



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRICOLAS

CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CARACTERIZACIÓN CLÁSICA Y MOLECULAR DEL HUITLACOCHÉ
[*Ustilago maydis* D.C. (Corda)], HONGO DE IMPORTANCIA SOCIAL Y
ECONÓMICA EN LA REGIÓN CENTRAL DE MÉXICO

MARÍA LETICIA CALDERÓN FERNÁNDEZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PUEBLA, PUE.

2010



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

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

CAMPUE- 43-2-03 ANEXO

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 **María Leticia Calderón Fernández** 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. José Hilario Hernández Salgado** por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Caracterización clásica y molecular de huitlacoche [*Ustilago maydis* D.C. (Corda)], hongo de importancia social y económica 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 o Director de Tesis y el 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 26 de noviembre de 2010.

Vo. Bo. Dr. José Hilario Hernández Salgado

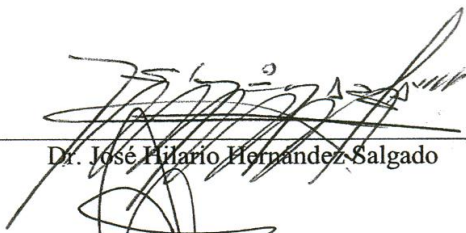
La presente tesis intitulada: **Caracterización clásica y molecular de huitlacoche [*Ustilago maydis* D.C. (Corda)], hongo de importancia social y económica en la región central de México**; realizada por la alumna: **María Leticia Calderón Fernández**; bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

**PROGRAMA EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO
AGRÍCOLA REGIONAL.**

CONSEJO PARTICULAR

Consejero




Dr. José Pilario Hernández Salgado

Asesor



Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera

Asesor



Dr. Antonio Macías López

Asesor



Dr. Miguel Sánchez Hernández

Asesor



Dr. Hermilo Leal Lara

Puebla, Pue., noviembre de 2010.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por hacer posible la continuación de mis estudios de postgrado.

Al Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla y a sus docentes por brindarme los conocimientos necesarios para llevar a cabo la presente investigación.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, a las autoridades de la Vicerrectoría de Docencia, y a los directivos de las dos administraciones que apoyaron mi superación académica.

A los miembros de mi Honorable Consejo:

Dr. José Hilario Hernández Salgado, por su apoyo, su asesoría y observaciones en la presente tesis.

Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera, Dr. Miguel Sánchez Hernández, Dr. Antonio Macías López, y Dr. Hermilo Leal Lara, quienes con sus conocimientos y guía en sus respectivas áreas, dieron realce al presente trabajo.

Al Dr. Porfirio Morales Almora por todo su apoyo metodológico y paciencia para la realización del trabajo de laboratorio.

A mis amigos y compañeros de generación, a quienes no quisiera nombrar a uno por uno por temor a omitir a alguno.

A mis grandes amigos del laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales: Rosy de Lima, Mir Bonilla, Paty Ramírez, Almis Tovar, Katy Reyes, Dany Sihuanca, Helios Escudero, Willy Martínez y Cuquis Martínez, por su amistad, comprensión y apoyo en todo momento, y de manera muy especial a Isaac Tello Salgado, quien además fue mi apoyo en varios aspectos durante la realización de este trabajo.

A mis padres: María del Carmen Fernández Fernández y Alejandro Calderón Grados.

Gracias por su ejemplo, sus enseñanzas, su apoyo y su amor incondicional.

A mis hermanas: Ale, Carmelita y Claudis.

Por ser mis amigas a lo largo de mi vida, por darme su cariño y comprensión, y por estar siempre a mi lado.

A mis cuñados y sobrinos: Raúl, Salvador, Oscar, Ale, Moni, Chava, Angel, Saúl, Ian y Enya.

Quienes como siempre han confiado en mí dándome su apoyo y cariño.

Al amor de toda mi vida, quien soportó ausencias y enfados, en varios momentos de esta parte tan importante de mi vida, quien a pesar de ser tan joven, es mi mejor amiga, compañera, y muchas veces, maestra. A ti mi amorcito, mi motivo de ser, mi todo... Karen.

A ti que lees esta tesis, esperando te sea de utilidad.

CARACTERIZACIÓN CLÁSICA Y MOLECULAR DEL HUITLACOCHÉ [*Ustilago maydis* D.C. (Corda)], HONGO DE IMPORTANCIA SOCIAL Y ECONÓMICA EN LA REGIÓN CENTRAL DE MÉXICO

María Leticia Calderón Fernández, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2010

RESUMEN

Las secuencias de ADNr han sido útiles para clasificar a muchos basidiomicetos, debido a que se pueden caracterizar en muchos niveles taxonómicos en base a sus regiones conservadas y variables. Tal es el caso de los *Ustilaginales*, los cuales tienen importancia por sus implicaciones económicas adversas, por lo que han sido estudiados mediante algunas de estas técnicas, especialmente con la región ITS del ADNr, ya que muestran diferencias a nivel de nucleótidos, permitiendo establecer la diversidad genética de hongos a nivel inter e intra-específico. En este contexto se tiene a *Ustilago maydis*, el cual es un hongo que infecta al maíz produciendo el “huitlacoche” o “carbón del maíz” del cual existen estudios limitados sobre sus características morfológicas y genéticas. Por lo que en esta investigación se realizó un estudio sobre la caracterización de más de 100 especímenes de huitlacoche y las cepas aisladas de éstas, obtenidas de 42 zonas geográficas de nueve estados de México (Chiapas, Guanajuato, Hidalgo, México, Morelos, Puebla, Querétaro, Tlaxcala, y Veracruz). Se determinó que existe correlación entre el origen con el índice de severidad y con la variedad de maíz, siendo los maíces blancos los más susceptibles. También se encontró correlación entre el color de las agallas con su textura y con su tamaño, ya que al ser más oscuras, son más blandas y grandes. Así mismo, se determinó la diversidad genética de 36 cepas mediante la región ITS del ADNr, encontrando que existe una significativa diversidad genética entre ellas (4.3%) por análisis de máxima parsimonia, lo que puede deberse a la existencia de poblaciones pertenecientes a subespecies, razas o biotipos de *U. maydis*.

Palabras clave: Diversidad genética, región ITS del ADNr, *Ustilago maydis*, recursos genéticos.

**CLASSICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF “HUITLACOCHÉ”
[*Ustilago maydis* D.C. (Corda)], A FUNGUS OF SOCIAL AND ECONOMIC
IMPORTANCE IN THE CENTRAL REGION OF MEXICO**

María Leticia Calderón Fernández, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2010

ABSTRACT

rDNA sequences have been useful to classify many *Basidiomycetes*, because they can be analysed on the basis of their conserved and variable regions. This is the case of *Ustilaginales*, which have negative economic impact on agriculture, and their inter- and intra-specific genetic diversity has been assessed through the nucleotide differences at the ITS region of the rDNA. In this context, *Ustilago maydis* is a fungus that infects corn producing the "huitlacoche" or corn smut, and there are limited studies on its morphological and genetic characteristics. In this research, more than 100 specimens and strains of "huitlacoche", obtained from 42 geographical areas of nine States of Mexico (Chiapas, Guanajuato, Hidalgo, México, Morelos, Puebla, Querétaro, Tlaxcala, and Veracruz), were characterized on the basis of morphology. A correlation was found between the origin and the rate of severity, as well as the variety of corn, white corn being the most susceptible. We also found a correlation between the color of the galls and its texture and size, darker galls are softer and bigger. A significant genetic diversity (4.3%) was found in 36 strains of *U. maydis* using the ITS region of the rDNA, through maximum parsimony analysis, suggesting the existence of populations belonging to subspecies, races or biotypes.

Key words: Genetic diversity, “huitlacoche”, ITS-rDNA region, *Ustilago maydis*, genetic resources.

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Importancia del huitlacoche [<i>Ustilago maydis</i> D.C. (Corda)] en México.	1
1.2 Planteamiento del problema y justificación del estudio en la caracterización de <i>Ustilago maydis</i> .	3
1.3 Hipótesis.	5
1.3.1 Hipótesis general.	5
1.3.2 Hipótesis particulares.	5
1.4 Objetivos.	6
1.4.1 Objetivo general.	6
1.4.2 Objetivos particulares.	6
II. MARCO CONCEPTUAL DE LA DIVERSIDAD DE <i>Ustilago maydis</i>	8
2.1 Sistemas de clasificación de los organismos.	8
2.2 Clasificación mediante características morfológicas y genéticas.	8
2.3 Diversidad genética y los factores que intervienen en ella.	9
2.4 La filogenia y sus herramientas.	13
2.4.1 Métodos de reconstrucción filogenética.	14
2.4.2 Importancia de la biología molecular.	15
2.4.3 Marcadores moleculares.	16
2.5 Diversidad genética de hongos.	19
2.6 <i>Ustilago maydis</i> .	21
2.6.1 El ciclo de vida de <i>U. maydis</i> .	21
2.6.2 Procesos de infección de <i>U. maydis</i> y de otros hongos fitopatógenos.	23
2.6.3 Mecanismos de defensa de las plantas contra hongos fitopatógenos.	25
2.6.4 <i>U. maydis</i> como modelo biológico.	26
2.7 Estudios de <i>U. maydis</i> mediante métodos moleculares.	28
2.7.1 Estudio del sistema <i>U. maydis</i> – maíz mediante métodos moleculares.	29
2.7.2 Estudios de <i>U. maydis</i> y otros hongos con ITS.	31
2.8 Diversidad genética de <i>U. maydis</i> .	33
2.9 El huitlacoche.	35
2.9.1 Historia del consumo del huitlacoche.	35
2.9.2 Propiedades nutritivas del huitlacoche.	38
2.9.3 Métodos de producción de huitlacoche.	39
III. MATERIALES Y MÉTODOS	42
3.1 Recolección de huitlacoche.	43
3.2 Caracterización fenotípica.	43
3.2.1 Caracterización de las teliosporas.	44
3.2.2 Obtención de progenie y conservación de esporidias.	44
3.2.3 Caracterización de esporidias.	45

3.2.4	Análisis estadístico de los datos de caracterización fenotípica.	45
3.3	Caracterización genética de las cepas aisladas de <i>U. maydis</i> .	45
3.3.1	Producción de biomasa.	45
3.3.2	Extracción de ADN.	46
3.3.3	Determinación de la calidad del ADN.	47
3.3.4	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	48
3.3.5	Purificación de los productos de PCR.	48
3.4	Secuenciación.	49
3.5	Alineación de secuencias.	50
3.6	Construcción de los árboles filogenéticos.	51
IV.	RESULTADOS	52
4.1	Caracterización del huitlacoche.	52
4.2	Caracterización de las teliosporas y esporidias	56
4.3	Análisis estadístico de los datos de caracterización fenotípica.	58
4.4	Evaluación de la diversidad genética.	60
V.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES	64
5.1	Caracterización fenotípica de huitlacoche.	64
5.2	Diversidad genética.	66
5.3	Conclusiones	72
VI.	RECOMENDACIONES	75
6.1	Recomendaciones generales.	75
6.2	Definiciones de estrategia.	75
6.3	Estrategia para crear una red nacional de generación de conocimiento sobre <i>U. maydis</i> .	77
6.3.1	Objetivos de la estrategia para crear una red nacional de generación de conocimiento sobre <i>U. maydis</i> .	77
6.3.1.1	Objetivo general de la estrategia.	78
6.3.1.2	Objetivos particulares de la estrategia.	78
6.3.2	Implementación de la estrategia para crear una red nacional de generación de conocimiento sobre <i>U. maydis</i> .	78
6.3.3	Beneficios esperados de la estrategia implementada para crear una red nacional de generación de conocimiento sobre <i>U. maydis</i> .	82
6.4	Estrategia para determinar un método sistemático para producir huitlacoche en los Valles Altos de Puebla para contribuir al desarrollo agrícola regional.	84
6.4.1	Objetivos de la estrategia para determinar un método sistemático para producir huitlacoche en los Valles Altos de Puebla para contribuir al desarrollo agrícola regional.	84
6.4.1.1	Objetivo general de la estrategia.	84
6.4.1.2	Objetivos particulares de la estrategia.	84
6.4.2	Implementación de la estrategia para determinar un método sistemático	85

para producir huitlacoche en los Valles Altos de Puebla para contribuir al desarrollo agrícola regional.	
6.4.3 Beneficios esperados de la estrategia implementada para determinar un método sistemático para producir huitlacoche en los Valles Altos de Puebla para contribuir al desarrollo agrícola regional.	87
6.5 Estrategia para aprovechar comercialmente el huitlacoche que se produce naturalmente por parte de comunidades rurales.	88
6.5.1 Bases para plantear la Estrategia para aprovechar comercialmente el huitlacoche que se produce naturalmente por parte de comunidades rurales.	88
6.5.1.1 Premisa I	
6.5.1.2 Premisa II	88
6.5.1.3 Premisa III	89
6.5.2 Pasos de la estrategia.	89
6.5.2.1 Creación de un equipo de diagnóstico especializado.	89
6.5.2.2 Selección de las localidades donde se obtenga una cantidad de huitlacoche significativa y más o menos constante.	90
6.5.2.3 Creación de un centro de acopio y distribución de huitlacoche regional.	90
6.5.2.4 Creación del Consejo Directivo.	92
6.5.3 Gestión de apoyos.	94
6.6 Beneficios esperados de la estrategia implementada para aprovechar comercialmente el huitlacoche que se produce naturalmente por parte de comunidades rurales.	94
 LITERATURA CITADA	 95
 ANEXO A. DATOS DE ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE <i>U. maydis</i>	 113
Anexo A1. Secuencias de ITS-4 de <i>Ustilago maydis</i> del centro del centro de México.	114
Anexo A2. Matriz de distancias del análisis filogenético.	126
 ANEXO B. DATOS DE LAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE LOS ESPECÍMENES DE HUITLACOCHES RECOLECTADOS	 128
Anexo B1. Formato de las características fenotípicas de los especímenes de huitlacoche recolectado.	129
Anexo B2. Registros de los datos de las características fenotípicas de los especímenes de huitlacoche recolectado.	130
Anexo B3. Fotografías de mazorcas de huitlacoche recolectadas en el centro de México.	150

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 3.1 Diagrama de flujo de la metodología desarrollada.	42
Figura 3.2 Gel de agarosa de algunas cepas de <i>U. maydis</i> aisladas para determinar la cantidad y calidad del ADN extraído.	47
Figura 3.3 Gel de agarosa de algunas cepas de <i>U. maydis</i> aisladas para determinar los productos de PCR.	49
Figura 3.4 Gel de agarosa de algunas cepas de <i>U. maydis</i> aisladas para determinar los productos purificados de PCR.	50
Figura 4.1 Árbol Consenso por MP de cepas propias, cepas externas de <i>U. maydis</i> , algunos <i>Ustilagos</i> y grupos externos (<i>S. sorghi</i> y <i>P. caricina</i>) y su relación con las características fenotípicas	63

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 2.1 Características morfológicas de <i>U. maydis</i> documentadas por Christensen (1963).	34
Tabla 4.1 Distribución geográfica de los especímenes de huitlacoche recolectados en cada estado de México.	53
Tabla 4.2 Distribución geográfica de los especímenes de huitlacoche recolectados en cada localidad de cada estado.	53
Tabla 4.3 Relación de la cantidad de especímenes de huitlacoche obtenidos de acuerdo a la fuente de adquisición.	54
Tabla 4.4 Relación de la forma en que se presenta el huitlacoche en los especímenes recolectados en cada estado.	54
Tabla 4.5 Relación de la variedad de maíz en que se presenta el huitlacoche en los especímenes recolectados en cada estado.	54
Tabla 4.6 Relación del índice de severidad con que se obtuvieron los especímenes de huitlacoche en cada estado.	55
Tabla 4.7 Relación del índice de severidad de los especímenes de huitlacoche y la variedad de maíz.	55
Tabla 4.8 Relación del número de especímenes de huitlacoche de acuerdo al índice de severidad, estado de procedencia y variedad de maíz.	56
Tabla 4.9 Características de la mayoría de las agallas de las mazorcas frescas recolectadas.	56
Tabla 4.10 Dimensiones de las teliosporas de las agallas analizadas.	57
Tabla 4.11 Dimensiones de las esporidias de las cepas analizadas.	58
Tabla 4.12 Correlación entre el estado de procedencia del huitlacoche recolectado y el índice de severidad presentado en ellos.	59
Tabla 4.13 Correlación entre el estado de procedencia del huitlacoche recolectado y la variedad de maíz donde se presentó.	59
Tabla 4.14 Correlación entre el color y la textura de las agallas del huitlacoche recolectado.	59
Tabla 4.15 Correlación entre el tamaño y la textura de las agallas del huitlacoche recolectado.	60
Tabla 4.16 Cepas secuenciadas de algunas zonas geográficas del centro de México.	61
Tabla 4.17 Secuencias de grupos externos y de otros <i>Ustilagos</i> y otros <i>U. maydis</i> para comparación.	62

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia del huitlacoche [*Ustilago maydis* D.C. (Corda)] en México.

Los carbones, tizonos o royas son hongos conformados por aproximadamente 1,200 especies que pertenecen al orden de los *Ustilaginales*, caracterizados por producir enfermedades a angiospermas causando significativas pérdidas agrícolas en el mundo. Uno de los miembros más importantes de estos es *Ustilago maydis* D.C. (Corda), el cual infecta exclusivamente al maíz (*Zea mays*) y a su antecesor el teosinte (*Zea mays ssp. parviglumis*), de ahí su nombre, “carbón del maíz”, aunque en México es mejor conocido como huitlacoche o cuitlacoche.

El huitlacoche se ha consumido en México desde la época prehispánica debido a su sabor exquisito, sin embargo, su consumo era exclusivo para los emperadores ya que era considerado un manjar. Debido a su sabor único, el consumo de huitlacoche va en aumento, ya que tiene una gran demanda en Europa, Japón y Estados Unidos, principalmente. También se ha considerado como uno de los platillos de la alta cocina internacional, y de la “nueva cocina mexicana”, debido a que es utilizado por chefs prestigiados en restaurantes exclusivos, preparando sopas, cremas, omelettes, budines, mousse; relleno de crepas, chiles poblanos, pechugas de pollo, ternera, escalopas de cerdo y filete de pescado; y salsas para acompañar otros platillos. Por ello se le ha reconocido como exquisitez culinaria en diversos periódicos y revistas como “Le Monde”, “New York Magazine”, “Playboy”, “Country Living”, “Bon Appétit”, “Vogue”, “The Egyptian Gazette”, y otras (González- Alamillo, 2010; Jiménez de León, 2007).

Esto ha provocado que se realicen una variedad de estudios respecto a este producto, por ejemplo, se ha determinado sus propiedades nutricionales por varios autores, entre ellos, Valverde y Paredes- López (1993), Venegas *et al.* (1995), Valverde *et al.* (1995), Paredes- López (2000), y Castro-Espinoza y Ruiz- Hernández (2003), quienes han reportado datos dentro de rangos similares y complementarios acerca de su composición proximal en base seca, mostrando que la cantidad de proteínas es moderada (1.62 a 16.4 %), el contenido de hidratos de carbono y fibra es alto (53 a 66.5 % y 7.5 a 26.6 %, respectivamente), mientras que el de grasas es bajo (1.0 a 6.5 %), contiene aminoácidos esenciales como la lisina, glicina, valina, leucina, y ácido glutámico, así como otros catorce aminoácidos comunes, y otros no comunes como el ácido γ -aminobutírico, ornitina, y el ácido tricotómico (Lizarraga-Guerra y López, 1996). Su contenido

de ácidos grasos es elevado, siendo los predominantes el palmítico, el oléico y el linoléico (Gunasekaran, 1972; Valverde y Paredes- López, 1993; Venegas *et al.*, 1995). También contiene monosacáridos, siendo los más abundantes la glucosa, la fructosa, el glicerol, el sorbitol, y el manitol (Lizarraga-Guerra y López, 1998). Además contiene cantidades considerables de polifenoles, β -glucanos, azúcares libres, y compuestos antioxidantes tales como lacasas y tirosinasas, las cuales tienen efectos antioxidantes sobre *p*- hidroxifenoles *in vitro* (Desentis-Mendoza *et al.*, 2006) y que lo hacen un alimento nutracéutico. Así mismo contiene niveles adecuados de vitaminas (tiamina, biotina, riboflavina, niacina, ácido fólico y ácido ascórbico) y minerales como calcio, nitrógeno, fósforo (Paredes- López y Valverde, 2006; Castro- Espinoza y Ruiz- Hernández, 2003), y oligoelementos como el cromo, cobre, hierro, manganeso, níquel y plomo (Serafín-Muñoz *et al.*, 2005).

Por estas razones, el huitlacoche ha llegado a alcanzar un precio en el mercado de Estados Unidos hasta 20 USD/ Kg, como producto congelado, aunque como producto fresco se comercializa a 11.16 USD\$/ Kg y 3.5 USD\$/ mazorca. Sin embargo, la producción natural o espontánea es insuficiente para el mercado, ya que en la época de mayor oferta, que es en los meses de Julio y Agosto, se comercializan entre 300 a 500 toneladas de producto fresco por año en los mercados de la ciudad de México (Kealey y Kosikowski, 1981, citado en Villanueva, 1997). Por ello, los productores de maíz y los investigadores han intentado algunas técnicas para inducir la infección, evaluando cepas nativas, mezclas de ellas y hasta cruces altamente infectivas, cantidad de inóculo, forma y época de aplicación del inóculo, las condiciones ambientales, etc., tanto a campo abierto como en invernadero, para producir el mayor porcentaje de incidencia (número de plantas infectadas entre el número de plantas inoculadas, y el mayor índice de severidad (porcentaje del área de la mazorca cubierta con agallas) en las mazorcas inoculadas (Villanueva, 1997).

En el año de 1963 Christensen reportó un amplio trabajo sobre la diversidad fenotípica de *U. maydis*, el cual presentó la diversidad de las diferentes estructuras formadas en su ciclo de vida, es decir, en las formas, colores, tamaños, texturas y número de las teliosporas, esporidias, micelio y agallas. La diversidad de cada una de ellas se debe a que *U. maydis* se desarrolla de diferente forma dependiendo del sustrato (parte de la planta, variedad de maíz, o medio de cultivo artificial), y de las condiciones de desarrollo (agroecológicas en el campo o de cultivo en el laboratorio). Dicha diversidad es amplia si se toma en cuenta que sólo se desarrolla

naturalmente en sustratos específicos como el teocintle (*Zea mexicana*), el teosinte (*Euchlaena mexicana*), y el maíz (*Zea mays*), y de que en este último, sólo se desarrolla en algunas variedades, siendo las dulces las más susceptibles. En este trabajo Christensen muestra una recopilación muy extensa sobre las características fenotípicas de *U. maydis*, reconociendo que desde entonces, ya existía un número indefinido de biotipos nativos, tanto haploides como diploides, además de los nuevos obtenidos por hibridación y mutación, existiendo hasta 1954, 15,000 diferentes biotipos según Rowell y DeVay (1954, citado en Christensen, 1963). En dicho documento se incluyen cepas de diferentes países, sin embargo, ninguno que involucrara a las de México. Después de esa fecha y hasta la actualidad, no se han reportado trabajos sobre este tema.

Por otra parte, en los últimos años se ha logrado establecer sistemas taxonómicos fiables mediante las herramientas desarrolladas por la biología molecular. Tal es el caso de la filogenómica, la cual es una poderosa herramienta para identificar el linaje de organismos gracias a la disponibilidad de los genomas completos de muchos de ellos, lo cual es posible aún cuando no se cuente con datos completos del patrón estudiado. También se ha logrado determinar, entre otros aspectos, la diversidad genética entre las especies y sus relaciones, la cual ha sido determinada de forma confiable mediante el uso de marcadores moleculares, principalmente los fragmentos de restricción polimórficos (RFLP), el ADN polimórfico amplificado al Azar (RAPD), las secuencias simples repetidas (SSR), y los espaciadores internos transcritos (ITS). Por ello, los datos obtenidos mediante estas técnicas moleculares, han podido ayudar a una mejor comprensión de la sistemática morfológica cuando la variación de estos datos es limitada y la homología de estos caracteres no es clara. En el caso de *U. maydis* existe una aportación significativa de las técnicas moleculares hacia el conocimiento de éste, ya que probablemente es el hongo fitopatógeno que más se ha sujetado a análisis experimentales, sirviendo como un modelo primario (Hu *et al.*, 2007) y genético por más de cuarenta años (Holliday, 2004).

1.2 Planteamiento del problema y justificación del estudio en la caracterización de *Ustilago maydis*.

A pesar de las propiedades y avances mencionados sobre el huitlacoche (*U. maydis*), y de que éste representa no tan sólo una fuente de alimento, sino de generación de recursos

económicos en las regiones productoras de maíz del centro del país. En México no existen estudios sobre su caracterización clásica, y sólo se tienen estudios escasos sobre sus características genéticas. Así mismo, los estudios de su diversidad genética mediante técnicas moleculares en México han sido limitados, ya que por un lado, sólo se ha trabajado con un pequeño número de cepas, algunas que no son de México, y por otro, sólo se han tratado con una sola técnica, los RFLP. Como por ejemplo, el trabajo realizado por Zambino *et al.*, (1997), quienes trabajaron con muestras de *U. maydis* de cuatro lugares de Minesota, mediante la técnica de RFLP; demostrando que existe una alta diversidad del locus de apareamiento *b* dentro de las poblaciones, pero niveles muy bajos de diferenciación entre las poblaciones, y que los tipos de acoplamiento fueron encontrados a través de las distancias geográficas amplias. Un trabajo similar en México, fue realizado por Valverde *et al.* (2000), donde se estudiaron 30 cepas nativas de *U. maydis* pertenecientes a cinco diferentes lugares de México (Irapuato, Toluca y Pachuca, Oaxaca, y Culiacán) mediante RFLP; determinando que la población de Irapuato fue la más divergente, mientras que las de Oaxaca y Pachuca están muy relacionadas; sin embargo, no se encontró correlación entre las distancias genéticas y geográficas entre estas cepas, es decir, que se determinó que existe diversidad genética considerable dentro y entre ellas.

Con base a lo anterior, las preguntas centrales del problema de investigación en el presente estudio fueron:

¿Qué nivel de diversidad genética existirá en cepas de *U. maydis* provenientes de diferentes zonas geográficas del centro de México?

¿La diversidad genética existente en cepas de *U. maydis* provenientes de diferentes zonas geográficas del centro de México se puede identificar satisfactoriamente mediante la región ITS del ADNr?

¿Los datos de diversidad fenotípica y genética de *U. maydis* tendrán alguna relación?

Dado que en México no se cuenta con estudios documentados acerca de las características fenotípicas de huitlacoche y de las diversas estructuras formadas en el ciclo de desarrollo de *U. maydis*, y que sólo se cuenta con estudios limitados acerca de la diversidad genética de este hongo, con el presente estudio se podrá tener una base de datos con las características principales del huitlacoche de diferentes zonas geográficas del centro de México, las cuales se puedan relacionar con las características genéticas para generar mayor conocimiento acerca de este hongo, ya que el entendimiento de la diversidad genética es necesario para

estudiar las poblaciones a partir de su estructura genética con el fin de aplicarse en programas de mejoramiento.

De igual forma dichas cepas se conservarán en el Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla, para que en un futuro, este material y mediante los resultados obtenidos en la presente investigación, proporcionen información genética básica que pueda servir para orientar y fortalecer los estudios respecto a este hongo, como por ejemplo, la selección de cepas de *U. maydis*, las cuales sirvan para generar programas de investigación y desarrollo de estrategias de mejoramiento genético, y por lo tanto de la producción de huitlacoche en México y principalmente en Puebla, con lo cual a su vez, se logre tener un mayor aprovechamiento de este producto que genere recursos económicos y además colaboren en la conservación de estos materiales al igual que han mantenido sus sistemas tradicionales agrícolas con lo que han logrado aprovechar los recursos genéticos.

1.2 Hipótesis.

La presente investigación se basó en encontrar respuesta al planteamiento de las siguientes hipótesis.

1.2.1 Hipótesis general.

Dado que México es el centro de origen del maíz, y de que éste presenta una gran diversidad en sus variedades nativas, es de esperarse que las poblaciones nativas de huitlacoche (*U. maydis*) provenientes de diferentes zonas geográficas del centro de México presenten diversidad genética a nivel de subespecies, razas o biotipos, la cual puede presentar relación con algunas características fenotípicas.

1.3.2 Hipótesis particulares

- a) Las cepas de las poblaciones nativas de huitlacoche (*U. maydis*) provenientes de diferentes zonas geográficas del centro de México presentan diversidad genética a nivel de subespecies, razas o biotipos.
- b) El índice de severidad presente en cada espécimen de huitlacoche está relacionado con la variedad de maíz.

- c) El índice de severidad presente en cada espécimen de huitlacoche está relacionado con su procedencia.
- d) El índice de severidad presente en cada espécimen de huitlacoche está relacionado con las características fenotípicas de las agallas como el tamaño, color y textura.
- e) El índice de severidad presente en cada espécimen de huitlacoche está relacionado con las características fenotípicas de las teliosporas y las esporidias.
- f) El lugar de procedencia donde se desarrolla el huitlacoche está relacionado con la variedad de maíz.
- g) Las características fenotípicas de los especímenes de huitlacoche tienen relación con su diversidad genética.

1.3 Objetivos.

En base a lo mencionadas en el apartado anterior, en el presente trabajo se analizaron cepas de huitlacoche (*U. maydis*) nativas de diferentes zonas geográficas del centro de México mediante la región ITS del ADNr y algunas variables fenotípicas, para lo cual se plantearon los siguientes objetivos:

1.3.1 Objetivo general.

Determinar la diversidad fenotípica y genética del huitlacoche (*U. maydis*) de diferentes zonas geográficas del centro de México para conocer la relación filogenética entre sus poblaciones.

1.3.2 Objetivos particulares

a) Generar una base de datos sobre las características fenotípicas de huitlacoche de diferentes zonas geográficas del centro de México para identificar y seleccionar maíces y mazorcas de huitlacoche que contengan más características productivas y comerciales.

b) Sistematizar y analizar estadísticamente las características fenotípicas de huitlacoche (*U. maydis*) para establecer relaciones entre ellas que sirvan de base para su aprovechamiento en áreas productoras de maíz del centro y sur del país.

c) Determinar la diversidad genética que existe en poblaciones de *U. maydis* aisladas en diferentes zonas geográficas del centro de México mediante el análisis de la región ITS del ADNr.

d) Generar e identificar una colección de cepas de *U. maydis* que sirvan de base para diseñar estrategias de aprovechamiento en áreas productoras de maíz del centro y sur del país.

II. MARCO CONCEPTUAL DE LA DIVERSIDAD DE *Ustilago maydis*

2.1 Sistemas de clasificación de los organismos.

Dada la gran variedad de organismos en la Tierra, desde la época primitiva el ser humano siempre ha tratado de clasificar a los seres vivos, basándose en sus semejanzas y diferencias. Siendo Aristóteles el primero en establecer un sistema de clasificación, dividiendo a los seres vivos en reino animal y reino vegetal. Mientras que Teofrasto clasificó a las plantas de acuerdo a su forma de crecimiento y basado en similitud de estructuras, teniendo tres formas: árboles, arbustos y hierbas. Dos mil años después, en los siglos XVI y XVII los científicos clasificaron a las plantas y animales de acuerdo a sus características estructurales y su valor medicinal.

A inicios del siglo XVIII Carlos Linneo asignó a cada organismo en una categoría grande, el reino, y a cada una de estas categorías las dividió en otras más pequeñas, el género y la especie, donde entre más pequeño era el grupo, eran más parecidos los miembros que lo conformaban.

2.2 Clasificación mediante características morfológicas y genéticas.

El sistema de Linneo se basó sólo en las similitudes de la estructura externa, es decir, en sus características morfológicas o fenotípicas. Actualmente esta clasificación sirve de base o para complementar estudios genéticos.

Para clasificar a los organismos morfológicamente, primero se estudia la estructura general del organismo en estudio, y después se trata de encontrar estructuras, formas, colores, tamaños, formas y/o estructuras de reproducción, y otras características homólogas.

En base a lo anterior, el concepto del árbol de la vida de Darwin establecido en el año de 1840, estuvo sustentado en la comparación de las características que se diagnosticaban sobre la morfología de los organismos, convirtiéndose en la base de la sistemática de los taxones. Sin embargo, estos caracteres son incoherentes e inestables, ya que están fuertemente influenciadas por las condiciones ambientales, además de que son insuficientes para resolver la sistemática taxonómica y las relaciones evolutivas.

La taxonomía se basa en el estudio de las relaciones evolutivas, por lo que una especie está basada en su la historia evolutiva. Para ello, primero se estudia la estructura general de dicho organismo buscando estructuras homólogas, es decir, aquellas que tienen una similitud básica, las cuales también se han desarrollado en otros organismos con un antecesor común. Así mismo, se estudia el ciclo de vida del organismo en estudio para encontrar un parecido embriológico con otros organismos. Y si se tiene algún registro fósil, se determinan las relaciones con otros organismos a través del tiempo.

Lo más usual es determinar el grado de parecido, el tipo y secuencia de aminoácidos en proteínas similares en la especie a estudiar en relación con otras parecidas, o bien el parecido genético entre los cromosomas, mediante la comparación de segmentos de ADN o ARN. Para lo cual se han desarrollado diversas técnicas de biología molecular, que han permitido realizar análisis filogenéticos basados en la conservación de las secuencias de algunas moléculas, principalmente el ARN ribosómico (ARNr) (Konnin, 2009; Petersen y Hughes, 1999).

2.3 Diversidad genética y los factores que intervienen en ella.

A partir de 1859, con la publicación del libro “El origen de las especies” de Charles Darwin, el concepto de la formación de nuevas especies ha sido la base para explicar la teoría de la evolución, la cual da como resultado a la biodiversidad en función de diferentes factores como se verá a continuación.

La **variabilidad genética** es la base del proceso genético, ya que es la habilidad genética para variar, lo que implica que se debe tener la capacidad para responder a variaciones ambientales y a cambios en los objetivos de selección (Rochambeau *et al.*, 2000). En general, se tienen dos tipos de variabilidad genética, la continua y la discontinua. La variabilidad continua se presenta cuando en una especie determinada, las diferencias entre sus individuos son graduales y son provocadas por el ambiente que afectan solamente al fenotipo y por ello, no son heredables (Burd, 2009). Mientras que la discontinua o mutación, es brusca y no se debe a cuestiones de herencia, es decir, es espontánea y se da en el seno de una población (Reeve y Sherman, 2009). Se puede concluir entonces, que la variación es la materia prima donde la selección actúa, y que el resultado de estos dos proceso es la evolución, por lo que la variación hereditaria es el resultado de la mutación, del paso de material genético entre poblaciones y la recombinación de factores genéticos junto con la selección que moldea el patrón de la variación (Ayala *et al.*, 2000;

Barton y Keightley, 2002; Reznick, 2009). En el caso de las poblaciones, la diversidad genética se incrementa por la reproducción, tanto sexual como asexual o su combinación, produciendo nuevas combinaciones genéticas (Wolfe y McDermott, 1994; McDonald *et al.*, 1995).

La variabilidad genética de una población depende de diferentes factores, tales como la selección, la recombinación sexual y parasexual, la mutación, y la fluctuación genética, entre otros. En el caso de los hongos fitopatógenos, la variabilidad genética es muy común, los cuales dependen de un proceso de mutación y recombinación.

La **selección natural o coevolución**, se refiere a los cambios genéticos recíprocos que ocurren en dos o más especies que interactúan ecológicamente. Ésta es el resultado de la reproducción diferencial de unas variantes con respecto a otras, y actúa sobre los dos factores principales de la variabilidad genética - la mutación y la recombinación-. Esto hace posible que sobrevivan individuos que interactúan más eficientemente con el medio ambiente. De forma más explícita, es el producto obtenido debido a la variación fenotípica entre los individuos de una población, a la supervivencia o reproducción diferencial asociada a la variación, y a la herencia de la variación (Reznick, 2009; Mitton, 2009).

La **recombinación** es el proceso por el cual una hebra de material genético, ya sea ADN o ARN, se rompe y después se une a otra molécula de ADN o ARN diferente. En forma natural ésta se lleva a cabo en eucariotas, durante la meiosis mediante el entrecruzamiento cromosómico entre los cromosomas apareados. Este proceso conduce a que la progenie tenga diferentes combinaciones de genes de sus padres y pueda producir alelos quiméricos. Este proceso también influye en la variabilidad genética, la cual, para organismos fitopatógenos, ocurre a través de procesos de hibridación somática, donde se intercambia el material nuclear y el citoplasmático, los cuales generan el aumento de la diversidad genotípica en poblaciones de patógenos (Ellingboe, 1961).

La **migración de genes** se produce cuando llegan individuos a una población que causan el movimiento de genes (flujo genético) hacia dentro o fuera de la población (Mousseau y Olvido, 2009). Dentro de las especies, el flujo de genes entre poblaciones suplementa la mutación y la recombinación, esparciéndose desde un área a otra. El flujo de genes tal vez es el más simple debido a que contribuye a una diversidad de baja estimación.

La **mutación** es un proceso genético fundamental y es la fuente principal de las nuevas variaciones genéticas, por lo que gracias a ellas, es posible el proceso evolutivo de la vida

(Harrison, 2009). Según De Vries en su obra “Die mutations theorie” concluyó que gran parte de la evolución se debe a los cambios discretos repentinos llamados mutaciones, las cuales son alteraciones espontáneas del material hereditario (Grant y Shoemaker, 2009). Sin embargo, actualmente se sabe que estos cambios repentinos no son debido a las mutaciones, sino a la redistribución de la variación genética producida por la recombinación (Johnston, 2009). La mutación contribuye a la diversidad efectiva de poblaciones, la cual es afectada por el coeficiente de mutación, el nivel ploide de la población, y el tamaño de la población. La mutación espontánea es un recurso poderoso para la variación en muchas poblaciones de patógenos.

La **deriva genética** se da cuando se presentan eventos producidos al azar que provocan cambios en sus frecuencias génicas que cambian drásticamente el pool génico, y también cuando se presenta una variación en la frecuencia de un gen en generaciones sucesivas (Hastings, 2009; Ayala *et al.*, 2000).

La **especiación** es la formación de dos o más nuevas especies de una especie ancestral, y es la responsable de la gran cantidad de diversidad biológica actual. Las especies difieren en su número y forma de cromosomas, así como en la fisiología, anatomía y genética. Las especies pueden surgir por dos mecanismos: la anagénesis y la cladogénesis.

La anagénesis o evolución filética se trata de un proceso de evolución progresiva de las especies, la cual implica un cambio en la frecuencia genética de toda la población. De manera que cuando en una población existen mutaciones suficientes para que tenga diferencias significativas con la población ancestral, entonces se tiene una nueva especie, y la población ancestral puede considerarse extinta.

Por otro lado, la cladogénesis se refiere al modo fundamental de especiación, y es la responsable directa de la biodiversidad. Ésta se produce por aislamiento reproductivo de las poblaciones de una especie. Las barreras reproductoras se pueden dividir en precigóticas y en postcigóticas. Las primeras son mecanismos de aislamiento que tienen lugar antes o durante la fecundación, siendo las más importantes, la incompatibilidad de las estructuras utilizadas en el acoplamiento, los mecanismos conductuales para reconocerse entre ellas, la reproducción que se produce en diferentes épocas del año, la diferencia de micro-ambiente al que están adaptadas algunas especies que viven el mismo hábitat, y la falta de reconocimiento de los gametos a nivel molecular (Reiseberg y Ungerer, 2009). Las segundas se dan por mecanismos que impiden que se forme el cigoto, es decir, mediante mecanismos de aislamiento precigóticos, o después del

apareamiento y la formación del cigoto, como por ejemplo, los abortos espontáneos, la esterilidad de los híbridos, los híbridos débiles, y la muerte prematura.

Para que exista la especiación debe haber divergencia genética y aislamiento reproductivo entre dos poblaciones relacionadas anteriormente, con lo que se tienen dos formas de ésta, la especiación alopátrica y la simpátrica (Otte, 2009).

La especiación alopátrica, geográfica, o vicariante, es aquella que se da cuando las poblaciones comienzan a divergir, y el flujo de genes entre ellas se restringe o se interrumpe totalmente debido a la dispersión y divergencia en diferentes ambientes, por lo que la primera etapa de este proceso es el aislamiento geográfico, y al pasar un periodo de tiempo largo se produce la separación espacial y con ello, la aparición de novedades evolutivas en una o en ambas poblaciones (Mousseau y Olvido, 2009).

La especiación simpátrica se refiere a las nuevas especies surgidas sin aislamiento geográfico, produciendo dos o más especies de una sola población local (Kondrashov y Kondrashov, 1999; Dieckmann y Doebeli, 1999). Esta puede darse debido a la existencia de alguna barrera biológica, como por la variación de nichos, o por los mecanismos que producen una o más especies nuevas a partir de una especie ancestral sin segregación geográfica de las poblaciones. También se da cuando se produce aislamiento en el mismo sitio por rangos de distribución, lo que elimina el flujo genético entre las poblaciones y con ello, la formación de nuevas especies (Mousseau y Olvido, 2009).

También se ha definido a la especiación híbrida o recombinacional, la cual se refiere a las nuevas especies que se originan por hibridación de especies paternas cromosómica o genéticamente divergentes. Se caracteriza por tener periodos largos de estasis (puntuado), donde la mayoría de las especies no exhibe algún cambio direccional, después se dan transiciones abruptas donde las especies paternas individuales son desplazadas rápidamente por las especies nuevas híbridas (McCarthy, 1995; Ungerer *et al.*, 1998).

