



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA
REGIONAL

**Propiedades funcionales de las agallas de huitlacoche
(*Ustilago maydis*) comercializado en la región central de
México**

LUZ NOYOLA MÉNDEZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PUEBLA, PUEBLA

2018



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

CAMPUE-43-2-03

SUBDIRECCIÓN DE EDUCACIÓN
CAMPUS PUEBLA

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, la que suscribe **Luz Noyola Méndez**, alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección del Profesor **Dr. Porfirio Morales Almora**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Propiedades funcionales de las agallas de huitlacoche (*Ustilago maydis*) comercializado en la región central de México**, y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Consejero y la que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Puebla, Puebla, a 10 de diciembre de 2018

Luz Noyola Méndez

Dr. Porfirio Morales Almora
Vo. Bo. Profesor Consejero

La presente tesis, titulada: **Propiedades funcionales de las agallas de huitlacoche (*Ustilago maydis*) comercializado en la región central de México**, realizada por la alumna: **Luz Noyola Méndez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. PORFIRIO MORALES ALMORA

ASESOR:



DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA

ASESORA:



DRA. MERCEDES SOBAL CRUZ

ASESOR:



DR. ANTONIO MACÍAS LÓPEZ

ASESORA:



DRA. CONSUELO DEL CARMEN BAUTISTA MUÑOZ

Puebla, Puebla, México, a 10 de diciembre de 2018

PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS AGALLAS DE HUITLACOCHÉ (*USTILAGO MAYDIS*) COMERCIALIZADO EN LA REGIÓN CENTRAL DE MÉXICO

Luz Noyola Méndez, M. C.
Colegio de Postgraduados, 2018

El huitlacoche (*Ustilago maydis*) es un hongo de gran importancia histórica, cultural, nutricional y funcional en nuestro país. El objetivo del presente estudio fue determinar las propiedades funcionales de las agallas de *U. maydis*, basada en las seis etapas de la infección del hongo en el elote de maíz, en su comercialización, consumo y bioquímica. Se realizó una encuesta con el fin de conocer los lugares de venta de huitlacoche en mercados y supermercados de la ciudad de Puebla y en un mercado de la ciudad de Tlaxcala. Se aplicaron encuestas a 155 personas en una plataforma electrónica para conocer los hábitos de consumo del huitlacoche. La morfología se caracterizó con técnicas de microscopía de luz y electrónica de barrido. Se realizaron análisis bioquímicos de *U. maydis* en diferentes etapas para poder reconocer cual fue la mejor etapa en términos nutricionales. Se encontró que el precio promedio del huitlacoche fue de \$ 60 pesos MN el kilogramo, y predominó su presentación desgranada. Se identificaron las seis etapas en las muestras analizadas del huitlacoche. Se encontró que en casi todas las etapas hay teliosporas, siendo su tamaño de 6 a 7.5 μm . La concentración de polifenoles varió de 608.6 meqAG/mL de muestra para el grano de maíz hasta 15,338 meqAG/mL de muestra en la etapa 4. La mejor actividad antioxidante determinada por la IC50 fue en la etapa 5 donde alcanzó el valor de 6.62. La etapa 2 fue donde se obtuvo una mayor cantidad de Brix (14.45%), el grano de maíz fue el que obtuvo mayor pH (6.55). La etapa 5 tuvo la mayor conductividad (7719.38 $\mu\text{S/cm}$), y el grano de maíz obtuvo la mayor resistividad (182.25 Ohms). La información obtenida en la presente investigación puede ser utilizada para recomendar el consumo de este hongo en las etapas 4 o 5, ya que es donde se obtuvieron los valores más altos de proteínas, polifenoles y la IC50 más baja de DPPH. Se propone una estrategia para promover el consumo de este huitlacoche en las comunidades de México.

Palabras clave: Bioquímica, consumo, infección, microscopía, morfología, funcionalidad, *Zea mays*.

FUNCTIONAL PROPERTIES OF HUITLACOCHÉ GALLS (*USTILAGO MAYDIS*) COMMERCIALIZED IN THE CENTRAL REGION OF MEXICO

Luz Noyola Méndez, M. C.
Colegio de Postgraduados, 2018

Huitlacoche (*Ustilago maydis*) is a fungus of great historical, cultural, nutritional and functional importance in our country. The objective of the present study was to determine the functional properties of the galls of *U. maydis*, based on the six stages of infection in corn, marketing, consumption and biochemistry. A survey was conducted with the purpose of knowing the places of sale of huitlacoche in markets and supermarkets of the city of Puebla and in a market of the city of Tlaxcala. Surveys were applied to 155 people on an electronic platform to learn about the consumption habits of huitlacoche. The morphology was characterized with light microscopy techniques and scanning electronic microscope. Biochemical analysis of *U. maydis* were carried out in different stages in order to recognize which was the best stage in terms of nutrition. It was found that the average price of the huitlacoche was MN \$ 60 pesos per kilogram, and its presentation was shelled. The six stages in the analyzed samples of the huitlacoche were identified. It was found that in almost all stages there are teliospores, being their size from 6 to 7.5 μm . The concentration of polyphenols varied from 608.6 meqAG/1mL per sample for corn grain up to 15,338.37 meqAG/mL per sample in stage 4. The best antioxidant activity determined by IC50 was in stage 5 where it reached the value of 6.62. Stage 2 was the one that had a greater amount of ° Brix (14.45%), the grain of corn was the one that obtained the highest pH (6.55). Stage 5 had the highest conductivity (7719.38 $\mu\text{S/cm}$), and the corn grain obtained the highest resistivity (182.25 Ohms). The information obtained in the present investigation can be used to recommend the consumption of this fungus in stages 4 or 5, since it is where the highest values of proteins, polyphenols and the lowest IC50 of DPPH were obtained. A strategy is proposed to promote the consumption of this huitlacoche in the communities of Mexico.

Key words: Biochemistry, commercialization, consumption, microscopy, morphology, functional properties, *Zea mays*.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por otorgarme la beca y permitirme continuar con mis estudios.

Al Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla, por abrirme sus puertas durante dos años que disfruté y aprendí mucho.

Quiero agradecer a la Dra. Mercedes Sobal Cruz y al Dr. Porfirio Morales Almora, por su apoyo y consejos a lo largo de esta investigación. Al Dr. Daniel Martínez Carrera, por su asesoría y ayuda con el tema de investigación.

A la Dra. Araceli Zavaleta Mancera y a su equipo: Simón, Estela y Susana del Laboratorio de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados, por sus enseñanzas y asistencia en el tema de microscopía durante mi estancia en el *Campus* Montecillo.

A Bety y Helios, por su respaldo y colaboración en el capítulo de bioquímica.

A mis amigas, especialmente a Grace, Marly y Nayeli por su amistad y consejos.

A Yamil por su cariño y atenciones.

DEDICATORIA

Agradezco a mi familia: Polo, Malú, Teresa, por todos sus cuidados, ayuda y amor incondicional.

Mia y Chispita

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Biotecnología y desarrollo social.....	3
2.2 Origen del maíz en México.....	4
2.3 Características y propiedades del grano de maíz.....	4
2.4 Importancia del maíz en México.....	6
2.5 Generalidades de los hongos.....	7
III. MARCO DE REFERENCIA	8
3.1 Historia de los hongos comestibles.....	8
3.2 <i>Ustilago maydis</i> (huitlacoche).....	8
3.3 Producción de huitlacoche.....	9
3.4 Ciclo de vida de <i>U. maydis</i>	10
3.5 Desarrollo de la agalla (ontogenia).....	12
3.6 Morfología de la infección.....	15
3.7 Propiedades del huitlacoche.....	16
3.8 Consumo y comercialización del huitlacoche.....	18
IV. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	19
V. HIPÓTESIS	20
VI. OBJETIVOS	20
VII. DESARROLLO EXPERIMENTAL	21
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	22
8.1 Distribución de huitlacoche en los mercados locales.....	22
8.2 Morfología macro y microscópica del huitlacoche (<i>U. maydis</i>)....	22
8.2.1 Microscopía de luz.....	24
8.2.1.1 Fijador FAA (formaldehído, alcohol, acético) (Megías <i>et al.</i> , 2016)	24
8.2.1.2 Fijador paraformaldehído tamponado (Megías <i>et al.</i> , 2016).....	24
8.2.1.3 Fijador plp (Peryodato, lisina, formaldehído) (Megías <i>et al.</i> , 2016)	24
8.2.1.4 Técnica de tinción.....	24
8.2.1.5 Buffer salino de fosfato (PBS).....	25
8.2.1.6 Histología clásica.....	25
8.2.2 Microscopía electrónica de barrido*.....	26
8.3 Determinación de propiedades funcionales de las agallas de <i>U. maydis</i>	29
8.3.1 Toma de muestra.....	29
8.3.2 Elaboración de los macerados.....	29
8.3.3 Caracterización de los macerados.....	29
8.3.4 Propiedades nutricionales de los macerados.....	30
8.3.4.1 Determinación de proteínas.....	30
8.3.5 Propiedades funcionales de los extractos.....	30
8.3.5.1 Polifenoles totales.....	30
8.3.5.2 Cuantificación de la actividad antioxidante por DPPH.....	31
8.3.6 Análisis estadísticos.....	32
IX. RESULTADOS	33
9.1 Comercialización y consumo de huitlacoche.....	33

9.2	Morfología macro y microscópica del huitlacoche (<i>U. maydis</i>)....	45
9.2.1	Microscopía de luz.....	53
9.2.2	Microscopía electrónica de barrido.....	59
9.3	Propiedades de las agallas comerciales del huitlacoche.....	62
9.4	Propiedades funcionales del huitlacoche.....	70
X.	DISCUSIÓN	73
XI.	CONCLUSIONES	76
XII.	ESTRATEGIA PARA DIFUNDIR DEL CONSUMO DEL HUITLACOCHÉ (<i>Ustilago maydis</i>) EN LAS MEJORES ETAPAS DE DESARROLLO	78
XIII.	LITERATURA CITADA	81

LISTA DE FIGURAS		Página
Figura 1.	Sección longitudinal de un maíz maduro (tercer estado de desarrollo). Se observan los tejidos del grano, el pericarpio, el endospermo blando, el escutelo y embrión. Tomado de Borok <i>et al.</i> (2018).....	5
Figura 2.	Partes del grano de maíz (Tosi, 2012).....	6
Figura 3.	a. Polen de maíz tomado de Diethart (2005). b. Teliospora de <i>Ustilago maydis</i> tomado de Pataký (1991).....	6
Figura 4.	Ciclo de vida de <i>Ustilago maydis</i> . Tomado de Saville <i>et al.</i> , (2012).....	11
Figura 5.	Diagrama general de la metodología seguida en la presente investigación.....	21
Figura 6	Vista de la forma en que se seleccionaron las muestra: granos de elote (A) y agallas (B-D) de <i>Ustilago maydis</i> para su caracterización en esta investigación.....	23
Figura 7.	Diagrama de flujo de procesamiento de muestras de microscopía electrónica de barrido.....	28
Figura 8.	Macerados en solución hidroalcohólica. Se observa los diferentes colores de los macerados de acuerdo a la etapa. C= Control. E= Etapa.....	29
Figura 9.	Mapa de ubicación de los mercados en la ciudad de Puebla en donde se comercializa <i>Ustilago maydis</i> (huitlacoche)....	33
Figura 10.	Presentación de la venta del huitlacoche (<i>Ustilago maydis</i>) en algunos puestos de los mercados de Puebla y Tlaxcala. a. Mercado Zapata. b. Mercado Independencia. c. Defensores de la República. d. Mercado de Xonaca. f. Mercado de Cholula.....	38
Figura 11.	Diferentes formas de las presentaciones en que ponen a la venta de U. maydis en los supermercados de la Ciudad de Puebla. 1. Chedraui. 2. Soriana. 3. WalMart. 4. Superama.	39
Figura 12.	Encuestados (%) que mencionaron conocer el hongo huitlacoche.....	40
Figura 13.	Lugar donde adquieren el huitlacoche las personas entrevistadas.....	40
Figura 14.	Conocimientos de los usos gastronómicos para el huitlacoche en la muestra.....	41
Figura 15.	Platillos en los que se consume huitlacoche habitualmente.	41
Figura 16.	Aceptación del huitlacoche con los hijos de los encuestados.....	42
Figura 17.	Proporción de encuestados que conocen los beneficios del huitlacoche.....	43
Figura 18.	Consumo de huitlacoche en un mes.....	44
Figura 19.	Recurrencia del consumo de huitlacoche en un mes.....	44
Figura 20.	La disposición a consumir huitlacoche.....	45
Figura 21.	Mazorcas de elote con brácteas infectadas con <i>Ustilago maydis</i> utilizadas en esta investigación.....	46

Figura 22.	Mazorcas infectadas por <i>Ustilago maydis</i> desgranadas.	47
Figura 23.	Corte transversal del elote sin infección de <i>U. maydis</i> (a) y con diferentes grados de infección (b-c).....	48
Figura 24.	Desgranado de <i>Ustilago maydis</i> . a. Corte transversal de una mazorca totalmente infectada de huitlacoche. b. Desgranado. c. Medición para clasificación de las agallas. d. Clasificación de las agallas según su tamaño.....	49
Figura 25.	Microfotografías obtenidas por microscopía de luz en <i>Ustilago maydis</i> : cortes en parafina de <i>U. maydis</i> . Cortes longitudinales de: a. grano de maíz sin infección del hongo (Control). b. Grano de maíz infectado de <i>U. maydis</i> , etapa 1. c. Grano de maíz infectado de <i>U. maydis</i> , etapa 2. d. Grano de maíz infectado de <i>U. maydis</i> , etapa 3.....	52
Figura 26.	Microfotografías obtenidas por microscopía de luz en <i>Ustilago maydis</i> : cortes en parafina de <i>U. maydis</i> . Cortes longitudinales de: a. Grano de maíz infectado de <i>U. maydis</i> , etapa 4. b. Grano de maíz infectado de <i>U. maydis</i> , etapa 5. c. Grano de maíz infectado de <i>U. maydis</i> , etapa 6. d. Grano de maíz infectado de <i>U. maydis</i> , etapa 6.....	53
Figura 27.	Microfotografías obtenidas por microscopía de luz en <i>Ustilago maydis</i> : cortes en parafina de <i>U. maydis</i> . Tinción de granos de elote y agallas de huitlacoche (<i>U. maydis</i>). a. Grano de elote fresco con azul de toluidina. b. Grano de elote con FAA y azul de toluidina. c. Agalla fresca con azul de toluidina. d. Agalla con FAA y azul de toluidina. d. Grano de elote con Brillante R. e. Agalla con Brillante R.....	55
Figura 28.	Microfotografías obtenidas por microscopía de luz en <i>Ustilago maydis</i> : cortes en parafina de <i>Ustilago maydis</i> . Tinción de granos de elote y agallas de huitlacoche (<i>Ustilago maydis</i>). a. Grano de elote con Congo Red Kongorot. b. Grano de elote con FAA y Congo Red Kongorot. c. Agalla fresca con Congo Red Kongorot. d. Grano de elote fresco con azul de toluidina y Congo Red Kongorot. e. y f. Agalla fresca con azul de toluidina y Congo Red Kongorot.....	56
Figura 29.	Microfotografías obtenidas por microscopía de luz en <i>Ustilago maydis</i> : cortes en parafina de <i>Ustilago maydis</i>	57
Figura 30.	Mazorcas de elote con brácteas infectadas con <i>Ustilago maydis</i> utilizadas en esta investigación. a. Ejemplar 1. b. CP-963 (ejemplar 2). c. CP-964 (ejemplar 3). d. Ejemplar 4.	58
Figura 31.	Microfotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido en <i>Ustilago maydis</i> : a. Sección transversal en la etapa 1, CP-963 (ejemplar 2). b. Sección longitudinal de Etapa 1, CP-963 (ejemplar 2). c: Pericarpio, de Etapa 1, CP-963 (ejemplar 2). d. Sección transversal de Etapa 2, CP-963 (ejemplar 2). e. Sección longitudinal de Etapa 2,	61

	CP-963 (ejemplar 2). f. Pericarpio, de Etapa 2, ejemplar 1.	
	g. Sección transversal de Etapa 3, CP-964 (ejemplar 3). h.	
	Sección longitudinal de Etapa 2, CP-963 (ejemplar 2). i.	
	Pericarpio de Etapa 3, CP-963 (ejemplar 2).....	
Figura 32.	Microfotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido en <i>Ustilago maydis</i> : a). Sección transversal de Etapa 4, ejemplar 1. b). Sección longitudinal de Etapa 4 de ejemplar 1. c). Pericarpio de Etapa 4, ejemplar 1. d). Sección transversal de Etapa 5, ejemplar 1. e). Sección longitudinal de Etapa 5 de CP-964 (ejemplar 3). f). Pericarpio de Etapa 5, ejemplar 1.....	62
Figura 33.	Diferentes volúmenes y coloraciones de los macerados de <i>Ustilago maydis</i> . E= Etapa. R= cepa de referencia de <i>U. maydis</i>	63
Figura 34.	Apariencia de cada residuo sólido de las muestras después de maceradas correspondiente a cada etapa de <i>Ustilago maydis</i> . E= Etapa. R= cepa de referencia de <i>Ustilago maydis</i>	63
Figura 35.	Peso húmedo (g) a las 24 horas a 40°C. E= Etapa. CP-145= <i>Ganoderma lucidum</i> . CP-286= <i>Neolentinus lepideus</i> . R= cepa de referencia de <i>Ustilago maydis</i>	64
Figura 36.	Peso seco (g) de la muestra deshidratada de <i>Ustilago maydis</i> por 24 horas de macerado comparados con los obtenidos con las muestras de hongos y con el grano de elote. E= Etapa. CP-145= <i>Ganoderma lucidum</i> . CP-286= <i>Neolentinus lepideus</i> . R= cepa de referencia de <i>Ustilago maydis</i>	65
Figura 37.	Volumen (mL) del macerado recuperado después de la maceración de las etapas de <i>Ustilago maydis</i> , el grano de elote y las cepas de referencia. E= Etapa. CP-145= <i>Ganoderma lucidum</i> . CP-286= <i>Neolentinus lepideus</i> . R= cepa de referencia de <i>Ustilago maydis</i>	66
Figura 38.	pH de los macerados estudiados. E= Etapa. CP-145= <i>Ganoderma lucidum</i> . CP-286= <i>Neolentinus lepideus</i> . R= cepa de referencia de <i>Ustilago maydis</i>	67
Figura 39.	Conductividad de los macerados estudiados de <i>Ustilago maydis</i> . E= Etapa. CP-145= <i>Ganoderma lucidum</i> . CP-286= <i>Neolentinus lepideus</i> . R= cepa de referencia de <i>Ustilago maydis</i>	68
Figura 40.	Resistividad de los macerados estudiados de <i>Ustilago maydis</i> . E= Etapa. CP-145= <i>Ganoderma lucidum</i> . CP-286= <i>Neolentinus lepideus</i> . R= cepa de referencia de <i>Ustilago maydis</i>	68
Figura 41.	Grados Brix de los macerados estudiados de <i>Ustilago maydis</i> . E= Etapa. CP-145= <i>Ganoderma lucidum</i> . CP-286=	69

	<i>Neolentinus lepideus</i> . R= cepa de referencia de <i>Ustilago maydis</i>	
Figura 42.	Rendimiento de los macerados estudiados de <i>Ustilago maydis</i> . E= Etapa. CP-145= <i>Ganoderma lucidum</i> . CP-286= <i>Neolentinus lepideus</i> . R= cepa de referencia de <i>Ustilago maydis</i>	70
Figura 43.	Proteínas de los macerados estudiados de <i>Ustilago maydis</i> . E= Etapa. CP-145= <i>Ganoderma lucidum</i> . CP-286= <i>Neolentinus lepideus</i> . R= cepa de referencia de <i>Ustilago maydis</i>	71
Figura 44.	Polifenoles de los macerados estudiados de <i>Ustilago maydis</i> . Proteínas de los macerados estudiados de <i>Ustilago maydis</i> . E= Etapa. CP-145= <i>Ganoderma lucidum</i> . CP-286= <i>Neolentinus lepideus</i> . R= cepa de referencia de <i>Ustilago maydis</i>	72
Figura 45.	Actividad antioxidante considerando la capacidad efectiva (IC50) de los macerados estudiados de <i>Ustilago maydis</i> a partir de los ensayos del DPPH. E= Etapa. CP-145= <i>Ganoderma lucidum</i> . CP-286= <i>Neolentinus lepideus</i> . R= Cepa de referencia de <i>Ustilago maydis</i>	72

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Descripción de la morfogénesis de la infección de <i>Ustilago maydis</i> durante el tiempo que madura la agalla y presenta una masa de teliosporas negras y polvosas (Tomado de Pataky y Snetselaar, 2006).....	17
Cuadro 2. Descripción de las etapas de <i>Ustilago maydis</i> que se presentan durante la morfogénesis de la infección (Pataky y Snetselaar, 2006).....	23
Cuadro 3. Composición del fijador FAA utilizado para teñir los tejidos de <i>Ustilago maydis</i>	25
Cuadro 4. Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de la muestra y del estándar para la determinación de la actividad antioxidante.....	32
Cuadro 5. Comercialización del hongo comestible <i>Ustilago maydis</i> (huitlacoche) en la ciudad de Puebla, Cholula y Tlaxcala. <i>D=desgranado, M=mazorca</i>	35
Cuadro 6. Tamaño (cm) de las agallas frescas de <i>Ustilago maydis</i> comparado con el del grano de elote. L= Largo; A= Ancho; G= Grosor.....	50
Cuadro 7. Peso (g) de las agallas frescas de <i>Ustilago maydis</i> comparado con el de grano de elote (control).....	51
Cuadro 8. Volumen de las agallas frescas de <i>Ustilago maydis</i> comparado con el de grano de elote (control).....	51
Cuadro 9. Valores de los macerados obtenidos en el presente estudio.....	67
Cuadro 10. Propiedades funcionales de las diferentes etapas de los macerados de <i>Ustilago maydis</i>	70

I. INTRODUCCIÓN

Debido a la situación actual de la humanidad el cultivo de hongos se volvió una actividad constructiva para solucionar uno de los problemas más importantes: alimentar a una población en constante crecimiento (Chang y Miles, 1984). En 2013, la producción de champiñones y trufas fue de casi 10 millones de toneladas en todo el mundo (FAO, 2015). Comparados con otros alimentos, los hongos tienen un alto valor proteínico (Chang y Miles, 1984). Estos organismos han demostrado tener compuestos bioactivos que presentan propiedades medicinales y nutricionales mismas que pueden ser extraídas y aprovechadas en la prevención y tratamientos de enfermedades. Además, los hongos basidiomicetos presentan actividades antibacterianas (Rajesh *et al.*, 2014). *Ustilago maydis* (DC) Corda, es el nombre científico del hongo basidiomiceto causante de la enfermedad conocida comúnmente como “huitlacoche” o carbón común. Es un patógeno que parasita al cultivo del maíz (*Zea mays*), ya que infecta a los granos de elote formando tumores o agallas de color gris; el interior de estas estructuras es de color oscuro debido a la presencia de esporas negras que son el medio de diseminación del hongo. A pesar de que en otros países *U. maydis* es considerado como plaga, desde tiempos prehispánicos, el “huitlacoche” se ha usado como alimento en la cocina mexicana (Mayett *et al.*, 2012).

La situación agrícola de México se encuentra colapsada, 4.5 de cada 10 migrantes son campesinos milperos, de los 12.5 millones de personas que emigran a Estados Unidos tienen entre 14 y 44 años (Ashwell, 2008). Esta pérdida no solo es económica, sino social y cultural, lo cual es un hecho inadmisibles para el país considerado como “cuna del maíz” (Kato *et al.*, 2009).

U. maydis es un basidiomiceto que ofrece una composición química atractiva y un alto valor nutricional. Productos fermentados de medios de cultivo de *U. maydis* han demostrado tener antibióticos, aceites, cristales, grasas, esteroides, aminoácidos esenciales, proteínas, vitaminas (Haskins, 1950; Valverde *et al.*, 1995). Sin embargo, poco se sabe acerca del género *Ustilago* y al ser una especie nativa de México, su trascendencia como recurso genético tiene un alto potencial (Pataky, 1991). Para potencializar al hongo *Ustilago*, se realizaron estudios sobre su

composición nutricional, sus propiedades funcionales y medicinales en extractos de hongos comestibles cultivados en sustratos sólidos (Martínez-Carrera y Ramírez, 2016). Existen pocos estudios sobre la anatomía del huitlacoche y la descripción de su ontogenia desde su inoculación en el maíz.

II. MARCO DE TEÓRICO

2.1 Biotecnología y desarrollo social

La biotecnología moderna es una actividad multidisciplinaria que tiene como misión la utilización del conocimiento derivado de diferentes disciplinas y métodos para poder resolver problemas. Sus prácticas involucran al sector social, público, y privado. Uno de los aspectos más relevantes de la biotecnología en la biología es el manejo de especies y su conservación. Es imperativo adoptar nuevas tecnologías, pero sobre todo desarrollarlas dentro del propio sistema con el fin de que sean locales, particulares y se adapten fácilmente a nuestras necesidades específicas y al medio en cuestión (Bolívar, 2004).

En México, la biotecnología relacionada con la biodiversidad tiene efectos duales. Por un lado, los efectos positivos y negativos, en relación de la biotecnología a la biodiversidad; y por otra parte la materia prima que ofrece la biodiversidad para la biotecnología (Bolívar, 2004). Las herramientas biotecnológicas deben utilizarse con cuidado ya que uno de los mayores riesgos que se pueden correr es que la biotecnología aplicada despoja al campesino de bajos recursos del control de buena parte del proceso agrícola. La agricultura biotecnológica suele estar asociada a la falta de sustentabilidad y por lo tanto es un riesgo para la seguridad alimentaria (Bolívar, 2004).

Otro problema es la normatividad y la capacidad institucional para que se encuentre un balance correcto entre el cuidado de la biodiversidad y la promoción de su uso correcto. Particularmente para México, se debe contar con una ley de acceso a recursos biológicos. Esta problemática enfrenta a dos extremos, el riesgo de perder los recursos biológicos, y el de crear una legislación tan restrictiva que cualquier uso que se haga sea ilegal. Una forma de crear una buena ley de accesos es manejar al recurso como tal, como un "recurso", y así promover su utilización. Aunque este tipo de enfoque debe ser cauteloso, ya que se debe tener en claro desde el inicio qué sector se verá beneficiado con el uso de este recurso, donde se debe dar prioridad al sector social, y hacer hincapié a los habitantes locales de dónde se obtiene el recurso. En este sentido, también entra en juego la protección

del conocimiento tradicional y con ella su conservación (Bolívar, 2004). Esto es complicado siendo que el conocimiento tradicional suele ser colectivo, y dificulta realizar trámites de propiedad intelectual, tal y como está estipulado por la ley (Thompson, 2007).

2.2 Origen del maíz en México

En 1895 Ascherson, propone que el teocintle es el ancestro directo del maíz y que pudo ser un origen monofilético (Citado por Kato Yamakake, 2008). Eubanks postula que el maíz se originó por la cruce de *Tripsacum dactyloides* y *Zea diploperennis* (Kato *et al.*, 2009). Se calcula que se desarrolló hace ocho mil años en Mesoamérica. Se trata de una de las selecciones artificiales más sobresalientes en temas agrícolas. En relación a los patrones de distribución se propone que el maíz fue domesticado en cinco regiones (centro-sur de México y en Centroamérica) (McClintock, 1978; Kato, 1984). De ese proceso se han localizado tres grandes regiones: en el norte (Chihuahua-Durango), en el occidente (Jalisco-Michoacán-Colima-Guanajuato), y el sur de México (Oaxaca-Chiapas- Guatemala). Su origen fue un proceso gradual, con la ayuda de la selección de cazadores-recolectores prehistóricos para su domesticación (Kato *et al.*, 2009).

Actualmente, existen alrededor de 62 variedades de maíz, adaptadas a muy diferentes climas, suelos y regímenes pluviales (Bourges, 2013). Estudios recientes han demostrado que el país es un continuo de diversidad, y que en todas las regiones del territorio mexicano existe una actividad constante de generación de variación genética en el maíz que se cultiva (Kato *et al.*, 2009).

2.3 Características y propiedades del grano de maíz

Los granos de maíz se localizan en la inflorescencia femenina del maíz, llamada espiga. En relación a la longitud, diámetro y número de hileras de la mazorca, esta puede contener entre 300 y 1000 granos. El grano del maíz puede pesar entre 19 y 30 g por cada 100 granos (FAO, 1993).

