedores ambulantes de verduras, la cual era marca comercial "México".


Puebla se recolecto 1 muestra:

-  1 adquirida en el mercado tradicional de San Pedro Cholula.

Comunidad de Santa Úrsula, municipio de General Felipe Ángeles del estado de Puebla.  
1 muestra:

-  1 adquirida en parcela de maíz híbrido, H-48.

Comunidad de Acatzingo de Hidalgo, Puebla, 2 muestras:

-  1 comprada en el tianguis tradicional de los días martes, con procedencia de Ciudad Serdán, Puebla.

- 1 comprada con vendedores de elotes de los días domingos, con procedencia de Ciudad Serdán, Puebla.

Tepeaca, Puebla, 2 muestras adquiridas en el tianguis tradicional de los días viernes:

- 1 con procedencia de Tehuacán.
- 1 con procedencia de Tlaxcala.

Muestras adquiridas en centros comerciales, con marcas registradas, 2 muestras:

- “Mexi hongos” y
- “Monte blanco”.

En la tabla 4 se ve, las muestras recolectadas y los lugares de procedencia de cada una.

Tabla 4. Procedencia de las muestras recolectadas.

Nº de muestra	Procedencia (origen)	Fecha	Tipo
1	Puebla	17/05/2017	Comercial “Mexi hongos”
2	Puebla	17/05/2017	Comercial “Monte Blanco”
3	Atlixco	24/05/2017	Maíz criollo blanco
4	Atlixco Localidad: Teyuca, municipio Tepeojuma.	22/05/2017	Maíz blanco
5	Atlixco Localidad: Teyuca, municipio Tepeojuma.	22/05/2017	Maíz azul
6	Procedencia desconocida	24/05/2017	Maíz criollo blanco
7	Ixtlahuaca estado de México	30/07/2017	Desconocido
8	San Antonio portezuelo	10/07/2017	Maíz criollo blanco
9	San Antonio portezuelo	31/07/2017	Comercial “México”
10	Cholula (mercado 22 sur y av. San Ignacio)	11/07/2017	Desconocido
11	Santa Úrsula	27/07/2017	Hibrido H-48
12	Ciudad Serdán 1	30/07/2017	Desconocido
13	Ciudad Serdán 2	1/08/2017	Desconocido
14	Tehuacán	4/08/2017	Desconocido
15	Tlaxcala	4/08/2017	Desconocido

En las figuras 2 a 14, se muestran las recolectas de muestras de huitlacoche.

Figura 2. Muestra 15 de huitlacoche.  
Procedencia Tlaxcala.



Figura 3. Muestra 14. Procedencia Tehuacán.



Figura 4. Muestra 4. Procedencia Atlixco.  
Localidad Teyuca.



Figura 5. Muestra 10. Adquirida en mercado  
de Cholula, Puebla.



Figura 6. Muestra 3. Procedencia Atlixco.



Figura 7. Muestra 8. Procedencia San Antonio  
Portezuelo.



Figura 8. Muestra 12. Procedencia Ciudad Serdán 1.



Figura 9. Muestra 13. Procedencia Ciudad Serdán 2.



Figura 10. Muestra 11. Procedencia Santa Úrsula.



Figura 11. Muestra 7. Procedencia Ixtlahuaca (Estado de México).



Figura 12. Muestra 9. Procedencia San Antonio Portezuelo. Comercial México



Figura 13. Muestra comercial adquirida en Monte blanco.



Figura 14. Muestra 1 comercial Mexi hongos.



### 2.3 Fase de laboratorio: 2ª etapa

El trabajo de laboratorio requiere de conocimientos previos, y medidas de precaución para evitar accidentes.

#### 2.3.1 Aislamiento de teliosporas

El aislamiento de teliosporas de cada muestra recolectada, requiere de condiciones extremas de higiene de ella depende el obtener un aislamiento libres de contaminación por otro hongos o bacterias.

##### Material:

- |                                    |                                  |
|------------------------------------|----------------------------------|
| ■ Mesa o campana de flujo laminar. | ■ Tubos de ensaye.               |
| ■ Alcohol del 70° a 96°.           | ■ Sulfato de cobre.              |
| ■ Autoclave.                       | ■ Vasos de precipitado de 50 mL. |
| ■ Agua destilada.                  | ■ Probeta de 50 mL.              |
| ■ Mecheros.                        | ■ Detergente.                    |
| ■ Agujas de disección.             |                                  |

Se utilizó la metodología propuesta por Christensen (1963), se realizó la esterilización de todo el material en autoclave. Previo al aislamiento es la desinfección de la campana de flujo laminar con detergente y algodón humedecido con fenol (alcohol a 70° o 96°), con lo que se elimina el polvo y otros contaminantes.

De las muestras con huitlacoche, se realizó la elección de las agallas más grandes, maduras, negras, completas y sin algún daño mecánico. Para lograr la desinfección de estas se utilizó una solución de cloro al 10%, durante 1 minuto realizando movimientos

oscilatorios suaves. Posteriormente se realizaron dos lavados con agua destilada estéril, durante 30 segundos cada uno, realizando los mismos movimientos con la finalidad de eliminar el exceso de hipoclorito de sodio.

Con la punta flameada de una aguja de disección se hace un corte rectangular (solo en tres lados del rectángulo) en la cubierta, y se levanta hasta dejar expuestas las teliosporas.

Con la punta de otra aguja en condiciones estériles son obtenidas y depositadas en los tubos de ensaye con 1 mL de solución de sulfato de cobre a 250 ppm.

Estas labores se hacen en condiciones asépticas, sea en una campana de flujo laminar o en una área esterilizada, frente a mecheros.

Se incuban en oscuridad a temperatura ambiente durante un periodo de 8-12 horas.

En las figuras 15 a 19 se muestra el proceso de aislamiento de *Ustilago maydis*.

Figura 15. Material de extracción.



Figura 16. Preparación de la solución de  $\text{CuSO}_4$ .



Figura 17. Lavado de agallas.



Figura 18. Extracción de teliosporas.



Figura 19. Aislamiento de teliosporas.



Siguiendo la metodología propuesta por Christensen (1963), se modificó de la forma que se describe a continuación:

Se preparó el medio de Agar-Papa-Dextrosa (*Potato Dextrose Agar, PDA*, por sus siglas en inglés), de acuerdo a la ficha técnica, con referencia de 39 g de agar en 1 litro de agua, se esterilizo en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Se esterilizó la campana de flujo laminar con detergente y algodón humedecido con alcohol a 70° o 96° y con mecheros.

El medio de cultivo PDA, se dejó enfriar y cuanto alcanzo una temperatura soportable en el dorso de la mano, se le agrego y disolvió 250 mg de cloranfenicol, ver figura 20.

Finalmente se realizó el vertido en cajas petri estériles, se dejó solidificar el medio para posteriormente realizar el aislamiento en este.

Mientras que al tubo donde se aislaron las teliosporas se le coloco una capa fina de algodón estéril, en la parte superficial de la solución de sulfato de cobre, se filtraron y realizó la extracción de 100 µl con una micropipeta, ver figura 21. Se colocaron en forma de gotas en el medio y se agitó con un movimiento rotatorio hasta asegurar una buena distribución, ver figura 22. Posteriormente fueron selladas las placas con papel parafil, colocándose en la oscuridad a temperatura ambiente por 48 horas.

Las modificaciones realizadas consistieron en disminuir la cantidad de cloranfenicol a 250 ppm y utilizar la capa de algodón para la extracción de esporas propuesta por Calderón (2010). Esto porque al utilizar una cantidad más grande de cloranfenicol como lo reportan ciertos autores al realizar en aislamiento en PDA, no mostraba algún crecimiento este

hongo por lo cual se disminuyó la cantidad a la mitad, concluyendo que a cantidades elevadas el hongo no logra desarrollarse por causa de intoxicación.

Figura 20. Preparación del medio con cloranfenicol.



Figura 21. Extracción de esporas del sulfato de cobre.



Figura 22. Extracción en medio PDA.



### 2.3.2 Criterios para elaborar los inóculos

Para la elaboración de los inóculos se tomaron en cuenta tres criterios, el primero fue la cantidad visual de teliosporas en el huitlacoche, esto se identificó cuando se realizó la extracción de teliosporas, donde al realizar el corte rectangular en las agallas se vio, si estaban completamente llenas o solo presentaba un poco contenido.

El segundo, pureza de las esporidias presentes en el medio de cultivo, de acuerdo a las diferentes muestras que se aislaron en medio PDA, el tercero se consideró el lugar de procedencia de la muestra de huitlacoche, con la finalidad de combinar muestras que tuvieran orígenes más lejanos, bajo la teoría que entre mayor diversidad, mayor será el éxito de la progenie.

### 2.3.3 Muestras para preparar los inóculos

En las figuras 23 a 30, se muestran las esporidias de cada una de las muestras de huitlacoche recolectadas.

Figura 23. Maíz criollo blanco (Atlixco).

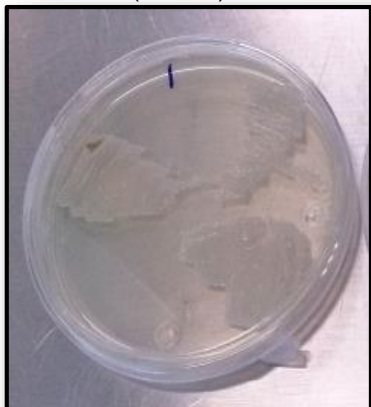


Figura 24. Maíz criollo blanco (Procedencia desconocida).

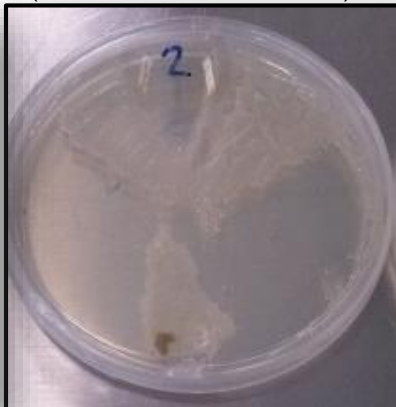


Figura 25. Maíz blanco (Teyuca, municipio Tepeojuma).

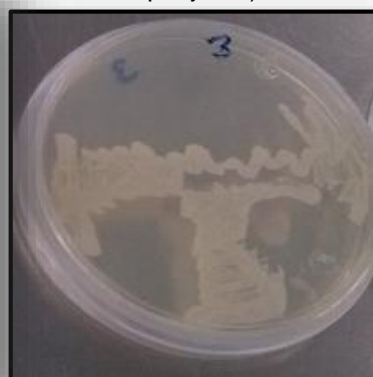


Figura 26. Maíz azul (Teyuca, municipio Tepeojuma).

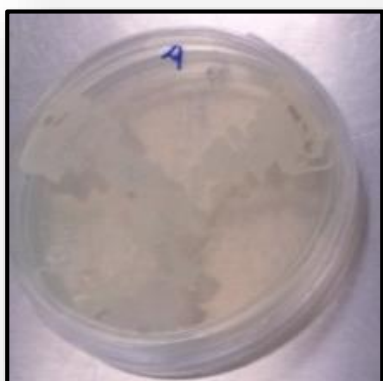


Figura 27. Maíz criollo blanco (San Antonio portezuelo).

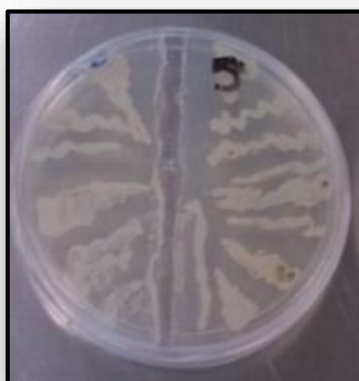


Figura 28. Variedad de maíz desconocida (Cholula).

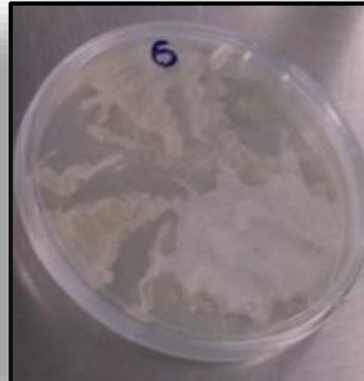


Figura 29. Variedad de maíz desconocida (Tehuacán).



Figura 30. Variedad de maíz desconocida (Tlaxcala).



### 2.3.4 Combinaciones para la elaboración de inóculos

Las combinaciones se hicieron, tomando en cuenta los tres criterios para poder elaborar los cuatro inóculos, la distribución se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Preparación de inóculos.