La formación de subespecies se da cuando una población debilita su entrecruzamiento reproductor con el resto de las poblaciones de la especie debido a que se encuentra en un periodo de especiación o de cladogénesis, de tal manera que la población debilita sus relaciones reproductoras para posteriormente producir una ruptura permanente entre la población y el resto de la especie; o bien, la población debilita sus relaciones reproductoras y posteriormente es absorbida por el resto de la especie, por lo que la separación es temporal. En el primer caso se

produce un fenómeno verdadero de diferenciación, es decir, la formación de una nueva especie a partir de una subespecie.

A partir de estos conceptos se ha logrado clarificar la estructura genética de poblaciones, la cual se refiere a la distribución y cantidad de la variación genética dentro y entre poblaciones. En el caso de los hongos fitopatógenos el conocimiento de esta estructura, indica la rapidez con el patógeno puede evolucionar, ya que poblaciones con un nivel alto de variabilidad genética, se pueden adaptar más rápido a hospederos resistentes (McDonald y McDermott, 1993).

2.4 La filogenia y sus herramientas.

La filogenia es la ciencia que estudia el proceso de origen de linajes nuevos resultado de la bifurcación de las especies, por lo que su principal tarea es el estudio de la cladogénesis; en otras palabras, es la secuencia ramificada del cambio de caracteres en los organismos a través del tiempo. Por lo que ésta ayuda a resolver problemas de posición y nomenclatura. También es sinónimo de “evolución filética”, y es el proceso que produce un cambio en un carácter genético o fenotípico en una especie. En este caso se habla de un cambio gradual de un órgano con el tiempo.

Las filogenias ofrecen un gran potencial para investigar las causas generales y las tasas de especiación dentro de los clados, además cuando son inferidas mediante datos moleculares en las especies proporcionan registros indirectos de los eventos de especiación (Barraclough y Nee, 2001), los cuales han dirigido la expansión de las especies.

Una especie filogenética es un grupo de organismos que comparten rasgos únicos genéticos y morfológicos que los distinguen de otros. Por ello, la especie filogenética se enfoca en la reconstrucción de la historia evolutiva de los organismos.

La sistemática filogenética utiliza los caracteres apomórficos y la agrupación de taxas basadas en el linaje común. Mientras que la sistemática tradicional es útil para la identificación de especies, pero no para clarificar dudas sobre su evolución. Estos datos son más fáciles de visualizar cuando se construye un dendograma, fenograma, o cladograma, el cual es un diagrama ramificado que representan a las Unidades Taxonómicas Operativas (OTU's) agrupadas en función de índices de semejanza o de diferencia global, es decir, un fenograma resume los patrones de similitud total.

2.4.1 Métodos de reconstrucción filogenética.

Para determinar los fenogramas que sirven para la reconstrucción filogenética, existen varios métodos, los cuales se pueden dividir en métodos fenéticos o de distancia y los métodos cladísticos. Los primeros se basan en el principio de que los organismos más parecidos deben estar filogenéticamente más emparentados, aunque dicho parecido (similitud global) puede llevar a conclusiones erróneas, por lo que se deben utilizar una gran cantidad de caracteres que reflejen los patrones evolutivos, aunque algunos también estarán influenciados por la selección. Éstos calculan el índice de distancia entre pares de taxa, de acuerdo a los caracteres que comparten, es decir, los caracteres analizados se convierten en un sólo número – la distancia evolutiva – entre un par de taxa, con los que se obtiene el árbol filogenético (Sokal, 1985). En el caso de los segundos (cladísticos) se basan en similitudes derivadas, por lo que para su análisis se utilizan propiedades derivadas compartidas de los organismos en estudio para determinar sus relaciones evolutivas.

La inferencia de árboles filogenéticos se puede realizar mediante métodos de reconstrucción, los cuales se basan en matrices de distancias, por ejemplo el método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages) y el Neighbor-Joining; o los métodos que buscan la máxima verosimilitud, o los métodos basados en la obtención de la máxima parsimonia, por mencionar algunos.

UPGMA. Presenta varias ventajas, como que presenta directamente una “raíz”; las distancias de las ramas son las medias entre las distancias de cada grupo de organismos; y tal vez la más importante, es que es rápido y muy eficiente en la reconstrucción de la filgenia cuando las tasas de cambio son relativamente constantes (Sokal, 1985).

Neighbor-Joining. Se basa en buscar secuencialmente los taxa “vecinos” que minimizan el largo total del árbol, ajustando nuevamente el largo de las ramas para cada par de nodos cuando se une un par de taxa. Es uno de los métodos de distancia más usados debido a que es más confiable ante los problemas de diferencias en las tasas de substitución, y es relativamente rápido para la reconstrucción filogenética (Hillis *et al.*, 1994).

Máxima Verosimilitud. En este método se trata de buscar e identificar la topología con la mayor probabilidad para explicar los cambios de las OTUs mediante datos de frecuencias génicas. Tiene la desventaja que es muy lento, pero con el uso de algoritmos, esto se resuelve en

cierta medida, por lo que tiene mayor empleo en las filogenias evolutivas, ya que presenta menores restricciones previas al analizar los datos (Martínez-Lage y González-Tizón, 2004).

Máxima Parsimonia. Se basa en buscar e identificar la topología que requiera el menor número de cambios evolutivos para explicar las diferentes secuencias analizadas u OTUs. Una de las ventajas de este método con respecto a los métodos basados en distancias, es que el análisis se basa en el uso directo de las secuencias de ADN sin ningún tratamiento previo. Para encontrar el árbol con la mayor parsimonia se requiere diferenciar y detectar las posiciones nucleotídicas diferentes. Así, un sitio es invariante si presenta el mismo nucleótido en todas las secuencias; y es variable si presenta alguna variación en, al menos, una de las secuencias comparadas, dentro de estos últimos sólo son de interés aquellos que sean informativos, es decir, que produzcan árboles evolutivos que expliquen las diferencias nucleotídicas mediante diferente número de procesos mutacionales. Este método es poco realizable cuando el número de OTUs es elevado, por lo que se sugiere que se aplique este método cuando las OTUs sean menores a diez. De lo contrario se puede buscar el árbol con la máxima parsimonia mediante la estrategia de la “rama y unión” (branch andbound), que consiste en eliminar los árboles con una longitud mayor a los examinados previamente; o mediante la estrategia “heurística”, la cual consiste en que sólo se examina una porción de árboles mediante el uso de diferentes algoritmos.

Sin embargo, cualquiera de estos métodos, en principio, es válido (Martínez-Lage y González-Tizón, 2004).

2.4.2 Importancia de la biología molecular.

La forma más certera para determinar los niveles de diversidad y estructura genética intra-específica, es mediante el uso de marcadores moleculares, principalmente los fragmentos de restricción polimórficos (RFLP), el ADN polimórfico amplificado al Azar (RAPD), las secuencias simples repetidas (SSR), y los espaciadores internos transcritos (ITS). Los cuales han sido utilizados para determinar diversos aspectos sobre las poblaciones, como por ejemplo, para determinar diferencias genéticas entre aislamientos de algunos hongos patógenos y de interés comercial, para asociar índices de patogenicidad (Sivaramakrishnan *et al.*, 2002), para determinar la eficiencia de hongos entomopatógenos (Coates *et al.*, 2002), para entender las interacciones planta-patógeno, su co-evolución y su rol ecológico (Ahlholm *et al.*, 2002); incluso para comparar la eficiencia de algunos de estos métodos para organismos específicos

(Sivaramakrishnan *et al.*, 2002; Becerra, *et al.* 2007). Estos y otros logros han hecho que la filogenómica, en conjunto con la disponibilidad de los genomas completos de un gran número de organismos eucariotes, sea una poderosa herramienta para identificar el linaje de otros organismos, lo cual es posible aún cuando no se cuente con datos completos del patrón estudiado (Desmond y Grimaldo, 2009).

Por ello, en los últimos años la filogenética molecular ha resultado ser más útil para establecer un sistema taxonómico fiable, además de lograr grandes avances mediante la aplicación de las técnicas de ADN, el uso de marcadores moleculares, y la comparación de las secuencias de nucleótidos de fragmentos amplificados de ADN nuclear, ADN mitocondrial y de manera específica, el ADN ribosomal (Bao *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Schmidt y Moreth, 2000; Wu *et al.*, 2000). Entre estos avances se pueden mencionar la determinación de la diversidad genética entre las especies y sus relaciones, la especialización de cada población y sus relaciones evolutivas respecto a su biogeografía, la especiación, el esclarecimiento sobre la biología de la población y su historia evolutiva, la determinación de las formas de reproducción o de compatibilidad, entre otros (Maeta *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2002; Zervakis *et al.*, 2004).

Esto ha conducido a que las especies y las poblaciones se clasifiquen en base a estudios de diversidad genética en los últimos años. Ya que ésta es asumida como la originaria de mutaciones, las cuales a su vez implican migración, selección, y la deriva genética, mediante los cuales se extiende y mantiene dicha diversidad. Y mediante esta diversidad, se puede determinar la habilidad de un organismo para responder a los cambios en las condiciones ambientales, y por consiguiente para sobrevivir y evolucionar, así como para determinar las fuentes y la forma como se mantiene la variación genética, la tasa de cambio, etc. (McDonald, 1997; Ahlholm *et al.*, 2002). También ayuda a entender aspectos sobre la historia evolutiva para mantener y generar la estructura genética de la población, ya que una habilidad de dispersión grande puede verse reflejada en una variación genética grande dentro de las poblaciones y en una homogeneidad genética entre las poblaciones (Loveless y Hamrick, 1984, citado en Ahlholm *et al.*, 2002).

2.4.3 Marcadores moleculares.

Con el desarrollo de la biología molecular y sus técnicas, actualmente es posible, entre otras cosas, identificar genes específicos responsables de ciertos rasgos y características a partir

de los ácidos nucleicos. Lo que su vez ha dado como resultado un incremento en el uso de caracteres moleculares en estudios taxonómicos. De ellos, las secuencias génicas son las más utilizadas, ya que tienen la ventaja de que representan una fuente abundante de caracteres, dado que potencialmente cada nucleótido representa un carácter, cada uno con tasas evolutivas, propiedades estructurales y funcionales diferentes (Ritland y Clegg, 1987; Field *et al.*, 1988). Además para sus procedimientos se utilizan generalmente métodos enzimáticos, marcadores no radioactivos y secuenciación automatizada (Kumar y Filipski, 2001).

Los marcadores moleculares se basan en la búsqueda de polimorfismos en proteínas o ADN, y se han aplicado en taxonomía, filogenia, ecología, y genética. Los RAPD y AFLP tienen la desventaja de que son marcadores no específicos, lo que puede llevar a errores de interpretación de los resultados por contaminación con otros organismos (Dyer y Leonard, 2000). Por su parte, el ADN ribosomal nuclear (nrADN) es muy utilizado debido a que permite la inferencia de relaciones filogenéticas entre taxa muy distantes debido a que presentan secuencias de bases altamente conservadas con tasas de evolución muy lentas (Hillis y Dixon, 1991; Lafontaine y Tollervey, 2000), por lo que sus secuencias dan resultados viables para el análisis filogenético en diferentes niveles taxonómicos. Éste se encuentra constituido de forma general por los genes ribosomales y sus regiones espaciadoras asociadas. De manera específica, el arreglo del nrADN de un genoma eucariótico consiste típicamente de cientos de copias repetidas en tándem, las cuales, cada una se compone de la unidad transcrita y de la región de los espaciadores externos no transcritos (Hillis y Dixon, 1991).

En eucariotas, existen generalmente tres o cuatro subunidades de nrADN, así para el caso de plantas se tienen las 18S, 5.8 S, y 26S; en animales la 18S, 5S, y 28S; y en hongos las 16S, 5S, 5.8S y 25S. Estas subunidades a su vez consisten de la subunidad larga que tiene un rango de 16S a 28S con aproximadamente 1500 nucleótidos a más de 4000 nucleótidos, respectivamente; la subunidad pequeña 5.8S con 160 nucleótidos; la unidad 18S con 1800 nucleótidos; y en algunos organismos, la subunidad 5S con 120 nucleótidos.

Respecto a las regiones espaciadoras, en eucariotas existen dos regiones de espaciadores internos transcritos (ITS), ITS-1 e ITS-2, que son los que separan a las unidades 18S, 5.8S y 28S o sus homologos. Esta región ha sido usada ampliamente para esclarecer las relaciones entre taxa a nivel inter e intragenérico.

Una de las formas para obtener “fingerprinting” o huella digital del ADN es la que se basa en PCR (Reacción en Cadena Polimerasa), la cual involucra la amplificación *in vitro* de secuencias específicas de ADN, mediante oligonucleótidos específicos o arbitrarios (iniciadores) y una polimerasa termoestable. Los fragmentos amplificados obtenidos se separan mediante electroforesis, donde se detectan los patrones de bandas polimórficas teñidas con bromuro de etidio o con nitrato de plata.

Los procedimientos de diagnóstico basados en PCR requieren conocer las secuencias de nucleótidos de las regiones blanco con la finalidad de diseñar iniciadores específicos. El ADN que codifica para el rARN es un cluster génico que se repite cientos de veces en el genoma del individuo en estudio, en donde se incluyen los genes para las subunidades 5.8S, 18S, y 28S, los cuales están separados por dos secuencias no codificantes: ITS-1 e ITS-2. El hecho de que este cluster génico tenga algunas regiones altamente conservadas y otras altamente variables, permite analizar la variación en niveles taxonómicos diferentes (Steven y Taylor, 1992).

El desarrollo de la cadena de la PCR ha permitido el incremento del uso de secuencias génicas en el estudio de las relaciones filogenéticas entre poblaciones y especies, de las cuales, las más utilizadas incluyen a los genes ribosomales, y en específico, los ITS (Walsh, 2009).

Se puede mencionar algunas de las ventajas de utilizar los ITS en estudios de taxonomía, filogenia, ecología, y genética:

a) Sólo es necesario muestrear algunos individuos para establecer las relaciones filogenéticas entre especies diferentes (Hillis *et al.*, 1991), lo cual se debe a que la evolución concertada (dado por mecanismo no Mendeliano, sino principalmente por mecanismos de entrecruzamiento desigual y por la conversión génica, donde la familia de genes repetidos experimenta una homogenización rápida en sus secuencias de bases [Baldwin *et al.*, 1995; Wendel *et al.*, 1995]) y la recombinación sexual tienden a promover la uniformidad de los ITS dentro y entre los individuos de poblaciones, lo cual se debe a que esta región se encuentra relativamente homogénea dentro del genoma, y por lo tanto, sólo una secuencia se necesita para caracterizar a los individuos de una especie específica (Baldwin *et al.*, 1995).

b) Los ITS son fáciles de amplificar mediante la PCR, debido por una parte, a que los ITS se encuentran representados altamente en el genoma, lo que hace posible su amplificación a partir de cantidades pequeñas de ADN; y por otra parte, a que las secuencias conservadas

altamente dentro de la mayoría de los genes del nrADN son muy útiles en el diseño de oligonucleótidos (primers) universales (Liston, 1992).

c) Los iniciadores ITS-1 e ITS-4 permiten la amplificación de la región ITS-1 – 5.8S – ITS-2 de los genes ribosomales de eucariotas. Los cuales son fáciles y económicos de construir debido a su pequeño tamaño (ITS-1 5´tccgtaggatgaacctgcgg 3´10 nucleótidos; ITS-4 5´tctccgcttatttgatatgc 3´10 nucleótidos)

d) Es muy importante alinear las secuencias lo mejor posible y descartar las zonas dudosas antes de utilizarlas (Giannasi *et al.*, 1992; Bult y Zimmer, 1993), debido a que los caracteres están representados por la posición en la secuencia del gen, y a que los estados de carácter son los nucleótidos que se encuentran en esa posición (Dragon y Filipowics, 2009).

2.5 Diversidad genética de hongos.

En el caso de algunos hongos, su clasificación se ha centrado principalmente en la morfología de sus cuerpos fructíferos, de su desarrollo colonial en placa, así como de sus características de compatibilidad o de reproducción. Otros se han clasificado en base a algunos efectos que tienen sobre su entorno, ya sea benéfico o perjudicial. Sin embargo, debido a que cada población de especies puede variar en dichas características, es necesario ampliarlas con datos a nivel genético-molecular, fenotípico, y reproductivo (Xu *et al.*, 2002; Zervakis *et al.*, 2004).

En los últimos años los métodos moleculares se han aplicado en un número grande de investigaciones sobre los hongos. Resultando ser útiles para determinar la proporción de un determinado grupo microbiano en distintos ambientes, y la proporción de cada grupo y sus poblaciones en determinado medio. En el caso de los hongos, esto se debe por una parte, a que estos organismos están más estrechamente relacionados con los animales que a las plantas, algas, bacterias, y arqueas; y por otra parte, a que los hongos divergieron junto con los animales de un antepasado común hace 800 a 1,000 millones de años (Lengeler *et al.*, 2000). Esto se puede evidenciar en un estudio realizado por Fierer *et al.*, 2007, quienes al trabajar con secuencias de unidades taxonómicas operativas (OTUs) del suelo con similitud del 97%, encontraron que las bacterias son mucho más abundantes que los hongos y arqueas, y que los virus son taxonómicamente diversos y distintos de las poblaciones de otros ambientes, además, que existe

un solapamiento mínimo entre los sitios de taxonomía, lo cual sugiere que la diversidad global y local de cada uno de estos grupos debe ser muy alto. Dentro de cada uno de los cuatro grupos microbianos, se observó un mínimo solapamiento entre los sitios de taxonomía, lo que sugiere que las arqueas, bacterias, hongos y virus del suelo, son diversos a nivel mundial y a nivel local.

Los hongos están formados por un gran número de miembros, ya que tan sólo los hongos verdaderos, que se encuentran dentro de la División Eumycota, existen alrededor de 80,000 especies, comprendiendo levaduras, mohos, royas, tizones y setas, tanto micro como macroscópicos. Los hongos macroscópicos están conformados de aproximadamente 10,000 especies, que pueden ser comestibles o venenosos (Martínez-Carrera *et al.*, 1993). Por ello, estos métodos también han servido para analizar la diversidad genética en diferentes tipos de hongos, logrando identificar y diferenciar las setas nativas venenosas de las cultivadas, así como la realización de discriminaciones entre aislamientos mediante el nivel de diversidad genética (Maeta *et al.*, 2008; Becerra *et al.*, 2007).

En el caso de la técnica RAPD-PCR ha sido usada para determinar la variación genética dentro de diferentes grupos y para clarificar datos obtenidos mediante la sistemática morfológica de manera inmediata. En el caso de Zervakis *et al.* (2001), evaluaron la diversidad de taxa de *Pleutorus* europeos asociados con *Umbelíferas*, y determinaron los procesos de especiación en marcha de acuerdo a sus expresiones de sus caracteres anatómicos, morfológicos, ecológicos, y distribucionales.

Así mismo, las secuencias de rARN han permitido clasificar a muchos basidiomicetos, debido a que se pueden caracterizar en muchos niveles taxonómicos en base a sus regiones conservadas y variables (Henson *et al.*, 1993; Swann *et al.*, 1999; Swann y Taylor, 1993; Hibbett, 1992; citados en Singh *et al.*, 2005). Especialmente los ITS-1 e ITS-2, han mostrado diferencias en nucleótidos, permitiendo establecer la diversidad genética de hongos a nivel inter e intra-específico, mediante partidores universales que amplifican zonas genéticamente conservadas (Buscott *et al.*, 1996).

Dentro de los basidiomicetos, las especies de los *Ustilaginales* tienen cierta importancia por sus implicaciones económicas negativas, de los cuales actualmente se tiene mayor conocimiento sobre los sistemas que forman con las plantas hospederas, en base a las aplicaciones de los métodos moleculares (Andrade *et al.*, 2004). Tal como el esclarecimiento de las dinámicas entre hospedero-patógeno de sistemas agrícolas en la domesticación, ya que las

actividades humanas han alterado el ambiente de estos sistemas, incluyendo los ambientes genéticos de cada especie, y con ello el movimiento de patógenos alrededor del mundo por dicha actividad. Así, en el caso de los sistemas de los hongos *U. maydis*, *U. scitaminea*, *Sporisorium reilianum*, y *S. sorghi* con el maíz, sorgo y caña de azúcar estudiados por Muncaksi *et al.* (2007), se determinó que la especiación de los patógenos no es el resultado necesariamente de las prácticas agrícolas, y que la domesticación ha permitido la simbiosis entre los cultivos y decenas de microorganismos ancestrales, los cuales luchan por sobrevivir en el hospedero.

2.6 *Ustilago maydis*.

Ustilago maydis D.C (Corda), es un hongo de los carbonos que causan enfermedades a más de 75 familias de angiospermas en el mundo. *U. maydis* infecta al maíz produciendo el “huitlacoche” o “carbón del maíz” (Basse y Steinberg, 2004). Es un hongo basidiomiceto dimórfico, ya que tiene dos formas de vida, una fase saprófita, la cual se desarrolla como células haploides levaduriformes y se caracteriza por ser no patogénica; y una fase patogénica, la cual se desarrolla como células dicariotas miceliales y que es la forma patogénica que crece en la planta de maíz formando tumores o agallas en las partes aéreas (Banuett, 1995; Christensen, 1963), donde se forma una tercera forma del hongo, las teliosporas diploides (Lee y Kronstad, 2002).

2.6.1 El ciclo de vida de *U. maydis*.

El ciclo de vida está regulado por un sistema de reconocimiento tetrapolar de compatibilidad sexual, formado por los loci de apareamiento *a* y *b*. El cual también regula las transiciones morfológicas y la patogenicidad (Banuett, 1995; Kahmann *et al.*, 1995). El locus bialélico *a* codifica para un sistema feromona-receptor, el cual es requerido para controlar el reconocimiento y la fusión de esporidias compatibles de tipo opuesto. Cada alelo contiene un gen precursor y un receptor de feromonas que regulan la formación del tubo de formación y la fusión de las células haploides. Mientras que el locus *b* es multialélico, con al menos 25 alelos; éste codifica para proteínas con homeodominios *bE/bW* (Bölker *et al.*, 1992; Banuett, 1995; Kamper *et al.*, 1995). Cuando las esporidias se aparean, forman un dicarion que da lugar a la forma filamentosa, que es la que infecta los tejidos del maíz, siempre y cuando tengan alelos diferentes del locus *b*, y las condiciones ambientales propicias (Banuett y Herskowitz 1994a;

Banuett, 1995; Feldbrügge *et al.*, 2004). Por lo que el locus *b* es determinante para la patogenicidad (Kamper *et al.*, 1995).

El ciclo de vida de *U. maydis* está relacionado con su forma de infección, lo cual se ha podido detallar más profundamente con las investigaciones recientes. De esta forma se sabe, que durante la etapa de la infección temprana las hifas se encuentran rodeadas por la membrana plasmática del hospedero. En etapas posteriores, las hifas crecen intra e intercelularmente mediante un crecimiento direccional del filamento (Snetselaar y Mims, 1993) a través de los estigmas (Christensen, 1963, citado en Flor-Parra *et al.*, 2007), y entonces se desarrollan los tumores o agallas debido al crecimiento polar continuo, ya que las hifas que alcanzan los ovarios del maíz, producen el aumento de tamaño de las células de la planta y las divisiones celulares del hongo al formarse las teliosporas diploides (Banuett y Herskowitz, 1996; Callow y Ling, 1973; Doehlemann *et al.*, 2008, Banuett, 1995; Feldbrügge *et al.*, 2004; Martínez-Espinoza *et al.*, 2002; Flor-Parra *et al.*, 2007).

También se ha determinado que el ciclo sexual de *U. maydis* sólo se lleva a cabo bajo condiciones específicas en la planta. Mientras que el asexual requiere de condiciones propicias ambientales y nutricionales creadas en el laboratorio. Por lo que en el primer caso resulta complicado llevarlo a cabo bajo condiciones de laboratorio, ya que para iniciar el desarrollo sexual se requieren condiciones de estrés, un sistema de control de participación positiva, y reguladores negativos que propicien el momento óptimo de apareamiento (Castillo-Lluya *et al.*, 2005). Tal es el caso de la proteólisis, la cual en conjunto con algunas proteasas, juega un papel fundamental en la respuesta al estrés (Mercado-Flores *et al.*, 2003; Andrews *et al.*, 2000). Otros factores de estrés que inducen la filamentación de células haploides y diploides de *U. maydis* en medios sintéticos son algunos factores ambientales como el pH, los detergentes y los lípidos (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995; Klose *et al.*, 2004), cuyo control, puede desencadenar la reacción "Fuz" (Banuett y Herskowitz, 1994; Martínez-Espinoza *et al.* 1997), la cual resulta útil para determinar la compatibilidad de apareamiento de cepas haploides (Méndez-Morán *et al.* 2005). Así, a pH neutro el hongo crece como esporidias, mientras que a pH ácido, crece en forma micelial (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995), el cual puede ser suprimido en presencia de glucosa (Klose y Kronstad, 2006).

Respecto al desarrollo asexual, es decir, el desarrollo de esporidias, también se han realizado estudios más detallados aunque más escasos, debido a que esta fase no resulta de

interés por no ser infecciosa. Sin embargo, se ha podido determinar que la división celular por gemación se lleva a cabo en varias etapas, tratándose de un crecimiento polar mediante el desarrollo de una yema en la punta de la célula (Weinzierl *et al.*, 2002), el cual es llevado a cabo por una proteína homóloga única en este hongo, que es la responsable de formar un anillo contráctil durante la citoquinesis (Bohmer *et al.*, 2008).

2.6.2 Procesos de infección de *U. maydis* y de otros hongos fitopatógenos.

Los hongos son organismos eucariotas simples que se desarrollan de forma general por crecimiento polar (Steinberg y Pérez-Martín, 2008). Además cada tipo de hongo tiene diversas formas para desarrollarse. Así, en el caso de los hongos patógenos de plantas, conocidos como hongos fitopatógenos, han desarrollado diferentes estrategias para hacer frente al entorno de la planta y poder desarrollarse en ella. Unas de estas estrategias son los procesos de reconocimiento, con lo que logran penetrar las barreras físicas mediante fuerzas mecánicas contra la epidermis del hospedero, y en conjunto con la producción de enzimas, desintegran algunos componentes estructurales. Pero al mismo tiempo, los patógenos se sobrepone a las defensas de sus hospederos y sobreviven a las sustancias que producen, y también sintetizan entre otras sustancias reguladores de crecimiento para ejercer efectos hormonales en la planta; toxinas para alterar el metabolismo de ésta hasta matarla; y polisacáridos para afectar la translocación de nutrientes y agua. De esta forma, estos hongos adquieren los nutrientes de los tejidos vivos de las planta, requiriendo una adaptación muy especializada de estos. Sus hifas pueden crecer inter e intracelularmente, envainándose en la membrana plasmática de las células vegetales, con lo que logra desarrollarse y dispersarse en el hospedero (Agrios, 1988, citado en Martínez Espinoza *et al.*, 2000; Doehlemann *et al.*, 2008). Por lo que el papel de los cambios morfológicos que presentan muchos hongos dimórficos que afectan a plantas y animales es relevante en los procesos de virulencia (Maresca y Kobayashi, 2000; Gold *et al.*, 1994).

Los carbones, tizones o royas son hongos conformados por aproximadamente 1,200 especies que pertenecen al orden de los *Ustilaginales*. Estos hongos se caracterizan porque causan enfermedades a aproximadamente 75 familias de plantas de angiospermas en el mundo causando significativas pérdidas agrícolas (Reineke *et al.*, 2008).

U. maydis pertenece a este grupo, y se caracteriza porque infecta exclusivamente al maíz (*Zea mays*) y a su antecesor el teosinte (*Zea mays ssp. parviglumis*), de ahí su nombre, “carbón

del maíz”. A diferencia de otros hongos de este grupo, posee la habilidad para formar tumores en todas las partes aéreas del hospedero, como son hojas, tallos y con mayor incidencia en los órganos reproductores y en las mazorcas, mediante varias estrategias de infección (Laurie *et al.*, 2007; Reineke *et al.*, 2008), que van desde la síntesis de algunas sustancias, hasta el desarrollo de estructuras especializadas para fines específicos (Xu y Day, 1992; Castillo-Lluva y Pérez-Martín, 2005; Steinberg *et al.*, 2000).

Así entonces, el proceso de infección inicia con el ingreso de las teliosporas de *U. maydis* por los estigmas y por estomas (Banuett y Herskowitz, 1994), seguida de la formación de apresorias, las cuales facilitan el crecimiento a través de las células epidérmicas, y finalmente la formación de hifas ramificadas (Kruger *et al.*, 2000). Sin embargo, aún no se conoce el mecanismo específico de reconocimiento en el hospedero, por lo que se han realizado intensas investigaciones que han llevado a esclarecer este proceso, como las que se mencionan a continuación.

El tubo de germinación emerge después de que las teliosporas atacan la superficie de la planta y germinan (Flor-Parra *et al.*, 2007), lo que implica la activación del eje polar y la emergencia de dicho tubo, el cual, para algunos hongos ha evolucionado a aberturas naturales, como los estomas u otras estructuras especializadas desarrolladas para este fin, como las apresorias (Tucker y Talbot, 2001, citado en Flor-Parra *et al.*, 2007). Estas estructuras juegan un papel importante durante la diferenciación fúngica en la penetración, ya que ésta es conducida por una o varias señales producidas por la planta que dependen del contacto íntimo entre el tubo de germinación y la superficie de la planta (Apoga *et al.*, 2004). También se ha estudiado la dinámica de los microtúbulos durante la gemación polar, la morfogénesis y la migración nuclear, determinando que los microtúbulos son dinámicos en la mitosis y la interfase, además son flexibles y con motilidad dentro de la célula (Steinberg *et al.*, 2000).

Por otro lado, *U. maydis* forma apresorias, las cuales se desarrollan por diferenciación de los filamentos con el fin de penetrar a la célula vegetal, mediante enzimas que degradan la pared celular de la planta, y cuyo desarrollo depende de factores químicos y físicos externos (Snetselaar y Mims, 1992, 1993, citados en Flor-Parra *et al.*, 2007; Schirawski *et al.*, 2005; Mendoza-Mendoza *et al.*, 2008). Uno de estos factores es la hidrofobicidad, la cual es la señal primaria que estimula el desarrollo de las apresorias, ya que los ácidos grasos hidroxilados, los cuales

son obtenidos por la degradación enzimática de la cutina, tienen un efecto potenciador (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2008).

Al igual que otros hongos fitopatógenos y otros carboles, *U. maydis* desarrolla haustorias que son usadas para la alimentación, las cuales crecen entre la pared celular de las hifas y la membrana plasmática de la planta, mediante una interfaz formada de un hidrato de carbono y proteínas que facilitan el intercambio de señales y nutrientes (Hahn y Mendgen, 2001; Voegelé *et al.*, 2001, Mendgen y Hahn, 2002; Perfect y Green, 2001, citados en Doehlemann *et al.*, 2008).

En cuanto a las sustancias que sintetiza durante el proceso de patogénesis, se tiene principalmente algunas proteínas, las cuales han sido determinadas así como su función durante este proceso, mediante la comparación de secuencias de proteínas de otros organismos y de genotipos mutados de *U. maydis* creados para dicho fin (Becht *et al.*, 2005). También se han realizado estudios sobre las vías de señalización, donde además de las proteínas mencionadas, también participan otras, tales como enzimas y hormonas, las cuales son relevantes en los procesos genéticos de patogénesis, morfogénesis y diferenciación celular, resultando de gran utilidad para el control de la infección de forma efectiva y segura (Basse y Steinberg, 2004; Kahmann y Kämper, 2004; Martínez- Espinoza *et al.*, 2000).

2.6.3 Mecanismos de defensa de las plantas contra hongos fitopatógenos.

Por su parte, las plantas también han desarrollado sistemas de defensa, como es en primera instancia su cutícula, la cual representa la primera barrera de defensa contra los patógenos (Eigenbrode y Espelie, 1995, citado en Mendoza- Mendoza *et al.*, 2008). Otros sistemas de defensa más especializados son inducidos sólo durante el ataque de patógenos, y entre los que destaca la inducción de genes relacionados a la patogénesis, la producción de metabolitos secundarios, y el refuerzo de las paredes celulares. La inducción del sistema de defensa se produce mediante el reconocimiento de moléculas conservadas presentes generalmente en una variedad de especies de microorganismos, y ausentes en el hospedero, como es el caso de los patrones moleculares asociados que incluyen la quitina, β -glucanos y ergosterol, así como algunas fitohormonas como el etileno y los jasmonatos (Glazebrook, 2005, Greenberg y Yao, 2004; Jones y Dangl, 2006; O'Connell y Panstruga, 2006, citados en Doehlemann *et al.*, 2008).

Con respecto al maíz, también se han estudiado algunos mecanismos que inhiben o favorecen el proceso de infección por *U. maydis*. Determinando que la manosa, la glucosa, la xilosa y la galactosa están contenidas en estructuras complejas de la pared celular de *U. maydis* (Ruíz-Herrera *et al.*, 1996), y que dichos hidratos de carbono son activos como receptores de lectinas, las cuales inhiben la capacidad patogénica del hongo. Esto indica que podría haber una participación activa de los residuos de estas moléculas como mediadores específicos del reconocimiento entre la planta y el parásito durante la regulación de la germinación y el desarrollo del hongo (Pérez- Santiago *et al.*, 2000).

Recientemente se ha determinado la inducción de un programa de defensa llevado a cabo por un grupo de genes del maíz que interfiere en la diferenciación de sus tejidos, y que por lo tanto, regulan la infección por *U. maydis* (Basse, 2005). Esto se ha demostrado con la mayoría de los trabajos sobre la patogénesis, la especificidad del hospedero, y la determinación de algunos eventos morfológicos que ocurren en las estructuras desarrolladas durante el proceso de apareamiento, los cuales han sido llevados a cabo en plántulas y plantas de maíz, principalmente de la variedad Early Golden Bantam (Castillo-Lluva y Pérez-Martín, 2005; Hu *et al.*, 2007; Mendoza-Mendoza *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2008; Flor- Parra; Reineke *et al.*, 2008) y de Cacahuzintle (Matínez-Espinoza *et al.* 1997; Rodríguez-Kesslera *et al.*, 2008; Matsuoka *et al.*, 2002), así como en plántulas de otras especies (León-Ramírez *et al.* 2004; Méndez-Morán *et al.* 2005). Con esto se ha concluido que, aunque *U. maydis* es capaz de infectar plántulas de otras especies, sólo logra producir huitlacoche cuando infecta al maíz y a su antecesor.

2.6.4 *U. maydis* como modelo biológico.

La filogenómica es una poderosa herramienta para identificar el linaje de organismos eucariotes gracias a la disponibilidad de los genomas completos de muchos de ellos, lo cual es posible aún cuando no se cuente con datos completos del patrón estudiado. En base a esto, se logra reorganizar los datos observados entre el organismo de interés y los de referencia (Desmond y Grimaldo, 2009).

De forma paralela, y muchas veces derivados de los estudios de filogenómica, se han desarrollado sistemas modelo. Entre ellos, los modelos derivados de los hongos, los cuales han contribuido a la comprensión de las vías esenciales celulares debido a las ventajas de las técnicas, a la accesibilidad genética, al tiempo de generación corto, a los métodos simples de

cultivo, y a las herramientas moleculares sofisticadas (Steinberg y Perez-Martin, 2008). Estos modelos han servido para estudiar entre otros aspectos, el origen y la diversidad de alelos que se reproducen sexualmente, siendo el sistema tetrapolar uno de los más estudiados (Hu *et al.*, 2007).

Probablemente *U. maydis* es el hongo fitopatógeno que más se ha sujetado a análisis experimentales, a pesar de ser un parásito no obligado del maíz, y de tener un rango muy estrecho de hospederos (León-Ramírez *et al.*, 2004), ya que ha servido como un modelo primario (Hu *et al.*, 2007) y genético por más de cuarenta años (Holliday, 2004), mediante el uso de cepas de referencia como son la 521 (*a1 b1*), 518 (*a2 b2*), FB1 (*a1 b1*), y FB2 (*a2 b2*), principalmente (Boyce *et al.* 2005, 2006; Lee y Kronstad, 2002; Castillo-Lluva y Pérez-Martín, 2005; Hartmann *et al.*, 1996; Mercado-Flores *et al.*, 2003). Cabe hacer mención, que las dos primeras han sido proporcionadas por R. Holliday, y las dos últimas por F. Banuett en la mayoría de los trabajos, debido a la reproducibilidad de resultados y al tipo de apareamiento conocido. También se ha trabajado con un sin fin de cepas nativas de diferentes países y muchas más mutadas o clonadas (Xu y Day, 1992; Basse *et al.*, 2000; Lee y Kronstad, 2002; García-Muse *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2007; Garrido *et al.*, 2004). Todo lo mencionado hace a *U. maydis* un organismo genéticamente trazable debido a que posee una amplia gama de sistemas de genes y de mutagénesis de inserción establecidos desde principios de la década de los 90's (Bortfeld *et al.*, 2004).

Este hongo, también se ha utilizado como modelo molecular de la patogénesis de hongos en plantas y dimorfismo fúngico (Sgarlata y Pérez-Martín, 2005; Feldbrügge *et al.*, 2004; Bölker, 2001), así como de morfogénesis y virulencia de diferentes hongos patógenos (Zhao *et al.*, 2007) debido a su cultivo fácil en el laboratorio y a su sensibilidad en la manipulación molecular y en los análisis genéticos (Ho *et al.*, 2007). Es uno de los miembros de los basidiomicetes más reconocidos, debido a su dimorfismo (Kämper *et al.*, 2006), por lo que ha servido para direccionar los sistemas de apareamiento con el fin de determinar modelos de biología molecular y ecológica, así como para aclarar puntos clave sobre las relaciones entre heterotalismo y el número de alelos de apareamiento (Giraud *et al.*, 2008). Más aún, ha ayudado a elucidar los procesos biológicos celulares en eucariotas superiores, entre los que destaca la mitosis; inclusive, ha proporcionado avances sobre la comprensión de la biología básica de las células humanas, ya que sus hifas muestran similitudes fenotípicas con las células neuronales, y

por el papel de muchas proteínas conservadas en los seres humanos, a pesar de la deficiencia de información funcional de ellas (Steinberg y Pérez- Martín, 2008).

U. maydis también ha servido para clarificar procesos genéticos, de apareamiento y patogénicos de otros hongos fitopatógenos, como los del género *Microbotryum* que afecta a plantas de la familia de los Caryophyllaceae, debido a que poseen un sistema tetrapolar similar al de *U. maydis* (Devier *et al.*, 2009). Las secuencias de algunas de sus proteínas, a partir del estudio de la similitud y la función de ellas, se han utilizado para comparar la severidad de la enfermedad producida por diferentes especies de eucariotas (Martin *et al.*, 2009). Mediante el conocimiento de los genes expresados durante su etapa de germinación, se ha logrado determinar los procesos de producción de energía, y por consiguiente, las proteínas de biosíntesis y metabolismo primario de otros hongos de interés científico, como es el hongo saprófito acuático *Blastocladiella emersonii* (Salem-Izacc *et al.*, 2009). Su uso como modelo ha sido extensivo al estudio de organismos de otros órdenes y de otros reinos, como es el caso de los *Uredinales*, específicamente *Puccinia triticina* Eriks, conocido como “la roya de la hoja o anaranjada del trigo”, el cual también es importante por producir grandes pérdidas en este cultivo (Hu *et al.*, 2007). También *Myxobacterium Plesiocystis pacifica* sirvió para clarificar su linaje en base a homologos de enzimas de 38 eucariotas, sus rutas metabólicas, y algunos esteroides que sintetizan (Desmond y Grimaldo, 2009).

Todos estos avances han sido posibles gracias a la determinación del genoma de *U. maydis* (Kämper *et al.*, 2006), el cual se logró en el año 2003 con financiamiento del National Human Genome Research Institute, eligiendo a la cepa 521 para dicho fin, debido a que es una de las cepas originales mayormente estudiadas, y la cual fue obtenida originalmente de teliosporas proveídas por J. J. Christensen, quien se las proporcionó a R. Holliday (Kronstad, 2003). Por ello, de los más de 2,000 genomas secuenciados, y de los aproximadamente 200 genomas secuenciados de hongos hasta el año 2007, *U. maydis* ha sido tomado en cuenta para crear algunas bases de datos y librerías con fines e intereses específicos (Alam *et al.*, 2007; Hedeler *et al.*, 2007).

2.7 Estudios de *U. maydis* mediante métodos moleculares.

Los métodos moleculares han sido aplicados para *U. maydis* con diferentes fines, como por ejemplo, los realizados con microsatélites o SSR, los cuales al ser abundantes y representar

niveles extensos de polimorfismo en genomas de procariotas y eucariotas, han sido utilizados en un gran número de trabajos de genética sobre parentesco y estudio de poblaciones. Así, con el fin de proporcionar una fuente general de marcadores genéticos para la identificación de poblaciones y cepas de hongos, Karaoglu *et al.*, (2004) estudiaron nueve especies de hongos taxonómicamente diferentes, entre ellas la cepa 521 de *U. maydis*, a pesar de que no se contaba con los genomas completos de todas ellas. Determinando que no existe correlación entre el tamaño del genoma y la abundancia relativa de las repeticiones de los SSRs. Específicamente para *U. maydis*, se determinó que las repeticiones de hexanucleotidos fueron los más abundantes, además de presentar la abundancia relativa más alta y la densidad más alta con respecto a las demás especies.

