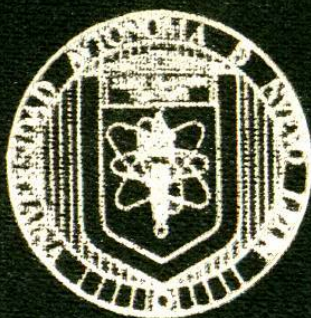


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



**EVALUACION DE METODOLOGIAS PARA LA
INDUCCION ARTIFICIAL DE
HUITLACOCHES**

POR

MARIO ALBERTO LEAL CHAPA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS
EN PRODUCCION AGRICOLA**

JULIO, 1996

TM

SB608

.M2

L4

C.1



1080071991

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



EVALUACION DE METODOLOGIAS PARA LA
INDUCCION ARTIFICIAL DE
HUITLACOCHES

POR

MARIO ALBERTO LEAL CHAPA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS
EN PRODUCCION AGRICOLA

JULIO, 1996

12559

BIBLIOTECA Agronomía U.A.N.L.

5352

X



FONDO
TESIS

(71991)



FONDO
MAESTRIA

EVALUACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA LA INDUCCIÓN
ARTIFICIAL DE HUITLACOCHÉ

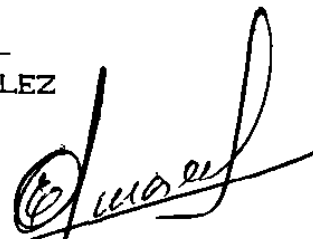
Aprobación de la Tesis:




Ph. D. JOSÉ LUIS DE LA GARZA GONZÁLEZ
(Asesor de la Tesis)



M. C. MAURILIO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ
(Coasesor)



Ph. D. EMILIO OLIVARES SAENZ
(Coasesor)



Dra. MARÍA ELIZABETH CARDENAS CERDA
(Coasesor)



Ph. D. RIGOBERTO GONZÁLEZ GONZÁLEZ
Subdirector de Estudios de Posgrado

Julio de 1996
Marín, Nuevo León, México.

A MANERA DE PRÓLOGO

México cuenta con una gran diversidad de hongos, de los cuales muchos de ellos son comestibles; la tradición en su consumo proviene desde la época prehispánica.

El interés por su explotación comercial ha sido muy limitada, debido en parte a la falta de una tecnología adecuada para ello.

La producción de hongos comestibles prácticamente se ha enfocado a dos especies: *Agaricus* y *Pleurotus*. La primera, basada en una tecnología dependiente del extranjero; la segunda, con una tecnología desarrollada en el país.

Sin embargo, relativamente pocos estudios se han hecho con el huitlacoche, cuya tradición de consumo se remonta a la época de los aztecas.

En el presente trabajo se ha tratado de contribuir en el conocimiento del manejo de *Ustilago maydis* para la obtención de huitlacoche.

Este trabajo sin duda alguna, ha sido posible gracias a la colaboración de un sinnúmero de personas, entre ellos: asesores de tesis y profesores de cursos de maestría, quienes brindaron un excelente apoyo académico; condicípulos de maestría, que sin su ayuda no hubiese sido posible llevar a cabo las actividades de campo; mi esposa y mis hijos, quienes dieron un gran apoyo moral; compatriotas contribuyentes, que gracias a sus impuestos fue posible recibir una beca de apoyo económico; así como a instituciones como la UANL, la FAUANL y el CONACYT, sin las cuales no hubiese sido posible realizarlo.

A todos ellos quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

El Autor.

CONTENIDO

Capítulo	Página
APROBACIÓN DE TESIS	ii
A MANERA DE PRÓLOGO	iii
CONTENIDO	iv
LISTA DE CUADROS	vi
NOMENCLATURA	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Ubicación Taxonómica de <i>U. maydis</i>	6
2.2 Descripción Morfológica	7
2.3 Ciclo de Vida	10
2.4 Etiología y Desarrollo de la Enfermedad	12
2.5 Limitante Económico	13
2.6 Naturaleza Alimentaria	16
2.7 Manipulación Artificial	18
2.8 Requerimientos Agronómicos	23
2.8.1 Genotipo de Maíz	24
2.8.2 Temperatura	26
2.8.3 Humedad.	27
2.8.4 Fertilización	27
2.8.5 Densidad	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1 Localización de la FAUANL	31
3.2 Características Agroclimáticas de la Región.	31
3.2.1 Suelo	31
3.2.2 Clima	31
3.3 Materiales	32
3.3.1 Materiales y Aparatos de Laboratorio	32
3.3.1.1 Cristalería	32
3.3.1.2 Material Diverso	32
3.3.1.3 Aparatos	33
3.3.2 Sustancias y Mezclas Químicas	33
3.3.2.1 Sustancias en General	33
3.3.2.2 Medio de Cultivo Sólido	33
3.3.2.3 Medio de Cultivo Líquido	33

3.3.2.4	Fertilizantes	34
3.3.2.5	Insecticidas	34
3.3.3	Material de Campo	34
3.3.4	Material Vegetal	34
3.3.4.1	Material a Infectar	34
3.3.4.2	Material para Inóculo	34
3.4	Métodos	35
3.4.1	Diseño del Experimento	35
3.4.1.1	Factores a Evaluar	36
3.4.1.2	Variables a Medir	37
3.4.1.3	Diseño Experimental	38
3.4.1.4	Tratamientos	38
3.4.1.5	Hipótesis a Probar	39
3.4.1.6	Parcela Experimental	40
3.4.1.7	Evaluación Estadística	40
3.4.2	Métodos de Laboratorio	41
3.4.2.1	Preparación de Inóculo	41
3.4.2.1.1	Teliosporas como inóculo	41
3.4.2.1.2	Basidiosporas como inóculo	42
3.4.3	Métodos de Campo	43
3.4.3.1	Manejo Agronómico	43
3.4.3.2	Manejo de Factores a Evaluar	44
4.	RESULTADOS	46
4.1	Observaciones Durante el Ciclo del Cultivo	46
4.2	Variables Medidas	49
4.3	Análisis de Varianza y Covarianza	50
4.4	Comparación de Medias de Tratamientos	52
4.5	Análisis de Varianza para los Factores en Estudio	53
4.6	Comparación de Medias en los Niveles de los Factores	54
4.7	Comparación de Medias en Forma Combinada	56
5.	DISCUSIÓN	60
5.1	Discusión General	60
5.2	Discusión por Factores	61
5.2.1	Factor A "Tipo de Inóculo"	61
5.2.2	Factor B "Frecuencia de inoculación"	62
5.2.3	Factor C "Concentración de Inóculo"	63
5.2.4	Factor D "Modo de Aplicación"	64
5.2.5	Factor E "Variedad"	64
5.2.6	Factor F "Nivel de Fertilización"	65
5.2.7	Factor G "Densidad"	65
6.	CONCLUSIONES	67
7.	RECOMENDACIONES	69
	BIBLIOGRAFIA	71

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Factores y niveles estudiados en el experimento con un diseño Taguchi La	37
2. Tratamientos generados con el diseño Taguchi La	38
3. Fechas relevantes en el ciclo del cultivo	43
4. Condiciones climáticas de Abril a Julio de 1995 en el Campo Experimental Fitotecnia Marín de la FAUANL	46
5. Déficit porcentual de planta en parcela útil del área experimental al 19 de Abril de 1995	47
6. Déficit porcentual de planta en parcela útil al momento de la inoculación	47
7. Daño por coyote (<i>Canis latrans</i>); número de mazorcas perdidas del área útil experimental	48
8. Porcentaje de incidencia o presencia de huitlacoche	49
9. Porcentaje de infección o severidad en mazorca	49
10. Porcentaje de incidencia de huitlacoche en ángulos Bliss	50
11. Porcentaje de infección o severidad de la enfermedad en ángulos Bliss	50
12. ANVA para el porcentaje de incidencia de huitlacoche	50
13. ANVA para el porcentaje de infección en mazorca	51
14. Análisis de Covarianza para el porcentaje de incidencia o presencia de huitlacoche con "número de plantas" como covariable	52
15. Análisis de Covarianza para el porcentaje de infección o severidad en mazorca con "número de plantas" como covariable	52

16.	Comparación de medias de tratamientos para la variable "porcentaje de incidencia".	53
17.	ANVA para los factores bajo el arreglo Taguchi	54
18.	Comparación de medias en los niveles del factor A "tipo de inóculo"	54
19.	Comparación de medias en los niveles del factor D "modo de aplicación"	55
20.	Comparación de medias en los niveles de los factores B, C, E, F y G	56
21.	Comparación de medias de la combinación de los factores A y B	57
22.	Comparación de medias de la combinación de los factores A y C	57
23.	Comparación de medias de la combinación de los factores A y D	57
24.	Comparación de medias de la combinación de los factores A y E	57
25.	Comparación de medias de la combinación de los factores A y F	58
26.	Comparación de medias de la combinación de los factores A y G	58
27.	Comparación de medias de la combinación de los factores D y B	58
28.	Comparación de medias de la combinación de los factores D y C	58
29.	Comparación de medias de la combinación de los factores D y E	59
30.	Comparación de medias de la combinación de los factores D y F	59
31.	Comparación de medias de la combinación de los factores D y G	59

NOMENCLATURA

ANVA	Análisis de Varianza
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
cm	Centímetro
cm ³	Centímetro Cúbico
CuSO ₄ · 5H ₂ O	Sulfato de Cobre Pentahidratado
FeSO ₄	Sulfato de Hierro
g	Gramo
g/l	Gramos por Litro
HCl	Ácido Clorhídrico
H ₃ BO ₃	Ácido Bórico
Kg	Kilogramo
Kg/ha	Kilogramo por Hectárea
KH ₂ PO ₄	Difosfato de Potasio
m	Metro
MgSO ₄	Sulfato de Magnesio
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MnSO ₄ · H ₂ O	Sulfato de Manganeso Monohidratado
N	Normal
N/acre	Nitrógeno por Acre
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	Molibdato de Sodio Dihidratado
NaOH	Hidróxido de Sodio
NH ₄ NO ₃	Nitrato de Amonio
PDA	Papa Dextrosa Agar
pl/ha	Plantas por Hectárea
rpm	Revoluciones por Minuto
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	Sulfato de Zinc Heptahidratado
°C	Grado Centígrado
μm	Micrómetro

RESUMEN

MARIO ALBERTO LEAL CHAPA Fecha de Graduación: Julio, 1996

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Agronomía

Título del Estudio: EVALUACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA LA
INDUCCIÓN ARTIFICIAL DE HUITLACOCHÉ

Número de Páginas: 75 Candidato para el grado de Maestría
en Ciencias en Producción Agrícola.

Área de Estudio: Fitopatología

Metodología: Se realizaron pruebas para la inducción artificial del carbón común del maíz [*Ustilago maydis* (DC) Corda] en la FAUANL, municipio de Marín, N.L., México, en el ciclo primavera-verano de 1995. El propósito del experimento fue evaluar siete factores con niveles contrastantes en un diseño de bloques al azar con tres repeticiones bajo un arreglo Taguchi L₈, midiéndose el porcentaje de incidencia de huitlacoche. Los factores evaluados para inducir el huitlacoche fueron: tipo de inóculo, usando una suspensión de teliosporas y de basidiosporas; frecuencia de inoculación, con una y dos aplicaciones; concentración de inóculo, empleando 1×10^5 y 1×10^6 células/ml; modo de aplicación, siendo endógena y exógena; genotipo de maíz a infectar, utilizando al Blanco Alemán y el H-422; nivel de fertilización, con base en la fórmulas 0-0-0 y 100-40-0; así como la densidad del cultivo a infectar, con 35 000 y 55 000 pl/ha. Las teliosporas se obtuvieron de mazorcas infectadas en forma natural colectadas en la misma región. El inóculo de basidiosporas consistió en una mezcla de cuatro líneas obtenidas por micromanipulación a partir de la germinación de teliosporas.

Resultados y Conclusiones: La media general de los factores evaluados fue de 12.85%, la incidencia natural fue < 1%. De los factores evaluados, sólo el tipo de inóculo y el modo de aplicación mostraron diferencia estadística entre sus niveles con $p = 0.048$ y $p = 0.001$, respectivamente. Para la inducción artificial del huitlacoche se considera que puede emplearse basidiosporas como inóculo aplicándolas en forma endógena a los jilotes de maíz.

ASESORES: Ph. D. JOSÉ LUIS DE LA GARZA G., Dra. Ma. ELIZABETH CÁRDENAS CERDA, M. C. MAURILIO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ, Ph. D. EMILIO OLIVARES SAENZ.

ABSTRACT

MARIO ALBERTO LEAL CHAPA

Graduation date: July, 1996

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Agronomía

Title of work: EVALUACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA LA
INDUCCIÓN ARTIFICIAL DE HUITLACOCHÉ

Pages: 75

Degree candidat of: Maestría
en Ciencias en Producción Agrícola.

Study work: Phytopathology

Method: Test was made for inducing common smut [*Ustilago maydis* (DC) Cordal. Field plots were located at the FAUANL, Marín, N.L., Méx., in spring 1995. The purpose of this work was to evaluate seven factors with two levels and replicated three times, using Taguchi L₈ arrangement in a randomized complete block design. Percentage of infected ears was determined. The factors evaluated to induce huitlacoche were: 1) type of inoculum: teliospores and esporidial suspension; 2) frequency of inoculation, with one and two times; 3) concentration of inoculum, adjusted to 10⁵ and 10⁶ cells per milliliter; 4) application manner, were endogenous and exogenous; 5) corn genotypes, Blanco Alemán and H-422; 6) fertilization level, with 0-0-0 and 100-40-0; 7) population density, 35 000 and 55 000 pl/ha. Teliospores from naturally infected ear of field corn collected at the region. The sporidia inoculum consisted in a four line mix removed by micromanipulation from teliospore germination.