El fruto del maíz es un cariopse, ya que la pared del ovario está fusionada con la cubierta de la semilla y juntas forman la pared del fruto (Figura 1). Basada en

la morfología del grano de maíz (Tosi, 2012), la semilla madura se compone del pericarpio (5 y 6%), que le da el color al grano de maíz; el endospermo que es el 85% del grano y en donde se almacenan las propiedades nutricionales que tienen la función de alimentar al embrión (Figura 2). Leroux *et al.* (2014), comenta que el tamaño del endospermo varió dependiendo de la locación donde creció en los primeros doce días. El maíz cuenta con alto contenido de fibra, hierro y grasa, aunque tiene una deficiencia en la concentración de proteínas como la lisina y triptófano, la zeína es la principal proteína en los granos de maíz (Paliwal *et al.*, 2001). En el pericarpio están los principales minerales del grano, como son fósforo, potasio, magnesio, silicio, sodio, calcio, hierro, manganeso, cobre, zinc, y está formado por celulosa. Borok *et al.* (2018) comentan que hay una amplia acumulación de Si en el embrión y el pericarpio. Los otros macroelementos encontrados fueron P, S, Na, y N. En el grano está el principal compuesto, el almidón que abarca entre el 60 y 85% del peso el grano y de ahí el 98% se ubica en el endospermo. El maíz es rico en vitamina A y vitamina E (FAO, 1993). Las teliosporas de *U. maydis* son ornamentadas (Pataky, 1991), mientras que el polen de maíz tiene una superficie lisa (Figura 3).

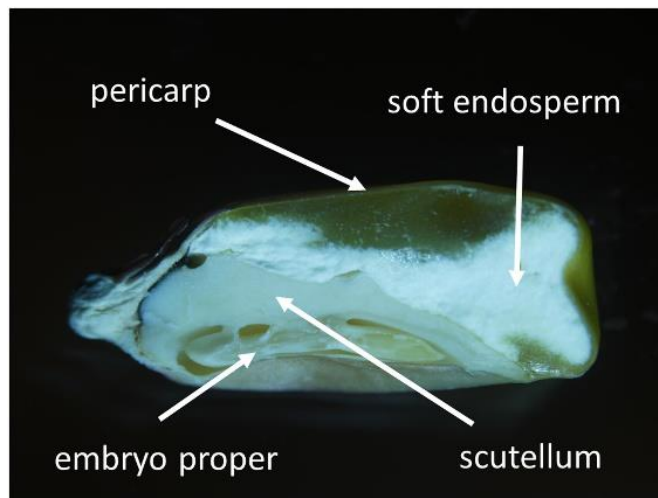


Figura 1. Sección longitudinal de un maíz maduro (tercer estado de desarrollo). Se observan los tejidos del grano, el pericarpio, el endospermo blando, el escutelo y embrión. Tomado de Borok *et al.* (2018).

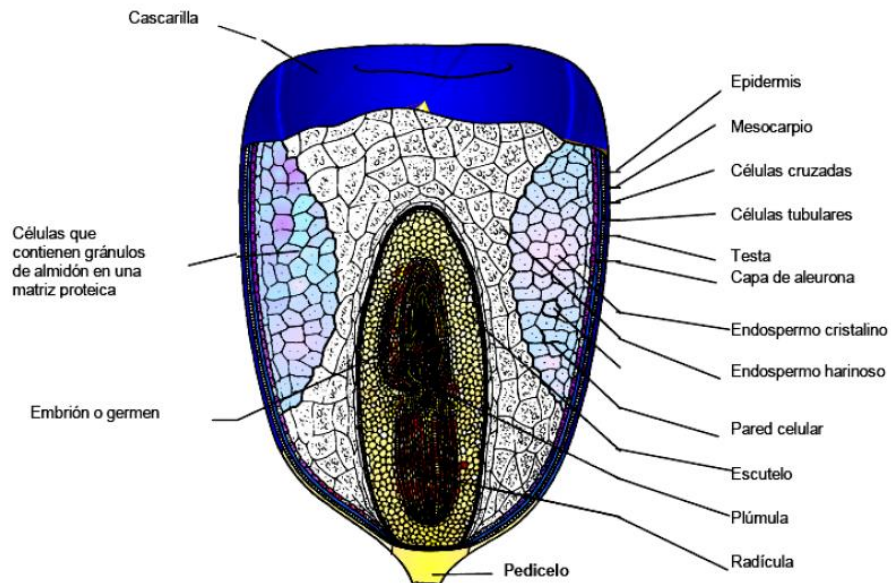


Figura 2. Partes del grano de maíz (Tosi, 2012).

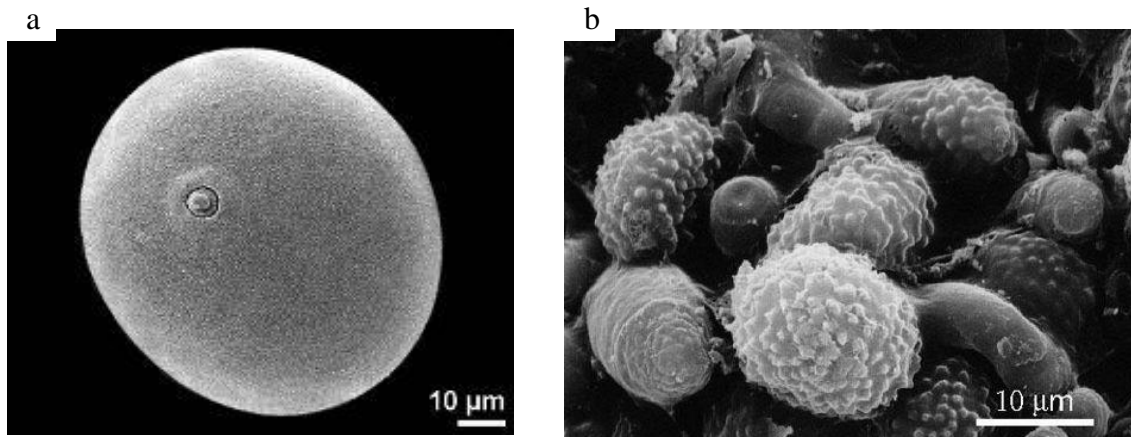


Figura 3. a. Polen de maíz tomado de Diethart (2005). b. Teliospora de *Ustilago maydis* tomado de Pataky (1991).

2.4 Importancia del maíz en México

Históricamente la diversidad morfológica ha servido como indicador de la diversidad genética para determinar centros de origen de la agricultura. Además, está relacionada directamente con el proceso de domesticación, puesto que, al realizar

una selección artificial se suelen buscar características morfológicas específicas (Kato *et al.*, 2013).

El maíz es el cultivo más emblemático del país, siendo además la base de la economía rural y de la nutrición familiar. México, es el cuarto mayor productor de maíz en el mundo. Se trata del principal cultivo del país con un promedio de 8.5 millones de hectáreas sembradas y una actividad a la que se dedica el 80% de los productores agrícolas del país, unos 4 millones de personas. El maíz cumple todas las características para ser un alimento completo debido a sus propiedades inocuas, accesibilidad, atractivo sensorial y valor cultural. Se trata de la principal fuente de energía, proteínas, fibra y hierro para los mexicanos. Alrededor de 4/5 partes del maíz que se cultiva es blanco. El 56 % de la producción del maíz proviene de productores campesinos. El consumo humano es de más de 12 millones de toneladas por año (300 g diarios en zonas rurales y 180 g diarios en zonas urbanas), en comparación con los 6 millones de toneladas de trigo y alrededor de 600 mil toneladas de arroz. Además de ser un recurso alimenticio, el maíz se puede utilizar como combustible, pienso, medicina, artesanías, bebidas fermentadas, o envolturas, entre otros (Bourges, 2013).

2.5 Generalidades de los hongos

Los hongos son organismos eucariotas, heterótrofos que no pueden producir los nutrientes básicos que requieren y por eso obtienen su alimento a través de otros organismos mediante el uso de enzimas (Cooke, 1958; Carlile *et al.*, 2001). Los hongos heterótrofos almacenan glucógeno y lípidos (a diferencia de las plantas, que almacenan almidón). Algunos son parásitos facultativos, obligados o simbiotes; otros se alimentan de materia orgánica muerta (saprobios). Secretan enzimas que reducen los alimentos a moléculas pequeñas fáciles de absorber. Los parásitos tienen hifas especializadas (haustorios), que absorben los nutrientes directamente de las células de otros organismos. Junto con las bacterias, los hongos son los principales descomponedores de la materia orgánica.

III. MARCO DE REFERENCIA

3.1 Historia de los hongos comestibles

Desde sus inicios el ser humano ha tenido una relación con los hongos, nuestros ancestros recolectaban hongos comestibles (Lhote, 1973). Las primeras referencias documentadas sobre la utilización de los hongos ya sea como alimento, medicina o en ritos religiosos se encuentran en la India y Egipto y datan de hace 4 mil años, cuando la creencia era que surgían de un fluido formado por los relámpagos. Nicander 185 a.C. físico y poeta griego, hizo alusión a los hongos venenosos en su poema “Alexipharmaca” (Buller, 1914). Llamados a veces como imperfecciones del terreno, uno de los primeros intentos de clasificación lo realizó el médico griego, Dioscórides, en el primer siglo de la era cristiana, quién lo divide en variedades comestibles y venenosas (Buller, 1914; Kendrick, 2011).

Bernardino de Sahagún denota la importancia de los hongos para los indígenas de la nueva España, con sus propiedades alimenticias, farmacológicas o psicoterapéuticas y reporta que los aztecas conocían más de 50 especies de hongos comestibles. En Chignahuapan, Puebla, existe una iglesia dedicada a un Cristo conocido como “Nuestro Señor del Honguito”, y se trataba de un hongo fosilizado (*Ganoderma lobatum*) aparecía grabado junto a la imagen de un Cristo con un sol y una luna a cada lado. Para nuestros antepasados indígenas, los hongos fueron importantes en muchos sentidos, como alimento o con poder curativo, destacándose en su aspecto ritual, cuya esencia trasciende hasta hoy día en culturas como la Cora en Nayarit, Huichola en San Luis Potosí y Zacatecas, Maya en la península de Yucatán, Rarámuri en Chihuahua y Sonora, Mazateca en la Sierra de Oaxaca y sur de Puebla y Nahua en el centro de México (Guzmán, 1985).

3.2 *Ustilago maydis* (huitlacoche)

Históricamente existen fuentes que registran al huitlacoche como un manjar culinario y alimento de reyes prehispánicos, sin embargo, en recientes estudios etnográficos, antropólogos y especialistas de la cocina tradicional mexicana muestran que esto último pudo ser una estrategia mercadológica para generar una mayor aceptación de este producto en la sociedad, puesto que existen evidencias

suficientes para afirmar que en la época prehispánica el huitlacoche era concebido como “algo raro” que crecía en la mazorca, considerándolo una deformidad o anomalía de la misma, y que estaba ligado a la deidad de la lluvia, como se puede constatar en el vocablo náhuatl “huitlacoche” “cujtlacochi”, “cuitlacohtli” o “cuitlacuchtlí”, cuyo significado puede traducirse como “mugre que crece encima del maíz”, “caca de cuervo” (Valadez-Azua *et al.*, 2011).

Sin embargo, otras evidencias muestran que en la época colonial el huitlacoche se convirtió en un alimento de subsistencia para indígenas y campesinos, necesario y presente en su dieta, que sobrevive hasta nuestras fechas, inició a mediados del siglo XX, y fue el punto de partida cuando el huitlacoche pasó a ser una más de nuestras bendiciones, y a formar parte de las maravillas mexicanas y a ser protagonista de importantes recetas de chefs dentro de la categoría de “alimento tradicional”, exquisitez, manjar.

Para un consumo tradicional del huitlacoche, su preparación conlleva guisarlo con ajo y epazote, se consume preferentemente antes de su maduración en quesadillas y algunos otros guisos, sin embargo su uso en recetas es muy variado, depende de la región en donde se prepare, algunos de sus usos más elaborados incluyen: cremas, relleno de pechugas de pollo, crepas; de igual forma es un ingrediente esencial en las salsas que bañan todo tipo de carnes, se usa para la preparación del popular mole prieto (Paredes *et al.*, 2006).

Conocido como el hongo que infecta el maíz, el huitlacoche (*U. maydis*) es un basidiomiceto que ofrece una composición química atractiva y un alto valor nutricional. Sin embargo, poco se sabe acerca del género *Ustilago* y al ser una especie nativa de México, su trascendencia como recurso genético tiene un alto potencial (Pataky, 1991).

3.3 Producción de huitlacoche

En un inicio, para la producción tradicional de huitlacoche se intentó mezclar semillas de maíz con agallas (teliosporas), no obstante, este procedimiento no dio resultado. Posteriormente se intentaron obtener grandes cantidades de huitlacoche dejando esporas en los suelos antes de sembrar, este método tampoco dio

resultados, finalmente se experimentó esparciendo las esporas en las plantas de maíz cuando los jilotes están tiernos, obteniendo escasos resultados, por lo que la producción alcanzada no fue suficiente para satisfacer mercados extensos (Paredes *et al.*, 2006).

En la producción por inoculación, se buscaba de primera mano obtener plantas resistentes al hongo, sin embargo, debido al aumento de la demanda de huitlacoche, se empezó a utilizar esta técnica para obtenerlo a gran escala y satisfacer los mercados nacionales y extranjeros. Se ha reportado que la inyección de esporidios en la planta de maíz produce un alto índice de infección; por lo que esta estrategia se ha utilizado para obtener huitlacoche con buenos resultados (Thakur *et al.*, 1989; Pataky, 1991; Pope y McCarter, 1992; Valverde *et al.*, 1993; Vanegas *et al.*, 1995; Paredes *et al.*, 2006). Pimentel *et al.* (2011), comenta que la variedad de maíz utilizado como sustrato influye en las características fisicoquímicas del huitlacoche.

3.4 Ciclo de vida de *U. maydis*

U. maydis es agrupado taxonómicamente con los hongos heterobasidiomicetes. El ciclo de vida de *U. maydis* incluye tres estados diferentes (Figura 4). Teliosporas diploides se forman en agallas de hospederos infectados y son la forma de hibernación de propágulos del hongo. Su forma es esférica a elipsoide, de color negro a café olivo, y fuertemente equinulada, cubierta por pequeñas espinas. Cuando germinan las teliosporas forman un promicelio septado, que da lugar a la meiosis, y se forman esporidias haploides (basidioesporas), que usualmente tienen un solo núcleo. Las esporas haploides se pueden mantener fácilmente en cultivos que muchos consideran, es el estado saprófito del hongo. Los cultivos de esporidios pueden ser propagados de diferentes maneras, se ha observado una variación considerable en su morfología, color, tamaño y crecimiento. La espora no infecciosa se comporta como una levadura. Bajo condiciones ambientales apropiadas, las cruces de esporidias genéticamente compatibles forman hifas dicarióticas; la tercera etapa son las esporidias patogénicas que, pueden infectar al maíz y al teosinte (Pataky y Snetselaar, 2006).

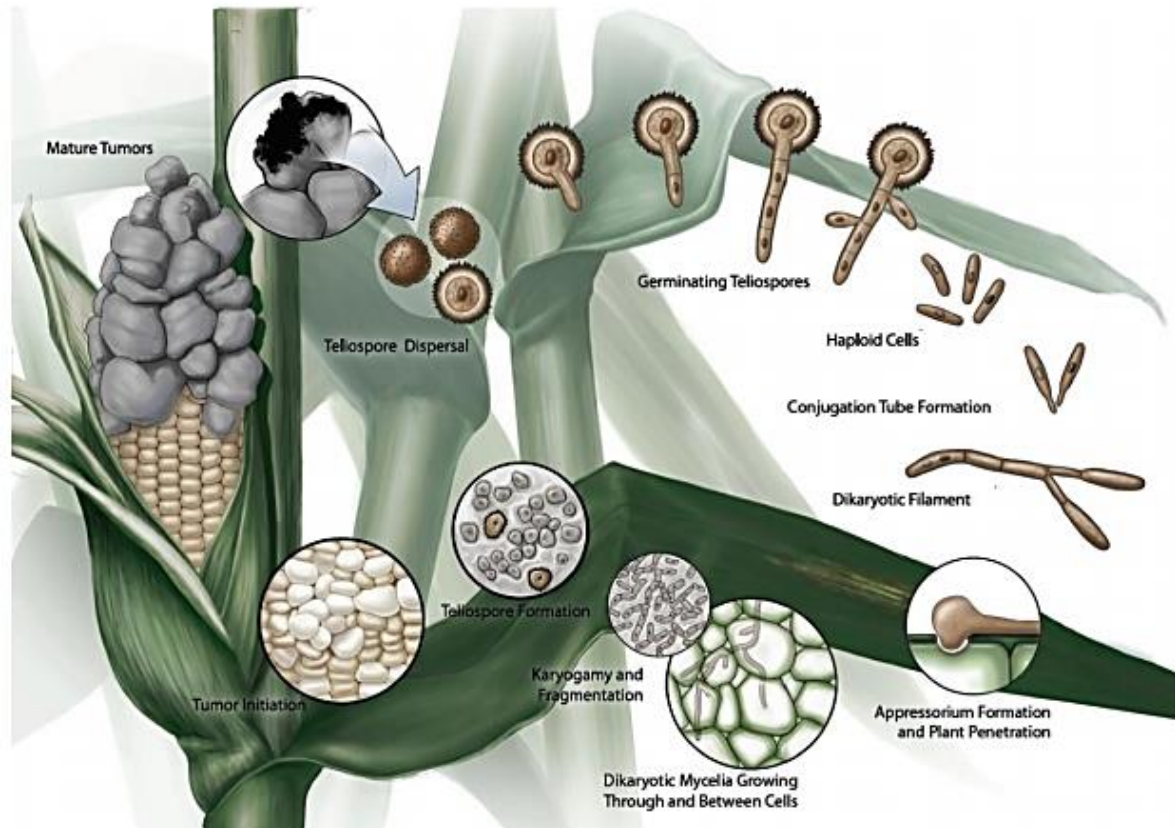


Figura 4. Ciclo de vida de *Ustilago maydis*. Tomado de Saville *et al.*, (2012).

U. maydis es un basidiomiceto patógeno que infecta al maíz, este hongo no usa estrategias de virulencia agresivas para matar a su huésped. Pertenece al grupo de los parásitos biotróficos que dependen del tejido vivo para la proliferación y el desarrollo. La enfermedad se traduce en crecimiento de la planta atrofiada y reduce el rendimiento, lo que conduce a graves pérdidas económicas (Kämper *et al.*, 2006).

La forma patogénica del hongo dimórfico *U. maydis* es una hifa dicariótica, que consiste en una elongación de células cilíndricas separadas por un septo. Su forma no patogénica es haploide y se comporta como levadura saprofitica; las células tienen forma tubular y las células hijas emergen por gemación. La transición de su forma de levadura a hifa implica varias etapas: la formación de tubos conjugados de células haploides de tipo de cruce diferente, la fusión de células para formar un dicarion, y finalmente filamentos (hifas) que crecen del dicarion (Banuett y Herskowitz, 1996). La conjugación produce un vigoroso crecimiento de hifas dicarióticas, hifas que son ramificadas, y que proliferan intracelularmente dando

lugar a la inducción de un tumor en diferentes partes de la planta. Las hifas dicarióticas parecen dar lugar a una fusión nuclear al tiempo que ocurre la formación de tumores. Dentro de los tumores, el hongo produce una espora especializada llamada teliospora, que es un componente que dará lugar a la meiosis que producirá una forma tipo levadura haploide cuando germine (Banuett, y Herskowitz,1996).

La formación de las teliosporas dentro de las células tumorales implica cambios morfológicos de hifas cilíndricas a teliosporas redondeadas. Estudios sugieren que la formación de teliosporas se da por fragmentación de las hifas. Estos estudios describen la aparición de fragmentos hifales que dan lugar a cambios morfológicos antes de la producción de esporas (Sleumer, 1932; Christensen, 1931; Banuett y Herskowitz, 1996). El síntoma más distintivo es la presencia de agallas que se pueden desarrollar en cualquiera de las partes aéreas de la planta. Las agallas se encuentran comúnmente en mazorcas, tallos, brotes y nodos, pero también ocurren en hojas. En su etapa madura, las agallas contienen masas oscuras de esporas, similares al hollín, de ahí se deriva el nombre. Las agallas que aparecen en la mazorca la dañan totalmente ya que reemplazan al grano con esporas. Las agallas que aparecen en otras partes de la planta pueden afectar su rendimiento en diferentes extensiones. La severidad de estos síntomas varía de acuerdo con el aislamiento del hongo. La planta parece ser susceptible a la infección durante su etapa de crecimiento, pero las más jóvenes son muy vulnerables y muestran una alta mortalidad cuando ocurre la infección (Banuett y Herskowitz, 1996).

3.5 Desarrollo de la agalla (ontogenia)

Las agallas consisten en tejidos de hongos y del hospedero. Las agallas jóvenes son blancas, firmes y cubiertas con un peridermo semi brillante. Cuando las agallas comienzan a madurar, el interior del tejido se vuelve semicarnoso y aparecen vetas de tejidos negros conforme aparecen las teliosporas. Con más maduración, las agallas se vuelven una masa de teliosporas polvosas, y el peridermo se rompe para liberarlas. En las mazorcas, cuando los ovarios son infectados las agallas maduran alrededor de tres semanas más tarde. Tres a seis días posteriores a la infección los

granos se ven ligeramente descoloridos y sin forma; agallas blancas, pequeñas, firmes se desarrollan de nueve/diez días después y se observan claramente entre los diez/catorce días, siendo que entre los once/doce días comienzan a alargarse con un crecimiento tumoral (Pataky y Snetselaar, 2006).

Las agallas comienzan a tener una apariencia gris plateada mientras que aparecen venas de tejidos oscuros (teliosporas) a los catorce/quince días de la infección. A partir de los diecisiete días cerca de 70% del tejido de las agallas es oscuro, mantienen una integridad semicarnosa propia de hongo. A los veintiún a veintitrés días, el peridermo se rompe, las agallas se convierten en una flácida húmeda masa, mientras con deshidratación, se vuelven hollinosas y polvosas masas de teliosporas que se observan a simple vista (Pataky y Snetselaar, 2006).

El número, tamaño y localización de las agallas depende de la edad de las plantas al momento de la infección. Las agallas de las hojas difieren considerablemente en tamaño de las agallas de los tallos y mazorcas, que son más grandes. En el tallo, el diámetro de las agallas es de 20-30 cm. Las agallas pueden reemplazar la mayoría del tejido dependiendo de la severidad de la infección. Las agallas de las mazorcas usualmente resultan de la infección de ovarios individuales. Comúnmente, unos pocos granos en la base o extremos de la punta de la mazorca, son los infectados (Pataky y Snetselaar, 2006).

La cruza e infección están bajo control genético de dos *loci* diferentes *a* y *b*. Históricamente, el locus *a* se le ha llamado locus de tipo cruza, el locus *b* al de patogenicidad. Para que *U. maydis* sea infeccioso, los compañeros de cruza (células haploides que forman una hifa dicariótica) deben tener alelos diferentes en ambos de sus loci *a* y *b* (por ejemplo, esporidias con alelos a_1b_2 con un alelo a_2b_1). Los alelos de ambos loci han sido clonados y secuenciados. El locus *a* tiene dos alelos, a_1 y a_2 , codifican componentes de una respuesta feromónica en la formación de la fusión celular y tubos de conjugación. Cuando los nutrientes son limitados, las esporidias haploides que tienen diferentes alelos en el locus *a* forman un filamento fino que crece a través uno del otro siguiendo gradientes feromónicos. Por último, el filamento se fusiona. Múltiples alelos se producen en el locus *b* que codifica proteínas de unión a ADN con funciones reguladoras. Si el dicarion que resulta de

la fusión filamentosa tendrá dos núcleos con alelos diferentes en el locus *b*, se formará una vigorosa infección. El filamento infeccioso responde a una superficie apropiada del hospedero formando un apresorio que permitirá al hongo penetrar en el hospedero. Los apresorios se forman sólo en células que puedan alongarse rápidamente, no se han podido inducir *in vitro*. La cruce y penetración ocurre en un periodo de doce/dieciocho horas en plantas inoculadas artificialmente con esporidias compatibles (Pataky y Snetselaar, 2006).

En examinaciones microscópicas se observa que, en etapas tempranas, el dicarion de *U. maydis* se comporta como un biótrofo. El crecimiento hifal crece en su mayoría por vía intracelular, pero tanto la membrana plasmática del hongo como del hospedero permanecen intactas. Las células de las plantas realizan un flujo citoplasmático normal a pesar de que están invadidas por las hifas. El haustorio regular no es observado, pero la presencia de un material en la matriz, denso electrónicamente entre las paredes del hospedero y el hongo son un sitio de transferencia de nutrientes. La naturaleza exacta de la transferencia de nutrientes aún no se conoce, pero, la mayoría de cepas de *U. maydis* que son autótrofos aminoácidos no son patogénicos, sugiriendo que un simple carbohidrato podría ser el nutriente primario que utiliza el hongo (Pataky y Snetselaar, 2006).

Las alteraciones microscópicas como es el alargamiento anormal de células parenquimales se puede observar a las 24 horas de inoculación. Los tumores resultantes de ese crecimiento anormal de las células hospedera comienzan a desarrollarse una semana después de la infección. Los tumores inicialmente son el resultado de un crecimiento anormal de divisiones celulares y alargamientos de tejidos del hospedero, las hifas fúngicas son relativamente raras. Las células hospederas permanecen vivas durante las etapas tempranas de la formación de tumores. Por ejemplo, el patrón regular de venación se pierde, y las células parenquimatosas pueden volverse extremadamente largas. Mientras va creciendo el tumor, las hifas comienzan a proliferar entre las células hospederas, en lugar de crecer a través de ellas. La cariogamia (fusión de núcleos que ocurre durante la reproducción sexual), parece que ocurre en etapas tempranas del alargamiento de los tumores, y es seguido por una proliferación hifal rápida entre células hospederas.

En esta etapa, las paredes de las hifas se hinchan y se vuelven gelatinosas, y el protoplasto pierde su forma cilíndrica y se vuelve esférico. Por un proceso que aún es poco entendido, las esporas iniciales se alargan y desarrollan paredes ornamentadas con pigmentos, que pueden verse emergiendo de las hifas gelatinosas remanentes. El hongo completa su ciclo de vida cada vez que una teliospora se forma en el hospedero infectado (Pataky y Snetselaar, 2006).

El hongo pasa el invierno como una teliospora diploide en los restos del cultivo o en el suelo. Se estima que una sola agalla de tamaño mediano produce 200 mil millones de esporas. Las teliosporas pueden mantenerse viables durante muchos años. Se diseminan directamente por viento o lluvia, o también pueden germinar y pasar por la meiosis para formar esporidios haploides que también son dispersadas por lluvia y viento. La esporidia brota en una forma de levadura, se cruza y forma una infección de hifa dicariótica (Pataky y Snetselaar, 2006).

El estudio de tejidos con parafina provee información anatómica valiosa. Consiste en encapsular tejido en un bloque sólido, que sirve de soporte estructural para que se pueda seccionar en cortes finos, y así poder visualizar y caracterizar los tejidos. Al proceso de distribuir uniformemente el medio de soporte a través del tejido se llama infiltración. El proceso de solidificación del tejido dentro de un bloque de soporte se le conoce como incrustación (Ruzin, 1999). El propósito de este estudio fue apreciar si existen diferencias morfológicas entre las diferentes etapas.

3.6 Morfología de la infección








U. maydis infecta a dos hospederos, al maíz (*Zea mays*) y teocintle (*Zea mexicana*). Su tipo de infección se caracteriza por las masas de teliosporas que se encuentran dentro de las plantas hospederas. Los síntomas más obvios son agallas tipo tumores que varían en tamaño, de menos de un centímetro a más de 30 mm de diámetro (Cuadro 1). Todos los tejidos meristemáticos son susceptibles a infección. Las agallas se encuentran más frecuentemente en mazorcas, tallos, brotes nodulares y costillas medias de hojas. Aunque las agallas se pueden formar en muchas partes de las plantas, la infección es local (no se coloniza sistemáticamente). Ocasionalmente, las agallas se desarrollan debajo de la

superficie del suelo cuando el meristemo apical de una planta joven es infectado (Pataky y Snetselaar, 2006). Síntomas de infecciones causadas de *Sphacelotheca reiliana*, son similares a los del huitlacoche. Cuando se infectan sistemáticamente, las estructuras florales (tallos y mazorcas) se convierten en una especie de masas de teliosporas polvosas que pueden llegar a parecerse a las agallas del huitlacoche. Los haces vasculares del huésped generalmente están presentes como estructuras filamentosas de *S. reiliana* (Pataky y Snetselaar, 2006).

3.7 Propiedades del huitlacoche

En la actualidad el huitlacoche se consume tanto en el medio urbano como en el medio rural, este hongo puede ser obtenido en época de lluvias en mercados tradicionales, y fuera de esta temporada puede ser conseguido enlatado por empresas como Herdez S.A. Analizando pesos secos, aunque la cantidad de proteínas es moderada (11.5-16.4 g/100 g), es más alta que en maíz y otros cereales. El contenido de carbohidratos (55.1-66.5 g/100 g), y fibras (16.0-23.5 g/100 g), es alto. Presentan bajas cantidades de calorías y colesterol (Valverde *et al.*, 1995; Haskins, 1950). Presenta altas cantidades de ácido linoleico, que se considera un ácido graso esencial. El huitlacoche tiene aminoácidos como la histidina, treonina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico y serina (Valverde-González, 1992). Los mayores componentes de nutrientes son el carbono y nitrógeno que proveen energía y ayudan a formar compuestos celulares, ya que la mayoría de los constituyentes de las células poseen carbono (Stakman *et al.*, 1929).