Munkacsí *et al.* (2008) utilizaron diez marcadores SSR para analizar la estructura de poblaciones genéticas de cepas de *U. maydis* provenientes de México, Sudamérica, y USA, en base a la evolución de plantas infectadas de maíces criollos y de sus antecesores de México. Determinando que las cepas de *U. maydis* han sido aisladas extensamente desde el establecimiento del maíz, en los cuales no existe una gran diferencia sobre la presencia de dicho hongo; además de determinar que su presencia no es mucho mayor que la domesticación del maíz. También determinaron que la diversidad genética entre las poblaciones de *U. maydis* en México no es mayor comparadas con las de Sudamérica y USA, y que la evolución entre ellas, de igual forma no es tan grande, siendo casi simultánea en México y USA, a pesar de la diferencia en el tiempo de cultivo del maíz.

Martínez-Espinoza *et al.* (2003) determinaron la presencia de *U. maydis* en diferentes partes de plántulas de maíz infectadas con cepas de diferentes grados de virulencia, mediante PCR y en base a secuencias correspondientes a una región conservada del homeodominio de los genes *bE* de *U. maydis*. Se obtuvieron resultados exitosos a pesar de las cantidades pequeñas de ADN extraído.

2.7.1 Estudio del sistema *U. maydis* – maíz mediante métodos moleculares.

Se ha supuesto que los patógenos que se asocian con el hospedero se distribuyen geográficamente de acuerdo a la distribución de éste último, y que los efectos sufridos en él, pueden repercutir en la evolución, población y estructura del patógeno. Esto significa que la

domesticación de cultivos ha tenido enormes repercusiones en la evolución de patógenos en períodos de tiempo cortos (Munkacsi *et al.*, 2008). También se tiene la idea de que el patógeno debe tener su origen mucho tiempo antes del origen o la domesticación de la planta. No obstante, para algunos casos no se pueden establecer límites máximos para los momentos de su expansión, a pesar de los datos extensos que se tienen sobre el cultivo. Y es que la historia demográfica demuestra que las prácticas de la domesticación y de la agricultura del maíz y sus antecesores, ha afectado a los niveles globales de variación genética de *U. maydis* y su distribución geográfica (Munkacsi *et al.*, 2008; Munkacsi *et al.* 2007).

En el caso del huitlacoche, la relación simbiótica ha sido trazable experimentalmente, y de igual forma su historia evolutiva y biogeográfica, desde el antecesor del maíz (teosinte [*Zea mays ssp. parviglumis*]) hasta éste último (*Zea mays*). Determinando que los cambios recientes en la geografía y estructura genética de las poblaciones de *U. maydis* son los mismos que para el maíz (Abubakar *et al.*, 2003; Voth *et al.*, 2006). Lo cual ocurre a pesar de que *U. maydis* debe tener su origen mucho tiempo antes de la domesticación del maíz, la cual fue hace 6,000-10,000 años (Staller *et al.* 2006; citado en Munkacsi *et al.*, 2008), mientras que el maíz, fue domesticado a partir de *Z. mays ssp. parviglumis* en el sur de México aproximadamente hace 8,000 – 10,000 años (Matsuoka *et al.*, 2002). Estos datos demuestran que este sistema muestra una resistencia muy durable, a diferencia de los monocultivos, y que *U. maydis* no ha evolucionado, ya que su resistencia ha durado más de 50 años, a pesar de que en los años de 1900 se hicieron programas contra el hongo que fueron viables (Neuhauser *et al.*, 2003).

A partir de las relaciones planta – patógeno, también se ha podido relacionar los antecedentes históricos de los patógenos con la dinámica actual de los cultivos, con lo que se puede determinar la existencia de la correspondencia del origen geográfico y centro de diversidad. Por ejemplo, México es el centro de la diversidad genética de *Phytophthora infestans*, que infecta a la papa, mientras que los Andes es el centro de origen de la papa. Esto demuestra que la diversidad genética es fuertemente afectada por los acontecimientos demográficos más recientes (Zaffarano *et al.*, 2006; Brunner *et al.*, 2007; Goodwin, 1997; Grunwald y Flier, 2005; Alpizar-Gómez *et al.*, 2007, citados en Munkacsi *et al.*, 2008).

Los datos obtenidos sobre la evolución y la estructura genética del sistema maíz- *U. maydis*, también se han podido extender a otros individuos asociados a ellos, con el fin de determinar sus procesos de infección y coevolución en diferentes zonas geográficas, como es el

caso del micovirus H1 (Umv-H1). Este micovirus se estudió a partir de cepas provenientes de USA: Minnesota, Ohio, Nebraska y Carolina de del Norte, así como de México: Cuitzeo, Michoacán; Guachinango, Jalisco; Texcoco, México; Mazatlán, Guerrero; El Estanco, Jalisco; La Cabacera, Jalisco; y Francisco Villa, Durango. Los resultados sugirieron que las poblaciones dentro y entre USA y México de este virus, no se encuentran en equilibrio de la deriva y migración, tal vez por la edad de las poblaciones mexicanas o por el índice alto de migración que debe esperarse de *U. maydis* (Voth *et al.*, 2006).

2.7.2 Estudios de *U. maydis* y otros hongos con ITS.

Las regiones de ITS han sido útiles porque han permitido distinguir entre varios niveles de especies (Somai *et al.*, 2002). Al comparar una pequeña parte del genoma, los ITS son viables al revelar suficiente variabilidad para distinguir entre aislamientos y géneros, y frecuentemente para distinguir organismos a nivel de especie. Sin embargo, algunas veces las especies y ciertos aislados geográficos de una especie, han presentado secuencias idénticas o similares de ITS (Bakkeren *et al.*, 2000).

Esta técnica ha sido particularmente útil para el análisis de especies relacionadas en muchos géneros, incluyendo especies de hongos cultivados (Carbone y Kohn, 1993; Hallenberg *et al.*, 1996; Harrington y Potter, 1997; Hibbett *et al.*, 1995; Mitchell y Bresinsky, 1999; Moncalvo *et al.*, 1995a, b; Pringle *et al.*, 2000; Rehner y Uecker, 1994, citados en Zervakis *et al.*, 2004) y especies patógenas de cereales, logrando determinar diferencias genéticas entre diferentes géneros de ellos, así como el grado de especificidad con el hospedero (Roux *et al.*, 1998; Bakkeren *et al.*, 2000; Stoll *et al.*, 2003). Incluso, ha resultado viable, cuando no hay síntomas o características externas de la enfermedad (Albert y Schenck, 1996; Henson y French, 1993; Willits y Sherwood, 1998, citados en Martínez-Espinoza *et al.*, 2003).

Respecto a esta técnica, se pueden mencionar estudios específicos mediante la región ITS del ADNr, para basiomicetos comestibles como *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes*, y del género *Suillus*, obteniendo la correlación de cada especie con la biografía continental e intercontinental, así como la interrelación con otros géneros (Vilgalys y Sun, 1994; Hibbett *et al.*, 1995; Hibbett *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2000; citado en Shen *et al.*, 2002).

También se ha aplicado para determinar la relación de algunos de estos hongos comestibles con patógenos, como es el caso de la enfermedad producida en Corea del Sur a

Pleurotus por especies tradicionales y nuevas de *Trichoderma koreana* y *T. pleurota* (Park *et al.*, 2004, Hatvani *et al.*, 2007, Kullnig-Gradinger *et al.*, 2002, Park *et al.* 2004; citados en Komo-Zelazowska *et al.*, 2007).

Respecto a hongos patógenos de cereales, se puede mencionar el estudio realizado por Stukenbrock *et al.* 2007, quienes aislaron 123 cepas de *Mycosphaerell graminicola*, un hongo patógeno del trigo, provenientes del noroeste de Irán, provincia de Ardabil, una de las localidades más importantes de cultivo de trigo en Irán. De estas cepas, seleccionaron 28 para obtener su secuencia por ITS, demostrando que el grupo más fuerte se expandió extensa y globalmente gracias a las prácticas humanas y las condiciones del trigo, cuya coespeciación tomó lugar en un periodo de tiempo evolutivo corto en las granjas, siendo de 10,000 a 12,000 años, en los cuales sufrió cambios el trigo por la domesticación.

Un estudio realizado por Singh *et al.* (2005) con secuencias de ITS de *Ustilagos*, mostró las relaciones existentes entre especies cercanas de ellos. Para ello estudiaron aislamientos de *U. scitaminea* provenientes de diversas partes del mundo, mostrando que presentan una pequeña variación entre ellos, y una variación mayor con los otros *Ustilagos* estudiados (*U. bullata*, *U. tririci*, *U. nuda* y *U. maydis*).

Entre los estudios realizados para determinar la viabilidad de la región ITS, se puede mencionar el caso de Bakkeren *et al.*, (2000), quienes al determinar las secuencias de 14 cepas de *Ustilaginales*, mediante ITS y AFLP, concluyeron que los datos de las secuencias de ITS normalmente son viables para identificar organismos a nivel de género, pero no así a nivel de especies, ya que no se puede distinguir con seguridad diferencias entre ellas. No obstante, estas técnicas no mostraron desacuerdos y se complementan entre ellas. Resultados similares fueron obtenidos por Becerra *et al.* (2007) con secuencias obtenidas mediante ITS y RAPD de cepas del hongo entopatógeno *Beauveria bassiana* provenientes de diversas regiones de Chile. Los resultados obtenidos mediante RAPD mostraron un promedio de 43% de similitud entre los aislamientos, mientras que mediante ITS fue de 83%; además de que la diversidad genética no estuvo asociada con la zona geográfica de los aislamientos.

Un estudio sobre la especificidad de hongos fitopatógenos sobre sus hospederos fue llevado a cabo por Stoll *et al.* (2003). En esta investigación se determinó la relación entre y dentro de miembros de *Ustilago* y *Sporisorium*. Con ésta se demostró que con respecto a *U. maydis* existen variedades de maíz no resistentes a él, en contraste con otros cereales que no son

susceptibles a los *Ustilagos*, lo que indica que existe una habilidad aparente del maíz para defenderse de *U. maydis*. Se presume que dicha habilidad consiste en una composición genética especial, ya que aunque se supone que las prácticas llevadas a cabo sobre el cultivo de maíz ha llevado a generar una presión de selección especial de *U. maydis*, sólo a éste y a sus antecesores logra infectar. Un trabajo similar empleando además la técnica de AFLP, estableció que las relaciones filogenéticas de *Sporisoriumreilianum*, *Tilletiales*, y *Ustilaginales*, incluyendo *U. maydis*, coinciden con el origen de sus hospederos. Y más aún, con los resultados de compatibilidad en plántulas de otros cultivos, con lo que se pudo determinar que *U. maydis* únicamente se desarrolla completamente en maíz, ya que aunque se obtienen agallas en otros cultivos, no se producen teliosporas (Bakkeren *et al.*, 2000).

2.8 Diversidad genética de *U. maydis*.

U. maydis presenta una amplia diversidad fenotípica en las diferentes estructuras formadas en su ciclo de vida, es decir, en las formas, colores, tamaños, texturas y número de las teliosporas, esporidias, micelio y agallas, la cual ha sido reportada en general por Christensen (1963). La diversidad de cada una de ellas se debe a que *U. maydis* se desarrolla de diferente forma dependiendo del sustrato (parte de la planta, variedad de maíz, o medio de cultivo artificial), y de las condiciones de desarrollo (agroecológicas en el campo o de cultivo en el laboratorio). Dicha diversidad es amplia si se toma en cuenta que *U. maydis* sólo se desarrolla naturalmente en sustratos específicos como el teocintle (*Zea mexicana*), el teosinte (*Euchlaena mexicana*), y el maíz (*Zea mays*), y de que en este último, sólo se desarrolla en algunas variedades, siendo las dulces las más susceptibles.

Una parte de este trabajo desarrollado por Christensen, muestra una amplia diversidad de las características morfológicas de *U. maydis* (Cuadro 1), reconociendo que desde entonces ya existía un número indefinido de biotipos nativos, tanto haploides como diploides, además de los nuevos obtenidos por hibridación y mutación, existiendo hasta 1954, 15,000 diferentes biotipos según Rowell y DeVay (1954, citado en Christensen, 1963).

Existen pocos estudios realizados sobre la diversidad genética de *U. maydis* mediante técnicas moleculares. Por ejemplo, el realizado por Zambino *et al.*, (1997), quienes trabajaron con muestras de *U. maydis* de cuatro lugares de Minesota, mediante la técnica de PCR de los RFLPs. Sus resultados demostraron que existe una alta diversidad del locus de apareamiento *b*

dentro de las poblaciones, pero niveles muy bajos de diferenciación entre las poblaciones, y que los tipos de acoplamiento fueron encontrados a través de las distancias geográficas amplias.

Tabla 2.1 Características morfológicas de *U. maydis* documentadas por Christensen (1963).

<p>Teliosporas. Forma: elipcoidales, esféricas o globosas y subglobosas, mas o menos irregulares, muy equinuladas, angulares. Tamaño: generalmente de 7 a 11 micras de diámetro, y pocos casos mayores a 15 micras; según la fuente van de 4.8 a 30.7 micras. Color: oliva tenue a café intenso (Christensen, 1931; Clinton (1943, 1904) y Fischer (1953).</p>
<p>Esporidias. Varían según el medio artificial, la fuente y la línea -haploide o diploide-Longitud: 13.4 a 28.9 micras. Forma de esporidias primarias: regulares, hialinas, y fusiformes (Christensen, 1931).</p>
<p>Hifas haploides. Son muy finas, generalmente uninucleadas y no desarrolladas extensivamente; algunas veces pueden continuar creciendo en presencia del micelio dicariótico (Rawitscher, 1912, 1922; Ehrlich, 1958).</p>
<p>Micelio parasítico. Es uninucleado y haploide hasta que aproximadamente se forman las teliosporas (Rawitscher, 1012, 1022; Ehrlich, 1958).</p>
<p>Micelio dicariótico. El más común es irregular y variable en forma, frecuentemente ramificadas, algunas veces contorsionados. Otro tipo es fuerte, uniforme y muy extensivo. El tercer tipo es muy contorsionado y en forma de racimo. Compuestos de células uninucleadas en segmentos que llegan a ser teliosporas (Christensen, 1931; Ehrlich, 1958).</p>
<p>Células del micelio parasítico. Son binucleadas, multinucleadas y algunas veces asociadas en pares (Ehrlich, 1958; Sleumer, 1932; Lutman, 1910; Christensen, 1929, 1931; Clinton, 1900).</p>
<p>Esporidias y células hifales en la planta. Son haploides y diploides, la mayoría uninucleadas.</p>
<p>Esporidias solopatógenicas y monospóricas. Las solopatógenicas son heterotálicas, y las monospóricas ocasionalmente lo son. Presentes en agallas específicas y en algunas cruas. Las solopatógenicas no son comunes (Eddins, 1929; Christensen, 1929,1931; Gattani, 1946; Sleumer, 1932; Wilkinson y Kent, 1945).</p>

Elaboración propia a partir de Christensen (1963).

Un trabajo similar en México, fue realizado por Valverde *et al.*, (2000), quienes estudiaron 30 cepas nativas de *U. maydis* pertenecientes a cinco diferentes lugares de México (Irapuato, Toluca y Pachuca, Oaxaca, y Culiacán) mediante RFLP. Con ello se pudo determinar que la población de Irapuato fue la más divergente, mientras que las de Oaxaca y Pachuca están muy relacionadas. Sin embargo, no se encontró correlación entre las distancias genéticas y geográficas, lo que indica que existe diversidad genética considerable dentro y entre ellas.

Resultados muy interesantes se obtuvieron al estudiar siete poblaciones de *U. maydis* provenientes de Norteamérica, mediante once pruebas genómicas de RFLPs. Los resultados obtenidos muestran que no existe aislamiento por distancia, lo cual se debe a la dispersión de las esporas y las altas tasas de migración. Además de que las poblaciones mantienen altos niveles de heterocigosidad, y que no se distribuyen uniformemente entre las poblaciones genéticamente variables de maíz en las diferentes regiones geográficas donde se cultivan, lo cual se debe a que se reproduce sexualmente (Neuhauser *et al.*, 2003).

Estos estudios demuestran que las poblaciones contemporáneas de *U. maydis* muestran poca migración de genes a larga distancia, a pesar de mantener una variación sustancial y de mostrar bajos niveles de endogamia local, lo que sugiere que las prácticas modernas han modificado a *U. maydis* (Voth *et al.*, 2006; Barnes *et al.*, 2004).

2.9 El huitlacoche.

Cuando se da la interacción entre maíz- *U. maydis*, se obtiene el huitlacoche, el cual se ha consumido desde la época prehispánica debido a su sabor característico único. Incluso, actualmente su consumo va en aumento, ya que tiene una gran demanda en Europa, Japón y Estados Unidos, principalmente. Esto ha provocado que se realicen una variedad de estudios respecto a este producto, que va desde las técnicas para obtener una mayor cantidad de este producto en diferentes épocas del año, así como la determinación de propiedades nutricionales y funcionales, como se detallará a continuación.

2.9.1 Historia del consumo del huitlacoche.

México es una potencia mundial en materia de diversidad cultural indígena, las cuales tienen una antigüedad que va de varios siglos hasta milenios. En el tiempo de la conquista de Tenochtitlán se piensa que había más de cien grupos étnicos diferentes, las “Naciones Indias”

como se conocían en ese entonces. Además, si se toma en cuenta que una de las manifestaciones más importantes de la cultura es la cocina, la cual es propia para cada región o cultura. Entonces no es de sorprenderse que cada uno de estos grupos tenían sus propias costumbres gastronómicas, teniendo en común el chile, el frijol y el maíz (Iturriaga, 1998a). Y es que es bien cierto, que las costumbres y las necesidades de alimentación de las poblaciones han estado en función de los recursos disponibles en su medio ambiente, así como los que se pueden generar a partir de éste. En el caso de las culturas mesoamericanas dada la diversidad de condiciones agroecológicas de esta región, y con la consecuente biodiversidad presente en microorganismos vegetales y animales, hicieron que sus pobladores llevaran dietas ricas, no tan sólo de forma suficiente, sino en su variedad y en sus nutrientes. Esta diversidad de alimentos se encuentra bien documentada en el caso de los aztecas en el centro del país, y de los mayas en la península de Yucatán. Siendo uno de los principales autores, Bernal Díaz del Castillo, soldado de Hernán Cortés, quien describió detalladamente las actividades y productos del mercado de Tlatelolco en la capital mexicana, y de igual forma de los banquetes del emperador Moctezuma II, en su obra “Historia verdadera de la conquista de la Nueva España”. Por su parte Bernardino de Sahagún, narra las costumbres culinarias del México prehispánico, en su obra “Historia general de las cosas de Nueva España”. El dominico Diego Durán, también realizó una importante aportación de los alimentos que los aztecas recibían de otros pueblos, como impuesto o tributo, en “Historia de las Indias de Nueva España”. El franciscano Diego de Landa, de igual forma escribió sobre las costumbres de la cultura Maya en “Relación de las cosas de Yucatán”, donde destaca que la cocina prehispánica incluía varios guisos cotidianos y de temporada que estaban relacionados con las principales fiestas para honrar a los dioses del panteón indígena, con los cultivos agrícolas, y con la climatología de las estaciones del año (Iturriaga, 1998b).

En el caso del maíz tenía tanta importancia que era considerada una planta sagrada, y su aprovechamiento fue total, desde las mazorcas como alimento para el ser humano y para los animales, los estigmas como medicina, las hojas como envolturas de alimentos, los olotes como combustible y alimento para ganado, hasta el consumo de los gusanos elotereros como relleno de tortillas, así como del huitlacoche, que a pesar de su apariencia, se le consideraba un manjar de reyes en la época de los aztecas, debido a que se le consideraba como un destilado, y por ello, como materia preciosa.

Los hongos fueron utilizados por las culturas mesoamericanas en su alimentación, en la medicina, en festividades y en ceremonias religiosas. Además se utilizaban las levaduras y mohos para la elaboración de bebidas populares, como el pozol, el colonche, la tuba y el tejuino obtenidos al fermentar algunos productos como el maíz (Guzmán, 1994). Así, en la cultura Náhuatl y Maya, los hongos llegaron a tener un rango elevado al grado de considerárseles como "comida de dioses y reyes". Uno de los hongos más apreciados desde entonces fue el huitlacoche también conocido como cuitlacoche, carbón del maíz, hongo del maíz, papíotl, y pupoiol. Su consumo era exclusivo para los emperadores por ser considerado como un manjar. Sin embargo, en la actualidad el huitlacoche es uno de los hongos más consumidos en México, y por ello es el más importante, lo cual se debe a su sabor único. Esto ha hecho que no tan sólo se haya empleado para preparar platillos tradicionales de México, como el esmoloc, el cual es una bebida de Chiapas; el mole prieto de Tlaxcala que se prepara con huitlacoche deshidratado; y las tradicionales quesadillas, tacos, y otros antojitos en varias partes del centro de México. En la actualidad, el huitlacoche se cocina salteándolo en aceite o manteca con cebolla, ajo, chile fresco y epazote, siendo la forma más común de prepararlo en Puebla, Tlaxcala, Hidalgo, Michoacán, y en el D.F. También se ha considerado como uno de los platillos de la alta cocina internacional, y de la "nueva cocina mexicana", ya que se ha utilizado por chefs prestigiados en restaurantes exclusivos, preparando sopas, cremas, omelettes, budines, mousse; relleno de crepas, chiles poblanos, pechugas de pollo, ternera, escalopas de cerdo, filete de pescado; y salsas para acompañar otros platillos. Por ello, se le ha reconocido como exquisitez culinaria en diversos periódicos y revistas como "Le Monde", "New York Magazine", "Playboy", "Country Living", "Bon Appétit", "Vogue", "The Egyptian Gazette", y otras (González- Alamillo, 2010; Jiménez de León, 2007).

Por todo lo mencionado, se dice que la cocina mexicana es algo más que preparaciones indígenas conservadas a lo largo de los siglos, ya que es un injerto de ingredientes del Viejo Mundo con éstas, dando como resultado un arte culinario evolucionado a través de los siglos (Palazuelos, 1997). Por ello, muchos de ellos se han convertido en gourmets, a pesar de que durante muchos años y por la misma población europea habían sido rechazados y estigmatizados como alimentos de los pobres y prohibidos por la nueva religión (Long, 1997).

2.9.2 Propiedades nutritivas del huitlacoche.

El valor nutricional de diferentes hongos nativos reside principalmente en su contenido de vitaminas y minerales como zinc, hierro, cobre, etc. (Manzi *et al.*, 2001), de proteínas y de fibra dietética, los cuales son relativamente altos, siendo hasta 7 y 9 g/ 100 g, respectivamente, así como por su contenido bajo de calorías (30 a 130 Kcal/100 g) (Serafín- Muñoz *et al.*, 2005). Y el huitlacoche no es la excepción, ya que posee atributos nutricionales que lo hacen un alimento potencial y nutracéutico.

En este aspecto, Valverde y Paredes- López (1993), Venegas *et al.* (1995), Valverde *et al.* (1995), Paredes- López (2000), y Castro-Espinoza y Ruiz- Hernández (2003) han reportado datos dentro de rangos similares y complementarios acerca de su composición proximal en base seca, mostrando que la cantidad de proteínas es moderada (1.62 a 16.4 %), pero más alta que en el maíz y otros cereales. El contenido de hidratos de carbono y fibra es alto (53 a 66.5 % y 7.5 a 26.6 %, respectivamente), mientras que el de grasas es bajo (1.0 a 6.5 %). Cabe mencionar, que la composición proximal varía ampliamente entre los diferentes trabajos debido a la diversidad de las condiciones agroecológicas, así como por las cepas de *U. maydis* y las combinaciones que se usan de ellas. Sobre los componentes básicos de las biomoléculas mencionadas, se ha determinado que contiene aminoácidos esenciales y otros importantes por su papel en el sabor, cuyo contenido global varía entre 0.08–3.21 mg/g en base seca, siendo la lisina el de mayor proporción (3.21 mg/g), seguido de glicina, valina, leucina, y ácido glutámico, así como otros catorce aminoácidos comunes, y otros no comunes como el ácido γ -aminobutírico, ornitina, y el ácido tricotómico (Lizarraga-Guerra y López, 1996). Su contenido de ácidos grasos es elevado, siendo los predominantes el palmítico, el oléico y el linoléico, donde destaca la importancia de este último debido a que es esencial (Gunasekaran, 1972; Valverde y Paredes- López, 1993; Venegas *et al.*, 1995). Contiene también monosacáridos, de los cuales se han detectado veintisiete, siendo los más abundantes la glucosa (143.2 mg/g) y la fructosa (71.10 mg/g), seguidos del glicerol (8.5 mg/g), el sorbitol (4.45 mg/g), y el manitol (3.17 mg/g) (Lizarraga-Guerra y López, 1998).

Además contiene cantidades considerables de polifenoles, β -glucanos, azúcares libres, que lo hacen un alimento nutracéutico, por lo que pueden ayudar en la prevención de enfermedades como el cáncer y la arteriosclerosis, entre otras. Adicionalmente tiene niveles adecuados de vitaminas (tiamina, biotina, riboflavina, niacina, ácido fólico y ácido ascórbico) y

minerales como el calcio, nitrógeno, y fósforo (Paredes- López y Valverde, 2006; Castro-Espinoza y Ruiz- Hernández, 2003), y oligoelementos (en $\mu\text{g/g}$, en peso seco) como el cromo (2.15), cobre (2.22), hierro (19.0), manganeso (0.37), níquel (0.43) y plomo (1.5) (Serafín-Muñoz *et al.*, 2005). También contiene compuestos antioxidantes tales como lacasas y tirosinasas, las cuales tienen efectos antioxidantes sobre *p*- hidroxifenoles *in vitro* (Desentis-Mendoza *et al.*, 2006). Así mismo, *U. maydis* tiene genes que involucran la biosíntesis de antioxidantes de bajo peso molecular como el ácido ascórbico, glutatión, tocoferoles, NADH, y NADPH (Molina y Kahmann, 2007), los cuales podrían estar en cantidades suficientes para que el huitlacoche proporcione propiedades antioxidantes.

2.9.3 Métodos de producción de huitlacoche.

Aunque *U. maydis* ha sido ampliamente estudiado por ocasionar grandes pérdidas económicas (Martínez-Espinoza *et al.*, 2002), en México este hongo no es considerado como una plaga, ya que sólo infecta del 1 al 5 % de las plantas en un cultivo. Por ello, es aún más apreciado por los agricultores, ya que representa un excedente económico debido a que el valor de una mazorca puede llegar hasta 20 a 50 veces más que el de una sana.

Sin embargo, este interés no es nuevo, ya que desde la domesticación del maíz hace aproximadamente 8,000–10,000 años, ha sido consumido. Sin embargo, su consumo se ha incrementado en los últimos años, al grado de tener una gran demanda a nivel internacional, principalmente en Estados Unidos, Unión Europea y Japón, por considerarlo como una exquisitez, y donde es conocido como “caviar azteca”, “trufa mexicana”, “hongo del maíz” y “maizteca” (Ruiz-Herrera y Martínez-Espinoza, 1998; Paredes- López y Valverde, 2006). Por este motivo, el huitlacoche ha llegado a alcanzar un precio en el mercado de Estados Unidos hasta de 20 USD\$/ Kg, como producto congelado, aunque como producto fresco se comercializa en 11.16 USD\$/ Kg y 3.5 USD\$/ mazorca. Mientras que en México varía según la calidad como producto fresco, y de acuerdo a la temporada de cosecha (Julio y Agosto), siendo de 1.60 USD\$/ Kg para el de menor calidad (agallas reventadas) y 3.2 USD\$/ Kg para el de mejor calidad, en temporada, y hasta 6.36 USD\$/ Kg fuera de temporada, incluso ha alcanzado precios hasta de 40.28 USD\$/ Kg en invierno (Pataky, 1991, 2002; Villanueva, 1997, 1999).

Sin embargo, la producción natural o espontánea es insuficiente para el mercado, ya que en la época de mayor oferta, que es en los meses de Julio y Agosto, se comercializan entre 300 a

500 toneladas de producto fresco por año en los mercados de la ciudad de México (Kealey y Kosikowski, 1981, citado en Villanueva, 1997). Por consiguiente, su industrialización, es escasa, ya que entre los años 2000 al 2006, sólo existían seis empresas de origen mexicano y norteamericano dedicadas a comercializarlo, principalmente en forma enlatada, congelada o liofilizada (Valverde *et al.*, 2000; Pataky, 2002).

Por estas razones, los productores de maíz en México han intentado algunas técnicas para inducir la infección, principalmente durante la fertilización. Incluso, en los últimos años, se ha realizado un número considerable de investigaciones con este fin, las cuales consisten en determinar condiciones ambientales, uso de cepas nativas, mezclas de ellas y hasta cruza altamente infectivas, cantidad de inóculo, forma y época de aplicación del inóculo, etc., tanto a campo abierto como en invernadero (Villanueva, 1997). Con los cuales se ha podido demostrar la rentabilidad de dicho proceso, siendo aproximadamente de 1,990.8 USD\$/ hectárea en temporada y de 11,157.5 USD\$/ hectárea fuera de ella, según datos de Villanueva (1997) obtenidos en un experimento en una localidad del estado de Puebla.

De igual manera, investigadores de otros países, principalmente en Estados Unidos, han contribuido en estos esfuerzos. Llevándose las primeras tentativas por parte de Pataky, du Toit, Pope, McCarter, Snetselaar y Zimmerman; mientras que en México por Villanueva, Valverde, y Paredes- López como se detallará a continuación.

Probablemente los datos más antiguos con fines de producción de huitlacoche datan de 1989 por Thakur *et al.*, quienes inyectaron el inóculo en el nudo apical, con resultados muy satisfactorios. En otra investigación Pataky (1991) probó la aplicación del inóculo por medio de aspersión entre el entre sexto y octavo nudo del tallo, con resultados significativos. A partir de 1992 se utilizó la aplicación del inóculo por medio de inyección, así, se empleó la inyección transversal de mazorcas por el canal de los estigmas con cepas cruzadas, con un éxito mayor que en el caso anterior (Pope y Mc Carter, 1991 y 1992). Zimmerman y Pataky, (1992) inocularon las plantas de maíz en diferentes etapas de desarrollo, donde se obtuvieron resultados aceptables en plantas con estigmas totalmente emergidos. A partir de 1995, se ha probado este último método con algunas variantes, como el porcentaje de polinización de las mazorcas (Pataky y Kerns, 1995; Valverde *et al.*, 1995; Villanueva, 1997; Villanueva *et al.*, 1999; duToit y Pataky, 1999a; duToit y Pataky, 1999b). En el caso de Hartmann *et al.* (1996) lograron infectar con éxito total las plantas inoculadas con la cruce de cepas FB1 y FB2. Mientras que Snetselaar *et al.*,

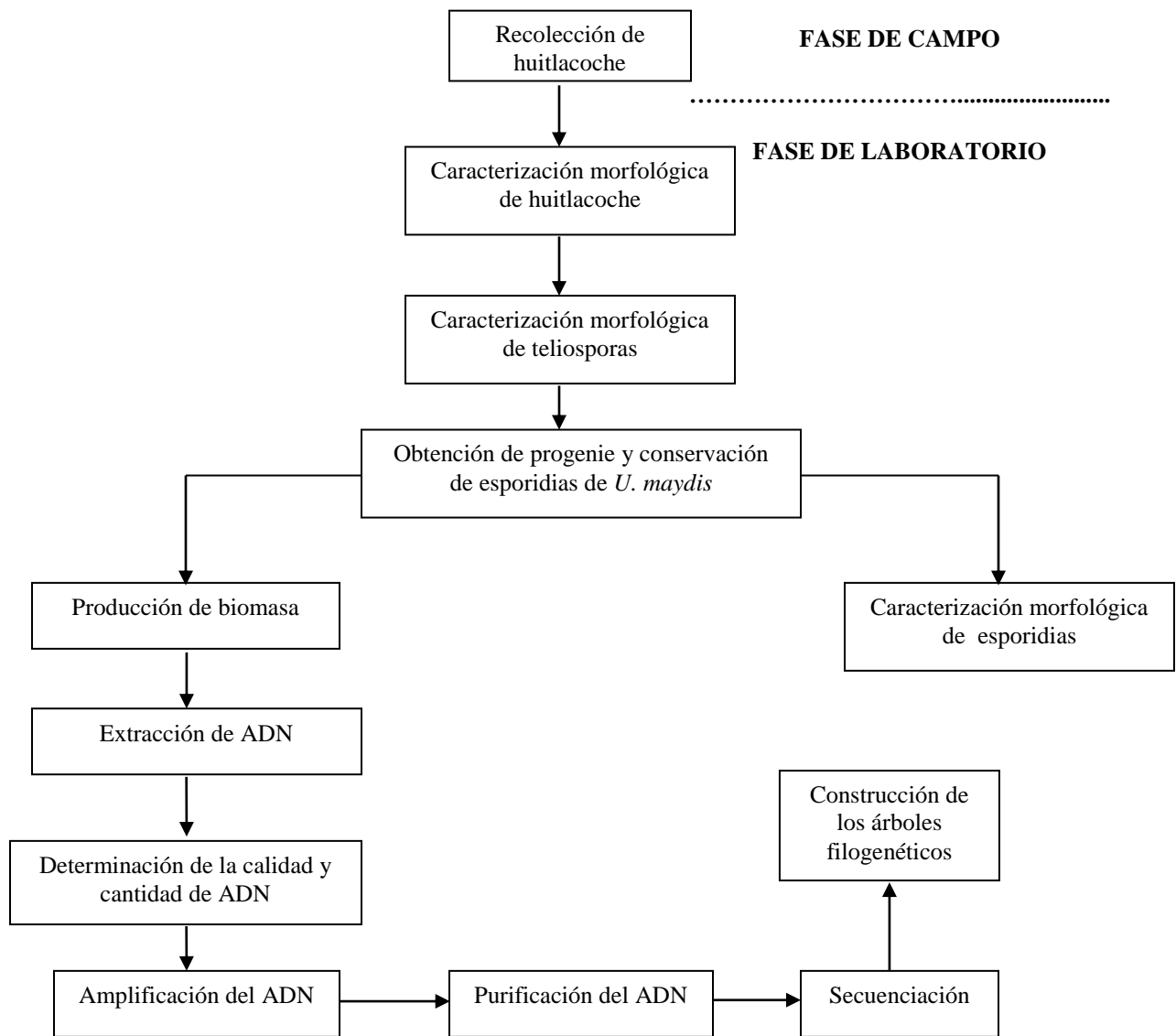
(2001) obtuvieron resultados similares al inocular las plantas cuatro días antes de la polinización. En base a estos resultados Pataky y Chandler (2003) eliminaron las espigas del maíz para evitar la polinización, sin embargo, obtuvieron resultados menos exitosos.

A pesar de todos estos resultados, algunas veces no se ha podido reproducir los resultados, lo cual se puede deber a varios factores. Uno de ellos es la aparición del hongo en el maíz, la cual depende principalmente de las condiciones ambientales y a la asociación entre la etapa de desarrollo del cultivo (Pataky, 1991). Otro factor, es la presencia de las teliosporas, ya que una sola espora de una especie de origen geográfico distinto, afecta diferencialmente el crecimiento y la fisiología de la planta a la que se asocia, tal como sucede en los hongos micorrízicos arbusculares (Koch *et al.*, 2003). También pueden afectar mecanismos de defensa específicos de la variedad de maíz contra *U. maydis*, ya que algunas de ellas pueden formar de una capa de células muertas en la zona de incisión producida por la inoculación por inyección, impidiendo que los filamentos del hongo sean incapaces de crecer más allá de esta zona (Snetselaar *et al.*, 2001).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Para lograr los objetivos planteados, la presente investigación se llevó a cabo en dos fases, la de campo y la de laboratorio, de acuerdo al diagrama de flujo presentado en la figura 3.1.

Figura 3.1 Diagrama de flujo de la metodología desarrollada



3.1 Recolección de huitlacoche.

La primera etapa de la presente investigación consistió en recolectar especímenes de huitlacoche desarrollado en las diferentes partes de la planta de maíz, es decir tanto mazorcas, como en tallos y espigas, y en algunos casos donde no se pudo obtener de estas formas, se obtuvieron sólo las agallas.

De esta forma, se logró recolectar 106 especímenes de huitlacoche entre los meses de Julio a diciembre del año 2008. Los cuales provinieron de diferentes zonas geográficas de nueve estados del centro de México (Chiapas, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Morelos, Puebla, Querétaro, Tlaxcala, y Veracruz).

Esta cantidad no hubiera sido posible sin el apoyo de amigos y académicos. Por lo que se agradece la colaboración para facilitar la recolección en los campos experimentales del Dr. Arahón Hernández (campo experimental en Huaquechula, Pue), del Dr. Abel Gil (campo experimental Huejotzingo, Pue.), y del M.C. Arturo Terrón (campo experimental INIFAP-Bajío, Celaya, Gto.). Así como la adquisición de especímenes en parcelas y mercados de otros estados por el Dr. Porfirio Morales (Tehuacán, Ver. y San Cristóbal de las Casas, Chis.), el Dr. Mario Valadéz (Querétaro, Qro.), el Dr. Daniel Martínez (Tepoztlán, Mor.) y el Biol. Wilfredo Martínez (Zacapoaxtla, Pue.).

3.2 Caracterización fenotípica.

La segunda etapa se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales del Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla, México. La cual se inició con la descripción de las características fenotípicas más relevantes de los especímenes de huitlacoche obtenidos (Anexo B1. Formato de las características fenotípicas de los especímenes de huitlacoche recolectado). Cabe mencionar que los datos solicitados en el formato se lograron completamente para casi todas las mazorcas frescas, ya que para el resto de los especímenes (mazorcas secas, agallas frescas y secas, tallos y espiga) no fue posible por su propia naturaleza (Anexo B2. Registros de los datos de las características fenotípicas de los especímenes de huitlacoche recolectado). De igual forma para las mazorcas frescas fueron las únicas que se tiene registro de sus imágenes, por considerárseles especímenes completos (Anexo B3. Fotografías de mazorcas de huitlacoche recolectadas en el centro de México).

3.2.1 Caracterización de las teliosporas.

Una vez registrados los datos de morfología de las diferentes especímenes recolectados de huitlacoche, se procedió a preparar la muestra para observar microscópicamente la estructura de las teliosporas, como se detalla a continuación.

1. Se seleccionaron 2 ó 3 agallas grandes, íntegras y llenas de teliosporas de cada espécimen.
2. Se tomó la más pequeña de ellas y se lavó con solución de detergente, enjuagándola primero con agua potable y finalmente con agua destilada estéril (ADE). El resto de las agallas se guardaron para la obtención de progenie.
3. Se tomó la agalla y se eliminó la capa externa con agujas estériles.
4. Se tomó una pequeña cantidad de teliosporas y se colocaron en un eppendorf de 1.5 mL que contenía 0.5 mL de ADE.
5. Se agitó por inmersión y se tomaron 100 μ l de solución, y se colocaron en un portaobjetos previamente desengrasado y desinfectado. Se colocó el cubreobjetos y se observó con microscopio óptico (Karl Zeiss).
6. Se tomaron datos de color, forma y tamaño de las teliosporas.

3.2.2 Obtención de progenie y conservación de esporidias.

Las agallas restantes del paso anterior, se desinfectaron y trataron para obtener progenie a partir de las teliosporas de acuerdo a Holliday (1974) modificado, como se detalla a continuación.

1. Las agallas seleccionadas se colocaron en un vaso de precipitados de 100 mL con suficiente solución de hipoclorito de sodio al 10 % para cubrirlas, dejándolas reposar por 30 segundos.
2. Se enjuagaron dos veces con ADE.
3. Se tomó una agalla y se eliminó la capa externa con agujas estériles.
4. Se tomó una cantidad suficiente de teliosporas colocándolas en un eppendorf de 1.5 mL, y se le agregó 1mL de solución de CuSO_4 al 1.5%. En caso de que la cantidad de teliosporas no fueran suficientes, se agregaron más teliosporas, ya sea de la misma agalla o de la restante.
5. Se dejó reposar por aproximadamente 14 h a temperatura ambiente y en oscuridad.
6. Se centrifugó a 2500 rpm por 15 minutos.

7. Se tomaron 100µl de solución sobrenadante y se sembró por extensión en superficie en PDAC (agar papa dextrosa (PDA, de laboratorios Bioxon) adicionado con cloranfenicol a 500 ppm). Se incubaron a 28 - 30 °C por 24 - 48 h.

8. Se seleccionaron colonias sospechosas (levaduriformes), resembrándolas por estría en PDACA (PDA adicionado con carbón activado al 1%), y se incubaron a 28 -30 °C por 24 -48 h.

9. Se seleccionaron colonias levaduriformes sospechosas y se resembraron por estría en placas con PDA. Se Incubaron a 28 -30 °C por 24 -48 h.

10. Se conservaron en refrigeración por 14 días como máximo, tiempo tras el cual se resembraron continuamente en ese período.

Nota: Todo el material aislado se encuentra depositado en el Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla, en donde se mantiene y conserva en PDA.

3.2.3 Caracterización de esporidias.

Las esporidias obtenidas del paso anterior fueron caracterizada mediante microscopio óptico (Karl Zeiss) de forma similar que las teliosporas, sólo que para este caso se tomó una colonia de la cepa, en lugar de una cantidad de teliosporas.

3.2.4 Análisis estadístico de los datos de caracterización fenotípica.

Para el análisis de los datos morfológicos de los especímenes de huitlacoche, así como de las teliosporas y las esporidias, se obtuvieron correlaciones de ellos mediante el programa SPSS 15.0.