Result and Conclusion: Mean of incidence of ear gall was 12.85%; naturally infected was < 1%. Only the type of inoculum and the application manner showed statistical differences between its levels with p=0.048 and p=0.001, respectively. Artificial induction of huitlacoche may be carried out using sporidial endogenous injection into corn ears.

ASSESSOR: Ph.D. JOSÉ LUIS DE LA GARZA G., Dra. Ma. ELIZABETH CÁRDENAS CERDA, M.C. MAURILIO MARTINEZ RODRIGUEZ, Ph.D. EMILIO OLIVARES SAENZ.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

Ustilago maydis (DC) Cda. es el hongo causante del carbón común del maíz y, en México se sabe que, cuando ataca a las mazorcas del maíz forma en sus granos agallas comestibles denominadas huitlacoche. Si bien es cierto que este hongo ha sido estudiado durante muchos años como patógeno del maíz, sólo recientemente se han estado haciendo estudios para la producción comercial de huitlacoche, aunque muchos de ellos en el extranjero.

A diferencia de otros cultivos agrícolas, los hongos susceptibles de ser cultivados que existen en México al parecer aún no son muy atractivos para su explotación, ya que ésta se reduce a la colecta que realizan los habitantes conocedores de las propias zonas en donde crecen en forma natural.

La producción de hongos comestibles se reduce al champiñón (*Agaricus bisporus*) de origen europeo que poco antes de 1940 ha sido cultivado a escala comercial, y a las llamadas setas (*Pleurotus ostreatus*) cuya producción inicia en 1974 (Martínez et al., 1991). Por lo general, la tecnología para su producción depende del extranjero, aunque últimamente se han realizado esfuerzos notables en el género

Pleurotus para el desarrollo de tecnología y obtención de cepas a partir de especies que crecen en forma natural en este país (Martínez y Larqué, 1990; García y Villegas, 1992; Guzmán *et al.*, 1994).

Los estudios acerca de *U. maydis* desde el punto de vista alimentario han sido pocos relativamente; aunque provoca una enfermedad ampliamente distribuida del maíz, en su estado vegetativo es un alimento muy cotizado y, preparado, se le considera como un platillo sofisticado de la cocina mexicana.

La importancia de los daños que causa esta enfermedad varía según el lugar de infección en la planta. Los agricultores saben que los daños por *U. maydis* se deben básicamente al presentarse el ataque en la mazorca y es cuando puede presentarse una reducción en el rendimiento. Sin embargo, esto no es visto precisamente como daño, pues en la mayor parte de los lugares de México en que se cultiva maíz, es frecuente observar que las mazorcas infectadas son empleadas como un elemento más en la dieta humana (López, 1988).

Los trabajos realizados en el desarrollo de una tecnología para la producción del huitlacoche desde el punto de vista alimentario han sido enfocados a desarrollar una metodología para inducir la formación de agallas en la mazorca y, a la vez, a detectar genotipos de maíz susceptibles a la enfermedad.

Para la formación de agallas se han hecho inoculaciones en los distintos estados fenológicos de la planta así como en diferentes sitios tales como: semilla, tallo y jilote. Como inóculo se han utilizado teliosporas o basidiosporas en soluciones acuosas a diferentes concentraciones, hasta espolvoraciones de teliosporas directamente sobre la planta o al suelo. Se han realizado ensayos con diferentes variedades e híbridos bajo diferentes condiciones agronómicas tales como densidad, fertilización y fechas de siembra.

No obstante, no ha sido posible obtener una técnica de inoculación que produzca de manera confiable y consistente un alto porcentaje de incidencia con un alto grado de severidad, ya sea para programas de mejoramiento de maíz o para la producción de huitlacoche.

Con base en lo anterior y tratando de contribuir en el conocimiento y manipulación de la infección para la producción de huitlacoche, ya sea con enfoque alimentario o para selección de genotipos resistentes de maíz, se consideró conveniente realizar el presente trabajo a fin de evaluar diferentes métodos para provocar artificialmente la infección en maíz con *U. maydis* para la obtención de huitlacoche.

Objetivo general:

Comparar metodologías de infección sobre la incidencia y severidad de *Ustilago maydis* en maíz, para la obtención de

huitlacoche.

Para esto se diseña un trabajo en el cual se consideraron los factores: clase de inóculo, frecuencia de inoculación, concentración del inóculo, modo de aplicación, genotipo de maíz a infectar, nivel de fertilización así como densidad del cultivo a infectar.

Tomando en cuenta lo anterior se plantea la siguiente hipótesis:

Mediante una metodología de infección en maíz con *Ustilago maydis* es posible inducirlo para la obtención de huitlacoche.

CAPÍTULO 2

LITERATURA REVISADA

El carbón común del maíz, causado por *Ustilago maydis* (DC) Cda., es una enfermedad que se presenta en casi todos los lugares en que se cultiva dicha especie (Agrios, 1989; Christensen, 1963; De la Garza, 1974; De León, 1984).

Este hongo únicamente parasita al maíz (*Zea mays*) y al teosintle (*Euchlaena mexicana*); se presenta sólo en las partes aéreas de dichas plantas atacando tallos, hojas, mazorcas y espigas, manifestándose con la formación de agallas en la zona infectada (Agrios, 1989; Alexopoulos y Mims, 1979; Christensen, 1963; De la Garza, 1974).

Se desconoce cuál es su centro de origen; sin embargo, dado que es un patógeno específico del maíz, puede considerarse que es originario del mismo lugar del maíz. En la actualidad prácticamente tiene una distribución universal ya que ocurre en casi todas las regiones productoras de maíz (Agrios, 1989; Alexopoulos y Mims, 1979).

En México se le conoce desde la época prehispánica; los aztecas conocieron esta enfermedad y fueron quienes le dieron el nombre de "cuitlacochtli", mismo que fue modificado a "huitlacoche" a la llegada de los españoles (Valverde et al., 1993). La herencia dejada

por estas culturas indígenas, quienes conocían las propiedades culinarias, farmacológicas y psicoterapéuticas de los hongos (Guzmán, 1984), muestran que el huitlacoche es un alimento muy apreciado cuyos orígenes gastronómicos se remontan a la época de los aztecas (Pope y McCarter, 1992).

U. maydis fue llevado a Europa por los españoles apareciendo los primeros reportes de este hongo hacia 1750. En 1760-61 se iniciaron los estudios sobre esta enfermedad en Francia; sólo hasta 1836 se le reconoce como hongo llamándosele *Ustilago zea*, mismo que fue cambiado en 1944 a *Ustilago maydis* (DC) Corda por Stevenson y Johnson (Christensen, 1963).

2.1 Ubicación Taxonómica de *Ustilago maydis*

Una de las características de la enfermedad que origina este hongo es producir, una vez que ha madurado, masas de esporas polvorientas negras similares al hollín y tener por hospedero a una gramínea, por lo que se le incluye en el grupo de los carbones de los cereales; por tal razón se le denomina carbón del maíz (Agrios, 1989; Alexopoulos y Mims, 1979).

Popularmente se le denomina huitlacoche, güitlacoche o huitlacoche, nombres que proceden, según Martín del Campo (mencionado por López, 1986) de la palabra náhuatl "cuitlacohtli", mencionando que esta palabra compuesta procede de los vocablos *cuitla(tli)* (suciedad, basura o

excremento) y *cochtli* (dormido).

Independientemente de su significado, el cual quizás implica conceptos agronómicos, esta palabra era utilizada por los aztecas, misma que fue modificada a *huitlacoche* por la influencia del idioma español (Valverde *et al.*, 1993).

Según el sistema de clasificación de cinco reinos propuesto por R.H. Whittaker en 1969 (Alexander *et al.*, 1986; Ville, 1991), la posición taxonómica de este hongo es la siguiente (Alexopoulos y Mims, 1979; De la Garza, 1974; Ville, 1991):

Reino.....De los Hongos (Fungi)
Subreino..Eumycota
Rama.....Amastigomycota
Filo.....Basidiomycota
Clase.....Basidiomycetes
Subclase..Heterobasidiomycetidae
Orden.....Ustilaginales
Familia...Ustilaginaceae
Género....*Ustilago*
especie...*maydis*

2.2 Descripción Morfológica

U. maydis pasa por una serie de etapas en su ciclo de vida en las que se presentan cinco estructuras que lo caracterizan.

Inicia como *teliospora* dicariótica, sigue como

basidiospora, luego como micelio haploide y por último como micelio dicariótico, que se transforma nuevamente en teliospora (Agrios, 1989; Alexopoulos y Mims, 1979; De la Garza, 1974).

Sólo en la etapa de micelio dicariótico presente en el hospedero es cuando ocurre la formación de agallas, síntoma característico de la enfermedad.

La teliospora es un tipo de espora esférica o elipsoidal, de color café oscuro a negro, con protuberancias en forma de espinas, de siete a once micrómetros de diámetro, con capacidad para resistir las condiciones adversas del ambiente; posee dos núcleos haploides y al germinar presenta cariogamia, meiosis y mitosis; la pared se abre emitiendo un cuerpo tubular llamado basidio o promicelio, generalmente con cuatro células haploides que se transforman en basidiosporas (Agrios, 1989; Christensen, 1963).

En los trabajos con *U. maydis* es frecuente observar el empleo de palabras como clamidospora (Christensen, 1963; De la Garza, 1974; Raynal, 1974), brandespora (Puhalla, 1968) y teliospora (Agrios, 1989; Alexopoulos y Mims, 1979; Pope y McCarter, 1992), para referirse a esta espora dicariótica. Dado que teliospora, etimológicamente hace referencia a un tipo de espora tardía o terminal, en el presente trabajo se ha decidido usarla para referirse a esta espora que se obtiene directamente de la agalla cuando ya ha

madurado y son las que le dan la apariencia polvorienta.

La basidiospora, también llamada esporidio, es ovalada, hialina, de tamaño muy variado entre 13 a 28 μm , con núcleo haploide, y constituye la fuente de inóculo primario; puede dividirse por gemación produciendo esporidios secundarios o puede germinar en la superficie del hospedero, produciendo una hifa haploide (Agrios, 1989; Christensen, 1963; De la Garza, 1974).

El micelio haploide está formado básicamente por hifas haploides provenientes de la germinación del esporidio; puede penetrar la epidermis, sin embargo, posee un crecimiento limitado y puede morir a no ser que se fusione con otra hifa haploide compatible. Si esto último ocurre, se forma una hifa dicariótica (Agrios, 1989; De la Garza, 1974).

El micelio dicariótico está formado por hifas dicarióticas, con dos núcleos haploides compatibles, de mayor diámetro que la anterior, con capacidad para desarrollarse en los tejidos de la planta. Estimula a las células del hospedero para que sufran hipertrofia e hiperplasia (Agrios, 1989).

La agalla es un tumor que se presenta en la planta infectada; es el síntoma característico de la enfermedad. Puede presentarse en el tallo, hojas, espigas o en los granos de elote. Se forma con el crecimiento desmesurado de

las células del tejido infectado. Inicialmente están cubiertas por una membrana blanca encerrando a las células hipertrofiadas del hospedero y el micelio del hongo. Conforme maduran, la membrana se torna gris plateado o plumizo, alcanzando dimensiones de hasta 15 cm de diámetro; al final, el micelio que ha invadido a las células del hospedero se transforma en teliosporas, mismas que son liberadas al romperse la membrana de la agalla (Agrios, 1989; De la Garza, 1974). La cantidad de teliosporas en una agalla de tamaño regular puede ser poco más de 200 mil millones (Christensen, 1963).

2.3 Ciclo de Vida

U. maydis es un hongo que sólo es capaz de completar su ciclo de vida parasitando a *Zea mays* (maíz) o a *Euchlaena mexicana* (teosintle) (Agrios, 1989; Christensen, 1963; De la Garza, 1974), basándose en un ciclo sexual haplonte con una larga dicarionfase (Puertas, 1992).

A partir de la germinación de una teliospora con dos núcleos haploides, se presenta la cariogamia y la meiosis, dando lugar a la formación de una tétrada de núcleos haploides. Éstos se distribuyen a lo largo del basidio o promicelio emitido por la teliospora durante el proceso de germinación. El basidio se divide en cuatro células, cada una con uno de los núcleos haploides, formando cuatro basidiosporas (Agrios, 1989).

Una basidiospora mediante la gemación forma nuevas

basidiosporas idénticas entre sí o bien, al germinar, puede dar un micelio primario formado por hifas haploides; al crecer el micelio primario puede fusionarse con una hifa compatible de otro micelio primario formando un micelio secundario en el cual cada célula es dicariótica, esto es, con dos núcleos provenientes de cada uno de los dos micelios primarios (Christensen, 1963).

El micelio secundario, si posee capacidad patogénica, invade al hospedero estimulando a las células del mismo para que sufran hipertrofia e hiperplasia formándose las características agallas (Agrios, 1989; De la Garza, 1974).

El hongo crece y se desarrolla a expensas de las células del hospedero; al madurar, la mayoría de las células dicarióticas se transforman en teliosporas, las cuales serán liberadas al romperse la agalla, reiniciándose el proceso si las condiciones son favorables (Agrios, 1989; Christensen, 1963).