INOCULO	MUESTRA
1	1,2,4,5
2	1,2,7,8
3	3,6,4,5
4	3,6,7,8

### 2.3.5 Preparación del inóculo

La preparación del inóculo, se realizó en condiciones estériles para la extracción de esporidias del medio de cultivo, se utilizó un asa bacteriológica, se depositaron y mezclaron en agua destilada estéril. En seguida se hizo el ajuste de densidad con ayuda de un hematocitómetro a una concentración de 106 basidiosporas·ml<sup>-1</sup> de agua, depositándose en frascos de vidrio esterilizados, para facilitar su manejo y traslado al campo, según la metodología empleada por Villanueva (1995).

La concentración se determinó mediante el conteo de células con la cámara de Neubauer (IMPROVED bright Line, MARIENFELD), para obtener el inoculo inicial de 106. Utilizando la fórmula:

$$\frac{\text{Cél}}{\text{mL}} = 10\,000 \left( \frac{X}{4} \right)$$

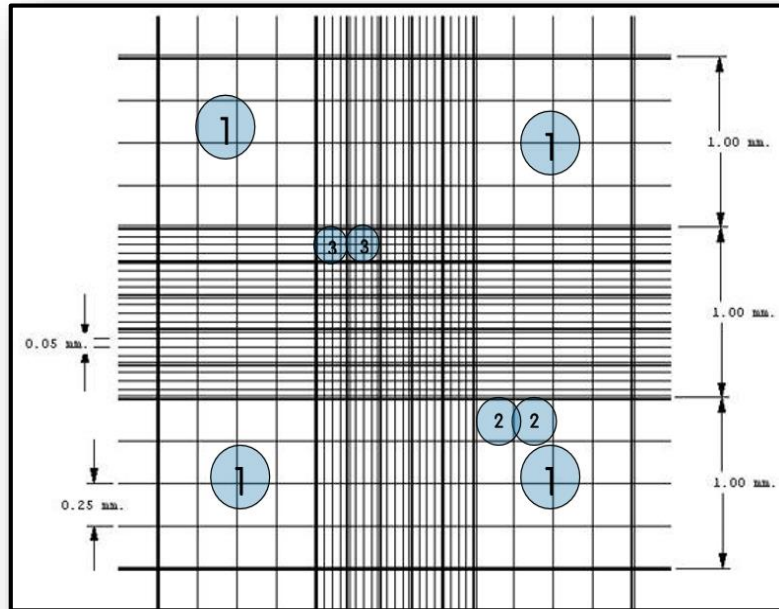
En la figura 31, se observa la preparación de los inóculos, con sus correspondientes mezclas de muestras que se describieron anteriormente.

Figura 31. Preparación del inoculo.



En la figura 32 se muestran los diferentes cuadrantes de una cámara, con los que se contaron el número de estructuras del hongo observadas en los 4 cuadrantes laterales.

Figura 32. Detalle de la rejilla de una cámara de Neubauer Improved.



Fuente: Latorrea, 2015.

En la tabla 6 se ilustra un ejemplo de la concentración de esporas por cuadrante en la cámara de Neubauer, siendo este solo un ejemplo ya que cada muestra mostraba diferentes cantidades.

Tabla 6. Conteo de esporidias.

Cuadrante	Numero de esporidias
1	125
2	150
3	132
4	93
<b>Total</b>	<b>500</b>

Posteriormente los datos obtenidos se sustituyeron en la fórmula:

$$V_1 C_1 = V_2 C_2$$

Para obtener la concentración de esporas deseada se aplica, según la metodología empleada por Villanueva (1995). Para el procedimiento referido anteriormente por medio de la fórmula:

$$V_1 C_1 = V_2 C_2$$

Dónde:

V1: volumen inicial

C1: concentración inicial para el ajuste de la densidad de basidiosporas.

V2: es el volumen final o deseado de la concentración de basidiosporas.

C2: es la concentración final para el ajuste de la densidad de basidiosporas.

El ajuste de la concentración deseada de basidiosporas por mililitro de suspensión, se realizó de la siguiente manera:

- 1) Preparar en un primer momento un volumen inicial conocido (V1) con una alta densidad de esporidios.
- 2) Con la ayuda de un hematocitómetro se determina la concentración inicial (C1) de esporidias, la cual es intencionalmente demasiado alta respecto a la deseada.
- 3) La concentración final de inóculo (C2) es conocida a priori. Está predefinida de acuerdo a resultados experimentales.
- 4) Con esos tres valores conocidos (V1, C1 y C2), se despeja V2 de la fórmula para conocer el volumen al que debemos aforar para lograr la densidad o concentración de inóculo que se requiere.

De esta forma se realiza una sola determinación de la densidad de esporidias con el hematocitómetro, durante el proceso de ajuste de la densidad de inóculo.

#### **2.4 Fase de campo: 3ª etapa**

Esta etapa consistió en la ubicación de la parcela, la obtención de los maíces que se utilizaron, la siembra y preparación realizada al cultivo de maíz, la inoculación por inyección y espolvoreo, hasta la recolección de huitlacoche producido con el método de inyección y de espolvoreo.

### 2.4.1 Ubicación de la parcela y manejo de los experimentos

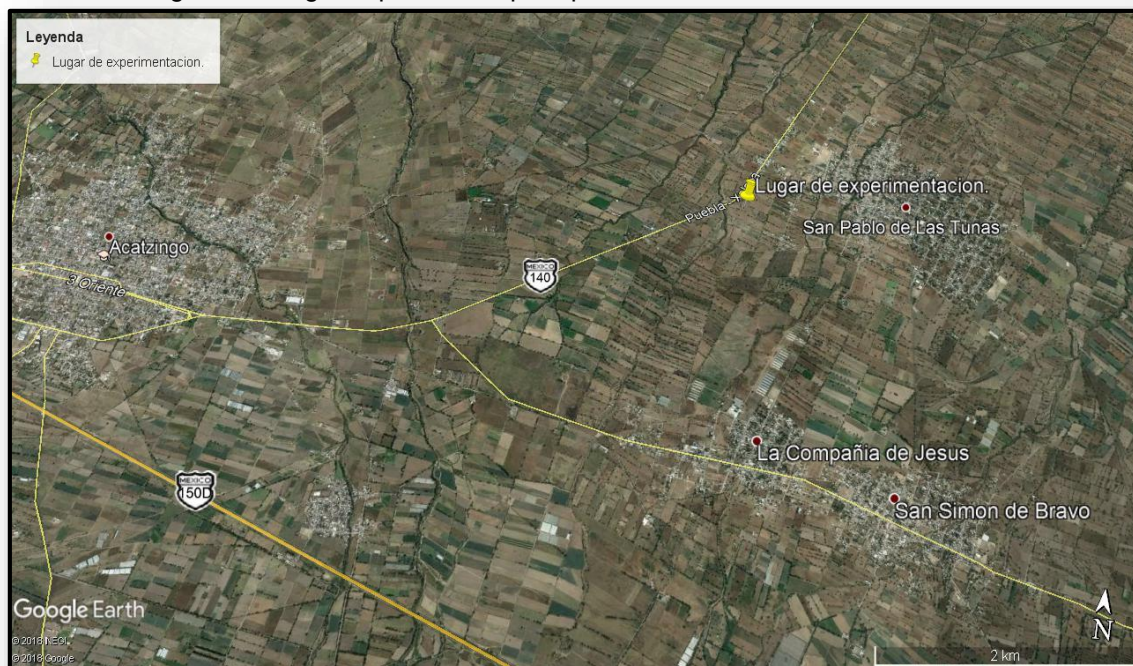
Los experimentos se establecieron en la parcela, ubicada en la región de Acatzingo de Hidalgo, Puebla, con coordenadas  $18^{\circ}59'37.8''\text{N}$  y  $97^{\circ}43'32.1''\text{W}$ .

La siembra en ambos experimentos, se hizo de forma manual, la evaluación de cada método de inoculación consistió de 8 surcos de 9.5 m de largo por 5 m de ancho (dividido en 4 bloques). El sistema de siembra para todos los maíces fue de 25 cm entre plantas de maíz y 60 cm entre surcos. Por cada hoyo se colocaron de 2 a 3 semillas. Por cada método de inoculación la unidad experimental fue un total de 64 plantas.

En la figura 33, se muestra la ubicación del lugar experimental con coordenadas  $18^{\circ}59'37.8''\text{N}$  y  $97^{\circ}43'32.1''\text{W}$ .

Para el experimento 1, se sembraron los cuatro tipos de maíz y se probaron los cuatro inóculos preparados en laboratorio a través del método de inoculación por inyección, y para el experimento 2, se sembraron los mismo cuatro tipos de maíz, y se probó la mezcla en polvo de las muestras recolectadas a través de la inoculación por el método de espolvoreo.

Figura 33. Lugar experimental para probar los dos métodos de inoculación.



Fuente: Google earth. (s.f.).

## 2.4.2 Maíces que se utilizaron

Se utilizaron cuatro tipos de maíz en los cuales se evaluaron los dos métodos de inoculación, a continuación se describe cada uno de los maíces.

### 2.4.2.1 Maíz blanco (Pepitilla)

Según Reyes (1990) y Wellhausen (1951), dicen que el maíz se distribuye principalmente en Morelos y Guerrero es la raza que da la mejor calidad de tortilla, calidad forrajera, brácteas suaves (totomoxtle) que se utiliza para envolver tamales. Se adapta a suelos delgados, marginales y de ladera. Generalmente de olote delgado y grano muy largo, sin embargo presenta una gran variación morfológica (tamaño grano, grosor de mazorca, tamaño de mazorca, cantidad de hileras, 18 a 30 hileras) y alto contenido proteico (12%), aceite (6%).

Presenta una longitud promedio de 4.5 cm, con 12 hileras y el maíz para la siembra se adquirió con el productor. En la figura 34 se muestra el maíz blanco que se utilizó.

Figura 34. Maíz blanco.



### 2.4.2.2 Maíz azul

Este tipo de maíz presenta una longitud promedio de 5 cm, con 16 hileras de maíz, la semilla también se adquirió con el productor. En la figura 35 se muestra el maíz azul que se utilizó.

Figura 35. Maíz azul.



### 2.4.2.3 Maíces cacahuacintles

Según Reyes, (1990) y Wellhausen, (1951) el maíz cacahuacintle es una raza indígena o antigua de acuerdo a la clasificación de razas que hay en México.

Raza de grano harinoso grande, con adaptación especial a suelos de andosol, particularmente en el Valle de Toluca, pero que se siembra también en otras áreas de los Valles Centrales de México, es decir es una raza que se siembra en las partes más altas y de temperaturas más bajas de México. Se usa para pozole, elotes, pinole, atole y harina. El kilogramo de grano vale varias veces el valor del maíz común, presenta granos más suaves y tiene un pericarpio de los más delgados. Susceptible a pudrición de grano, predominan formas de grano blanco pero también se encuentran negras o azules. Por sus hojas caídas tolera a las granizadas, esta raza tiene buena adaptación a las condiciones del Valle de Toluca y cuando se siembra en lugares como Texcoco es muy susceptible a pudriciones, sin embargo para Tlaxcala existen formas más precoces e intermedias que pudieran adaptarse mejor a estas condiciones. En las figuras 36 y 37 se muestran los maíces que se utilizaron.

Figura 36. Maíz cacahuacintle morado (cabeza de gorrión).



Figura 37. Maíz cacahuacintle blanco.



### 2.4.3 Siembra y preparación del cultivo de maíz

La siembra se efectuó el 20 de mayo del 2017, sobre un terreno previamente labrado y utilizando el método de siembra en seco y bajo temporal. En la tabla 7 se muestran las actividades realizadas al cultivo con sus correspondientes fechas.

Tabla 7. Actividades realizadas en la preparación de maíz.

Actividad	DDS	FECHA (día/mes/año)
1 labor	13	02/06/2017
2 labor	42	01/07/2017
Aplicación de fertilizante 46-00-00	42	01/07/2017

\*DDS: días después de la siembra.

En las figuras 38 a 42 se muestran las diferentes actividades realizadas al cultivo de maíz.

Figura 38. Surcado del terreno



Figura 39. Siembra de los 4 tipos de maíz.



Figura 40. Tapado del maíz con cultivadora.



Figura 41. Aplicación de fertilizante.



Figura 42. Segunda labor.