3.3 Caracterización genética de las cepas aisladas de *U. maydis*.

Una vez que se obtuvieron las esporidias de cada cepa, se procedió a determinar su filogenia, para lo cual se inició con la generación de suficiente biomasa, hasta obtener el árbol filogenético de todas las cepas como se detalla a continuación.

3.3.1 Producción de biomasa.

Para obtener el ADN, primero se tuvo que producir suficiente cantidad de biomasa de cada cepa, lo cual se logró bajo el siguiente procedimiento.

1. Se tomó aproximadamente un centímetro cuadrado de colonias de cada cepa y colocó en un tubo con 5 mL de medio líquido de papa dextrosa (PDB, de laboratorios Bioxon) estéril. Y se incubó a temperatura ambiente a 175 rpm por 24 h.
2. Se tomaron 3 mL del cultivo y se adicionaron a 5 mL de PBD estéril fresco. Se incubó a 175 rpm y a temperatura ambiente por 48 h.
3. Se pasó el medio a tubos de centrífuga y se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos.
4. Se eliminó el sobrenadante y las células se enjuagaron dos veces por centrifugado con 1 mL de ADE. Se pasaron a un eppendorf de 2 mL eliminando el exceso de ADE.
5. Los eppendorf se introdujeron a nitrógeno líquido por 30 s. Se mantuvieron en congelación hasta la liofilización.
6. La biomasa contenida en los eppendorf se liofilizó por 24 h.
7. Se conservó a temperatura ambiente y en un lugar seco hasta la extracción de ADN, lo cual no debe sobrepasar 2 meses.

3.3.2 Extracción de ADN.

La extracción de ADN de cada aislamiento se realizó de acuerdo a Challen *et al.* (1995):

1. Se agregaron 650 µl de buffer de extracción (KCl 1M, EDTA 0.5M a pH 8.0, Triton al 20% y H₂O destilada estéril) al eppendorf que contenía la biomasa de la cepa y se homogenizó.
2. Se le agregó 3 µl de RNAasa mezclando por inmersión.
3. Se incubó a baño María a una temperatura de 70 °C por 30 min.
4. Se centrifugó a 13,000 rpm a temperatura ambiente por 10 min.
5. Se tomó el sobrenadante y se filtró en una columna del Kit Quiagen (Plasmid Mini Kit, Cat N°12125), previamente equilibrada con 1 mL de buffer QBT.
6. Se lavó 4 veces con 1 mL de buffer QC.
7. Se eluyó con 700 µl de buffer QF y se colectó en un eppendorf de 1.5 mL.
8. Se adicionaron 700 µl de 2-propanol para precipitar el ADN, mezclando por inmersión.
9. Se esperó dos minutos y se centrifugó por 20 minutos a 13,000 rpm.
10. Se eliminó el 2- propanol, y se lavó el pellet con 500 µl de etanol al 70%.
11. Se centrifugó por 10 minutos a 13,000 rpm, y se eliminó el etanol.
12. Se secó el pellet en estufa por 30 min.

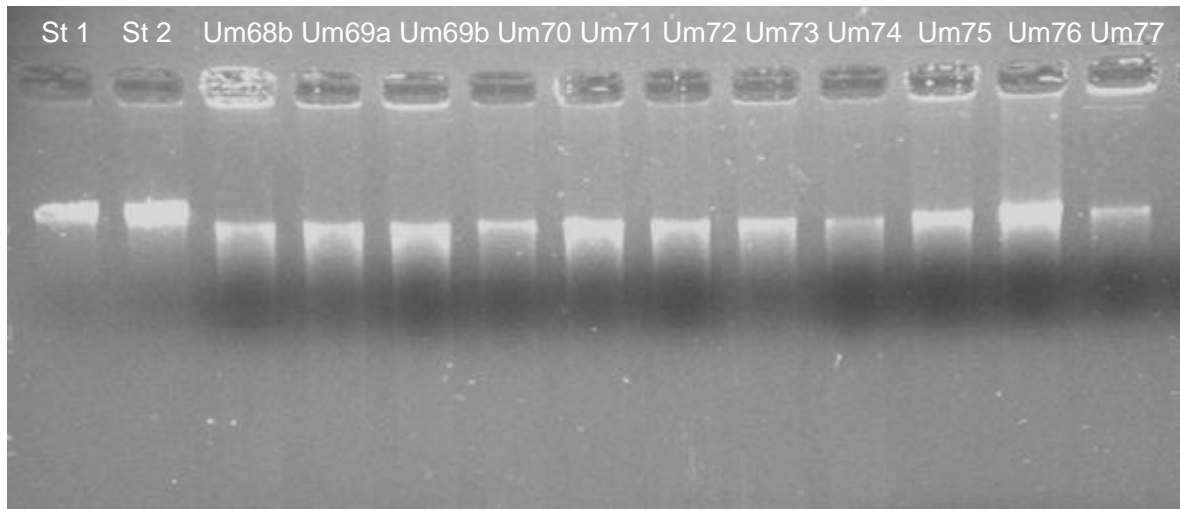
13. El pellet se resuspendió en 20 μ l de TE.
14. Se incubó en baño María por 30 minutos.
15. Se conservó en refrigeración hasta la determinación de la calidad del ADN.

3.3.3 Determinación de la calidad del ADN.

La calidad del ADN se determinó por el método de Sambrook *et al.*, (1989).

1. En un gel de agarosa al 1% suplementado con bromuro de etidio (1 μ l / 100 mL), se colocó en cada celda una mezcla de ADN constituida por 2 μ l de ADN, 2 μ l de colorante y 6 μ l de buffer TE.
2. En otras dos celdas se colocaron los estándares, el estándar 1: 1 μ l λ DNA = 10 ng, y el estándar 2: 2 μ l λ DNA = 20 ng.
3. El gel se corrió por electroforesis a 70 V por 85 min.
4. Inmediatamente se determinó la calidad y cantidad del ADN en el transiluminador UV (Gel Doc 2000, Bio- Rad) que se controla por el micropocesador “Quantity one” (Figura 3.1)
5. Las muestras cuyo ADN resultó de calidad y cantidad adecuada, se mantuvieron en congelación hasta su uso para el PCR.

Figura 3.2 Gel de agarosa de algunas cepas de *U.maydis* aisladas para determinar la cantidad y calidad del ADN extraído



3.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El ADN con las características mencionadas, se amplificó diferencialmente, mediante PCR, la región ITS1 (5´TCCGTAGGTGAACCTGCGG´3) e ITS4 (5´TCCTCCGCTTATTGATATGC´3) del rADN, mediante el siguiente procedimiento.

1. En un eppendorf de 200 µl, se adicionaron 5 µl de ITS1, 5 µl de ITS4, 25 µl de PCR Master y 15 µl de una solución de ADN con agua de PCR que contenían 40 ng/µl de ADN, para tener un volumen total de 50 µl.
2. Se colocó en el termociclador Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer) bajo las siguientes condiciones. Un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 1 min., seguida por 30 ciclos de 94 °C por 30 seg., 50 °C por 45 seg, 72 °C por 5 min. y un periodo final de extensión a 72 °C por 5 min.
3. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa del mismo modo que para el caso de ADN descrito anteriormente, excepto que en lugar de colocar los dos estándares mencionados, se colocaron 3µl de DNA Molecular Weight Marker III, 0.12 - 21.20 (Figura 3.2)
4. La visualización de las bandas se realizó bajo luz ultravioleta del mismo modo que para el ADN mencionado arriba.

3.3.5 Purificación de los productos de PCR.

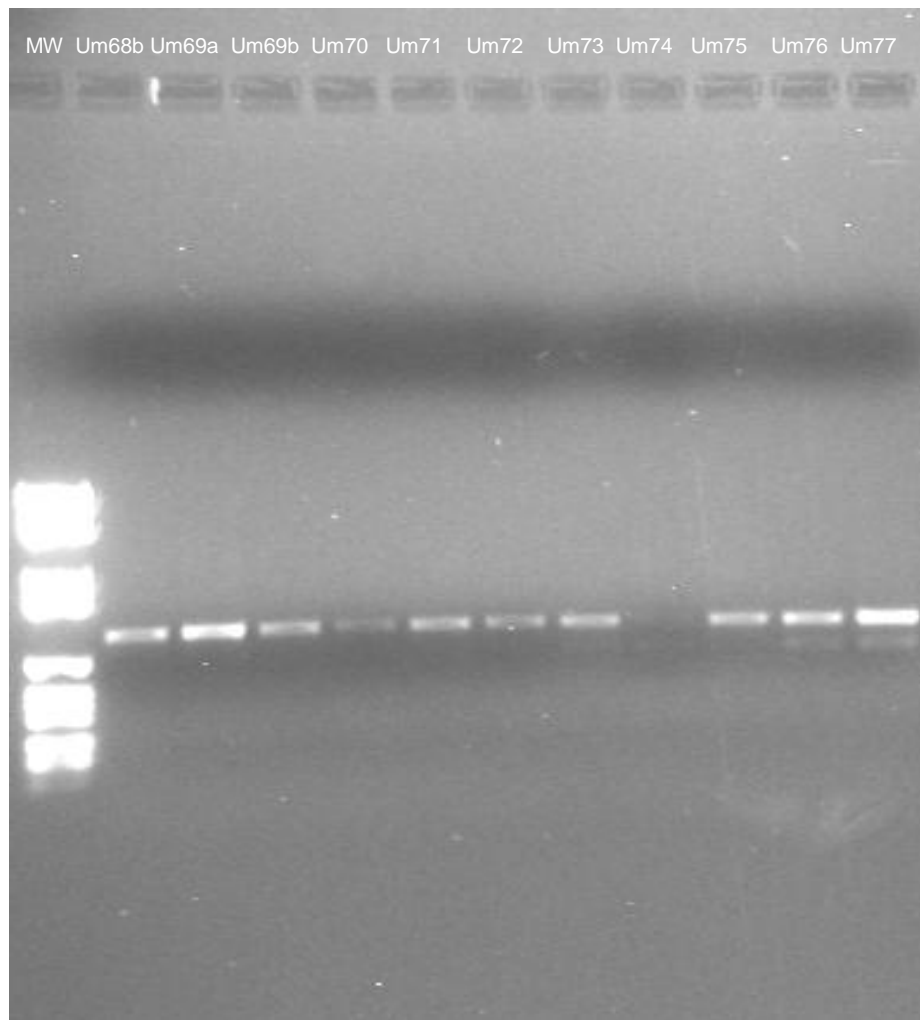
Los productos de PCR se purificaron utilizando el Kit Quiagen (QIA quik PCR Purification, Cat. N° 28106).

1. En una columna del Kit se adicionó 5 volúmenes de PB a un volumen del producto de PCR.
2. Se centrifugó a 13,000 rpm por 1 minuto.
3. Se agregaron 750 µl de PE.
4. Se centrifugó a 13,000 rpm por 1 minuto.
5. Se eliminó el filtrado y se colocó un eppendorf de 1.5 mL para recuperar el siguiente filtrado.
6. Se adicionó 30 mL de EB o de agua de PCR. Se dejó reposar por 1 minuto y se centrifugó a 13,000 rpm por 1 minuto.
7. El filtrado obtenido, es el producto de PCR purificado.

8. Los productos de PCR purificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa del mismo modo que para el caso de ADN descrito anteriormente, pero además se colocaron 3µl de DNA Molecular Weight Marker III, 0.12 - 21.20, y de igual forma el estándar 1: 1µl λ DNA = 10 ng, el estándar 2: 2µl λ DNA = 20 ng (Figura 3.3).

9. La visualización de las bandas se realizó bajo luz ultravioleta del mismo modo que para el ADN mencionado arriba.

Figura 3.3 Gel de agarosa de algunas cepas de *U. maydis* aisladas para determinar los productos de PCR



3.4 Secuenciación.

Los productos de PCR purificados se enviaron a secuenciar a *SeqWright* por secuenciación directa de cada una de las cepas de *U. maydis* (Anexo A1. Secuencias de ITS-4 de *Ustilago maydis* del centro del centro de México).

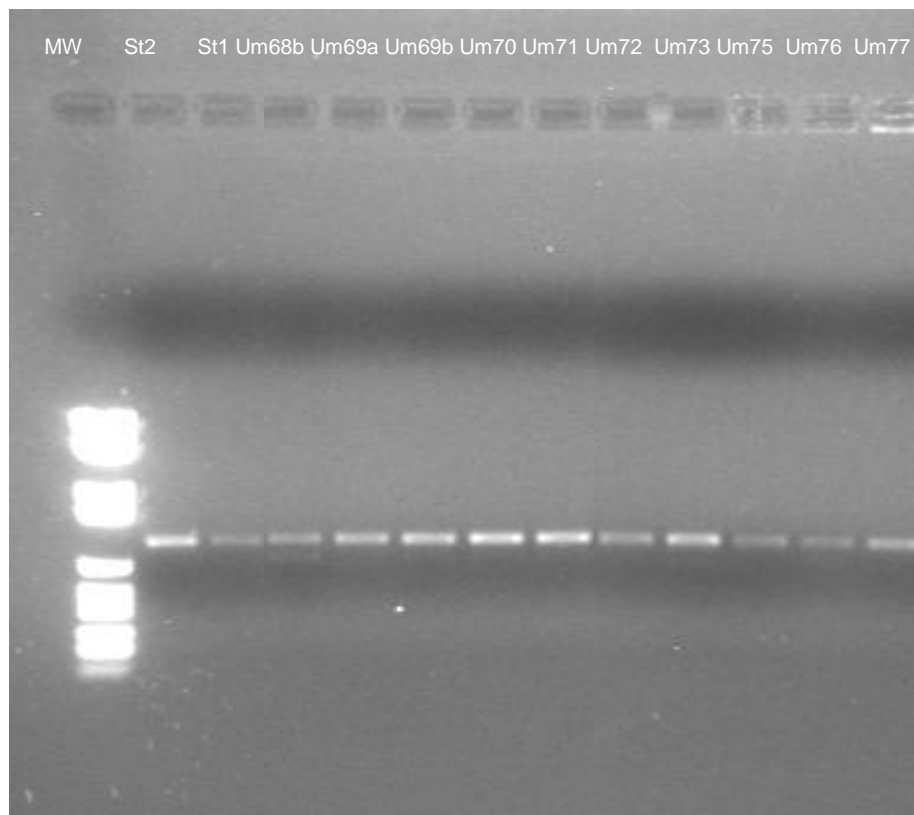
3.5 Alineación de secuencias.

Una vez obtenidas las secuencias de cada cepa de *U. maydis*, se procedió a recortarlas y alinearlas manualmente con el programa M4: Aligment Explorer/CLUSTAL de MEGA 4.0.2.

Para realizar inferencias filogenéticas más confiables, se procedió a bajar secuencias de especies y de géneros similares (*Ustilagos*, *Sporosorium* y *Puccina*) reportadas en el GenBank de BLAST del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) mediante la búsqueda por similitud (mayor a 90%).

Gel de agarosa de algunas cepas de *U. maydis* aisladas para determinar los productos purificados de PCR

Figura 3.4 Gel de agarosa de algunas cepas de *U. maydis* aisladas para determinar los productos purificados de PCR



3.6 Construcción de los árboles filogenéticos.

Las secuencias recortadas y alineadas fueron editadas y se usaron para construir los dendogramas que permitieran tener una idea de la filogenia de los especímenes estudiados. Para ello se utilizó el método de clustal de Máxima Parsimonia del *software* Mega 4.0.2 (<http://www.megasoftware.net/mega41.html>).

IV. RESULTADOS

De acuerdo a la metodología planteada en el capítulo anterior, se obtuvieron los siguientes resultados.

4.1 Caracterización del huitlacoche.

Se obtuvieron 106 especímenes de huitlacoche de 42 zonas geográficas de nueve estados de México (Tablas 4.1 y 4.2), donde la mayoría de los especímenes fueron obtenidos en diversas localidades del estado de Puebla (52.83%) debido a la mayor accesibilidad a las diferentes fuentes de obtención de las muestras recolectadas. En primer término, la fuente de adquisición más abundante correspondió a los campos experimentales (54.72%), en vista de que en estos el huitlacoche no se recolecta por el personal de apoyo o trabajadores de campo porque es parte de los datos experimentales; sin embargo, se permitió coleccionar sólo las agallas que habían infectado a la mazorca. La segunda fuente correspondió a los mercados y tianguis locales y regionales (36.79%), ya que en la mayor parte de las parcelas de maíz de la región centro de México, los propietarios y los jornaleros o peones de la localidad recolectan el huitlacoche y lo llevan a vender a los mercados más cercanos. Y finalmente, el resto de los especímenes (8.49%) se recolectaron una vez solicitado el permiso correspondiente, directamente de parcelas de productores de maíz (Tabla 4.3).

Los especímenes fueron obtenidos de la forma más común que se conoce en el mercado, es decir, como mazorca o sólo las agallas (51.82 %), aunque también como mazorcas y agallas secas (41.82 %), tallos y espigas (6.36 %) en los campos experimentales (Tabla 4.4).

En la mayoría de los casos (79.25%) se pudo obtener los datos del maíz de cada espécimen (Tabla 4.5).

Debido a que el índice de severidad se calcula en base a la proporción del área cubierta con agallas de la mazorca (Villanueva, 1997), este dato se pudo obtener sólo para 93 especímenes (Tabla 4.6, Tabla 4.7, y Tabla 4.8).

También se caracterizaron las agallas de las mazorcas frescas, obteniendo datos de color (blancas, grises, negras), textura (blandas, firmes, duras) y tamaño (chicas, medianas y grandes) que presentaban la mayoría de las agallas (Tabla 4.9). Donde se puede ver que la mayoría de las agallas en las mazorcas frescas, fueron firmes, medianas y de color gris.

Tabla 4.1 Distribución geográfica de los especímenes de huitlacoche recolectados en cada estado de México.

Estado de procedencia	Nº de localidades	Nº de especímenes	% de especímenes
Chiapas	1	1	0.94
Estado de México	6	17	16.04
Guanajuato	1	20	18.87
Hidalgo	2	2	1.89
Morelos	1	1	0.94
Puebla	25	56	52.83
Querétaro	1	3	2.83
Tlaxcala	2	2	1.89
Veracruz	1	2	1.89
Otras *	2	2	1.89
TOTAL	42	106	100

*Desconocidas (Puebla o Guanajuato), Hongos de México (Toluca, Edo. de Mex.)

Tabla 4.2 Distribución geográfica de los especímenes de huitlacoche recolectados en cada localidad de cada estado.

Nº	Localidad y/o municipio del estado de Puebla	Nº	Localidad y/o municipio del estado de Puebla
1	Acatzingo	2	Sn. Felipe Otlatepec, Tepexi de Rodríguez
1	Actipan de Morelos	1	Sn. Félix Hidalgo, Atlixco
1	Altepexi, Tehuacán	1	Sn. Gregorio Zaxcapexpan, Cholula
1	Azumiatla	1	Sn. Jerónimo Tecuanipa
1	Benito Juárez de Reyes, Tepeca	1	Sn. Mateo Capultitlán, Huejotzingo
1	Central de abastos, Cd. Pue.	21	Sn. Miguel Papaxtla, Cholula
1	Chietla	1	Sn. Pedro Teyuca
1	Coyula, Atlixco	1	Sn. Salvador Huixcolotla
3	Esperanza	1	Sta. Ma. Techachalco, Cd. Serdán
5	Huaquechula	3	Tehuacan
1	Izúcar de Matamoros	1	Tepeaca
2	Libres	2	Zacapoaxtla
1	Sn.Buena Aventura, Cholula		

Nº	Localidad y/o municipio de cada estado	Nº	Localidad y/o municipio de cada estado
	Estado de México		Morelos
11	Temac, Texcoco	1	Tepoztlán
1	Tlalomulco, Toluca		Veracruz
1	Milpa Alta	2	Tihuatlán
1	Toluca		Querétaro
2	Ixtlahuaca, Toluca	3	La Solana, Sta.Rosa Jauregui, Querétaro
1	Central de abastos		Guanajuato
	Hidalgo	20	Celaya
1	Hidalgo		Chiapas
1	Zaragoza	1	San Cristóbal de las Casas
	Tlaxcala		Otros orígenes
1	Sn.José Atoyatenco	1	Desconocida (Puebla o Guanajuato)
1	Sn.Diego Xocoyucan, Ixtacuitla	1	Hongos de México (Toluca, Edo. de Mex.)

Tabla 4.3 Relación de la cantidad de especímenes de huitlacoche obtenidos de acuerdo a la fuente de adquisición.

N° Especímenes	(%)	Tipo de fuente de adquisición
CAMPOS EXPERIMENTALES		
20	(18.87)	INIFAP- Bajío (Celaya, Guanajuato).
11	(10.38)	Colegio de Postgraduados <i>Campus</i> Montecillos (Temac, Tecoco, Edo. de México)
21	(19.81)	Colegio de Postgraduados <i>Campus</i> Puebla (San Mateo Calputitlán, Huejotzingo, Puebla)
5	(4.72)	Colegio de Postgraduados <i>Campus</i> Puebla (Huaquechula, Huaquechula, Puebla)
1	(0.94)	Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala (San Diego Xocoyucan, Ixtacuixtla de Mariano Matamoros, Tlaxcala)
CENTRALES DE ABASTOS, MERCADOS Y TIANGUIS		
39	(36.79)	Puebla, Edo. de México, Chiapas, Morelos, Querétaro, Tlaxcala, Hidalgo.
PARCELAS DE PRODUCTORES DE MAÍZ		
9	(8.49)	Libres, Pue., Tepexi de Rodríguez, Pue., Chietla, Pue., Tihuatlán, Ver., Zaragoza, Hgo.

Tabla 4.4 Relación de la forma en que se presenta el huitlacoche en los especímenes recolectados en cada estado.

Estado		Forma				Tallo	Espiga	Total
		Mazorca F*	Agallas F*	Mazorca S*	Agallas S*			
Puebla		33	4	20	0	2	0	59
Edo. de Méx.		1	4	3	7	1	0	16
Veracruz		3	0	0	0	0	0	3
Varios		4	5	0	0	0	0	9
Querétaro		3	0	0	0	0	0	3
Guanajuato		0	0	0	16	3	1	20
Total		44	13	23	23	6	1	110

* F: fresca(s), S: seca(s).

Tabla 4.5 Relación de la variedad de maíz en que se presenta el huitlacoche en los especímenes recolectados en cada estado.

Estado		Maíz					Total	
		Blanco	Amarillo	Azul	Rojo	Pinto 2*		Pinto 3*
Puebla		40	3	3	1	0	0	47
Edo. de Méx.		8	2	0	0	0	0	10
Veracruz		3	0	0	0	0	0	3
Varios		5	0	0	0	0	0	5
Querétaro		1	0	0	1	1	0	3
Guanajuato		11	1	2	1	3	2	20
Total		68	6	5	3	4	2	88

Pinto 2: rojo - blanco, y azul - rojo; Pinto 3: azul- rojo- blanco, y azul- rojo- amarillo.

Tabla 4.6 Relación del índice de severidad con que se obtuvieron los especímenes de huitlacoche en cada estado.

		Severidad*				Total
		Índice 1	Índice 2	Índice 3	Índice 4	
Estado	Puebla	12	13	5	23	53
	Edo. de Méx.	1	5	1	4	11
	Veracruz	0	2	0	0	2
	Varios	0	1	1	2	4
	Querétaro	1	1	0	1	3
	Guanajuato	3	0	0	17	20
Total		17	22	7	47	93

* Porcentaje del área de la mazorca cubierta con agallas aproximadamente (Índice 1: 1-25%; Índice 2: 26 – 50%; Índice 3: 51-75%; Índice 4: 76-100%).

Tabla 4.7 Relación del índice de severidad de los especímenes de huitlacoche y la variedad de maíz.

		Severidad				Total
		Índice 1	Índice 2	Índice 3	Índice 4	
Maíz	Blanco	11	17	7	31	66
	Amarillo	3	1	0	2	6
	Azul	1	2	0	2	5
	Rojo	0	0	0	3	3
	Pinto 2	2	0	0	2	4
	Pinto 3	0	0	0	2	2
Total		17	20	7	42	86

Nota: Sólo son 74 especímenes, ya que sólo se tomaron en cuenta las mazorcas con índice de severidad y variedad de maíz conocidos.

Tabla 4.8 Relación del número de especímenes de huitlacoche de acuerdo al índice de severidad, estado de procedencia y variedad de maíz.

Estado y Variedad de maíz	N° de especímenes según el índice de severidad				Estado y Variedad de maíz	N° de especímenes según el índice de severidad			
	1	2	3	4		1	2	3	4
GUANAJUATO					PUEBLA				
Blanco	1			6	Blanco	7	10	5	13
Azul				1	Azul		1		
Amarillo				1	Amarillo	1			1
Rojo				1	ESTADO DE MÉXICO				
Pinto	1			2	Blanco	1	4	1	4
(azul, rojo)					Amarillo		1		1
Pinto (azul, rojo, amarillo)				1	TLAXCALA				
Pinto (azul, rojo, blanco)				1	Blanco				1
QUERÉTARO					VERACRUZ				
Blanco		1			Blanco				2
Rojo				1	MORELOS				
Pinto (rojo, blanco)	1				Blanco				1
					CHIAPAS				
					Blanco				1
					DESCONOCIDO (PUEBLA O GUANAJUATO)				
					Blanco				1

Tabla 4.9 Características de la mayoría de las agallas de las mazorcas frescas recolectadas.

Parámetro	Valor		
	N° de especímenes		
Textura	Blandas	Firmes	Duras
	18	32	6
Tamaño	Chicas	Medianas	Grandes
	6	33	14
Color	Blancas	Grises	Negras
	7	30	19

4.2 Caracterización de las teliosporas y esporidias

Se caracterizaron las teliosporas de 110 agallas, ya que de algunas localidades se obtuvo más de una mazorca de la misma parcela y de la misma variedad de maíz, analizando sólo 2 mazorcas de cada una. En este caso se tienen las cepas Um 58 (Um 58a, Um 58b), la Um 65 (Um 65a y Um 65b), la Um 68 (Um 68a y Um 68b), y la Um 69 (Um 69a y Um 69b).

Las teliosporas se observaron al microscopio, determinando que todas son equinuladas, aunque algunas presentan una pared más gruesa que otras. Todas presentan color de verde olivo a café oscuro e incluso negro dependiendo del estado de madurez de la agalla y de la cantidad de teliosporas observadas a simple vista, ya que aunque las agallas fueran grandes, no necesariamente presentaban más teliosporas en su interior. En general se pudo observar que presentaban un color verde olivo para las más inmaduras o con menor número de teliosporas, y café oscuro o negras para las más maduras o con mayor número de teliosporas.

En cuanto al tamaño de las teliosporas, se puede ver que la mayoría (64.29%) de los especímenes presentó forma esférica con diámetros que van de las 10 a las 17.5 micras, siendo las más abundantes (25.93 %) las que presentaban un diámetro promedio de 12.5 micras [Tabla 4.10 (a)]. El resto, presentó una forma ovoide con dimensiones que van de 12.5 a 17.5 micras de largo, y 10 a 17.5 micras de ancho, siendo las más abundantes (14.29 %) las de 12.5 x 11.25 micras, como se puede observar en la Tabla 4.10 (b).

Tabla 4.10 Dimensiones de las teliosporas de las agallas analizadas.

a) Esféricas			b) Ovoides		
Diámetro (µm)	Código tamaño	% de especímenes	Largo x ancho (µm)	Código tamaño	% de especímenes
10.00	1	9.47	12.50 x 10.00	3	2.38
11.25	2	7.11	12.50 x 11.25	4	14.29
12.50	5	16.59	13.75 x 11.25	6	7.14
13.75	7	4.74	15.00 x 10.00	8	2.38
15.00	10	14.22	15.00 x 12.50	9	4.76
16.25	11	2.36	17.50 x 15.00	12	2.38
17.50	13	9.47	20.00 x 17.50	14	2.38

En referencia a la morfología de las colonias crecidas en placas de PDA a temperatura ambiente, en general se presentaron colonias de color casi blanco a crema claro, tanto levemente brillosas como opacas, estas dos características no se mantienen en cada cepa, y por consiguiente no se pudo precisar el porcentaje de cepas con dichas características. Sin embargo, sus características microscópicas sí se pudieron analizar. De esta forma, las esporidias observadas bajo el microscopio presentan forma alargada con longitudes que van desde las 12.5 hasta las 32.5 micras, siendo las más abundantes (31.82%), las que presenta 25 micras de longitud. En el

caso del ancho, que sería una aproximación de su diámetro, la mayoría (83.64 %) tienen un ancho de 5 micras (Tabla 4.11).

Cabe mencionar que se cuenta con una colección de 117 cepas, ya que de la cepa Um 26 se tienen dos aislamientos: Um 26A y Um 26B, los cuales provienen de 2 colonias distintas. Mientras que de las cepas Um 58, Um 65, Um 68 y Um 69 se tiene más de un aislamiento debido a que provienen de mazorcas diferentes de una misma parcela con la misma variedad de maíz. Así, para la Um58 se tienen cinco aislamientos (Um 58a, Um 58b, Um 58c, Um 58d y Um 58e), dos de la Um65 (Um 65a y Um 65b), tres de la Um 68 (Um 68a, Um 68b y Um 68c), y dos de la Um 69 (Um 69a y Um 69b). Así como la Um 24 y la Um 25 que son cepas de laboratorio con genotipo *a* y *b* conocidos [520 (*a2,b2*) y 521 (*a1,b1*) respectivamente], usadas como testigos, las cuales fueron donadas amablemente por la Dra. Patricia Sánchez Alonso (Centro de Investigaciones Microbiológicas, Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México), siendo la 521(*a1,b2*) la reportada por Banuett (1989).

Tabla 4.11 Dimensiones de las esporidias de las cepas analizadas.

Longitud (μm)	% de aislamientos	Ancho (μm)	% de aislamientos
12.50	1.82	2.50	1.82
15.00	3.64	3.12	0.91
17.50	1.82	3.75	12.73
18.75	1.82	5.00	83.64
20.00	20.00	6.25	0.91
22.50	25.50		
23.75	0.91		
25.00	31.82		
26.25	1.82		
27.50	9.09		
30.00	0.91		
32.50	0.91		

4.3 Análisis estadístico de los datos de caracterización fenotípica.

Se obtuvieron las correlaciones de los datos morfológicos de los especímenes de huitlacoche (Tablas 4.12 a 4.15), mediante el programa SPSS 15.0. Encontrando correlaciones en el origen y el índice de severidad (Tabla 4.12), y entre el origen y la variedad de maíz (Tabla 4.13). Y de igual forma se encontró correlación entre las características de las agallas, como son entre el color y la textura (Tabla 4.14), y entre el tamaño y la textura (Tabla 4.15). Sin embargo,

no se encontró correlación entre el índice de severidad con la mayoría de las características del huitlacoche, ni con la morfología de las teliosporas y las esporidias.

Tabla 4.12 Correlación entre el estado de procedencia del huitlacoche recolectado y el índice de severidad presentado en ellos.

		Estado	Severidad
Estado	Correlación de Pearson	1	.231(*)
	Sig. (bilateral)		.026
	N	110	93
Severidad	Correlación de Pearson	.231(*)	1
	Sig. (bilateral)	.026	
	N	93	93

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Tabla 4.13 Correlación entre el estado de procedencia del huitlacoche recolectado y la variedad de maíz donde se presentó.

		Estado	Maíz
Estado	Correlación de Pearson	1	.414(**)
	Sig. (bilateral)		.000
	N	110	87
Maíz	Correlación de Pearson	.414(**)	1
	Sig. (bilateral)	.000	
	N	87	87

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Tabla 4.14 Correlación entre el color y la textura de las agallas del huitlacoche recolectado.

		Color	Textura
Color	Correlación de Pearson	1	-.733(**)
	Sig. (bilateral)		.000
	N	56	56
Textura	Correlación de Pearson	-.733(**)	1
	Sig. (bilateral)	.000	
	N	56	56

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Tabla 4.15 Correlación entre el tamaño y la textura de las agallas del huitlacoche recolectado.

		Tamaño	Textura
Tamaño	Correlación de Pearson	1	-.295(*)
	Sig. (bilateral)		.032
	N	53	53
Textura	Correlación de Pearson	-.295(*)	1
	Sig. (bilateral)	.032	
	N	53	56

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

4.4 Evaluación de la diversidad genética.

La evaluación de la diversidad genética se realizó con las secuencias de 36 cepas nativas (Tabla 4.16), además de una testigo (Um 24), cuyo peso molecular varió entre 776 a 833 bp. También se incluyeron cuatro secuencias de *U. maydis* externas, así como cuatro *Ustilagos*, *Sporosorium* y una *Puccinia* como grupos externos (ver Tabla 4.17), obtenidas en la base de datos del *GenBank*.

Se realizó el análisis de Máxima Parsimonia de las secuencias de los datos generados a partir del primer ITS-4 de las cepas aisladas en el presente trabajo, así como de otros *Ustilagos* y otros *U. maydis* procedentes de otros países, y de *P. caricina* y *S. sorgi* como grupos externos para enraizar el árbol. Obteniendo de esta forma el árbol consenso más parsimonioso (Figura 4.1) con un análisis de bootstrap de 1,000 réplicas.

Tabla 4.16 Cepas secuenciadas de algunas zonas geográficas del centro de México.

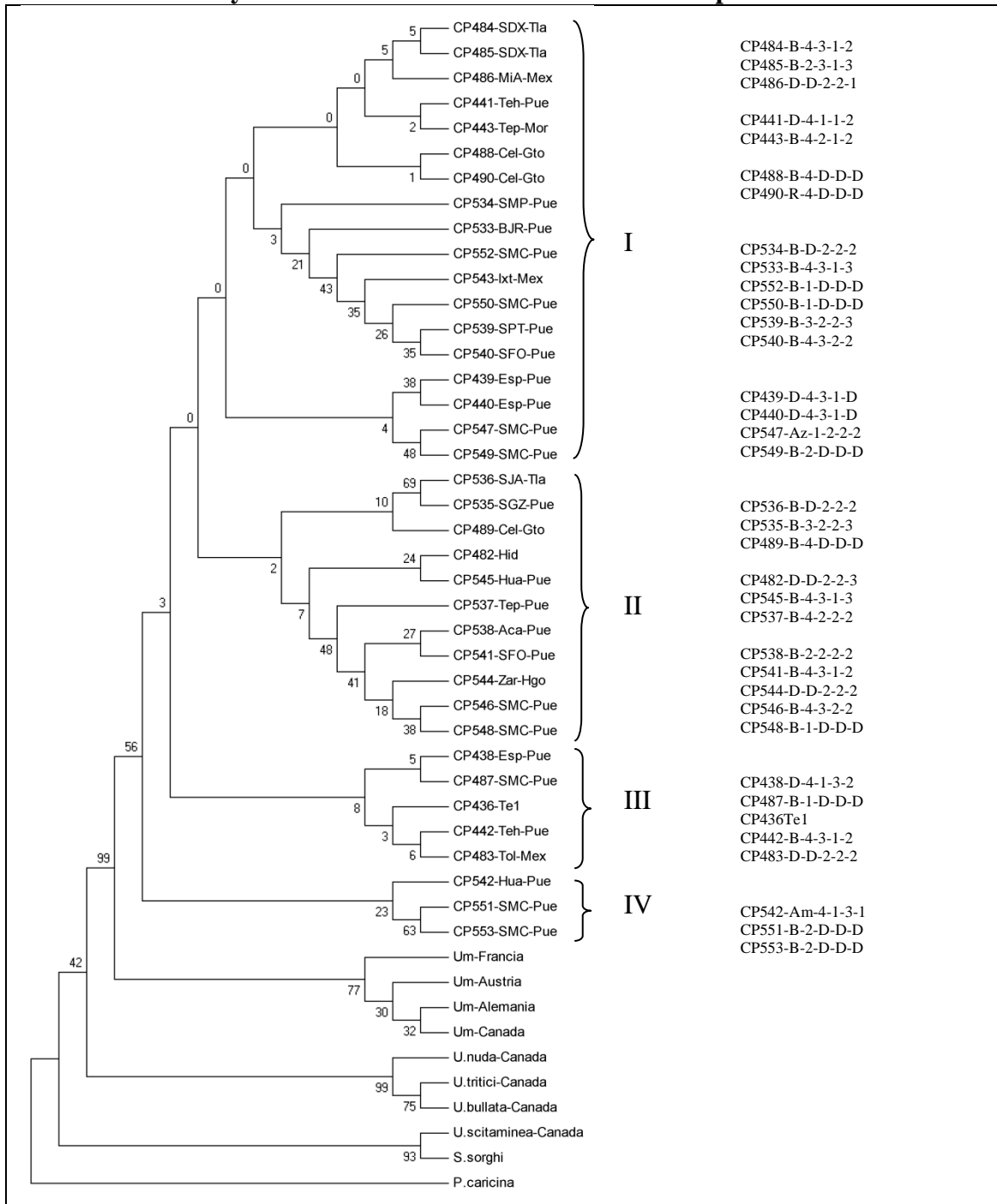
Cepa	Código CP	Procedencia (Clave)
Um24	(CP436)	Testigo 1 (Te1)
Um27	(CP438)	Esperanza, Pue. (Esp-Pue)
Um28	(CP439)	Esperanza, Pue. (Esp-Pue)
Um29	(CP440)	Esperanza, Pue (Esp-Pue)
Um30	(CP441)	Tehuacán, Pue. (Teh-Pue)
Um32	(CP442)	Tehuacán, Pue. (Teh-Pue)
Um33	(CP443)	Tepoztlán, Mor. (Tep-Mor)
Um62	(CP482)	Hidalgo (Hid)
Um64	(CP483)	Toluca, Edo. de Mex (Tol-Mex)
Um65a	(CP484)	Sn. Diego Xocoyucan, Tlax. (SDX-Tla)
Um65b	(CP485)	Sn. Diego Xocoyucan, Tlax. (SDX-Tla)
Um67	(CP486)	Milpa Alta, Edo. de Mex. (MiA-Mex)
Um90	(CP487)	Sn. Mateo Capultitlán, Huehotzingo, Pue. (SMC-Pue)
Um104	(CP488)	Celaya, Gto. (Cel-Gto)
Um106	(CP489)	Celaya, Gto. (Cel-Gto)
Um109	(CP490)	Celaya, Gto. (Cel-Gto)
Um40	(CP533)	Benito Juárez de Reyes, Tepeaca, Pue. (BJR-Pue)
Um41	(CP534)	Sn. Miguel Papaxtla, Cholula, Pue. (SMP-Pue)
Um42	(CP535)	Sn Gregorio Zacapexpan, Cholula, Pue. (SGZ-Pue)
Um43	(CP536)	Sn José Atoyatenco, Tlax. (SJA-Tla)
Um44	(CP537)	Tepeaca, Pue. (Tep-Pue)
Um45	(CP538)	Acatzingo, Pue. (Aca-Pue)
Um49	(CP539)	Sn Pedro Teyuca, Pue. (SPT-Pue)
Um53	(CP540)	Sn Felipe Otlaltepec, Tepexi de Rodriguez, Pue. (SFO-Pue)
Um54	(CP541)	Sn Felipe Otlaltepec, Tepexi de Rodriguez, Pue. SFO-Pue)
Um55	(CP542)	Huaquechula, Pue. (Hua-Pue)
Um63	(CP543)	Ixtlahuaca, Toluca, Edo. de Mex. (Ixt-Mex)
Um66	(CP544)	Zaragoza, Hgo. (Zar-Hgo)
Um69b	(CP545)	Huaquechula, Pue. (Hua-Pue)
Um73	(CP546)	Sn Mateo Capultitlán, Huehotzingo, Pue. (SMC-Pue)
Um74	(CP547)	Sn Mateo Capultitlán, Huehotzingo, Pue. (SMC-Pue)
Um75	(CP548)	Sn Mateo Capultitlán, Huehotzingo, Pue. (SMC-Pue)
Um76	(CP549)	Sn Mateo Capultitlán, Huehotzingo, Pue. (SMC-Pue)
Um77	(CP550)	Sn Mateo Capultitlán, Huehotzingo, Pue. (SMC-Pue)
Um80	(CP551)	Sn Mateo Capultitlán, Huehotzingo, Pue. (SMC-Pue)
Um84	(CP552)	Sn Mateo Capultitlán, Huehotzingo, Pue. (SMC-Pue)
Um88	(CP553)	Sn Mateo Capultitlán, Huehotzingo, Pue. (SMC-Pue)

Nota: La clave mostrada en los árboles se formó con los datos mostrados entre paréntesis.

Tabla 4.17 Secuencias de grupos externos y de otros *Ustilagos* y otros *U. maydis* para comparación.