Cuadro 1. Descripción de la morfogénesis de la infección de *Ustilago maydis* durante el tiempo que madura la agalla y presenta una masa de teliosporas negras y polvosas (Tomado de Pataky y Snetselaar, 2006).

		
<p>E 1. Los granos levemente descoloridos o desfigurados son notables a los 3 a 6 días después de la infección</p>	<p>E2. Las agallas pequeñas, blancas y firmes se desarrollan a los 9 o 10 días, resultando un crecimiento similar a un tumor a los 11-12 días después de la infección</p>	
		
E3	E4	E5
<p>Las agallas comienzan a tener una apariencia gris plateada, ya que las rayas de los tejidos ennegrecidos (teliosporas) comienzan a formarse entre los 14 a 15 días después de la infección (E1, E2 y E3)</p>		
		
E6 (vista completa)	E6 (Corte transversal de la mazorca)	
<p>Casi el 70% del tejido de las agallas de <i>U. maydis</i> está ennegrecido, mientras que las agallas mantienen una textura semi-carnosa, parecida a un hongo después de 16 a 18 días de la infección (E6). Entre 21 y 23 días, la peridermis se rompe y las agallas se vuelven una masa descuidada y húmeda de teliosporas. Con la deshidratación, las agallas se vuelven masas de teliosporas en polvo y hollín.</p>		

En los aspectos antibióticos, *U. maydis* ha demostrado tener efectos contra bacterias Gram-positivas, como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium smegmatis*. También ha mostrado tener efectos positivos contra bacterias Gram-negativas como *Brucella bronchiseptica*, y contra *Aspergillus* spp., *Verticillium* spp., y otros hongos (Haskins, 1950; Haskins y Thorn, 1951). Martínez-Flores *et al.* (2008), estudiaron cambios de apariencia y parámetros de color del

huitlacoche, las variables a estudiar fueron la luminosidad, el cambio de color total, el ángulo de tono y la pureza de color. También determinaron el porcentaje de peso perdido con respecto al peso inicial del huitlacoche fresco. El patrón de respiración se determinó con base en el método colorimétrico de Claypool y Keefer (1942), que a su vez fue modificado por Pratt y Mendoza (1979). El etileno se cuantificó por cromatografía de gases. Reportaron que el huitlacoche presenta altas tasas de respiración, lo que lo hace un hongo altamente perecedero. También parece tener una rápida pérdida de peso, lo cual figura como el problema principal para incrementar su vida útil ya que se genera una ruptura en las agallas y oscurecimiento en la coloración, siendo que la refrigeración influye ampliamente en esos parámetros.

3.8 Consumo y comercialización de huitlacoche

La comercialización del huitlacoche no es fácil ya que, por acción del desgranado, recibe daños mecánicos, porque al estar expuestas las agallas, se abarca mayor superficie de contacto, son más vulnerables, también la cubierta externa recibe esfuerzos de compresión que rebasan su límite elástico. Debido a la alta actividad metabólica, pérdida de agua acelerada y su falta de cutícula, *U. maydis* su vida de anaquel es corta (3-4 días), lo cual la sitúa con una alta desventaja comercial ya que se tiene que consumir casi inmediatamente después de la cosecha (López *et al.* 2017).

Para un consumo tradicional del huitlacoche, conlleva guisarlo con ajo y epazote, se consume preferentemente antes de su maduración en quesadillas y algunos otros guisos, sin embargo su uso en recetas es muy variado, depende de la región en donde se prepare, algunos de sus usos más elaborados incluyen: cremas, relleno de pechugas de pollo, crepas; de igual forma es un ingrediente esencial en las salsas que bañan todo tipo de carnes, se usa para la preparación del popular mole prieto (Paredes López *et al.*, 2006).

IV. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Debido a la desigual situación de la humanidad, uno de los problemas de mayor importancia a resolver es alimentar a una población en constante crecimiento, donde los hongos podrían tener un papel crucial, gracias a sus características de desarrollo, y a sus valores nutricionales y medicinales. El género *Ustilago* ha demostrado tener muchas cualidades que lo convierten en un foco importante y potencial de consumo. Por otro lado, la agricultura marginal de los campesinos pobres de México se encuentra colapsada y una forma de incentivar a las nuevas generaciones del campo es ofrecerles trabajo a través del cultivo de *U. maydis* que conlleva a aspectos no sólo económicos, sino nutricionales, sociales y culturales. Es regresar el poder del maíz a los campesinos, dándole un valor agregado al grano, para que tengan más y mejores opciones y, desde luego, mejor ingreso. El consumo del huitlacoche se realiza cuando la agalla está madura, con textura a hongo, aunque también cuando la agalla es casi oscura, con demasiadas teliosporas maduras y con apariencia de polvo. Hasta ahora no se sabe cuál es el mecanismo morfológico y bioquímico que se lleva a cabo una vez que se inocula y se desarrolla la agalla del huitlacoche de manera intensiva. En el presente trabajo se estudió si la apariencia de la agalla está asociada con mejor calidad nutricional y funcional, y con base en eso proponer una estrategia de producción para las comunidades de la región del centro de México, la cual permita promover la difusión del consumo del huitlacoche en las mejores etapas de desarrollo.

V. HIPÓTESIS

Existen diferencias morfológicas y bioquímicas en las distintas etapas de infección de *Ustilago maydis*, hasta la aparición de teliosporas en la agalla madura.

VI. OBJETIVO

Determinar las propiedades nutricionales y funcionales de las agallas de maíz infectadas con *Ustilago maydis*, basado en la morfología y la ontogenia de la infección del hongo en el elote de maíz hasta su comercialización.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Describir la morfología y anatomía del hongo *U. maydis* en el grano del elote durante las diferentes etapas de la infección.
2. Analizar las propiedades funcionales que presentan los granos de elote durante la infección de *U. maydis* en las diferentes etapas de formación de la agalla.
3. Proponer a los productores del hongo *U. maydis* (huitlacoche), la comercialización del producto en el desarrollo y propiedades de las agallas.

VII. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En la figura 5 se muestra la metodología general que se utilizó en la presente investigación.

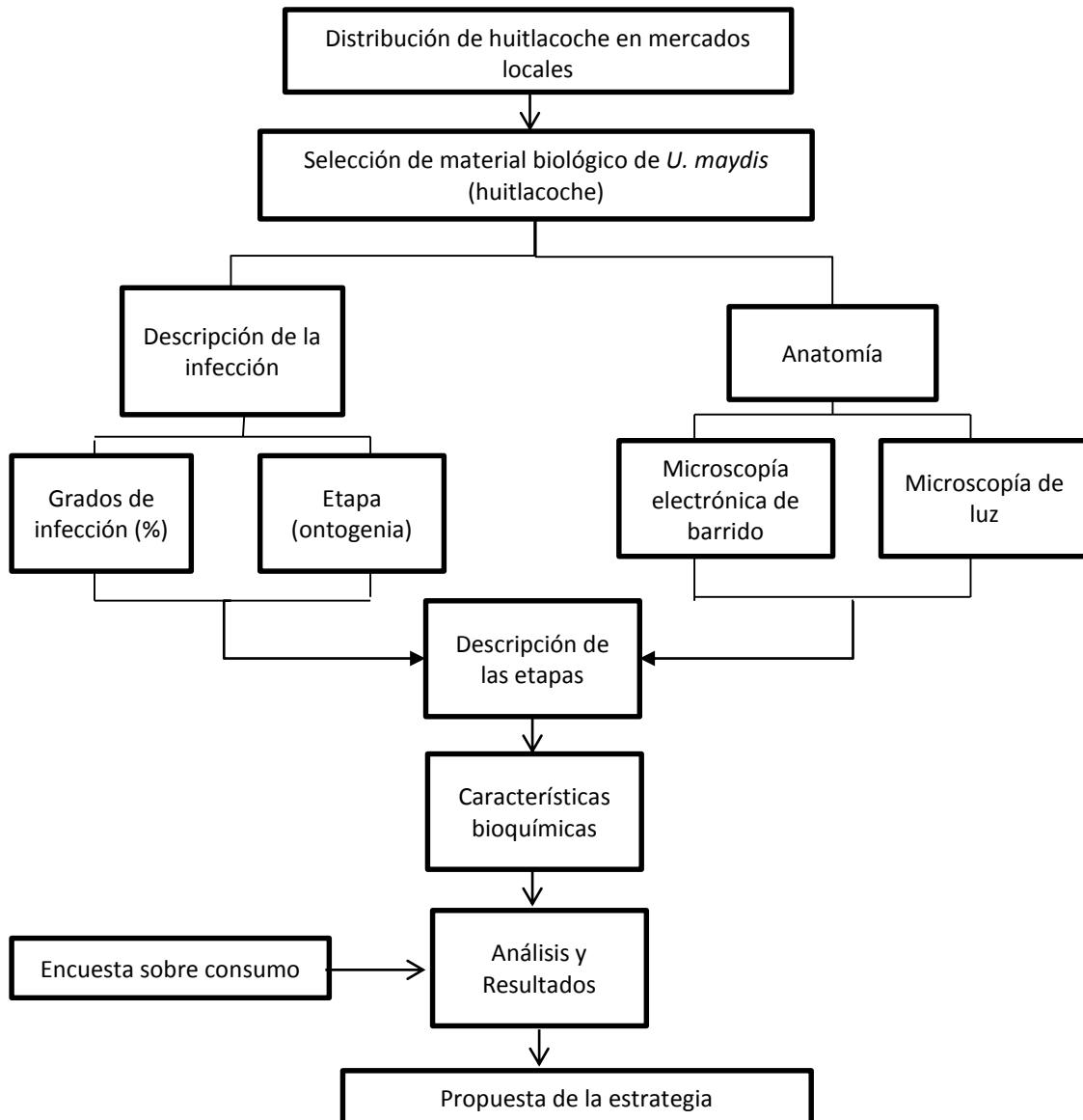


Figura 5. Diagrama general de la metodología seguida en la presente investigación.

VIII. MATERIALES Y METODOS

8.1 Distribución de huitlacoche en los mercados locales

Metodología: Se realizó una encuesta con el fin de conocer los lugares de venta de huitlacoche en mercados y supermercados de la Ciudad de Puebla y en un mercado de Tlaxcala. Se preguntó el precio, presentación, procedencia, disponibilidad del huitlacoche en doce mercados y tres supermercados.

Se realizó una encuesta electrónica que fue aplicada a 155 personas seleccionadas de forma aleatoria en una plataforma de internet (<https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSfH5NOQMFObIH1Ha1Cy1OO3dFSHKNQB0ZoF5FfJqoBA9sT3bPHw/viewform?c=0yw=1>).

La técnica empleada fue la encuesta instrumentada en base a un cuestionario que incluyó 11 preguntas estructuradas en cuatro apartados: I) Personales: género, edad, consumo en menores de edad (hijos); II) Conocimiento: Conoce el huitlacoche, platillos que lleven huitlacoche, lugar de venta, beneficios a la salud; III) Consumo: forma de consumo, disposición a consumir todo el año; IV) Frecuencia: recurrencia de consumo al mes, disposición al incremento en el consumo.

8.2 Morfología macro y microscópica del huitlacoche (*U. maydis*)

Esta parte del trabajo se llevó a cabo en el Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC), del Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla, y en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados, *Campus* Montecillo. La morfología de las mazorcas infectadas se basó en lo propuesto por Castañeda de León *et al.* (2016), quien describió el grado de infección que presenta la mazorca por *U. maydis* (Figura 6) siendo el grado 1 cuando el hongo infectó el 30% de la mazorca, el grado 2 cuando es entre 50 a 60% y, el grado 3 si la infección alcanzó cerca del 90 o 100% de infección, no quedando granos de elote sin infectar. Las muestras analizadas se basaron en la descripción propuesta por Pataky y Snetselaar (2006), y se asignó un número a cada etapa para caracterizar el material en estudio (Cuadro 2). La descripción del material biológico también se basó en su tamaño (largo, ancho, peso), forma, en la disección de la agalla y el color.

Cuadro 2. Descripción de las etapas de *Ustilago maydis* que se presentan durante la morfogénesis de la infección (Pataky y Snetselaar, 2006).

Etapas	Días	Descripción
0	0	Grano de elote sano
1	3-6	Grumo de maíz descolorido y cambio de forma
2	9-10	Agallas firmes
3	11-12	Agallas alargadas y desarrollo del tumor
4	14-15	Agallas plateadas o grises y aparición de tumor
5	16-18	Textura suave semicarnosa a hongo
6	19-20	Textura blanda más masa polvosa de teliosporas

En la figura 6 se muestra de manera esquemática la apariencia de cada agalla, basado en el color, textura y presencia de teliosporas.

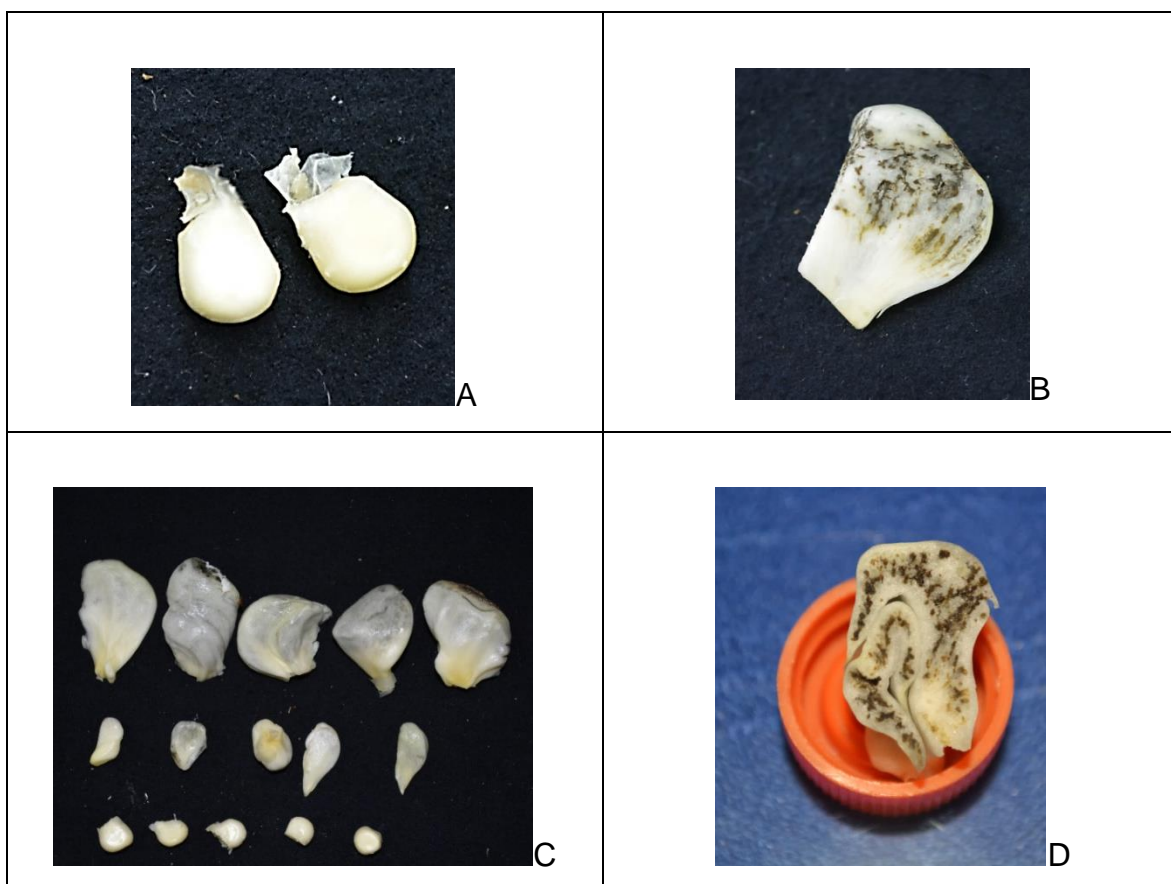


Figura 6. Vista de la forma en que se seleccionaron las muestra: granos de elote (A) y agallas (B-D) de *Ustilago maydis* para su caracterización en esta investigación.

Después de la caracterización del material biológico se procedió a procesar las muestras para las diferentes técnicas microscópicas.

8.2.1 Microscopía de luz

Se realizaron diferentes pruebas de tinción con granos de maíz y agallas de huitlacoche. Se probaron diferentes fijadores para preservar y preparar las muestras, los cuales se desarrollaron como sigue y posteriormente se observaron en un microscopio estereoscópico Leica.

8.2.1.1 Fijador FAA (formaldehído, alcohol, acético) (Megías *et al.*, 2016)

Se adicionan en un matraz 50 mL de etanol, 10 mL de formaldehído, 5 ml de ácido acético en 35 mL de agua destilada. La solución FAA se emplea normalmente en la fijación de tejidos vegetales. Aunque no preserva muy bien el citoplasma es un buen fijador para conservar las estructuras vegetativas.

8.2.1.2 Fijador paraformaldehído tamponado (Megías *et al.*, 2016)

Se calentaron 60-70 mL de agua a 60° en un matraz con un agitador magnético. Se añadieron 4 g de paraformaldehído. Posteriormente, se adicionaron dos o tres gotas de hidróxido sódico 10 N. Se espera a que la solución se vuelva transparente. Se filtró, y se agregaron 25 mL de tampón fosfato 0.4M pH 7.4. Se aforó con agua destilada hasta 100 mL. Se dejó enfriar a 4-10° antes de usar. El resultado fue 100 mL de formaldehído al 4% en tampón fosfato 0.1M pH 7.4.

8.2.1.3 Fijador plp (periyodato, lisina, formaldehído) (Megías *et al.*, 2016)

Este fijador mantiene la estructura de las membranas en buenas condiciones para muestras destinadas a microscopía electrónica. Se preparó una solución (a) de lisina-HCl 0.2 M en agua destilada, se añadió fosfato disódico dibásico 0.1 M hasta un pH de 7.4. La solución se diluyó en regulador fosfato sódico 0.1 M hasta que la concentración de lisina-HCl alcanzó 0.1 M. La solución (b) que se preparó fue paraformaldehído al 8% en agua destilada. Posteriormente, se generó la solución fijadora mezclando 3 partes de la solución a con una de la solución b, y se añadió metaperiyodato sódico sólido hasta alcanzar una concentración final del 0.01M.

8.2.1.4 Técnica de tinción

Se siguió la técnica descrita por Leroux *et al.* (2014). Las muestras se enjuagaron en una solución salina amortiguada por fosfato (PBS). Se seccionaron en 150-200

µm (Vibratome 1000 plus). Se tiñeron con 0.05% (p/v) de azul de toluidina acuosa (tbo). Se montó en fluoromount (Sigma) o alcohol polivinílico al 10% p/v (pva) -2,5% p/v 1,4 - diazabicyclo [2.2.2] octano (dabco) en tris 25 mMol /L, con un pH de 8.7. Se tomaron micrografías inmediatamente con un microscopio Olympus szx12 zoom.

8.2.1.5 Regulador salino de fosfato (PBS)

Se disolvieron 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.4g de Na₂ HPO₄, y 0.2g de KH₂PO₄ en 800 mL de agua destilada. Se ajustó el pH a 7.4 con HCl. Se aforó en 1000 mL. Se colocó la solución en matraces y se esterilizaron en una autoclave por 20 minutos. Se dejó enfriar el buffer a temperatura ambiente.

8.2.1.6 Histología clásica

Se utilizó fue el FAA (Cuadro 3).

Cuadro 3. Composición del fijador FAA utilizado para teñir los tejidos de *Ustilago maydis*.

Compuesto	Cantidad
Etanol (96%)	50% (v/v)
Ácido acético glacial	5% (v/v)
Formalina (37%)	10% (v/v)
Agua destilada	35% (v/v)

Se realizaron cortes longitudinales y transversales de las agallas en sus cuatro posiciones. A continuación, las muestras se colocaron en fijador FAA y se dejaron reposar durante 24 h. Posteriormente, se colocaron en casetes biopsy y después en el cambiador automático Histokinet conteniendo etanol diluido al 50°, 60°, 70° (con eosina), 80°, 90°, 100°, y tres cambios sucesivos de xileno. Finalmente, los casetes fueron colocados en parafina 1 durante 24 h, seguido de una segunda inclusión en parafina 2 durante 24 h. Las muestras de huitlacoche, se tuvieron que incluir durante 15 días en Parafina 2, debido a que el método común no fue adecuado para su procesamiento. Después, los soportes de madera fueron colocados con las orientaciones transversales y longitudinales, y se dejaron reposar durante 24 h. Los cortes de 10 µm fueron realizaos con un Micrótopo rotatorio Leica. Y almacenados en refrigeración.

Para la adhesión de las muestras, los mejores cortes fueron colocados en portaobjetos y se les agregó adhesivo de cromo. Después se calentaron en una

plancha para que las muestras se estiraran. Posteriormente, los portaobjetos se dejaron reposar por 12 horas para que se adhirieran bien y, se volvieron a subir a la plancha durante 24 horas. A continuación, los portaobjetos fríos se colocaron en el tren de desparafinado que comenzó con 3 cambios sucesivos de xileno absoluto, seguido de cambios sucesivos de etanol al 100%, 96%, 70%, y 50% por tres/cinco minutos cada uno.

Una vez que las muestras se quedaron en etanol al 50%, siguió el proceso de tinción, para lo cual estas fueron colocadas en Safranina durante 2 a 24 horas máximo. Se enjuagaron con agua desionizada y se pasaron al tren de tinción, donde permanecieron un minuto en etanol al 50%, 70%, 96% respectivamente; se mantuvieron en verde rápido por un tiempo aproximado de diez segundos. Se enjuagaron en etanol al 96% y se pasaron a etanol al 100% por unos segundos, y después a tres cambios sucesivos de xilenos absolutos. Para montar la muestra, se colocó una gota de resina sintética a lo largo del portaobjeto, y encima con cuidado se puso el cubreobjetos, para procurar evitar la generación de burbujas, se colocaron las muestras en la plancha caliente, por 24 horas. De esa forma las muestras estuvieron listas para su observación en un microscopio óptico Leica.

8.2.2 Microscopía electrónica de barrido*

En la figura 11 se observa un diagrama general del procesamiento de las muestras para su observación en el microscopio electrónico de barrido. Las muestras se dividieron en cuatro secciones, en relación al tamaño de la agalla. Posteriormente, se cortaron a la mitad longitudinalmente y transversalmente, luego se les dio forma de cuadrado de aproximadamente un 1 cm² y se fijaron en una solución de glutaraldehído al 3% en regulador de Sorensen´s 0.1 M pH 7.2 durante 24 horas (Ruzin, 1999). Posteriormente, se realizó una deshidratación gradual con etanol al 30°, 40°, 50°, 60°, 70°, 80°, 90° y, dos cambios sucesivos al 100° durante dos horas en cada una de las disoluciones y soluciones mencionadas anteriormente.

* Este estudio de la Microscopía Electrónica de Barrido se realizó en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados, *Campus Montecillo*, bajo la dirección de la Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera.

Las muestras se colocaron en un secador por punto crítico (secadora Samdri-780, Tousimis) con CO₂ líquido a 1250 PSI y una temperatura de 31°C. El etanol fue eliminado durante 20 minutos y la muestra se secó durante 40 minutos, aproximadamente. A continuación, las muestras se montaron en porta muestras de latón con cinta doble adhesiva de carbón, se recubrieron con una aleación de oro-paladium (80:20%) durante 20 minutos en una ionizadora Ion Sputter JFC-1100 (Jeol, Fine Coat, Japón) y se observaron en el microscopio electrónico de barrido MEB (JEOL JSM 6390) operando a 10 y 15 KV. En la figura 7, se ilustra un esquema general del procesamiento de las muestras para su observación, descripción y caracterización al microscopio electrónico de barrido.



Figura 7. Diagrama de flujo de procesamiento de muestras de microscopía electrónica de barrido.

8.3 Determinación de propiedades funcionales de las agallas de *U. maydis*

8.3.1 Toma de muestra

Las mazorcas infectadas de huitlacoche se desgranaron, se clasificaron en las diferentes etapas en relación a la descripción de Pataky y Snetselear (2006) y se colocaron en un horno de secado (Lab-line, U.S.A.) a 40 °C por 24 horas.

8.3.2 Elaboración de los macerados

Se pesaron 2 gramos de las muestras secas de cada una de las etapas, del control, y de las cepas de referencia (Fig. 8). Las muestras se molieron en un mortero, posteriormente se maceraron con 30 mL de una solución hidroalcohólica al 30% se dejaron reposar por 24 horas. Los macerados se filtraron con papel filtro de poro de 20 μ m, en un embudo colocado al vacío.

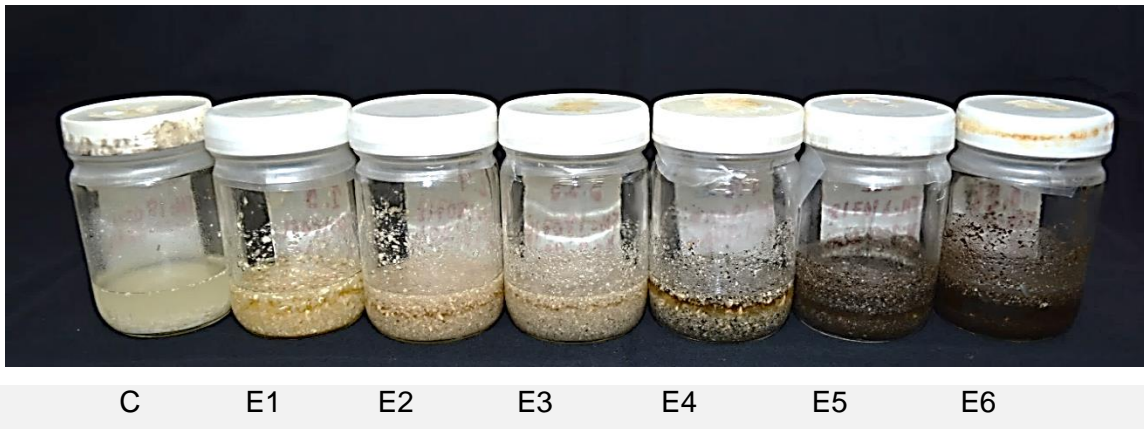


Figura 8. Macerados en solución hidroalcohólica. Se observa los diferentes colores de los macerados de acuerdo a la etapa. C= control. E= Etapa.

8.3.3 Caracterización de los macerados

A continuación, se detallan los protocolos para cada variable estudiada.

pH, Conductividad y Resistividad

Se llevó a cabo la medición de pH, conductividad y resistividad, con un potenciómetro (Mettler Toledo, modelo Seven Excellence). Se realizaron 4 réplicas.

Grados Brix

Con una micropipeta de 1 mL (Thermo Scientific, Finnpiquette) se tomaron 300 μ L de cada macerado. Cada muestra se colocó en el lector del refractómetro (PAL-1 ATAGO), previamente calibrado (n=4) con agua destilada.

Rendimiento por gravimetría (mg/mL)

Con una micropipeta de 1 mL (Thermo Scientific, Finnpiquette) se tomaron muestras de 0.2 mL en cajas de Petri previamente pesadas, y se colocaron en un horno de secado (Lab-line, U.S.A.) a 40 °C por 24 horas hasta la evaporación del solvente y peso constante. Posteriormente, se realizaron las operaciones para calcular el rendimiento en mg/mL de cada muestra (n=3).

8.3.4 Propiedades nutricionales de los macerados

8.3.4.1 Determinación de proteínas

Se preparó una solución Stock de albúmina bovina [1 mg/mL] pesando 1 mg de albúmina bovina la cual se disolvió en 1 mL de agua destilada. Una vez que se obtuvo la solución stock se procedió a preparar la curva de calibración mediante la conformación de diferentes diluciones. Dichas diluciones tenían una concentración conocida, (0, 10, 20, 40, 60, 80, 100) µg/mL.

Se colocaron 80 µL por pozo de cada muestra a analizar usando una dilución 1/50 y la curva de calibración, posteriormente se agregaron 20 µL de colorante (Bio-Rad Protein Stains), las microplacas se incubaron por 30 minutos en obscuridad para posteriormente leer en el espectrofotómetro (Biotek, Epoch) a una longitud de onda de 595 nm. La ecuación para el cálculo de proteínas se determinó en el programa de cómputo Excel, con base en los datos graficados de la curva de calibración.

8.3.5 Propiedades funcionales de los extractos

8.3.5.1 Polifenoles totales

Para la cuantificación de los polifenoles totales se usó el método colorimétrico-espectrofotométrico de Folin-Ciocalteau (Müller *et al.*, 2010). Se prepararon las siguientes soluciones:

Solución saturada de carbonato de sodio (Sigma, Aldrich). Se disolvieron 7.5 g de carbonato de sodio en 100 mL de agua destilada. Para inducir a la precipitación se agregaron 0.3 g de carbonato de sodio y se colocó en refrigeración durante una hora.