#### 2.4.4 Inoculación por inyección

La inoculación se realizó por la tarde y se llevó a cabo con jeringas hipodérmicas estériles aplicando 3 mL de la suspensión por jilote, con una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml, inyectando cada plantas con la misma cantidad de esporidias por canal, esto se realizó cuando el 50% de las plantas a inocular presentaron una longitud de los estilos entre 5 y 10 cm (Pataky, 1991; Vanegas, 1995). La inoculación se realizó en etapa de jilote en tres puntos equidistantes a lo largo del mismo (Villanueva *et al.*, 2007). Solo una vez se realizó la inoculación, donde cada inoculo se probó en 4 plantas de cada tipo de maíz, con 4 repeticiones, el total de plantas inoculadas por este método fue de 64. El 23 de agosto para 3 variedades de maíz y el día 1 de septiembre para maíz cacahuacintle blanco.

En la figura 43 se muestran, los diferentes frascos con inóculo y en la figura 44 se muestra la inoculación realizada a través del método de inyección.

Figura 43. Inóculos en frascos.



Figura 44. Inoculación en maíz cacahuacintle blanco.



#### 2.4.5 Inoculación por espolvoreo

Para este método se utilizaron las agallas restantes de las 8 muestras recolectadas, que se utilizaron para elaborar los inóculos probados en el otro método.

Sobre las bases de las ideas expuestas por parte del productor, se realizó una separación de las agallas de la mazorca, esto en todas las muestras de huitlacoche, se pusieron a secar al sol, una vez secas se pulverizaron con las manos y pasadas a través de un arnero de malla fina de 2 mm, con el objeto de eliminar la cubierta de las agallas, para lograr un polvo fino, ver figura 45 y 46. Como complemento se pesó cada muestra finalmente se mezclaron para formar una sola. La inoculación se realizó en etapa de jilote, el 19 de agosto del 2017, se hizo por la mañana, donde se espolvoreo cada jilote, La inoculación se realizó una vez, en total se inocularon 64 plantas en este método, ver figura 47.

Figura 45. Molida manual de las agallas.



Figura 46. Polvo fino de las muestras de huitlacoche.



Figura 47. Inoculación por espolvoreo en maíces.



En la tabla 8 se muestra el peso de todas las muestras que se utilizaron para elaborar el polvo y utilizarlo en el método de espolvoreo.

Tabla 8. Rendimiento de las muestras secas.

Muestra	Nombre	Peso
1	Maíz criollo blanco (Atlixco).	17.1 g
2	Maíz criollo blanco (Estado de México).	13.3 g
3	Localidad: Teyuca, municipio Tepeojuma. Maíz blanco.	17.8 g
4	Localidad: Teyuca, municipio Tepeojuma. Maíz azul.	22.7 g
5	San Antonio portezuelo Maíz criollo blanco.	2.8 g
6	Cholula (mercado 22 sur y av. San Ignacio).	19 g
7	Tehuacán	12.5 g
8	Tlaxcala	10.8 g
	Peso total	116 g
	Merma de agallas	50 g
	Peso total de las muestras ya tamizadas	66 g

#### 2.4.6 Cosecha

Se realizaron cuatro cosechas donde se cortaron los huitlacoques que habían desarrollado en cada método y se evaluó el % de infección, la cobertura y rendimiento. La recolecta se realizó por la mañana, los huitlacoques se colocaban en papel periódico, y en una caja de cartón para facilitar la manipulación de traslado al lugar donde se analizaron todas las variables a evaluar. En la tabla 9 podemos ver los días de cosecha, y la cantidad de muestras recolectadas por cada método.

Tabla 9. Recolectas realizadas.

Recolecta	Fecha	Inoculación con jeringa	DDI	Inoculación por espolvoreo	DDI
1	16-sep-17	1	24	1	28
2	23-sep-17	7	31	2	35
3	30-sep-17	5	28	5	42
		3	38		
4	07-oct-17	5	38	1	49
		Total=21		Total=9	

## 2.4.7 Variables a evaluar

### 2.4.7.1 Porcentaje de infección

Que es la relación de las mazorcas inoculadas y mazorcas infectadas (Valverde, 1992; Vanegas, 1995). Se aplicó la siguiente fórmula.

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

### 2.4.7.2 Superficie o cobertura de la mazorca

Del elote infectado se medirá el largo y la longitud viendo que tanto cubren las agallas del huitlacoche y se calculó la relación en una escala arbitraria del 1 al 100 (Valverde y col., 1993; Pataky y Chandler, 2003).

### 2.4.7.3 Rendimiento

Para obtener este parámetro se calculara de la siguiente manera, el cociente del peso del huitlacoche y el peso total de la mazorca más huitlacoche (Valverde, 1992; Valverde y col., 1993; Vanegas, 1995).

#### Rendimiento de huitlacoche limpio (RHL)

Para el cálculo del RHL se tomaron las mazorcas infectadas de cada tratamiento y se procedió a separar sus agallas. Esta operación se realizó manualmente y/o utilizando un cuchillo de cocina. Se obtuvo el peso de las agallas por tratamiento y se aplicó la siguiente fórmula (Cota, 2004).

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

Dónde:

RHL= Kg/ha

$\sigma p$  = densidad de plantas = 45, 000 plantas por hectárea.

#### **2.4.8 Diseño experimental en campo**

Para el desarrollo experimental en campo, se utilizó una parcela agrícola de temporal, la distancia entre cada método de inoculación (inyección y espolvoreo) fue de 8 surcos entre cada uno.

##### **2.4.8.1 Diseño experimental para inoculación por inyección**

Para el método de inyección se utilizó un diseño en bloques al azar con arreglo factorial, el cual consiste en distribuir de manera aleatoria una réplica de cada tratamiento dentro de cada bloque. El utilizar bloques dentro del experimento es porque, hay variables que no podemos controlar, pero el efecto de un tratamiento a comparar depende de otros factores, que pudieran influir en el resultado del experimento, y se deben tomar en cuenta para eliminar su posible efecto, y evitar sesgos al comparar los factores de interés. Al respecto se consideraron variables extrañas debido a que el experimento fue en campo y bajo temporal, por lo cual se consideró dentro de estas variables (la profundidad y composición de suelo, inclinación del terreno, retención de humedad, efecto de borde, etc.), por lo que el objetivo al utilizar este arreglo es eliminar su efecto y de esta manera obtener resultados más confiables.

La parcela experimental consistió de 8 surcos de 9.5 m de largo por 5 m de ancho (dividido en 4 bloques). El sistema de siembra para todos fue de 25 cm entre plantas de maíz y 60 cm entre surcos. Por cada hoyo se colocaron de 2 a 3 semillas. Fueron 16 tratamientos y cada uno consta de 1 planta por unidad experimental con 4 repeticiones y da un total de 64 plantas, en la imagen 48 se muestra el diseño del método.

En el diseño se evaluaron:

Método de inoculación + Tratamiento + 4 repeticiones.

## Simbología

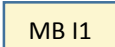
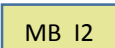
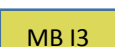
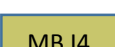
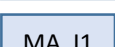
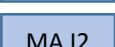
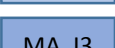

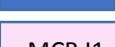

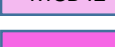
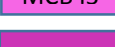
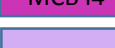
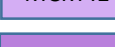
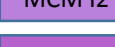
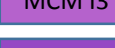
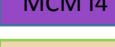

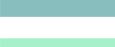
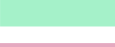


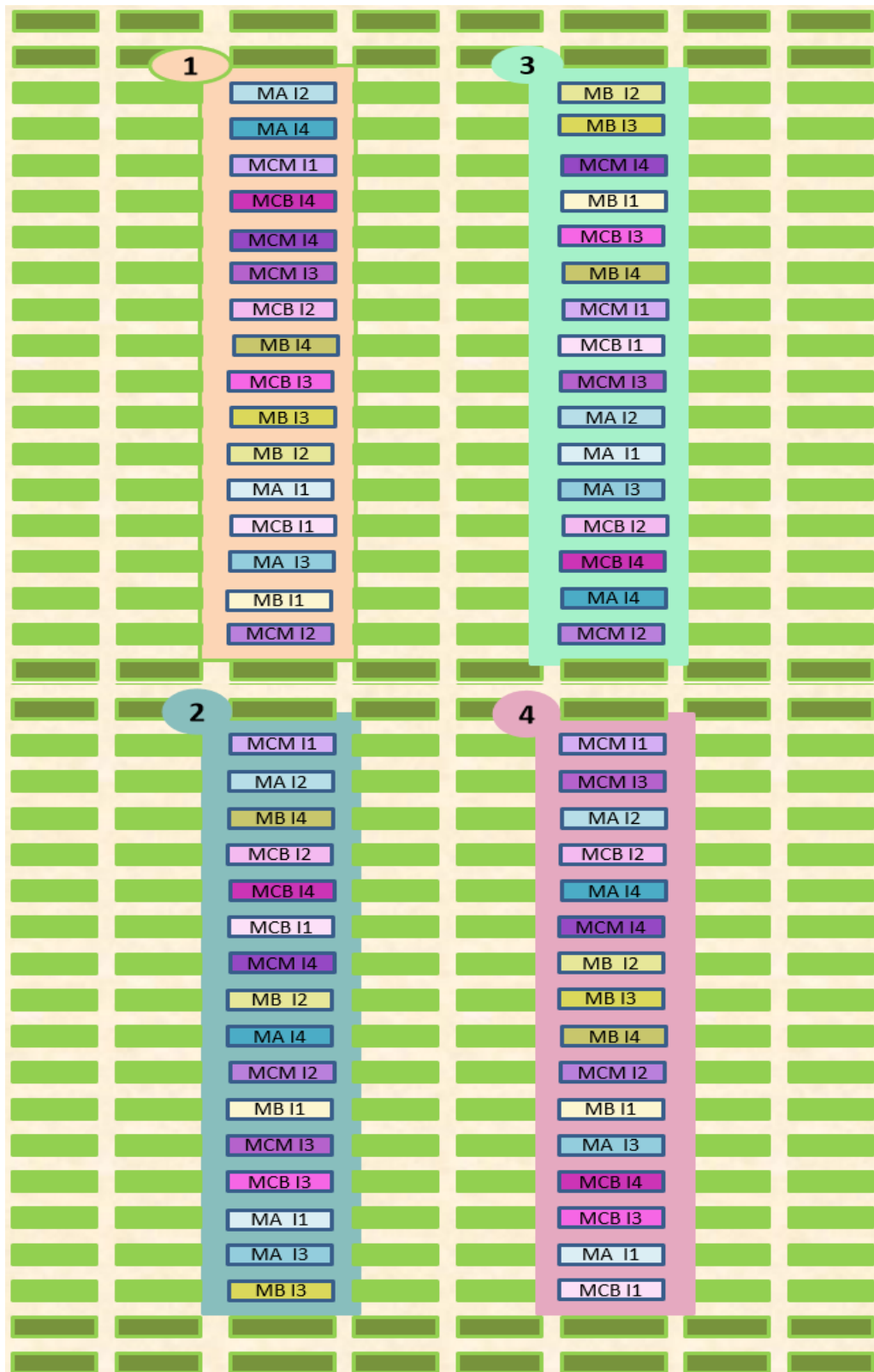
 MB I1	Maíz blanco inoculo 1
 MB I2	Maíz blanco inoculo 2
 MB I3	Maíz blanco inoculo 3
 MB I4	Maíz blanco inoculo 4
 MA I1	Maíz azul inoculo 1
 MA I2	Maíz azul inoculo 2
 MA I3	Maíz azul inoculo 3
 MA I4	Maíz azul inoculo 4
 MCB I1	Maíz cacahuacintle blanco inoculo 1
 MCB I2	Maíz cacahuacintle blanco inoculo 2
 MCB I3	Maíz cacahuacintle blanco inoculo 3
 MCB I4	Maíz cacahuacintle blanco inoculo 4
 MCM I1	Maíz cacahuacintle morado inoculo 1
 MCM I2	Maíz cacahuacintle morado inoculo 2
 MCM I3	Maíz cacahuacintle morado inoculo 3
 MCM I4	Maíz cacahuacintle morado inoculo 4
 Bloque 1	
 Bloque 2	
 Bloque 3	
 Bloque 4	
 Fila de maíces sin inocular	
 Columna de maíces sin inocular	

Figura 48. Distribución experimental en campo de los tratamientos de inoculación por inyección.