La fusión de las hifas haploides así como la patogenicidad están reguladas genéticamente por un sistema tetrapolar en el que intervienen dos genes denominados α y β ; el primero se encarga de regular la capacidad de fusión de las hifas y el segundo regula la capacidad patogénica del hongo (Fincham et al., 1974; Holliday, 1974; Kronstad y Leong, 1990; Snetelaar y Mims, 1993).

El gene α presenta dos alelos y el gene β , alelos

múltiples mencionándose poco más de 25 alelos (Christensen, 1963; Fincham *et al.*, 1974; Holliday, 1974) hasta 33 alelos (Bolker *et al.*, 1992).

Para formar el micelio secundario con capacidad patogénica se requiere de la fusión de dos hifas con alelos *a* y alelos *b* diferentes; esto es, la unión de dos hifas genéticamente diferentes en sus genes *a* y *b*, a las que se les denomina hifas compatibles. Si ocurre dicha unión, *U. maydis* puede completar su ciclo de vida dentro del hospedero (Agríos, 1989; Christensen, 1963).

Sin embargo, aún no se conoce por completo su ciclo de vida, pues no se sabe cómo ocurre la infección en el hospedero (Paredes, 1993; Snetselaar y Mims, 1993), cómo las feromonas de la planta estimulan su crecimiento en la misma, ni los factores que influyen en la composición química del huitlacoche (Paredes, 1993).

2.4 Etiología y Desarrollo de la Enfermedad

U. maydis es un hongo fitopatógeno que ocasiona la enfermedad denominada carbón del maíz, cuyo síntoma característico es la formación de agallas; éstas, al principio son de color blanco plomizo y al madurar, grisáceas con dimensiones de hasta 15 cm, con su interior lleno de una masa polvorienta de esporas oscuras. Permanece viable durante varios años en el suelo en forma de teliospora (Agríos, 1989; De la Garza, 1974).

Cuando las condiciones son favorables las teliosporas germinan produciendo basidiosporas que pueden ser diseminadas por el viento, animales, manejo cultural e incluso salpicadas por la lluvia hasta el hospedero. Ahí, las basidiosporas pueden germinar en la superficie desarrollando una hifa que puede penetrar en las células epidérmicas; su crecimiento se detendrá e incluso morirá a menos que contacte y se fusione con otra hifa compatible. Al fusionarse se forma una hifa dicariótica que al desarrollarse formará un micelio que puede provocar la infección. Para que ésto ocurra, se requiere de tejido en crecimiento activo; entonces las células del hospedero son estimuladas para que sufran hipertrofia e hiperplasia, iniciándose la formación de agallas. El micelio crece a expensas de las células modificadas que se colapsan y mueren; las células miceliales dicarióticas posteriormente se transforman en teliosporas que serán liberadas al romperse la membrana que cubre a la agalla. Si las teliosporas caen en tejido meristemático de maíz, pueden producir nuevas infecciones; si caen en el suelo, permanecerán en él hasta presentarse las condiciones favorables para su germinación. En caso de no romperse la agalla, permanecerán en los restos del maíz (Agris, 1989; De la Garza, 1974).

2.5 Limitante Económico

El carbón común del maíz ocurre en casi todas las regiones productoras de maíz (Agris, 1989; De la Garza,

1974; De León, 1984).

Ataca las partes aéreas de la planta. La enfermedad es más severa en la etapa de plántula con estado de crecimiento activo, provocándole enanismo o la muerte (De León, 1984). Si la variedad es genéticamente susceptible, le puede provocar severos daños (Agrios, 1989; Alexopoulos y Mims, 1979; Christensen, 1963).

Se caracteriza por la presencia de agallas en las diferentes partes de la planta. Si se desarrolla en tallos y hojas, probablemente su daño relativo sea bajo. El mayor daño lo hace cuando se presenta en la mazorca, ya que los granos son reemplazados por agallas con masas polvorientas de esporas e incluso las puede destruir completamente (Agrios, 1989; Alexopoulos y Mims, 1979).

El carbón ocurre con mayor frecuencia en áreas cálidas y moderadamente secas (Agrios, 1989; De la Garza, 1974). De León (1984) menciona que puede ser más severo en ambientes húmedos y templados que en los calientes y húmedos; por su parte Girón (1994) señala que un clima templado y caliente con viento seco favorece la enfermedad.

La pérdida económica por este patógeno puede variar desde un valor insignificante hasta un 10 por ciento. Si el maíz es una variedad susceptible, en algunos lotes pueden tenerse pérdidas cercanas al 100 por ciento.

La reducción en el rendimiento en Estados Unidos de

América varía de uno a cinco por ciento, aunque bajo condiciones epifíticas puede llegar al 10 por ciento. Antes del desarrollo de híbridos resistentes, en algunos campos se tenía hasta el 70 por ciento de las plantas infectadas, lo cual no sólo reducía el rendimiento, sino también incrementaba las dificultades y costos en el proceso del maíz dulce (Christensen, 1963).

En México se desconoce la magnitud de los daños económicos que ocasiona (López, 1988). Se le considera como una enfermedad potencial si se presentan las condiciones de clima favorable (Girón, 1994). Sin embargo, por lo regular en áreas extensas en donde se emplean variedades resistentes, las pérdidas en el rendimiento de grano son menores al dos por ciento (Agrios, 1989).

Para su control, la sanidad y la rotación de cultivos son las medidas recomendadas (Agrios, 1989; De la Garza, 1974; Tseng, 1988).

El uso de genotipos resistentes es otra de las prácticas más efectivas (Agrios, 1989; De la Garza, 1974; Pope y McCarter, 1992), pues la selección por resistencia al carbón ha sido relativamente fácil (Poehiman, 1974), aunque se desconoce la naturaleza y durabilidad de la misma (Pope y McCarter, 1992); además, el hongo presenta una gran variabilidad en su patogenicidad (Agrios, 1989; Christensen, 1963).

2.6 Naturaleza Alimentaria

Cuando la infección de *U. maydis* ocurre en la mazorca genera agallas a las que se les denomina huitlacoche (De la Garza, 1974; López, 1988; Paredes, 1993; Pope y McCarter, 1992).

Lejos de ser considerado como una limitante de la producción, en el altiplano de México (donde es más utilizado como alimento) se le llega a considerar benéfico (López, 1988; Villanueva et al., 1992; Paredes, 1993), siendo muy popular en los mercados de dicha zona (López, 1986; Mapes et al., 1981).

Fuera de México se había considerado a *U. maydis* con una dudosa toxicidad al hombre. Diversos autores mencionados por Christensen (1963) señalaban, por un lado, la presencia de diferentes efectos tóxicos en el hombre y en el ganado al inhalar o ingerir teliosporas del hongo, y por otro, que no detectaban efectos nocivos incluso con su ingestión.

Por esos años, Emmons (1961) menciona que al parecer existe el consenso entre los veterinarios de que el hongo no es tóxico al ganado y agrega que algunas personas están acostumbradas a usarlo como alimento.

Pruebas realizadas con cerdos a los que se les suministró en su dieta teliosporas al uno por ciento durante 50 días, no mostraron diferencia significativa respecto al grupo testigo en lo que se refiere a la conversión

alimenticia, así como en el conteo de eritrocitos, leucocitos y cantidad de hemoglobina (Tobijas et al., 1989).

Aunado a esto, al parecer no se conoce alguna especie de patógeno que ataque a las plantas e infecte al hombre o a los animales (Agrios, 1989).

Ahora bien, se debe tener presente que el huitlacoche, al igual que el maíz, puede contaminarse con otros hongos tales como *Fusarium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, (Pataky, 1991; Valverde et al., 1993) que producen metabolitos secundarios de interés farmacológico (Trigos y Zambrano, 1992), y también pueden producir sustancias tóxicas tales como la fumonisina, las aflatoxinas y las ochratoxinas, respectivamente, todas con efecto sobre la salud e incluso con actividad carcinogénica (Mirocha, 1992).

Aunque se desconocen los factores que influyen en la composición alimentaria del huitlacoche, su calidad nutricional es similar a otros hongos comestibles, ya que su contenido proteínico (16.4%) se encuentra dentro del rango de los hongos comerciales (15 a 26.9%) tales como *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes* y *Agaricus bisporus*, mismos que han pasado por procesos de selección mientras que *U. maydis* no ha sido seleccionado (Paredes, 1993).

En México se le aprecia por sus características culinarias: sabor fino y delicado, y últimamente a nivel internacional, ya preparado, empieza a ser considerado como

un platillo sofisticado de la cocina mexicana (Villanueva et al., 1992), por lo que ya no se le ve como el carbón del maíz, sino como el champiñón del maíz o como la trufa mexicana (Paredes, 1993; Pataky, 1991; Pope y McCarter, 1992; Valverde et al., 1993).

Adicionalmente, es frecuente encontrar en recetarios de periódicos (p.e. Buena Mesa de "El Norte") o en publicaciones periódicas (p.e. Pasemos a la mesa de "Selecciones") diferentes recetas para su preparación. También es usual observar anuncios de restaurantes de la zona metropolitana de Monterrey, N.L., con menús que incluyen platillos preparados con huitlacoche.

2.7 Manipulación Artificial

A *U. maydis* se le considera un fitopatógeno facultativo pues puede crecer fuera de su hospedero, en materia orgánica o en un medio de cultivo artificial; sin embargo, únicamente puede completar su ciclo de vida en el maíz (Agrios, 1989; De la Garza, 1974).

Al parecer, se desconoce cual fue el posible manejo realizado en la época prehispánica para la obtención del huitlacoche; también se ignora si lo veían realmente como un hongo, aunque es posible que no fuese así. Se sabe que los purépechas, quienes conocen claramente a los hongos de su región, a *U. maydis* lo consideran como a una parte del maíz (Mapes et al., 1981).

Los primeros registros europeos sobre los intentos por manipular la enfermedad se realizaron en Francia. En 1760-61, Tillet (mencionado por Christensen, 1963) realizó estudios sobre la enfermedad sin tener éxito en inducirla artificialmente, por lo que se pensó que la formación de agallas se debía a una acumulación de savia que provocaba la excesiva dilatación del tejido celular; este fenómeno algunos lo atribuyeron a la presencia del rocío, a la lluvia e incluso al suelo rico en materia orgánica (Christensen, 1963).

En el periodo de 1883 a 1895 Brefeld (citado por Christensen, 1963) logró inducir la enfermedad empleando para ello basidiosporas asperjadas a la planta y en el cogollo de la misma; también detectó que el tejido meristemático es el que se infectaba. Adicionalmente demostró que *U. maydis* crece en sustratos nutritivos, incluyendo el estiércol.

Griffith en 1928, así como Stakman y Christensen en 1929 (citados por López, 1988) inocularon plantas con jeringa hipodérmica logrando excelentes resultados. Más tarde, en 1945, Wilkinson y Kent (citados por López, 1988) encontraron una buena respuesta con el método de vacío parcial.

El empleo de teliosporas o de basidiosporas se convirtió en la técnica usada extensivamente en el campo para probar y seleccionar líneas y variedades de maíz

resistentes al carbón común (Christensen, 1963).

Dado que esta especie es heterotálica, requiere de la fusión de dos líneas compatibles; diferentes autores mencionaron este hecho. En 1932, Bauch (mencionado por Puhalla, 1968) describió una característica indicadora de la fusión *in vitro* de dos líneas compatibles.

La seguridad de tener cultivos monospóricos del hongo se convirtió en una parte preliminar importante; Hanna (1928), propuso un método que incluía la descripción de un aparato fácil de elaborar para aislar esporas individuales, las cuales se hacen germinar en PDA.

El rápido crecimiento vegetativo en medio artificial, su relativa fácil obtención, así como un ciclo de vida corto, convirtieron a este hongo en una herramienta útil para la investigación genética (Puhalla, 1968). Dado lo anterior y a su usual presencia en los campos de cultivo es a menudo empleado como material de laboratorio en los cursos de micología, fitopatología y fisiología vegetal (Alexopoulos y Mims, 1979; Christensen, 1963).

Tanto las teliosporas como las basidiosporas pueden germinar en sustratos artificiales. Las teliosporas al germinar pueden presentar un crecimiento esporidial por gemación, micelial o ambos (Christensen, 1963).

El sustrato que se emplea para su germinación puede ser PDA o algún medio adicionado de micro y macronutrientes

(Hanna, 1928; Christensen, 1963; Fincham et al., 1974).

En la obtención de líneas puras monosporidiales se emplea la micromanipulación, separando cada una de las basidiosporas que surgen al germinar la teliospora, para proceder a su multiplicación individual (Hanna, 1928).

Otro procedimiento consiste en poner a germinar teliosporas en medio sólido, separando las basidiosporas cuando éstas germinan, colocándolas en nuevo medio de cultivo; de la colonia resultante de basidiosporas se separan nuevamente basidiosporas colocándolas en nuevo medio de cultivo y así sucesivamente una o dos veces más a fin de obtener una colonia de línea pura (Pope y McCarter, 1992).

Las líneas puras obtenidas pueden ser transferidas a medio líquido conteniendo 15 por ciento de glicerol y colocándola a -80°C para su conservación (Pope y McCarter, 1992; Thakur et al., 1989); de ahí, son evaluadas en su capacidad de fusión mediante la prueba de compatibilidad y fusión *in vitro* (Puhalla, 1968), o para estudios posteriores, ya sean genéticos, de fisiología, de mejoramiento del maíz o para la producción de huitlacoche (Christensen, 1963; Holliday, 1974; Puhalla, 1968).