Reactivo Folin-Ciocalteau. En un matraz volumétrico de 10 mL se puso 1 mL del reactivo Folin-Ciocalteau (Sigma, Aldrich) y se aforó con agua.

Solución stock de ácido gálico (Sigma, Aldrich) a 1000 ppm. Se pesaron 10.05 mg de ácido gálico y se disolvieron en 0.5 mL de etanol para ayudar a su disolución, se aforó a 10 mL con agua destilada.

Curva de calibración. En matraces aforados de 10 mL y envueltos con papel aluminio para evitar la exposición a la luz, se pusieron 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mL de la solución stock de ácido gálico (Meyer) y se aforaron con agua destilada. Dichas soluciones tuvieron una concentración de 0, 25, 50, 100, 150 y 200 ppm, respectivamente.

Método: En una microplaca de 96 pozos se tomaron 5 réplicas de 20 μ L de cada muestra, solo en el caso de los extractos debido a la intensidad de su color se tuvo que hacer diluciones 1/10 para evitar que los valores de la absorbancia fueran mayores a 1.5. Posteriormente, se agregaron 100 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu, 75 μ L de solución saturada de carbonato de sodio. La placa se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad por 2 horas. Al término del tiempo de incubación, se leyó la placa en un espectrofotómetro de microplacas (Biotek, Epoch) a una longitud de onda de 740 nm.

La ecuación para el cálculo de polifenoles totales como equivalentes de ácido gálico (mg EAG/g) se determinó en el programa de cómputo Excel, en base a los datos graficados de la curva de calibración. Con los valores de la solución estándar de ácido gálico se construyó una línea de tendencia, la ecuación de la recta y el valor de R^2 . Los valores de la ecuación ($y = mx + b$) se utilizaron para determinar la concentración del ácido gálico presente en los extractos.

8.3.5.2 Cuantificación de la actividad antioxidante por DPPH

Preparación de la muestra

A partir de los extractos se prepararon las soluciones stock, en el programa Excel "Diluciones", donde se determinaron las respectivas alícuotas, necesarias para preparar concentraciones de 1000, 500, 250, 100, 50, 10 y 0 μ g/mL de los extractos.

Preparación de los estándares

A partir de la solución stock de cada estándar se prepararon las diluciones para determinar las curvas de concentración (cuadro 4). Preparación de la solución de DPPH: La solución del radical libre 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) (0.4 mM) en

Cuadro 4. Concentración (µg/mL) de la muestra y del estándar para la determinación de la actividad antioxidante.

Muestra (µg/mL)	BHT
0	0
10	0.25
50	0.5
100	0.75
250	1
500	5
1000	10
2000	25

BHT= Butilhidroxitolueno.

metanol grado analítico se preparó en un matraz completamente cubierto con papel aluminio. El volumen a preparar depende de la cantidad de muestras a evaluar (4 mL por microplaca de 96 pozos). Se preparó 10 mL a una concentración 0.4 mM de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH).

Preparación de la microplaca: Se hicieron 5 réplicas por columnas; y se pusieron 160 µL de cada macerado y los extractos estériles como testigo negativo, en sus diferentes concentraciones. Posteriormente, se adicionaron 40 µL de la solución de DPPH (0.4mM). Las placas se incubaron en oscuridad durante 30 minutos; posteriormente, se leyó en el espectrofotómetro (Biotek, Epoch) a la longitud de onda de 517nm.

Cálculos: A partir de las absorbancias obtenidas se determinó el porcentaje de actividad antioxidante con la ecuación que se presenta a continuación (Murillo *et al.*, 2007).

$$\% \text{ Actividad Antioxidante} = \frac{A_{\text{control}(-)} - A_{\text{extracto}}}{A_{\text{control}(-)}} \times 100$$

A control (-): Absorbancia del DPPH (solo) al tiempo 0.

A extracto: Absorbancia de los extractos.

8.3.6 Análisis estadístico

Todos los experimentos se analizaron mediante un diseño experimental completamente al azar y algunas variables se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), se les aplicó la prueba de Duncan ($\alpha= 0.05$), y se realizó un análisis de componentes principales en el programa SAS 9.4.

IX. RESULTADOS

9.1 Comercialización y consumo de huitlacoche

Ubicación de los mercados en Puebla y Tlaxcala

Los lugares donde se realizaron las encuestas en los Mercados de Puebla y Tlaxcala se muestran en la figura 9, donde puede observarse que se ubican once mercados en Puebla y uno en Tlaxcala.



Figura 9. Mapa de ubicación de los mercados en la ciudad de Puebla en donde se comercializa *Ustilago maydis* (huitlacoche).

En el cuadro 5 se muestran las direcciones de los mercados, fecha de realización de la encuesta, precio, presentación y procedencia del huitlacoche. Se aplicaron 152 encuestas, mismas que fueron realizadas entre el 9 de junio al 17 de julio del 2018. Durante el periodo mencionado, el precio del huitlacoche varió de \$40.00 a \$80.00 M.N. por kilogramo. En promedio el precio del hongo fue de \$60 pesos (MN) por kilogramo y en todos los casos la presentación de venta fue desgranada (fig. 10), a excepción de tres mercados donde se vendió el huitlacoche tanto en mazorca como desgranada (Mercado Xonaca, Mercado de Cholula y Mercado de Tlaxcala). En todos los casos, los encuestados mencionaron que la disponibilidad del hongo

es de todo el año. En la figura 10, se observa la forma de comercialización en mercados muestreados. Puede notarse que en todos los casos la forma de venta es la desgranada a granel. Por otro lado en los supermercados, en cuatro de los seis muestreados se mostró su venta. Fue en este lugar donde se encontró los precios más altos con \$90.00 por kilogramo y la forma de venta fue desgranada en charolas de unicel en todos los casos. En la figura 11, se muestra la presentación de huitlacoche en los supermercados, puede notarse a simple vista que los hongos están deshidratados.

Cuadro 5. Comercialización del hongo comestible *Ustilago maydis* (huitlacoche) en la ciudad de Puebla, Cholula y Tlaxcala. D=desgranado, M=mazorca.

Clave	Mercado	Dirección	Fecha	Puntos de venta	Precio kg. (\$) M.N.	Precio kg. (Dólares, EUA)*	Presentación	Procedencia	¿Disponibl e todo el año?
1	5 de Mayo	Av 18 Poniente, Puebla	9.Junio 2018	1	65	3.2	D	Central de Abasto	Sí
				2	60	2.9	D	Central de Abastos	Sí
				3	65	3.4	D	Central de Abastos	Sí
2	El Parral	Privada 7 Poniente, Calle 9 Sur, Puebla	9. Junio 2018	1	80	3.93	D	Huaquechula y Central de Abasto	Sí
				2	60	2.9	D	Central de Abastos	
				3	70	3.4	D	Central de Abastos	
3	Emiliano Zapata	Av. Bugambilias S/N, Rancho Xalapa, Puebla	10.Junio 2018	1	60	2.9	D	Distrito 10, San Gregorio Zacapechcan	Sí
				2	48	2.3	D	No sabe	Sí
				3	48	2.3	D	Tepeaca	Sí
				4	80	3.9	D	No sabe	
4	Independencia	Blvd. Municipio Libre S/N, Campestre Mayorazgo, Puebla	9.Junio 2018	1	40	2.3	D	Atlixco Central de Abasto	Sí
				2	60	2.9	D	Invernadero	Sí
				3	65	3.2	D	Central de Abastos	Sí
5	Defensores de la República	Diagonal Defensores de la República # 91, Puebla	19.Junio 2018	1	60	2.9	D	Central de Abasto	Sí
				2	65	3.4	D	Se ignora procedencia	Si
				3	65	3.4	D	Se ignora procedencia	Si
6	Melchor Ocampo	Avenida 21 Oriente 215, Puebla	29.Junio 2018	1	80	3.9	D	Central de Abasto	Sí
				2	65	3.2	D	Se ignora procedencia	Si
				3	65	3.2	D	Se ignora procedencia	Si
7	Hidalgo	Boulevard Norte s/n, Cleotilde	22.Junio 2018	1	60	2.9	D	Acatlán de Osorio y Central de Abasto	Sí
				2	65	3.4	D		

		Torres, Puebla		3	65	3.4	D		
8	San Baltazar	Calle 20 de Noviembre 4715, Puebla	23.Junio 2018	1	60	2.9	D	Huaquechula y Central de Abasto	Sí
				2	65	3.2	D	No sabe	
				3	65	3.2	D	No sabe	
9	Morelos	Calle 20 de noviembre 4715, Puebla	27.Junio 2018	1	60	2.9	D	Central de Abasto	Sí
				2	65	3.4	D	No sabe	
				3	65	3.4	D	No sabe	
10	Xonaca	De La Quinta de Zaragoza S/N esquina con 22 Norte, Aldama, Puebla	28.Junio 2018	1	80	3.9	D	Central de Abasto	
				2	65	3.2	D y m (G3)	Central de Abastos	
				3	65	3.2	D	No sabe	
11	Mercado de Cholula	Centro, Cholula	11.Julio 2018	1	70	3.4	D y m (G2)	Atlixco y Pueblos cercanos	Sí
				2	65	3.4	D	No sabe	
				3	65	3.2	D	No sabe	
12	Mercado de Tlaxcala	Centro, Tlaxcala, Tlax.	12.Julio 2018	1	60	2.9	D y m (G2)	Pueblos circundantes	Sí
Supermercados en la Ciudad de Puebla									
13	Chedraui	Plaza Crystal	16.Jul.2 018	1	90	4.4	D	Edo. De México	No saben
14	Bodega Aurrera 1	11 Sur y 89 Pte.	17.Jul.2 018				No hay		
15	Bodega Aurrera 2	Bulevar Torrecillas	17.Jul.2 018				No hay		
16	Soriana	Bulevar Municipio Libre	17.Jul.2 018	1	90	4.4	D	Se ignora procedencia	No saben

17	Superam a	Vía Atlixcáyotl	18.Jul.2 018	1	90	4.4	D	Se ignora procedencia	No saben
18	Wal Mart	Vía Atlixcáyotl	18.Julio 2018	1	90		D	Se ignora procedencia	No saben

* Precio de dólar= \$20.312, fecha de consulta junio 7, 2018.



Figura 10. Presentación de la venta del huitlacoche (*Ustilago maydis*) en algunos puestos de los mercados de Puebla y Tlaxcala. a. Mercado Zapata. b. Mercado Independencia. c. Defensores de la República. d. Mercado de Xonaca. e. Mercado Morelos. f. Mercado de Cholula.

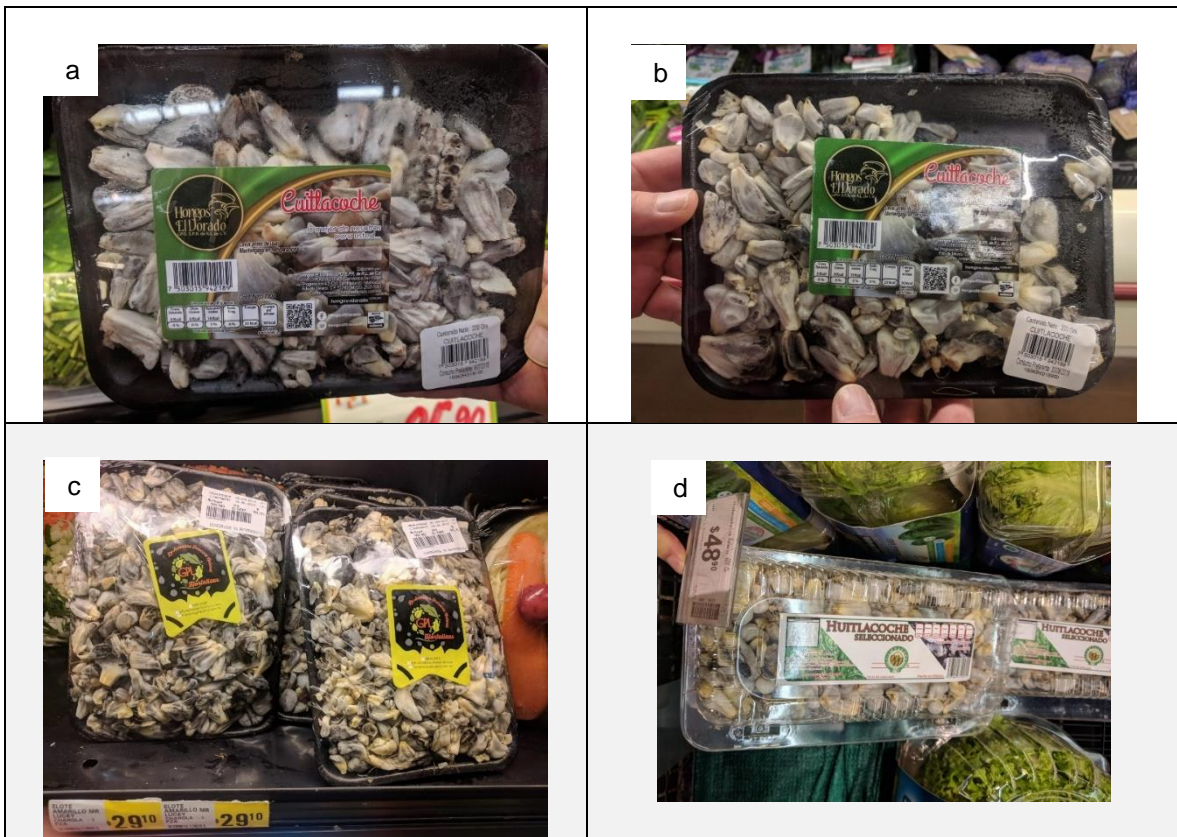


Figura 11. Diferentes formas de las presentaciones en que ponen a la venta de *U. maydis* en los supermercados de la Ciudad de Puebla. 1. Chedraui. 2. Soriana. 3. WalMart. 4. Superama.

Consumo de huitlacoche

La encuesta electrónica realizada mostró resultados interesantes sobre el consumo y conocimientos que acerca del huitlacoche tiene la población. Una de las características más importantes de las personas encuestadas fue la edad, que se ha considerado como un factor importante para fomentar el consumo de productos tradicionales. Las personas encuestadas tuvieron una edad promedio de 35 años, de las cuales 81 (52%) fueron hombres y 76 (49%) mujeres. En el figura 12 se presentan los resultados obtenidos con respecto al conocimiento del huitlacoche , donde se puede observar que un 99% de los encuestados afirma que si conoce al hongo. Con lo que se puede corroborar que el huitlacoche es un alimento ampliamente conocido.

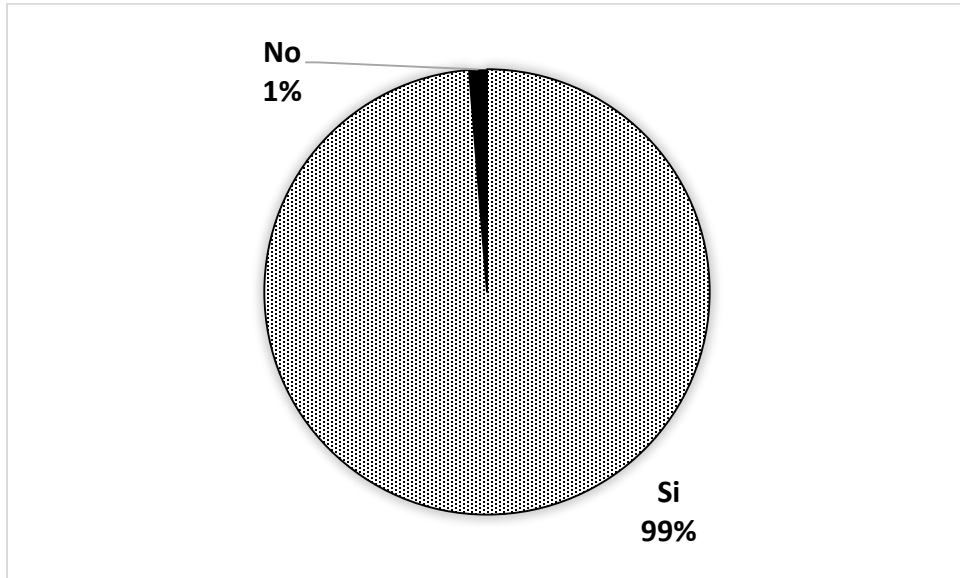


Figura 12. Encuestados (%) que mencionaron conocer el hongo huitlacoche.

Se muestra en la figura 13, el lugar donde adquieren el huitlacoche las personas entrevistadas, y donde podemos ver que 137 (88.4%) personas dicen conseguirlo en el mercado, 3 (1.9%) personas lo adquieren en el supermercado y 15 (9.7%) no sabe dónde conseguirlo.

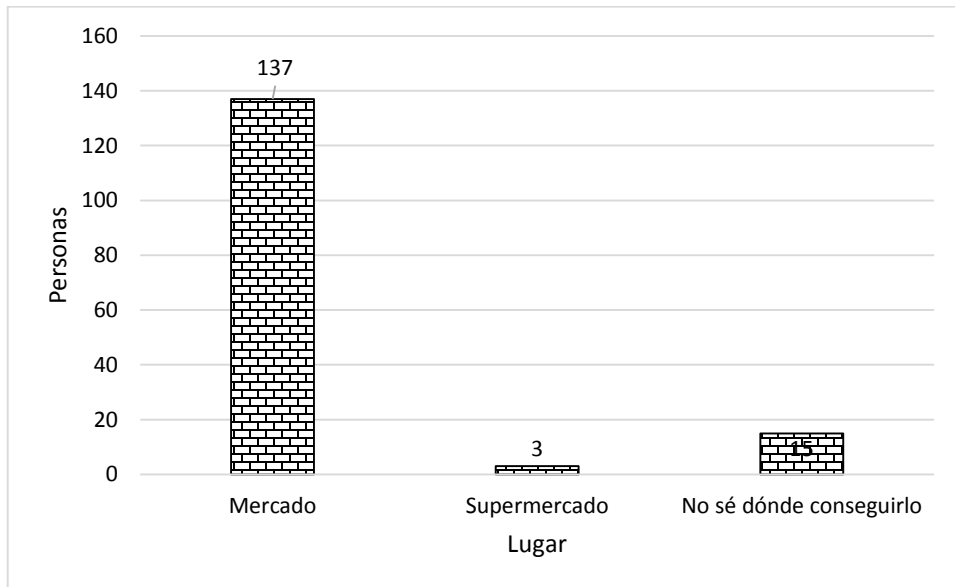


Figura 13. Lugar donde adquieren el huitlacoche las personas entrevistadas.

Como se puede ver en el figura 14, se observa que un 70.9% de la muestra conoce de 1 a 3 guisos, un 21.9% tiene conocimiento de 4 o 5 platillos diferentes, mientras que solo el 7% tiene el conocimiento de 6 platillos o más.

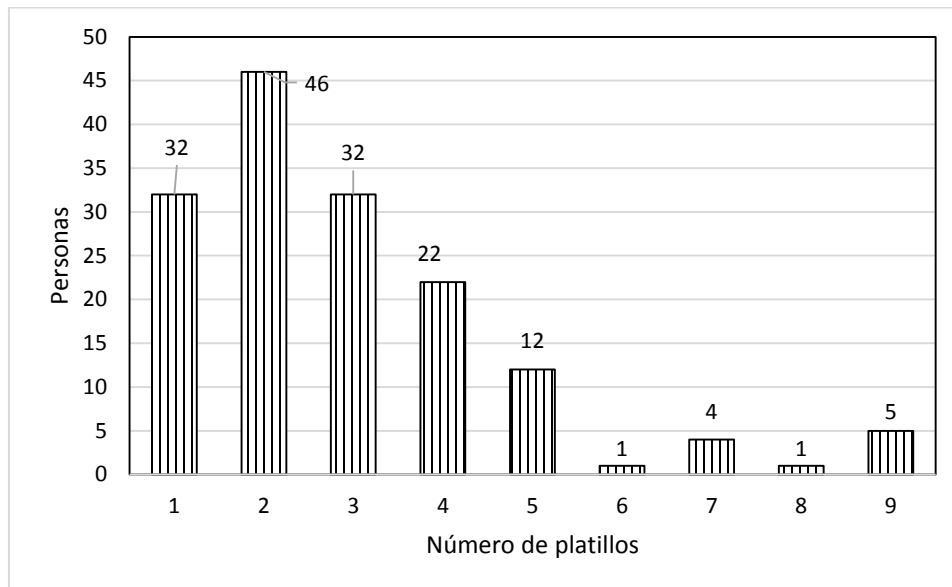


Figura 14. Conocimiento de los usos gastronómicos para el huitlacoche en la muestra.

Como se muestra en el figura 15, se puede aseverar que el consumo generalizado de este hongo se hace mediante el sofrito y la condimentación, agregando queso y granos de elote, con tortilla o sin ella, puesto que 109 encuestados respondió que lo consume de esta manera, mientras que sólo 54 encuestados afirmó consumirlo de alguna manera diferente.

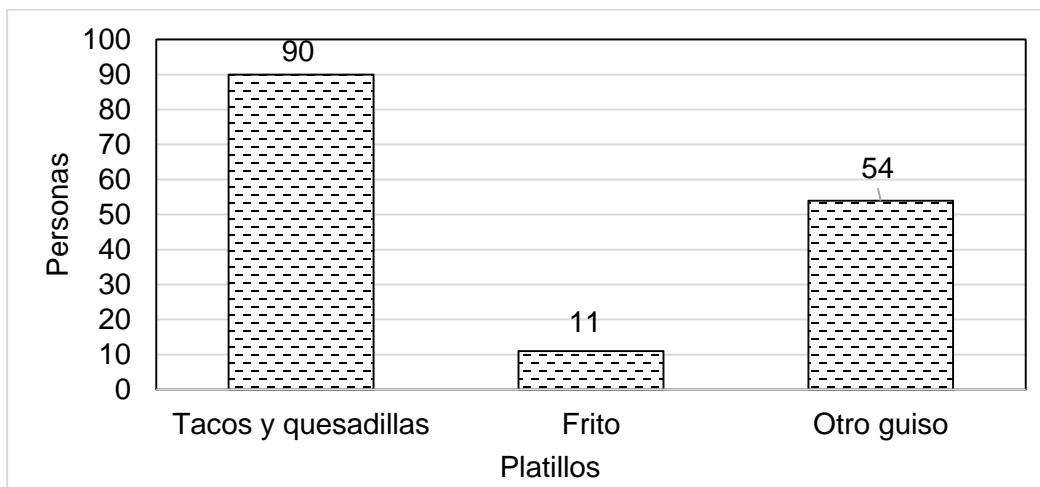


Figura 15. Platillos en los que se consume huitlacoche habitualmente.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el figura 16, referente a la pregunta: ¿A sus hijos les gusta el huitlacoche ?, se puede observar que de los encuestados que tienen hijos (33.5%) y que consumen huitlacoche, al 48% de ellos les agrada el hongo, mientras que a un 52% no les agrada, con esto se puede afirmar que no existe una amplia diferencia de preferencia entre los menores.

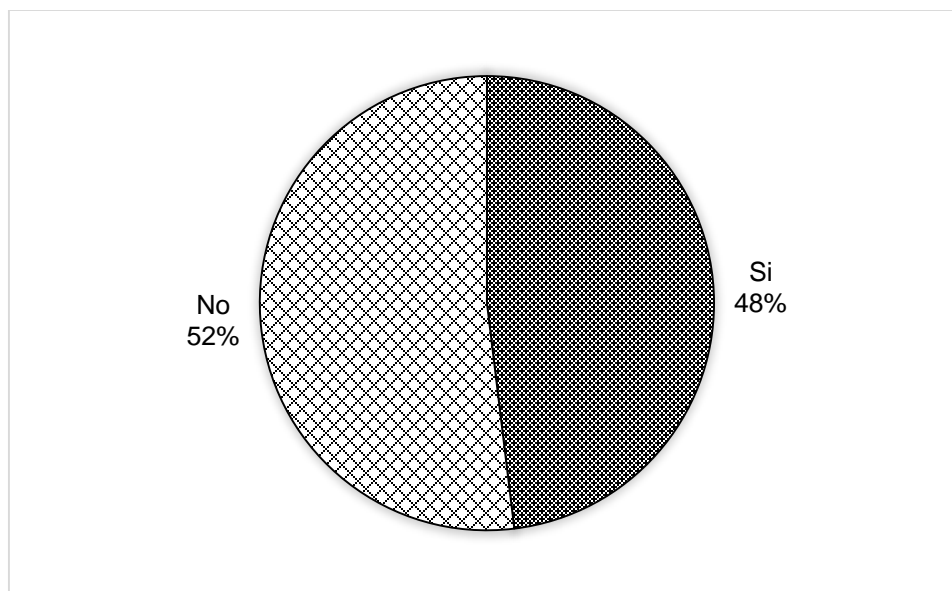


Figura 16. Aceptación del huitlacoche con los hijos de los encuestados.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la encuesta, sobre los conocimientos del huitlacoche como alimento funcional (figura 17), los resultados indicaron que el 60% de los encuestados conocen de algún beneficio nutricional aportado por el consumo de huitlacoche , mientras que, el 40% restante no conoce sobre los beneficios del huitlacoche a la salud. Con base en esto se podría decir que más de la mitad de los encuestados conocen de uno o varios beneficios.

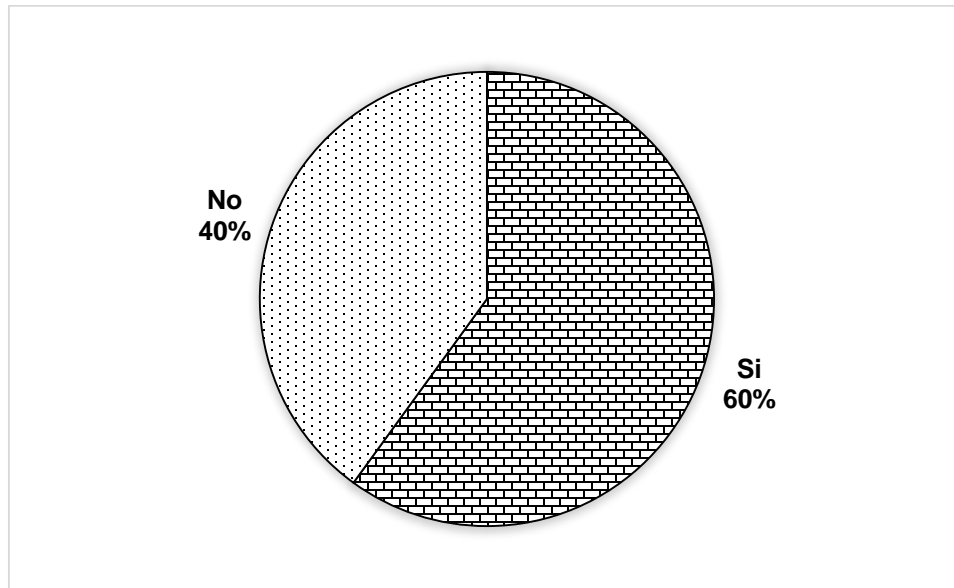


Figura 17. Proporción de encuestados que conocen los beneficios del huitlacoche.

Consumo

En el figura 18, los datos más destacados muestran que 105 (67%) personas consumen una vez al mes huitlacoche de forma habitual, mientras que 19 (12.3%) personas lo consumen dos veces por mes y 17 (11%) personas lo consumen 3 veces al mes.

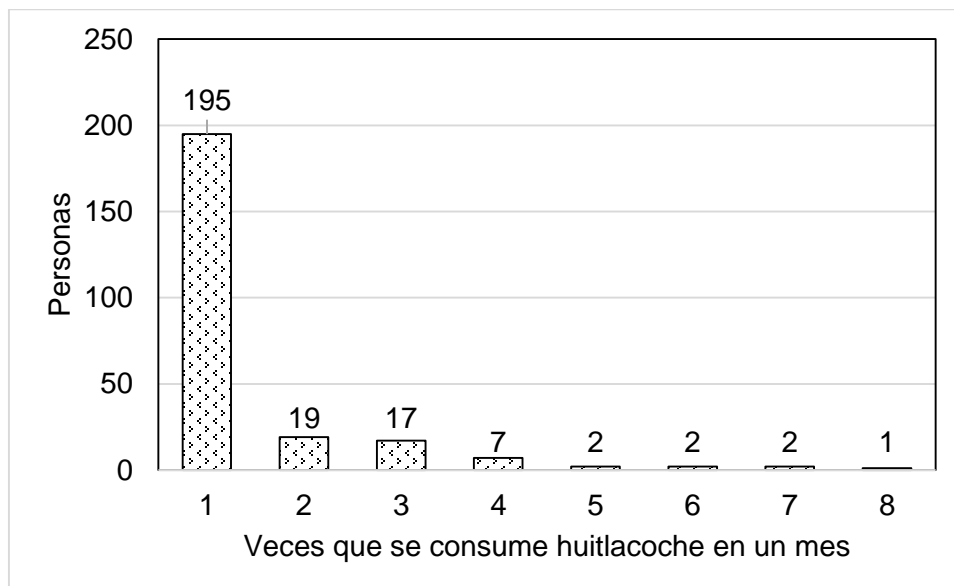


Figura 18. Consumo de huitlacoche en un mes.