### 2.4.8.2 Diseño experimental para inoculación por espolvoreo

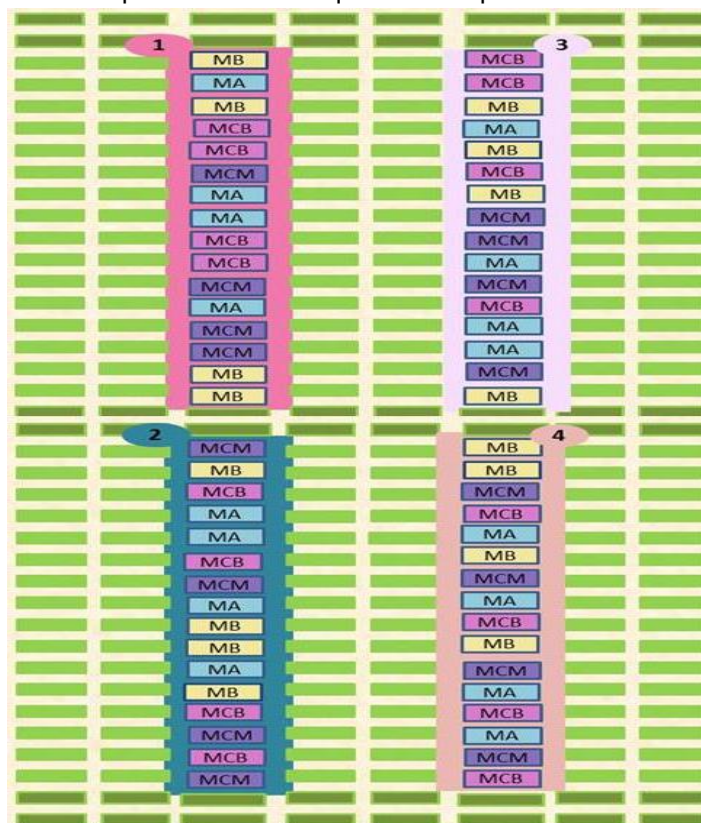
Para el método de espolvoreo se utilizó un diseño en bloques al azar, al respecto la mezcla fue de las 8 muestras de huitlacoche que se utilizaron para preparar los inóculos.

Hubo 4 tratamientos que consta de 1 planta por unidad experimental con 16 repeticiones y da un total de 64 plantas. En la imagen 49 se muestra el diseño de este método.

#### Simbología

<span style="background-color: yellow; border: 1px solid black; padding: 2px;">MB</span>	Maíz blanco	<span style="background-color: #e91e63; width: 20px; height: 10px; display: inline-block;"></span>	Bloque 1
<span style="background-color: #42a5f5; border: 1px solid black; padding: 2px;">MA</span>	Maíz azul	<span style="background-color: #4db6ac; width: 20px; height: 10px; display: inline-block;"></span>	Bloque 2
<span style="background-color: #e91e63; border: 1px solid black; padding: 2px;">MCB</span>	Maíz cacahuacintle blanco	<span style="background-color: #f0e6ff; width: 20px; height: 10px; display: inline-block;"></span>	Bloque 3
<span style="background-color: #4a4a8a; border: 1px solid black; padding: 2px;">MCM</span>	Maíz cacahuacintle morado	<span style="background-color: #e08080; width: 20px; height: 10px; display: inline-block;"></span>	Bloque 4
<span style="background-color: #90c040; width: 20px; height: 10px; display: inline-block;"></span>	Fila de maíces sin inocular		
<span style="background-color: #90c040; width: 20px; height: 10px; display: inline-block;"></span>	Columna de maíces sin inocular		

Figura 49. Distribución experimental de bloques en campo de la inoculación por espolvoreo.

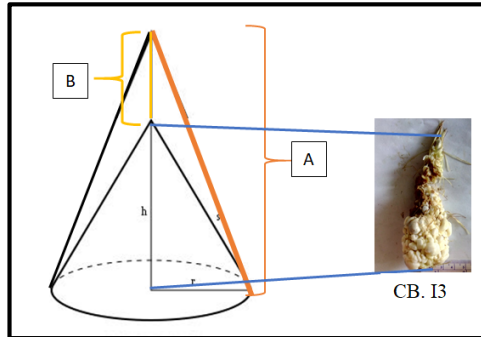


### 2.4.9 Método de aproximación para determinar el porcentaje de cobertura.

El diseño de esta metodología fue, con el objetivo de poder estimar un número más exacto, y medir el % de cobertura que el huitlacoche logro infestar en el elote.

Se tomó como referencia la figura geométrica más parecida a un elote infectado, al respecto se identificó que era un cono, como se puede apreciar en la figura 50.

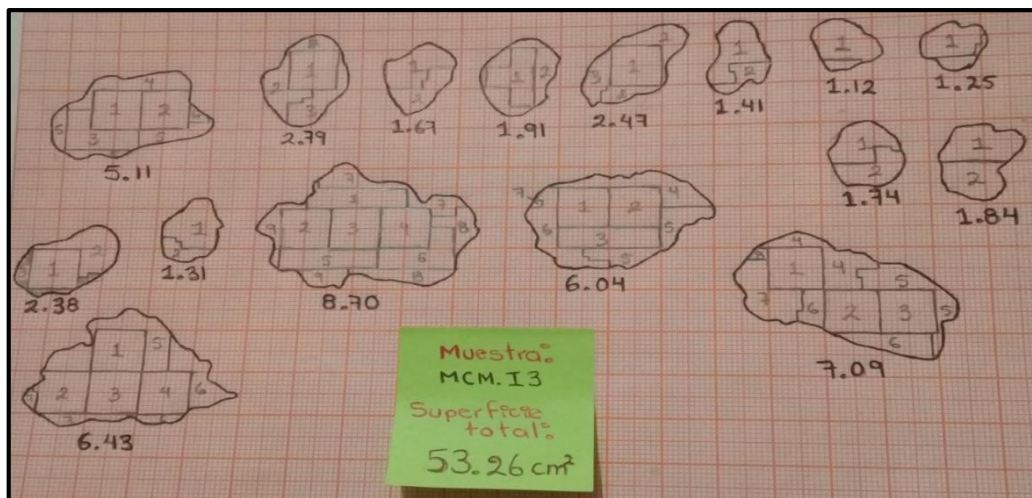
Figura 50. Muestra recolectada para calcular % de cobertura.



Mientras que la muestra recolectada, se le realizó una separación de las agallas con respecto a la mazorca, esto de manera manualmente y/o utilizando un cuchillo de cocina, posteriormente se dibujó cada agalla en hojas milimétricas, se contabilizaron todos los cuadros y se obtuvo el resultado en  $\text{cm}^2$ .

En la figura 51 se puede visualizar, las agallas que cubrían a la muestra de la recolecta 3, del método de inoculación con jeringa, perteneciente al maíz cacahuacintle blanco inoculo 3 (MCB I3), obteniendo una superficie total de  $53.26 \text{ cm}^2$ .

Figura 51. Cuadros contabilizados de la superficie de agallas.



Posteriormente se calculó la superficie de A y B con la siguiente fórmula:

$$\text{Superficie} = (\pi \cdot r^2) + (\pi \cdot r) (\sqrt{r^2 + h^2})$$

**Dónde:**

**h** = altura del cono.

**r** = radio de la base del cono.

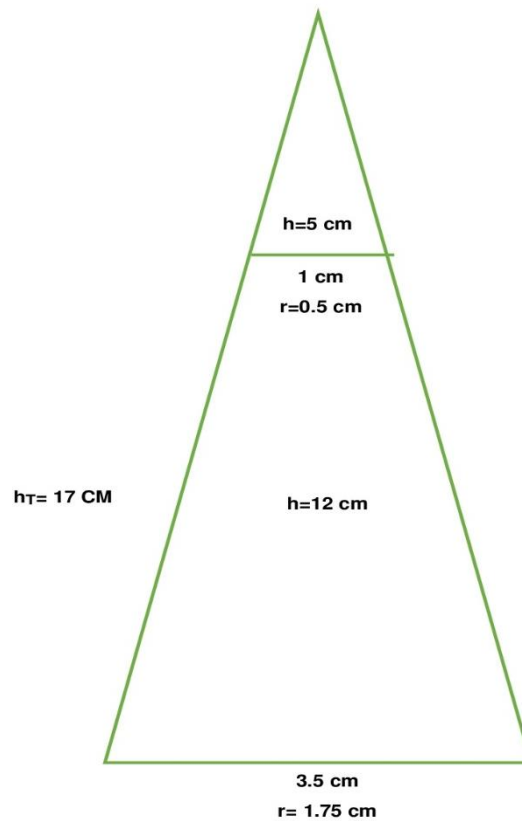
**A**= superficie total del cono.

**B**= superficie del pico del cono.

En la figura 52 se puede ver, la proyección de la muestra analizada con sus diferentes medidas para el cálculo de la superficie A y B.

**Por ejemplo: A = 112.7046 cm<sup>2</sup> y B = 9.4247 cm<sup>2</sup>.**

Figura 52. Proyección del huitlacoche maíz cacahuacintle blanco con inoculo 3.



**Para lograr la diferencia de A - B = Superficie del elote.**

**Por ejemplo:  $112.7046 \text{ cm}^2 - 9.4247 \text{ cm}^2 = 103.2798 \text{ cm}^2$ .**

Por lo tanto los aspectos como referencia son la **superficie del elote=100%** y la **superficie de las agallas = X**.

**Por ejemplo:  $103.2798 \text{ cm}^2 = 100\%$**

$$53.26 \text{ cm}^2 = X$$

Finalmente el resultado de esta relación, da el % de cobertura, más aproximado a la superficie que cubren las agallas en la mazorca tierna (elote).

**Obteniendo 51.5686% de cobertura de agallas.**

#### 2.4.10 Análisis estadístico

Todos los cálculos y pruebas estadísticas se realizaron utilizando un ANOVA multifactorial para la comparación de ambos métodos de inoculación, y un análisis por separado de ambos métodos con un ANOVA de un factor (o de una vía), en el caso de espolvoreo ya que se manejó la mezcla de muestras de huilacoche como una variable diferente que no se usó en el método de inyección para el cual se realizó un ANOVA multifactorial. El software estadístico usado fue el InfoStat (versión 2017); en ambos casos el nivel de confianza fue del 95%.

Se verificó la normalidad de los datos (% de infección, cobertura y rendimiento) con la prueba de Shapiro-Wilk y para comprobar homocedasticidad se utilizó el test de *Levene*, los cuales se describen un poco más adelante.

Partiendo de los supuestos anteriores, ambos métodos de inoculación se compararon en un diseño con bloques al azar. Los datos se sometieron a un análisis de varianza, para ver si existían diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre las variables % de infección, cobertura y rendimiento. Cuando se detectaron diferencias significativas, se procedió a la comparación de medias con la prueba de Tukey ( $p = 0.05$ ).

Se utilizó el siguiente modelo de ANOVA multifactorial sin interacción:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \epsilon_{ijk}$$

Dónde:  $\alpha_i$  es el efecto del factor  $F_1$  que es el método de inoculación por inyección,  $\beta_j$  es el efecto del factor  $F_2$  el método de inoculación por espolvoreo,  $\gamma_k$  es el efecto de los bloques y  $\epsilon_{ijk}$  es el error residual, que entendemos existe en todo experimento científico.

Con respecto a las variables del método de inoculación por inyección, que no cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se usó ANOVA multifactorial, y para corroborar los resultados, se utilizó la prueba no paramétrica de Friedman. Todas estas pruebas se utilizaron para comparar las medias de los diferentes tratamientos, y contrastar la prueba de hipótesis de que al menos una es diferente (hipótesis alternativa). Adicionalmente, con la finalidad de evitar cometer el error tipo I, (rechaza la hipótesis nula cuando ésta es verdadera, es decir, que no hay diferencias entre todos los tratamientos), se consideró la comparación múltiple de medias, mediante la prueba de Duncan.

Se utilizó un diseño experimental en bloques al azar, con cuatro repeticiones, en arreglo factorial 4x4, donde el F1 fueron las variedades de maíz: 1) maíz blanco; 2) maíz azul; 3) maíz cacahuacintle blanco; 4) maíz cacahuacintle morado. Y el F2 fueron los cuatro inóculos probados: 1) inóculo 1; 2) inóculo 2; 3) inóculo 3; 4) inóculo 4.

Se utilizó un modelo de ANOVA multifactorial con interacción:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Dónde:  $\alpha_i$  es el efecto del factor F1 en nivel i,  $\beta_j$  es el efecto del factor F2 en nivel j,  $\gamma_k$  es el efecto bloque y  $\epsilon_{ijkl}$  es el error residual. Si representamos por  $\mu_i$  a la media de todas las observaciones que tienen F1 en nivel i, y por  $\mu_j$  a la media de todas las observaciones que tienen F2 en nivel j, entonces  $\alpha_i = \mu_i - \mu$ ,  $\beta_j = \mu_j - \mu$ . Planteando las hipótesis:

$H_0$ : No existe efecto significativo entre las  $\mu_T$  para la producción de huitlacoche.