Especie	Número de acceso	Referencia	Clave
<i>Puccinia caricina</i>	U88234	Kropp <i>et al.</i> (1997)	P. caricina
<i>Sporisorium sorghi</i>	AF038828	Roux <i>et al.</i> (1998)	S.sorghi
<i>Ustilago scitaminea</i>	AF135433	Bakkeren <i>et al.</i> (2000)	U.scitaminea-Canada
<i>Ustilago bullata</i>	AF135423	Bakkeren <i>et al.</i> (2000)	U.bullata-Canada
<i>Ustilago nuda</i>	AF135430	Bakkeren <i>et al.</i> (2000)	U.nuda-Canada
<i>Ustilago tritici</i>	AF135424	Bakkeren <i>et al.</i> (2000)	U.tritici-Canada
<i>Ustilago maydis</i>	AF135431	Bakkeren <i>et al.</i> (2000)	Um-Canada
<i>Ustilago maydis</i>	AY345004	Stoll <i>et al.</i> (2003)	Um-Alemania
<i>Ustilago maydis</i>	AF038826	Roux <i>et al.</i> (1998)	Um-Francia
<i>Ustilago maydis</i>	AF455508	Buzina <i>et al.</i> (2003)	Um-Austria

Figura 4.1 **Árbol Consenso por MP de cepas propias, cepas externas de *U. maydis*, algunos *Ustilagos* y grupos externos (*S. sorghi* y *P. caricina*) y su relación con las características fenotípicas**



1er dígito: Variedad de maíz (B:blanco, Am: Amarillo, Az: azul, R: rojo).
 2º dígito: Índice de severidad (1: índice 1, 2: índice 2, 3: índice 3, 4: índice 4)
 3er dígito: Color de las agallas (1: blancas, 2: grises, 3: negras)
 4º dígito: Textura de las agallas (1: blandas, 2: firmes, 3: duras)
 5º dígito: Tamaño de las agallas (1: chicas, 2: medianas, 3: grandes)

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

5.1 Caracterización fenotípica de huitlacoche.

Como se puede apreciar en los datos obtenidos de los diversos lugares de recolección de huitlacoche, que aunque *U. maydis* posee habilidad para inducir una amplia variedad de agallas en diferentes órganos del hospedero (tallos, espigas, hojas y mazorca), que es única entre todos los *Ustilaginales* (Stoll *et al.*, 2003), el área de la planta que más afecta son las partes reproductivas y las mazorcas (Laurie *et al.*, 2007; Reineke *et al.*, 2008), representando a estas últimas el 60.91% de los especímenes obtenidos (Tabla 4.4). De igual forma se pudo determinar que las variedades de maíz blanco son las más susceptibles (77.27 %) (Tablas 4.5), aún tomando en cuenta la menor proporción (un tercio aproximadamente) de las variedades de maíz de color sembradas según los requerimientos agronómicos y culinarios en los Valles Altos de México (Antonio *et al.*, 2004; Hortelano *et al.*, 2008). Estos resultados confirman lo expuesto por Stoll *et al.* (2003), quienes afirman que existen variedades de maíz con una habilidad para defenderse de *U. maydis*, la cual consiste de una composición genética especial. Además de que el 46.96% de estos especímenes presentaron el índice más alto de severidad (Tablas 4.7).

Sin embargo, no se encontró correlación entre la variedad de maíz y el índice de severidad, por lo que la hipótesis b) “El índice de severidad presente en cada espécimen de huitlacoche está relacionado con la variedad de maíz”, se rechaza, lo que indica que aunque las variedades de maíz blanco son las más susceptibles, no tiene que ver con la intensidad con que *U. maydis* las afecta, lo que hace suponer que las condiciones de estrés (heladas, sequedad, daño mecánico, etc.), así como la etapa de desarrollo del maíz y de *U. maydis*, podrían ser determinantes en este proceso.

Respecto a la relación entre el índice de severidad y el origen del huitlacoche, se pudo determinar que existe una correlación de $r = 0.231^*$ (Tabla 4.12) por lo que se acepta la hipótesis c) “El índice de severidad presente en cada espécimen de huitlacoche está relacionado con su procedencia”, además de que el 47.31 % de las mazorcas con el mayor índice de severidad correspondieron a Puebla, Guanajuato y Estado de México (Tabla 4.6). Estos resultados

confirma que las condiciones agroecológicas del centro de México son propicias para el desarrollo de *U. maydis*.

De igual forma, se acepta la hipótesis d) “El índice de severidad presente en cada espécimen de huitlacoche está relacionado con las características fenotípicas de las agallas como el tamaño, color y textura”, ya que se determinó que existe una correlación de $r = - 0.733^{**}$ (Tabla 4.14) entre el color de las agallas y su textura, lo que indica que a menor dureza de las agallas, presentan un color más oscuro debido a una mayor cantidad de teliosporas. También se detectó que existe una correlación de $r = - 0.295^{*}$ (Tabla 4.15) entre el tamaño y la textura de las agallas, lo que significa que entre más pequeñas son las agallas, la textura es más dura, lo cual se esperaba, ya que durante la extracción de las teliosporas de las agallas en la etapa experimental, se pudo observar que entre más duras eran las agallas, existían menos teliosporas, y por ende, las agallas eran menos oscuras. Y lo contrario para las agallas grandes, ya que su textura era más suave debido a la mayor cantidad de teliosporas, las cuales sustituyen al tejido firme y blanco de las agallas.

En cuanto a la diversidad de las teliosporas y de las esporidias se puede ver (Tabla 4.10) que es muy amplia, sin embargo, no se encontró ninguna correlación entre su tamaño y el índice de severidad, por lo que se rechaza la hipótesis e) “El índice de severidad presente en cada espécimen de huitlacoche está relacionado con el tamaño de las teliosporas y las esporidias”. Este resultado, así como la falta de consistencia en los datos culturales de las esporidias en placa (color, superficie, margen, consistencia, etc. de las colonias en placa), se puede deber a que *U. maydis* está constituido por un gran número de formas fisiológicas diferentes aunadas a las nuevas que se van originando continuamente (Christensen, 1963; Hirschhorn, 1986). Sin embargo, los tamaños, formas, colores, y texturas, tanto de las teliosporas como de las esporidias se encuentran dentro de los reportados por Christensen (1963). Incluso, concuerdan con las características de diversas esporidias nativas de algunos lugares del mundo y las de referencia de genotipo conocido, principalmente la FB1, FB2, 518, y 521, mostradas en microfotografías tomadas por Schink y Bölker (2009), Chew *et al.* (2008), Flor-Parra *et al.* (2007), Boyce *et al.* (2005, 2006), García- Muse *et al.* (2004), Serafín- Muñoz *et al.* (2005), entre otros.

Referente a la hipótesis f) “El lugar de procedencia donde se desarrolla el huitlacoche está relacionado con la variedad de maíz”, se acepta, ya que se encontró una correlación de $r = 0.414^{**}$ (Tabla 4.13) entre la presencia de huitlacoche de acuerdo al lugar de origen y la

variedad de maíz, lo que indica que las prácticas llevadas a cabo sobre el cultivo de maíz han generado una presión de selección especial de *U. maydis* (Stoll *et al.*, 2003), con lo que se observa que el sistema maíz - *U. maydis* muestra una resistencia muy durable, a diferencia de los monocultivos, debido a que *U. maydis* no ha evolucionado, ya que su resistencia ha durado más de 50 años, a pesar de que en las primeras décadas del siglo pasado se hicieron programas contra el hongo que fueron viables (Neuhauser *et al.*, 2003).

5.2 Diversidad genética.

La hipótesis a) “Las cepas de las poblaciones nativas de huitlacoche (*U. maydis*) provenientes de diferentes zonas geográficas del centro de México presentan diversidad genética a nivel de subespecies, razas o biotipos”, es aceptada, lo cual se explica con detalle a continuación, de acuerdo al análisis de Máxima Parsimonia, el árbol filogenético generado y el análisis de distancia obtenidos.

El análisis de Máxima Parsimonia de las secuencias de los datos generados a partir del primer ITS-4 de las cepas aisladas en el presente trabajo, permitió obtener el árbol consenso más parsimonioso (Figura 1) con un análisis de bootstrap de 1000 réplicas. Dicho análisis se basó en una búsqueda heurística la cual produjo 47 árboles parsimoniosos con un índice de consistencia de 0.871201 y un índice de retención de 0.819473. En este árbol se observan cuatro grupos, el Grupo I está formado por tres subgrupos; el primer subgrupo está formado por cepas de Tlaxcala, Estado de México, Puebla y Guanajuato; el segundo por una cepa del Estado de México y el resto de seis localidades de Puebla; y el último, por cepas de dos localidades de Puebla. El Grupo II está formado por dos subgrupos, el primero contiene cepas de Tlaxcala, Puebla, y Guanajuato; mientras que el segundo de Hidalgo y Puebla. En el caso del Grupo III se tienen dos subgrupos, el primero contiene únicamente cepas de Puebla, y el segundo, la testigo, una de Puebla y una del Estado de México. Cabe notar que las cepas de Puebla en este grupo pertenecen a distintas localidades. En lo que respecta al Grupo IV, se encuentra formado por tres cepas, las cuales provienen de dos localidades distintas de Puebla. Cabe destacar que en todos los grupos y subgrupos existe al menos una cepa de Puebla, y en los casos del subgrupo 3 del Grupo I se encuentran dos pares de cepas de dos localidades distintas de Puebla (Esperanza y San Mateo Capultitlán), y lo mismo para el tercer subgrupo del Grupo II y para el Grupo IV, donde se obtuvieron dos pares de cepas de la localidad de San Mateo Capultitlán en cada caso. Resultados

similares se obtuvieron para pares de cepas de Tlaxcala y Guanajuato que fueron encontradas en el primer subgrupo del Grupo I.

Estos resultados muestran, por un lado, una gran diversidad dentro de las poblaciones locales, ya que aislamientos de la misma localidad se encuentran en varios grupos y subgrupos, lo cual se podría deber a las prácticas culturales llevadas a cabo en el centro de México, caracterizadas por la baja densidad de maíz de las plantaciones de maíz, las cuales son relativamente pequeñas, en campos aislados; así como a la rotación del maíz con otros cultivos. Condiciones culturales que son similares a muchas regiones de Sudamérica, y por ello, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Bakkeren *et al.* (2000). Estas condiciones pueden haber generado un alto grado de endogamia, que lleva a suponer que, aunque las teliosporas individuales actúan frecuentemente como unidades de una sola infección, derivados del apareamiento entre esporidios hermanos compatibles poco después de la germinación, ésta podría ser una fuente de inóculo más numeroso y diverso de lo que se esperaría según el grado de endogamia, debido a su latencia fuera de la planta que le permite sobrevivir en el suelo y los desechos, ya sea como esporidios saprofitos o como teliosporas múltiples (Bakkeren *et al.*, 2000). Un factor más podría ser que las poblaciones contemporáneas de *U. maydis* muestran una pequeña distancia de migración de larga distancia entre sus poblaciones, lo que sugiere que ni las esporas transportadas por el viento, ni el comercio agrícola contemporáneo, y ni las prácticas modernas, producen la variabilidad de poblaciones de este hongo, en contraste con otros patógenos de cultivos (Munkacsí *et al.*, 2007). Estos resultados son concordantes con los obtenidos por Zambino *et al.* (1997), quienes determinaron que los valores de diversidad genética para *U. maydis* no son comunes debido a la heterogocidad de lucus de apareamiento *b* y a los altos niveles de endogamia. Aunque la probabilidad de apareamiento entre hermanos dependerá de las prácticas agrícolas y de la germinación de las teliosporas, ya que si se produce la germinación antes de la labranza y de la siembra, el cultivo puede mezclar las poblaciones (Gordon *et al.*, 1992 citado en Zambino *et al.*, 1997) por lo que se produce en gran parte la fertilización exógama. Y si además se siembra en un mismo campo cada año para este propósito, los genotipos susceptibles prevaecientes en el mismo lugar, podrían crear una gran población de *U. maydis*, en contraste con el efecto de cuello de botella genético generado por rotación del cultivo en una nueva ubicación.

Por otro lado se tiene una gran diversidad entre poblaciones de las distintas localidades, lo cual se puede deber a que las poblaciones nativas de *U. maydis* están compuestas de aislamientos diversos genéticamente, resultado de diversos factores como la polinización cruzada que se produce entre poblaciones a varios kilómetros, lo cual depende de la distribución de los campos a escala regional, como lo sugieren Valverde *et al.* (2000) cuando determinaron que la mayor parte de la variación de *U. maydis* está distribuida a nivel de escala local. También podría deberse a las condiciones culturales de maíz opuestas a las del centro de México, donde se mantienen altos niveles de heterocigocidad desiguales entre las poblaciones en la mayoría de las regiones geográficas de cultivo de maíz, por lo cual, las poblaciones son primeramente sexuales y exogámicas (Neuhauser *et al.*, 2003). Por lo tanto, al ser sexuales requieren una diferencia genética en los loci de compatibilidad, los cuales dependen de la frecuencia de selección para mantener diversos tipos de acoplamiento, aún en las poblaciones locales (Takahata *et al.*, 1992; Wright, 1939, 1960, 1964; Yokoyama *et al.*, 1982, citados en Zambino *et al.*, 1997). Así, cuando una esporidia llega a la población por mutación o migración, lleva un nuevo tipo de apareamiento de compatibilidad que será compatible con la mayoría de otras células haploides (Zambino *et al.*, 1997). Por otro lado, respecto al proceso de exogamia, éste se produce por una parte por la difusión de las teliosporas a grandes distancias por el viento (Christensen, 1963); y por la otra, también podría deberse a que estas poblaciones, al igual que en el caso de las de Sudamérica, se pudieron adaptar de manera independiente a las regiones de baja y alta elevación (Munkacsi *et al.*, 2007), las cuales varían ampliamente entre las localidades estudiadas: Zaragoza, Hgo. (1260msnm), Huaquechula, Pue. (1580 msnm), Tehuacan, Pue. (1676 msnm), Celaya, Gto. (1750 msnm), Atlixco, Pue. (1840 msnm), Tepexi de Rodríguez, Pue. (1890 msnm), Acatzingo, Pue (2140 msnm), Cholula, Pue. (2150 msnm), Sn. Diego Xocoyucan, Tlax. (2220 msnm), Tepeaca, Pue. (2240 msnm), San Mateo Calputitlán, Pue. (2260 msnm), Milpa Alta, Edo. Mex. (2370 msnm), Hidalgo (2395 msnm), Esperanza, Pue. (2460 msnm), Toluca, Edo.Mex. (2680 msnm). Un factor más que afecta este proceso, es la historia de las poblaciones de los hospederos, la cual puede tener efectos sobre la evolución, diversificación y estructura poblacional de sus patógenos (Abubakar *et al.*, 2003; García-Arenal *et al.*, 200; Holmes, 2004; Ohshima *et al.*, 2002; Roossinck *et al.*, 1999, citados en Voth *et al.*, 2006), sobre todo cuando existen disturbios antropogénicos que imponen regímenes fuertes de selección sobre muchas comunidades naturales y manipuladas con dinámicas no equilibradas (Neuhauser *et al.*,

2003). Esto es evidente en el caso del maíz, ya que su comercio e intercambio regional, principalmente en Latinoamérica, se ha practicado desde su domesticación, y en el caso del huitlacoche, esta actividad ha sido más directa, por lo que puede tener una mayor tasa de migración local (Voth *et al.*, 2006). Estos resultados son concordantes con los de Valverde *et al.* (2000), quienes también determinaron que la mayoría de la variación genética en *U. maydis* se distribuye principalmente a escala local, más que a una escala macrogeográfica.

Respecto a la relación de los aislamientos del centro de México con los *U. maydis* externos y los otros *Ustilagos*, se puede observar (Figura 4.1) que se encuentran en grupos separados, lo cual coincide con los datos obtenidos por Bakkeren *et al.* (2000), Munkacsí *et al.* (2007), Singh *et al.* (2005), y Stoll *et al.* (2003), ya que en sus respectivas investigaciones mostraron que *U. scitaminea* presenta una variación mayor con *U. bullata*, *U. tririci*, y *U. nuda*, donde éste último también forma un grupo separado de los otros dos, y por supuesto, un grupo todavía más separado con *P. caricina* y *S. sorghi*. Los resultados obtenidos en este trabajo difieren de los reportados por Valverde *et al.* (2000), en cuanto a que en el caso del Um-testigo se coloca dentro de los aislamientos de México del Grupo III, y en el caso de los aislamientos de la misma localidad no se sitúan como un grupo separado, sino que se encuentran dispersos en grupos diferentes.

Estos resultados se encuentran bien sustentados con los resultados de análisis de distancia (Anexo B2. Registros de los datos de las características fenotípicas de los especímenes de huitlacoche recolectado) y del bootstrap, ya que en lo que respecta a este último, se tiene un valor del 99% en la rama que soporta tanto los aislamientos obtenidos en el presente trabajo, como los *U. maydis* externos, aunque para las ramas internas de los primeros no es así, ya que estos valores varían de 0 al 69%. Sin embargo, de acuerdo al análisis de distancia por pares, usando el método para nucleótidos *Tamura-Nei* mediante *Pairwise Deletion*, se obtuvo la mínima distancia de cero y la máxima de 0.0425 para los aislamientos del centro de México, correspondiendo el valor mínimo para los aislamientos CP484, CP485, CP441, CP443, y CP489 del Grupo I, y los CP438, CP487, CP442, y CP483 del Grupo III, los cuales corresponden a diferentes localidades, excepto las de Tlaxcala. La máxima distancia se obtuvo entre CP553, proveniente de Sn Mateo Capultitlán, y CP541 de Sn Felipe Otlaltepec, las cuales son localidades de Puebla. En el caso de la distancia con respecto a los *U. maydis* externos, la distancia mínima fue de 0.0071 (entre CP487 [Sn. Mateo Capultitlán] y Um-Francia), mientras

que la máxima de 0.0488 (entre CP553 [Sn. Mateo Capultitlán] y Um-Canadá). Como se esperaba, las distancias con respecto a los otros *Ustilagos* fueron mayores, ya que la distancia mínima fue de 0.1433 entre la CP438 (Esperanza), CP545 (Huaquechula) y *U. tritici*, y la máxima de 0.2507 entre la CP551 (Sn Mateo Capultitlán) y *U. scitaminea*. Finalmente, la distancia promedio para todas las cepas fue de 0.076. Estos resultados están dentro de los valores de distancias genéticas determinados por Nei (1976), donde se establece que para pares de razas locales se pueden tener valores entre 0.00 y 0.05, y para subespecies y especies, de 0.02 a 0.20. Por lo que se puede presumir que la diversidad obtenida entre los aislamientos del centro de México estudiados en el presente trabajo se puede deber a la existencia de razas o biotipos, así como a especies y subespecies de *U. maydis*, lo cual se debe por un lado a que es un hongo heterotálico, por lo que genera un número indeterminado de líneas o biotipos surgidos por hibridación en generaciones sexuales o por mutación (Valverde *et al.*, 2000), y también por la domesticación y el cultivo temprano del maíz, los cuales han determinado que el flujo genético sea suficiente para mantener el polimorfismo en la virulencia, pero a su vez también han impedido su especiación (Munkacsi *et al.*, 2007).

Respecto a la hipótesis g) “Las características fenotípicas de los especímenes de huitlacoche tienen relación con su diversidad genética” se pudo demostrar, ya que estos resultados también muestran que la mayoría de las características fenotípicas tienen relación con los datos genéticos, considerando que cuando un carácter morfológico se encuentra en el 50 % o más de los especímenes, se toma como representativo. Así, se observa en los datos mostrados a la derecha de la figura 4.1, que para el caso del maíz blanco se encuentra en todos los subgrupos y grupos en más del 50 %, con excepción del subgrupo 3 del Grupo I, por lo que se considera que la presencia de huitlacoche está estrechamente relacionada con la variedad de maíz blanco. En cuanto al índice de severidad, se determinó que existe una estrecha relación entre el índice de severidad mayor (índice 4: entre 75 y 100% del área cubierta de la mazorca) con la mayoría de los grupos, ya que en el subgrupo 1 del Grupo II y en el Grupo IV, no se encontró dicha relación. Respecto al color y la textura de las agallas, se puede observar que de igual forma para la mayoría de los grupos se tiene una estrecha relación con el color gris y negro (2 y 3, respectivamente) con la textura blanda y firme (1 y 2, respectivamente), a excepción del primer subgrupo del Grupo III y el Grupo IV, para ambos casos. Y lo mismo ocurre para el tamaño de las agallas, ya que para la mayoría de los grupos y subgrupos, se tuvo una relación estrecha con

el tamaño mediano y grande (2 y 3, respectivamente), con excepción del subgrupo 3 del Grupo I y el Grupo IV. Sin embargo, se puede argumentar que las excepciones detectadas casi siempre ocurren en el subgrupo 3 del Grupo I y en el Grupo IV debido a que la mayoría de estos datos se desconocen dado que se trata de agallas solas o de mazorcas con el 100% del área cubierta de agallas.

La determinación del índice de diversidad de los organismos es fundamental, ya que además de que es una característica crucial para su existencia, también de ella depende la multiplicidad de sus propiedades y usos, tanto a nivel biológico como cultural en cada región. Por ello, actualmente existe una preocupación por la pérdida de biodiversidad causada por el incremento de las actividades humanas sobre los ecosistemas naturales y rurales (Loreau, 2009), surgiendo estrategias para la conservación de los recursos genéticos. Entre estas estrategias se tiene la creación de los Centros de Recursos Biológicos, los cuales se han convertido en la pieza fundamental para el desarrollo de la biotecnología, y otras ciencias relacionadas con ésta, con el fin de regular y fortalecer la conservación, el estudio, la utilización y el acceso a los recursos genéticos, acorde con la Convención sobre Diversidad Biológica (Sobal *et al.*, 2007).

Por lo tanto, la diversidad obtenida de los aislamientos de *U. maydis* obtenidos es de suma importancia como recurso genético, no tan sólo como conservación de la diversidad biológica, sino como parte de la preservación de la cultura mexicana, ya que el huitlacoche junto con otros alimentos, en Mesoamérica era considerado como alimento de los dioses, de tal forma que existía un equilibrio con la sabiduría de sus habitantes, a quienes les importaba la diversidad de las especies vegetales y la capacidad para su utilización (Paredes- López, 2006). Por otro lado, desde que los campesinos y agricultores mexicanos empezaron a consumirlo, lo cual se supone que fue con la domesticación del maíz hace aproximadamente 8,000–10,000 años (Voith *et al.*, 2006), han aprendido muchos aspectos sobre éste. Por ejemplo, saben que el maíz dulce es mejor para producir huitlacoche, empleando tecnologías tradicionales para ello (Paredes-López, 2001), que van desde el mantenimiento del germoplasma, tanto el propio, como el de otras localidades que adquieren por intercambio, hasta su aplicación de diversas maneras. De igual forma, han desarrollado maíces resistentes a este y otros patógenos, generando una gran cantidad de variedades de maíz con diversas características propias para cada uso. Todo esto forma parte del *corpus* de conocimiento tradicional de cada localidad, el cual se regenera continuamente en base al uso múltiple de la diversidad mediante la selección natural y humana (Shiva, 1995, citado en

Ocampo y Escobedo, 2006). Además este *corpus* de conocimiento es único, y por consiguiente muy valioso, ya que en su afán de apropiarse de la naturaleza, expresan su sabiduría personal y/o comunitaria, resultado de la experiencia acumulada y transmitida de generación en generación; de la experiencia socializada en una misma generación; y de la experiencia personal aprendida a través de las creencias y mitos, las percepciones, y el conocimiento sistematizado (Toledo, 1991, citado en Ocampo y Escobedo, 2006).

En este contexto, caracterizado por la coevolución de la biología y lo cultural por siglos, se puede considerar que la agricultura tradicional en conjunto con los conocimientos científicos, como es en este caso del conocimiento de la diversidad genética de *U. maydis*, se pueden plantear estrategias de desarrollo agrícola para cada región, tanto del estado de Puebla, como de otras del centro del país, de tal forma que se usen los recursos y conocimientos locales, y la energía humana y animal para hacer un agroecosistema sustentable para producir huitlacoche de forma contralada. De tal manera que se aprovechen y mantengan los recursos genéticos de cada localidad y se intercambien con los de otras, cuidando que no se disperse sin control, mediante la lógica de manejo tradicional del campesino, combinado con los conocimientos de la ciencia agrícola moderna científica (Altieri, 1991; Altieri, 1995a; Altieri, 1995b, citado en Ocampo y Escobedo, 2006), de tal forma que se tenga un sistema propio para cada región, basado en su conocimiento del medio ambiente, sus calendarios agrícolas, clasificaciones de suelo, plantas y animales; de su conocimiento etnobotánico, sus prácticas propias de cada cultivo, de sus estrategias de uso múltiple y diversidad genética nativa, etc. (Sevilla, 1995, citado en Ocampo y Escobedo, 2006).

5.3 Conclusiones.

De acuerdo a los objetivos planteados y a los resultados obtenidos, se puede concluir que:

1. Con base en las características fenotípicas de 106 especímenes de huitlacoche provenientes de 42 zonas geográficas de nueve estados de México y de acuerdo a la hipótesis b, se logró determinar que las variedades de maíz blanco son las más susceptibles a *U. maydis*, ya que el 77.27% de los especímenes recolectados correspondieron a estas, de las cuales el 48.84% presentaron el índice más alto de

severidad, por lo que estas variedades de maíces podrían ser las más viables para encontrar huitlacoche producido de forma espontánea para su posterior comercialización.

2. Se detectó una correlación de $r = 0.231^*$ entre el índice de severidad con el origen del huitlacoche (hipótesis c), y una correlación $r = 0.414^{**}$ entre la variedad de maíz y el origen del huitlacoche (hipótesis f), lo que confirma que las condiciones agroecológicas del centro y sur de México son propicias para el desarrollo de *U. maydis*. Así mismo, se determinó que las características fenotípicas de las agallas como su color y textura, y entre su tamaño y textura se encuentran correlacionadas $r = -0.733^{**}$ y $r = -0.295^*$ respectivamente (hipótesis d), lo que parece tener una relación con las características fenotípicas de las teliosporas, es decir que las teliosporas maduras están relacionadas con la textura suave y el color oscuro. También se pudo confirmar que existe una amplia diversidad fenotípica de las teliosporas y de las esporidias; además de que estas últimas coinciden con diversas esporidias nativas de algunos lugares del mundo y las de referencia de genotipo conocido. Esto sirve de herramienta para detectar y seleccionar en los diversos hábitats o puntos de distribución, los mejores especímenes para aislar con mayor efectividad cepas de este hongo tan apreciado. De tal forma que los especímenes más viables serán aquellas que provengan de maíz blanco con la mayor área cubierta de agallas (más del 75%), con agallas grandes y con gran cantidad de teliosporas. Siendo los estados del centro de México los más viables para encontrar con mayor probabilidad huitlacoche, y aislar las cepas de manera exitosa (hipótesis g).
3. Los aislamientos de las diferentes zonas geográficas del centro de México mantienen una substancial diversidad genética del 4.3 %, tal como se muestra en el árbol generado por Máxima Parsimonia, donde se observa una diversidad entre los aislamientos que podrían referirse a biotipos o líneas (hipótesis a), generadas por la reproducción sexual de las diferentes generaciones o por mutación, dada su naturaleza heterotálica. Mientras que la diversidad entre las poblaciones, se puede deber a varios factores, como son la gran habilidad de dispersión de *U. maydis*, la migración de genes a larga distancia, provocado por el esparcimiento de las teliosporas con el viento; los eventos demográficos recientes, la historia demográfica de la domesticación y de la agricultura, las prácticas culturales llevadas a cabo en cada localidad, la fuerte selección o cuellos de botellas que promueven la deriva genética promovidos por la recombinación sexual y el poco flujo de

genes, y probablemente, hasta por los intentos para producir huitlacoche, factores que han provocado la exogamia y por consiguiente la modificación de las poblaciones de *U. maydis*. Con lo que se comprobó que la región ITS del ADNr es viable en este tipo de estudios, ya que al comparar una pequeña parte del genoma, pueden revelar suficiente variabilidad para distinguir organismos a nivel de poblaciones y aislamientos, como en el presente estudio.

4. Las cepas que presentaron mayor diferencia genética en el análisis filogenético, podrán ser seleccionadas para plantear estrategias para producir huitlacoche en zonas productoras de maíz del centro y sur del país con condiciones agroecológicas similares a las de las cepas seleccionadas.

VI. RECOMENDACIONES

6.1 Recomendaciones generales.

Debido a que los objetivos de esta investigación estuvieron encaminados a la generación de conocimiento a partir de los datos obtenidos y analizados sobre las características fenotípicas y genéticas de *U. maydis*, se propone:

- a) Crear una red nacional de generación de conocimiento sobre *U. maydis* para optimizar y ampliar el conocimiento generado por investigadores y cuerpos académicos, de las diferentes instituciones y centros de investigación de México, tanto a nivel de ciencia básica, como aplicada.
- b) Establecer un método sistemático para producir huitlacoche en los Valles Altos de Puebla para contribuir al desarrollo agrícola regional.
- c) Crear centros regionales de acopio de huitlacoche en las zonas productoras de maíz con mayor producción espontánea de este producto.

Para lograr cada una de estas propuestas se recomienda seguir estrategias particulares para cada una de ellas. Por lo que resulta pertinente mencionar algunas definiciones de estrategia.

6.2 Definiciones de estrategia.

A lo largo de la historia, la palabra estrategia se ha utilizado con diferentes connotaciones. Desde la guerra, donde se percibe como los planteamientos o propuestas para atacar al enemigo; en el campo comercial, donde la estrategia es el plan o patrón que integra las metas y políticas principales de una organización, estableciendo la secuencia coherente de las acciones a analizar (Mintzberg y Brian, 1993); y en la política, donde estrategia se refiere a determinar y evaluar las opciones de que se puede disponer, con el fin de encontrar las mejores para realizar el proceso de desarrollo; en otras palabras se trata de comprender las reacciones probables del sistema frente a diferentes acciones alternativas con el fin de alcanzar eficientemente los objetivos establecidos (Domínguez y Aguilar, 1999). De hecho, se considera

que la estrategia es la columna vertebral de los planes y programas de desarrollo, dado que éstas son acciones que se realizan en forma ordenada, sistemática y dirigida para conseguir el fin deseado (Baltazar, 2002).

Independientemente del campo de aplicación de una estrategia, ésta se concibe mejor si se analiza su concepto según López (2005), quien la define como un proceso regulable, un conjunto de reglas que aseguran una decisión óptima en cada momento. Donde el término proceso, incorpora la idea, las etapas y los tiempos para el logro de los objetivos; el término regulable, indica la existencia de normas que pueden ser aplicables al proceso y justifica su objeto de estudio.

Desde la perspectiva gubernamental, la estrategia implica la utilización y profunda integración del poder económico, político, y social (cultural, moral, espiritual y psicológico). Lo que significa que las autoridades deben plantear estrategias para aminorar el rezago económico y social que prevalecen en las poblaciones rurales del país, mediante la aplicación de programas de desarrollo concebidos como una estrategia que permita proveer de mejores condiciones a la población rural para dar principio a una de las bases fundamentales del desarrollo del país.

En el caso del Desarrollo Agrícola Regional, la estrategia ha sido definida por varios autores como Matus (1972), siendo para él, un análisis y un propósito de futuro que integra lo económico y lo político-social con el fin de dirigirlos a objetivos determinados. Éstas se basan en un modelo abstracto del proceso material de desarrollo, el cual ante hechos y perturbaciones simuladas, responde y reacciona igual que en forma real junto con sus consecuencias. Sin embargo, el plan de la estrategia puede modificarse cuando se lleva a cabo, con el fin de que cumpla su objetivo (Matus, 1980). De esta forma, la formulación de una estrategia parte de una síntesis entre realidad y proyecto, con lo que se obtiene una imagen preliminar (diagnóstico) de dicho proceso, requiriendo además, imaginación, capacidad técnica, y principalmente, un análisis riguroso de la viabilidad.

Para que se lleve a cabo una estrategia, García- Herrera (2004) propone tres sectores como elementos fundamentales, y con tareas específicas interrelacionadas y complementarias: los productores y sus familias, los técnicos y científicos, y los representantes y miembros de instituciones de apoyo a la producción y al desarrollo agrícola y rural. De tal manera que su acción coordinada mantendrá la estrategia y dará logros económico-sociales, con lo que se podrá promover el desarrollo agrícola y rural de una región. Donde el desarrollo implica el logro de

las condiciones con las cuales, la mayoría de la gente pueda tener acceso a los recursos necesarios para satisfacer no tan sólo sus necesidades fundamentales, sino para alcanzar niveles de vida y de bienestar aceptables, como son la alimentación, la educación, la seguridad, la salud mental, la recreación, y la integración social.

En base a lo mencionado, el término de estrategia fue incluido en la agricultura en el año 1967 en el Plan Puebla, siendo éste el primer Proyecto de Desarrollo Agrícola Regional que involucra el concepto de estrategia como guía para sus acciones y decisiones (Casas, 1994).

6.3 Estrategia para crear una red nacional de generación de conocimiento sobre *U. maydis*.

En México, los gobiernos y sus proyectos se inventan cada tres o seis años, dependiendo del tipo de gobierno, lo que ha impedido el desarrollo del país. En cuanto a proyectos de investigación, algo similar ocurre, ya que muchos de ellos se generan de acuerdo a la visión de los representantes de investigación y educación de cada gobierno, así como por parte de los investigadores e instituciones, para conseguir recursos, para tener alumnos participantes en las investigaciones particulares, o por intereses aislados de estos dos últimos. Lo que genera que se tengan estudios aislados y discontinuos de temas específicos.

Por lo que para colaborar a reducir este problema en el estudio de *U. maydis*, se propone generar una red nacional sobre investigación de este hongo y su producto (huitlacoche), con el fin de fortalecer y ampliar las investigaciones comunes, y diversificar las investigaciones hacia nuevas áreas u otras de interés pero de menor estudio mediante la colaboración y el trabajo conjunto.

6.3.1 Objetivos de la estrategia para crear una red nacional de generación de conocimiento sobre *U. maydis*.

De acuerdo a la definición de objetivos, los cuales son los elementos tangibles y concretos que se propone alcanzar a corto, mediano o largo plazo, en el presente proyecto se han planteado objetivos en estos tres plazos.

6.3.1.1 Objetivo general de la estrategia.

Generar una red nacional entre los diferentes centros de investigación e instituciones del país para contribuir a la generación del conocimiento sobre *U. maydis*.

6.3.1.2 Objetivos particulares de la estrategia.

A corto plazo:

i) Crear una red nacional sobre generación de conocimiento de *U. maydis*.

A mediano y largo plazo:

ii) Diseñar planes para incrementar la productividad de las investigaciones mediante la formación de investigadores y estudiantes de licenciatura, maestría y doctorado.

iii) Diseñar planes para incrementar la productividad de las investigaciones en campo.

6.3.2 Implementación de la estrategia para crear una red nacional de generación de conocimiento sobre *U. maydis*.

A corto plazo:

D) Se propone como primer paso para crear la red nacional de generación de conocimiento sobre *U. maydis*, convocar a las instituciones y centros de investigación de México que han generado conocimiento en las diferentes áreas acerca de *U. maydis* para participar en el “Foro Nacional sobre Avances en el conocimiento de *U. maydis*”. Para ello, se requiere invitar directamente a los investigadores más prestigiados del país para conformar el Comité de la Red Nacional de Generación de Conocimiento de *U. maydis*. Dicha invitación no tan sólo será para que participen con sus respectivos grupos de colaboradores en dicho encuentro, sino lo más importante, se les dará a conocer los objetivos y alcances de la futura red de investigación.

Se propone invitar a los siguientes investigadores debido a la trayectoria que se muestra a continuación:

1. José Ruiz Herrera del CINVESTAV, Irapuato, cuyos trabajos más antiguos se remontan a 1996, desde la dirección de tesis, aprobación y financiamiento de proyectos, hasta la

publicación de artículos. Ha realizado trabajos sobre identificación y mecanismo de genes y proceso de infección, producción de huitlacoche, selección de hospederos, propiedades nutraceuticas y nutricionales. Para ello, ha colaborado nacionalmente con Martínez-Espinoza, A.D.Valverde, Sánchez-Alonso Patricia, Octavio Paredes López, Fidel Guevara Lara, Venegas Espinoza, y a nivel internacional con Kronstad J.W. Pataky J. K. Pedersen W. L. García Saucedo, P.A., Velázquez Montoya, J.B. Quienes trabajan en diversas instituciones de México, USA, España, y Perú, tales como IPN, BUAP, CINVESTAV Vega de Metztitlan, Hgo, Universidad Autónoma de Chapingo, COPAE-AL, UNESCO; Trujillo, Perú.

2. Clemente Villanueva de la UACH, ha trabajado desde 1995 enfocándose en la producción de huitlacoche, quien en colaboración con la Technische Universität Berlin y el Instituto Politécnico Nacional, no tan sólo han estudiado el método para producirlo, sino para optimizar su manejo postcosecha.

3. Juan Francisco Jiménez Bremont, en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), ha colaborado desde 2001 con Ruiz-Herrera José y Becerra-Flora A., en diversos proyectos financiados por CONACYT, Fundación PRODUCE, y Fondos Mixtos. Publicando artículos en colaboración con otras instituciones como el Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala, y con Buenos Aires, Argentina. Incluso ha obtenido reconocimientos como el *Premio 20 de Noviembre a la Investigación Científica*, otorgado por el Gobierno del Estado de San Luis Potosí.

4. María Elena Valverde González, Octavio Paredes López, Fidel Guevara Lara, del Cinvestav, Irapuato han trabajado desde 1993 en diversas investigaciones y proyectos sobre genes y su papel en el proceso de infección, así como en la producción de huitlacoche con el apoyo de CONACYT, Fondos Mixtos, y Fundación PRODUCE. Colaborando con otros importantes investigadores como Martínez- Espinoza, A.D. y Ruiz-Herrera, J., y Kronstad, J.W, sólo por mencionar algunos de los mas importantes, provenientes de prestigiadas instituciones nacionales e internacionales.

5. Ignacio Ruiz Hernández y Luciano Castro Espinoza en conjunto con otros colaboradores del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON), desde 2001 han realizado algunos proyectos financiados para producir huitlacoche en el Valle del Yaqui con logros importantes, ya que han aseverado haber encontrado un método para producir huitlacoche masivamente. Entre

sus investigaciones destacan el fitomejoramiento genético de maíces criollos, y la formulación económica de inóculo.

6. Emma Saavedra Hernández y sus colaboradores, de la Escuela de Ciencias Biológicas del IPN, quienes se han destacado por obtener el Premio Ciencia y Tecnología en Alimentos 2003, cuya investigación es importante por determinar el papel de algunas proteasas en el sabor del huitlacoche. Aunque también se han reportado proyectos y publicaciones acerca de los cambios morfológicos y el proceso de infección de *U. maydis*, en colaboración con Ruiz-Herrera y con el Instituto de Oaxaca.

Cabe mencionar especialmente a José Ruiz-Herrera, Juan M. González-Prieto, Patricia Sánchez-Alonso y Plinio Guzmán, del Cinvestav-Irapuato y del IPN y del Cinvestav-Guanajuato, por su valiosa colaboración en la determinación del genoma de *U. maydis* en 2006. Así como señalar que existen trabajos menos extensos, y casi siempre únicos, aunque no menos importantes, de otras instituciones como el Colegio de Postgraduados, la UNAM, La Universidad Autónoma de Puebla, La Universidad de Guadalajara, La Universidad de Aguascalientes, La Universidad Autónoma de Nuevo León, El Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, CIBA en Tlaxcala, y otras quienes han recibido importantes ingresos para proyectos y que han tenido alguna publicación como resultado de ellos.

II) Como segundo paso, al finalizar el Foro, en una mesa de trabajo final, se propone que se establezcan las estrategias para conformar las líneas de generación de conocimiento particulares y las generales de acuerdo a la experiencia e interés de cada grupo, nombrando los comités responsables de cada una.

III) Una vez establecidos los comités responsables, se establecerán las estrategias generales y particulares teniendo como base las propuestas siguientes:

1. Reunir a los representantes de cada proyecto, cuerpo académico o similar para establecer líneas de investigación de acuerdo a los avances y experiencia de cada institución.

2. Establecer convenios de participación a corto, mediano y largo plazo, para generar proyectos integrales que involucre a cada institución.

3. Establecer en conjunto con CONACYT, PROMEP, e Instituciones similares los proyectos y líneas de investigación que serán apoyadas de acuerdo a los requisitos que se

acuerden por ambas partes, con el compromiso de continuar los proyectos hasta su meta a largo plazo.

A mediano y largo plazo:

Uno de los beneficios que tendrá la red nacional de generación de conocimiento sobre *U. maydis* es el incremento de la productividad de las investigaciones mediante la formación de investigadores y estudiantes de licenciatura, maestría y doctorado. Para lograr este objetivo, se propone la siguiente estrategia.

1. Los integrantes de cada proyecto, cuerpo académico o similar de todas las instituciones participantes deberán establecer las bases para seleccionar a los alumnos de los diferentes niveles de estudio.

2. Los integrantes de cada proyecto, cuerpo académico o similar de cada institución deberán seleccionar mediante los mecanismos acordados, a los alumnos que no tan sólo tengan el interés sino la capacidad para participar en los proyectos establecidos a corto, mediano y largo plazo, tanto a nivel local como con las otras instituciones participantes.

3. Los integrantes de cada proyecto, cuerpo académico o similar de todas las instituciones participantes deberán acordar los lineamientos para investigadores y alumnos sobre los compromisos para dar seguimiento y asegurar la terminación de los proyectos correspondientes.

4. Los integrantes de cada proyecto, cuerpo académico o similar de todas las instituciones participantes deberán generar espacios nacionales como Foros, Congresos, etc. para dar a conocer los avances en cada área de interés y así fortalecerlas, así como para generar el interés de alumnos, investigadores, productores y empresarios para participar en dichas áreas de interés.

5. Los grupos mencionados deberán propiciar la labor de investigación en los estudiantes de los diferentes niveles mediante el intercambio a los centros de investigación donde fortalezcan sus habilidades y conocimientos, con el fin no tan sólo de mantener el interés sino de incentivar su formación como investigadores que soporten y fortalezcan los proyectos en el futuro.