Los trabajos recientes para producir la enfermedad en forma artificial se enfocan principalmente a inducir la infección localizada en la mazorca a fin de provocar la formación de la agalla.

En México los reportes indican que como inóculo se han empleado teliosporas (Flores del Campo, 1991) o una mezcla de basidiosporas (López, 1988; Hidalgo, 1995); en el caso de basidiosporas, éstas no se aislan previamente en forma individual ni tampoco se realizan pruebas de compatibilidad.

La metodología empleada por Flores del Campo (1991) consistió en comparar tres técnicas de inoculación, mismas que fueron: mezclar teliosporas con la semilla, asperjar teliosporas al cogollo en etapa de seis a ocho hojas, o inyectando teliosporas al jilote al presentarse el 50 por ciento de polinización.

Girón (INIFAP, CIR Noreste, comunicación personal) enfoca su trabajo a detectar variedades susceptibles para contribuir a conformar el paquete tecnológico para la zona. Inocula hasta en cuatro ocasiones, inyectando en las etapas de cuatro y ocho hojas, así como al jilote en desarrollo y a la salida de los estigmas.

Villanueva et al. (1992) no aclaran si emplearon teliosporas o basidiosporas; inocularon semillas, tallo, polen, jilote cubierto y jilote descubierto.

López (1988) inyectó en una aplicación una mezcla de basidiosporas en el cogollo y el tallo de la planta a los 25 ó 52 días o antes del jiloteo, así como aspersiones en el estigma en la época de jiloteo.

Hidalgo (1995), utilizó teliosporas en una sola

aplicación inyectada a la base y en la punta del jilote, y basidiosporas en plantas de 28, 49 y 60 días; las teliosporas las maneja a una concentración de 5 g/l y las basidiosporas a 10^6 basidiosporas/ml.

En Estados Unidos de América, los trabajos para la obtención de este hongo comestible se enfocan a la inoculación de la mazorca cuando empiezan a emerger los estigmas, empleando como inóculo una mezcla de dos líneas puras de basidiosporas compatibles (Pataky, 1991; Pope y McCarter, 1992; Thakur et al., 1989; Valverde et al., 1993). De acuerdo con Valverde et al. (1993), la formación de agallas se incrementa significativamente por medio de la inyección de basidiosporas o teliosporas en el canal por el cual emergen los estigmas a los tres o cuatro días de haber emergido éstos.

2.8 Requerimientos Agronómicos

Poco es lo que se conoce sobre la biología del proceso de infección y de la interacción hospedero-parásito existente entre *Zea mays* y *U. maydis* (Paredes, 1993; Snetselaar y Mims, 1993). Tampoco se conocen con claridad las condiciones ambientales necesarias para que se lleve a cabo la infección, ya que es frecuente escuchar que en ocasiones se tiene mucha incidencia y a veces no, o que, aún bajo las mismas condiciones ambientales existe diferente respuesta a través de los años (Kostandi y Geisler, 1989).

Lo que sí se señala es que la mazorca es el órgano más

susceptible a *U. maydis* (Fed'ko et al., 1990) y es más común encontrarlo en ellas (Girón, 1994).

Independientemente de cuáles sean las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad, se pueden mencionar, entre otros, los siguientes reportes sobre los factores que posiblemente afectan el desarrollo del hongo.

2.8.1 Genotipo de Maíz

De acuerdo con Paredes (1993), los hombres del campo de México (campesinos) han identificado a los maíces dulces como variedades en las que se desarrolla la enfermedad. Tseng (1988), también señala que las variedades dulces son las más susceptibles y así mismo, Valverde et al. (1993) mencionan que el maíz dulce puede ser buen productor de huitlacoche.

Pataky (1991) identifica a los maíces dulces como los más susceptibles comparados con otros híbridos comerciales; sin embargo, también considera que los genotipos experimentales susceptibles pueden ser mejores para la producción de huitlacoche, entre los que pueden estar otros tipos de maíz como el dentado, el harinoso y otros.

Villanueva et al. (1992) probaron cuatro razas de maíz de los valles altos de México a la inoculación con *U. maydis* y no encontraron diferencias significativas en el porcentaje de plantas infectadas, mismo que osciló entre un 6.9 y un 36 por ciento.

López (1988), utilizando los genotipos Urquiza 54, H-131, H-127 y el criollo Chalqueño Méx. 633 no encontró diferencias significativas en la susceptibilidad de las mismas, teniendo un promedio de infección menor al 40%.

Flores del Campo (1991) encontró diferencias entre las variedades NL VS-2 y NL VS-30, presentando un mayor grado de infección la primera.

Hidalgo (1995) concluyó que de las variedades que él probó resultaron más susceptibles las variedades VS-409, P-3428 y H-422 con porcentajes de infección de hasta un 93.3%. Estas últimas dos concuerdan con lo expresado por Girón (comunicación personal), quien señala a esas variedades como genotipos susceptibles; aunque cabe aclarar que la Productora Nacional de Semillas (PRONASE) considera al H-422 como resistente al carbón común del maíz.

Valverde *et al.* (1993), encontraron que de 350 híbridos evaluados sólo el 34% de las plantas inoculadas presentaron formación de agallas.

De acuerdo a Kyle citado por Pope y McCarter (1992), la resistencia que presentan las variedades a *U. maydis* puede involucrar caracteres morfológicos tales como firmeza y tamaño de las espatas. Valverde *et al.* (1993) señalan que al parecer las espatas que cubren a la mazorca pueden ser benéficas en la producción del huitlacoche; Zimmermann *et al.* (1990) agregan que la tasa de infección

puede estar inversamente relacionada con el tamaño de las espatas. Nuberg *et al.* (1986) mencionan que una correlación negativa puede encontrarse entre las espatas y la incidencia del carbón del maíz.

2.8.2 Temperatura

De León (1984) refiere que el carbón común ocurre en casi todas las regiones productoras de maíz pero también expresa que puede ser más severo en zonas templadas.

Agrios (1989) menciona que esta enfermedad aparece con mayor frecuencia en áreas cálidas.

Kostandi y Geisler (1989) suponen el incremento de la infección al aumento en la temperatura del aire. López (1988) no atribuye totalmente a este factor el incremento en la incidencia pues observó valores contrastantes.

Girón (1994) aclara que esta enfermedad ocurre continuamente a través de la primavera y verano, siendo favorecido por condiciones de clima templado y caliente con temperaturas entre 20 y 35 °C.

En el cultivo de teliosporas y basidiosporas es frecuente incubarlas a 30 °C (Holliday, 1974; Pope y McCarter, 1992; Puhalla, 1968) y también es importante señalar la existencia de un locus con dos alelos sensibles a la temperatura: uno, favorece el crecimiento a 22 °C pero no a 32 °C (Holliday, 1974).

2.8.3 Humedad

Paredes (1993) menciona que los campesinos han identificado la alta humedad relativa con la presencia de huitlacoche. De León (1984) concuerda en que *U. maydis* es más severo en ambientes húmedos.

López (1988) observó que se formaron mayores cantidades de agallas con la humedad relativa entre 72 y 80% y también mencionó cierta tendencia a incrementar la cantidad de agallas conforme aumentó la precipitación.

Agrios (1989) señala que es bajo condiciones moderadamente secas en donde ocasiona daños graves a las variedades susceptibles. Girón (1994) también considera que el viento seco favorece al hongo.

2.8.4 Fertilización

Girón (1994) señala a la fertilización como medida preventiva al carbón del maíz, recomendando fertilizar en la zona de Río Bravo, Tamps., con la fórmula 140-40-0.

Wendell y Berry (1978) (citados por Flores del Campo, 1991) señalan que la incidencia de la enfermedad es mayor en suelos fertilizados con nitrógeno o con fuerte aplicación de estiércol. Girón (comunicación personal) asevera que la presencia de materia orgánica en el suelo favorece la incidencia del carbón del maíz.

Pope y McCarter (1992) y Valverde et al. (1993) durante sus experimentos para la inducción del carbón común

dieron al cultivo prácticas rutinarias de manejo incluyendo la fertilización.

Kostandi y Soliman (1991a) expresan que el incremento en la tasa de fertilización nitrogenada de 30 a 90 kg de N/acre produce gran respuesta en el índice del carbón del maíz en especial, cuando se acentúa el crecimiento del cultivo; en otro trabajo, Kostandi y Soliman (1991b) apuntan que la aplicación de potasio (50 a 100 kg/ha) reduce dicho índice.

2.8.5 Densidad

Los datos sobre densidad que cita Christensen (1963) sobre los estudios realizados son contradictorios. Piemeisel citado por Hidalgo (1995), menciona que la alta densidad promueve una mayor succulencia en las plantas favoreciendo el desarrollo del hongo; otros como Wilcoxon y Covey (1960) (citados por Hidalgo, 1995) mencionan que en las bajas densidades se obtiene una mayor incidencia.

Un estudio reciente realizado por Kostandi (1992) en donde ensayó seis variedades de maíz bajo dos densidades (35,000 y 56,000 pl/ha) con infección artificial de *U. maydis*, observó que la incidencia del carbón fue menor en un 6.6 % en la alta densidad comparada con la baja densidad.

En los estudios sobre el huitlacoche se cuenta con gran variación en las densidades empleadas en el manejo del cultivo. López (1988) e Hidalgo (1995) emplearon 45,000

pl/ha; Flores del Campo (1991) utilizó 43,000 pl/ha. Valverde et al. (1993) manejaron densidades de 41,000 pl/ha con plantas espaciadas a 32 cm; Pope y McCarter (1992) en densidades de 22,000 pl/ha aclarearon a 46 cm; Pataky (1991), utilizó un espaciamiento de 24 cm entre plantas.

CAPITULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó como parte de las actividades académicas a desarrollar dentro del Programa de Posgrado de Maestría en Ciencias en Producción Agrícola de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (FAUANL).

La investigación consistió en diseñar un experimento que permitiera evaluar los factores considerados como importantes en el proceso infeccioso de *U. maydis* para la obtención de huitlacoche, mismos que son deferidos en el objetivo de este trabajo. Además, el proceso de investigación comprendió actividades de laboratorio y de campo, ambas realizadas en forma paralela. La primera, se enfocó a la obtención de los inóculos de *U. maydis*, mismos que fueron utilizados para infectar artificialmente jilotes de maíz a fin de inducir la enfermedad y por ende, el huitlacoche. La segunda, estuvo enfocada a establecer el cultivo de maíz que fue utilizado para ser infectado para así poder realizar el estudio.

Todas estas actividades se realizaron en las instalaciones de la FAUANL.

Las actividades de laboratorio se realizaron en los

laboratorios de Fitopatología y Biotecnología de la FAUANL; las de campo, en el lote 4 del Campo Agrícola Experimental Fitotecnia Marín, en la propia FAUANL.

3.1 Localización de la FAUANL

La FAUANL, está situada en el municipio de Marín, N.L., México; se localiza en la carretera Zuazua a Marín, encontrándose entre las coordenadas geográficas 25° 53' de latitud norte y 100° 03' de longitud oeste con respecto al meridiano de Greenwich, y a una altura sobre el nivel del mar de 367 m.

3.2 Características Agroclimáticas de la Región

3.2.1 Suelo

De acuerdo con el Departamento de Ingeniería Agrícola de la FAUANL, al suelo se le describe como un suelo joven, de origen aluvial, con perfil no genético, una profundidad efectiva mayor a 40 cm, con buen drenaje, presentándose un cierto grado de erosión y salinidad, así como con insuficiente lluvia para siembra de temporal.

3.2.2 Clima

Con base en la clasificación climática de Köeppen modificada para la República Mexicana por García (1973), el municipio de Marín, N.L. se encuentra bajo la influencia de dos tipos climáticos: Bso y Bsi.

El clima se caracteriza por ser cálido con temperatura media anual de 22°C, siendo Enero el mes más frío con

temperatura media de 13.2 °C y Agosto el mes más caliente con temperatura media de 29.4 °C; es además extremoso con una amplia oscilación. El régimen de precipitación se presenta principalmente en verano, teniendo una media anual de 518 mm.

3.3 Materiales

Para realizar el estudio se utilizaron materiales, aparatos de laboratorio, sustancias y mezclas químicas de uso común, así como equipo de campo para las actividades rutinarias para el manejo del cultivo de maíz.