$H_a$ : Al menos un  $\mu_T$  será significativamente mejor para la producción de huitlacoche.

Para el método de inoculación por espolvoreo, se utilizó ANOVA unifactorial para comparar las medias, y aunque que dichos resultados tampoco cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad, pues en ambos casos sabemos que es posible aplicarla. Se verifico los resultados utilizando una prueba no paramétrica de Kruskal y Wallis, además de comparar las medias de los tratamientos mediante la prueba de Duncan.

Se utilizó un diseño experimental bloques al azar con dieciséis repeticiones, donde el F1 fueron las variedades de maíz: 1) maíz blanco; 2) maíz azul; 3) maíz cachuacintle blanco; 4) maíz cacahuacintle morado.

Se utilizó un modelo:

$$X_{ij} = \mu + \alpha_i + \gamma_k + \epsilon_{ij}$$

Dónde:  $X_{ij}$  es el valor observado,  $\mu$  media total,  $\alpha_i$  es el efecto del tratamiento,  $\gamma_k$  es el efecto bloque,  $\epsilon_{ij}$  es el error o residuo. Planteando como hipótesis:

$H_0$ : No existe efecto significativo entre las  $\mu_T$  para la producción de huitlacoche.

$H_a$ : Al menos un  $\mu_T$  será significativamente mejor para la producción de huitlacoche.

### CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A través del desarrollo experimental, el cultivo presentó ciertos eventos. La siembra se realizó el 20 de mayo del 2017, a los 15 días se hizo una resiembra debido a que no todas las plantas habían logrado emerger. Sin embargo si se logró el objetivo de contar con 16 plantas de cada tipo de maíz por cada método de inoculación, esto para probar los dos métodos planteados. A los 75 días de la siembra se detectó la aparición de chapulines en la parcela, a los cuales no se les aplicó ningún tratamiento químico para combatirlos, posteriormente a los 80 días se pudo ver los daños ocasionados a las plantas que ya habían emergido el jilote, donde los chapulines se comieron todos los estilos (pelos del elote).

#### 3.1 Comparación de los dos métodos de inoculación

Antes de estudiar las variables dependientes por separado, fue necesario comparar ambos métodos considerando al tipo de método como único factor.

Como seguimiento de esta actividad, se realizó un Análisis de varianza multifactorial, en cuanto a las tres variables evaluadas y dentro de este marco ver que método mostraba mejores resultados. En la tabla 10, se puede ver que solo existen diferencias entre el método de inyección y espolvoreo para la variable % de infección. Lo cual indica que uno de estos métodos es mejor para lograr un mayor % de infección.

Tabla 10. Análisis de Varianza para comparar los métodos de inoculación.

Variable dependiente	(I) Método de Inoculación	(J) Método de Inoculación	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig. <sup>b</sup>	95% de intervalo de confianza para diferencia <sup>b</sup>	
						Límite inferior	Límite superior
Porcentaje de infección	Inyección	Espolvoreo	18.750*	7.395	.013	4.108	33.392
	Espolvoreo	Inyección	-18.750*	7.395	.013	-33.392	-4.108
Cobertura por elote en grs	Inyección	Espolvoreo	5.111	4.083	.213	-2.974	13.195
	Espolvoreo	Inyección	-5.111	4.083	.213	-13.195	2.974
Rendimiento por elote en grs	Inyección	Espolvoreo	.090	.049	.069	-.007	.187
	Espolvoreo	Inyección	-.090	.049	.069	-.187	.007

Se basa en medias marginales estimadas

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel .05.

b. Ajuste para varias comparaciones: Bonferroni.

Al mismo tiempo se realizó una prueba de comparación de medias, para el porcentaje de infección en los métodos.

En la tabla 11, se observa que el método de inyección, muestran resultados superiores al método de espolvoreo.

Tabla 11. Prueba de Tukey para el porcentaje de infección.

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=14.64178					
<i>Error: 1750.0000 gl: 120</i>					
Método	Medias	n	E.E.		
Polvo	14.06	64	5.23	A	
Inyección	32.81	64	5.23		B
<i>Medias con una letra común no son significativamente diferentes (<math>p &gt; 0.05</math>).</i>					

El ANOVA aplicado en los métodos de inoculación nos permitió rechazar  $H_0$ , para la variable porcentaje de infección, exponiendo que es más conveniente la inoculación por inyección en lugar de la inoculación por espolvoreo, observando que el porcentaje de incidencia de huitlacoche fue mayor en el método de inyección.

Estos resultados son similares a los observados en Hidalgo (1995), quien inicialmente empleo teliosporas (método de espolvoreo) y luego, al cambiar a basidiosporas (método de inyección), incremento la incidencia de agallas en las parcelas.

Los resultados de este fenómeno está relacionado con el ciclo de vida del hongo, debido que si se emplear basidiosporas hay ventajas de que al hacer la aplicación en el hospedero puede germinar e iniciar la invasión de tejido inmediatamente, teniendo una mayor posibilidad de establecer la infección; en cambio, las teliosporas tienen que pasar por un proceso de germinación, meiosis y producción de basidiosporas, proceso que implica tiempo y lo más importante que se tengan las condiciones favorables para que esto suceda, mismas que pueden perderse fácilmente.

Al comparar estas evidencias se obtuvo que la inoculación por inyección es mejor, para una producción masiva en cuanto a que el porcentaje de infección es mayor, sin embargo se estima que se requiere de gastos económicos más elevados, porque son necesarios medios de cultivo para el aislamiento, tecnología adecuada, materiales de laboratorio, conocimiento de trabajo dentro de este, un mayor consumo de tiempo, compra de jeringas para inocular, capacitación para una adecuada inoculación, etc. Al comparar estas

evidencias con la inoculación por espolvoreo, resulta ser esta más atractiva para los productores ya que tienen los elementos necesarios a su alcance, no requiere elevados gastos económicos y ni un consumo de tiempo elevado, todo lo pueden hacer sin necesidad de grandes conocimientos o un asesoramiento técnico.

Por otra parte es importante la producción de huitlacoche para el buen vivir por ser un alimento apreciado, teniendo en cuenta un buen manejo en la producción, utilizando de manera adecuada el agua o incluso sacar ventaja de las condiciones climáticas de la región donde se vive, controlar las plagas sin causar daño a la naturaleza, no consumir productos que contribuyan al cambio climático y tener bien en claro que la tierra es algo que no se puede desechar ni vender. Además de que al producir nuestros propios alimentos nos aseguramos de que podemos cumplir con el concepto del Buen comer donde nosotros sabemos cómo producimos, que hacemos, y cómo será la calidad de nuestro alimento. Donde los productores puedan producir en maíces de la región susceptibles al hongo y de esta manera las familias consuman un alimento de calidad y además pueda estar disponible desde mercados hasta centros gourmets, estando accesible para todos a un buen precio.

Considerando la disminución al máximo del consumo energético, utilizando recursos que estén al alcance como abonos orgánicos, abonos verdes, estiércol de animales estos con un buen beneficio al suelo y ver si se obtienen mejores rendimientos en cuanto a la producción, sin necesidad de despilfarrar lo que genera más gastos y mayor consumo de energía, y cuando se realice la cosecha podemos utilizar los restos para incorporar al suelo para evitar la erosión o como materia para realizar compostas, etc.

Realmente hay productores que inconscientemente entran en el concepto de la Agroecología por la manera de ver a este hongo tolerando su presencia en los cultivos de maíz viéndolo como una bendición por el exquisito uso en los diferentes platillos.

Donde en cuestiones económicas de mercado, el maíz infectado cuesta el 50% más que el sano y el comer una tortilla con huitlacoche nos da todo lo que necesitamos en un solo plato.

### 3.2 Análisis por separado de cada método de inoculación

Como complemento se realizó un análisis por separado de cada método de inoculación analizando cada una de las variables dependientes (porcentaje de infección, cobertura y rendimiento). Asimismo se determinó el rendimiento de huitlacoche limpio con resultados del rendimiento obtenido.

#### 3.2.1 Porcentaje de infección para método de inoculación por inyección

El porcentaje de infección se determinó contabilizando las mazorcas de cada tipo de maíz con síntomas de infección (agallas).

El análisis de la varianza multifactorial, reportó que no hubo diferencias significativas con un P-valor de 0.0741 (maíz\*Inoculo), lo cual indica, que el factor 1 considerado el tipo de maíz, y el factor 2 considerado el tipo de inoculo, no presentan diferencias en cuanto a esta variable. Además se aplicó una prueba no paramétrica de Friedman, la cual indico un P-valor de 0.0693, ambas pruebas aceptando hipótesis nula (Ho).

Con el objeto de comparar las medias de los tratamientos, se realizó la prueba de Duncan, en la tabla 12 se muestran los resultados.

Tabla 12. Prueba de Duncan para el porcentaje de infección.

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.			
MCM I 1	0.00	4	21.35	A		
MB I3	0.00	4	21.35	A		
MCB I3	0.00	4	21.35	A		
MB I4	25.00	4	21.35	A	B	
MA I2	25.00	4	21.35	A	B	
MA I4	25.00	4	21.35	A	B	
MCB I4	25.00	4	21.35	A	B	
MCB I2	25.00	4	21.35	A	B	
MCM I3	25.00	4	21.35	A	B	
MA I3	25.00	4	21.35	A	B	
MA I 1	25.00	4	21.35	A	B	
MCM I4	25.00	4	21.35	A	B	
MB I2	50.00	4	21.35	A	B	C
MCM I2	75.00	4	21.35		B	C
MCB I 1	75.00	4	21.35		B	C
MB I 1	100.00	4	21.35			C
<i>Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p &gt; 0.05)</i>						

Se observaron 3 grupos de medias, donde los tratamientos que presentaron menor porcentaje de infección fueron MB. I3, MCB. I3 y MCM I1, los cuales no lograron infectar a ninguna planta. Los tratamientos donde se observó mayor porcentaje de infección fueron MB. 12, MCM. I2, MCB. I1 y MB.I1, con valores de 50, 75, 75 y 100%, respectivamente, donde se puede observar que el mejor tratamiento fue el del maíz blanco inoculo 1 (MB I1), ya que presentó el 100% de infección, lo que significa que todas las plantas inoculadas presentaron infección, siendo este el mejor tratamiento.

Al respecto los valores obtenidos en este método, coinciden con lo reportado por Valdez *et al.*, (2009), donde obtuvieron en 16 genotipos de maíz criollo de floración intermedia donde hubo variaciones en los porcentajes de infección en mazorcas desde el 31 a 92% (promedio 72%).

La búsqueda de evidencias en cuanto al alto porcentaje de infección en maíces dulces (maíz cacahuacintle blanco y maíz cacahuacintle morado), coincide con lo reportado (Pataky, 1991; Pope y Mc Carter, 1991; Pope y McCarter, 1992), que menciona, el trabajar con maíces dulces y variación de combinaciones de cepas por método de inyección transversal de mazorcas por el canal de los estilos, se obtiene un 97% de infección y un grado de severidad alto. Sin embargo, se pudo ver que el maíz blanco es más vulnerable al ataque de *Ustilago maydis*. Esto se puede deber al contenido de carbohidratos y que es el maíz que se produce en la región, y por tanto está más adaptado.

De los cuatro inóculos que se elaboraron el que mostro mejores resultados fue el inoculo 1 que se elaboró con muestras procedentes de Atlixco, Ciudad de México y San Antonio Portezuelo, las cuales presentaron desde las pruebas en el laboratorio los mejores criterios, ya que a simple vista presentó la mayor cantidad de teliosporas en las agallas, así como el mayor crecimiento en el medio de cultivo.

Se debe destacar que en este experimento hubo sucesos que pudieron afectar, como la temperatura y humedad relativa no fueron las favorables debido a que se presentaron fenómenos climáticos muy severos, con la entrada de dos huracanes, el primero fue Harvey inicio el 17 de agosto al 3 de septiembre posteriormente, Katia del 4 al 9 de septiembre los cuales influyeron de manera negativa en el experimento, ocasionando

podriciones en ciertas variedades, ya que en esas fechas se realizó la inoculación con jeringa.

Aunando a la situación diferentes autores (Agrios, 1989 y Girón, 1994) consideran la temperatura un factor importante, sin embargo la alta humedad relativa y las lluvias influyeron en la baja incidencia de huitlacoche, debido a que inocular con jeringa se le causa un daño mecánico a la planta.