Las estrategias mencionadas no tendrían ningún sentido sin la aplicación de la generación del conocimiento en las diversas áreas de producción, ya que es aquí donde se generan las fuentes de empleo, y con ello, el desarrollo de una nación.

Para el establecimiento de estrategias para este fin, se sugiere establecer de igual forma que en los dos casos anteriores, estrategias a corto mediano y largo plazo, las cuales a su vez van a ser específicas o generales de acuerdo a los avances en las investigaciones y de los proyectos establecidos.

1. Los integrantes de cada proyecto, cuerpo académico o similar de todas las instituciones participantes en conjunto con del sector gobierno, el cual mediante la intervención de Fundación PRODUCE, FONAESSDR, Fondos Mixtos, la SAGARPA y las estatales correspondientes, deberán formar comités que establezcan los lineamientos para determinar las estrategias para el desarrollo agrícola regional en cada área de interés: capacitación, capacitación a otros productores, optimización de los procesos de organización, producción de huitlacoche, procesamiento de huitlacoche, producción de inóculos, investigación de las cadenas de distribución y precios convenidos, etc., donde para esto último habrá que incluir a SNIM y a la PROFECO principalmente.

2. Los comités formados por ambas partes, establecerán los lineamientos para seleccionar a las ONGs, organizaciones particulares o empresas de las diversas regiones cercanas a las instituciones relacionadas, que no sólo estén interesadas y comprometidas a aprender, sino a estar dispuestos a esperar obtener resultados óptimos y a afrontar algunas pérdidas para aplicar las nuevas técnicas en las áreas mencionadas.

3. Los comités formados por ambas partes, establecerán los lineamientos para incluir a los productores de las regiones y micro regiones en la problemática de marginación y pobreza, de tal manera, que se disminuya esta problemática.

4. Establecer estrategias para involucrar constantemente a alumnos de los diversos niveles de estudio, con el fin de que los proyectos no sean aislados, para que tengan continuidad, y para que sean más robustos. Para ello, se propone las siguientes estrategias:

6.3.3 Beneficios esperados de la estrategia implementada para crear una red nacional de generación de conocimiento sobre *U. maydis*.

Según las experiencias de las naciones avanzadas, el medio para lograr el desarrollo de una nación, es mediante la generación de conocimiento, el cual se logra a partir del desarrollo de

la ciencia y la tecnología, y más aún, en los últimos años, en la innovación que se genera a partir de éstas.

Por ello, se espera que las estrategias propuestas en relación a la formación de una red de generación de conocimiento sobre *U. maydis*, tengan resultados importantes en el desarrollo de México. Ya que se podrán optimizar los recursos humanos, materiales y económicos dedicados a la investigación a nivel nacional, debido a que muchos de ellos podrán ser generales para cada línea de investigación nacional, con lo que además se evitará la duplicidad de esfuerzos y recursos, mediante el intercambio de alumnos e investigadores en cada línea de investigación, y con ello lograr articular sus habilidades y conocimientos en los centros más desarrollados de México en cada área de interés.

Como consecuencia de lo anterior, se logrará incrementar la productividad de las investigaciones mediante la formación de investigadores y estudiantes de licenciatura, maestría y doctorado de las diversas instituciones involucradas que estén interesados y comprometidos con la generación de conocimiento y la innovación de tecnologías sobre *U. maydis*.

Y finalmente, como uno de los logros que la sociedad podrá palpar, se logrará incrementar la productividad de las investigaciones en campo mediante la participación de productores de maíz de las diversas regiones de México, que no sólo estén interesados y comprometidos a aprender, sino que estén dispuestos a afrontar pérdidas para aplicar nuevas técnicas para producir huitlacoche. Más aún, se podrá contar con la participación y recursos económicos de los sectores productivos, tanto públicos como privados, así como de las ONGs, que deseen procesar el huitlacoche obtenido, empresas en biotecnología que deseen procesar los inóculos e invertir en nuevas investigaciones; participación de expertos en políticas públicas, en investigación, innovación, ciencia y tecnología, en solución de problemas regionales y nacionales, en mercadotecnia, etc., ya que cada día la sociedad confía más en el mejor manejo de los recursos y en obtener los resultados esperados de acuerdo al trabajo conjunto de estos sectores.

6.4 Estrategia para determinar un método sistemático para producir huitlacoche en los Valles Altos de Puebla para contribuir al desarrollo agrícola regional.

En base a las estrategias mencionadas anteriormente y en los resultados obtenidos en la presente investigación, se establece la estrategia para establecer un método sistemático para producir huitlacoche en los Valles Altos de Puebla para contribuir al desarrollo agrícola regional. Para lo cual, se han determinado los siguientes objetivos:

6.4.1 Objetivos de la estrategia para determinar un método sistemático para producir huitlacoche en los Valles Altos de Puebla para contribuir al desarrollo agrícola regional.

Como en el caso de la estrategia anterior, en este caso también se propone alcanzar objetivos a corto, mediano y largo plazo.

6.4.1.1 Objetivo general de la estrategia.

Contribuir al desarrollo de las regiones de los Valles Altos del estado de Puebla y posteriormente a la región central de México al generar un método específico para la producción sistemática de huitlacoche en cada región específica.

6.4.1.2 Objetivos particulares de la estrategia.

A corto plazo:

- i) Seleccionar cepas compatibles de *U. maydis* que tengan la mayor diversidad genética de acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación.
- ii) Diseñar inóculos con las cepas de *U. maydis* seleccionadas.
- iii) Diseñar de forma segura las unidades de investigación para cada unidad de investigación, en función de los maíces a evaluar y los inóculos diseñados.
- iv) Capacitar a productores de maíz de los Valles Altos de Puebla para evaluar los inóculos diseñados de *U. maydis*, para determinar el o los mejores inóculos.

A mediano y largo plazo:

i) Evaluar el mejor o los mejores inóculos obtenidos en el punto anterior por tres ciclos agrícolas para cada unidad de investigación para seleccionar el método específico de producción sistemática de huitlacoche para dicha región.

ii) Determinar el o los inóculos a utilizar para cada variedad de maíz en cada región, ya sea en campo abierto o en invernadero.

6.4.2 Implementación de la estrategia para determinar un método sistemático para producir huitlacoche en los Valles Altos de Puebla para contribuir al desarrollo agrícola regional.

A corto plazo:

Dado el interés y la elevada demanda del huitlacoche a nivel local, nacional e internacional, todos los sectores y actores involucrados en la estrategia se encuentran plenamente interesados y convencidos de los beneficios que se obtendrán al llevar a cabo el presente proyecto. Por lo que no hará falta, a diferencia de muchos planes de desarrollo agrícola, de convencer a cada uno de estos sectores, principalmente a los productores, por lo contrario, se deberá tener cuidado de que no se excluya a ningún miembro del sector agrícola, principalmente del sector pequeño y mediano, e incluir a productores que no se hayan unido a algún grupo u organización.

Sin embargo, se debe evaluar la operación de cada grupo u organización, y en caso necesario, se debe capacitar en este aspecto con el fin de participar en los programas de desarrollo agrícola, y de esta forma, ser los principales beneficiarios de los apoyos y gestiones institucionales. Para este fin, los investigadores y estudiantes del Colegio de Postgraduados-Puebla, expertos en estas disciplinas en el sector agrario, capacitarán a las organizaciones de productores, principalmente de maíz, utilizando la técnica de campesino a campesino para lograr una organización eficiente, de tal manera que se hagan acreedores de los apoyos económicos.

Por otra parte, y a partir de los resultados obtenidos en la presente investigación sobre diversidad genética, otro grupo de investigadores y estudiantes del área de Biotecnología de Hongos Comestibles del Colegio de Postgraduados- Puebla y de la Facultad de Ingeniería Química (FIQ) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), seleccionarán las

cepas de *U. maydis* con mayor diversidad y se determinará su cinética de crecimiento. A partir de estos datos, se realizarán pruebas de compatibilidad a nivel de laboratorio. Y finalmente con los datos obtenidos de ambas pruebas, se seleccionarán las cepas para producir diferentes inóculos.

A mediano y largo plazo:

Una vez logradas las habilidades requeridas de cada organización de productores, el grupo de investigadores y estudiantes de ambas instituciones mencionados anteriormente, capacitarán a las organizaciones de productores sobre el método para producir huitlacoche de forma sistemática y segura. Para ello, cada organización seleccionarán de 3 a 5 voluntarios de la organización o grupo, quienes dispondrán de una parte de su producción de maíz susceptible a *U. maydis* para evaluar los inóculos, de tal forma que para cada variedad de maíz se tengan 3 inóculos a evaluar.

La variedad de maíz se seleccionará bajo tres criterios:

- 1) La selección de maíces susceptible a *U. maydis* según la experiencia de los productores.
- 2) De estos maíces, se seleccionarán aquellos que sean similares a los que presentaron mayor índice de severidad en los resultados obtenidos en el presente trabajo.
- 3) Finalmente, y también de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se seleccionarán aquellos maíces que sean similares y que hayan crecido en condiciones agroecológicas similares a las de la localidad en estudio.

En esta etapa se incluirá las condiciones en que habrá de sembrarse cada unidad de investigación (parcela sembrada con una variedad de maíz específica) de manera que se obtenga huitlacoche sólo en las unidades de investigación y se evite la proliferación de huitlacoche en las parcelas vecinas. Una vez alcanzado el grado específico de madurez de las mazorcas, se procederá a inocular éstas con tres diferentes inóculos, de tal manera que se tengan tres unidades de experimentación. En todo momento se capacitará a los productores sobre el cuidado de las mazorcas hasta su recolección. Llegado el tiempo de recolección, se capacitará a los productores para que se obtenga huitlacoche de la mejor calidad en referencia a su manejo en la cosecha y postcosecha.

Lo anterior no será posible sin la participación del sector gobierno, el cual mediante la intervención de Fundación PRODUCE, FONAESSDR, o la Secretaría de Economía, la cual a su vez depende la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación

(SAGARPA), podrán brindar los apoyos técnicos, financieros y administrativos para iniciar la capacitación necesaria para optimizar los procesos de organización, así como para la capacitación para producir el huitlacoche de manera sistemática. Por otro lado, y una vez que se tenga establecido un método específico para la producción sistemática para cada región específica de los Valles Altos del estado de Puebla, es decir cuando se tengan cantidades suficientes de huitlacoche para satisfacer las demandas nacionales e internacionales, el Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados (SNIM), apoyará las gestiones necesarias para la mercadotecnia a nivel nacional e internacional. De igual forma la Procuraduría Federal del Consumidor (PROFECO) deberá publicar el precio al consumidor del huitlacoche en los principales estados consumidores de este producto como son el D.F., Estado de México y Puebla, ya que en la actualidad se carece de este dato, incluso en las bases de datos del INEGI y de la SAGARPA se carece de datos de producción de este producto, debido a que sólo se da de manera espontánea y por lo tanto en cantidades insignificantes.

6.4.3 Beneficios esperados de la estrategia implementada para determinar un método sistemático para producir huitlacoche en los Valles Altos de Puebla para contribuir al desarrollo agrícola regional.

La estrategia propuesta en esta investigación tiene un gran potencial, ya que la producción de huitlacoche actual está basada en la producción espontánea, la cual es inconstante, tanto en cantidad y calidad, ya que está sujeta a las condiciones prevalecientes en cada temporada. Por lo que de acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación, y a la estrategia propuesta, se podrá innovar en la tecnología para la producción sistemática de huitlacoche lo que permitirá una mayor cantidad y calidad de este producto en cualquier época del año, en primera instancia en los Valles Altos de Puebla, y posteriormente en la región central de México.

Al lograr una mejor organización de los productores de maíz, se logrará que se constituyan como una sociedad que sea sujeta no tan sólo de obtener apoyos económicos, sino también de financiamiento, el cual de manera particular sería casi imposible lograrlo. Posteriormente, una vez que los productores se encuentren capacitados, y que por lo tanto trabajen independientemente, y que ellos mismos promuevan esta tecnología de campesino a

campesino, se tenga una mayor producción de huitlacoche con la calidad necesaria para exportar, y con ello, contribuyan al desarrollo regional. Se espera que tanto los productores, como los centros de distribución, vendedores minoristas y mayoristas se beneficien con estos resultados desde las primeras etapas del proceso.

En el caso del sector académico y de investigación, se espera que también puedan contar con un fondo común, con el cual se pueda disponer de los recursos necesarios para la investigación básica y aplicada. Y una vez que los productores manejen de manera óptima esta tecnología, se espera que se abastezcan de los inóculos óptimos para su región, lo que generará recursos económicas que puedan emplearse tanto para el mejoramiento del producto, así como para el desarrollo de nuevos productos procesados a partir de huitlacoche, los cuales en un futuro inmediato se puedan comercializar en el extranjero principalmente.

6.5 Estrategia para aprovechar comercialmente el huitlacoche que se produce naturalmente por parte de comunidades rurales.

Aunque esta es la última de las estrategias que se propone, ésta es la más viable a corto plazo, además de que los requerimientos son mínimos comparados con los que se necesitan para las otras dos estrategias propuestas.

La presente estrategia se propone en base a los datos obtenidos en el presente trabajo, los cuales se pueden dividir en tres premisas:

6.5.1 Bases para plantear la Estrategia para aprovechar comercialmente el huitlacoche que se produce naturalmente por parte de comunidades rurales.

6.5.1.1 Premisa I

No se puede afirmar con precisión que en el estado de Puebla no exista algún método de producción controlada, ya que aunque se rumora que en Acatzingo y en Tepeaca se está produciendo de esta forma, durante la recolección de especímenes para el presente trabajo, no se pudo localizar las plantaciones o los productores que lo hicieran. En el caso de Acatzingo sólo se pudo detectar a un productor con una gran cantidad de producto (aproximadamente 10 cajas de

madera), pero sólo se concretó a decir que lo obtenía del campo en ese municipio. También en la central de abastos de la ciudad de Puebla, en la de Huixcolotla (Puebla), en la del Edo. de México, y en el mercado de la Merced en el D.F., se encontraron cantidades significativas (entre 10 a 20 cajas) pero sólo en temporada, ya que fuera de ella, se encontró en mucho menor cantidad y en muy pocos lugares. Por ello, se puede presumir que probablemente se está produciendo de manera tradicional (diversas prácticas desarrolladas por los productores) en cantidades mayores a la espontánea, pero sin ser sistemática o controlada. Por lo que estas cantidades justifican la estrategia propuesta a continuación.

6.5.1.2 Premisa II

Según la información obtenida por parte de los productores y peones durante la recolección de cuitlacoche, se sabe que la cantidad obtenida de este producto de forma natural, es decir, la producida espontáneamente, es escasa y no continua, ya que algunos años se produce mucho y otros poco o nada; según comentarios de ellos es alternada, es decir, un año se produce cuitlacoche y otro no.

6.5.1.3 Premisa III

Los resultados sobre las localidades de recolección, arrojaron que en el estado de Puebla se tienen localizadas cinco regiones: Atlixco, Cholula, Huejotzingo, Tepeaca y San Martín Texmelucan (año 2007).

6.5.2 Pasos de la estrategia

De esta forma la estrategia que se sugiere sería de la siguiente manera:

6.5.2.1 Creación de un equipo de diagnóstico especializado

Este con el fin de conocer la cantidad y frecuencia de huitlacoche obtenida por cada productor de diferentes localidades de cada una de las cinco regiones mencionadas en la premisa III.

Se propone que esta actividad esté a cargo de investigadores y estudiantes especializados en el área de diagnóstico del Colegio de Postgraduados- Puebla con el fin de obtener resultados óptimos.

6.5.2.2 Selección de las localidades donde se obtenga una cantidad de huitlacoche significativa y más o menos constante.

Estas localidades se identificarán en base a los resultados obtenidos en el diagnóstico. Las localidades cuya producción sea menor en cantidad y frecuencia, se anexarán a la localidad seleccionada más cercana a cada una de ellas.

En esta actividad participarán todos los involucrados en la presente investigación.

6.5.2.3 Creación de un centro de acopio y distribución de huitlacoche regional.

De acuerdo a los datos obtenidos en el punto anterior, se procederá a crear las condiciones en cada localidad seleccionada. Esta actividad podrá llevarse a cabo en dos partes:

a) Constitución de una organización encargada del centro de acopio y distribución de huitlacoche en cada localidad.

Esta etapa está relacionada con el requerimiento y la formación de recursos humanos.

Para la operación del centro se sugiere que al menos haya tres personas en cada centro de acopio, el Encargado General del Centro de Acopio y Distribución, el Personal Operativo del Centro de Acopio y Distribución, y El Transportista. De ser necesario, y de acuerdo a lo que decida el Consejo Directivo (definido en el punto 4 de la estrategia), cada una de estas personas podrá tener uno o más auxiliares.

El encargado general del centro de distribución, tendrá como funciones el registro de los datos del productor y las características del huitlacoche recolectado para determinar su calidad y precio, así como determinar el embalaje de acuerdo a la calidad y tiempo de almacenamiento, y finalmente, el registro de la salida del producto. De igual forma supervisará los procesos de limpieza, empaque, almacenamiento y embalaje.

Recomendaciones técnicas:

Se sugiere determinar dos niveles de calidad, de primera (100% del área de la mazorca cubierta con agallas de color blancas a grises e íntegras) y de segunda (50 a 75 % del área cubierta con agallas de color blancas a grises e íntegras). Por lo que no se aceptarán mazorcas con menos del 50% del área cubierta de agallas, ni con agallas negras y reventadas.

El personal operativo del centro de acopio, tendrá como tarea la limpieza del huitlacoche, es decir, eliminará las hojas y los insectos de éste, seleccionará e informará al encargado del centro, la calidad y peso del huitlacoche. Enseguida, envolverá cada mazorca en papel periódico con el fin de disminuir la deshidratación. Una vez envueltas, se colocarán en las parrillas del refrigerador separándolas 3 cm. una de la otra con el fin de permitir un enfriamiento homogéneo y evitar el maltrato de las agallas.

Recomendaciones técnicas:

Se recomienda mantener el huitlacoche a una temperatura de 3 °C hasta por 7 días (aunque se puede mantener a esta temperatura hasta por 11 días).

El transportista, se encargará de almacenar el producto en el medio de transporte y llevarlo a su destino de distribución o venta.

Recomendaciones técnicas:

Se sugiere que en caso de que el transporte no esté equipado con sistema de enfriamiento, el producto se transporte durante la noche para evitar el sobrecalentamiento del producto y consecuentemente la pérdida o disminución de la calidad.

Para el desarrollo óptimo de cada una de estas actividades se debe evaluar la operación de cada organización, y en caso necesario, se debe capacitar en este aspecto con el fin de participar en los programas de desarrollo agrícola, y de esta forma, ser los principales beneficiarios de los

apoyos y gestiones institucionales. Para este fin, los investigadores y estudiantes del Colegio de Postgraduados- Puebla, expertos en estas disciplinas en el sector agrario, capacitarán a las organizaciones de productores, utilizando la técnica de campesino a campesino para lograr una organización eficiente, de tal manera que se hagan acreedores de los apoyos económicos.

Por su parte, el grupo participante en el presente proyecto, será el encargado de capacitar en cuanto al aspecto técnico, es decir, la selección, clasificación, limpieza, almacenamiento, embalaje y transporte de cuitlacoche; así como de la logística y supervisión de estas actividades.

b) Creación de un centro de acopio.

Esta etapa está relacionada con los recursos materiales necesarios para la operación del centro de acopio, tales como: local, equipo administrativo, equipo de producción, y transporte.

El local deberá estar dotado de todos los servicios básicos: agua potable, electricidad, drenaje, teléfono e internet, principalmente.

Equipo administrativo, deberá incluir principalmente equipo de cómputo, escritorios, y sillas.

El equipo de producción sólo incluirá mesa(s) de trabajo y refrigerador(es) de acuerdo a la cantidad estimada de cuitlacoche acopiada de acuerdo a los datos del diagnóstico. Los refrigeradores deberán estar adaptados con parrillas separadas cada 15 cm. de altura, a fin de tener una sola fila de mazorcas para que se distribuya la temperatura uniformemente y disminuya la tasa de respiración y la deshidratación.

En cuanto al transporte, también será de acuerdo a la cantidad de cuitlacoche acopiada. El cual será desde una camioneta pick up de $\frac{3}{4}$ tonelada, hasta camiones de mayor capacidad. Si es posible, estos deberán estar adaptados con sistema de refrigeración.

6.5.2.4 Creación del Consejo Directivo.

Este consejo estará conformado por los encargados de cada centro de distribución así como por investigadores y estudiantes del Colegio de Postgraduados- Puebla especializados en el área de comercialización y consumo, administración, manejo de recursos humanos, etc. Con el fin de que en conjunto tomen decisiones relacionados a los siguientes aspectos:

- Determinar el precio de compra del producto de acuerdo a su calidad.

- Seleccionar al resto del personal de cada centro de acopio y distribución de acuerdo a sus cualidades.
- Determinar el destino de los ingresos y egresos generales, es decir, de todos los centros de acopio y distribución.
- Determinar el salario del personal de cada centro de acopio y distribución, así como de los miembros del consejo directivo.
- Diseñar las estrategias para optimizar continuamente las actividades, tanto del consejo directivo, como de cada uno de los centros de acopio y distribución.
- Determinar los mejores canales de comercialización del cuitlacoche en Puebla y si la cantidad acopiada es suficiente, en Tlaxacala, D.F y Edo. de México. De tal manera que se incluyan pequeños, medianos y grandes compradores, como comerciantes de establecimientos informales de antojitos y cocinas económicas, restaurantes de comida típica, y mercados y centrales de abastos, respectivamente.
- Determinar el precio de venta para cada uno de estos sectores.
- Determinar los periodos para atender las necesidades de cada uno de estos sectores o de cada cliente si así lo requiere.
- Diseñar en un futuro las estrategias para transformarse en un agronegocio a nivel regional en base a la integración y acuerdos regionales, ya que se ha determinado, que mediante este enfoque se garantizará el éxito de este tipo de empresas.

Nota: En la primera fase de la estrategia, la selección de los encargados de los centros de acopio y distribución de cada localidad será en base a dos criterios, primero, que el grupo de productores de cada localidad propongan a los candidatos que ellos elijan, y segundo, que el grupo de investigadores y estudiantes del Colegio de Postgraduados – Puebla especializados en organización de productores elijan a uno de los candidatos seleccionados de acuerdo a los criterios de liderazgo determinados en los cursos de capacitación. Posteriormente, una vez conformado el Consejo Directivo, los cambios o nuevos integrantes serán seleccionados por dicho consejo.

6.5.3 Gestión de apoyos.

Se gestionarán los apoyos técnicos, financieros y administrativos al gobierno, mediante la intervención de Fundación PRODUCE, FONAESDR, o la Secretaría de Economía, que a su vez depende la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).

Los apoyos técnicos, financieros y administrativos son indispensables para iniciar la capacitación requerida para los productores con el fin de optimizar los procesos de organización, así como para la capacitación para el acopio y distribución del huitlacoche.

También se solicitará el apoyo del Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados (SNIM) y de la Procuraduría Federal del Consumidor (PROFECO) para que integren y publiquen el precio al consumidor del huitlacoche en los principales estados consumidores de este producto como son el D. F., Estado de México y Puebla, ya que en la actualidad se carece de estos datos en las bases de datos del INEGI y de la SAGARPA.

6.6 Beneficios esperados de la estrategia implementada para aprovechar comercialmente el huitlacoche que se produce naturalmente por parte de comunidades rurales.

La presente estrategia, al igual que en los dos casos anteriores, tiene un gran potencial y con la ventaja de que se puede llevar a cabo en un plazo inmediato, ya que por un lado sólo se requiere capacitar a los productores y peones en aspectos básicos como se estableció en los apartados correspondientes. Por otro lado la producción de huitlacoche actual, basada en la producción espontánea, la cual al conjuntarse en un solo lugar, se podrá convenir y mantener un precio justo para todos los recolectores de este producto de una región determinada.

También, como en las otras dos estrategias, se logrará una mejor organización de los recolectores de huitlacoche que se constituyan como una sociedad que sean sujetos de apoyos económicos y de financiamiento. Y una vez que los recolectores se encuentren capacitados en el manejo postcosecha y en el establecimiento de precio justo, contribuyan al desarrollo regional.

LITERATURA CITADA

- Abubakar, Z., F. Ali, A. Pinel, O. Traoré, P. N'Guessan, J.L. Notteghem, F. Kimmins, G. Konaté, y D. Fargette. 2003. Phylogeography of Rice yellow mottle virus in Africa. *J Gen Virol.* 84: 733–743.
- Ahlholm, J.U., M. Helander, J.Henriksson, M. Metzler, y K. Saikkonen. 2002. Environmental Conditions and Host Genotype Direct Genetic Diversity of *Venturia ditricha*, a Fungal Endophyte of Birch Trees. *Society for the Study of Evolution.* 56, 8: 1566-1573.
- Alam, I., S.J. Hubbard, S.G. Oliver, y M. Rattray. 2007. A kingdom-specific protein domain HMM library for improved annotation of fungal genomes. *BMC Genomics.* 8:97
- Andrade, O., G. Muñoz, R. Galdames, P. Durán, y R. Honorato. 2004. Characterization, In Vitro Culture, And Molecular Analysis of *Thecaphora solani*, the Causal Agent of Potato Smut. *The American Phytopathological Society.* 94, 8: 875-882.
- Andrews, D.L., J.D. Egan, M.E. Mayorga, y S.E. Gold. 2000. The *Ustilago maydis* *ubc4* and *ubc5* Genes Encode Members of a MAP Kinase Cascade Required for Filamentous Growth. *The American Phytopathological Society.* 13, 7: 781–786.
- Antonio, M.M., V.J.L. Arellano, S.G. García, C.S. Miranda, C.J.A.Mejía, y C. F.V. González. 2004. Variedades criollas de maíz azul raza chalqueño. Características agronómicas y calidad de semilla. *Revista Fitotecnia Mexicana.* 27, 1: 15.
- Apoga, D., J. Barnard, H.G.Craighead, y H.C. Hoch. 2004. Quantification of substratum contact required for initiation of *Collectotrichum graminicola* appressoria. *Fungal Genet Biol.* 41: 1–12.
- Ayala F.J., W.M. Fitht, y T.M. Cleg. 2000. Variation and evolution in plants and microoanisms: Toward a new synthesis 50 years after Stebbins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA;* 97: 6941-6944.
- Bakkeren, G., J.W. Kronstad, y C.A. Le´vesque. 2000. Comparison of AFLP fingerprints and ITS sequences as phylogenetic markers in *Ustilaginomycetes*. *Mycologia.*92, 3: 510–521.
- Baldwin, B.G., M.J. Sanderson, J.M. Porter, M.F. Wojciechowski, C.S. Campbell, y M.J.

- Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence an angiosperm phylogeny. *Annal. Miss. Bot. Gard.* 82: 247-277.
- Baltazar, F. 2002. Papel de las organizaciones tradicionales para el desarrollo de comunidades marginadas en la Sierra Norte de Puebla. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.
- Banuett, F. e I. Herskowitz. 1994a. Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the a and b loci. *Exp. Mycol.* 18: 147–266.
- Banuett, F. e I. Herskowitz. 1994b. Identification of *Fuz 7*, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for a-locus dependent and independent steps in the fungal life cycle. *Genes Develop.* 8:1367-1378.
- Banuett, F. 1995. Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Ann Rev Genet.* 29:179–208. [PubMed]
- Banuett, F. e I. Herskowitz. 1996. Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development.* 122: 2965–2976.
- Bao, D. P., T. Aimi, y Y. Kitamoto. 2005. Cladistic relationships among the *Pleurotus ostreatus* complex, the *Pleurotus pulmonarius* complex, and *Pleurotus eryngii* based on the mitochondrial small subunit ribosomal DNA sequence analysis. *J. Wood Sci.* 51:77-82.
- Barnes, C.W., L.J. Szabo, G. May, y J.V.Groth. 2004. Inbreeding levels of two *Ustilago maydis* populations. *The Mycological Society of America.* 96, 6: 1236-1244.
- Barraclough, T.G. y S. Nee. 2001. Phylogenetics and speciation. *Trends. Ecol. Evol.* 16, 7: 391-399.
- Barton N.H. y P.D. Keightley. 2002. Understanding quantitative genetic variation. *Nat. Rev.Gen.* 3:11-21.
- Basse, C.W., S. Stumpferl, y R. Kahmann. 2000. Characterization of a *Ustilago maydis* gene specifically induced during the biotrophic phase: Evidence for negative as well as positive regulation. *Mol. Cell. Biol.* 20: 329–339.
- Basse, C. W. y G. Steinberg. 2004. *Ustilago maydis*, model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity. *Mol. Plant Pathol.* 5, 83-92.
- Basse, C. W. 2005. Dissecting Defense-Related and Developmental Transcriptional Responses of Maize during *Ustilago maydis* Infection and Subsequent Tumor Formation. *Plant Physiol.* 138: 1774-1784.

- Becerra, V., M. Paredes, C. Rojo, A. France, y J. Durán. 2007. Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. *Genetics and Molecular Biology*. 30, 1: 1415-4757.
- Becht, P., E. Vollmeister, y M. Feldbrügge. 2005. Role for RNA-Binding Proteins Implicated in Pathogenic Development of *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell*. 4, 1: 121–133.
- Bohmer, C., M. Bohmer, M. Bolker, y B. Sandrock. 2008. Cdc42 and the Ste20-like kinase Don3 act independently in triggering cytokinesis in *Ustilago maydis*. *J. Cell Sci*. 121:143-148.
- Bölker, M., M. Urban, y R. Kahmann. 1992. The *a* mating type locus of *Ustilago maydis* specifies cell signalling components. *Cell*. 68: 441-450.
- Bölker, M. 2001. *Ustilago maydis* – a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology*. 147: 1395–1401.
- Bortfeld, M., K. Auffarth, R. Kahmann, y C.W. Basse. 2004. The *Ustilago maydis* a2 Mating-Type Locus Genes *lga2* and *rga2*. Compromise Pathogenicity in the Absence of the Mitochondrial p32 Family Protein Mrb1. *Plant Cell*. 16: 2233-2248.
- Boyce, K. J., H. Chang, C. A. D'Souza, y J.W. Kronstad. 2005. An *Ustilago maydis* Septin Is Required for Filamentous Growth in Culture and for Full Symptom Development on Maize. *Eukaryotic Cell*. 4, 12: 2044–2056.
- Boyce, K.J., M. Kretschmer, y J. W. Kronstad. 2006. The *vtc4* Gene Influences Polyphosphate Storage, Morphogenesis and Virulence in the Maize Pathogen *Ustilago maydis*. *American Society for Microbiology*. 5, 8:1399–1409.
- Bult, C.J. y E.A. Zimmer. 1993. Nuclear systematics: ribosomal ITS evidence. *Mol. Biol. Evol.* 13: 612-622.
- Burd, M. 2009. Adaptation and constraint: overview. *Encyclopedia of Life Sciences*. <http://www.els.net> [04/Sep/2009]
- Buscott, F., D. Wipf, C. Di Battista, J.C. Munch, B. Botton, y F. Martin. 1996. DNA polymorphism in morels: PCR/RFLP analysis of the ribosomal DNA spacers and microsatellite-primed-PCR. *Mycol. Res*. 100:63-71.
- Buzina, W., H. Braun, K. Freudenschuss, A. Lackner, W. Habermann, y H. Stammberger. 2003. Fungal biodiversity as found in nasal mucus. *Med. Mycol*. 41, 2: 149-161

- Caballero, A., y M.A. Toro. 2002. Analysis of genetic diversity for the management of conserved subdivided populations. *Conserv. Genet.* 3:289-299.
- Callow, J.A. e I.T.Ling. 1973. Histology of neoplasms and chlorotic lesions in maize seedlings following the injection of sporidia of *Ustilago maydis* (DC) Corda. *Physiol. Plant Pathol.* 3: 489–494.
- Casas, R. 1994. Estrategias para el desarrollo agrícola regional en proyectos con enfoque de sistemas: caso del proyecto prototipo agropecuario del Plan Puebla. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.
- Castillo-Lluva, S. y J. Pérez-Martín. 2005. The Induction of the Mating Program in the Phytopathogen *Ustilago maydis* Is Controlled by a G1 Cyclin. *Plant Cell.* 17, 2: 3544–3560.
- Castro-Espinoza, L. e I. Ruiz- Hernández. 2003. Huitlacoche: Una delicadeza alimenticia que se puede producir en el Valle del Yaqui. *Perspectiva Universitaria.* 2:27- 28.
- Challen, M.P., A.J. Moore, y D. Martínez-Carrera. 1995. Facile extraction and purification of filamentous fungal DNA. *BioTechniques.* 18:975-978.
- Chew, E., Y. Aweiss, C.Y. Lu, y F. Banuett. 2008. *Fuz1*, a MYND domain protein, is required for cell morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Mycologia.* 100, 1:31-46.
- Christensen, J. J. 1963. Corn smut caused by *Ustilago maydis*. The American Phytopathology Society. Monograph. 2:1-41
- Coates, B., R. Hellmich, y L. Lewis. 2002. Allelic variation of a *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) minisatellite is independent of host range and geographic origin. *Genome.* 45:125-132.
- Desentis-Mendoza, R. M., H. Hernández-Sánchez, A. Moreno, D.C.E.Rojas, L. Chel-Guerrero, J. Tamariz, y M.E. Jaramillo-Flores. 2006. Enzymatic polymerization of phenolic compounds using laccase and tyrosinase from *Ustilago maydis*. *Biomacromolecules.* 7, 6: 1845-1854.
- Desmond, E. y S. Grimaldo. 2009. Phylogenomics of Sterol Synthesis: Insights into the Origin, Evolution, and Diversity of a Key Eukaryotic Feature. *Genome Biology and Evolution.* 2009:364-381.
- Devier, B., G. Aguilera, M.E. Hood, y T. Giraud. 2009. Ancient Trans-specific Polymorphism at Pheromone Receptor Genes in *Basidiomycetes*. *Genetics.* 181: 209-223

- Dieckmann, U. y M. Doebeli. 1999. On the origin of species by sympatric speciation. *Nature*. 400: 353-357.
- Doehlemann, G., R. Wahl, M. Vranes, R.P. de Vries, J. Kämper, y R. Kahmann. 2007. Establishment of compatibility in the *Ustilago maydis*/maize pathosystem. *J. Plant. Physiol.* 165: 29–40.
- Doehlemann, G., R. Wahl, R.J.Horst, L.M. Voll, B. Usadel, F. Poree, M. Stitt, J. Pons-Kühnemann, U. Sonnewald, R. Kahmann, y J. Kämper. 2008. Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *The Plant Journal*. 56, 2: 181-195.
- Domínguez, T. y A. Aguilar. 1999. Elementos de estrategia para el desarrollo agrícola en una unidad de riego en el estado de Veracruz. México. UACH.
- Dragon, F. y W. Filipowics. 2009. snoRNAs: Biogenesis, structure and function. *Encyclopedia of Life Sciences*. <http://www.els.net> [04/Sep/2009]
- du Toit, L. J. y J.K. Pataky. 1999a. Effects of silk maturity and pollination on infection of maize ears by *Ustilago maydis*. *Plant Disease*. 83:621-626.
- du Toit, L. J. y J.K. Pataky. 1999b. Variation associated with channel inoculation for common smut of sweet corn. *The American Phytopathological Society*. 83, 8: 727-732.
- Dyer, A.T. y K.J. Leonard. 2000. Contamination, error, and nonspecific molecular tools. *Phytopathology*. 90: 565-567.
- Ellingboe, A.H. 1961. Somatic recombination in *Puccinia graminis* var. *Tritici*. *Phytopathology*. 51: 13-14.
- Feldbrügge, M, J. Kämper, G. Steinberg, y R. Kahmann. 2004. Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Curr Opin Microbiol*. 7, 6: 666-672.
- Field K.G. G.J. Olsen, D.J. Lane, S.J. Giovannoni, M.T. Ghishelin, E.C. Raff, N.R. Pace, y R.A. Raff. 1988. Molecular phylogeny of the animal kingdom. *Science*. 239: 748- 753.
- Fierer, N., M. Breitbart, J. Nulton, P. Salamon, C. Lozupone, R. Jones, M. Robeson, R.A. Edwards, B. Felts, S. Rayhawk, R. Knight, F. Rohwer, y R.B. Jackson. 2007. Metagenomic and Small-Subunit rRNA Analyses Reveal the Genetic Diversity of Bacteria, Archaea, Fungi, and Viruses in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 73, 21: 7059-7066.

- Flor-Parra, I., S. Castillo-Lluva, y J. Pérez-Martín. 2007. Polar Growth in the Infectious Hyphae of the Phytopathogen *Ustilago maydis* Depends on a Virulence-Specific Cyclin. *Plant Cell*. 19, 10: 3280–3296.
- García-Herrera, E. 2004. Componentes de una estrategia para el desarrollo agrícola regional en Pinos, Zacatecas: el nopal tunero como su elemento central. *Comunicaciones en Socioeconomía, Estadística e Informática*. 8: 83-102.
- García-Muse, T., G. Steinberg, y J. Pérez-Martín. 2004. Characterization of B-type cyclins in the smut fungus *Ustilago maydis*: roles in morphogenesis and pathogenicity. *Journal of Cell Science*. 117, 3: 487-506.
- Garrido, E., U. Voss, P. Muller, S. Castillo-Lluva, R. Kahmann, y J. Pérez-Martín. 2004. The induction of sexual development and virulence in the smut fungus *Ustilago maydis* depends on Crk1, a novel MAPK protein. *Genes Dev*. 18:3117-3130.
- Giannasi, D.E., G. Zurawski, G. Learn, y M. T. Clegg. 1992. Evolutionary relationships of the Caryophyllidae based on comparative rbcL sequences. *Syst. Bot*. 17: 1-15.
- Giraud, T., R. Yockteng, M. López-Villavicencio, G. Refrégier, y M.E. Hood. 2008. Mating System of the Anther Smut Fungus *Microbotryum violaceum*: Selfing under Heterothallism. *Eukaryotic Cell*. 7, 5: 765-775.
- Gold, S., G. Duncan, K. Barrett, y J. Kronstad. 1994. cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes Dev*. 8: 2805-2816.
- González-Alamillo L.G. 2010. Productos mexicanos, Regalos de México para el mundo. *Revista Virtual Gastronómica, UAEM*.
http://www.uaemex.mx/Culinaria/segundo_numero/articulo01.htm [18/Agosto/2010]
- Grant, D. y R. C. Shoemaker. 2009. Plant gene mapping techniques. *Encyclopedia of Life Sciences* <http://www.els.net> [04/Sep/2009]
- Gunasekaran, M., J. L. Bushnell, y D. J. Weber. 1972. Comparative studies on lipid components of *Ustilago bullata* and *Ustilago maydis* spores. *Res. Commun. Chem. Pathol Pharmacol*. 3:621–628.
- Guzmán, G. 1994. Los hongos en la medicina tradicional de Mesoamérica y México. Ed. Iberoamericana. México.
- Harrison, R. M. 2009. *Encyclopedia of Life Sciences*. <http://www.els.net> [04/Sep/2009]

- Hartmann, H. A., R. Kahmann, y M. Bölker. 1996. The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* 15, 7:1632-1641.
- Hartmann, H.A., J. Krüger, F. Lottspeich, y R. Kahmann. 1999. Environmental Signals Controlling Sexual Development of the Corn Smut Fungus *Ustilago maydis* through the Transcriptional Regulator Prf1. *The Plant Cell.* 11: 1293–1305.
- Hastings, A. 2009. Hard-Weinberg theorem. *Encyclopedia of Life Sciences.* <http://www.els.net> [04/Sep/2009]
- Hedeler, C., H.M. Wong, M.J. Cornell, I. Alam, D.M. Soanes, M. Rattray, S.J. Hubbard, N.J. Talbot, S.G. Oliver, y N.W. Paton. 2007. e-Fungi: a data resource for comparative analysis of fungal genomes. *BMC Genomics.* 8: 426.
- Hillis, D.M. C. Moritz, C.A. Porter, y R.J. Baker. 1991. Evidence of biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA. *Science.* 251: 308- 310.
- Hillis, D.M. y M.T. Dixon. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart. Rev. Biol.* 66: 411-453.
- Hillis, D.M., J.P. Huelsenbeck, y C.W. Cunningham. 1994. Application and accuracy of molecular phylogenies. *Science.* 264: 671-677.
- Ho, E.CH, J. Matt, M.J. Cahill, y B.J. Saville. 2007. Gene discovery and transcript analyses in the corn smut pathogen *Ustilago maydis*: expressed sequence tag and genome sequence comparison. *BMC Genomics.* 8:334.
- Holliday, R. 1974. *Ustilago maydis*. In: *Handbook of Genetics*, vol. 1, edited by King, R.F. Plenum Press, N. Y., USA. Pag. 575-595.
- Holliday, R. 2004. Early studies on recombination and DNA repair in *Ustilago maydis*. *DNA Rep.* 3: 671–682.
- Hortelano, S.R.R., M.A. Gil, V.A. Santacruz, C.S. Miranda, y T.L. Córdova. 2008. Diversidad morfológica de maíces nativos del valle de Puebla. *Agricultura Técnica en México.* 34, 2: 189-200.
- Hu, G., A. Kamp, R. Linning, S. Naik, y G. Bakkeren. 2007. Complementation of *Ustilago maydis* MAPK Mutants by a Wheat Leaf Rust, *Puccinia triticina* Homolog: Potential for Functional Analyses of Rust Genes. *MPMI.* 20, 6: 637–647.
- Iturriaga, J. N. 1998a. Las cocinas de México I. Fondo 2000, Cultura para todos.
- Iturriaga, J. N. 1998b. Las cocinas de México II. Fondo 2000, Cultura para todos.