En los resultados obtenidos en la pregunta sobre la frecuencia en la que los encuestados quisieran consumir huitlacoche en un mes (figura 19) se observa gran variabilidad, sin embargo, la mayoría respondieron que quisieran consumir el hongo huitlacoche de 1 a 4 veces al mes. Siendo el valor más alto 4 veces (24.5%) al mes (38 encuestados), seguido de una vez (21.3%) al mes (33 encuestados), las frecuencias con las que menos encuestados quisieran consumir huitlacoche al mes fueron de 7, 9 y 8 días con 1, 2 y 4 encuestados respectivamente.

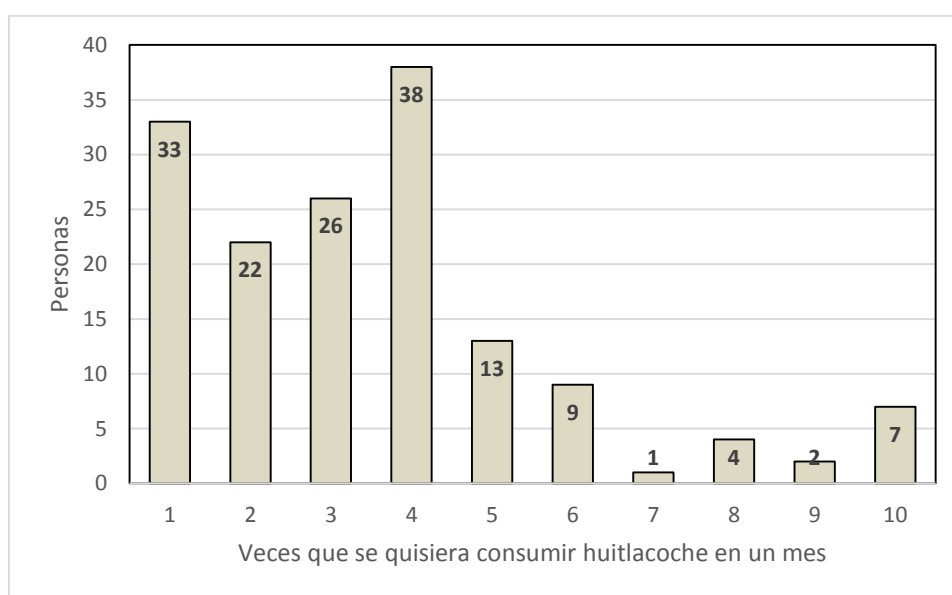


Figura 19. Recurrencia del consumo de huitlacoche en un mes.

Se observa en la figura 20 que 71% (110) de las personas aseguran que si les gustaría consumir huitlacoche durante todo el año, mientras que 29% (45), mencionan que no les gustaría consumirlo durante todo el año.

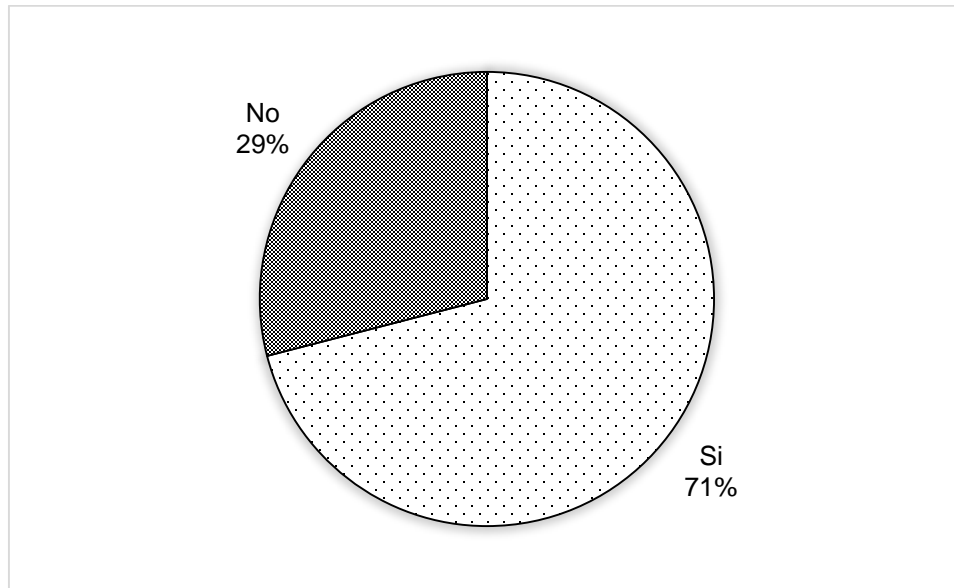


Figura 20. La disposición a consumir huitlacoche.

9.2 Morfología macro y microscópica del huitlacoche (*U. maydis*)

Las mazorcas se obtuvieron de la Central de Abastos de la Ciudad de Puebla. En la figura 21 y 22 se observan los diferentes grados de infección que puede tener una mazorca y la variedad de formas que van tomando de acuerdo a los tumores. En el caso de la figura 21a, se observa un grado dos de infección, debido a que sólo la mitad de la mazorca se encuentra infectada, pero con una etapa cuatro debido a que la agalla se está colapsada y se observan las teliosporas. En el caso de la b, c y se puede observar un grado de infección tres, debido a que la mazorca se encuentra toda infectada, aunque en el caso de la b la etapa es tres porque la agalla está a punto de colapsar, y en el caso de c, se trata de una etapa temprana (E2), un dos, debido a que los granos apenas se comienzan a observar de otro color y no existe una deformación tumoral grave.



Figura 21. Mazorcas de elote con brácteas infectadas con *Ustilago maydis* utilizadas en esta investigación.



Figura 22. Mazorcas infectadas por *Ustilago maydis* desgranadas.

En la figura 23, se observan cortes transversales de las mazorcas. En el inciso a se puede apreciar la mazorca sin infección, mientras que en el inciso b, se observa una infección en etapa dos, apenas diferenciándose con el cambio de color de los granos y leve crecimiento de los mismos. En el inciso c, se observa una gran deformación de las agallas y su comparación en tamaño con los granos que no se encuentran infectados.

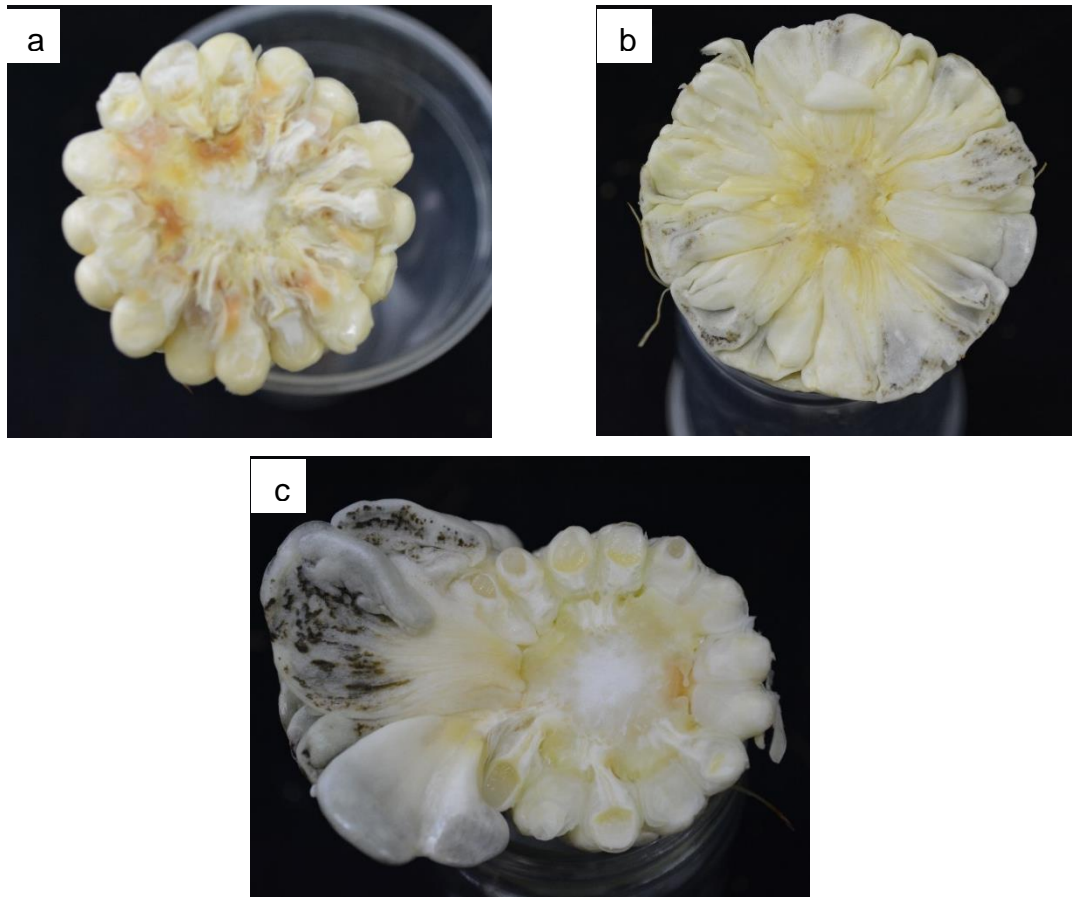


Figura 23. Corte transversal del elote sin infección de *U. maydis* (a) y con diferentes grados de infección (b-c).

En la figura 24, se observan el proceso de desgranado de una mazorca de huitlacoche. En el inciso a, un corte transversal hace notar que ha desaparecido el olote, transformándose en agallas. En el inciso b, agallas desgranadas. En el inciso c, cómo fueron tomadas las medidas de las agallas. En el inciso d, las agallas clasificadas en relación a su tamaño. Cada agalla se agrupó en una etapa en relación a su tamaño (Cuadro 6) donde el volumen más grande correspondió al obtenido en la etapa 4 (8.841 cm³) mientras que el grano de maíz (0.295 cm³) tuvo el menor valor. (Cuadro 7).

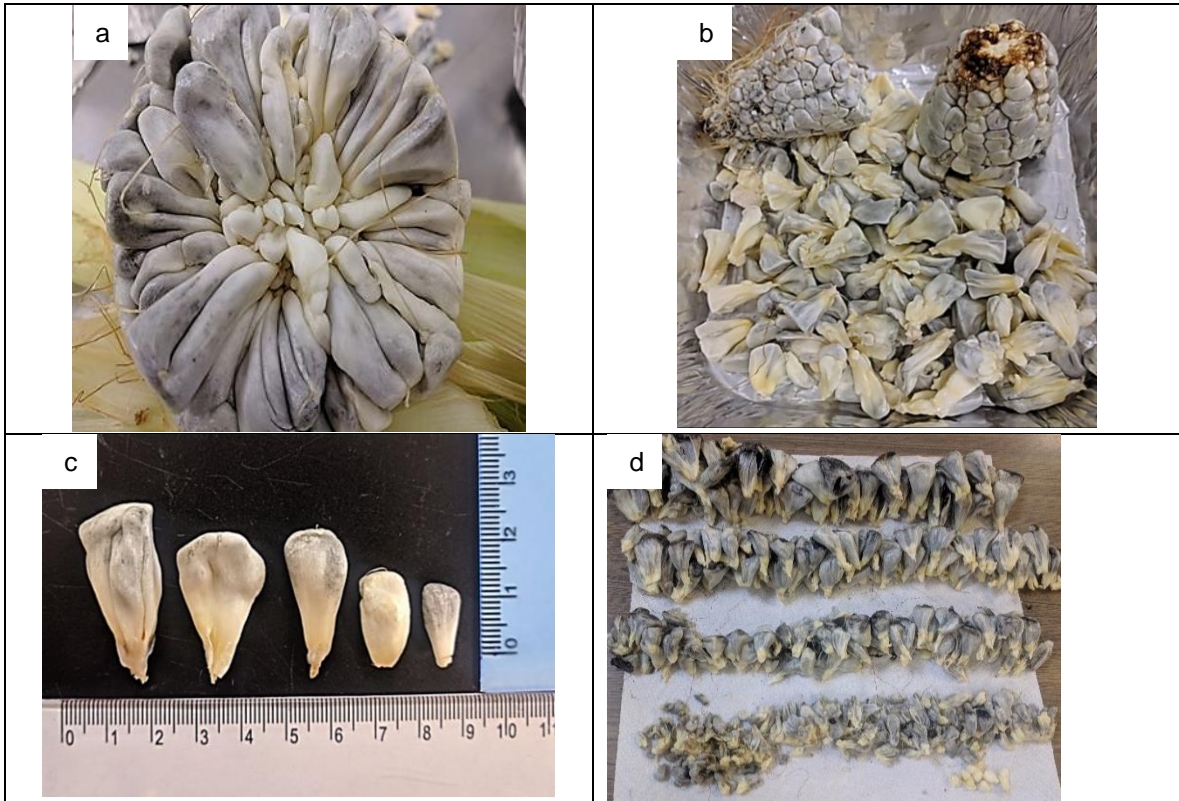


Figura 24. Desgranado de granos de maíz infectados con *Ustilago maydis*. a: Corte transversal de una mazorca totalmente infectada de huitlacoche. b: Desgranado. c: Medición para clasificación de las agallas. d: Clasificación de las agallas de acuerdo a su tamaño, en etapa 1 a etapa 6.

Cuadro 6. Tamaño (cm) de las agallas frescas de granos infectados con *Ustilago maydis* comparado con el del grano de elote sano, durante las diferentes etapas de la infección. L= largo; a= ancho; g= grosor.

RÉPLICA	Control			Etapa 1			Etapa 2			Etapa 3			Etapa 4			Etapa 5			Etapa 6		
	L	A	G	L	A	G	L	A	G	L	A	G	L	A	G	L	A	G	L	A	G
1	1	0.9	0.5	1.8	1	0.8	1.45	1.2	1.1	2.6	2.2	1.5	3.4	3.7	3	3.5	2.3	2	3.4	2.8	1.1
2	1.1	0.9	0.5	1.3	1.15	0.95	1.6	1.1	0.8	2.7	2.2	1.5	3.2	2.7	1.8	3.2	3.1	2.5	3	3.2	1.8
3	1	0.8	0.5	1.5	1.1	0.9	1.8	1.4	1.1	2.6	1.7	1.3	2.7	2.4	1.2	1.9	2.9	2.5	2.9	1.9	1.5
4	1.3	0.9	0.5	1.2	1.1	0.95	1.35	1	0.95	2.5	2.2	1.2	2.9	2	1.2	3.5	3.1	2.3	1.8	3	2.8
5	1.1	0.9	0.5	1.5	1.25	0.9	1.65	1.35	1.1	1.5	2	2	3.6	2.5	1.6	2.9	2.8	1.4	2.3	3.8	1.1
6	1.2	0.9	0.4	1.7	1.3	0.8	1.2	1.1	0.8	1.8	1.6	1.6	2.1	2.5	2.2	2.8	1.8	2.25	2.8	2.5	1.8
7	1	0.9	0.5	1.5	1.1	0.7	1.5	1.2	1.1	2	1.5	1.2	2.3	2.9	2.5	2.8	2.4	2.1	2.7	3.2	1.2
PROMEDIO	1.10	0.88	0.48	1.50	1.14	0.85	1.50	1.19	0.99	2.24	1.91	1.47	2.88	2.67	1.92	2.94	2.62	2.15	2.70	2.91	1.6
DESV. EST.	0.11	0.03	0.03	0.20	0.10	0.09	0.19	0.14	0.14	0.47	0.30	0.28	0.55	0.53	0.67	0.55	0.48	0.38	0.51	0.60	0.60

Cuadro 7. Peso (g) de las agallas frescas del huitlacoche *Ustilago maydis*, comparado con el de grano de elote (control).

Réplica	Control	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 4	Etapa 5	Etapa 6
1	0.2164	0.401	0.2674	0.9586	1.0533	1.8811	5.4276
2	0.2324	0.293	0.1321	0.4349	1.3621	2.4355	3.5955
3	0.2467	0.5833	0.3268	0.7889	0.9414	1.8361	4.7183
4	0.191	0.3589	0.1579	0.6889	0.9792	2.1876	3.9146
5	0.2416	0.4961	0.2243	0.5064	1.5709	2.4839	4.7994
6	0.2215	0.4407	0.4177	0.5311	1.2415	2.2661	4.845
7	0.2423	0.3855	0.4156	0.4554	1.0389	2.9613	4.2155
Promedio	0.22741	0.42264	0.27740	0.62346	1.16961	2.29309	4.50227
Desv. Est.	0.01959	0.09509	0.11513	0.19579	0.23173	0.38592	0.62696

Cuadro 8. Volumen de las agallas frescas de *Ustilago maydis* comparado con el de grano de elote (control).

Réplica	Control	Etapa 1 (cm ³)	Etapa 2 (cm ³)	Etapa 3 (cm ³)	Etapa 4 (cm ³)	Etapa 5 (cm ³)	Etapa 6 (cm ³)
1	0.268	0.905	1.023	4.849	19.980	9.203	7.54
2	0.303	0.762	0.831	5.084	8.853	13.215	9.93
3	0.236	0.831	1.542	3.406	4.849	7.544	4.85
4	0.382	0.666	0.697	3.983	4.402	13.671	8.51
5	0.303	0.943	1.337	3.226	8.853	6.941	7.24
6	0.303	1.064	0.578	2.424	6.098	6.233	6.94
7	0.268	0.697	1.064	2.013	8.853	7.544	6.94
Promedio	0.295	0.838	1.010	3.569	8.841	9.193	7.42
Desv. Est.	0.046	0.143	0.344	1.153	5.280	3.042	1.56

En la figura 25 se observan cortes longitudinales vistos en un microscopio estereoscópico *Leica*. En el inciso a, un grano de maíz sin infección. En el inciso b, la etapa 1, donde apenas se ve una transformación en el tamaño del grano de maíz. En el inciso c, la etapa 2, la deformación del grano es evidente y comienzan a aparecer teliosporas. En el inciso d, la etapa 3, que podría decirse ya es propiamente una agalla, con teliosporas. En la figura 26 se observan cortes longitudinales de las etapas tardías. En el inciso a, la etapa 4, una acumulación extensa de teliosporas y la deformación completa del grano de maíz. En el inciso b, la etapa 5, un fragmento de la agalla, ya que es demasiado grande para su observación completo en el microscopio, donde se hace énfasis en los surcos que se producen en los estados tardíos de transformación de un grano de maíz a una agalla. En el inciso c y d, la etapa 6, la agalla ya ha sufrido una transformación completa y su textura es totalmente de hongo; en esta etapa se abre el pericarpio de la agalla para dejar salir las teliosporas.

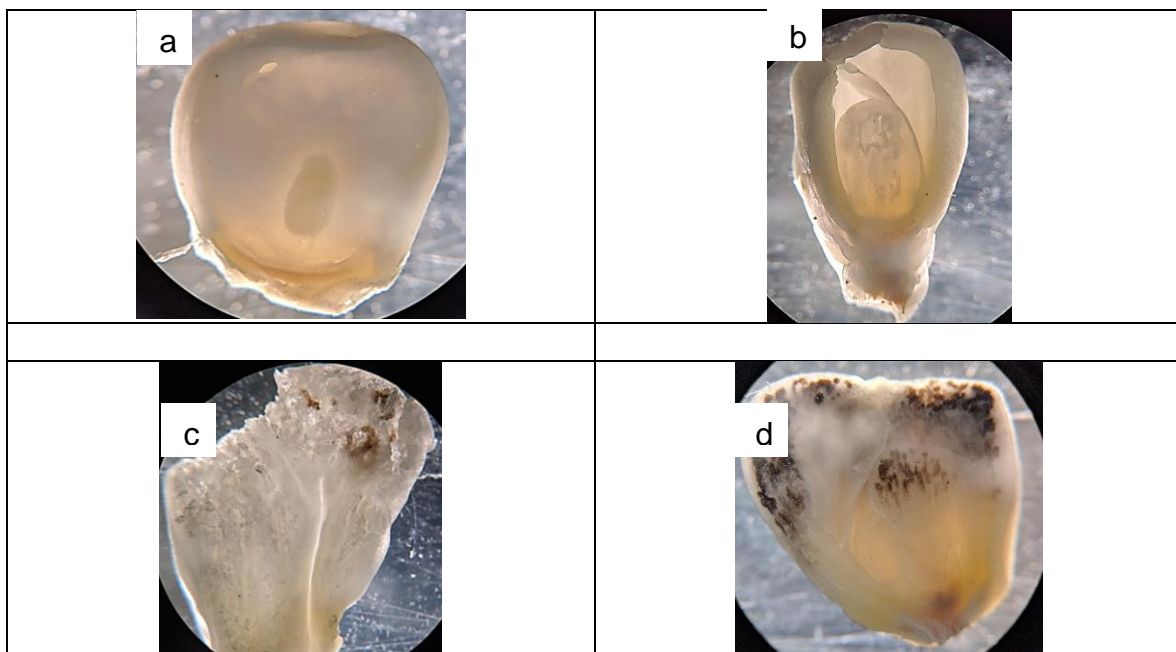


Figura 25. Microfotografías obtenidas por microscopía de luz de muestras de granos de maíz infectados con *Ustilago maydis* incluidos en parafina de *U. maydis*. Cortes longitudinales de: a. Grano de maíz sin infección del hongo (Control). b. Grano de maíz infectado de *U. maydis*, etapa 1. c. Grano de maíz infectado de *U. maydis*, etapa 2. d. Grano de maíz infectado de *U. maydis*, etapa 3.

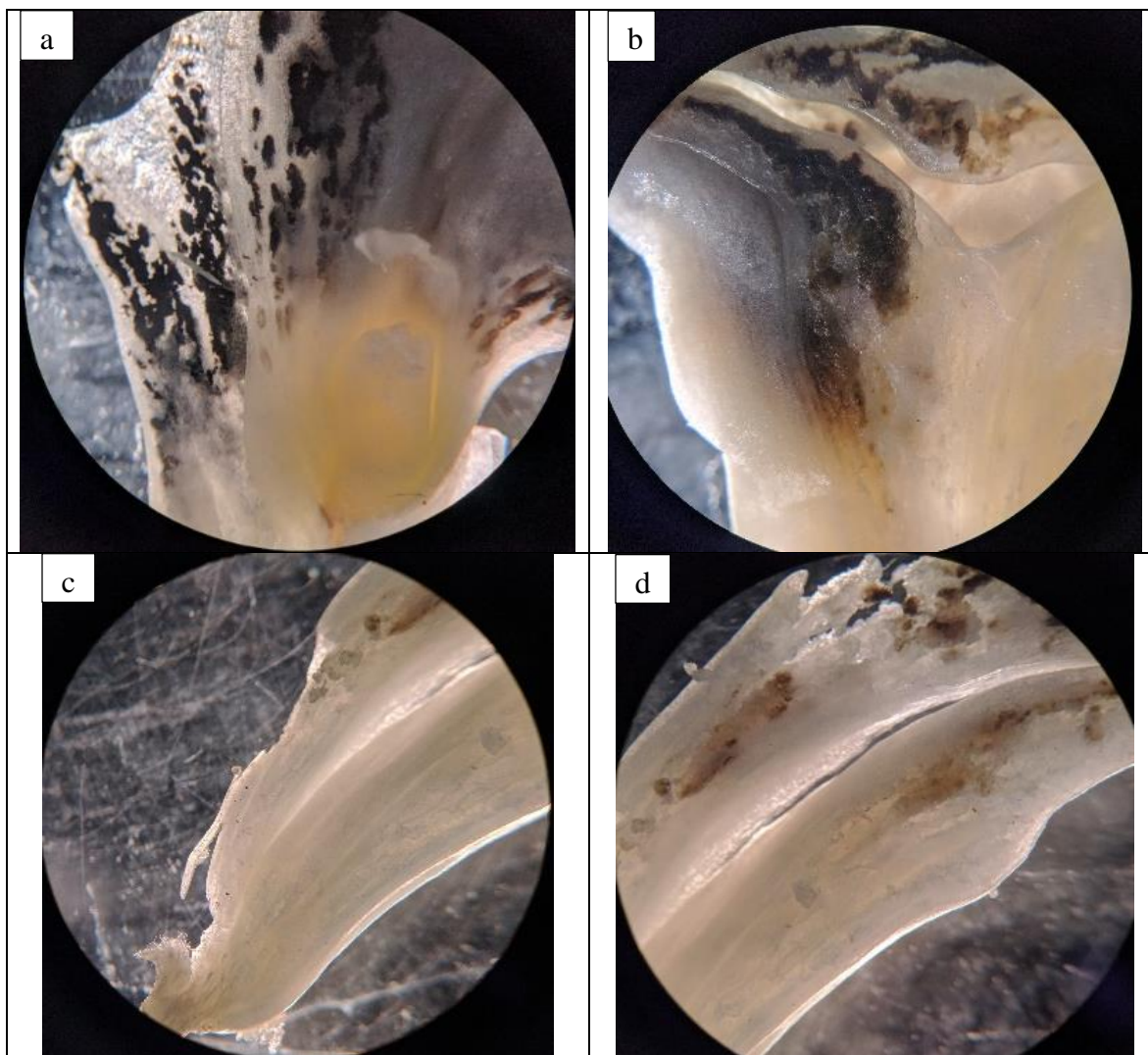


Figura 26. Microfotografías obtenidas por microscopía de luz de muestras de granos de maíz infectados con *Ustilago maydis* incluidos en parafina de *U. maydis*. Cortes longitudinales de: a. Grano de maíz infectado de *U. maydis*, etapa 4. b. Grano de maíz infectado de *U. maydis*, etapa 5. c. Grano de maíz infectado de *U. maydis*, etapa 6. d. Grano de maíz infectado de *U. maydis*, etapa 6.

9.2.1 Microscopía de Luz

En la figura 27 y 28 se muestran cortes longitudinales de granos de maíz y agalla de huitlacoche, las observaciones en el microscopio estereoscópico permitieron que los granos de maíz y las agallas se pudieran observar casi completamente sin la necesidad de seccionarlas y para así poder diferenciar mejor sus estructuras. Las tinciones permitieron identificar las partes del grano de maíz (figura 27a), en grano fresco sin ningún fijador antes de teñir la muestra con azul de toluidina y se observan

estructuras como el pericarpio, endospermo suave, el escutelo y el embrión como reporta Borok *et al.* (2018). En el inciso b, no se observó una diferenciación clara ya que se utilizó FAA y PBS antes de teñir la muestra y como resultado el grano mostró una coloración homogénea. En el inciso c y d, ocurre la misma dinámica de tinción, pero con una agalla de huitlacoche, y de igual manera se observa que en la coloración del inciso c, sin fijadores, hay una diferenciación más clara que en el inciso d con fijadores donde parece que se satura el tinte y se homogeniza la muestra. En el inciso e, se observa el grano de maíz, con una tinción de Brillante R. en este caso a diferencia del azul de Toluidina y Congo Red Kongorot que tardaron menos de cinco minutos en teñir los granos y agallas, la muestra tuvo que reposar alrededor de veinte minutos con Brillante R ya que no fijaba el color. Se utilizaron ejemplares frescos porque con los fijadores simplemente no se tiñó la muestra. En las muestras de los incisos c, d y f, del huitlacoche se observa en color oscuro densos manchones de teliosporas con una distribución en la parte posterior de la agalla.

La tinción de Congo Red Kongorot tuvo reacciones similares a las de azul de Toluidina, las muestras con a, c, tiñeron más que la b, que tenía PBS y FAA, en el caso del huitlacoche ni siquiera se realizó la tinción. Los incisos d, e y f, fueron mezclas de las dos tinciones para observar si se podía diferenciar estructuras en relación a la coloración, el color azul de Toluidina se saturó un poco en el inciso d, mientras que el color de azul de toluidina quedó más externo en el caso de e y f (Figura 28).