### 3.2.2 Porcentaje de infección para método de inoculación por espolvoreo

El porcentaje de infección para este método se determinó contabilizando las mazorcas de cada tipo de maíz con presencia de huitlacoche por cada 16 plantas inoculadas con *U. maydis* en cada uno de los cuatro tipos de maíz.

Los resultados del análisis de varianza unifactorial, reporto que esta variable no mostro diferencia significativas presentando un P-valor = 0.2181. Además se aplicó una prueba no paramétrica, la de Kruskal y Wallis presentando un P-valor = 0.2164, sin embargo los resultados concluyeron en lo mismo ambas aceptaron la Ho. Lo que indica que el tipo de maíz no es un factor determinante para el porcentaje de infección.

Se aplicó la prueba de Duncan para comparar las medias de los tratamientos, en la tabla 13 se muestran los resultados, de los cuales las conclusiones derivadas indican que utilizar cualquiera de estos maíces para la producción de huitlacoche por este método de inoculación es igual.

Tabla 13. Prueba de Duncan para porcentaje de infección.

TRATAMIENTO	Medias	N	E.E.	
M.A.	0.00	16	8.65	A
M.B.	12.50	16	8.65	A
M.C.M.	18.75	16	8.65	A
M.C.B.	25.00	16	8.65	A
<i>Medias con una letra común no son significativamente diferentes (<math>p &gt; 0.05</math>)</i>				

De acuerdo a lo observado, este método a comparación del método por inyección no presento pudriciones, debido que al inocular por espolvoreo no se le causa ningún tipo de daño a la planta.

Sin en cambio Pataky *et al.*, (1995), menciona que la gran mayoría de las variedades de maíz presentan algún grado de resistencia al ataque de *Ustilago maydis*, siendo las variedades de maíz dulce las más susceptibles a esta enfermedad. Al mismo tiempo, los resultados de maíz azul se pueden deber a lo reportado por Méndez *et al.*, (2005), indica que el maíz azul ofrece características nutricionales muy interesantes destacando: una menor cantidad de almidón, un índice glucémico inferior menor al maíz normal (interesante para personas diabéticas), y una carga proteica superior en un 20% al del maíz blanco. Además de que este maíz es una fuente importante de carbohidratos. Los azúcares constituyen aproximadamente el 2% del peso total del grano y cerca del 65% de los azúcares del grano se encuentran en el germen. Contienen fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa, rafinosa y algunos oligosacáridos (Boyer y Shannon, 2001).

### **3.2.3 Cobertura para método de inoculación por inyección**

La cobertura se determinó el mismo día de la recolecta, se trabajó con los datos del método de aproximación propuesto ya que los valores obtenidos son parecidos a la escala hedónica, sin embargo el método propuesto proporciona un número exacto y por tanto es más confiable a la hora de analizar los datos.

El análisis de varianza multifactorial mostro un p-valor de 0.1018 (maíz\*inoculo). Además se aplicó una prueba no paramétrica de Friedman presentando un P-valor de 0.1076 lo que indica que no hay diferencias significativas para esta variable.

Sin embargo se optó por realizar la prueba de Duncan, para comparar las medias de los tratamientos (ver tabla 14).

Tabla 14. Prueba de Duncan para cobertura.

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.		
<b>MCB I3</b>	0.00	4	10.63	A	
<b>MCM I1</b>	0.00	4	10.63	A	
<b>MB I3</b>	0.00	4	10.63	A	
<b>MA I3</b>	1.04	4	10.63	A	
<b>MB I4</b>	4.78	4	10.63	A	
<b>MCB I2</b>	7.13	4	10.63	A	
<b>MCM I4</b>	11.67	4	10.63	A	
<b>MA I1</b>	11.68	4	10.63	A	
<b>MA I2</b>	12.75	4	10.63	A	
<b>MCM I3</b>	12.89	4	10.63	A	
<b>MB I2</b>	13.53	4	10.63	A	
<b>MA I4</b>	17.44	4	10.63	A	
<b>MCB I4</b>	17.51	4	10.63	A	
<b>MB I1</b>	26.64	4	10.63	A	B
<b>MCM I2</b>	28.31	4	10.63	A	B
<b>MCB I1</b>	51.81	4	10.63		B
<i>Medias con una letra común no son significativamente diferentes (<math>p &gt; 0.05</math>)</i>					

Al respecto se observó dos grupos de medias, donde los mejores tratamientos fueron MCB I1, MCM I2 y MB I1 con un promedio de cubrimiento de 51.81, 28.31 y 26.64 % respectivamente. El MCB I1 fue el mejor tratamiento siendo este el único tratamiento que presento 2 mazorcas infectadas en una escala de 75-100% y 1 de 26-50% de cobertura. Los peores tratamientos fueron MCB I3, MCM I1 y MB I3 donde no hubo valores para grado de cubrimiento.

Los tratamientos de MA I3, MB I4 y MCB I2 presentaron valores de grado de cubrimiento muy bajos esto se puede deber a la poca virulencia de las muestras para infectar a los maíces y por lo tanto se tiene un menor grado de cubrimiento.

Los valores de los tratamientos MCB I1, MCM I2 y MB I1 coinciden con lo reportado por Vanegas (1995), quien obtuvo porcentajes de cobertura que variaron del 30, 60 al 71% en maíz híbrido.

El tratamiento MCB I1 coincide con lo reportado por Ruiz en 1995 quien obtuvo el 74% de las mazorcas con agallas en grado de cubrimiento 50-100% al inocular *U. maydis* en la base del jilote con el híbrido de maíz PNS-4019.

### 3.2.4 Cobertura para método de inoculación por espolvoreo

Para el método de inoculación por espolvoreo se obtuvieron resultados del ANOVA unifactorial  $p=0.3087$ , utilizando el método de aproximación. Además se analizaron los datos mediante un análisis de varianza no paramétrico con la prueba de Kruskal Wallis con un resultado de  $P=0.2431$ . Ambas pruebas indican que no hay diferencia significativa entre el tipo de maíz, por lo tanto no es un factor determinante para el cubrimiento de huitlacoche en una mazorca infectada.

Por otra parte, se realizó una prueba de comparación de medias, utilizando la prueba de Duncan (ver tabla 15). La cual indica que el tipo de maíz no es un factor determinante para la cobertura de huitlacoche, por lo tanto es lo mismo utilizar cualquiera de estos cuatro maíces para producir de esta manera.

Tabla 15. Prueba de Duncan para la cobertura de huitlacoche.

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.	
M.A.	0.00	16	5.59	A
M.C.M.	9.02	16	5.59	A
M.B.	10.01	16	5.59	A
M.C.B.	14.83	16	5.59	A

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*

De acuerdo a los resultados obtenidos en cobertura, a los productores les beneficia en cuanto a utilizar cualquiera de estos tipos de maíz, utilizando el que este más a su alcance, pues los porcentajes de cobertura son muy parecidos. Esto ayudándoles a que no tengan que comprar un maíz en específico.

### 3.2.5 Rendimiento para método de inoculación por inyección

El rendimiento nos indica la relación del peso total de la mazorca con el peso que corresponde al huitlacoche, este parámetro se evaluó el mismo día que se realizó la cosecha.

#### 3.2.5.1 Rendimiento

Para analizar los resultados de rendimiento del huitlacoche se realizó un análisis de varianza donde se obtuvo un  $p=0.0722$ , lo cual indica que no hay diferencias significativas en los tratamientos.

Sin embargo se realizó una prueba de Duncan para comparar las medias de los tratamientos, ver (tabla 16).

Tabla 16. Prueba de Duncan para rendimiento de huitlacoche.

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.			
<b>MCM I1</b>	0.00	4	0.13	A		
<b>MB I3</b>	0.00	4	0.13	A		
<b>MCB I3</b>	0.00	4	0.13	A		
<b>MA I3</b>	0.02	4	0.13	A		
<b>MA I4</b>	0.02	4	0.13	A		
<b>MB I4</b>	0.03	4	0.13	A		
<b>MCM I4</b>	0.05	4	0.13	A		
<b>MA I2</b>	0.10	4	0.13	A		
<b>MCM I3</b>	0.12	4	0.13	A		
<b>MA I1</b>	0.13	4	0.13	A		
<b>MCB I2</b>	0.18	4	0.13	A	B	
<b>MB I2</b>	0.21	4	0.13	A	B	
<b>MCB I4</b>	0.23	4	0.13	A	B	
<b>MCM I2</b>	0.34	4	0.13	A	B	C
<b>MCB I1</b>	0.57	4	0.13		B	C
<b>MB I1</b>	0.67	4	0.13			C

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).*

Los tratamientos presentaron 3 grupos de medias, donde destaca que los mejores tratamientos fueron MCM I2, MCB I1 y MB I1 con valores promedio de 0.34, 0.57 y 0.67 respectivamente. Los peores tratamiento fueron los mismos que no presentaron porcentaje de infección MB I3, MCB I3 y MCM I1 mientras que los tres tratamientos que presentaron más bajo valor fueron MB I4, MA I4 y MA I3.

Los rendimientos son de 0.02 a 0.67, con pesos promedio de huitlacoche por mazorca de 45.21 g.

Estos valores de rendimiento son bajos a los reportados por (Valverde *et al.*, 1993; Vanegas, 1995 y Pataky y Chandler, 2003); los últimos autores reportaron pesos de hasta 131g de huitlacoche por mazorca. Y con Valdez *et al.*, 2009 que utilizo líneas el criollo de San Juan Xidoo, criollo de la Cuadrilla y Corina 85-2, fueron las que presentaron los mejores rendimientos (superiores a 0.80 en todos los casos). Pero es necesario considerar que el bajo rendimiento se debe a las condiciones climáticas severas que ocasionaron un 50% de pudriciones.

Además cabe señalar que la utilización de maíces criollos representa una ventaja económica para los productores, el uso de estos materiales evitaría la compra de semilla cada ciclo agrícola. El maíz blanco es el más recomendable para producir huitlacoche tomando en cuenta los resultados de porcentaje de infección y rendimiento.

### 3.2.5.2 Rendimiento de huitlacoche limpio

Se determinó el rendimiento de huitlacoche limpio que representa los kilogramos de agallas producidas en una hectárea de terreno sembrado con maíz. Este rendimiento se determinó inoculando 1 mazorca por planta.

Para determinar el rendimiento del huitlacoche limpio se utilizó una densidad de 45 000 plantas por hectárea, que es la que el productor utiliza en su parcela. Considera densidades bajas, ya que son las adecuadas para criollos porque se obtiene mejor calidad de mazorcas y de esta manera la planta resiste más las sequías que se presentan en los cultivos temporales.

En la tabla 17 se puede observar que los mejores tratamientos fueron MB I1, MCB I1 y MCM I2 con valores de 30.22, 25.76 y 15.50 kg/ha respectivamente.

Tabla 17. Rendimiento de huitlacoche limpio.

TRATAMIENTO	RENDIMIENTO (Kg/ha)
MB I3	0
MCB I3	0
MCM I1	0
MA I3	0.82575
MB I4	1.213875
MCM I4	2.154375
MB I2	4.0725
MA I2	4.29975
MCM I3	5.38875
MA I1	6.04125
MCB I2	8.213625
MA I4	8.260875
MCB I4	10.188
MCM I2	15.50475
MCB I1	25.767
MB I1	30.225375

Sin embargo los rendimientos obtenidos son muy bajos en comparación con lo reportado por Ruiz (1999), ya que se obtuvo un rendimiento de huitlacoche limpio de 1973 kg/ha con el 75% de las plantas infectadas y utilizando una densidad de plantas por hectárea de 31, 250. Ulloa, en el año 2002, obtuvo un rendimiento de agallas de huitlacoche de 1, 678 kg/ha con el 76.73% de las plantas infectadas en una densidad de plantas por hectárea 20, 800.

Garibaldi (2003), logro producir 3,854 kg/ha de huitlacoche limpio con el 77.73% de infección de plantas y utilizando una densidad de plantas por hectárea de 62,000.

Este bajo rendimiento puede deberse a que en esta investigación se hizo a condiciones de temporal y se usó maíces criollos. Cabe destacar que en los trabajos de Ruiz (1999) y Garibaldi (2003) utilizaron maíces híbridos y fue en un sistema de riego. Otra explicación al bajo rendimiento puede ser que hubo mucha pudrición debido a la herida ocasionada al momento de la inoculación y luego presentarse la entrada de los dos huracanes descritos anteriormente. Es por eso que hay que considerar que actualmente el clima ha cambiado y seguirá cambiando de manera muy drástica debido al calentamiento global causado por la contaminación.