3.3.1 Materiales y Aparatos de Laboratorio

3.3.1.1 Cristalería.

- | | |
|------------------------------|-------------------------|
| * Matraz erlenmeyer 250 ml | * Porta y cubre objetos |
| * Vaso de precipitado 250 ml | * Mini caja Petri |
| * Agitador de vidrio | * Lámpara de alcohol |
| * Pipetas 1 ml | * Tubo de ensayo 12x75 |
| * Frascos boca ancha | |

3.3.1.2 Material Diverso.

- | | |
|-----------------------|-----------------------|
| * Algodón | * Papel aluminio |
| * Cubrebocas | * Tijeras |
| * Cerillos | * Etiquetas adhesivas |
| * Navaja | * Frasco rociador |
| * Pinzas de disección | * Jeringas |
| * Aguja de disección | * Espátula |
| * Cinta plastipack | * Tamiz |

3.3.1.3 Aparatos.

- * Cámara de incubación
- * Agitador oscilatorio
- * Micromanipulador
- * Balanza analítica
- * Balanza granataria
- * Cámara con flujo laminar de aire ultrafiltrado
- * Potenciómetro
- * Microscopio invertido
- * Termómetro
- * Olla de presión
- * Hemocitómetro

3.3.2 Sustancias y Mezclas Químicas

3.3.2.1 Sustancias en General.

- * Alcohol etílico 96%
- * Cloro comercial 6%
- * Agua destilada
- * HCl 0.1 y 1 N
- * NaOH 0.1 y 1 N

3.3.2.2 Medio de Cultivo Sólido.

- * PDA (Papa Dextrosa Agar)

3.3.2.3 Medio de Cultivo Líquido.

El medio de cultivo utilizado fue el de Vogel (Fincham *et al.*, 1974) empleado por Pope y McCarter (1992), el cual se prepara con:

Solución concentrada 50x:

150 g	Citrato de Sodio
250 "	KH ₂ PO ₄
100 "	NH ₄ NO ₃
10 "	MgSO ₄
5 "	CaCl ₂
750 ml	Agua

Solución concentrada 200x de microelementos:

5.0 g	Acido Cítrico
1.0 "	FeSO ₄
1.0 "	ZnSO ₄ ·7H ₂ O
0.25 "	CuSO ₄ ·5H ₂ O
0.05 "	MnSO ₄ ·1H ₂ O
0.05 "	H ₃ BO ₃
0.05 "	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O
100 ml	Agua

A estas soluciones se les añaden 20 g de sacarosa y 15 g de agar por cada litro.

3.3.2.4 Fertilizantes.

- * Urea como fuente de nitrógeno.
- * Fórmula 18-46-0 como fuente de nitrógeno y de fósforo.

3.3.2.5 Insecticidas.

- * Diazinón 25 %.

3.3.3 Material de Campo

Se utilizó el equipo necesario para labrar el área experimental; así como pala, azadón, machete, estacas, cuerda, cal y bolsas para el fertilizante.

3.3.4 Material Vegetal

3.3.4.1 Material a Infectar.

Se utilizaron las variedades H-422 y Blanco Alemán, ambas con características que les permite buena adaptación al ambiente de Marín, N.L. El H-422, de acuerdo con informes del M.C. Rodolfo Girón, Investigador del INIFAP de Río Bravo, Tamps., es susceptible a *U. maydis*; por su parte, el Blanco Alemán, de acuerdo con el M.Sc. Fermín Montes, Maestro-Investigador de la FAUANL, también presenta susceptibilidad a la enfermedad.

3.3.4.2 Material para Inóculo.

Mazorcas infectadas con el hongo fueron colectadas en el Campo Experimental Fitotecnia "Marín" de la FAUANL entre Abril y Mayo de 1995; se separaron las agallas, se dejaron secar a temperatura ambiente y se almacenaron en frascos estériles, se sellaron y se etiquetaron.

3.4 Métodos

El experimento implicó una fase de diseño del experimento, una de laboratorio y una de campo.

3.4.1 Diseño del Experimento

Como ya se mencionó, el experimento involucró un diseño experimental adecuado para la evaluación de los siete factores implícitos en el objetivo general. La evaluación se enfocó a comparar el efecto de cada uno de los factores en la obtención de huitlacoche; y se decidió analizarlos empleando niveles contrastantes.

Por lo anterior, se consideraron como objetivos particulares del experimento los siguientes:

Objetivos particulares:

1. Comparar el efecto en la inducción de huitlacoche al infectar jilotes de maíz con teliosporas o con basidiosporas.
2. Comparar el efecto en la inducción de huitlacoche al infectar jilotes de maíz mediante una o dos aplicaciones de inóculo.
3. Comparar el efecto en la inducción de huitlacoche al infectar jilotes de maíz con una concentración de inóculo de 1×10^5 ó 1×10^6 teliosporas o basidiosporas/ml.
4. Comparar el efecto en la inducción de huitlacoche al inocular jilotes de maíz mediante la aplicación endógena

o exógena.

5. Comparar el efecto en la inducción de huitlacoche al infectar jilotes de maíz H-422 o de maíz Blanco Alemán.

6. Comparar el efecto en la inducción de huitlacoche al infectar jilotes de plantas de maíz bajo fertilización cero o aplicando la fórmula 100-40-0.

7. Comparar el efecto en la inducción de huitlacoche al infectar jilotes de plantas de maíz a una densidad baja (35,000pl/ha) o a una densidad normal (55,000pl/ha).

Se llegó a la conclusión que al analizar los anteriores factores bajo un arreglo factorial completo implicaba una gran cantidad de trabajo y altos costos de operación; por ello, se optó por un arreglo factorial fraccionado con repeticiones, arreglo conocido como diseño Taguchi (Olivares et al., 1994).

3.4.1.1 Factores a Evaluar.

A fin de cumplir con los objetivos del trabajo, se diseñó el experimento evaluando a los factores: tipo de inóculo, frecuencia de inoculación, concentración del inóculo, modo de aplicación, genotipo de maíz a infectar, nivel de fertilización en el cultivo y densidad de siembra en el cultivo. Se manejó cada factor bajo dos niveles contrastantes, mismos que se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Factores y niveles estudiados en el experimento con un diseño Taguchi La.

Factor	Descripción	Nivel 1	Nivel 2
A.	Tipo de inóculo	teliospora	basidiospora
B.	Frec. de inoculación	una	dos
C.	Concentración de inóculo	1×10^5	1×10^6
D.	Modo de aplicación	endógena	exógena
E.	Variedad	H-422	Blanco Alemán
F.	Nivel de fertilización	0 - 0 - 0	100-40-0
G.	Densidad (pl/ha)	35 000	55 000

3.4.1.2 Variables a Medir.

Las variables medidas fueron:

1. Porcentaje de incidencia o presencia de huitlacoche
2. Porcentaje de infección o severidad en la mazorca

El porcentaje de incidencia o presencia se obtuvo comparando el número de la mazorcas infectadas respecto al total en cada parcela experimental, expresando dicho valor en forma porcentual.

El porcentaje de infección o severidad se obtuvo midiendo la proporción de cada mazorca que mostraba signos de infección en cada parcela experimental; se transformó dicha proporción a porcentaje y se obtuvo el promedio de las mazorcas infectadas de la parcela experimental dada.

La medición de las variables se realizó alrededor de 20 días después de la aplicación del inóculo a los jilotes de maíz, contabilizando del 10 al 21 de Julio de 1995.

3.4.1.3 Diseño Experimental.

El experimento se desarrolló bajo un esquema de diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones y con modelo $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + s_{ij}$ cuya hipótesis fue: $\tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_n$.

Los siete factores a evaluar con dos niveles contrastantes cada uno bajo un arreglo factorial completo constituiría un factorial 2^7 dando un total de 128 tratamientos. Para reducir trabajo y costos en el experimento, se utilizó un arreglo factorial fraccionado con repeticiones; para ello se trazó el experimento como un arreglo factorial 2^3 con cuatro factores en confusión y cuatro repeticiones, equivalente a un diseño Taguchi L_8 (Ross, 1988).

3.4.1.4 Tratamientos.

De acuerdo con el arreglo Taguchi se generaron ocho tratamientos, mismos que se obtuvieron empleando una tabla de contrastes ortogonales. Los tratamientos se muestran en el Cuadro 2. Estos fueron distribuidos en forma al azar en el área experimental.

Cuadro 2. Tratamientos generados con el diseño Taguchi.

Tratamiento	Niveles de cada factor						
1	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1
2	A1	B1	C2	D1	E2	F2	G2
3	A1	B2	C1	D2	E1	F2	G2
4	A1	B2	C2	D2	E2	F1	G1
5	A2	B1	C1	D2	E2	F1	G2
6	A2	B1	C2	D2	E1	F2	G1
7	A2	B2	C1	D1	E2	F2	G1
8	A2	B2	C2	D1	E1	F1	G2

3.4.1.5 Hipótesis a Probar.

Con base en el objetivo de evaluar a los siete factores se planteó para cada uno de ellos una hipótesis estadística, las cuales se enlistan a continuación:

H.1. No hay diferencia significativa en la infección empleando como inóculo teliosporas o basidiosporas de *U. maydis*.

H.2. No hay diferencia significativa en la infección variando el número de aplicaciones de inóculo.

H.3. No hay diferencia significativa en la infección empleando diferente concentración en el inóculo.

H.4. No hay diferencia significativa en la infección al realizar la aplicación endógena o la aplicación exógena del inóculo.

H.5. No hay diferencia significativa en los porcentajes de infección entre el maíz H-422 y el Blanco Alemán.

H.6. No hay diferencia significativa en los porcentajes de infección en maíz fertilizado o sin fertilizar.

H.7. No hay diferencia significativa en los porcentajes de infección en maíz a baja densidad o a densidad normal.

3.4.1.6 Parcela Experimental.

Cada tratamiento fue asignado a una parcela experimental que estuvo compuesta de cuatro surcos de seis metros de largo, con una distancia entre surcos de 90 cm, eliminado 0.5 m de cada extremo del surco, dejando los dos surcos centrales como parcela útil.

Para obtener el factor G "densidad" de siembra se hizo el arreglo siguiente: en la densidad de 35 000 pl/ha la plantación fue a 31 cm entre plantas y en la densidad de 55 000 pl/ha a 20 cm.

3.4.1.7 Evaluación Estadística.

La evaluación se hizo mediante el análisis de varianza (ANVA), convirtiendo previamente los datos porcentuales a ángulos Bliss (arco seno $\sqrt{\%}$) a fin de darles un comportamiento aproximado a la distribución normal (Snedecor y Cochran, 1971)

Primero se hizo un ANVA para probar la hipótesis general de este trabajo basada en la comparación de los tratamientos en bloques al azar, tanto para el porcentaje de incidencia como para el porcentaje de infección. Posteriormente se realizó un ANVA para comparar los factores bajo el arreglo Taguchi.

El ANVA se realizó con la ayuda del paquete estadístico "Diseños Experimentales FAUANL" desarrollado por el Dr. E. Olivares Sáenz, Maestro-Investigador de la FAUANL.

3.4.2 Métodos de Laboratorio

La fase de laboratorio comprendió, primero: la colecta, secado, macerado y tamizado de las agallas seleccionadas de mazorcas infectadas en forma natural durante la primavera de 1995; segundo: la germinación de teliosporas, aislado de basidiosporas y multiplicación de las mismas bajo condiciones asépticas y, por último: la preparación de soluciones de teliosporas y basidiosporas a las concentraciones definidas en los tratamientos.

Las actividades se realizaron con base en las técnicas usuales de esterilización, manipulación aséptica, así como la preparación de soluciones y medios de cultivo empleadas en el cultivo de tejidos vegetales (Hurtado y Merino, 1991).

3.4.2.1 Preparación de Inóculo.

3.4.2.1.1 Teliosporas como Inóculo. Se procedió a desmenuzar cuidadosamente agallas secas; se maceraron y se tamizó con mallas número 80 y 200. Se verificó al microscopio las características del material resultante de la última malla, comprobándose que la mayor parte correspondían a teliosporas; también había restos de tejido de agalla.

Se mezcló una pequeña cantidad de teliosporas con agua destilada esterilizada y con un hemocitómetro se midió la concentración; se agregó más agua destilada o más teliosporas según fuese necesario hasta obtener la concentración deseada de 10^5 ó 10^6 teliosporas/ml.

3.4.2.1.2 Basidiosporas como Inóculo. Cuatro teliosporas diferentes, seleccionadas mediante micromanipulación de un conjunto de teliosporas se pusieron a germinar cada una en una gota de PDA estéril en una mini caja Petri estéril a 30 °C.

Una vez germinadas, se separó una basidiospora de cada teliospora mediante micromanipulación y se pasaron a un medio de cultivo líquido (1 ml en tubo de ensayo 12x75 con tapón de algodón esterilizado) para su multiplicación individual, dando agitación manual cada cuatro horas y a 30 °C por dos o tres días. Posteriormente se transfirió cada una a 3 ml de nuevo medio líquido esterilizado en tubo de ensayo 12x75 con tapón de algodón esterilizado, también bajo agitación manual y a 30 °C; por último, se transfirió cada uno a 100 ml de medio líquido en matraz de 250 ml con tapón de algodón esterilizado, con agitación constante a 100 rpm y a 30 °C por 2.5 días. Todas las actividades de selección, separación y transferencia se realizaron en cámara de flujo laminar de aire ultrafiltrado y empleando instrumental esterilizado.

Una vez obtenido el cultivo de basidiosporas se procedió a tomar una parte para llevarla a la concentración deseada de 10^5 ó 10^6 basidiosporas /ml mediante dilución en agua estéril; el resto se dejó para una nueva multiplicación para los ensayos subsiguientes.

Finalmente, se hizo una mezcla de las cuatro líneas de

basidiosporas, constituyendo así el inóculo de basidiosporas.

3.4.3 Métodos de Campo

La fase de campo comprendió, primero: el establecimiento del cultivo en el campo a fin de tener material para realizar la infección y, segundo: la aplicación de los tratamientos en dicho cultivo.

3.4.3.1 Manejo Agronómico.

El manejo agronómico del cultivo se llevó a cabo empleando las prácticas culturales rutinarias para el maíz bajo riego con siembra en seco; se sembró a mano, con o sin fertilizante según fuera el caso, tapando con azadón y se dió el correspondiente riego de siembra. En el Cuadro 3 se muestran las fechas más relevantes.

Cuadro 3.- Fechas relevantes en el ciclo del cultivo.