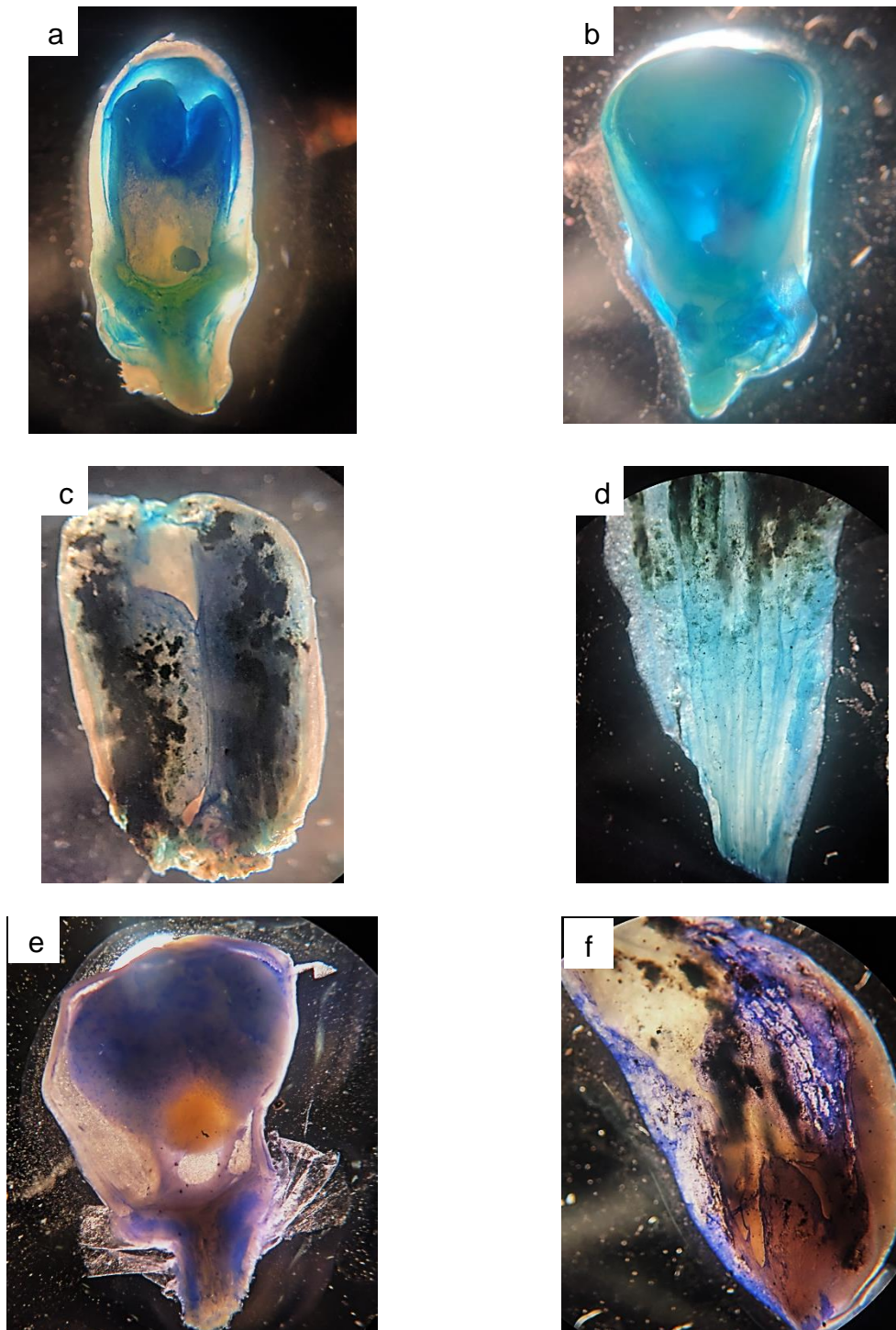


Figura 27. Microfotografías obtenidas por microscopía de luz en *Ustilago maydis*: cortes en parafina de *U. maydis*. Tinción de granos de elote y agallas de huitlacoche (*U. maydis*). a. Grano de elote fresco con azul de toluidina. b. Grano de elote con FAA y azul de toluidina. c. Agalla fresca con azul de toluidina. d. Agalla con FAA y azul de toluidina. e. Grano de elote con Brillante R. f. Agalla con Brillante R.

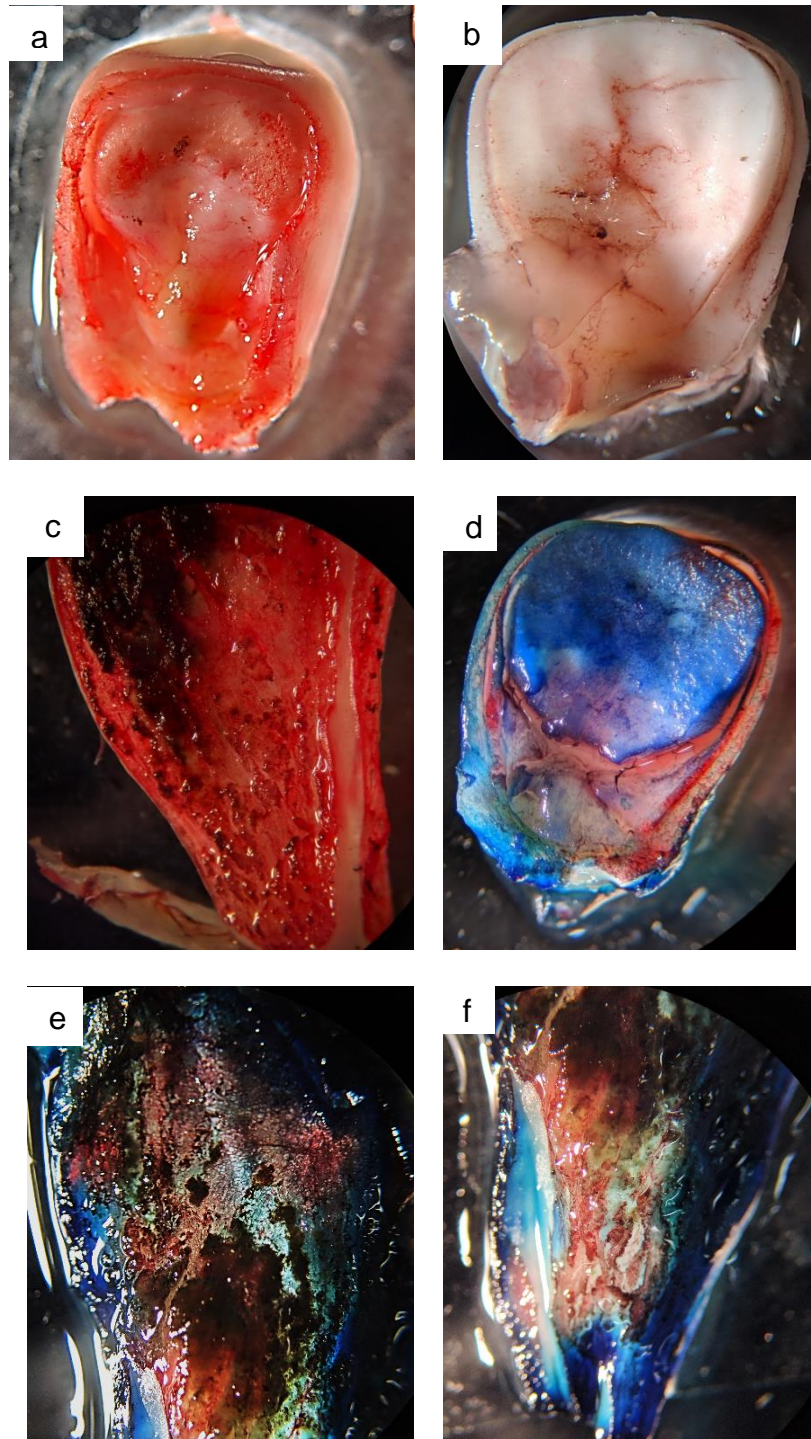


Figura 28. Microfotografías obtenidas por microscopía de luz en *Ustilago maydis*: cortes en parafina de *Ustilago maydis*. Tinción de granos de elote y agallas de huitlacoche (*Ustilago maydis*). a. Grano de elote con Congo Red Kongorot. b. Grano de elote con FAA y Congo Red Kongorot. c. Agalla fresca con Congo Red Kongorot. d. Grano de elote fresco con azul de toluidina y Congo Red Kongorot. e. y f. Agalla fresca con azul de toluidina y Congo Red Kongorot.

En la figura 29 se observan cortes longitudinales de muestras de huitlacoche incluidas en parafina, evidenciando el germen del grano de maíz (fig. 29a-c) y las teliosporas en forma de puntos rojos (fig. 29b y d).

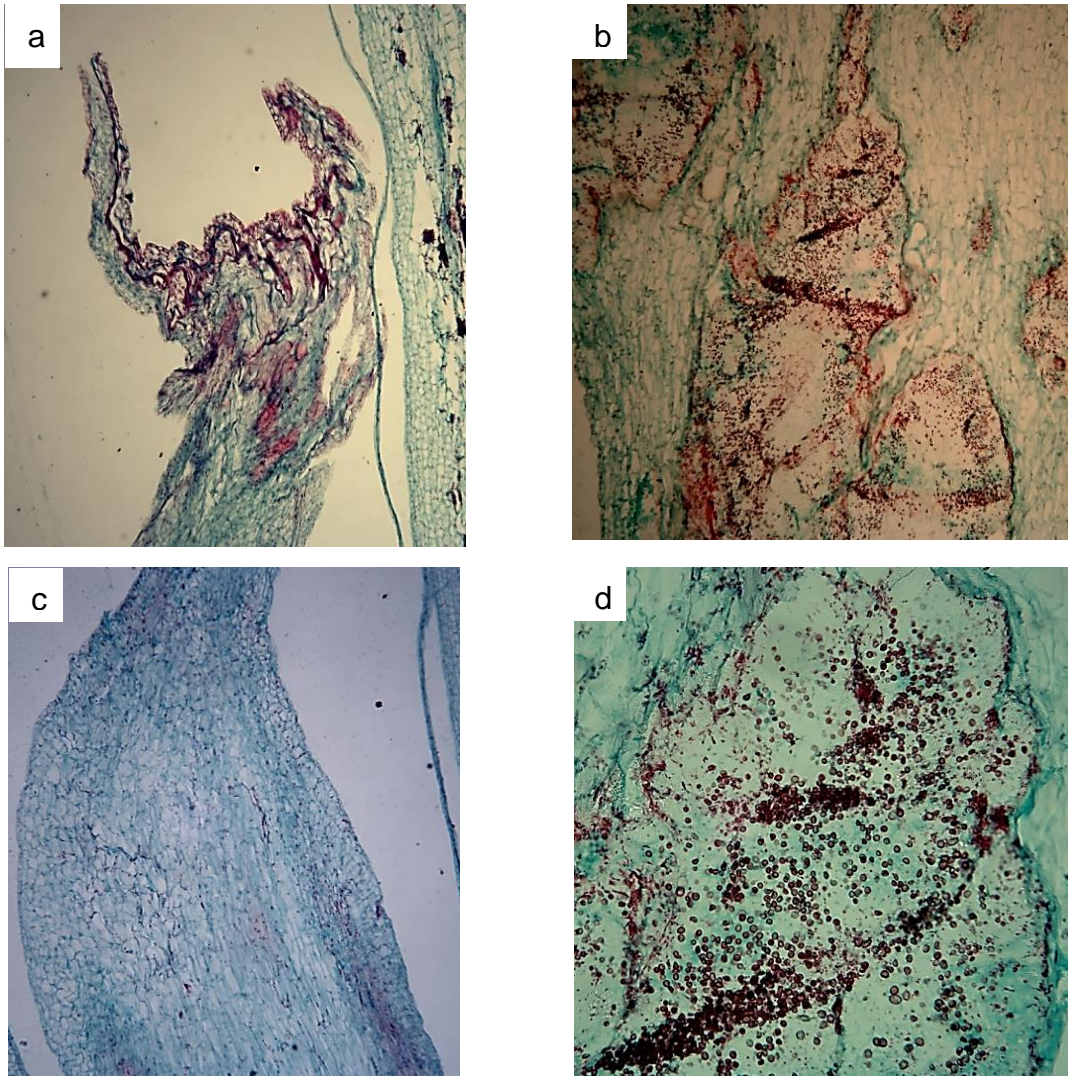


Figura 29. Microfotografías obtenidas por microscopía de luz de cortes longitudinales de muestra de huitlacoche incluidas en parafina.

Se obtuvieron mazorcas infectadas con *Ustilago maydis* de la central de abastos de la Ciudad de Puebla a partir de las cuales fueron aisladas cepas de este hongo (Figura 30).



Figura 30. Mazorcas de elote con brácteas infectadas con *Ustilago maydis* utilizadas en esta investigación. a. Ejemplar 1. b. CP-963 (ejemplar 2). c. CP-964 (ejemplar 3). d. Ejemplar 4.

9.2.2 Microscopía electrónica de barrido*

El análisis de microscopía electrónica de barrido permitió caracterizar las diferentes etapas morfológicas que presenta la transformación del grano de maíz a agalla, durante las diferentes etapas de infección con *U. maydis*. Se diferenciaron cuatro etapas: etapa uno, donde se observa el grano de maíz sin ninguna transformación estructural pero invadida por teliosporas y algunos cúmulos de hifas. En la etapa dos se empiezan a observar una degradación de las estructuras vegetales, se pueden ver también teliosporas en etapas primigenias. En la etapa tres predomina un exceso de teliosporas, masas mucilaginosas cubren la remanente de las estructuras vegetativas. La etapa cuatro fue similar a la etapa tres.

La microscopía nos ayudó a entender el desarrollo de las hifas y la formación de las teliosporas. Banuett (1996), reportó que nueve días después de la inoculación, las hifas fúngicas parecen estar envueltas en material mucilaginoso. El contorno de las hifas parecer ser indistinto en este periodo, y las hifas parecen estar hinchadas y adheridas entre ellas. Las hifas ya no se encuentran rectas, sino que se entrelazan una alrededor de otra con las células hospederas. Los extremos de las regiones de muchas de las hifas forman una apariencia lobulada, que podría ser la consecuencia de la vasta formación de pequeñas ramificaciones. La fragmentación de las hifas en segmentos de una a muchas células elongadas también es aparente en esta etapa. Para Banuett está claro que la fragmentación de las hifas ocurre dentro de las células tumorales y no entre las células como se había reportado previamente (Mills y Kotzé, 1981; Snetselaar y Mims, 1994). En general, las imágenes del corte transversal comparten características, por ejemplo, que en la parte superior de once de las imágenes se observa la epidermis del pericarpio y el mesocarpio.

La figura 31 ilustra las diferentes etapas del grano de maíz infectado por *U. maydis* durante las diferentes etapas de la infección. La etapa uno representa al grano de maíz sin deformaciones estructurales, aunque existen la

* Este estudio de la Microscopía Electrónica de Barrido se realizó en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados, *Campus* Montecillo, bajo la dirección de la Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera.

presencia de teliosporas, se logra diferenciar el endospermo con formas predominantemente hexagonales. En el lumen celular se aprecian pequeñas teliosporas, algunas en etapas primigenias. Los cortes transversales muestran la forma hexagonal de las células del endospermo (fig. 31b, e, h), y se pueden ver claramente las células transversales del pericarpio. Se puede observar las esporas pegadas a la epidermis del pericarpio. También se alcanzan a notar estomas en la superficie de la epidermis del pericarpio (fig. 31c, f, i).

La etapa dos se caracterizó por una leve degradación del tejido vegetal y una acumulación más extensa de teliosporas en una etapa más madura (fig. 32). También se comienzan a ver masas mucilaginosas. Un corte de la sección transversal, muestra las células hexagonales un tanto deformadas y teliosporas en el lumen de las células (fig. 32a, d, g). El corte longitudinal deja ver aglomeraciones de teliosporas a causa de la degradación del tejido vegetal (fig. 32b, e y h). Se observa una pérdida de estructura celular. De igual forma, se observa la epidermis del pericarpio, con sus característicos estomas y a las teliosporas sostenidas (fig. 32c, f, i).

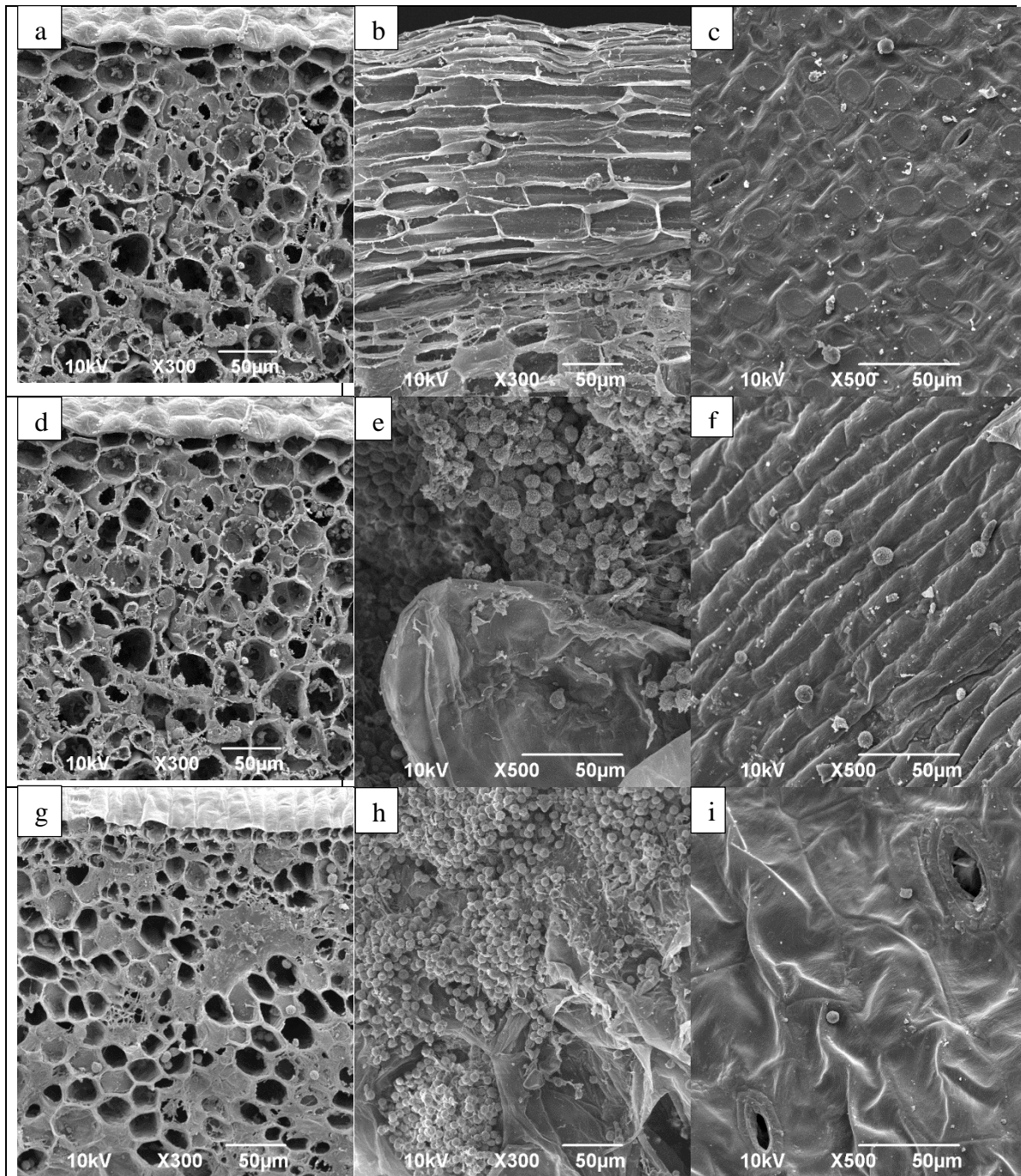


Figura 31. Microfotografías de huitlacoche obtenidas por microscopía electrónica de barrido: a. Sección transversal en la etapa 1, CP-963 (ejemplar 2). b. Sección longitudinal de Etapa 1, CP-963 (ejemplar 2). c. Pericarpio, de Etapa 1, CP-963 (ejemplar 2). d. Sección transversal de Etapa 2, CP-963 (ejemplar 2). e. Sección longitudinal de Etapa 2, CP-963 (ejemplar 2). f. Pericarpio, de Etapa 2, ejemplar 1. g. Sección transversal de Etapa 3, CP-964 (ejemplar 3). h. Sección longitudinal de Etapa 2, CP-963 (ejemplar 2). i. Pericarpio de Etapa 3, CP-963 (ejemplar 2).

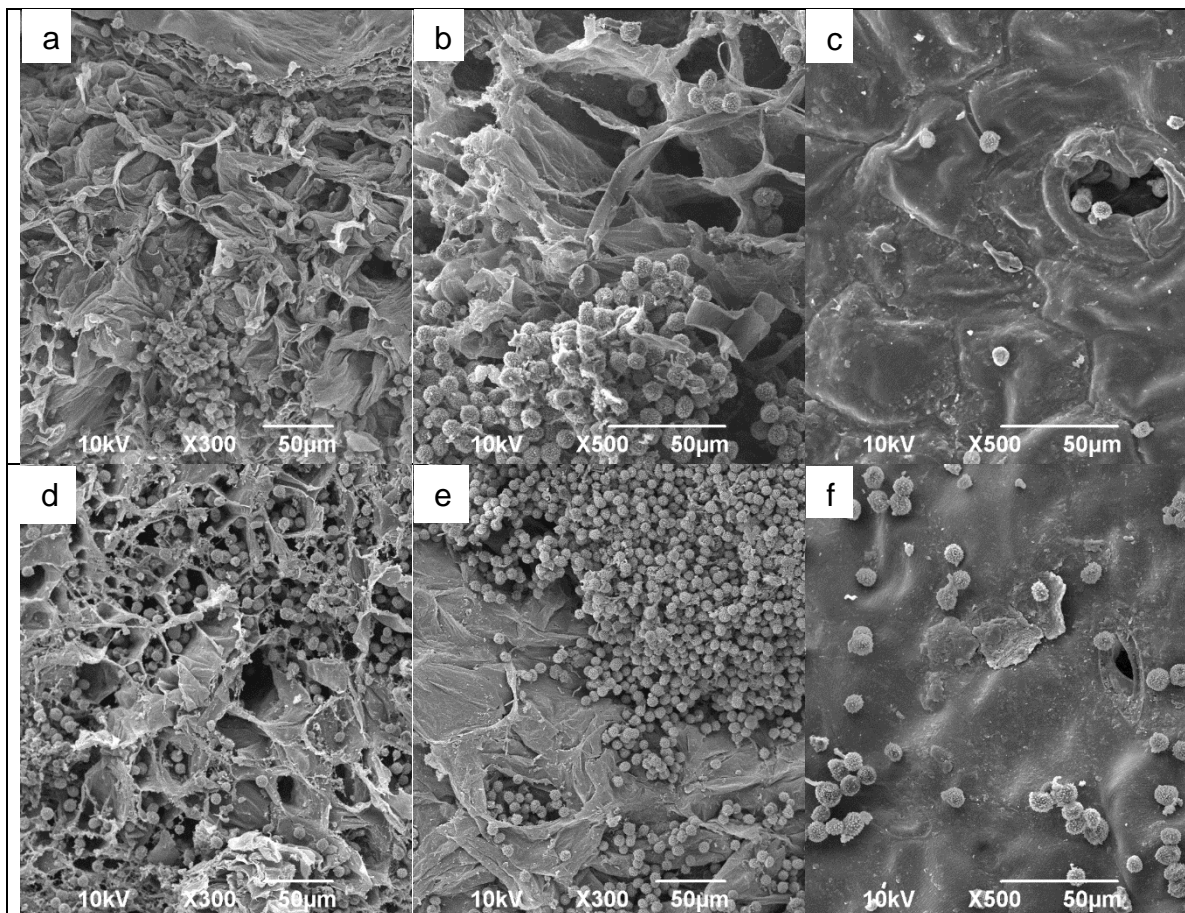


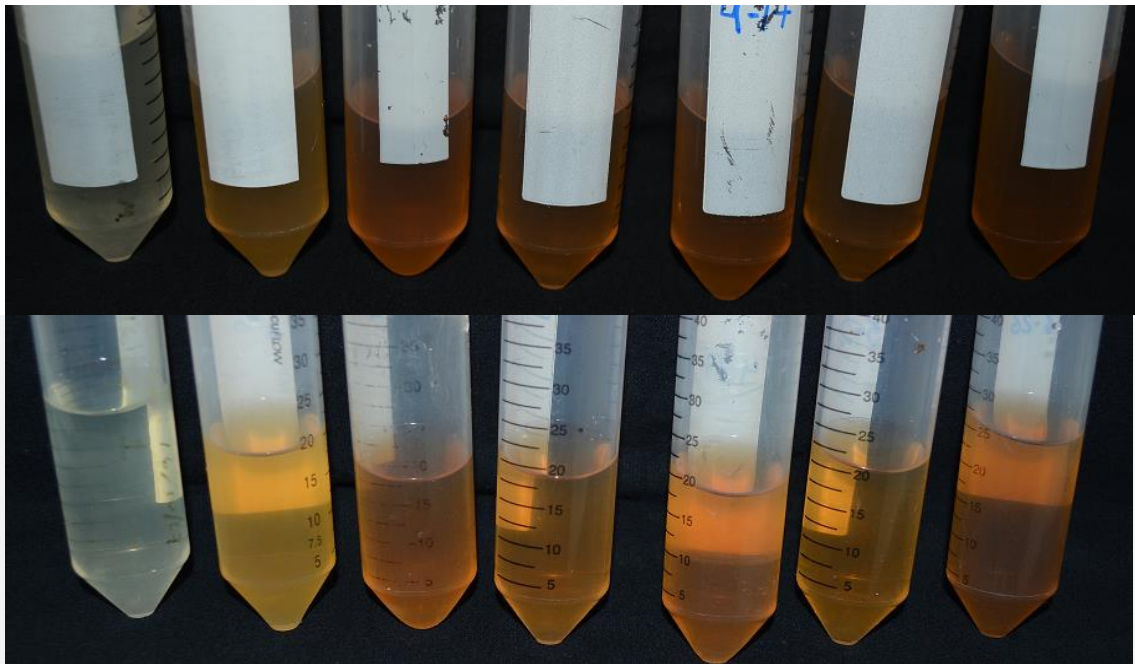
Figura 32. Microfotografías de huitlacoche obtenidas por microscopía electrónica de barrido: a. Sección transversal de Etapa 4, ejemplar 1. b. Sección longitudinal de Etapa 4 de ejemplar 1. c. Pericarpio de Etapa 4, ejemplar 1. d. Sección transversal de Etapa 5, ejemplar 1. e. Sección longitudinal de Etapa 5 de CP-964 (ejemplar 3). f). Pericarpio de Etapa 5, ejemplar 1.

9.3 Propiedades de las agallas comerciales del huitlacoche

Caracterización de los macerados

Después de macerar cada muestra correspondiente a las etapas seleccionadas de *U. maydis* se observa que el color de las muestras van de amarillo-pálido a amarillo oscuro (fig. 33). Por otro lado, después de este tiempo de maceración el peso inicial de 2g de cada muestra disminuyó, con variaciones en cada etapa (fig. 34). De igual forma, las muestras de huitlacoche que contenían a los hongos de referencia, perdieron peso después de 24 horas de maceración. La muestra que más peso perdió fue la correspondiente a la cepa de referencia de *U. maydis* (CP

436x437), con más de 1g, seguido de la muestra infectada con la cepa CP-296 del hongo *Neolentinus lepideus* con cerca de 1g, todas durante la etapa 1 de la infección. La muestra menos peso perdió fue la cepa CP- 145 de *G. lucidum* (menos de 0.2g), y el gramo de elote cerca de 0.4g (fig. 35).



C **E1** **E2** **E3** **E4** **E5** **R6**

Figura 33. Diferentes volúmenes y coloraciones de los macerados demuestras de huitlacoche. E= Etapa. R= cepa de referencia de *Ustilago maydis*.



C **E1** **E2** **E3** **E4** **E5** **E6**

Figura 34. Apariencia de cada residuo sólido de las muestras de huitlacoche después de ser maceradas, correspondiente a cada una de las etapas de *Ustilago maydis*. E= Etapa. R= cepa de referencia de *Ustilago maydis* empleada en la preparación de las muestras de huitlacoche.

En la figura 35 se representa el peso húmedo en gramos de las muestras después de 24 horas en el horno de secado. El valor más alto fue de CP-145 que equivale a *Ganoderma lucidum*. El grano tuvo un valor de 1.6 g, mientras que el valor más bajo es el reportado muestra infectada con la cepa de referencia. Los valores no varían significativamente entre las diferentes etapas del huitlacoche.

En la figura 36 se observa la pérdida de peso seco de la muestra macerada. Las muestras que menos perdieron peso fue la de la referencia infectada con *U. maydis*, seguida de la ensayada con la cepa 286 de *N. lepideus* y comparado con el tiempo necesario para alcanzar la etapa 1 de infección de *U. maydis*. Los demás perdieron más de 1g de peso. La muestra de *G. lucidum* (cp-145) casi perdió todo el peso. El grano de maíz también muestra una baja disminución de peso seco. Posteriormente, el huitlacoche se mantiene estable a lo largo de todas las etapas siguientes.