### **3.2.6 Rendimiento para el método de inoculación por espolvoreo**

Se determinó el rendimiento y posteriormente se calculó el rendimiento de huitlacoche limpio (Kg/ha). Considerando que se inoculo una mazorca por planta.

#### **3.2.6.1 Rendimiento**

Para determinar el rendimiento de huitlacoche en el método de inoculación por espolvoreo, se aplicó un análisis de varianza unifactorial arrojando un  $p=0.3090$ , además de realizar la prueba de Kruskal Wallis, obteniendo valores de  $p=0.2396$ .

Ambas pruebas nos permiten aceptar  $H_0$ , lo que indica que no hay diferencia significativa en el tipo de maíz por lo tanto no importa el que se utilice, los rendimiento en cualquiera de estos son muy parecidos.

Se realizó la prueba de Duncan para comparar las medias, los resultados se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Prueba de Duncan para rendimiento.

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.	
<b>M.A.</b>	0.00	16	0.06	A
<b>M.C.M.</b>	0.10	16	0.06	A
<b>M.B.</b>	0.10	16	0.06	A
<b>M.C.B.</b>	0.15	16	0.06	A
<i>Medias con una letra común no son significativamente diferentes (<math>p &gt; 0.05</math>)</i>				

### 3.2.6.2 Rendimiento de huitlacoche limpio

Para determinar el rendimiento del huitlacoche limpio se utilizó una densidad de 45 000 plantas por hectárea, que es la que el productor utiliza en su parcela.

El peso de las agallas en este método varió considerablemente en los diferentes tipos de maíces desde 14.2 g hasta 146.4 g.

En la tabla 19, se pueden observar los resultados del rendimiento de huitlacoche limpio, los cuales son kg/ha muy bajos en comparación con el otro método.

Tabla 19. Rendimiento de huitlacoche limpio en método de espolvoreo.

TRATAMIENTO	RENDIMIENTO (Kg/ha)
MB	4.69688
MA	0
MCB	6.56747
MCM	4.45753

#### 4. CONCLUSIONES

En base a los objetivos de este trabajo, las conclusiones son las siguientes:

1. El método de inoculación por inyección resulto ser estadísticamente mejor que el método de espolvoreo en la variable infección, presentando porcentajes promedio de infección de 32.81 y 14.06% respectivamente y mostraron similitud en las variables de cobertura y rendimiento. El tipo de maíz no es un factor determinante para la producción de huitlacoche, ya que no se encontró diferencias significativas.
2. Económicamente y sustentablemente es más viable la producción de huitlacoche por el método de espolvoreo, ya que resulta ser una buena alternativa para los pequeños productores y produzcan su propio huitlacoche con recursos locales a su alcance ya que no requieren elevados gastos económicos, un consumo de tiempo elevado, grandes conocimientos o asesoría técnica.
3. La elaboración de inóculos con diversas muestras de huitlacoche resulto ser favorable para incrementar el porcentaje de infección esto cuando la inoculación es por inyección.
4. La prueba de Duncan para el método de inyección mostro que los mejores tratamientos fueron MB I1, MCB I1 Y MCM I2 ya que obtuvieron valores de 100, 75,75% de infección, 26.64, 51.87 y 28.31% de cobertura y 0.67, 0.57 y 0.34 de rendimiento respectivamente.
5. La prueba de Duncan para el método de espolvoreo no mostro diferencias significativas en relación a las variables evaluadas.

## 5. RECOMENDACIONES

- Seguir con las investigaciones para la producción masiva de *Ustilago maydis* implementando la combinación de ambos métodos de inoculación para lograr porcentajes de infección más altos.
- Se propone a próximos investigadores, realizar la inoculación con jeringa en etapa de jilote, evitando la etapa lechosa, así no se le ocasionara daños al jilote ni se presentara el derrame de inóculo.
- Se propone a próximos investigadores formular y utilizar inóculos provenientes de muestras recolectadas de maíces criollos.
- Se propone realizar evaluaciones de tipo económico para corroborar económicamente cual método de producción de huitlacoche es mas conveniente.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. (1989). Fitología. 3<sup>er</sup> Reimp. Ed. Limusa. México. 756 p.
- Agrios, G. N. (2005). Plant pathology. 5th ed. Academic Press. USA. 922 p.
- Agrios, G.N. (1988). Planta Patología. 2 ed. New York. Academia Press. 703 p.
- Alexopoulos, C. J., Mims C. y Blackwell M. (1996). Introductory mycology. Fourth Edition. USA: Ed. John Wiley & Sons, Inc.
- Anónimo. (1989). Caviar Azteca. Más 1:2.
- Arnold, C. (1992). Postharvest and marketing of huitlacoche, the Maíz mushroom (*Ustilago maydis*-Corn smut). Acta Horticultura 318:321-324.
- Banuett, F. (1992). *Ustilago maydis*, the delightful blight. Trends in Genetics 5:174-180.
- Banuett, F. y Herskowitz, I. (1994). Morphological Transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the *and b* locy. Experimental mycology, 18: 247-266.
- Benson, L. (1962). Plant Taxonomy. Methods and Principles. The Royal Press Co. New York, U.S.A. 494 p.
- Benz, B. F. (1986). Taxonomy and evolution of Mexican maize. Unpublished Ph D Dissertation. University of Wisconsin. 433 p.
- Benz, B. F. (2001). Archaeological evidence of teozintle domestication from Guilá Naquitz. PNAS 98 (4): 2104-2106.
- Bernal, M. H. 2017. Enfoque Marxista/ambientalista “Proyectos de I+D” Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Unidad Regional. Tecamachalco. 05 de marzo de 2017.
- Bernal, M. H. 2017. La flor de la Permacultura “Proyectos de I+D” Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Unidad Regional. Tecamachalco. 10 de marzo de 2017.
- Bernal, M. H. y Ramírez V. B. (2011). Diversidad genética de huitlacoche (*Ustilago maydis*) y su conservación como recurso genético. En Calderón Fernández, María Leticia. Investigación Interdisciplinaria para el desarrollo en Puebla y Tlaxcala (pág. 29), Puebla y Tlaxcala: Altres Costa- Amic.

- Boyer, C. y Shannon, J. (2001). Carbohydrates of the kernel, corn: chemistry and technology. *Journal of Cereal Science*. 1:253-272.
- Calderón Fernández, M. L. (2010). Tesis: caracterización clásica y molecular del huitlacoche [*Ustilago maydis* D.C. (Corda)], hongo de importancia social y económica en la Región Central de México. Colegio de Posgraduados. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Puebla, Puebla. Obtenido en: [http://www.biblio.colpos.mx:8080/xmlui/handle/10521/319/Calderon\\_Fernandez\\_DC\\_EDAR\\_2010.pdf?sequence=1](http://www.biblio.colpos.mx:8080/xmlui/handle/10521/319/Calderon_Fernandez_DC_EDAR_2010.pdf?sequence=1).
- Cano, C. C., Acevedo. L., Ponce, N. P., Flores, M. I., Flores, C. A., Leal, M. CA. Induction of lytic enzymes by the interaction of *Ustilago maydis* with *Zea mays* tissues. *Fungal Genet Biol*. 2000; 29:145–151. Doi: 10.1006/fgbi.2000.1196.
- Carpenter, J., Sánchez G. & E. Villalpando (2005). The Late Archaic/Early Agricultural Period in Sonora, Mexico. *New Perspective on the Late Archaic Across the Borderlands*. University of Texas Press, Austin. pp. 3-40.
- Carpenter, S. J. (2006). Reflexiones sobre el maíz prehispánico en Sinaloa y Sonora. Comunicación personal.
- Carrera, V. J. A., Ortega P. R., Ron P. J., Morales, R. M., Márquez, L. A. (en prensa). Cinco nuevas razas de maíz en Michoacán y áreas adyacentes de Jalisco (REV. FIT. MEXICANA).
- Chang, S. T. 1999. Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century: nongreen revolution. *Int. Journal of Medicinal Mushrooms* 1: 1-7.
- Chang, S. T. y P. G. Miles. 2004. *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, environmental impact*. CRC Press, Boca Raton.
- Christensen, J. J. (1963). Corn Smut caused by *Ustilago maydis* Cda. *The American Phytopathological Society*. Department of Plant Pathology and Botany. Institute of Agriculture, University of Minnesota, St. Paul. 41 p.
- Christensen, J. J. (1963). Corn smut caused by *Ustilago maydis*. *Monograph No. 2*. The American Phytopathological Society. p: 41.

- Cota, C. B. (2004). Evaluación de cepas locales de *Ustilago maydis* en maíz para la producción de huitlacoche en el valle del Yaqui. Mayo 12, 2018. De Indexe Sitio web: [https://biblioteca.itson.mx/dac\\_new/tesis/48\\_ciria\\_cota.pdf](https://biblioteca.itson.mx/dac_new/tesis/48_ciria_cota.pdf).
- De Franco, K. N. (1976). Corn smut is a delicacy. *Organic Gardening and Farming* 23(9):79.
- Descarga mapas. Net. 2016 [Mapa de municipios de Puebla, México en descarga mapas.net]. Recuperado el 23 de junio de 2018 de <http://descargamapas.net/mexico/puebla/mapa-estado-puebla-municipios>.
- FAO. (1993). El maíz en la nutrición humana. Colección FAO: Alimentación y nutrición, N° 25. ISBN 92-5-303013-5. Roma, Italia.
- Feeney, M. J. 2006. Optimizing vitamin D2 in mushrooms: Pilot study to expose mushrooms to ultraviolet light. *Mushroom News* 54(5): 2-24.
- Galarza, M. (1996). Aumente su cosecha de maíz en la Sierra. Quito, Ec., Estación Experimental "Santa Catalina". *Boletín Divulgativo*. p. 12.
- Garcés, N. (1999). Cultivos de la Sierra Ecuatoriana. Quito, Ec., Universidad Central, Facultad de Ingeniería Agronómica y Medicina Veterinaria. p. 84.
- Garibaldi, C.J.M. (2003). Fertilización nitrogenada y densidad de plantas de maíz (*Zea mays*) L. con fatigación y acolchado plástico en la producción de huitlacoche *Ustilago maydis* (D.C) Corda, en el Valle del Yaqui. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Sonora. Cd. Obregón Sonora.
- Garibay-Origel, R, J. Caballero, A. Estrada-Torres, and J. Cifuentes. 2007. Understanding cultural significance, the edible mushrooms case. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 11:3-4.
- Girón, C. R. (1994). Principales enfermedades del maíz en el norte de Tamaulipas en el ciclo otoño- invierno. CIR-Noreste, INIFAP, SARH. Publicación especial No 22. 31 p.
- González, S. V. (2008). Agroecología. Saberes campesinos y agricultura como forma de vida. Universidad Autónoma Chapingo, México. 177 p.
- Google earth. (s.f.). [Mapa de zona de experimentación Acatzingo, Puebla en Google earth]. Recuperado el 23 de junio, 2018, de: <https://earth.google>.

com/web/@18.98245873,97.73384071,2129.19524354a,9902.24328037d,35y,0.0000001h,45.06173786t,-Or.

- Gudynas, E. y A. Acosta. (2011). El Buen vivir o la disolución de la idea del progreso, en Rojas M. (Ed.) La medición del progreso y el bienestar. Propuestas desde América Latina. Foro Consultivo Científico y Tecnológico de México, México. pp. 103-110.
- Guerrero, A. (1987). Cultivos herbáceos extensivos. Cuarta edición revisada y ampliada. Mundi prensa. España.
- Guevara, L. F., Valverde M.E. y Paredes, L. O. (2000). Is pathogenicity of *Ustilago maydis* (Huitlacoche) strains on maize related to in vitro production of indole-3-acetic acid? WorldJournal of Microbiology and Biotechnology 16 (5): 481-490.
- Hidalgo, C. H. (1995). Desarrollo de una metodología para la producción comercial de huitlacoche de alta calidad. Tesis de Doctor en Ciencias, ITESM. Monterrey, México. 102p.
- Holt, G. E. (2010). Los pecados de la agroecología según el capital. *In*: La Jornada del campo. Suplemento del periódico La Jornada, México, D. F., diciembre. Núm. 39.
- Holmgren, D. (2013). La esencia de la permacultura. Consultado el 03 de febrero de 2015. En: [http://holmgren.com.au/downloads/Essence\\_of\\_Pc\\_ES.pdf](http://holmgren.com.au/downloads/Essence_of_Pc_ES.pdf).
- Huberman, L. 1976. Análisis y crítica del capitalismo. Consultado en: Mayo 20, 2018. De Ediciones Martínez Roca. Sitio web: <https://omegalfa.es/downloadfile.php?file=libros/analisis.y.critica.del.capitalismo.pdf>.
- Kamper, J. (2003). Regulation of pathogenic and sexual development in *Ustilago maydis*. Max Planck-Institute Terrestrial Microbiology. Department of Organism Interactions.
- Kealey, K. S. y Kosikowski, F. V. (1981). Corn smut as food source-perspectives on biology, composition, and nutrition. CRC Critical Reviews of Food Science and Nutrition 15(14):321-350.
- Kostandi, S. K. and Geisler G. (1989). Maize smut induced by *Ustilago maydis* (D.C.) Corda reaction of maize híbrids and lines to smut disease. J. Agron. And Crop Sci. 162(3): 149-156.