Etapa del Cultivo	Fecha
Siembra	5 de Abril de 1995
Emergencia	14-18 Abril
Floración masculina	8-12 Junio
Floración femenina	14-18 Junio
Madurez fisiológica	17 a 20 Julio
Inoculación	14, 20 y 23 Junio
Evaluación de variables	10- 21 Julio

Los riegos se dieron los días seis de Abril (de siembra), 19 de Mayo, 9 y 29 de Junio; entre el 1 y 2 de Mayo se presentó una precipitación de 49 mm. Se realizaron deshierbes los días 9 al 11 de Mayo, 17 al 18 de Mayo y 4 al

7 de Julio, empleando azadón, y se trató de controlar el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* - Smith) el 28 de Mayo y gusano cogollero y gusano elotero (*Heliothis zea* - Boddie) el 17 de Junio.

3.4.3.2 Manejo de Factores a Evaluar.

Tres de los factores fueron manejados al momento de realizar la siembra; éstos fueron: factor E "variedad", factor F "fertilización" y factor G "densidad", mismos que fueron asignados a cada parcela experimental con base al plan de distribución en el campo. Se colocaron a mano tres o cuatro semillas por punto, aclareando posteriormente para tener la densidad deseada, es decir, 35 000 pl/ha y 55 000 pl/ha. La fórmula de fertilización 100-40-0 se preparó con la fórmula 18-46-0 y se ajustó la cantidad de nitrógeno con urea a fin de tener al final la proporción 100-40-00, aplicando todo el fósforo y 1/3 del nitrógeno en la siembra y el resto del nitrógeno cuando se dió el primer riego.

Los cuatro factores restantes se aplicaron en la época de la floración femenina.

Se prepararon cuatro tipos de soluciones para cumplir con los factores A "tipo de inóculo" y C "concentración de inóculo". Estas soluciones fueron: solución con 1×10^5 teliosporas/ml, solución con 1×10^6 teliosporas/ml, solución con 1×10^5 basidiosporas/ml y solución con 1×10^6 basidiosporas/ml; las soluciones fueron preparadas en tres ocasiones: el 14, 20 y 23 de Junio de 1995, fechas en que se

presentaron las condiciones para la inoculación.

El factor B "frecuencia de inoculación" se realizó con base en una o dos aplicaciones. En el caso de una aplicación se llevó a cabo cuando emergieron los estigmas; cuando correspondía a dos aplicaciones, la primera se dió al momento en que el jilote aún era pequeño y la segunda al emerger los estigmas.

El factor D "modo de aplicación", consistió en aplicar el inóculo en forma exógena o endógena. Para la forma exógena se rociaron al jilote tres mililitros de la solución correspondiente al tratamiento empleando una pistola rociadora común; para la forma endógena, se inyectaron tres mililitros de la solución correspondiente al tratamiento a través del conducto por el que emergen los estigmas, empleando para ello una jeringa de 60 cm³.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 Observaciones Durante la Estación de Crecimiento

Durante el periodo en que se desarrolló el cultivo se presentaron las condiciones climáticas mostradas en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Condiciones climáticas de Abril a Julio de 1995 en el Campo Experimental Fitotecnia Marín de la FAUANL.

	Abril	Mayo	Junio	Julio
Temp. Media (°C)	25.3	29	29	31
Temp. Media Máx.	34	35.4	34.5	37.8
Temp. Media Mín.	16.5	22	23.4	24.1
Temp. Máxima	43	44	40	41
Temp. Mínima	10	16	18	18
Humedad Relativa (%)	43	67	67.1	62.4
Precipitación (mm)	3	80	73.1	31.1

A los 10 días de la siembra, iniciándose la emergencia, se detectó daño por pájaro, principalmente cuervo (*Corvus corax*) el cual, al parecer, introducía el pico en el área sembrada con la tierra húmeda y suave hasta encontrar la semilla germinada; el daño se reflejó en una pérdida promedio del 16 % de plantas en el área experimental (Cuadro 5).

Cuadro 5. Deficit porcentual de planta en parcela útil del área experimental al 19 de abril de 1995.

Tratamiento	R1	R2	R3	R4	\bar{x}
T1	5.8	47.0	38.2	23.5	28.7
T2	0.0	0.0	13.5	3.8	4.3
T3	9.6	17.3	28.8	34.6	22.6
T4	20.5	11.8	8.8	8.8	12.5
T5	9.6	0.0	1.9	3.8	3.8
T6	35.3	23.5	32.4	41.2	33.1
T7	41.2	2.9	5.8	5.8	13.9
T8	7.7	5.7	25.0	32.8	17.8
\bar{x}	14.2	11.9	18.9	19.2	16.1

El 20 de Abril se intentó, sin éxito, reponer plántulas de los surcos de la orilla mediante su trasplante.

El 2 de Mayo, aprovechando un suelo a capacidad de campo por una precipitación previa del 1 de Mayo así como una alta humedad relativa, se transplantaron plantas de surcos de la orilla y de aclareo a las áreas dañadas, logrando reducir el promedio de planta faltante a un 8.9 % (Cuadro 6).

Cuadro 6. Déficit porcentual de planta en parcela útil al momento de la inoculación.

Tratamiento	R1	R2	R3	\bar{x}
T1	0.0	23.5	29.4	17.6
T2	9.6	1.9	13.5	8.3
T3	0.0	23.1	19.2	14.1
T4	0.0	0.0	0.0	0.0
T5	23.1	7.7	5.8	12.2
T6	5.9	5.9	0.0	3.9
T7	8.8	0.0	8.8	5.9
T8	0.0	7.7	21.1	9.6
\bar{x}	5.9	8.7	12.2	8.9

En el periodo del 8 al 14 de Mayo se presentaron condiciones de clima extremoso: del 8 al 10 de Mayo con baja humedad relativa (30 al 47%) y temperaturas máximas de 35 a 38°C y del 12 al 14 de Mayo, de 42 a 44 °C. Dichas condiciones dañaron notablemente al cuarto bloque, lo que obligó a tomar la decisión de eliminarlo del experimento. Dado que Panze y Sukhatme (mencionados por Olivares, 1993) recomiendan al menos 12 grados de libertad en el error en un análisis estadístico, se decidió continuar con el experimento con tres repeticiones, con lo que se tuvieron 14 grados de libertad en el error.

Previo a la cosecha, se observó daño por coyote (*Canis latrans*) mismo que consistió en la pérdida de mazorcas debido a que esta especie las utilizó como fuente alternativa de alimento, al parecer, por las condiciones ambientales extremosas; las mazorcas fueron consumidas en su estado lechoso masoso, estado que permite suministrar líquido, carbohidratos y proteína vegetal. El daño por coyote representó una pérdida cerca del 4 por ciento del total de mazorcas del área útil experimental (Cuadro 7).

Cuadro 7. Daño por coyote (*Canis latrans*); número de mazorcas perdidas del área útil experimental (porcentaje).

Tratamiento	R1	R2	R3	total
T1	4 (11.7)	-	-	
T2	-	-	1 (2.2)	
T3	-	6 (15)	6 (14)	
T4	1 (2.9)	-	-	
T5	2 (5)	-	9 (18.3)	

... continuación Cuadro 7

T6	-	5 (15.6)	-
T7	-	2 (5.8)	-
T8	-	2 (4.2)	1 (2.4)
total			39 $\bar{x} = 4\%$

4.2 Variables Medidas

De las variables medidas se obtuvo la información mostrada en el Cuadro 8 y el Cuadro 9.

Cuadro 8. Porcentaje de incidencia o presencia de huitlacoche.

Rep.	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	\bar{x}
R1	27.50	17.02	7.41	11.43	12.50	3.13	58.06	38.46	21.94
R2	3.85	13.73	5.00	2.50	8.33	9.38	38.46	2.08	10.42
R3	8.33	6.67	0.00	0.00	2.04	0.00	12.90	19.51	6.18
\bar{x}	13.23	12.47	4.14	4.64	7.62	4.17	36.47	20.02	12.85

Cuadro 9. Porcentaje de infección o severidad en mazorca.

Rep.	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	\bar{x}
R1	21.00	20.60	45.00	27.50	15.00	30.00	28.60	37.80	28.19
R2	5.00	37.10	5.00	50.00	18.30	28.30	48.60	10.00	25.29
R3	27.50	40.00	0.00	0.00	10.00	0.00	77.50	35.00	23.75
\bar{x}	17.83	32.56	16.66	25.83	14.43	19.43	51.56	27.60	25.74

Dado que son valores porcentuales, mismos que no se distribuyen normalmente, fueron transformados a ángulos Bliss ($\sqrt{\%}$ arco seno), a fin de darles una distribución cercana a la normal empleando la tabla para la transformación a dichos valores presente en Steel y Torrie (1986), resultados que se muestran en el Cuadro 10 y el Cuadro 11, respectivamente.

Cuadro 10. Porcentaje de incidencia de huitlacoche en ángulos Bliss.

Rep.	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
R1	31.63	24.36	15.80	19.75	20.70	10.17	49.64	38.33
R2	11.31	21.75	12.92	9.10	16.77	17.83	38.33	8.29
R3	16.77	14.90	0.00	0.00	8.21	0.00	21.05	26.22

Cuadro 11. Porcentaje de infección o severidad de la enfermedad en ángulos Bliss.

Rep.	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
R1	27.28	26.99	42.13	31.63	22.79	33.21	32.33	37.94
R2	12.92	37.52	12.92	45.00	25.33	32.14	44.20	18.44
R3	31.63	39.23	0.00	0.00	18.44	0.00	61.68	36.27

4.3 Análisis de Varianza y Covarianza

Se realizó el análisis de varianza (ANVA) para probar la hipótesis principal de trabajo, a fin de detectar diferencias entre los tratamientos tanto para el porcentaje de incidencia como para el porcentaje de infección, cuyos resultados se muestran en el Cuadro 12 y el Cuadro 13, respectivamente.

Cuadro 12. ANVA para el porcentaje de incidencia de huitlacoche.

FV	gl	SC	CM	F	$p > F$
Trata.	7	1828.765137	260.966461	4.8265	0.006
Bloque	2	962.050293	481.025146	8.8964	0.004
Error	14	756.979004	54.069927		
Total	23	3545.794434			

CV = 40.68%

Cuadro 13. ANVA para el porcentaje de infección en mazorca.

FV	gl	SC	CM	F	p > F
Trata.	7	1698.406250	242.629471	0.9992	0.528
Bloque	2	285.914063	142.957031	0.5887	0.573
Error	14	3399.691406	242.835098		
Total	23	5384.011719			

CV = 55.82%

El ANVA para el porcentaje de incidencia o presencia permite rechazar la H_0 que considera a todos los tratamientos iguales, ya que muestra la probable diferencia ($p > F = 0.006$) entre los tratamientos.

El ANVA para el porcentaje de infección o severidad no permite rechazar la H_0 que considera a todos los tratamientos iguales, por lo que con los datos obtenidos en el experimento no se puede comprobar que sean estadísticamente diferentes.

A fin de descartar un posible efecto sobre las variables estudiadas se realizó un análisis de varianza con ajuste por covarianza (ANCOV) para cada una usando como covariable el número de plantas; los resultados se muestran en el Cuadro 14 y en el Cuadro 15, respectivamente.

Estos análisis muestran resultados similares, al no haber efecto de la covariable, no alterando los resultados obtenidos en los respectivos ANVA (Cuadro 12 y Cuadro 13).

Cuadro 14. Análisis de covarianza para el porcentaje de incidencia o presencia de huitlacoche con "número de plantas" como covariable.

FV	gl	SC	CM	F	p > F
Covar.	1	0.895589	0.895589	0.0154	0.899
Trata.	7	1819.192231	259.987457	4.4702	0.010
Bloque	2	837.339355	418.669678	7.1986	0.008
Error	13	756.083435	58.180263		
Total	23	3414.230611			

CV = 42.19%

Cuadro 15. Análisis de covarianza para el porcentaje de infección o severidad en mazorca con "número de plantas" como covariable.

FV	gl	SC	CM	F	p > F
Covar.	1	123.872154	123.872154	0.4916	0.502
Trata.	7	1813.105835	259.015106	1.0279	0.458
Bloque	2	139.744171	69.872086	0.2773	0.765
Error	13	3275.819336	251.986099		
Total	23	5352.541496			

CV = 56.86%

4.4 Comparación de Medias de Tratamientos

Una vez detectada la diferencia estadística entre los tratamientos para la variable "porcentaje de incidencia" se procedió a hacer la comparación de medias, cuyos resultados se muestran en el Cuadro 16.

Basado en un nivel de significancia de 0.01, la comparación de medias mostró que los tratamientos 1, 2, 7 y 8 son estadísticamente iguales; de igual manera, los tratamientos 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 8, también lo son.

Cuadro 16. Comparación de medias de tratamientos para la variable "porcentaje de incidencia".

Tratamiento	Media en ángulos Bliss	Media en %
7	36.3400 A	36.50
8	24.2800 A B	20.00
2	20.3367 A B	12.47
1	19.9033 A B	13.22
5	15.2267 B	7.62
4	9.6167 B	4.64
3	9.5733 B	4.14
6	9.3333 B	4.17

DMS(0.05) = 17.8736

4.5 Análisis de Varianza para los Factores en Estudio

Analizando la información para los efectos de los factores con base en el arreglo Taguchi se efectuó el ANVA cuyos resultados se encuentran en el Cuadro 17 para el porcentaje de incidencia o presencia de huitlacoche. Este análisis no se hizo para el porcentaje de infección o severidad de la enfermedad ya que el ANVA para tratamientos no reveló diferencia estadística entre ellos.