- Jiménez de León J. R. 2007. Huitlacoche. La Specula.com International Weekly Magazine.
<http://www.laspecula.com>
- Johnston, M.O. 2009. Mutations and new variation: overview. Encyclopedia of Life Sciences.
<http://www.els.net> [04/Sep/2009]
- Kahmann, R., T. Romeis, M. Bölker, y J. Kämper. 1995. Control of mating and development in *Ustilago maydis*. Curr. Op. Gen. Dev. 5, 559-564.
- Kahmann, R. y J. Kämper. 2004. *Ustilago maydis*: How Its Biology Relates to Pathogenic Development. New Phytologist. 164; 1: 31-42.
- Kämper, J., M. Reichmann, T. Romeis, M. Bölker, y R. Kahmann. 1995. Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. Cell. 81, 73-83
- Kämper, J., R. Kahmann, M. Bölker, L.J. Ma, T. Brefort, B.J. Saville, F. Banuett, J. W. Kronstad, S. E. Gold, O. Müller, M. H. Perlin, H. A. B. Wösten, R. de Vries, J. Ruiz-Herrera, y C.G. Reynaga-Peña. 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. Nature Publishing Group. 444, 2: 97-101.
- Karaoglu, H, C.M. Ying Lee, y W. Meyer. 2004. Survey of Simple Sequence Repeats in Completed Fungal Genomes. Molecular Biology and Evolution. 22, 3:639-649.
- Klose, J., M. Moniz de Sá, y J.W. Kronstad. 2004. Lipid-induced filamentous growth in *Ustilago maydis*. Molecular Microbiology. 52, 3: 823–835.
- Klose, J. y J. W. Kronstad. 2006. The Multifunctional b-Oxidation Enzyme Is Required for Full Symptom Development by the Biotrophic MaizePathogen *Ustilago maydis*. Eukaryotic Cell. 5, 12: 2047–2061.
- Koch, A.M., G. Kuhn, P. Fontanillas, L. Fumagalli, J. Goudet, e I.R.Sanders. 2003. High genetic variability and low local diversity in a population of arbuscular mycorrhizal fungi. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101:2369-2374.
- Komo-Zelazowska, M., J. Bissett, D. Zafari, L. Hatvani, L. Manczinger, S. Woo, M. Lorito, L. Kredics, C.P. Kubicek, y I.S. Druzhinina. 2007. Genetically Closely Related but Phenotypically Divergent *Trichoderma* Species Cause Green Mold Disease in Oyster Mushroom Farms Worldwide. Applied and Environmental Microbiology.73, 22: 7415-7426.

- Kondrashov, A. S. y F. A. Kondrashov. 1999. Interactions among quantitative traits in the course of sympatric speciation. *Nature*. 400: 351-354.
- Koonin, E.V. 2009. Darwinian evolution in the light of genomics. *Nucleic Acids Research*. 37, 4:1011-1034.
- Krajewski, C. 1994. Phylogenetic measures of biodiversity: a comparison and critique. *Biol. Conserv.* 69: 33-39.
- Kronstad, J.W. 2003. Review. Castles and cuitlacoche: the first international *Ustilago* conference. *Fungal Genetics and Biology*. 38: 265–271.
- Krüger, J., G., G. Loubradou, E. Wanner, M. Regenfelder, M. Feldbrügge, y R. Kahmann. 2000. Activation of the cAMP Pathway in *Ustilago maydis* Reduces Fungal Proliferation and Teliospore Formation in Plant Tumors. *The American Phytopathological Society*. 13, 10:1034-1040.
- Kumar, S. y A. J. Filipski. 2009. Molecular phylogeny reconstruction. *Encyclopedia of Life Sciences*. <http://www.els.net> [04/Sep/2009]
- Lafontaine, D.L. y D. Tollervey. 2009. Ribosomal RNA. *Encyclopedia of Life Sciences*. <http://www.els.net> [04/Sep/2009]
- Laurie. J.D., R. Linning, y G. Bakkeren. 2007. Hallmarks of RNA silencing are found in the smut fungus *Ustilago hordei* but not in its close relative *Ustilago maydis*. *Current Genetics*. 53, 1: 49- 58.
- Lee, J. S., M. O. Lim, K. Y. Cho, J. H. Cho, S. Y. Chang, y D. H. Nam. 2006. Identification of medicinal mushroom species based on nuclear large subunit rDNA sequences. *J. Microbiol.* 44:29-34.
- Lee, N., y J. W. Kronstad. 2002. *ras2* Controls Morphogenesis, Pheromone Response, and Pathogenicity in the Fungal Pathogen *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell*. 1, 6: 954–966.
- Lengeler, K.B., R. C. Davidson, C. D'souza, T. Harashima, W. Shen, P.Wang, X. Pan, M. Waugh, y J. Heitman. 2000. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *American Society for Microbiology*. 64, 4: 746-785.
- León-Ramírez, C., L. Cabrera-Ponce, A.D. Martínez-Espinoza, L. Herrera-Estrella, L. Méndez, G. Reynaga-Peña, y J. Ruiz-Herrera. 2004. Infection of alternative host plant species by *Ustilago maydis*. *New Phytologist*. 164, 2: 337-346.

- Liston, A. 1992. Variation in the chloroplast genes *rpoCl* and *rpoC2* of the genus *Astragalus* (Fabaceae): Evidence from restriction site mapping of a PCR- amplified fragment. *Ame. J. Bot.* 79: 953- 961.
- Lizarraga-Guerra, R., y G. Lopez Mercedes. 1996. Content of free amino acids in huitlacoche (*Ustilago maydis*). *J. Agric. Food Chem.* 44: 2556-2559.
- Lizarraga-Guerra, R., y G. Lopez Mercedes. 1998. Monosaccharide and alditol contents of huitlacoche (*Ustilago maydis*). *J. Food Compos. Anal.* 11: 333-339.
- Long, J. 1997. *Conquista y comida. Consecuencias del encuentro de dos mundos.* UNAM. 539pp.
- López, F. 2005. Elementos para el diseño de estrategias eficaces de gestión de la información agraria. Fundación General de la UNED.
- Loreau, M. 2009. Linking biodiversity and ecosystems: towards a unifying ecological theory. *Phil. Trans. R. Soc.* 365; 1537: 49-60.
- Maeta, K., T. Ochi, K. Tokimoto, N. Shimomura, N. Maekawa, N. Kawaguchi, M. Nakaya, Y. Kitamoto, y T. Aimi. 2008. Rapid Species Identification of Cooked Poisonous Mushrooms by Using Real-Time PCR Applied and Environmental Microbiology. 74; 10: 3306-3309.
- Manzi, P., A. Aguzzi, y L. Pizzoferrato. 2001. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chem.* 73: 321-325.
- Maresca, B., y G. S. Kobayashi. 2000. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. *Contrib. Microbiol.* 5:201-216.
- Martin, D.M. A., D. Miranda-Saavedra, y G.J. Barton. 2009. Kinomer V. 1.0: a database of systematically classified eukaryotic protein kinases. *Nucleic Acids Research.* 37 (Database issue): D244-D250.
- Martínez-Carrera, D., A. Larqué-Saavedra, P. Morales, M. Sobal, W. Martínez, y A. Aguilar. 1993. Los hongos comestibles en México: biotecnología de su reproducción. *Ciencia y Desarrollo.* 41-49.
- Martínez-Espinoza, A.D; C. León, G. Elizarraraz, y J. Ruiz-Herrera. 1997. Monomorphic Nonpathogenic Mutants of *Ustilago maydis*. *Phytopathology.* 87, 3: 259- 265.
- Martínez-Espinoza, A.D., J. Ruiz-Herrera, y S.E. Gold. 2000. Las vías de transducción de señales en la patogénesis y la morfogénesis de hongos: los casos de *Ustilago maydis* y

- Magnaporthe grisea*. Revista Mexicana de Fitopatología. 18, 3: 55-60.
- Martinez-Espinoza, A.D., M.D. Garcia-Pedrajas, y S.E. Gold. 2002. The *Ustilaginales* as Plant Pests and Model Systems. Fungal Genet Biol. 35, 1:1-20.
- Martínez-Espinoza, A.D., C.G. León-Ramírez, N. Singh, y J. Ruiz-Herrera. 2003. Use of PCR to detect infection of differentially susceptible maize cultivars using *Ustilago maydis* strains of variable virulence. Int Microbiol. 6: 117–120.
- Martínez-Lage, A y A. González-Tizón. 2004. Aplicaciones de la bioinformática en la elaboración de filogenias moleculares. Bioinformática. Edit. Fundación Alfredo Brañas. Santiago de Compostela. 53-81 [pdf]
- Matsuoka, Y., Y. Vigouroux, M. M. Goodman, J. Sanchez, E. Buckler, y J. Doebley. 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 6080– 6084.
- Matus, C. 1972. Estrategia y Plan. 11ª Edición. Siglo XXI. Editores. México.
- Matus, C. 1980. Planificación de situaciones. 1ª Edición. Fondo de Cultura Económica. México.
- McCarthy, E.M., M. A. Asmussen, y W.W. Anderson. 1995. Heredity. 74: 502-509.
- McDonald, B.A. y J.M. McDermott. 1993. The population genetics of plant pathogenic fungi. BioScience. 43: 311-319.
- McDonald, B. 1997. The Population Genetics of Fungi: Tool and Techniques. Symposium Population Genetics of Soilborne Fungal Plant Pathogens. Phytopathology. 87, 4: 448-452.
- Méndez-Morán, L; C.G. Reynaga-Peña, P.S. Springer, y J. Ruiz-Herrera. 2005. *Ustilago maydis* Infection of the Nonnatural Host *Arabidopsis thaliana*. Phytopathology. 95, 5: 480- 488.
- Mendoza-Mendoza, A., P. Berndt, A. Djamei, C. Weise, U. Linne, M. Marahiel, M. Vraneš, J. Kämper, y R. Kahmann. 2008. Physical-chemical plant-derived signals induce differentiation in *Ustilago maydis*. Molecular microbiology. 71, 4: 895-911.
- Mercado-Flores, Y., C. Hernández-Rodríguez, J. Ruiz-Herrera, y L. Villa-Tanaca. 2003. Proteinases and exopeptidases from the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. Mycologia, 95, 2: 327-339.
- Mintzberg, H. y J. Brian. 1993. El proceso estratégico. Prentice Hall. Segunda edición. México, D.F. 1207 p.

- Mitton J.B. 2009. Adaptation and natural selection: overview. Encyclopedia of Life Sciences. <http://www.els.net> [04/Sep/2009]
- Molina, L. y R. Kahmann. 2007. An *Ustilago maydis* Gene Involved in H₂O₂ Detoxification Is Required for Virulence. *The Plant Cell*. 19: 2293-2309.
- Mosseau T. A. y A. E. Olvido. 2009. Geographical variation. Encyclopedia of Life Sciences. <http://www.els.net> [04/Sep/2009]
- Munkacsi, A. B., S. Stoxen y G. May. 2007. Domestication of maize, sorghum, and sugarcane did not drive the domestication of their smut pathogens. *Evolution*. 61: 388–403.
- Munkacsi, A.B., S. Stoxen, y G. May. 2008. *Ustilago maydis* populations tracked maize through domestication and cultivation in the Americas. *Proc. R. Soc. B*. 275, 1638: 1037-1046.
- Nei, M. 1976. Mathematical models of speciation and genetic distance. *Population Genetics and Ecology* (S. Karlin and E. Nevo, eds.), Academic Press, New York. 723-765 p.
- Neuhauser, C., D. A. Andow, G. E. Heimpel, G. May, R.G. Shaw, y S. Wagenius. 2003. Community Genetics: Expanding the Synthesis of Ecology and Genetics. *Ecology*. 84, 3: 545-558.
- Ocampo, F. I. y C. J. F. Escobedo. 2006. Conocimiento tradicional y estrategias campesinas para el manejo y conservación del agua de riego. *Ra Ximhai*. 2, 2: 343-371.
- O'Hara, R.J. 1993. Systematic generalization, historical fate and the species problem. *Syst. Biol.* 42, 3: 231-246.
- Otte, D. 2009. Species and speciation. Encyclopedia of Life Sciences. <http://www.els.net> [04/Sep/2009]
- Palazuelos, S. 1997. El libro de la cocina mexicana. Edit. Patria. 256 p.
- Paredes- López, O. 2000. Tecnologías para la producción masiva de huitlacoche. CONACYT. Cuaderno de trabajo, Sistema de Investigación Miguel Hidalgo. México, 35p.
- Paredes- López, O. 2001. Alimentos mesoamericanos: el huitlacoche, caviar de los pobres, exquisitez culinaria. En: *Lunes en la Ciencia*, 10 de septiembre del 2001. <http://www.jornada.unam.mx/2001/09/10/cien-paredes.html> [8-sep-10]
- Paredes- López, O. y M.E. Valverde. 2006. Los recursos nutraceuticos y medicinales que Mesoamérica le ha dado al mundo. *Revista Cinvestav*. 3: 65-73
- Pataky, J. K.1991. Production of cuitlacoche (*Ustilago maydis* [DC] Corda) on sweet corn. *HortScience*. 26:1374-1377

- Pataky J. K., y M.R. Kerns. 1995. Evaluation of a Silk-Inoculation Technique to Differentiate Reactions of Sweet Corn Hybrids to Common Smut. *Phytopathology*. 85:1323-1328.
- Pataky, J. K. 2002. Production of huitlacoche *Ustilago maydis* using inoculation techniques developed to screen reactions of sweet corn to common smut. *Mushroom Biology and Mushroom Products*. Sánchez et al. (eds). 31-41p.
- Pataky, J. K y M.A. Chandler. 2003. Production of huitlacoche, *Ustilago maydis*: timing inoculation and controlling pollination. *Mycologia*, 95, 6: 1261-1270.
- Pérez- Santiago, A., E. Saavedra, E. Pérez-Campos, y F. Córdoba. 2000. Research Article. Effect of plant lectins on *Ustilago maydis in vitro*. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci*. 57: 1986–1989.
- Petersen, R. H., y K. W. Hughes. 1999. Species and speciation in mushrooms? Development of a species concept poses difficulties. *Bio. Sci*. 49:440-452.
- Pope D.D. y S.M. McCarter. 1991. The effect of inoculation method on disease incidence and severity of the corn smut caused by *Ustilago maydis*. *Phytopathology*. 81, 7:814-819.
- Pope D. D. y S. M. McCarter. 1992. Evaluation of inoculation methods for inducing common smut on corn ears. *Phytopathology*. 82:950-955.
- Reeve, H.K. y P.W. Sherman. 2009. Adaptations: meanings. *Encyclopedia of Life Sciences*. <http://www.els.net> [04/Sep/2009]
- Reineke, G., B. Heinze, J. Schirawski, H. Buettner, R. Kahmann, y C.W. Basse. 2008. Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation. *Molecular Plant Pathology*. 9, 3: 339-355.
- Reiseberg, L.H. y M.C. Ungerer. 2009. Speciation: genetics. *Encyclopedia of Life Sciences*. <http://www.els.net> [04/Sep/2009]
- Reznick, D. 2009. Natural selection. *Encyclopedia of Life Sciences*. <http://www.els.net> [04/Sep/2009]
- Ritland, K. y M. T. Clegg. 1987. Evolutionary analysis of plant DNA sequences. *The American Naturalist*. 130: S74-S100.
- Rocchambeau, H., F.Fournet-Hanocq, y V.T. Khang. 2000. Measuring and managing genetics variability in small populations, *Ann Zootech*. 49:77-93.

- Rodríguez-Kessler, M., O.A. Ruizb, S. Maialeb, J. Ruiz-Herrera, y J.F. Jiménez-Bremont. 2008. Polyamine metabolism in maize tumors induced by *Ustilago maydis*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46, 8-9: 805-814.
- Roux, C., T. Almaraz, y G. Durrieu. 1998. Phylogeny of some smuts fungi based on ITS sequence analysis. *Cr. Acad. Sci. III-Vie. PubMed. CSA*. 321, 7: 603–609.
- Ruiz-Herrera, J., C.G. Leon, L. Guevara-Olvera, y A. Carabez-Trejo. 1995. Yeast-mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis*. *Microbiology*.141: 695–703.
- Ruiz-Herrera, J., C. León, A. Carabez-Trejo, y E. Reyes-Salinas. 1996. Structure and chemical composition of the cell walls from haploid yeast and mycelial forms of *Ustilago maydis*. *Fungal Genet. Biol.* 20: 133–142
- Ruiz-Herrera, J. y A.D. Martínez-Espinoza. 1998. The fungus *Ustilago maydis*, from the aztec cuisine to the research laboratory. *International Microbiology*. 1:149-158
- Salem-Izacc, S.M., T. Koide, R.Z.N. Vêncio, y S.L. Gomes. 2009. Global Gene Expression Analysis during Germination in the Chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*. *Eukaryotic Cell*.8, 2: 170-180.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, y T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. Laboratory manual*. 2nd ed. N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1659p.
- Schink, K.O. y M. Bölker. 2009. Coordination of Cytokinesis and Cell Separation by Endosomal Targeting of a Cdc42-specific Guanine Nucleotide Exchange Factor in *Ustilago maydis*. *Mol.Biol.Cel.* 20, 3: 1081-1088.
- Schirawski, J., H.U. Böhnert, G. Steinberg, K. Snetselaar, L. Adamikova, y R. Kahmann. 2005. ER glucosidase II is required for pathogenicity of *Ustilago maydis*. *Plant Cell*. 17: 1–12.
- Schmidt, O., Y U. Moreth. 2000. Species-specific PCR primers in the rDNA-ITS region as a diagnostic tool for *Serpula lacrymans*. *Mycol. Res.* 104:69-72.
- Serafin- Muñoz,A.H., K. Kubachka, K. Wrobel, F. Gutierrez- Corona, S. K. V. Yathavakilla, J.A.Caruso, y K. Wrobel. 2005. Metallomics Approach to Trace Element Analysis in *Ustilago maydis* Using Cellular Fractionation, Atomic Absorption Spectrometry, and Size Exclusion Chromatography with ICP-MS Detection. *J. Agric. Food Chem.* 53, 13: 5138 -5143.

- Sgarlata, C. y J. Pérez-Martín. 2005. Inhibitory phosphorylation of a mitotic cyclin-dependent kinase regulates the morphogenesis, cell size and virulence of the smut fungus *Ustilago maydis*. *Journal of Cell Science*. 118: 3607-3622.
- Shen, Q., D.M. Geiser, y D.J. Royse. 2002. Molecular phylogenetic analysis of *Grifola frondosa* (maitake) reveals a species partition separating eastern North American and Asian isolates. *Mycologia*. 94, 3: 472-482.
- Singh, N, B.M. Somai, y D. Pillay. 2005. Molecular profiling demonstrates limited diversity amongst geographically separate strains of *Ustilago scitaminea*. *FEMS Microbiology Letters*. 247: 7–15.
- Sivaramakrishnan, S., S. Kannan, y S.D. Singh. 2002. Genetic variability of Fusarium wilt pathogen isolates of chickpea (*Cicer arietinum L.*) assessed by molecular markers. *Mycopathologia*. 155:171-178.
- Snetselaar, K.M. y C.W. Mims. 1993. Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: Light and electron microscopy. *Phytopathology* 83:843-850.
- Sobal, M., P. Morales, M. Bonilla, G. Huerta y D. Martínez-Carrera. 2007. El Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados. Capítulo 2.1, 14 p. En: El Cultivo de Setas *Pleurotus spp.* en México. J. E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata and H. Leal (Eds.). ECOSUR-CONACYT, México, D.F.
- Snetselaar, K.M., M. Carfioli, K.A. Cordisco. 2001. Pollination can protect maize ovaries from infection by *Ustilago maydis*, the corn smut fungus. *Can J Bot.* 79:1390-1399
- Sokal, R.R. 1985. The continuing search for order. *American Naturalist*. 126: 729- 749.
- Somai, B.M., R.A. Dean, M.W. Farnham, T.A. Zitter, y A.P. Keinath. 2002. Internal transcribed spacer regions 1 and 2 and random amplified polymorphic DNA analysis of *Didymella bryoniae* and related *Phoma* species isolated from cucurbits. *Phytopathology* 92, 997–1004.
- Steinberg, G., R. Wedlich-Söldner, M. Brill, e I. Schulz. 2000. Microtubules in the fungal pathogen *Ustilago maydis* are highly dynamic and determine cell polarity. *Journal of Cell Science*. 114: 609-622.
- Steinberg, G. y J. Perez-Martin. 2008. *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends Cell Biol.* 18, 2: 61-67.

- Steven, B.L. y J.W. Taylor. 1992. Phylogeny of five fungus-like protocistan *Phytophthora* species, inferred from the Internal Transcribed Spacers or Ribosomal DNA. *Mol. Biol. Evol.* 9, 4: 636-653.
- Stoll, M., M. Piepenbring, D. Begerow, y F. Oberwinkler. 2003. Molecular phylogeny of *Ustilago* and *Sporisorium* species (*Basidiomycota*, *Ustilaginales*) based on internal transcribed spacer (ITS) sequences. *Canadian Journal of Botany. ProQuest Agriculture Journals.* 81, 9: 976-984.
- Stukenbrock, E.H, S. Banke, M. Javan-Nikkhah, y B.A. McDonald. 2007. Origin and domestication of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* via sympatric speciation. *Mol. Biol. Evol.* 24: 398–411.
- Taylor, J.W., E. Turne, J.P. Townsend, J.R. Dettman, y D. Jacobson. 2006. Eukaryotic microbes, species recognition and the geographic limits of species: examples from the kingdom Fungi. *Phil Trans R Soc B.* 361, 1475: 1947 - 1963.
- Thakur, R. P., K.J. Leonard, y J.K. Pataky. 1989. Smut gall development in adult corn plants inoculated with *Ustilago maydis*. *Plant Disease.* 73: 921-925.
- Ungerer, M. C., J. E. Stuart, J. P. Baird, y L. H. Rieseberg. 1998. Rapid hybrid speciation in wild sunflowers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 11757-11762.
- Valverde, M. E., O. Paredes-López, J.K. Pataky, y F. Guevara-Lara. 1995. Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a Food Source Biology, Composition, and Production. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 35, 3:191-229.
- Valverde, M. E. y O. Paredes- López. 1993. Production and evaluation of some food properties of huitlacoche (*Ustilago maydis*). *Food Biotechnology.* 7: 207-219.
- Valverde, M. E., G. Vandemark, O. Martínez, y O. Paredes-López. 2000. Genetic diversity of *Ustilago maydis* strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 16: 49-55.
- Venegas, P.E., M.E. Valverde, O. Paredes-Lopez, y J.K. Pataky. 1995. Production of the edible fungus huitlacoche (*Ustilago maydis*): Effect of maize genotype on chemical composition. *Journal of Fermentation and Bioengineering.* 80, 1: 104-106.
- Villanueva, C.V. 1997. Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a food in Mexico. *Micol. Neotrop. Apl.* 10: 73-81.
- Villanueva, C.V., D. Cruz, J.D. Molina, F. Castillo, y E. Zavaleta. 1999. Artificial induction of huitlacoche (*Ustilago maydis*): influence of different conditions in the field. *Micol.*

Neotrop. Apl. 12: 41 – 57.

- Voth, P.D., L. Mairura, B.E. Lockhart, y G. May. 2006. Phylogeography of *Ustilago maydis* virus H1 in the USA and Mexico. J.Gen.Virol. 87: 3433-3441.
- Walsh, J.B. 2009. Genome evolution: overview. Encyclopedia of Life Sciences. <http://www.els.net> [04/Sep/2009]
- Weinzierl, G., L. Leveleki, A. Hassel, G. Kost, G. Wanner, y M. Bölker. 2002. Regulation of cell separation in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. Molecular Microbiology. 45, 1: 219–231.
- Wendel, JF., A. Schnabei, y T. Seelanen. 1995. Bi-directional intelocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 92: 280- 284.
- Wolfe, M.S y J.M. McDermott. 1994. Population genetics of plant-pathogen interactions: the example of the *Erysiphe graminis- Hordeum vulgare* pathosystem. Annual Review of Phytopathology. 32: 89-113.
- Wu, Q. X., G. M. Mueller, F. M. Lutzoni, Y. Q. Huang, Y S. Y. Guo. 2000. Phylogenetic and biogeographic relationships of eastern Asian and eastern North American disjunct *Suillus* species (fungi) as inferred from nuclear ribosomal RNA ITS sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 17: 37-47.
- Xu, J. y A.W. Day. 1992. Multiple Forms of Fimbriae on the Sporidia of Corn Smut, *Ustilago maydis*. International Journal of Plant Sciences. 153, 4: 531-540.
- Xu, J., C. Desmerger, y P. Callac. 2002. Fine scale genetic analyses reveal unexpected spatial temporal heterogeneity in two natural populations of the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. Microbiology. 148: 1253-1262.
- Zambino, P.J., J.V. Groth, L. Lukens, J.R. Garton, y G. May. 1997. Variation at the b mating type locus of *Ustilago maydis*. Phytopathology. 87:1233–1239.
- Zervakis, G.I., G. Venturella, y K. Papadopoulou. 2001. Genetic polymorphism and taxonomic infrastructure of the *Pleurotus eryngii* species-complex as determined by RAPD analysis, isozyme profiles and ecomorphological characters. Microbiology. 147: 3183-3194.

- Zervakis, G.I., J.M. Montalvo y R. Vilgalys. 2004. Molecular phylogeny, biogeography and speciation of the mushroom species *Pleurotus cystidiosus* and allied taxa. *Microbiology*. 150: 715-726.
- Zhao, X., R. Mehrabi, y J. R. Xu. 2007. Mitogen-activated protein kinase pathways and fungal pathogenesis. *Eukaryot. Cell*. 6: 1701–1714.
- Zheng, Y., J. Kief, K. Auffarth, J.W. Farfsing, M. Mahlert, F. Nieto, y C.W. Basse. 2008. The *Ustilago maydis* Cys₂His₂-type zinc finger transcription factor Mzr1 regulates fungal gene expression during the biotrophic growth stage. *Molecular microbiology*. 68, 6: 1450-1470.

ANEXO A

DATOS DE ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE *U. maydis*

Anexo A1. Secuencias de ITS-4 de *Ustilago maydis* del centro del centro de México.

CP436

NNNNNNNNNNNNNNNNNNCENNCTGAGGCCGATGAATTGAAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTAA
AGCANAGGCNNGGGCGGGGTTCAANAAGCACGCCAAACAGCANAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGC
CCTCTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCGA
GCTTTCGTCCGTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCA
NANACCCTCACTACNGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTCGTTCGAAACAATTC
NCGGCCCTCAAACAGGCNTGCTCCCCANATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGNGCGTTCAAAGATTCTN
ATGATTCACTTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAG
AGATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGTTCCATCATCAAAAA
AATGATTTTTGTCTTCCAATCCTANTGTTCAAAAAGTGTGGTAAGAAGCGCCNACCCGCTTTCCCCA
NACGCTGCTCGCTATGAGCNCTACNGGTTTCGACAGACCGACCGATGCAACCGTGTATATAAAAAAG
GTAGCTCAGGTTTAGTTGGACAGGTGCGAGCCACACCTCANAAAAAAAAGTTTTTCNTCAAATGAT
CCNTCCGCAGNTCNCCCCACNNAANNNNNNNNNNNNNGNNGAAAANCNTTTTTTNCNNAGGNGTGG
CTNNNACTGTCNACTAACNGANCTNCNNTTTTANNNNNANGGNNNNTCNNTGGTCNGNNAANCNT
NNNGNTNNNNNGNANNNNGGGNNNNNNGGGNGNNNNNNNNCNANNTTTGANNNNNNGNNGN
NNNAANNNTTTTTNGANN

CP438

GNNNNNNNGNNNNNNNCENNCTGANGNCGATGANNTGAAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTAA
GCAGAGGCATGGGCGGGGTTCAAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGC
CTCTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCGAG
CTTTCGTCCGTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCAG
AGACCCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTCGTTCGAAACAATTCG
CGGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCTGA
TGATTCACTTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGA
GATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGTTCCATCATCAAAAA
ATGATTTTTGTCTTCCAATCCTAGTGTTCAAAAGTGTGGTAAGAAGCGCCGACCCGCTTTCCCCAG
ACGCTGCTCGCTATGAGCGCTACTGGTTTCGACAGACCGACCGATGCAACCGTGTATATAAAAAAGG
TAGCTCAGGTTTAGTTGGACAGGTGCGAGCCACACCTCANAAAAAAAAGTTTTTCATCAAATGATC
CATCCGCANGTCNCCNTACGGNNNNNNNGNTNNNTNGATGAANAACNNTTTTTTTTCNGANGTGN
GCTGNNNCTGTCCACTAACCTGAGCTACCTTTTTTATANNNNNGGTNNATCNGTNGGTCNGNNNAAA
CCNGTAGNGCTNANAGCGAGCANCGNCNGGGGNAAGANNGGGTNGNNNNTCNNNCANNNTTTTGAN
NNNAGGANNGGNGGNNNAAANNNTTTTTNNNANN

CP439

NNNNNNNNNNNNNNNNNNCENNCTGAGGCCGATGATTGAAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTAA
AGCAGAGGCATGGGCGGGGTTCAAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGC
CCTCTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCGA
GCTTTCGTCCGTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCA
GAGACCCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTCGTTCGAAACAATTC
GCGGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCTG
ATGATTCACTTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAG
AGATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGTTCCATCATCAAAAA
AATGATTTTTGTCTTCCNATCCTAGTGTTCAAAAGTGTGGTAAGAAGCGCCGACCCGCTTTCCCCA
GACGCTGCTCGCTATGAGCGCTACTGGTTTCGACAGACCGANCGATGCAACCGTGTATATNAAAAAG
GTAGCTCANGNTTAGNTGGACNGGTGCGANNACANCTCNAAAAAAAANGNTTTTCNTCAANANGN
NNNNNNCENNANGNCCNCTNNNNNNNNNGGNGNNGNNGANGANNNNCENNNTTTTTNCNNGA
NGNGNNNTNNNNCNGNCCNACTAAACNGAGCTNCCNTTTNNANANANNNGTGCATCNNNNNG
NCNNNNNNNNNNNNNGNNNNNNNNNNNNNNNCNGNNGNNGNNGNNGNNGNNGNNGNNGNNGN
TTNANNNNNNNGNNGNNGGNNNANANNNTTTTTNTNNNNNNNN

CP440

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCTGAGGNCGANGAATTGAAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTAA
AGCAGAGGCATGGGCGGGGTTT CAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGC
CCTCTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCGA
GCTTTCGTCCGTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCA
GAGACCCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTCGTTTCAAACAATTC
GCGGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCG
ATGATTCACTTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAG
AGATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGCTTCCATCATCAAAAA
AATGATTTTTGTCTTCCNATCCTAGTGTTT CNAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCNANCCGTCTTTCCCA
GACGCTGCTCGCTATGANCGCTACTGGTTTCGACAGANCGACCGATGCAACCGTGTATATAAAAAAG
GTAGCTNNNNNTAGTTGGACAGGTGCGAGCCACACCTCNNAAAAAAANNNTTTTNTCNNNATGAT
NCATNNGCNNNNNTNNNNNNACNNNNNNNNGGNGGGNNNNGANNNNNANCNTTTTNTCNGNNNNGN
GNNTNNNACNGNCNACTAAANCNGAGNTNNNTTNNNNNANAANNCGNNNGCATCGGNNCGGNNNGN
NGAANCNNNNNNNNNNNNNNNCNAGCANCNNNCNGNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNT
NNANNNNNGNANNNNNNNNNAANNNTTTTTTANANNANNNNNNNNNNNGNNANNNN

CP441

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNCNNNNCTGAGGCCGANGAATTGAAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTA
AAGCAGAGGCATGGGCGGGGTT CAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCG
CCCTCTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCG
AGCTTTCGTCCGTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGC
AGAGACCCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTCGTTCAAACAATT
CGCGGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATT
GATGATTCACTTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCA
GAGATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGCTTCCATCATCAAAA
AAATGATTTTTGTCTTCCAATCCTAGTGTTCAAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCGACCCGTCTTTCCCG
AGACGCTGCTCGTATGAACGCTACTGGTTTCGACAGCCGACCGATGCAACCGTGTATATAAAAAA
AGTGTAGTCANGTTTAGTTGGACAGGTGCGAGCCACACCTCANAAAAAAAAGNTTTTCATCAAAAATG
ATCCNTCCGAGGTTNNNCACNGNAAANNNGGGGGGGGNNNNGANGAANNANNNTNTNNNCNGA
GGTGNNGNNTNNNACNGNCNACTAAACCTGAGCTACCTTTTNTANNNNNANGNNNGCATCGGTGCGNT
CTGTGAAANNNGNAGCGTTCNTNNNNNNCANCNNCNGGGNAAAAANNNNNGNNNNNNNNCNNNNAC
ACTTTTGANNNTANGANNNGNANGNCNAAAAANNNTTTTTTTNNNNNNNGNAAAAANNNNNNNNNN
NNNNNNNN

CP442

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNCNNNNCTGANGCCGANGANTGAAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTAA
GCAGAGGCATGGGCGGGGTT CAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGC
CTCTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCGAG
CTTTCGTCCGTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCAG
AGACCCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTCGTTCAAACAATTTCG
CGGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGA
TGATTCACTTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGA
GATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGCTTCCATCATCAAAAA
ATGATTTTTGTCTTCCAATCCTAGTGTTCAAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCGACCCGTCTTTCCCGAG
ACGCTGCTCGCTATGAGCGCTACTGGTTTCGACAGACCGACCGATGCAACCGTGTATATAAAAAAGG
TAGCTCAGGTTTAGTTGGACAGGTGCGAGCCACACCTCANAAAAAAAAGNTTTTCATCAAAAATGATC
CNTCCGAGGNTCNCCTACGGAANNNNNNNNNTTGGATGANNNACNTTTTTTTTCTGAGGTGTGGC
TNNNCTGTCNNTAANCCTGAGCTACCTTTTTTANATAANCNGNNGCNCNNGNNTCNGTNNAAACCN
NNANNNTNNNANGNNNANNNTCNGGNGAAAGACGGGGTNNNNCNTNNTNNCANNCNTTTGANNC
TNNGNATNGGNNNNNNNAANNNTTTNNNTGANNNNNNAANNACGGNNNNNN

CP443

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCTGAGGNCGANGANTTGAAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTAAAG
CAGAGGCATGGGCGGGGTTTTCAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGCCC
TCTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCGAGC
TTTCGTCCGTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCAGA
GACCCTACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTCGTTCGAAACAATTTCGC
GGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGAT
GATTACTIONTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAG
ATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGTTCCATCATCAAAAAAA
TGATTTTTGTCTTCCAATCCTAGTGTTCAAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCGACCCGTCTTTCCCCAGA
CGCTGCTCGCTATGAACGCTACTGGTTTCGACAGACCGACCGATGCAACCGTGTATATAAAAAAGGT
AGCTCANGTTTAGTTGGACAGGTGCGAGCCACACCTCANAAAAAAAAGGTTTTTCATCAAAAATGATCC
ATCCGCNNNTCNCCTACGGAANGANNNTNANTTTNGATGAAAAACCTTTTTTTTTCTGAGGTGTGG
CTNNACTIONTACTAAACCTGAGCTACCTTTTTTNNANNANGGNNNNNTNNNNNGGTCTGTCAANNC
AGTANCGNTNATANCGAGCNNNNNNNGGGAAAGANGGGNNNGNNTNCNNNNANNNTTTTGANN
NGGANNNGNAGGGACAAAATANTTTTTNNANNNGNN

CP482

NNNNNNNNNNNNNNNCCNNNTNGNNGNNNNNGAATTGAAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTAAA
GCAGAGGCATGGGCGGGGTTTCANAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCNTTTCGCTCCAGCTCCCGCC
CTCTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCGAG
CTTTTCGTCCGTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCAG
AGACCCTACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTCGTTTCGAAACAATTTCG
CGGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGA
TGATTACTIONTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCCTTCATCGATGGGAGAACCAAGA
GATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGTTCCATCATCAAAAAAA
ATGATTTTTGTCTTCCAATCCTAGTGTTCAAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCGACCCGTCTTTCCCCAG
ACGCTGCTCGCTATGAGCGCTACTGGTTTCGACAGACCGACCGATGCAACCGTGTATATAAAAAAAGG
TAGCTCAGGTTTAGTTGGACAGGTGCGAGCCACACCTCANAAAAAAAAGGTTTTTCATCAAAAATGATC
CATCCGCNNNNNCCNNNNNGGNAANNNNNGGNNNNNNNNNGGNNNNNNNCNTTNNNNNNNNANGTG
TGNTGNNCTGNNNNNTGNNNNNGAGCTNCNNNTTANNNNNNAGGGNNGNANNNGTNGGTNNG
NCNAANCNGNGNTNNNNNNGNNNGTCNGNGNANNNNNNNTNNNNCNNNNNNNNNNNTTGANN
NGGNNGNANGGNNNAANNNTTTNNNANGAANGNNNNNGNNNNNGNNNNNNNNNNNNNAAAA
NNNNNGGNNNGNNNNNNGGNTCCNN

CP483

NNNNNNNNNNNNNNNCCNTCTGAGGNCGATGAATTGAAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTAAAG
CAGAGGCATGGGCGGGGTTTTCAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGCCC
TCTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCGAGC
TTTCGTCCGTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCAGA
GACCCTACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTCGTTTCGAAACAATTTCGC
GGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGAT
GATTACTIONTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAG
ATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGTTCCATCATCAAAAAAA
TGATTTTTGTCTTCCAATCCTAGTGTTCAAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCGACCCGTCTTTCCCCAGA
CGCTGCTCGCTATGAGCGCTACTGGTTTCGACAGACCGACCGATGCAACCGTGTATATAAAAAAGGT
AGCTCAGGTTTAGTTGGACAGGTGCGAGCCACACCTCANAAAAAAAAGGTTTTTCATCAAAAATGATCC
ATCCGCNNNTCNCCTACNGNAANGGNNNGNCCNNNNNGNTGAANAANNNTTNNNNNNCNGANGT
GTGNTCGNACNGNNNNCTNNNNNGGANNTANNNNNTANATNNCNGGNNNNNNCGNNNGNNNGN
NNNNNNGNNNGCTNNANCANGNNNNNTNNGGGGNAAGANGGGNNNNNNCNNNNNNNNNNNTTTTG
ANNNTANNGATGGGANNNNNNNNNNTTTTTNNNANNANGNNNNNNNGGNTNANGNGNNNNNN
NNNNAAAAANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGNNTNNNNNN

CP484

NNNNNNNNNNNNNNNNNNCCATCTGAGGCCGATGAATTGAAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTAAA
GCAGAGGCATGGGCGGGGTTTCAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGCC
CTCTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCGAG
CTTTTCGTCCTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCAG
AGACCCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTCGTTTCGAAACAATTTCG
CGGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGA
TGATTCACTTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGA
GATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGCTTCCATCATCAAAAAA
ATGATTTTTGTCTTCCAATCCTAGTGTTCAAAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCGACCCGTCTTTCCCCAG
ACGCTGCTCGCTATGAACGCTACTGGTTTCGACAGACCGACCGATGCAACCGTGTTATATAAAAAAGG
TAGCTCAGGTTTAGTTGGACAGGTGCGAGCCACACCTCAGAAAAAAAAGGNTTTTCATCAAATGATC
CATCCGCAGGNTNNCCNTACGGNAANN

CP485

NNNNNNNNNNGGNNNNNNNCNNTCTGAGGCCGATGAATTGAAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTAAA
GCAGAGGCATGGGCGGGGTTTCAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGCC
CTCTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCGAG
CTTTTCGTCCTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCAG
AGACCCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTCGTTTCGAAACAATTTCG
CGGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGA
TGATTCACTTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGA
GATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGCTTCCATCATCAAAAAA
ATGATTTTTGTCTTCCAATCCTAGTGTTCAAAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCGACCCGTCTTTCCCCAG
ACGCTGCTCGCTATGAACGCTACTGGTTTCGACAGACCGACCGATGCAACCGTGTTATATAAAAAAGG
TAGCTCAGGTTTAGTTGGACAGGTGCGAGCCACACCTCAGAAAAAAAAGGTTTTTCATCAAATGATC
CATCCGCANNNNNNCCCTACNGNAA

CP486

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCTGAGGCCGATGAATTGAAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGT
TAAAGCAGAGGCATGGGCGGGGTTTCAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCC
CGCCCTCTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACT
CGAGCTTTCGTCCTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATG
GCAGAGACCCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTCGTTTCGAAACAA
TTCGCGGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGAT
TCGATGATTCACTTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACC
AAGAGATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGTTCCATCATCAA
AAAAATGATTTTTGTCTTCCAATCCTAGTGTTCAAAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCGACCCGTCTTTCC
CCAGACGCTGCTCGCTATGAACGCTACTGGTTTCGACAGACCGACCGATGCAACCGTGTTATATAAAA
AAGGTAGCTCAGGTTTAGTTGGACAGGTGCGAGCCACACCTCAGAAAAAAAAGGNTTTTCATCAAAT
GATCCATCCGCAGGTTCNCCCTANNGAA