- Kues, U., Y. Liu. 2000. Fruiting body production in basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 141-152.
- Latorrea, A. A. 2015. Recuento celular en cámara de Neubaver. Recuperado de <http://jugandoconpipetas.wordpress.com/2015/12/14/recuento-celular-en-camara-de-neubaver/>.
- Latouche, S. (2008). *La Apuesta por el decrecimiento ¿cómo salir del imaginario dominante?* (Vol. 273). Icaria Editorial.
- León, R. C. N. (2015). Propuesta de gestión para mejorar el nivel de aceptación del presidente Rafael Correa Delgado en los guayaquileños que pertenecen a las clases sociales medio típico y medio bajo y que fluctúan entre los 16 y 65 años de edad (Master's thesis, Universidad de Guayaquil).
- Lizárraga, G. R. 1995. Extracción y caracterización de compuestos saborizantes en huitlacoche (*Ustilago maydis*). Tesis de maestría. Facultad de Agricultura. Universidad Autónoma de Sinaloa. pp: 30-34, 57.
- López, A. G. F. (1988). Factores que determinan el desarrollo de *Ustilago maydis* (D. C.) Cda; agente causal del huitlacoche del maíz. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Posgraduados. Fitopatología. Montecillos, México. p.84.
- Martínez, C. D., Larqué, S. A., Morales P., Sobal M., Martínez, W. y Aguilar, A. (1993). "Los hongos comestibles en México: biotecnología de su reproducción". *Ciencia y desarrollo* 41-49.
- Martínez, G. M. I., Gaytán, B. R., Reyes, M. L., Luna F. M., Padilla, R. J. S. y Mayek, P. N. M. 2004. Rendimiento de grano y forraje de maíces híbridos de riego en Aguascalientes y Zacatecas, México. *Agricultura Técnica en México.* 30:53-61.
- Martínez, M. (1928). *Las plantas más útiles que existen en la República Mexicana.* Ediciones Botas.
- Méndez, G., Solorza, J. y Paredes, O. (2005). Composición química y colorimetría de híbridos y variedades de maíz. *Revista Agrociencia.* 39:267-274.
- Morales, M. V., Valverde, M. E., & López, O. P. (2000). Procedimiento tecnológico para la producción masiva de huitlacoche.

- NCBI. 2015. Centro Nacional para la Información Biotecnológica. Fecha de consulta: 11 de Agosto de 2017. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=4577&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>.
- Ortega, P. R. (1979). Reestudio de las razas Mexicanas de maíz. Informe Anual. Campo Agrícola Experimental de la Mesa Central. INIA, Chapingo, Edo. de México. México.
- Paredes L., O. 2000. Tecnología para la producción masiva de Huitlacoche.
- Paredes, L. O. (2000). Tecnologías para la producción masiva de huitlacoche. SEP-CONACYT. Cuaderno de trabajo: sistema de investigación Miguel Hidalgo. Área de alimentos.
- Paredes, L. O. y Valverde M. E. (1999). Los alimentos mágicos de las culturas indígenas de México – El caso del huitlacoche. México: El Colegio de Sinaloa.
- Pataky, J. K. (1991). Production of huitlacoche [*Ustilago maydis* (DS) Corda] on sweetcorn. HortScience 26(11):1374-1377.
- Pataky, J. K. y Chandler, M. A. (2003). "Production of huitlacoche, *Ustilago maydis*: timing inoculation and controlling pollination". Mycologia 95: 1261-1270.
- Pataky, J. K., Nankam, C., Kerns, M. R. (1995). Evaluation of a silkinoculation technique to differentiate reactions of sweet corn hybrids to common smut. Phytopathology 85(10): 1323-1328.
- Piperno, D. R. & Flannery, K. V. (2001). The earliest archaeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: New accelerator mass spectrometry date and their implications. PNAS 98 (4): 2101-2103
- Pope, D. D. (1992). Production of huitlacoche-the corn smut delicacy. Abstract. En: Proceeding of the VIIIth Biennial Workshop on the smut fungi. D. D. Pope (ed.) Department of Plant Pathology, University of Georgia, Athens, GA.
- Pope, D. D. y McCarter, S. M. (1992). Evaluation of inoculation methods for inducing common smut on corn ears. Phytopathology 82:950-955.

- Pope, D.D. y McCarter, S. M. (1991). The effect of inoculation method on disease incidence and severity of the corn smut caused by *Ustilago maydis*. *Phytopathology* 81(7):814-819.
- Ramírez, C. M. A. (2006). Caracterización y almacenamiento de granos de elote criollo de la región Otomí Tepehua del estado de Hidalgo. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tulancingo de Bravo.
- Reshetnikov, S. V., Wasser, S.P. y Tan, K.K. (2001). Higher basidiomycota as a source of Antinutrient and immunostimulating polysaccharides. A review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, (3): 361-394.
- Reyes, P. (1990). El maíz y su cultivo. AGT editor, S.A. México.
- Reyes, P. (1990). El maíz y su cultivo. Editorial AGT Editor, S. A. México, D.F. p. 1-2, 66-67, 103-121.
- Robles, R. (1982). Producción de granos y forrajes. 3<sup>ra</sup> impresión. Editorial Limusa, S.A. México, D.F. p. 32-35.
- Ron, P. J., Sánchez, G. J. J., Jiménez, C. A. A., Carrera, V. J. A., Martín, L. J. G., Morales, R. M, Cruz, L. de la L., Rodríguez, F. J. G., Hurtado de la P. S. A., Mena, M. S. (2006). Maíces nativos del Occidente de México I. *Colectas 2004. Scientia-CUCBA* 8(1):1-143
- Royer, M. H. y Rytter. J. (1985). Artificial inoculation of wheat with *Tilletia indica* from Mexico and India. *Plant Disease* 69:317-319.
- Ruán-Soto, F., R. Garibay-Origel, and J. Cifuentes. 2006. Process and dynamics of traditional selling wild edible mushrooms in tropical Mexico. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 2:3 (Abstr.).
- Ruíz, H. J. (1995). Dimorfismo y patogenicidad en *Ustilago maydis*, *Memorias del XXVI Congreso Nacional de Microbiología*. Veracruz, México. Pp. 25.
- Ruiz, I. (1999). Producción de Huitlacoche por inoculación artificial de cepas locales de *Ustilago maydis* (D. C.) Corda, en híbridos regionales de maíz (*Zea mays* L.) en el Valle del Yaqui. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Sonora. Cd. Obregón, Sonora, México.

- Sámano, R. M. Á. (2013). La agroecología como una alternativa de seguridad alimentaria para las comunidades indígenas. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4(8), 1251-1266. Recuperado en 23 de mayo de 2018, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342013000800011&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342013000800011&lng=es&tlng=es).
- Sánchez, G. J., Goodman, M., Stuber, C. W. (2000a). Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of México. *Econ. Bot.* 54(1):43-59.
- Sánchez, G. J. J., Goodman, M. M., Rawlings, J. O. (1993). Appropriate characters for racial classification in maize. *Econ. Bot.* 47:44-59.
- Secretaría de Desarrollo Agropecuario (SDA). (2005). Alternativas forrajeras para Guanajuato. Forrajes para el ciclo Primavera-Verano. Secretaría de Desarrollo Agropecuario, Guanajuato. Bajado de la red en 2005. Verificado en marzo del 2006.
- Serratos, J. A. (2009). El origen y la diversidad del maíz en el continente americano. Mayo 06, 2018, de Greenpeace Sitio web: <https://www.greenpeace.org/mexico/Global/mexico/report/2009/3/el-origen-y-la-diversidad-del.pdf>
- Thakur, R. P., Leonard, K. J. y Pataky, J. K. (1989). Smut gall development in adult corn plants inoculated with *Ustilago maydis*. *Plant Disease* 73:921-925.
- The Global biodiversity Information Facility: GBIF Backbone Taxonomy, 2013-07-01. <http://www.gbif.org/species/5290052>.
- Torregrosa, F. (1997). Esquema de mejoramiento de maíz en la Sierra Ecuatoriana. Quito, INIAP. p. 8.
- Tracy, W. F., Vargas, C., Zepeda, J. K., Pataky, J. K. y Chandler, M. A. (2007). Production and marketing of huitlacoche. En: *Signes in new crops and new uses*. Janick J. y Whipkey (Eds.) ASHS Press. Alexandria, VA. pp: 233-236.
- Ulloa, R. (2002). Efecto del periodo de fecundación del maíz (*Zea mays* L) en la infección artificial de *Ustilago maydis* para la producción de Huitlacoche en el valle del Yaqui. Artículo publicado en el III Encuentro internacional de Biotecnología UIBI 2002. Querétaro, México.

- Valadez, A. R. (2012). El huitlacoche un recurso alimentario mexicano no tan milenario. Instituto de investigación Antropológica, 5(1).
- Valdez, M. M., Valverde, M. E. y Paredes L. O. (2009). Procedimiento tecnológico para la producción masiva de huitlacoche. CINVESTAV-Irapuato. Sinnco.10-37 pp.
- Valdez, M. M., Valverde, M. E. y Paredes L. O. (2009). Procedimiento tecnológico para la producción masiva de huitlacoche. CINVESTAV-Irapuato. Sinnco. p. 16.
- Valverde, M. E. (1992). Estudios sobre la infección de *Ustilago maydis* (Huitlacoche) y sus características alimentarias. Tesis de maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Unidad Irapuato. pp: 10-37.
- Valverde, M. E. y Paredes, (1993). Production and Evaluation of some food properties of Huitlacoche (*Ustilago maydis*). Food Biotechnology; 7(3):207-219.
- Valverde, M.E., Fallah, M. P., Zavala, G. Z., Pataky, J.K., Paredes, L. O. and Pedersen, W.L. (1993). Yield and quality of huitlacoche on sweet corn inoculated with *Ustilago maydis* (DC) Corda. HortScience 28, 782-785.
- Vanegas, P. E. (1995). Procedimientos tecnológicos para la producción de huitlacoche (*Ustilago maydis*) efecto de la cepa y materiales genéticos de maíz sobre la calidad. Tesis de maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Unidad Irapuato pp: 32-78.
- Vanegas, P.E., Valverde, M.E., Paredes, L. O. and Pataky, J.K. (1995). Production of the edible fungus huitlacoche (*Ustilago maydis*): Effect of maize genotype on chemical composition. Journal of Fermentation and Bioengineering 80 (6), 104-106.
- Vanhulst, J. & Beling, A. E. (2013). Buen vivir: la irrupción de América Latina en el campo gravitacional del desarrollo sostenible. Revibec: revista iberoamericana de economía ecológica, 21, 1-14.
- Villanueva, V. C. (1995). Estudios de la reacción del maíz al carbón común o huitlacoche (*Ustilago maydis*). Tesis de Doctor en Ciencias. Programa de Genética. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 133 p.
- Welhausen, E. J., Roberts, L. M., Hernández, E. y Mangelsdorf, P. C., (1951). Raices of Maize in Mexico. Their origin, characteristics and distribution. The bussey Institution

of Harvard University. Pp 79-96. (<http://www.infiagro.com/herbaceos/cereales/maiz.asp>).

Wellhausen, E. J., Roberts, L. M., Hernández, X. E., en colaboración con Mangelsdorf, P, C, (1951), Razas de maíz en México. Su origen, características y distribución. Folleto Técnico No. 5. Oficina de Estudios Especiales. Secretaría de Agricultura y Ganadería. México, D.F. 236 p.

Whittaker, R. H. (1968). "New concepts of kingdoms of organisms" *Science* 163: 150-163.

Zimmerman, S. A. y Pataky, J. K. (1992). Inoculation techniques to produce galls of common smuton ears of sweet corn. *Phytopathology* 82(9):995-999.