El ANVA mostró diferencia estadística ($p = 0.048$) presente en los niveles del factor A, mismo que está representado por el tipo de inóculo (teliospora vs basidiospora), así como en el factor D ($p = 0.001$), el cual corresponde al modo de aplicación del inóculo (endógeno vs exógeno). Además, el ANVA revela que con la información que se tiene no se puede probar que estadísticamente existan diferencias en los niveles manejados en los factores B, C,

Cuadro 17. ANVA para los factores en estudio bajo el arreglo Taguchi.

FV	gl	SC	CM	F	$p > F$
Bloque	2	2962.050293	481.025146	8.8964	0.004
Factor A	1	248.648438	248.648438	4.5986	0.048
Factor B	1	84.487793	84.487793	1.5626	0.230
Factor C	1	114.537598	114.537598	2.1183	0.165
Factor D	1	1223.082031	1223.082031	22.6204	0.001
Factor E	1	127.375000	127.375000	2.3557	0.144
Factor F	1	16.121094	16.121094	0.2982	0.599
Factor G	1	12.513184	12.513184	0.2314	0.642
Error	14	756.979004	54.069927		
Total	23	3545.794434			

CV = 40.68 %

E, F y G, es decir en cuanto a frecuencia de inoculación, concentración de inóculo, genotipo de maíz a infectar, nivel de fertilización en el cultivo y densidad de siembra en el cultivo no hubo diferencias significativas en sus niveles.

4.5 Comparación de Medias en los Niveles de los Factores

Con base en lo anterior, se compararon las medias para los niveles de los factores A "tipo de inóculo" y D "modo de aplicación", resultados mostrados en el Cuadro 18 y el Cuadro 19, respectivamente.

Cuadro 18. Comparación de medias en los niveles del factor A "tipo de inóculo".

Nivel	Tipo de inóculo	Media en:		
		Ángulo Bliss	Porcentaje	
1	Teliospora	14.857	8.62	b
2	Basidiospora	21.295	17.07	a

Cuadro 19. Comparación de medias en los niveles del factor D "modo de aplicación".

Nivel	Modo de aplicación	Media en:		
		Ángulo Bliss	%	
1	Endógena	25.215	20.55	a
2	Exógena	10.937	5.14	b

Como se observa, en el factor A se muestra que estadísticamente ($p = 0.048$) al emplear basidiospora como inóculo es mejor a usar teliosporas; con el uso de basidiosporas se tuvo una incidencia promedio de la enfermedad del 17.07%, mientras que con el uso de teliosporas sólo llegó a 8.62%.

En el factor D, se observa que ($p = 0.001$) el inóculo al ser aplicado en forma endógena es mejor que la aplicación exógena; la aplicación endógena mostró una incidencia promedio del 20.55%, en tanto la aplicación exógena fue del 5.14%.

Las medias para los niveles de los factores B, C, E, F y G, mismos que no mostraron diferencia estadística en sus niveles, se muestran en el Cuadro 20.

Cuadro 20. Comparación de medias entre los niveles de los factores B, C, E, F y G.

Factor	Media en:			
B	Nivel	Frec. de inocul.	Ángulo Bliss	%
	1	1	16.20	9.38
	2	2	19.95	16.32
C	Nivel	Concentración	Ángulo Bliss	%
	1	1×10^5 /ml	20.26	15.37
	2	1×10 /ml	15.89	10.33
E	Nivel	Variedad	Ángulo Bliss	%
	1	H-422	15.775	10.39
	2	Blanco Alemán	20.375	15.31
F	Nivel	Fertilización	Ángulo Bliss	%
	1	0 - 0 - 0	17.255	11.38
	2	100- 40- 0	18.90	14.31
G	Nivel	Densidad	Ángulo Bliss	%
	1	35 000 pl/ha	18.80	14.63
	2	55 000 pl/ha	17.35	11.06

4.7 Comparación de Medias en Forma Combinada

Al comparar en forma combinada, primero al factor A y luego al factor D con cada uno de los demás factores, se obtuvo la información mostrada en los cuadros numerados del número 21 al número 31. Esta información no fue evaluada estadísticamente por un ANVA; sin embargo, se consideró que pudiera servir para observar posibles tendencias, mismas que podrían considerarse para el diseño de tratamientos en experimentos futuros.

Cuadro 21. Comparación de medias de la combinación de los factores A y B; *negrilla* en ángulos Bliss, *cursiva* en porcentaje.

	Frecuencia de inoculación			
	Una		Dos	
Teliospora	20.12	12.85	9.59	4.39
Basidiospora	12.28	5.9	30.31	28.25

Cuadro 22. Comparación de medias de la combinación de los factores A y C; *negrilla* en ángulos Bliss, *cursiva* en porcentaje.

	Concentración de inóculo			
	1×10^5 /ml		1×10^6 /ml	
Teliospora	14.74	8.68	14.97	8.56
Basidiospora	25.78	22.05	16.81	12.09

Cuadro 23. Comparación de medias de la combinación de los factores A y D; *negrilla* en ángulos Bliss, *cursiva* en porcentaje.

	Modo de aplicación			
	Endógena		Exógena	
Teliospora	20.12	12.85	9.59	4.39
Basidiospora	30.31	28.25	12.28	5.90

Cuadro 24. Comparación de medias de la combinación de los factores A y E; *negrilla* en ángulos Bliss, *cursiva* en porcentaje.

	Variedad			
	H-422		Blanco Alemán	
Teliospora	14.74	8.68	14.97	8.56
Basidiospora	16.81	12.09	25.78	22.05

Cuadro 25. Comparación de medias de la combinación de los factores A y F; *negrilla* en ángulos Bliss, *cursiva* en porcentaje.

	Nivel de fertilización			
	0 - 0 - 0		100- 40- 0	
Teliospora	14.76	8.94	14.96	8.30
Basidiospora	19.75	13.82	22.84	20.32

Cuadro 26. Comparación de medias de la combinación de los factores A y G; *negrilla* en ángulos Bliss, *cursiva* en porcentaje.

	Densidad de siembra			
	35 000 pl/ha		55 000 pl/ha	
Teliospora	14.76	8.94	14.96	8.30
Basidiospora	22.84	20.32	19.75	13.82

Cuadro 27. Comparación de medias de la combinación de los factores D y B; *negrilla* en ángulos Bliss, *cursiva* en porcentaje.

	Frecuencia de inoculación			
	Una		Dos	
Endógena	20.12	12.85	30.31	28.25
Exógena	12.28	5.9	9.60	4.39

Cuadro 28. Comparación de medias de la combinación de los factores D y C; *negrilla* en ángulos Bliss, *cursiva* en porcentaje.

	Concentración de inóculo			
	1 x 10 ⁵ esporas/ml		1 x 10 ⁶ esporas/ml	
Endógena	28.12	24.85	22.30	16.24
Exógena	12.40	5.88	9.48	4.41

Cuadro 29. Comparación de medias de la combinación de los factores D y E; *negrilla* en ángulos Bliss, *cursiva* en porcentaje.

	Variedad			
	H-422		Blanco Alemán	
Endógena	22.09	16.62	28.34	24.47
Exógena	9.45	4.15	12.42	6.13

Cuadro 30. Comparación de medias de la combinación de los factores D y F; *negrilla* en ángulos Bliss, *cursiva* en porcentaje.

	Nivel de fertilización			
	0 - 0 - 0		100- 40 -0	
Endógena	22.09	16.62	28.34	24.47
Exógena	12.42	6.13	9.45	4.15

Cuadro 31. Comparación de medias de la combinación de los factores D y G; *negrilla* en ángulos Bliss, *cursiva* en porcentaje.

	Densidad de siembra			
	35 000 pl/ha		55 000 pl/ha	
Endógena	28.12	24.85	22.31	16.24
Exógena	9.48	4.41	12.40	5.88

CAPITULO 5

DISCUSIÓN

5.1 Discusión General

La información generada en el presente trabajo muestra que existen diferencias en las técnicas para la inducción artificial del carbón del maíz.

El porcentaje de incidencia o presencia de huitlacoche promedió un 12.85% con un rango porcentual de variación de 0 a 58.06 % y de 4.14 a 36.47% entre tratamientos (Cuadro 8). Dicho promedio superó al porcentaje de infección natural presente en Marín, N.L., cuyo promedio no rebasó al uno por ciento en el ciclo primavera-verano de 1995 (Longoria, FAUANL, comunicación personal).

El análisis estadístico indica ($p = 0.006$) la probable diferencia en los tratamientos empleados en la inducción artificial de esta enfermedad (Cuadro 12).

El hongo se desarrolló en un ambiente con temperatura promedio de 30°C y una humedad relativa promedio del 64.7 % (Cuadro 4). La temperatura puede considerarse como favorable, pues así lo consignan diferentes autores (Agrios, 1989; Girón, 1994); sin embargo, la humedad relativa pudo influir en la relativa baja incidencia del huitlacoche, ya

que algunos autores señalan que se requiere una alta humedad relativa para el desarrollo del hongo (López, 1988; Paredes, 1993).

Se desconoce el porcentaje de incidencia promedio al que se puede llegar en el área de Marín, N.L., pues no existen antecedentes. Por otro lado, en otras regiones, algunos autores ya han mencionado que se presentan diferentes respuestas a través de los años aún bajo las mismas condiciones ambientales (Kostandi y Geisler, 1989); este hecho fue observado en Hidalgo (1995) quien al sembrar en diferentes fechas en Apodaca, N.L., obtuvo diferentes incidencias porcentuales a través del tiempo. De igual manera ocurrió en los trabajos de Pataky (1991) donde la media porcentual que reportó varió de 17.6 a 3.8 en tres años de estudio.

5.2 Discusión por Factores

5.2.1 Factor A "Tipo de Inóculo"

El ANVA bajo el arreglo Taguchi permitió rechazar la hipótesis 1 (Cuadro 17), mostrando la conveniencia de utilizar como inóculo a las basidiosporas en lugar de las teliosporas, observándose una proporción porcentual en el porcentaje de incidencia de huitlacoche de 1.98 : 1 (Cuadro 18). Resultados similares fueron observados en Hidalgo (1995) quien inicialmente empleó teliosporas y luego, al cambiar a basidiosporas, incrementó la incidencia de agallas en sus parcelas experimentales.

El empleo de basidiosporas tiene la ventaja de que al aplicarla en el hospedero puede germinar e iniciar la invasión de tejido inmediatamente, teniendo una mayor probabilidad de establecer la infección; en contraste, las teliosporas tienen que pasar por un proceso de germinación, meiosis y producción de basidiosporas, proceso que implica tiempo y sobre todo, condiciones favorables, mismas que se pueden perder fácilmente. Adicionalmente, el emplear basidiosporas, mismas que son aisladas bajo condiciones controladas, permite evitar la contaminación con otros patógenos.

5.2.2 Factor B "Frecuencia de inoculación"

El ANVA no permitió rechazar la hipótesis 2 (Cuadro 17), por lo que en general, estadísticamente es igual usar una o dos aplicaciones de inóculo (Cuadro 20).

Cuando este factor se combinó con el tipo de inóculo se tuvo que usando basidiosporas en dos aplicaciones presentó una proporción de incidencia porcentual de huitlacoche de 4.79 veces mayor a el empleo de basidiosporas en una aplicación (Cuadro 21).

Cuando se aplica una dosis de basidiosporas, éstas pueden iniciar la invasión de tejido y, si se aplica una segunda dosis, ésta última puede "reforzar" la invasión al presentarse mayores posibilidades de que se unan dos hifas compatibles y con ello se inicie la actividad patogénica y en consecuencia se incremente el porcentaje de incidencia de

huitlacoche.

En el caso de usar teliosporas, al aplicar una dosis, éstas germinan e inician la invasión después de germinar las basidiosporas. Si se da una segunda dosis, las teliosporas de ésta última tendrán que germinar e iniciar el proceso de invasión; sin embargo, para que esto ocurra es necesario que transcurra cierto tiempo, tiempo en el que las mazorcas ya no estarán en condiciones para ser infectadas adecuadamente.

Quizás, al aplicar teliosporas, si en la segunda dosis se emplean basidiosporas es posible que se tengan mejores resultados.

5.2.3 Factor C "Concentración de Inóculo"

El ANVA mostró que no es posible rechazar la hipótesis 3 (Cuadro 17), por lo que en el caso de la concentración de inóculo no se tuvieron diferencias estadísticas en los niveles usados (Cuadro 20). De manera similar, López (1988) tampoco encontró diferencias en los niveles empleados, aunque estos últimos eran del orden de 10^7 a 10^8 basidiosporas/ml.

Ya que no se detectaron diferencias en las concentraciones usadas para inducir la enfermedad se observa la conveniencia de ensayar valores extremos en la concentración del inóculo, en especial en el uso de basidiosporas en forma endógena.

5.2.4 Factor D "Modo de Aplicación"

El ANVA mostró que es posible rechazar la hipótesis 4 (Cuadro 17), por lo que estadísticamente la aplicación endógena del inóculo es mucho mejor que la aplicación exógena; proporcionalmente su relación porcentual de huitlacoche es de 4:1 (Cuadro 19). La aplicación exógena tiene el inconveniente de exponer el inóculo al ambiente, pudiendo sufrir una rápida deshidratación, hecho que no ocurre con la aplicación endógena.