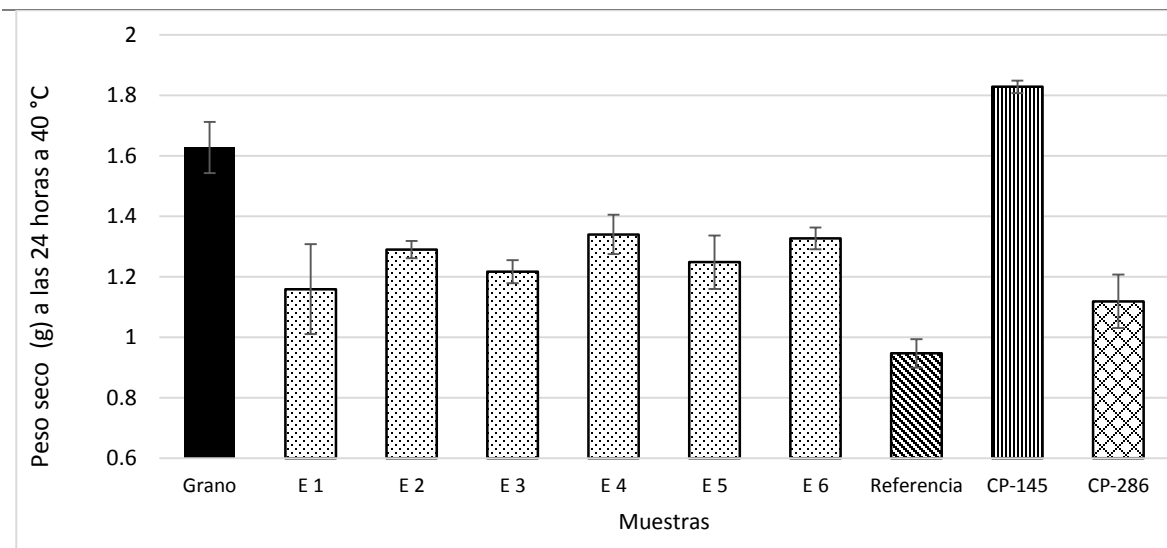


Figura 35. Peso húmedo (g) a las 24 horas a 40°C. E= Etapa. CP-145= *Ganoderma lucidum*. CP-286= *Neolentinus lepideus*. R= cepa de referencia de *Ustilago maydis*.

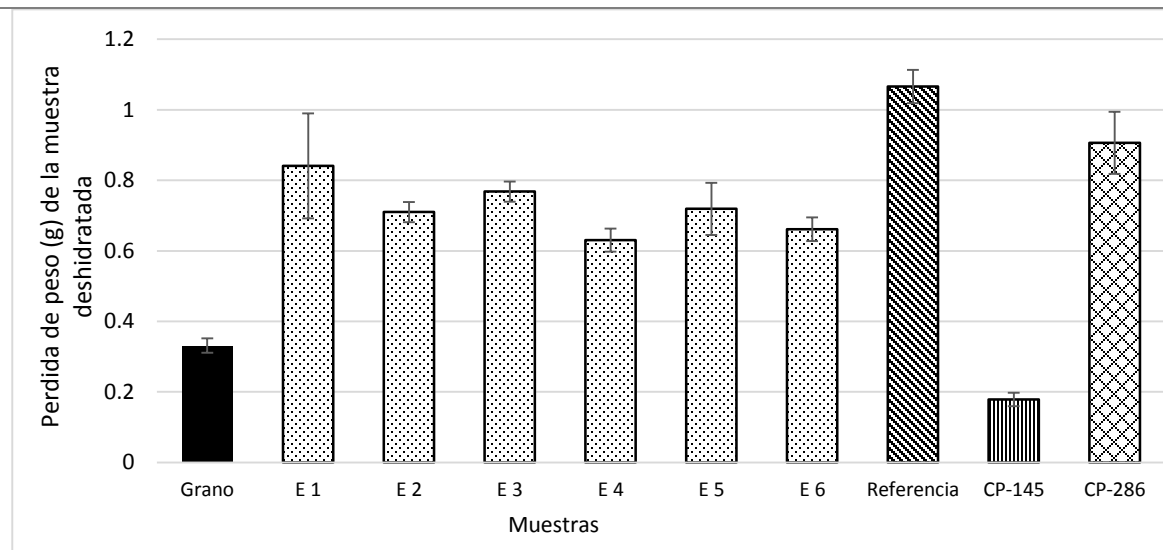


Figura 36. Peso seco (g) de la muestra deshidratada de *Ustilago maydis* por 24 horas de macerado comparados con los obtenidos con las muestras de hongos y con el grano de elote. E= Etapa. CP-145= *Ganoderma lucidum*. CP-286= *Neolentinus lepideus*. R= cepa de referencia de *Ustilago maydis*.

En cuanto al volumen (mL) del solvente hidroalcohólico recuperado, después de la maceración, éste varió de acuerdo a la muestra. El valor más alto recuperado fue el de la cepa de referencia. La etapa 6 presenta casi el mismo valor que el grano de maíz sin infección (testigo negativo), mientras que en las etapas intermedios disminuye el volumen. La cepa CP-145 de *G. lucidum* presentó el volumen recuperado más bajo (16mL) (figura 37).

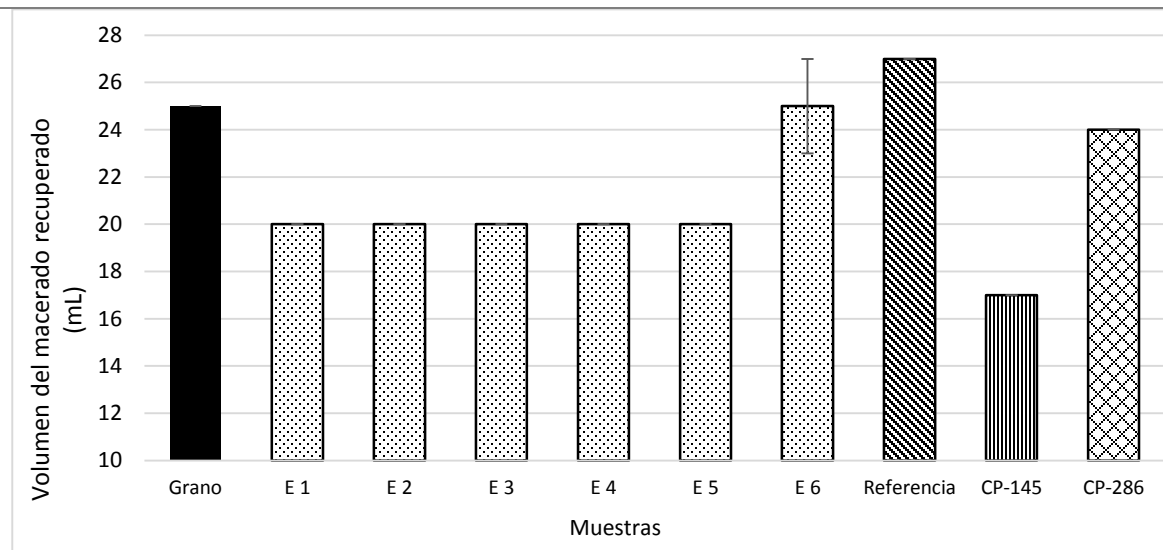


Figura 37. Volumen (mL) del macerado recuperado después de la maceración de las etapas de *Ustilago maydis*, el grano de elote y las cepas de referencia. E= Etapa. CP-145= *Ganoderma lucidum*. CP-286= *Neolentinus lepideus*. R= cepa de referencia de *Ustilago maydis*.

En el cuadro 9 se reportan las características de los macerados. Puede observarse una tendencia a la acidificación de la muestra a medida que el hongo avanza en el grano, observándose que el control tuvo un valor de pH 6.55 y en la etapa 5 alcanzó un valor de 5.96 (fig. 38). La cepa de *N. lepideus* (CP-286) también presentó un valor inicial de alrededor de 6.0. La muestra de huitlacoche infectada con la cepa referencia tuvo un valor menor de pH 5.5, mientras que la de *G. lucidum* (CP-145) alcanzó el valor más bajo con 4.8. Estos valores son más altos a los obtenidos por Pimentel-Gonzalez y Col. (2011) quienes obtuvieron valores de 4.26 a 4.44.

Cuadro 9. Valores de los macerados obtenidos en el presente estudio.

Muestra	pH	Conductividad (μS/cm)	Resistividad (Ohms)	°Brix	Rendimiento (mg/mL)
Grano	6.55±0.10	3916.38±374.52	182.25±15.20	12±0.82	6.8±0.69
E1	6.23±0.04	6961.90±1595.55	104.5±23.81	13.58±1.75	26.73±4.57
E2	6.11±0.02	6083.43±1386.33	145±46.80	14.45±0.39	26.6±1.11
E3	6.16±0.09	7630.93±994.69	93.25±12.42	13.23±1.84	27.8±1.25
E4	6.09±0.06	7387.53±693.28	92.75±9.29	13.68±1.05	25.66±0.66
E5	5.96±0.03	7719.38±412.76	86.25±4.03	12.18±3.16	25.4±0.6
E6	6.02±0.09	7644.95±1154.02	87.75±12.47	13.5±0.91	20.87±0.11
R	5.45±0.15	5164.88±412.76	117.00±12.42	15.60±2.45	36.07±1.8
CP-145	4.93±0.12	2441.10±374.52	252.50±8.90	13.00±1.67	9.8±0.48
CP-286	6.04±0.05	7339.55±345.67	82.75±7.34	15.20±2.62	30.75±0.75

E= Etapa. CP-145= Cepa de *Ganoderma lucidum*. CP-286= Cepa de *Neolentinus lepideus*. R= Cepa de referencia de *Ustilago maydis*.

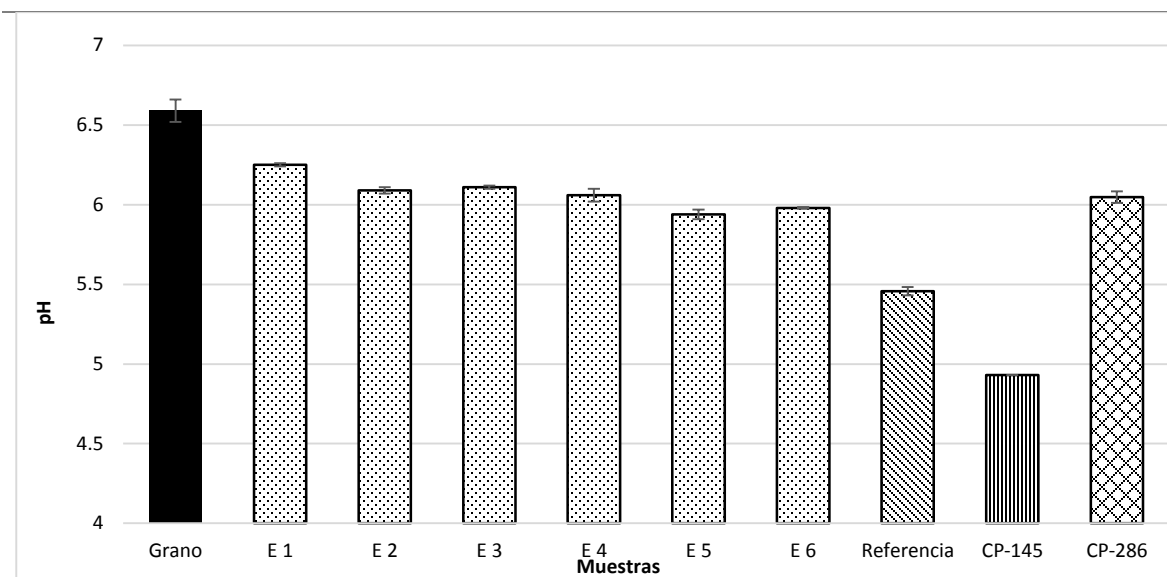


Figura 38. pH de los macerados estudiados. E= Etapa. CP-145= *Ganoderma lucidum*. CP-286= *Neolentinus lepideus*. R= Cepa de referencia de *Ustilago maydis*.

En la figura 39 se presenta la conductividad de los macerados en las muestras estudiadas, observándose un incremento durante las etapas de las muestras infectadas con la cepa de referencia de *Ustilago maydis*, que superan por mucho a los valores de grano de maíz. CP -286 tiene valores similares a los de las etapas. En contraste, la referencia es menor a las etapas y el CP-145 es el que tiene menor conductividad.

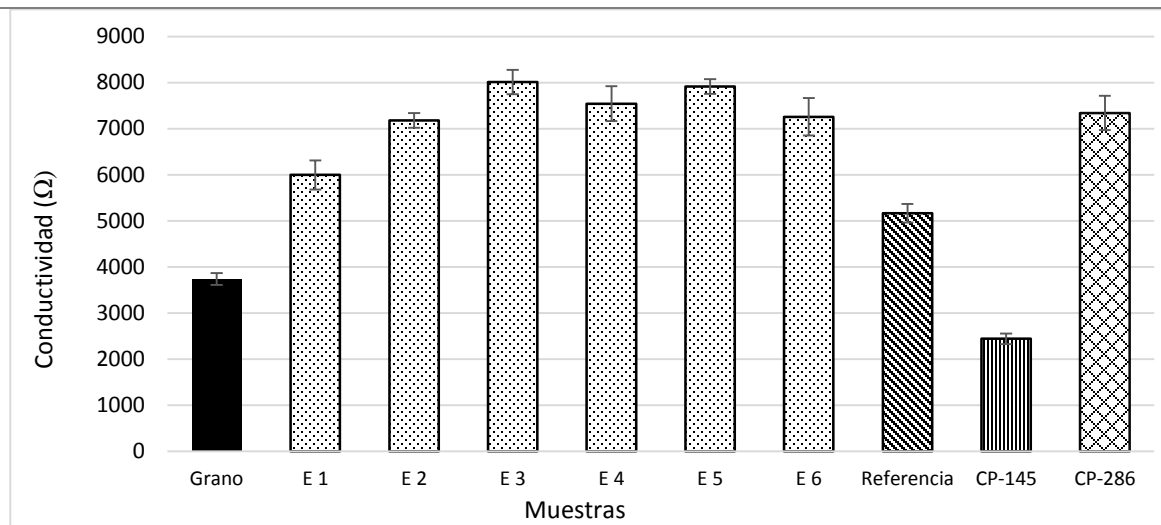


Figura 39. Conductividad de los macerados estudiados de *Ustilago maydis*. E= Etapa. CP-145= *Ganoderma lucidum*. CP-286= *Neolentinus lepideus*. R= Cepa de referencia de *Ustilago maydis*.

En la figura 40 se observa la resistividad de los macerados de las muestras estudiadas. La CP-145 de *G. lucidum* fue el que tuvo el valor más alto. Le sigue el grano de maíz. Las etapas tuvieron mucha menor resistividad que el grano de maíz, manteniendo valores constantes durante las seis etapas. La resistividad de la cepa CP-286 y *N. lepideus* y fue un poco mayor que la de las etapas.

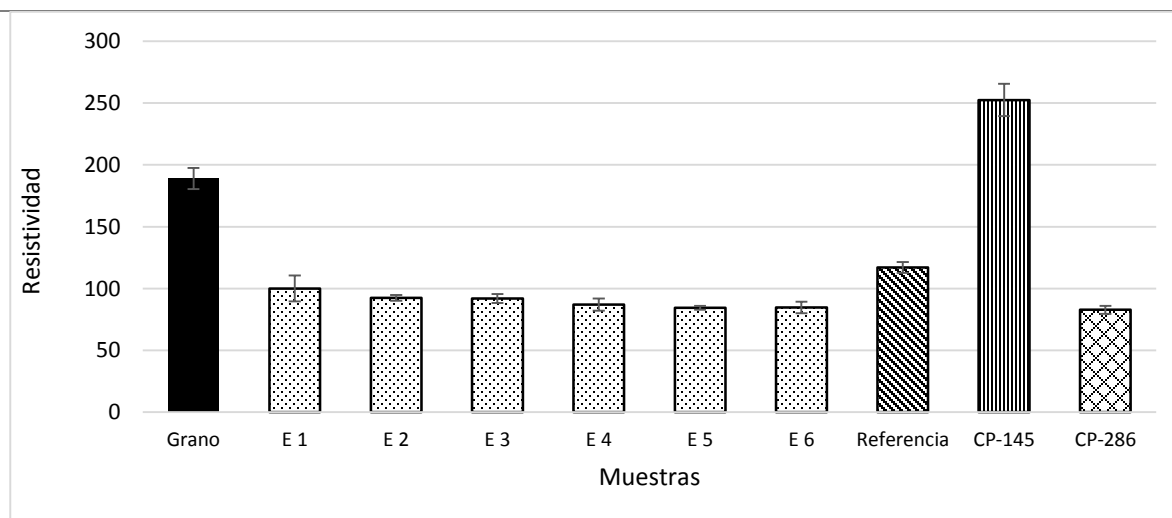


Figura 40. Resistividad de los macerados estudiados de *Ustilago maydis*. E= Etapa. CP-145= *Ganoderma lucidum*. CP-286= *Neolentinus lepideus*. R= Cepa de referencia de *Ustilago maydis*.

En la figura 41 se pueden observar los grados Brix de las muestras. Se puede notar que el contenido de sólidos solubles totales se incrementa a medida que avanza el desarrollo de *U. maydis*, principalmente en la etapa 3. Estos valores son notablemente más altos que los mencionados por Pimentel-González y Col. (2011) quienes obtuvieron valores de 2.13 a 3.76 en *U. maydis* en los tres tipos de maíz. Aun así, los valores más altos pertenecen a los obtenidos con la cepa de referencia de *U. maydis* mientras que la cepa de CP-145 de *G. lucidum*, tuvo los valores más bajos entre las muestras. Por otro lado, en la figura 42 podemos observar los datos obtenidos del rendimiento expresados en mg/mL de los extractos en las diferentes etapas. La cepa de referencia de *U. maydis* fue la que presentó un mayor rendimiento, seguida de la CP-286 de *N. lepideus* (fig. 42). La cepa CP-145 de *G. lucidum* y el grano de maíz son los que tienen los valores más bajos. Se observa un incremento notable de rendimiento a lo largo del desarrollo de *U. maydis* sobretodo en las primeras etapas.

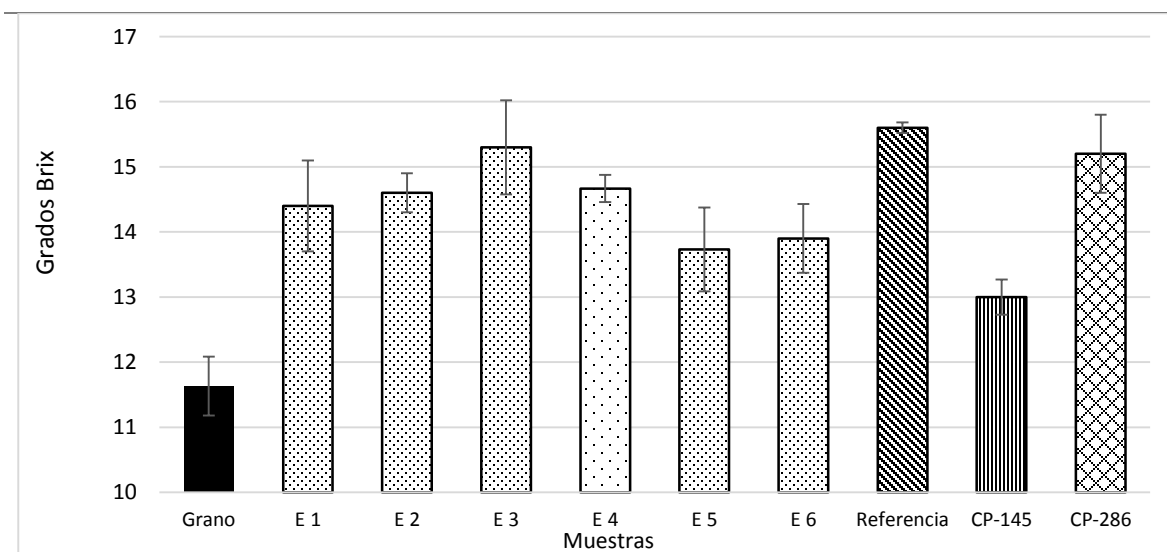


Figura 41. Grados Brix de los macerados estudiados de *Ustilago maydis*. E= Etapa. CP-145= *Ganoderma lucidum*. CP-286= *Neolentinus lepideus*. R= Cepa de referencia de *Ustilago maydis*.

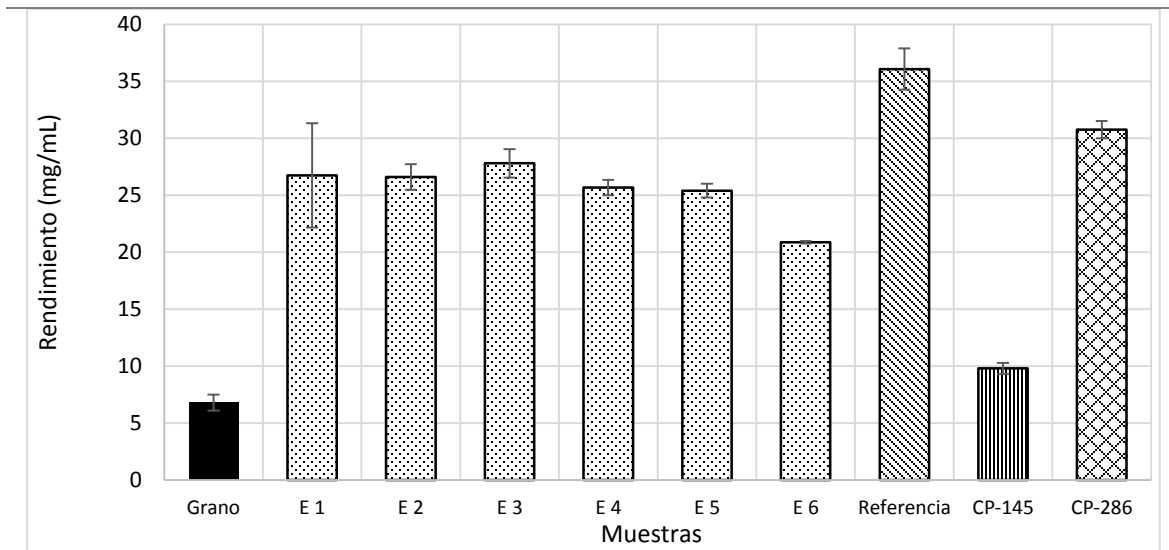


Figura 42. Rendimiento de los macerados estudiados de *Ustilago maydis*. E= Etapa. CP-145= *Ganoderma lucidum*. CP-286= *Neolentinus lepideus*. R= Cepa de referencia de *Ustilago maydis*.

9.4 Propiedades funcionales del huitlacoche

En el cuadro 9 se observan los valores obtenidos de las proteínas totales, polifenoles y DPPH contenidos en las diferentes etapas en las muestras de huitlacoche obtenidos en las diferentes etapas y los hongos de referencia.

Cuadro 10. Propiedades funcionales de las diferentes etapas de los macerados de *Ustilago maydis*.

Muestra	Proteínas (µg/mL)	Polifenoles (meq AG/mL de muestra)	DPPH (IC 50%) (µg)
Grano	46.43±2.45 ^e	608.6±77.05 ^e	23.11±4.85 ^a
E1	48.83±2.72 ^{d,e}	6704.97±1108.4 ^d	23.42±2.91 ^a
E2	51.54±4.61 ^{d,e}	12374.7±2689.75 ^{a,b}	17.43±1.73 ^c
E3	59.81±2.41 ^{b,c,d}	12585.45±1120.47 ^{b,c}	19.56±1.45 ^{b,c}
E4	67.18±5.8 ^{a,b}	15338.37±1826 ^a	17.22±0.93 ^d
E5	67.18±5.8 ^{b,c}	12696.37±1023.31 ^{a,b}	6.62±1.6 ^d
E6	74.08±2.74 ^a	10326.02±410.53 ^{a,b}	21.87±0.76 ^{a,b}
R	50.88±1.63 ^{c,d,e}	14086.61±825.99 ^{c,d}	22.28±0.36 ^a
CP-145	73.81±2.13 ^a	2777.6±493.72 ^e	6.91±0.2 ^e
CP-286	56.28±2.82 ^{b,c,d,e}	13668.37±1602.59 ^e	6.51±1.11 ^e

E= Etapa. CP-145= *Ganoderma lucidum*. CP-286= *Neolentinus lepideus*. R= Cepa de referencia de *U. maydis*.

En la figura 43 se representa la concentración de proteína total (mg/mL) de las muestras de huitlacoche en las diferentes etapas de infección comparados con las demás muestras testigo. Se observa que las muestras infectadas con la cepa de la referencia de *U. maydis*, presentó los valores más bajos en comparación al desarrollo de *U. maydis*, en donde el contenido de proteínas se incrementó gradualmente. La cepa CP-286 de *N. lepideus* tuvo valores un poco mayores que la correspondiente a la cepa de referencia de *U. maydis*. La cepa CP-145 de *G. lucidum* tuvo los valores más altos comparado con la etapa 6 de *U. maydis*.

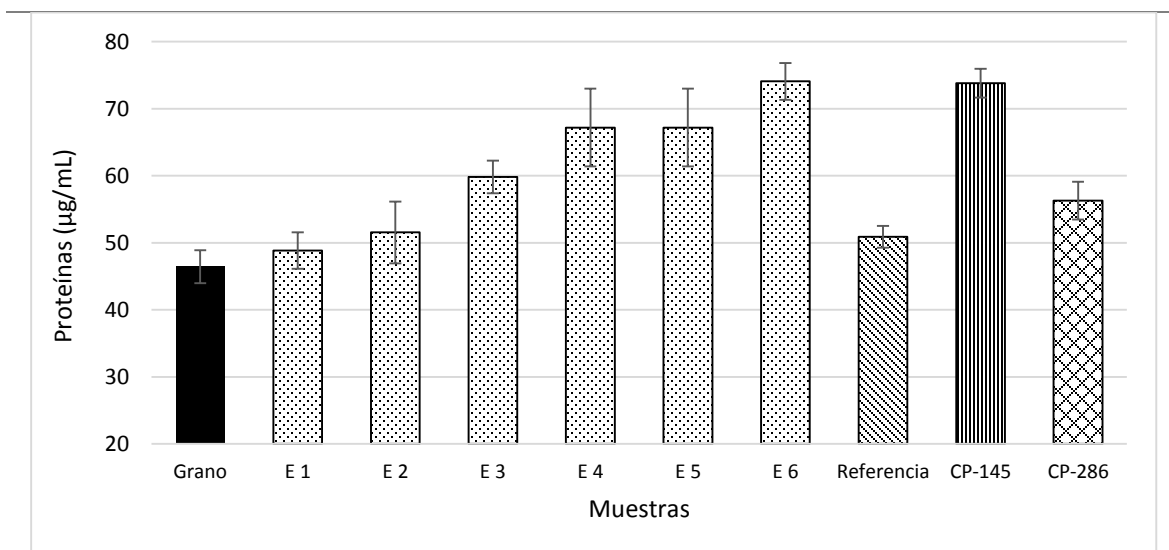


Figura 43. Proteínas de los macerados estudiados de *Ustilago maydis*. E= Etapa. CP-145= *Ganoderma lucidum*. CP-286= *Neolentinus lepideus*. R= Cepa de referencia de *U. maydis*.

En la figura 44 se observa la concentración de polifenoles totales (mg/mL). El grano de maíz casi no presentó polifenoles, mientras que *U. maydis* tuvo valores altos, sobretodo la etapa 2. La de referencia de *U. maydis* tuvo valores menores que las etapas de *U. maydis*. La cepa CP-145 y CP-286 tuvieron valores altos en comparación con el grano de maíz, pero menores a las etapas tardíos de *U. maydis*.

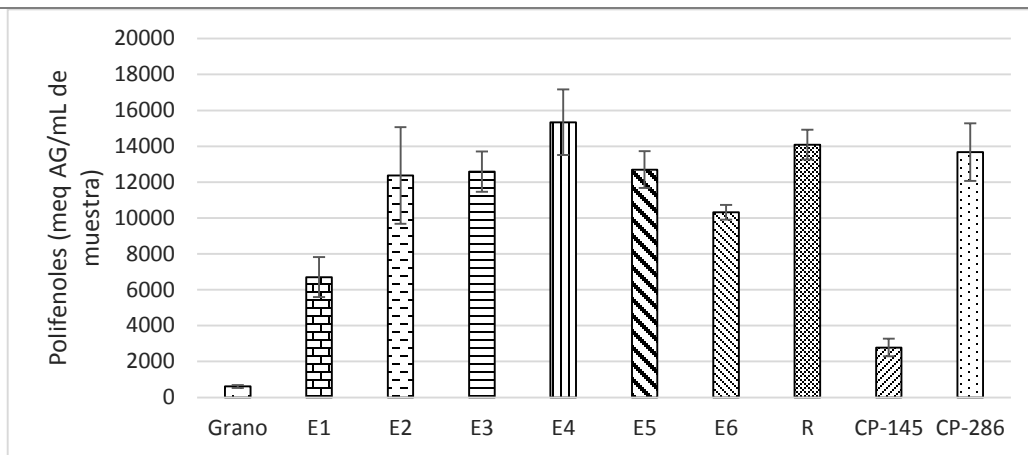


Figura 44. Polifenoles de los macerados estudiados de *Ustilago maydis*. E= Etapa. CP-145= *Ganoderma lucidum*. CP-286= *Neolentinus lepideus*. R= Cepa de referencia de *U. maydis*.