La información mostrada en el Cuadro 23 permitió definir la conveniencia de utilizar basidiosporas en forma endógena cuando se trata de inducir a *U. maydis* en especial dirigido a la mazorca. Quizás las técnicas que emplean teliosporas sean buenas cuando se trata de buscar genotipos resistentes a la enfermedad, ya que la infección natural inicia con la germinación de teliosporas. La aplicación de una dosis de basidiosporas representa un fenómeno que no ocurre en la naturaleza, por ello, las variedades catalogadas como resistentes a *U. maydis*, en algunos casos, pueden sucumbir a la infección "artificial".

5.2.5 Factor E "Variedad"

El ANVA no permitió rechazar la hipótesis 5 (Cuadro 17); por ello, en cuanto a la comparación de la respuesta al carbón entre los dos genotipos usados, no se observó diferencia estadística entre usar a el H-422 y a el Blanco Alemán para obtener más huitlacoche.

Es conveniente destacar que una variedad puede estar catalogada como resistente a una infección natural, como es el caso del H-422; sin embargo, esto no quiere decir que sea resistente a *U. maydis* bajo una infección artificial, en especial cuando se manejan basidiosporas por vía endógena.

5.2.6 Factor F "Nivel de Fertilización"

Con el análisis de los datos que se obtuvieron en el experimento, no fue posible rechazar la hipótesis 6 (Cuadro 17), por lo que no se pudo comprobar el efecto del nivel de fertilización en la incidencia de *U. maydis*.

Es de notar que la respuesta del maíz a la fertilización en el Campo Fitotecnia Marín de la FAUANL es relativamente baja (Guzmán, FAUANL, comunicación personal), por lo que quizás no se tuvo respuesta a este factor.

5.2.7 Factor G "densidad"

Con el ANVA se encontró que no se pudo rechazar la hipótesis 7 (Cuadro 17), referente al factor densidad, por lo que no se puede decir que existan diferencias entre las dos densidades utilizadas para favorecer la incidencia del huitlacoche.

Kostandi (1992) obtuvo una diferencia porcentual del 6.6 % entre dos densidades diferentes (35 000 y 56 000 pl/ha). En el presente trabajo se tuvo una diferencia del 3.57% entre las dos densidades; sin embargo, al combinar este factor con el tipo de inóculo, empleando basidiospora

(condiciones similares a Kostandi, 1992), se observa una diferencia porcentual del 6.5% siendo mayor en la densidad baja (Cuadro 26). Para el caso de teliospora, se tuvieron porcentajes similares en ambas densidades (Cuadro 26). Sin embargo cabe señalar que con los datos del presente trabajo no se puede afirmar que en la baja densidad se tenga una mayor incidencia porcentual de huitlacoche, ya que no se analizaron estadísticamente las interacciones de los factores.

6. No se detectaron diferencias entre el empleo de las variedades H-422 y el Blanco Alemán, por lo que ambas presentan una respuesta similar en la inducción artificial del carbón.
7. No se encontraron diferencias entre fertilizar y no fertilizar el maíz en el que se induciría la infección.
8. En lo que respecta a la densidad, no se obtuvieron diferencias entre emplear 35,000 y 55,000 pl/ha.

CAPÍTULO 7

RECOMENDACIONES

1. En la inducción artificial del carbón del maíz en el campo, deben tomarse todas las precauciones necesarias a fin de evitar contaminar campos aledaños.
2. En la inducción artificial de *U. maydis* se recomienda emplear basidiosporas en lugar de teliosporas.
3. Al inocular una suspensión de basidiosporas, se aconseja sea de manera endógena, inyectando el inóculo al jilote.
4. Dado que otros investigadores han inoculado en otras etapas diferentes a las del presente trabajo, se observa la conveniencia de comparar la inoculación en diferentes etapas fenológicas del cultivo, tanto con una como con varias aplicaciones.
5. Se sugiere iniciar un programa de aislamiento y selección de líneas haploides compatibles de *U. maydis*, así como realizar pruebas de su patogenicidad en maíz. En el aislamiento de dichas líneas se recomienda usar la micromanipulación.

6. Para un proyecto de producción de huitlacoche es recomendable realizar previamente pruebas de comportamiento de distintas variedades de maíz apto para la zona de trabajo.

7. Para lograr porcentajes de incidencia y de infección más altos y consistentes se requiere mejorar la técnica de inoculación, lo que implica definir claramente los factores que afectan el establecimiento, desarrollo y crecimiento de *U. maydis* en su hospedero, de lo contrario, todos los esfuerzos que se hagan tendrán un éxito limitado.

BIBLIOGRAFIA

- Agrios, G.N. 1989. Fitopatología. 3^{er} Reimp. Ed. Limusa. México. 756p.
- Alexopoulos, C.J., and C.H. Mims. 1979. Introductory mycology. 3er. ed. John Wiley & Sons, Inc. USA. pp 37, 521-528.
- Alexander, P., M.J. Bahret, J. Chaves, G. Gourts, and N.S. D'Alessio. 1986. Biology. Teacher's ed. Silver Burdett Co. USA. pp 210-211.
- Bolker, M., M. Dahal, R. Schlesinger, J. Bergemann, B. Gillissen, F. Schavwecker, M. Urban, B. Schroeer, and R. Kahmann. 1992. Mating type genes of *Ustilago maydis*. In: Molecular biology of filamentous fungi: Proceedings of the EMBO-workshop. Berlin. p 231-240.
- Christensen, J.J. 1963. Corn smut caused by *Ustilago maydis*. Mon. 2. Am. Phytopath. Soc., St. Paul. MN. USA.
- De la Garza G., J.L. 1974. Curso de Fitopatología. UANL. México. 192p. p.
- De León, C. 1984. Enfermedades del maíz. Una guía para su identificación en el campo. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). 3ra. ed. 80p.
- Emmons, C.W. 1961. Mycology and Medicine. Mycologia. 53(1): 1-10.
- Fed'ko, I.A., A.A. Morshchatskii, and B.A. Tereshchenko. 1990. Testing maize for resistance to *Ustilago zaeae*. Zashchita zernovykh at vreditel'ei i boleznei pri intensivnoi tekhnologii. 11-17.
- Fincham, J.R.S., P.R. Day, and A. Radford. 1974. Fungal genetics. 4th ed. University of California Press. Ca. 636p
- Flores del Campo R., J. 1991. Producción de huitlacoche

[*Ustilago maydis* (DC) Cda.] probando tres métodos de inoculación en tres variedades de maíz (*Zea mayz* L). Tesis profesional, ITESM. Monterrey, México. 40p.

García C., J.L. y S. Villegas. 1992. Recuperación de material silvestre de *Pleurotus* sp. para la producción de hongos comestibles. XIV Congreso Nacional de Fitogenética. p 329.

García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köeppen. Instituto de Geografía, UNAM. México.

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. 31p.

Guzmán, G. 1984. El uso de los hongos en mesoamérica. Ciencia y Desarrollo. 59:17-27.

Guzmán, G., G. Mata y D. Salmenes. 1994. El cultivo de los hongos comestibles, su biotecnología y proyección en México. pp 45-49 en: Tecnologías ambientales para el desarrollo sustentable. Inst. de Ecología, A.C. Xalapa, Ver. Méx.

Hanna, W.F. 1928. A simple apparatus for isolating single spores. Phytopathology 18:1017-1021.

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.

Holliday, R. 1974. *Ustilago maydis*. Pages 575-595 in: Handbook of Genetics. I.R.C. King, ed. Plenum, New York.

Hurtado M., D.V. y M.E. Merino M. 1991. Cultivo de tejidos vegetales. 2^{da} Reimp. Ed. Trillas. México. 232 p.

Kostandi, S.F. 1992. Smut incidence and yield losses of corn cultivars under different plant population densities.

- J. of Agron. and Crop Sci. 168(3):201-207.
- Kostandi, S.K. and G. Geisler. 1989. Maize smut induced by *Ustilago maydis* (D.C.) Corda reaction of maize hybrids and lines to smut disease. J. Agron. and Crop Sci. 162(3):149-156.
- Kostandi, S.F., and M.F. Soliman. 1991a. Effect of nitrogen rates at different growth stages on corn yield and common smut disease (*Ustilago maydis* (D.C.) Corda). J. Agron. and Crop Sci. 167(1):53-60.
- Kostandi, S.F., and M.F. Soliman. 1991b. The significance of NPK fertilizers on yield and smut incidence of corn. J. of Agron. and Crop Sci. 176(4):266-276.
- Kronstad, J.W., and S.A. Leong. 1990. The *b* mating type locus of *Ustilago maydis* contains variable and constant regions. Genes and Development. 4:1384-1395.
- López A., G.F. 1988. Factores que determinan el desarrollo de *Ustilago maydis* (DC) CDA; agente causal del huitlacoche del maíz. Tesis de M.C., Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 84p.
- López R., A. 1986. Hongos comestibles y medicinales de México. Ed. Posada. México. pp 21-24.
- Martínez C., D. y A. Larqué S. 1990. Biotecnología en la producción de hongos comestibles. Ciencia y Desarrollo. 95:53-64.
- Martínez C., D., R. Leben, P. Morales, M. Sobal y A. Larqué. 1991. Historia del cultivo comercial de hongos comestibles en México. Ciencia y Desarrollo. 96:33-43.
- Mapes, C., G. Guzmán y J. Caballero. 1981. Etnomicología purépecha. El conocimiento y uso de los hongos en la cuenca de Pátzcuaro, Michoacán. Cuadernos de Etnobiología No.2. Dir. Gral. Culturas Populares, SEP. Soc. Mex. Mic. e Inst. Biol., UNAM, México. 79p.
- Mirocha, C.J. 1992. Mycotoxins and food safety. pp 59-64 Memorias II Simposio y I Reunión Nacional de

Agricultura Sostenible: Un enfoque ecológico, socioeconómico y de desarrollo tecnológico. Comisión de Estudios Ambientales C.P. e Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.

Nuberg, I.K., R.N. Allen, J.M. Colless, and R.E. Darnell. 1986. Field reactions of maize varieties commonly grown in Australia to boil smut caused by *Ustilago zeae*. Australian J. Exp. Agric. 26(4):481-488.

Olivares S., E. 1993. Notas de diseños experimentales con aplicación a la experimentación agrícola y pecuaria. FAUANL. Marín, N.L. México. 291p.

Olivarez S., E., R. Sánchez de la C. y R. Valdéz C. 1994. Establecimiento y análisis de un experimento con fertilizantes bajo un diseño Taguchi. En: Avances de Investigación. CIA-FAUANL. pp 163-164.

Paredes L., O. 1993. Pasado, presente y futuro de la biotecnología azteca. Ciencia y Desarrollo. 112:34-45.

Pataky, J.K. 1991. Production of cuitlacoche [*Ustilago maydis* (DC) Corda] on sweet corn. Hortscience 26:1374-1377.

Poehlman, J. M. 1974. Mejoramiento genético de las cosechas. Versión española por N. Sánchez Durón. 4ta. Reimp. Ed. Limusa. México. p 295.

Pope, D.D., and S.M. McCarter. 1992. Evaluation of inoculation methods for inducing common smut on corn ears. Phytopathology 82:950-955.

Puertas, M.J. 1992. Genética, fundamentos y perspectivas. Interamericana, McGraw-Hill. Madrid, España. pp 27-28.

Puhalla, J.E. 1968. Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*. Genetics 60:461-474.

Raynal, G. 1974. Une technique de contamination artificielle de maïs par *Ustilago maydis* (DC) Corda. Phytopatol. 6: 353-357.

- Ross, P.J. 1988. Taguchi techniques for quality engineering. McGraw Hill, Inc. Singapore. p 126.
- Snedecor, C.W. y W.G. Cochran. 1971. Métodos Estadísticos. Ed. Continental. Mexico. p 405-406.
- Snetselaar, K.M., and C.W. Mims. 1993. Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: light and electron microscopy. *Phytopathology* 83:843-850.
- Steel, R.G.D. y J.H. Torrie. 1986. Bioestadística: Principios y Procedimientos. McGraw-Hill. México. p 581-582.
- Thakur, R.P., K.J. Leonard, and J.K. Pataky. 1989. Smut gall development in adult corn plants inoculated with *Ustilago maydis*. *Plant Dis.* 73:921-925.
- Tobijas, S., I. Rajic, and M. Kabljegic. 1989. Effects of *Ustilago maydis* chlamydospores on performance and blood picture of fattening pig. *Veterinarski Glasnik.* 43:3-4, 289-295.
- Trigos, A. y N. Zambrano. 1992. Nos habremos olvidado de los hongos? *Educación química* 4(3):290-297.
- Tseng, C.M. 1988. Studies on corn smut control in Taiwan. *Taiwan District Agric. Improv. Stn. Res. Bull.* no.22:13-23.
- Valverde, M.E., P. Fallah, M. Zavala, J.K. Pataky, O. Paredes, and W.L. Pedersen. 1993. Yield and quality of huitlacoche on sweet corn inoculated with *Ustilago maydis*. *HortScience* 28(8):782-785.
- Villanueva V., C., S. Cruz y M. Orona. 1992. Reacción de maíces de valles altos de México a la inoculación con huitlacoche (*Ustilago maydis*). XIV Cong. Nal. Fitogen. México. p 329.
- Ville, C.A. 1991. Biología. Trad. al español por R. Espinosa Zarza. 7a.ed. McGraw-Hill. México. pp 110, 151-159, 754-755.
- Zimmermann, J., W. Rotschke, and B. Martin. 1990. Observations on occurrence of maize smut (*Ustilago maydis*). *Nachrichtenblatt für den Pflanzenschutz in der DDR.* 44:1,20.