En la figura 45, se observa actividad antioxidante considerando la capacidad efectiva (IC50) de los macerados estudiados de *Ustilago maydis* a partir de los ensayos del DPPH. Puede notarse que la etapa 1 fue el que tuvo una mayor cantidad con 23.42, mientras que la menor cantidad la obtuvo la etapa 1 (6.62).

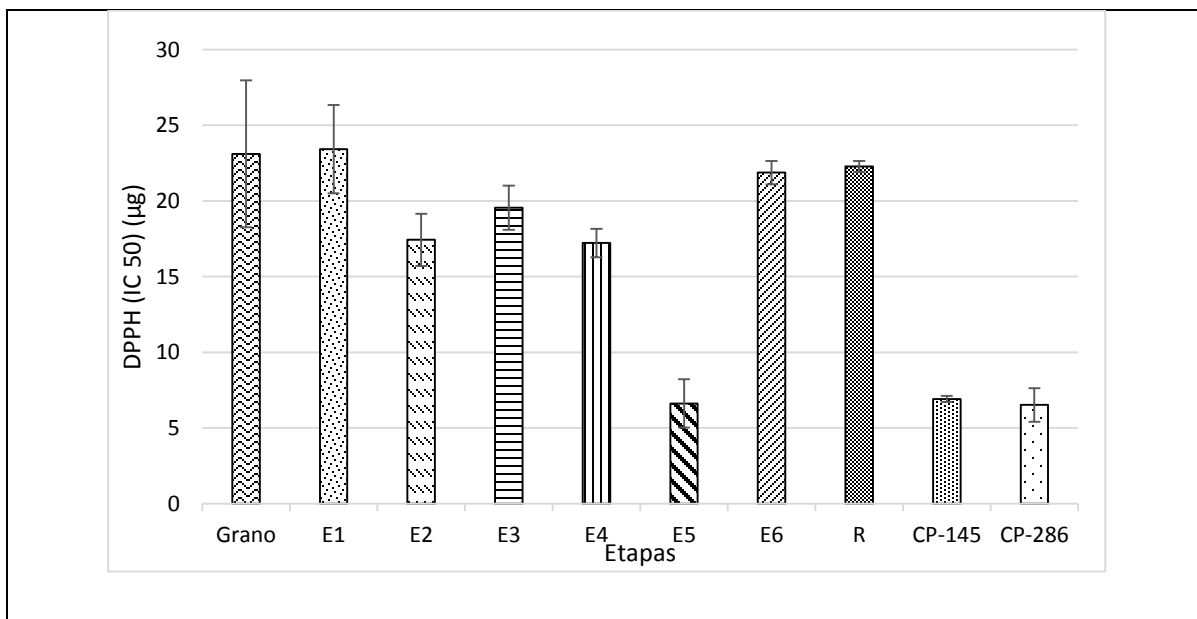


Figura 45. Actividad antioxidante considerando la capacidad efectiva (IC50) de los macerados estudiados de *Ustilago maydis* a partir de los ensayos del DPPH. E= Etapa. CP-145= *Ganoderma lucidum*. CP-286= *Neolentinus lepideus*. R= Cepa de referencia de *Ustilago maydis*.

X. DISCUSIÓN

Desde hace algunos años los hongos comestibles han llamado mucho la atención debido a su valor nutricional ya que contienen altos contenidos de proteínas, importante cantidad de amino ácidos esenciales y fibra y bajo contenido en grasa (Mattila *et al.*, 2001; Reis *et al.*, 2012). Los hongos comestibles pueden ser una fuente de varios compuestos nutraceuticos tales como compuestos fenolicos, tocoferoles, ácido ascórbico y ácidos grasos insaturados entre otros. En la presente investigación se estudió al huitlacoche, enfermedad causada por el hongo *Ustilago maydis* (DC) Corda, tanto su venta en los mercados de la región central del país, su desarrollo morfológico con microscopia clásica y electrónica de barrido y algunas de sus propiedades nutricionales. En relación a la venta del huitlacoche en los mercados se pudo observar que se puede comprar en todos los mercados encuestados. Y su precio varió de \$ 40.00 a \$ 80.00 el kilogramo. Estos precios están en el intervalo reportado por Mayett *et al.* (2012), quienes mencionaron un precio de \$66.60 el kilogramo. Por otro lado, el precio en los supermercados fue de \$90.00 en todos los casos. Se menciona que el producto está disponible durante todo el año. Derivado de las encuestas se determinó que 99% de las personas dijeron conocer el hongo, por lo que es un alimento muy conocido en la población. Una alta proporción de los entrevistados (88.4%) mencionó que lo compran en los mercados.

Con respecto al conocimiento que tienen sobre el valor como alimento funcional del huitlacoche, un 60% de los entrevistados mencionó que si conoce este atributo del hongo. El 67% de los entrevistados mencionó que consume una vez al mes el huitlacoche, en contraste con lo mencionado por Mayett *et al.* 2012, quienes encontraron que la frecuencia del consumo de hongos (1 o 2 veces) por mes fue del 41.5%. En años recientes ha habido un creciente interés por la búsqueda de fuentes naturales de alimentos con gran capacidad antioxidante. Existen diversos estudios sobre el contenido de compuesto fenolicos, actividad antioxidante y perfil de lípidos, entre otros de *U. maydis* (Aydoğdu y Gölükcü, 2017; Pimentel González *et al.*, 2011; Valdez-Morales *et al.*, 2016;).

En el presente trabajo se pudo observar que la cantidad de proteína se incrementó en relación al control al pasar de 56.55 $\mu\text{g/mL}$ a 74.16 55 $\mu\text{g/mL}$ en la etapa E4. La misma tendencia se puede notar en los polifenoles totales donde el control tuvo 89.5 meqAG/mL de muestra y aumentó hasta 597.71 meqAG/mL de muestra. Por otro lado, la capacidad antioxidante, determinada como IC50 de *U. maydis* en las diferentes etapas varió en cada uno de ellos. Es importante hacer notar que en relación a las propiedades antioxidantes del extracto derivado de la capacidad del extracto entre más bajo sea el valor de la IC50 su capacidad antioxidante es más alta. Así tenemos que en el caso del grano sano de maíz la IC50 fue de 23.11, mientras en las diferentes etapas este valor disminuyó. Siendo en la etapa 5 donde alcanzó el valor más bajo con 6.62. Este valor es muy bajo en relación al reportado por Aydoğdu y Gölükçü, (2017) quienes obtuvieron un IC50 de 186.444. Esto puede deberse a la variedad de maíz que ellos utilizaron o a las condiciones de cultivo.

Se observó que en las 6 etapas propuestas por Pataky y Snetselaar (2006), existió un incremento en el tamaño de las agallas en comparación con el control (grano de elote). Este incremento fue muy notorio a partir de la etapa 3, en donde se observan aumentos de más del 100% en los tres parámetros (largo, ancho y grosor del grano). De estos tres parámetros el largo fue el que menos incrementó en términos de porcentaje, sólo un 167% en la etapa 5. Por otro lado, el ancho alcanzó su máximo incremento en la etapa 6, con un 230% de aumento. Finalmente, el grosor fue lo que más aumentó, con un 347% en la etapa 5. Este mismo patrón de desarrollo se observó en el volumen de las agallas. Así se tuvo que en la etapa 1 aumento un 184 % en relación al control que es el grano de elote. Siendo la etapa 5 donde se obtuvo el mayor aumento del volumen con un 3,016%. Con la microscopía electrónica de barrido (MEB) se pudo observar que en etapa 1 a pesar de que se observó la presencia de teliosporas, la cantidad de estas fue escasa.

Sin embargo, es a partir de la etapa dos donde se puede observar una gran cantidad de teliosporas, aunque morfológicamente no se vea un cambio significativo en el grano de maíz. La microscopía de luz no logró observar las teliosporas, aunque

se logró observar un ligero agrandamiento del grano de maíz. Es de notarse que casi no existen trabajos relacionados con la morfología del desarrollo de *U. maydis* en el grano del maíz, a diferencia de investigaciones sobre el desarrollo del tumor en la planta del maíz (Breford *et al.*, 2009).

XI. CONCLUSIONES

1. El huitlacoche se vende durante todo el año en la mayoría de los mercados de la Ciudad de Puebla, donde su precio promedio fue de \$60.00, y en los supermercados de \$90.00. La presentación de venta predominante fue la desgranada.
2. Se identificaron las seis etapas del proceso de formación de las agallas a partir del grano de maíz infectado con el hongo *U. maydis*.
3. . Se registró la presencia de teliosporas, con un tamaño promedio de 6 a 7.5 μm de diámetro, en todas las etapas del proceso de formación de las agallas a partir del grano de maíz infectado con el hongo *U. maydis*.
4. La actividad antioxidante máxima, determinada por la IC50, fue alcanzada en la etapa 5, con un valor de 6.62.

Contrastación de hipótesis

Existen diferencias morfológicas y bioquímicas en las distintas etapas de infección de Ustilago maydis, hasta la aparición de teliosporas en la agalla madura.

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo con el hongo huitlacoche (*Ustilago maydis*) pudimos observar que existen una relación entre las etapas del desarrollo del hongo y las propiedades de cada una de ellas. Se pudo observar que a medida que se incrementa la etapa de desarrollo de hongo, aumenta la cantidad de teliosporas en la agalla. En este sentido también se notó un aumento tanto en el tamaño, peso y volumen del grano infectado. Por otro, lado los valores más altos de grados Brix y rendimiento se obtuvieron en la etapa 6. El mismo patrón se observó en la proteína, polifenoles totales y actividad antioxidante. Por estas razones, la hipótesis planteada se acepta.

XII. ESTRATEGIA PARA DIFUNDIR DEL CONSUMO DEL HUITLACOCHÉ (*Ustilago maydis*) EN LAS MEJORES ETAPAS DE DESARROLLO

La cadena agroalimentaria de los hongos comestibles, funcionales y medicinales en México existe desde 1933, además de los tradicionales champiñones ahora también se experimenta con el *Ustilago maydis*, el hongo parásito del maíz que conocemos popularmente como huitlacoche o huitlacoche desde el siglo XVII, fecha en que comenzó a tener una gran variedad de usos y aplicaciones alimenticias, medicinales y cosméticas.

El huitlacoche presenta retos biotecnológicos diferentes al de otros hongos comestibles, por ello es necesario una estrategia adecuada para satisfacer un potencial mercado nacional e internacional previsiblemente creciente, puesto que en nuestro país siempre ha sido costumbre el consumo de hongos, una tendencia que crece paulatinamente. Si en 1991 la producción nacional de hongos era de 9 mil toneladas, en tan sólo 20 años su producción se incrementó a 62 mil toneladas, destacándose como el país más productivo de Latinoamérica con un 80 % de la producción total.

La participación del huitlacoche en esta bonanza no es baladí, sobre todo cuando instituciones educativas como el COLPOS, en coordinación con productores de maíz en algunos estados del centro y sur de México, han desarrollado las bases metodológicas para la producción controlada del hongo fuera de temporada, así como sus perspectivas sobre el consumo, valor nutricional y funcional, puesto que su producción controlada no debe afectar la producción habitual de maíz, el grano básico de nuestra alimentación.

Cabe destacar que el consumo de huitlacoche en México, a pesar de su longevidad relativa, aún está en proceso de incorporarse a nuestra dieta cotidiana. Si bien desde los años 50 del siglo pasado se empezó a utilizar en platillos gourmet como una de las exquisiteces mexicanas, hay países en donde todavía se tira o se usa como alimento animal, así como regiones mexicanas en donde su consumo no existe, lo que incrementa la importancia de su valoración actual, que sitúa al huitlacoche como una importante contribución para el sistema agroalimentario microbiano.

Su potencial es enorme en las industrias alimenticia, farmacéutica y biotecnológica, lo que representa a futuro aportes y beneficios económicos importantes para la actividad agrícola nacional. En la actualidad el huitlacoche ha desplazado en producción a otros hongos cultivados considerados como “exóticos”, tales como el *shiitake* (*Lentinula*) y el *reishi* (*Ganoderma*), dado su valor nutricional y funcional.

La estrategia de incorporar a los productores de maíz para que conozcan el proceso de inoculación del huitlacoche para su producción, ahora que es posible, dada las características nutricionales y medicinales del hongo, pues está demostrado que tienen hasta un 35 % de proteínas utilizables en peso seco (la soya alcanza el 39.1 %), es un alimento funcional rico en vitaminas, sales minerales, oligoelementos y antioxidantes, con propiedades anticancerígenas, antibióticas, antimutagénicas, antioxidantes, antiinflamatorias y anti-diabéticas, además de que, una vez reconocido por nuestro paladar, es un alimento delicioso, con sabor “umami”, cuya preparación incrementa la calidad de nuestra cocina mexicana.

Estrategia y método

Existen tres sistemas de producción de huitlacoche, el primero es el conocido por todos los productores porque es el que viene con la cosecha estacional, con mazorcas infectadas de huitlacoche de forma natural y que representa en promedio el 1 % del total; en segundo lugar la instrucción rudimentaria de la infección con sus propios medios y conocimientos, y en tercer lugar la producción asistida de huitlacoche, cuando los productores reciben orientación sobre la aplicación de técnicas de inoculación y producción de huitlacoche.

Los métodos diseñados específicamente para la producción de huitlacoche como alimento implican una inoculación; es decir, la inyección directa de inóculos que contienen cepas compatibles de *U. maydis* en los jilotes.

Esta técnica para producir huitlacoche ha sido utilizada extensivamente en estudios genéticos y para la producción de variedades de maíz resistentes a hongos patógenos, adicionalmente se le ha probado en experimentos de campo e invernadero resultando con una alta incidencia de infección en jilotes (Castañeda *et al.*, 2016).

Los productores deben aprender sobre la variedad de maíz adecuado para su parcela, localmente adaptado para la inoculación directa con cepas de *U. maydis*, que presenten características fenotípicas “comerciales” apropiadas para su región, que incluyen características como porte de la planta, tamaño y peso de mazorca y agallas, protección de las hojas, sabor, precocidad, tiempo de maduración y vida de anaquel.

Para ello es menester hacer una evaluación cuantitativa de la infección por el hongo con estos parámetros: el desarrollo de la infección en el jilote; rendimiento por mazorca infectada; rendimiento por planta inoculada e incidencia de la infección, que es el número total de jilotes infectados.

Las experiencias adquiridas por los productores que han accedido a esa asistencia especializada les han permitido desarrollar y mejorar el sistema de producción masiva de huitlacoche. Por ejemplo, se ha propuesto que la protección de las hojas sobre las agallas es una característica comercial importante, ya que permite mantener una buena calidad de las agallas (menos daño) y extender el periodo de vida de anaquel.

Se ha logrado establecer una biotecnología básica para la producción intensiva y continua de huitlacoche, lográndose un producto de alta calidad, con agallas de buen tamaño, identificando las mejores propiedades en etapas de desarrollo, más dulces y menos amargas al consumir agallas no maduras, suaves y tiernas, y con una producción continua todo el año.

La estrategia contempla el reto de situar el cultivo de huitlacoche dentro de un sistema agroalimentario innovador, difundir su beneficio a todas luces, dada su relevancia en nuestra dieta, en la salud de nuestras familias y en sus evidentes aportaciones a la cultura y la economía de los mexicanos (Castañeda *et al.*, 2016).

XIII. LITERATURA CITADA

- Ashwell, A. (2008). Campesinos, la milpa y el maíz. *Elementos* 71: 19-23.
- AYDOĞDU, M., y GÖLÜKÇÜ, M. (2017). Nutritional value of huitlacoche, maize mushroom caused by *Ustilago maydis*. *Food Science and Technology* 37(4): 531-535.
- Banuett, F. y I. Herskowitz. (1988). *Ustilago maydis*, smut of maize. *Advances in Plant Pathology* 6.
- Banuett, F. y Herskowitz. I. (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* 122: 2965-2976.
- Bolívar, F. (2004). Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna. UNAM, México.
- Borok B., Ondos S., Vaculík M., Bokorová S., Weidinger M., Lichtscheid y Turn J. (2017). Expression of Genes for Si Uptake, Accumulation, and Correlation of Si with Other Elements in Ionome of Maize Kernel. *Frontiers in Plant Science* 8: 1063.
- Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A., y Kahmann, R. (2009). *Ustilago maydis* as a pathogen. *Annual Review of Phytopathology*, 47: 423-445.
- Buller, A. H. R. (1914). The fungus lore of the Greeks and Romans. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 5 21-66.
- Bourges, H. (2013). El maíz en peligro ante los transgénicos, un análisis integral sobre el caso de México. Capítulo 7, El maíz: su importancia en la alimentación de la población mexicana. UNAM.
- Carlile, M., Watkinson, S. y G. Gooday. (2001). *The Fungi*. Academic press. Second Edition.
- Castañeda de León, V., Martínez-Carrera, D., Morales, P., Sobal, M., Gil, A. y Leal, H. (2016). El huitlacoche, producto de la interacción *Ustilago maydis*- maíz, una aportación de México al mundo en el sistema agroalimentario microbiano. En: *Ciencia, Tecnología e Innovación en el Sistema Agroalimentario de Mexico* (Editores: D. Martínez-Carrera y J. Ramírez). Pp.193-222. Colegio de Postgraduados-AMC-CONACYT-UPAEP-IMINAP, San Luis Huexotla, Texcoco, México.
- Chang, S., y P. Miles. (1984). A New Look at Cultivated Mushrooms. *BioScience* 34 (6): 358-362.
- Chichester. <http://www.els.net>.
- Christensen, J. J. (1931). Studies on the genetics of *Ustilago zaeae*. *Phytopath. Z.* 4: 129-188.
- Claypool, L., y R. Keefer. (1942). A colorimetric method for CO₂ determination in respiration studies. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sd.* 40:177-86.
- Cooke, B. (1958). The ecology of the fungi. *The Botanical Review* 24(6): 341-429.

- Diethart B. (2005). *Zea mays*. In: PalDat - A palynological database. https://www.paldat.org/pub/Zea_mays/103254; accessed 2018-10-26.
- FAO.1993. El maíz y la nutrición humana. Paredes, O., Guevara, F. y L. Bello. (2006). Los Alimentos Mágicos de las Culturas Indígenas Mesoamericanas. Fondo de Cultura Económica- Serie Ciencia para Todos. México, DF. 205 pp. ISBN 968-16- 7567-3.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. (2015). FAOStat: crops. Rome: FAO. Retrieved from <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>.
- Guzmán, G. (1985). El uso de los hongos en Mesoamérica. *Ciencia y Desarrollo* 59: 17-27.
- Haskins, R. (1950). Biochemistry of the Ustilaginales. I. Preliminary cultural studies of *Ustilago zaeae*. *Can. J. Res.* 28C: 213.
- Haskins, R. y J. Thorn. (1951). Biochemistry of the Ustilaginales. VII. Antibiotic activity of *Ustilago acid*. *Can. J. Bot.* 29: 585.
- Holmes, C., Cahill, G., Smart, K. y D. Cook. (2013). The composition and ultrastructure of sorghum spent grains. *J. Inst. Brew* 119: 41–47.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.-J., Brefort, T. Saville, B. J., Banuett, F. Kronstad, J.W., Gold, S.E., Müller, O., Perlin, M.H., Wösten, H.A.B., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Peña, C.G., Snetselaar, K., McCann, M., Pérez-Martín, J. Feldbrügge, M., Basse, C.W., Steinberg, G., Ibeas, J.I., Holloman, W., Guzman, P., Farman, M., Stajich, J.E., Sentandreu, R., González-Prieto, J.M., Kennell, J.C., Molina, L., Schirawski, J., Mendoza-Mendoza, A., Greilinger, D., Münch, K., Rössel, N., Scherer, M., Vraneš, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandrock, B., Meng, S., Ho, E.C.H., Cahill, M.J., Boyce, K.J., Klose, J., Klosterman, S.J., Deelstra, H.J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P.H., Häuser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopmann, E., Friedrich, G., Voss, H., Schlüter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Güldener, U., Münsterkötter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes, H.-W., Mauceli, E.W., DeCaprio, D., Wade, C.M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D.B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J., Birren, B.W. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 444: 97-101.
- Kato, T. A., Orega, R., Boege, E., Wegier, A., Serratos J., Alavez, V., Jardón-Barbolla, L., Moyers, L. y D. Ortega. (2013). El maíz en peligro ante los transgénicos, un análisis integral sobre el caso de México. Capítulo 1, origen y diversidad del maíz. UNAM.
- Kato, T. A., Mapes, C., Mera, L., Serratos, J. y R. Bye. (2009). Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Kato, T. A. (1984). Chromosome morphology and the origin of maize and its races. *Evol. Biol.* 17: 219-253.
- Kato Yamakake, T. A. (2008). Teorías sobre el origen del maíz. Informes del proyecto global “Recopilación, generación, actualización y análisis de información

- acerca de la diversidad genética de maíces y sus parientes silvestres en México". Proyecto Global de Maíces Nativos. CIBIOGEM CIBIOGEM/EX/02/2006-05.
- Kendrick, B. (2011). *Fungi and the History of Mycology in: eLS*. John Wiley y Sons Ltd,
- Leroux, B., Goodyke, A., Schumacher, K., Abbott, C., Clore, A., Yadegari, R., Larkins, B. y J. Dannenhoffer. (2014). Maize early endosperm growth and development: from fertilization through cell type differentiation. *American Journal of Botany* 101(8): 1259–1274.
- Lhote, H. (1973). *A la découverte des fresques du Tassili*. Arthaud, Paris 261 pp. 28: 1103-1105.
- López, E., Pérez, A., Acosta, M., Ochoa, M. y Rojas, R. (2017). Factores físicos y microbiológicos en el deterioro del huitlacoche en poscosecha. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8 (3): 545-558.
- Martínez-Carrera, D. y J. Ramírez. (2016). *Ciencia, Tecnología e Innovación en el Sistema Agroalimentario de México*. Editorial del Colegio de Postgraduados-AMC-CONACYT-UPAEP-IMINAP, San Luis Huexotla, Texcoco, México. 856 pp. 641-687.
- Martínez-Flores, A., Corrales-García, J., Espinosa-Solares, T., García-Gatica, P. y C. Villanueva-Verduzco. (2008). Cambios postcosecha del hongo comestible huitlacoche (*Ustilago maydis* (D. C.) Corda). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14(3): 339-346.
- Mattila, P., Könkö, K., Eurola, M., Pihlava, J.-M., Astola, J., Vahteristo, L., Hietaniemi, V., Kumpulainen, J., Valtonen, M. y Piironen, V., 2001. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2343–2348.
- Mayett, Y., Martínez-Carrera, D., Sobal, M., Morales, P. y Bonilla M. (2012). Mushroom prices and their effect on consumption: the case of Mexico. *Micología Aplicada Internacional* 24(1): 11-26.
- McClintock, B. (1978). Significance of chromosome constitutions in tracing the origin and migration of races of maize in the Americas. *In: D. B. Walden (Ed.), Maize Breeding and Genetics* (pp. 159-184). New York: John Wiley and Sons.
- Megías, M., Molist, P. y M. Pombal. (2016). *Atlas de Histología Vegetal y Animal, Técnicas histológicas* Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo.
- Müller, M., Katzberg, M., Bertau, M., y Hummel, W. (2010). Highly efficient and stereoselective biosynthesis of (2S,5S)-hexanediol with a dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Org Biomol Chem* 8(7): 1540-50.
- Murillo, E., Fernández, K., Viña, A., y Jairo, J. (2007). Actividad antioxidante *in vitro* y antimicrobial de extractos metanólicos de cuatro albahacas cultivadas en Ibagué. *Revista Tumbaga* 2: 72-84.
- Paliwal R., Granados G., Laffitte H., y Violic A. (2001). *El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción*. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Roma.

- Pataky, J. (1991). Production of huitlacoche, *Ustilago maydis*, on corn smut. *HortScience* 26: 1374-1377.
- Pataky, J. y K. M. Snetselaar. (2006). Common smut of corn. *The Plant Health Instructor*.
- Paredes-López O., Guevara-Lara F., y Bello-Pérez L. A. (2006). Capítulo VIII El huitlacoche: exquisitez culinaria mexicana con altas propiedades nutraceuticas. En O. Paredes-López, F. Guevara-Lara, y L. A. Bello-Pérez (Eds.). Los Alimentos Mágicos de las Culturas Indígenas Mesoamericana. Primera edición. México, D. F.: Fondo de Cultura Económica. (p: 75).
- Pimentel-González, D., Rodríguez-Huezo, M., Campos-Montiel, R. Trapala-Islas, A. y Hernández-Fuentes A. (2011). Influencia de la variedad de maíz en las características fisicoquímicas del huitlacoche (*Ustilago maydis*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10(2): 171-178.
- Pope, D. y S. McCarter. (1992). Evaluation of inoculation methods for inducing common smut on corn ears. *Phytopathology* 82: 950-955.
- Pratt, H. y D. Mendoza. (1979). Colorimetric determination of carbon dioxide for respiration studies. *HortScience* 14: 175-176.
- Rajesh, K., Dhanasekaran, D. y A. Panneerselvam. (2014). Isolation and taxonomic characterization of medicinal mushroom *Ganoderma* spp. *Journal of Microbiology Research* 2(2): 61-70.
- Reis, F. S., Barros, L., Martins, A., y Ferreira, I. C. (2012). Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study. *Food and Chemical Toxicology* 50(2): 191-197.
- Ruzin SE. (1999). Plant microtechnique and microscopy. Oxford, New York: Oxford University Press. 322p.
- Saville, B., Donaldson, M., Doyle C. 2012. Investigating Host Induced Meiosis in a Fungal Plant Pathogen. *Meiosis - Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity*.
- Saville, B., Donaldson, M., y Doyle, C. (2012). Investigating Host Induced Meiosis in a Fungal Plant Pathogen. *Meiosis - Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity*.
- Sleumer, H. O. (1932). Über Sexualität und Zytologie von *Ustilago zae* (Beckm.) Unger. *Zeitsch. Bot.* 14: 210-263.
- Stakman, E., Christensen, J., Eide, C. y B. Peterson. (1929). Mutation and hybridization in *Ustilago zae*. *Minnesota. Agric. Exp. Stn. Tech. Bull.* 65 (1).
- Tosi A. 2012. Nixtamalización de variedades locales seleccionadas de maíz y aplicación a recetas tradicionales y de autor. Universidad de Cuenca.
- Thakur, R., Leonard, K. y J. Pataky. (1989). Smut gall development in adult corn plants inoculated with *Ustilago maydis*. *Plant Disease* 73: 921-925.
- Thompson, P. (2007). Food biotechnology in ethical perspective. Springer, Michigan State University, East Lansing, MI, USA.
- Valadez Azua, R., A. Moreno y G. Gómez. (2011). Cujtlacoche: El Huitlacoche. UNAM, Instituto de Investigaciones Antropológicas, México, D.F. 150 pp.

- Valdez-Morales, M., Carlos, L. C., Valverde, M. E., Ramírez-Chávez, E. y Paredes-López, O. (2016). Phenolic Compounds, Antioxidant Activity and Lipid Profile of Huitlacoche Mushroom (*Ustilago maydis*) Produced in Several Maize Genotypes at Different Stages of Development. *Plant Foods for Human Nutrition* 71(4): 436-443.
- Valverde-González, M. (1992). Estudios Sobre la Infección de *Ustilago maydis* (Huitlacoche) y sus Características Alimentarias. Tesis de Maestría, CINVESTAV-IPN, Irapuato, México.
- Valverde, M. y O. Paredes-López. (1993). Production and evaluation of some food properties of huitlacoche (*Ustilago maydis*). *Food Biotechnology* 7(3): 207-219.
- Valverde, M., Paredes, O., Pataky, J. y F. Guevara-Lara. (1995). Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a food source biology, composition and production. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35: 191-229.
- Vanegas, P., Valverde, M., Paredes-López, O. y J. Pataky. (1995). Production of the edible fungus huitlacoche (*Ustilago maydis*). Effect of maize genotype on chemical composition. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 80: 11-14.
- Wasson, R. (1969). Soma-divine mushroom of immortality. Harcourt Brace Jovanovich, Inc., New York. 381 pp.

ANEXO A

Encuesta sobre conocimiento y usos del huitlacoche para la localidad de Puebla.

1.- Género

Mujer.

Hombre.

2.-Edad

3.- ¿Conoce el huitlacoche?

Si

No

4.- ¿Qué tan recurrente es su consumo de huitlacoche al mes?

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

5.-¿Cómo consume el huitlacoche?

6.- ¿Cuántos platillos que lleven huitlacoche conoce?

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

7.- ¿A sus hijos les gusta el huitlacoche?

Si

No

8.- ¿Estaría dispuesto a consumirlo todo el año?

Si

No

9.- ¿En cuántas ocasiones le gustaría consumir huitlacoche al mes?

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

10.- ¿Sabe dónde conseguirlo?

Si

No

11.- ¿Sabe si es bueno para la salud?

Si

No