CP487

NNNNNNNNNNGGNNNNNNNCCNNTCTGAGGCCGATGAATTGAAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTAA
AGCAGAGGCATGGGCGGGGTTTCAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGC
CCTCTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCGA
GCTTTCGTCCTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCA
GAGACCCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTCGTTTCGAAACAATTTC
GCGGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCG
ATGATTCACTTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAG
AGATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGCTTCCATCATCAAAAA
AATGATTTTTGTCTTCCAATCCTAGTGTTCAAAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCGACCCGTCTTTCCCA
GACGCTGCTCGCTATGAGCGCTACTGGTTTCGACAGACCGACCGATGCAACCGTGTTATATAAAAAAG

GTAGCTCAGGTTTAGTTGGACAGGTGCGAGCCACACCTCAGAAAAAAGGTTTTTCATCAAAATGAT
CCATCCGAGGTNNCCNTACNGAANN

CP488

NNNNNNNNNNNNNNCNNNNTGNNNNNNANGAATTGAAAAANAATCCCTTCCTCTGTGGTTAAAGCA
GAGGCATGGGCGGGTTCAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGCCCTC
TCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCGAGCTT
TCGTCCGTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCAGAG
ACCCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTCGTTTCGAAACAATTTCGCG
GCCCTCAAACAGGCATGCTCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATG
ATTCATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAGA
TCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTTCAATTTANACGACCGCATTACCAGTCGTTCCATCATCAAAAAAAT
GATTTTTGTCCTTCCAATCCTAGTGTTCAAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCGACCCGTCTTTCCCAGAC
GCTGCTCGCTATGAACGCTACTGGTTTCGACAGACCNACCGATGCAACCGTGTTATATAAAAAAGGTA
GCTCANGTTTAGTTGGACAGGTGCGAGCCACACCTCANAAAAAAAAGGTTTTTCATCAAAATGATCCA
TCCNCNNNNNNCNNNNNGNNAANGNNNNNGNNNNNGNNGNNNNNNNNNNNTTNTGNNNNNGANGTGN
NNNGNCNNTNNNNNANNCGGGNNNNNTTNNNNNNNNNNNGGNNNGNNGGTTGGGNNNNNNNAACNN
NNGNNANANNAGNNNNNNNGNNAANANNNNNNGNNNNNNNNNNNTTGANNNNNGGANGGNA
NGNNNNANNNNTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNGNNNNNNNNNNNNNNNNNANNN
NNNNNNNNNNNN

CP489

NNNNNNNNNNNNNNNNCNNNCTGAGGNGANGAATTGAAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTAAA
GCAGAGGCATGGGCGGGTTCAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGCC
CTCTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCGAG
CTTTTCGTCGGTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCAG
AGACCCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTCGTTTCGAAACAATTTCG
CGGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGA
TGATTCATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGA
GATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGTTCCATCATCAAAAA
ATGATTTTTGTCCTTCCAATCCTAGTGTTCAAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCGACCCGTCTTTCCCAG
ACGCTGCTCGCTATGAACGCTACTGGTTTCGACAGACCGACCGATGCAACCGTGTTATATAAAAAAGG
TAGCTCANGTTTAGTTGGACAGGTGCGAGCCACACCTCANAAAAAAAAGGTTTTTCATCAAAATGATC
CATCCNNNNNCCCTNNNGGAANGGGGNNNNNNNNNNNGGNNNAANANNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNGTCTCNACNNANNGNNGGNNNATTNTNNNNNNACGNNNNNNNGTNGGGNGGAGA
ANGAGTGNGTTNNNNNNGNNNNTCNGNNNAAGNANGNNGNCGNNNNNNNNNNNTTTTGANNNN
NNNNGGNAAGNNNNNNNNNTTTTTNANNNNGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

CP490

NNNNNNNNNNNNNNCNNNCTGAGGCCGANGAATTGAAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTAAAGCA
GAGGCATGGGCGGGTTCAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGCCCTC
TCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCGAGCTT
TCGTCCGTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCAGAG
ACCCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTCGTTTCGAAACAATTTCGCG
GCCCTCAAACAGGCATGCTCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATG
ATTCATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAGA
TCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGTTCCATCATCAAAAAAAT
GATTTTTGTCCTTCCAATCCTAGTGTTCAAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCGACCCGTCTTTCCCAGAC
GCTGCTCGCTATGAACGCTACTGGTTTCGACAGACCGACCGATGCAACCGTGTTATATAAAAAAGGTA
GCTCAGGTTTAGTTGGACAGGTGCGAGCCACACCTCANAAAAAAAAGGTTTTTCATCAAAATGATCCA
TCCNCNNNNNNCCNNNNNGNANNNNGGGNNNNNTNNGANNANNNACCTTTTTTNNNNNGAGGTGTG
NNTCGNNCNGNANTNANNNNNNNNTNNTTTTTANANNNNGGGTTGCNTCGGTGGTCTGNNGAANCN
GNAGCGTNCATAGCGNCCNCGTCNGGGNAAGACGGTNGNCCNTCNNNNNAANNNTTTTGANNNN
NNNTNGNNNGGNAAAAANNNNTTNNNNNNNANNNNANNCNNNGGNNNANGNNNNNNNNNNNN
NNNNNAANNNNTTGGNNNNNNNNNNNGNNNNNNNNNN

CP533

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNTGAGGCCGATGATTGAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTAAAGCAGA
GGCATGGGCGGGGTTTCAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGCCCTCTCT
TCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCGAGCTTTC
GTCCGTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCAGAGAC
CCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTCGTTTCGAAACAATTCGCGGC
CCTCAAACAGGCATGCTCCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGNGCGTTCAAAGATTCGATGAT
TCACTTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCNAGAGATC
CGTTGCCNAAAGTTGNTTTTTTCNATTTAGACGANCGCATTANCNGTCGTTCCATCATCAAAAAAATG
ANNTTTTGTCTTNNNNNCTAGTGNTCNAANNTGNTGNNAAGAANCGCCNANCCNNCTTTCNCCNNA
CGCTGCTCGCTATGAACGCTACTGGTTNNNACAGANCGACCGATGCAACCNNGTATATAAAAAANN
NNGCTNNNNTAGTNGGNNAGGNGCGAGCNCNCCTCNNAAAAAANGNTTTTCNTCNNNANGANN
NNCCNCCNNGNNNNCNNGNANNGNNGNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNCTNNNNCTNNNNNNNNNNNNNA
NCNGTNN
NNNNNNANNNNNNGNN
NNNNNNNNNGNNNNNGNN

CP534

NNNNNNNNNGNNNNNNNNNNNCTGANGNCGATGATTGAANAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTAAAG
CAGAGGCATGGGCGGGGTTTCAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGCCC
TCTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCGAGC
TTTCGTCCGTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCAGA
GACCCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTCGTTTCGAAACAATTCGC
GGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGAT
GATTCACCTTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAG
ATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGTTCCATCATCAAAAAAA
TGATTTTTGTCTTCCAATCCTAGTGTTCAAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCGACCCGTCTTTCCCCAGA
CGCTGCTCGCTATGAACGCTACTGGTTTCGACAGACCGACCGATGCAACCGTGTTATATAAAAAAGGT
AGCTCNNTTTAGTTGGACAGGTGCGAGCCACACCTCAGAAAAAAAAGGTTTTTCATCAAAATGATCC
ATCCGCNNNNNNCCNNACGGNN

CP535

NNNNNNNNNNNGNNNNNNNNCNCNCTGANNNNATGATTGAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTAAAGC
AGAGGCATGGGCGGGGTTTCAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGCCCT
CTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCGAGCT
TTCGTCCGTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCAGA
GACCCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTCGTTTCGAAACAATTCGC
GGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGAT
GATTCACCTTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAG
ATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGTTCCATCATCAAAAAAA
TGATTTTTGTCTTCCNATCCTAGTGTTCAAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCGANCCGTCTTTCCCCAGA
CGCTGCTCGCTATGAGCGCTACTGGTTTCGACAGACCGACCGATGCAACCGNGTTATATAAAAAAGGN
AGCTCNNTTAGTTGGNNAGGTGCGAGCCNCNCCTCNNAAAAAAAAAGGTTTTTCATCAAAATGATCC
NTCCGCNNNGNNNNCCNACGGNN

CP536

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCTGANNNNATGAATTGAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTAAAG
CAGAGGCATGGGCGGGGTTTCAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGCCC
TCTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCGAGC
TTTCGTCCGTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCAGA
GACCCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTCGTTTCGAAACAATTCGC
GGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGAT
GATTCACCTTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAG

ATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGCTTCCATCATCAAAAAA
TGATTTTTGTCCTTCCNATCCTAGTGTTCAAAAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCGACCCGTCTTTNCCCAGA
CGCTGCTCGCTATGAGCGCTACTGGTTTCGACAGACCGACCGATGCAACCGTGTTATATAAAAAAGGN
AGCTCNNNNTTAGTTGGACAGGNGCGAGCCACACCTCANAAAAAANNGNNTTTCNTCAAAAANGATCC
NTCCGAGGNCNCCNNNNGNA

CP537

NNNNNNNNNNNNNNNNNNCENNNTGAGNNNATGATTGAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTAAAGCAGA
GGCATGGGCGGGTTCAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGCCCTCTCT
TCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCGAGCTTTC
GTCCGTCTTTCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCAGAGAC
CCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTCGTTTCAAACAATTCGCGGC
CCTCAAACAGGCATGCTCCCAAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGAT
TCACTTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAGATC
CGTTGCCAAAAGTTGTTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGCTTCCATCATCAAAAAAATGA
TTTTTGTCTTCCAATCCTAGTGTTCAAAAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCGACCCGTCTTCCCAAGACGC
TGCTCGCTATGAACGCTACTGGTTTCGACAGACCGACCGATGCAACCGTGTTATATAAAAAAGGTAGC
TCAGGTTTAGTTGGACAGGTGCGAGCCACACCTCANAAAAAAGGTTTTTTCATCNAANTGATCCNTC
CGCAGGTCNNCCTACGNANNNN

CP538

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNCTGANGNCGATGANTGAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTAAAGCA
GAGGCATGGGCGGGTTCAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGCCCTC
TCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCGAGCTT
TCGTCCGTCTTTCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCAGAG
ACCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTCGTTTCAAACAATTCGCG
GCCCTCAAACAGGCATGCTCCCAAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATG
ATCACTTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAGA
TCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGCTTCCATCATCAAAAAAAT
GATTTTTGTCCTTCCAATCCTAGTGTTCAAAAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCGACCCGTCTTCCCAAGAC
GCTGNTCGCTATGAGCGCTACTGGTTTCGACAGACCGACCGATGCAACCGTGTTATATAAAAAAGGTA
GCTCNGTTTTAGTTGGACAGGTGCGAGCCACACCTCANAAAAAAGGTTTTTTCATCAAAATGATCCA
TCCGAGGTNNCENNACGN

CP539

NNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNCENNCTGAGGNCGANGANTGANNATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTAA
AGCAGAGGCATGGGCGGGTTCAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGC
CCTCTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCGA
GCTTTCGTCCGTCTTTCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCA
GAGACCCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTCGTTTCAAACAATTC
GCGGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCAAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCG
ATGATTCACCTTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAG
AGATCCGTTGCCNAAAGTTGTTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGCTTCCATCATCAAAAA
AATGATTTTTGNCCTTNCANTCCTAGTGTTCAAAAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCNANCCGTCTTTNNCA
NANGCTGCTCGCTATGAACGCTACTGGTTTCGACAGACCGACCGATGCAACCNNGTNNNATNAAAAA
NGNAGNTCNGNTTAGTTGNNNAGGNGAGNCNACCTCNAAAAAAGGTTTTTNNTCNNAANGN
NNCNTCCNNNGNCCCTTNGAANNNGGNNNNNNNNNGANAACNTTNTTTNNNGTGNGNN
GNCCNGNCNNNANCCGNNCNCNTNTNN

CP540

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNCTGAGGNCGATGATTGAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTAAAGC
AGAGGCATGGGCGGGTTCAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGCCCT
CTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCGAGCT
TTCGTCCGTCTTTCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCAGA

GACCCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAGCTGTGCGTTCGAAACAATTTCGC
GGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGAT
GATTCACTTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCATCGATGGGAGAACCAAGAG
ATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGCTTCCATCATCAAAAAA
TGATTTTTGTCCTTCNATCCTAGTGNTCAAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCNACCCGCTTTNNNNNAC
GCTGCTCGCTATGAACGCTACTGGNTTCGACAGACCGACCGATGCAACCGTGTTATATAAAAAAGGAG
CTCENNNTNNGTTGGNCAGGNGNANCCNCACCTCENNAAAAAANNTTTTTCNNCNNNATGANNCN
TCCGNANGNNNNCNTNNNGNANNNGGGGNNNNNNNCNNNNNANCNNNNCNNNNNNNNNNNTNNT
NNANCNGNNNNNNANNCNGNNNNNCCTNNNNNNNNNNNNNNNNNNCNNNNNNNGNNAANCANN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNCNNNTTTNNANNTNNNNNNNNNNNN
NANNNNTTTNNNNNNNNNANNNNNNNN

CP541

NNNNNNNNNNNNNNNNNNCTGAGGNCGATGATTGAAAATAAATCCCTTCTCTGTGGTTAAAGCA
GAGGCATGGGCGGGTTCAGAAGCACGCCAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGCCCTC
TCTTCGCCTCCGAAGTCTGACATTATCAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAAGCTCGAGCT
TCGTCCGTCTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCAGAG
ACCCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAGCTGTGCGTTCGAAACAATTTCGC
GCCCTCAAACAGGCATGCTCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGATG
ATTACTTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCATCGATGGGAGAACCAAGAGA
TCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGCTTCCATCATCAAAAAAAT
GATTTTTGTCCTTCCAATCCTAGTGTTCAAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCGACCCGCTTTCCNNNNAC
GCTGCTCGCTATGAGCGCTACTGGTTTCGACAGACCGACCGATGCAACCGTGTTATATAAAAAAGGTA
GCTCAGGNTTAGTTGGACAGGTGCGAGCCACACCTCANAAAAAAGGTTTTTTCATCAAATGATCCA
TCCGAGGTCNCCNNACGGNN

CP542

NNNNNNNNNGNNNNNNNNNNNCTGNNNNCGANGNNTTGA AAAATAAATCCCTTCTCTGTGGTTAAA
GCAGAGGCATGGGCGGGTTCAGAAGCACGCCAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGCC
CTCTCTTCGCCTCCGAAGTCTGACATTATCAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAAGCTCGAG
CTTTCGTCCGTCTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCAG
AGACCCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAGCTGTGCGTTCGAAACAATTTCG
CGGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCANGGTGCGTTCAAAGATTTCGA
TGATTCACTTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAN TTCGCTGCGTTCATCGATGGGAGAACCAAGA
GATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTCAATTTANACGACCGCNTACCNGTCGCTTCCATNNNNAAAAA
AATGNNTTTTGTCTTCCNNCCTAGTGNTCAAAGTGTTGGNAAGAANCGCCNANNCCNTTTCCNC
ANACNNNNNTCGCTATGAGCGCTNCTGGNTCNACAGACCNACCNATNCAACCNNNTANATAANAG
AGGNNNNNNNNNNNGTNGNNNNGGGGNNANNCNNAACTNANAAAAANAGGNANNGGGGNNNNN
CNNNNNNNNAAAAANNGGNNNNNNNTTTNNNNANANCNNNNNNNCNNNCNNGNNNNNCNAAN
NNNNANANNNNNANNNANCNGNNNNNGNANNANANNNNNGNANNNNNNTTNNNNNNNNNNNTNNN
NNNNNNNNNGGGGNNGGNNNAACNNNTTTNNNNNNNNNGNNNGGNANGNNNNNNNNNNNTNNN
NTNNNNANNAANNNTTGGNNNNGGNNNTNNNNNNNTNNNCNNNNNNNTTGNNNNNNNCNNNTTN
GGNTNNNNNNNNNNANNNNNNNNNANNNNNNNNGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCNNNNNNNNNN

CP543

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTCTGANGCCGATGANTTGAANATAAATCCCTTCTCTGTGG
TTAAAGCAGAGGCATGGGCGGGTTCAGAAGCACGCCAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTC
CCGCCCTCTCTTCGCCTCCGAAGTCTGACATTATCAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAAG
TCGAGCTTTCGTCCGTCTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTCGAGGGAGCCACGGTAAAT
GGCAGAGACCCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAGCTGTGCGTTCGAAACA
ATTGCGGGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGA
TTCGATGATTCACTTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCATCGATGGGAGAAC
CAAGAGATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGCTTCCATCATCA
AAAAAATGATTTTTGTCCTTCCAATCCTAGTGTTCAAAGTGTTGGNNAGAAGCGCCGACCCGCTTTN
CCAGANGCTGCTCGCTATGAANGCTACTGGTTNCGACAGACCGACCGATGCAACCGNGNTATATNNA

AAAAGGNAGCTCNGT TTTAGTTGGACAGGTGCGAANCCACACCTCNNA AAAAAAAAAAGGNTTTTTTCATC
AAANNNATCCNNCCNNANGNTCCNCTTNTGAAGGGGGGGGNNNNNNNNNTGANAAACCNN

CP544

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNC NNNCTGANGNCGATGATTGAAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTAAA
GCAGAGGCATGGGCGGGGTT CAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGCC
CTCTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAA ACTCGAG
CTTTTCGTCCTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCAG
AGACCCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTGTTTCGAAACAATTTCG
CGGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGA
TGATTCACCTTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGA
GATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGCTTCCATCATCAAAAAA
ATGATTTTTGTCCTTCCNATCCTAGTGTTCAAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCGANCCGTCTTTCCCCNN
ACGCTGCTCGCTATGAGCGCTACTGGTTNCGACAGACCGACCNATGCAACCGTGTTATATAAAAAAGG
TAGCTCAGGTTTAGTTGGACAGGNGCGAGCCACACCTCNNA AAAAAAAAAANGGTTTTTCTCN NNANNNT
NNNNNNAAAANNTCTNTTTNNNNNGGGGGGNNNGC NNGNNNNNNNAANNNNGANCNNNCNNNNNN
NNANANNNNNNNNNNNNNNNNNNGNNNGNNAANCNGNNNNNNNNNTNTCN NNNNNNCCTGGGNAAAA
NNNGNNGNNNNNNNCNAANANNNTTTTNAANNNNNNNAATGGNANNNNANAAANNNTTTNTTNNANN
AANNAANNNNTNGNNANGNNNNNNNNNNANNTNNNAANNNNNNNNNNNANANCNGNNNNNGNNNN
NNC NNNNNNANNNNNNNNNNNNNNTAAANNNNNNNNNNNNNNNNNANNNNNNNNNNCNNN

CP545

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNC NNNNNNNNNNGNNNNNGANGNNNTGAANNANNAATCCCTTNNNTGTGGTT
AAAGCAGAGGCATGGGCGGGGTT CAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCC
GCCCTCTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAA ACTC
GAGCTTTCGTCCGTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGG
CAGAGACCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTGTTTCGAAACAAT
TCGCGGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATT
CGATGATTCACCTTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCA
AGAGATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGCTTCCATCATCAAA
AAAATGATTTTTGNCCTTCCNATCCTAGNGNTCAAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCGACCCGTCTTTCCC
CNGACGCTNNNGCTATGAACGCTACTGGTTTCGACAGANCGACCGATGCAACCCGNGTTATATAAAA
AAGGNAGCTCANGTTTAGTNGGACAGGNGNAGCCACACCTCNNA AAAAAAAAAAGGTTTTTTCATCAAAA
TGANCCATCCGCAGGTTCTACTACGNAA

CP546

NNNNNNNNNGNNNNNNNNNNNNCTGANGCCGATGATTGAAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTAAAG
CAGAGGCATGGGCGGGGTT CAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGCCC
TCTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAA ACTCGAGC
TTTCGTCCGTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCAGA
GACCCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTGTTTCGAAACAATTCGC
GGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGAT
GATTCACCTTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAG
ATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGCTTCCATCATCAAAAAA
TGATTTTTGTCCTTCCAATCCTAGTGTTCAAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCGACCCGTCTTTCCCCAGA
CGCTGCTCGCTATGAGCGCTACTGGTTTCGACAGANCGACCGANGCAACCGTGTTATATAAAAAAGGN
AGCTCAGGNTTAGTTGGACANGNCGNAGCCNACCTCANAAAAAAAANGNTTTTCTCN NNANGANN
NNTCCGNANGNCCNNNTNNNGNANGGNGGGGNCNNTNNNNNNNANCNNNNNNNNNNCTGANNNNNNG
NTNNNNCNGNCNNCTANNNNGNCTNNNNNNNNNANNANNNCGNNGNNNNNNNGTCNNGNNNAA
CNGNAGCGNNNTNCNNGC NNNNNCNGGNAANNNGGNNGGNNCTCTANNANNNTTTNNANNNTNN
GNANGGNANGNNNANNNNNNTTTNNATGANGAANNNNNNNNNNAANNNNNNNNNNNANNNNNNNNN
NNNTTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNC NNNNNNNNNANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNANNNNNNNNNNTNNNN

CP547

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCTGAGGNCGATGATTGAAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTAAAG
CAGAGGCATGGGCGGGGTTTTCAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGCCC
TCTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCGAGC
TTTCGTCCGTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCAGA
GACCCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTCGTTCGAAACAATTCGC
GGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGAT
GATTACTIONTCTGCAATTCACATACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAG
ATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGTTCCATCATCAAAAAAA
TGATTTTTGTCTTCCAATCCTAGTGTTCAAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCGACCCGTCTTTCCCCAGA
CGCTGCTCGCTATGAACGCTACTGGTTTCGACAGACCGACCGATGCAACCGTGTTATATAAAAAAGGN
AGCTCANGTTTAGTTGGACAGGTGCNAGCCACACCTCANAAAAAAAAGGNTTTTCATCAAAATGANCC
ATCCGCAGGNTCACCTACGGAANGNNGNNTNNGANGAANAACCTTTTTTTNCNGAAGNGNNTN
TNGNANCTGGTNCAACTAACNNNNNTACCTTTTTTATNTANNANNGTTGCNNCNNNNGNNTNNTNCG
AAACNNNAGNGTTANNNNNNGCANGNTCNGNGNAAAANANGGNGNNTTCTNNCNANNTTTTTGAA
CNCTNNNNNNGNNGGCAAAANTNNNTTTTTNGNNGNNGNAANNNNNNGTAANNNGGNNTNNTNNTN
AAAAANNACTTNNNNNNNGNNT

CP548

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCTGANGNCGATGATTGAAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTAA
AGCAGAGGCATGGGCGGGGTTTTCAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGC
CCTCTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCGA
GCTTTTCGTCCGTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCA
GAGACCCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTCGTTCGAAACAATTC
GCGGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCG
ATGATTACTIONTCTGCAATTCACATACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAG
AGATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGTTCCATCATCAAAAA
AATGATTTTTGTCTTCCAATCCTAGTGNTCAAAGTGNTGGTAAGAAGCGCCNACCCGNTTTCCCA
GACGCTGCTCGCTATGAGCGCTACTGGNTTCGACAGACCGANCGATGCANCCGTGTTATATAAAAAAG
GTAGCTCANGNTTAGTTGGACAGGTGCNANCCNCNCCTCANAAAAAANGTTTTTNTNNTNNTNNTN
NCNNNNNNANNNNNNNNTTTTTNNNNNGGGGGGNNNNNNNCNNGNNAANNNNNNTNACNNNNNTGT
TNTATAANNNNGNNGNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTN
NAAAACANGNANNGNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTN
NNTTTTTNANNNNTAAGNNNNNNANGNNANNNANNNNTTTTTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTN
NNNNNCNNNNNNNTNANANNANNTTNNNNANNNANNNNNNGNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTN
NNNNNNNNNNNNANNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTN
NNNNNNN

CP549

GNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTCTGANGCCGATGATTGAAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTAAAG
CAGAGGCATGGGCGGGGTTTTCAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGCCC
TCTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCGAGC
TTTCGTCCGTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCAGA
GACCCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTCGTTCGAAACAATTCGC
GGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGAT
GATTACTIONTCTGCAATTCACATACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAG
ATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGTTCCATCATCAAAAAAA
TGATTTTTGTCTTCCAATCCTAGTGTTCAAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCGACCCGTCTTTCCCCAGA
CGCTGCTCGCTATGAACGCTACTGGTTTCGACAGACCGACCGATGCAACCGTGTTATATAAAAAAGGT
AGCTCANNNTTAGTTGGACAGGTGCGAGCCACACCTCANAAAAAAAAGGTTTTTNTCNAATGATNC
NNTCCGNANGNTCNNNNNNNAAANGNNGGNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTN
GTGNTNNGANCNGNNAANTAAANCNGNANTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTN
NGAAANCAGNANGTNNNNNNNNNNCANNNTGGGAAANNNNNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTN
NNNAGGANGNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTNNTN

NNAAAAANNNTTNGNNNNGNANNNNNGNNNNNCNNNNNAANAANNNNNAANNNNNNNNANN
NNGGNANNNNNNANNNNNNNNNNNNNNNNANNNTTNNNNCCNNNGNNNNNGNANANN

CP550

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNCNNNCTGANGNCGATGANTGAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTAAAG
CAGAGGCATGGGCGGGGTTTCAAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCGCCC
TCTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCGAGC
TTTCGTCCGTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGCAGA
GACCCTACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAGCTGTCGTTCGAAACAATTCCG
GGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGAT
GATTAATTCTGCAATTCACATACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAG
ATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGTTCCATCATCAAAAAA
TGATTTTTGTCTTCCNATCCTAGTGTTCAAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCNACCCGTCTTTCCCGA
NGCTGCTCGCTATGAACGCTACTGGTTTCGACNGANCGANCGANGCNACCGTGNTATATAAAAAAGG
NAGCTCANGNTNANTTGGANAGGNGNANCCACNCCTCAAAAAAAAAGGTNTTNCNNCNNNNNNNA
NNNNNNNAANNNTTNTTTNNNNNGGNGNNNNNNNCNNNNNANCNANNNNNNCTNNNNNTN
NNNAANCGGNNNNNTNNNCNGGNNNNNNNNNNNNANANNNCNNNNNGCNNNNNNNTCNGNAA
NNNGNNNNNNNTNNNNNNNCNNNNNGNANANANGNNNNNGNNNCNNNNNNNTTTTTNAN
NNNGNANNGNNNNNAAANNNTTNTNNNNNNNNNNANNNNNNNNNNGNNNNNNNNNN
NNNANNNNTTNGNNNNNNNNNNNNNNNCNNNNNANNNANNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNANNNNNCCNCNNNTTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

CP551

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCTGANNNNATGANTTGAANAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTA
AAGCAGAGGCATGGGCGGGGTTTCAAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCG
CCCTCTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCG
AGCTTTCGTCCGTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGC
AGAGACCCTACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAGCTGTCGTTTCGAAACAATT
CGCGGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATT
GATGATTAATTCTGCAATTCACATACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAA
NANATCCNNTGCCAAAAGTTGTTTTTCNNTTATAGACGACCGCNTTACCANNNGCTTCCATCATCAA
AAAATGATTTTTGTCTTNCNNCCTANNNGTTCAAAGTGTTGGTAAGAANCGCCNACCCCGNCTTT
CCCCANCGCTGCTCGCTATGAACGCTACTGGTTNCNNNGNANCGACNNANGCANNNGTGTATAT
NAAAAGGNAGCTCAGGTTAGTTGNACANGNANNAAGCCNNCCNNNAAAAAANGTTTTTCNN
NNNNNNNNNNNNNAAANACCTTTTTTNNAGAGNGGGGGCNNNNNNNNNNNAACCNNNTN
NCNNNNNNNTNNNNNNNAACCNGNCNANTNANNCCNGGNNNNNCNNNANCAATAAACCTCNTNGNN
TCNNNNNNNNNCNAAANNNNNNNNNTNTCTNNNANNNNTNNGAANNNGGGNNNNNNNNNN
NAACNNNTTTTTNANNNTNNGGANNGNNGGNAAANNNTTTTTTAATNNNNNAAANNNGG
NNNNNGNNGNNNTATTTNNNANNNNTTTNNNNNNNNNNNNCTNNNNNNNNNNNNNNNAAN
NNCNGNNNNNN

CP552

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCTGANGNCGATGAATTGAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTTA
AAGCAGAGGCATGGGCGGGGTTTCAAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCCCG
CCCTCTCTTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAAACTCG
AGCTTTCGTCCGTCTTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGGC
AGAGACCCTACTACCGATCCGCCAGCTCTTTCTCAACAAGAAAAAAAGCTGTCGTTTCGAAACAATT
CGCGGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATT
GATGATTAATTCTGCAATTCACATACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAA
GAGATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCAGTCGTTCCATCATCAAAA
AAATGATTTTTGTCTTCCAATCTAGTGTTCAAAGTGTTGGTAAGAAGCGCCNACCCGTCTTTCCCG
AGACGCTGCTCGCTATGAACGCTNCTGGTTTCGACAGACCGACCGATGCAACCGTGTTATATAAAAA
NGNAGCTCANGTTTAGTTGGACAGGNGCGANCCACACCTCANAAAAAAANGTTTTTCNTCNNNATN
ANNCNNNGAANGNCCNNNTTNNNNNNNGGNGGNNNNNNNNNNNNNAAACNANCNTNNNCNNNN

NNNNNTNNAANNNGNNTAANNNGNGCTNNNNNNNNNNNNANNNNNNNNCANNNNNCNNNN
NNNAAACAGNNNGTNNNTNNNNCNNCNNNTGNNAANNNGGNNNNNNNNNNNNANNNNTNNANN
NGNNNNNANGNNANANNNTTTNTNANNNGNANNNNNNNANNGNNNNNNNNNNNNNNNN
NTNNNNNNNNNNNGNNNNNTNNNNAANANNNAANNNNANNNNNNNNNNNNNNNNN

CP553

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTCTGAGGCCGATGANTTGAAAAATAAATCCCTTCCTCTGTGGTT
AAAGCAGAGGCATGGGCGGGGTTTCAGAAGCACGCCAAACAGCAGAAAAGTCGTTGCGTCCAGCTCC
GCCCTCTCTCGCCTCCGAAGTCCTGACATTATCAAAACCCGGCAGGGAAGCGAGGGCAAAAAACTC
GAGCTTTCGTCCGTCTTCCGCCTTCCAATGGATGCGCTAATGCATTTTCGAGGGAGCCACGGTAAATGG
CAGAGACCCTCACTACCGATCCGCCAGCTCTTCTCAACAAGAAAAAAAAGCTGTCGTTTCGAAACAAT
TCGCGGCCCTCAAACAGGCATGCTCCCAGATTAATCTGCCGGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATT
CGATGATTCACTTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCA
ANANATCCGTTGCCAAAAGTTGTTTTTCAATTTAGACGACCGCATTACCANNCGCTTCCATCATCAA
NANNNGATTTTTGTCCTTNCNATCCTAGTGTTCAAAGNGTTGGTAANAAGCGCCNACCCGNCTTCC
CCNNNNCTGCTCGCNNTGANNNCTACTGGTTTCGACAGANCNACCGANGCANNNNNGTTNTATTAA
AAAGGTAGCTCNGGTTNANNNGGACANNNGCGAGCCNNCCTCNNAAAAAANNNTTTTTTCNTCNN
GNNANCTTNNNNNNNANCNNNNNTTNANNNGGGGGGNNNGNNNNNNNNANCCNTNNNNNGN
NNNNNNNTGNNNNANCNGNNNNNNNNCNGGNTNNTATNNNNANNNNNNGNTNGNNNG
GNCGGNNNGTGAANNNGAGCGGNCNNTNNNNAACCACNNCANNNGANNACNGGTNGNGCTNNNAAN
CANNTTTTAANNAGNATGGGAAGNNAAAAANCNTTTTTTTNNTAANAAAACANCN

Anexo A2. Matriz de distancias del análisis filogenético.

```
#mega
!Title: prueba;
!Format DataType=Distance DataFormat=LowerLeft NTaxa=47;
!Description
  No. of Taxa : 47
  Data File : C:\um-2009\secuencias\pruebas-ok\arreglo2\1a2a3a-Um-Ext-2.meg
  Data Title : prueba
  Data Type : Nucleotide (Coding)
  Analysis : Pairwise distance calculation
  ->Compute : Distances only
  Include Sites : =====
  ->Gaps/Missing Data : Pairwise Deletion
  ->Codon Positions : 1st+2nd+3rd
  Substitution Model : =====
  ->Model : Nucleotide: Tamura-Nei
  ->Substitutions to Include : d: Transitions + Transversions
  ->Pattern among Lineages : Same (Homogeneous)
  ->Rates among sites : Uniform rates
  No. of Sites : 841
  d : Estimate

[ 1] #CP436-Te1
[ 2] #CP438-Esp-Pue-D
[ 3] #CP439-Esp-Pue-D
[ 4] #CP440-Esp-Pue-D
[ 5] #CP441-Teh-Pue-D
[ 6] #CP442-Teh-Pue-B
[ 7] #CP443-Tep-Mor-B
[ 8] #CP482-Hid-D
[ 9] #CP483-Tol-Mex-D
[10] #CP484-SDX-Tla-B
[11] #CP485-SDX-Tla-B
[12] #CP486-MiA-Mex-D
[13] #CP487-SMC-Pue-B-1
[14] #CP488-Cel-Gto-B
[15] #CP489-Cel-Gto-B
[16] #CP490-Cel-Gto-R
[17] #CP533-BJR-Pue-B
[18] #CP534-SMP-Pue-B
[19] #CP536-SJA-Tla-B
[20] #CP537-Tep-Pue-B
[21] #CP538-Aca-Pue-B
[22] #CP539-SPT-Pue-B
[23] #CP540-SFO-Pue-B
[24] #CP541-SFO-Pue-B
[25] #CP542-Hua-Pue-Am
[26] #CP543-Ixt-Mex-D
[27] #CP544-Zar-Hgo-D
[28] #CP545-Hua-Pue-B
[29] #CP546-SMC-Pue-B-4
[30] #CP547-SMC-Pue-Az-1
[31] #CP548-SMC-Pue-B-1
[32] #CP549-SMC-Pue-B-2
[33] #CP550-SMC-Pue-B-1
[34] #CP551-SMC-Pue-B-2
[35] #CP552-SMC-Pue-B-1
[36] #CP535-SGZ-Pue-B
[37] #CP553-SMC-Pue-B-2
[38] #Um-Alemania
[39] #Um-Austria
[40] #Um-Canada
[41] #Um-Francia
[42] #U.tritici-Canada
[43] #U.bullata-Canada
[44] #U.nuda-Canada
[45] #U.scitaminea-Canada
```

[46] #S.sorghi-Francia
 [47] #P.caricina

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]	[15]	[16]	[17]	[18]	[19]	[20]	[21]		
[22]	[23]																						
[1]																							
[2]	0.00000																						
[3]	0.00586	0.00716																					
[4]	0.00877	0.01142	0.00436																				
[5]	0.00141	0.00138	0.00858	0.00997																			
[6]	0.00000	0.00000	0.00716	0.01000	0.00138																		
[7]	0.00141	0.00138	0.00860	0.01140	0.00000	0.00138																	
[8]	0.00285	0.00277	0.00870	0.01300	0.00275	0.00139	0.00279																
[9]	0.00000	0.00000	0.00715	0.01140	0.00138	0.00000	0.00138	0.00277															
[10]	0.00141	0.00137	0.00858	0.01139	0.00000	0.00138	0.00000	0.00417	0.00137														
[11]	0.00141	0.00137	0.00858	0.01139	0.00000	0.00138	0.00000	0.00416	0.00137	0.00000													
[12]	0.00141	0.00137	0.00858	0.01139	0.00000	0.00138	0.00000	0.00417	0.00137	0.00000	0.00000												
[13]	0.00000	0.00000	0.00714	0.01139	0.00137	0.00000	0.00137	0.00277	0.00000	0.00137	0.00136	0.00137											
[14]	0.00288	0.00280	0.01014	0.01010	0.00140	0.00281	0.00140	0.00282	0.00140	0.00140	0.00140	0.00140	0.00280										
[15]	0.00715	0.00558	0.01439	0.01291	0.00556	0.00698	0.00417	0.00281	0.00556	0.00556	0.00555	0.00556	0.00695	0.00140									
[16]	0.00142	0.00139	0.00858	0.00855	0.00000	0.00139	0.00000	0.00281	0.00138	0.00000	0.00000	0.00138	0.00140	0.00555									
[17]	0.01425	0.01239	0.01409	0.00931	0.01235	0.01239	0.01080	0.01572	0.01392	0.01390	0.01388	0.01390	0.01546	0.01407	0.01863	0.01233							
[18]	0.00569	0.00415	0.01300	0.01575	0.00415	0.00416	0.00276	0.00840	0.00553	0.00414	0.00413	0.00414	0.00552	0.00562	0.00840	0.00417	0.01394						
[19]	0.00580	0.00424	0.01172	0.01308	0.00707	0.00566	0.00567	0.00284	0.00423	0.00706	0.00706	0.00706	0.00564	0.00430	0.00570	0.00712	0.01727	0.00994					
[20]	0.01148	0.00980	0.01159	0.01449	0.00838	0.00980	0.00700	0.00561	0.00977	0.00976	0.00974	0.00976	0.01116	0.00706	0.00703	0.00842	0.01879	0.01266	0.00705				
[21]	0.01147	0.01117	0.01159	0.02172	0.01120	0.00981	0.01118	0.00420	0.00975	0.01257	0.01257	0.01114	0.00848	0.00702	0.01126	0.02042	0.01686	0.00847	0.00277				
[22]	0.00922	0.00745	0.01159	0.00608	0.00748	0.00749	0.00598	0.00432	0.00900	0.00748	0.00747	0.00748	0.00899	0.00301	0.00748	0.00747	0.01428	0.00450	0.00911	0.01058	0.01520		
[23]	0.01058	0.00739	0.01502	0.00893	0.01033	0.00888	0.00739	0.00895	0.01182	0.01032	0.01030	0.01032	0.01180	0.00593	0.01033	0.01032	0.01259	0.00590	0.01193	0.01490	0.01947	0.00000	
[24]	0.01290	0.01118	0.01305	0.02181	0.01262	0.01121	0.01121	0.00421	0.01115	0.01397	0.01396	0.01397	0.01254	0.00851	0.00703	0.01268	0.02355	0.01693	0.00988	0.00415	0.00000	0.01517	0.01790
[25]	0.02523	0.02125	0.02299	0.02145	0.02618	0.02286	0.02295	0.02317	0.02456	0.02623	0.02623	0.02452	0.02467	0.02622	0.02623	0.02387	0.02802	0.02641	0.02983	0.02811	0.01683	0.02006	
[26]	0.01046	0.00870	0.01621	0.01330	0.00869	0.00871	0.00870	0.00879	0.01017	0.01015	0.01014	0.01015	0.01162	0.00582	0.01160	0.00869	0.01098	0.00870	0.01029	0.01463	0.01911	0.00452	0.00297
[27]	0.01174	0.01147	0.01162	0.01313	0.01293	0.01149	0.01151	0.00575	0.01286	0.01578	0.01576	0.01578	0.01429	0.00867	0.00858	0.01289	0.02029	0.01738	0.01019	0.00573	0.00143	0.01370	0.01643
[28]	0.00452	0.00439	0.01051	0.00899	0.00146	0.00293	0.00146	0.00293	0.00439	0.00293	0.00292	0.00293	0.00439	0.00147	0.00146	0.00146	0.01123	0.00588	0.00446	0.00589	0.00590	0.00309	0.00610
[29]	0.01176	0.01094	0.01016	0.01171	0.01149	0.01004	0.01008	0.00432	0.01145	0.01289	0.01289	0.01289	0.01144	0.00867	0.00859	0.01147	0.02197	0.01594	0.01164	0.00574	0.00143	0.01370	0.01799
[30]	0.00433	0.00423	0.00573	0.01008	0.00280	0.00422	0.00281	0.00570	0.00421	0.00280	0.00280	0.00421	0.00284	0.00427	0.00431	0.00284	0.01082	0.00716	0.00874	0.00574	0.00720	0.01053	0.01336
[31]	0.01339	0.01163	0.00880	0.00887	0.01309	0.01165	0.01165	0.00729	0.01306	0.01453	0.01451	0.01453	0.01304	0.01024	0.01014	0.01307	0.01728	0.01759	0.01033	0.00726	0.00436	0.01380	0.01805
[32]	0.00439	0.00429	0.00145	0.00290	0.00284	0.00429	0.00284	0.00579	0.00428	0.00284	0.00284	0.00427	0.00431	0.00714	0.00284	0.01082	0.00716	0.00874	0.00574	0.00720	0.01053	0.01340	
[33]	0.00756	0.00588	0.01047	0.00597	0.00589	0.00589	0.00588	0.00594	0.00737	0.00736	0.00735	0.00736	0.00884	0.00295	0.00736	0.00588	0.01264	0.00442	0.00747	0.01039	0.01642	0.00000	0.00150
[34]	0.02571	0.02351	0.02377	0.02222	0.02353	0.02510	0.02197	0.02366	0.02351	0.02346	0.02346	0.02346	0.02506	0.02208	0.02194	0.02349	0.02340	0.02526	0.01892	0.02669	0.03014	0.01953	0.01932
[35]	0.00587	0.00429	0.01019	0.00436	0.00429	0.00430	0.00429	0.00433	0.00573	0.00428	0.00428	0.00572	0.00144	0.00572	0.00428	0.01717	0.00718	0.00582	0.00866	0.01451	0.00150	0.00442	
[36]	0.00435	0.00282	0.01174	0.01312	0.00566	0.00424	0.00425	0.00284	0.00282	0.00565	0.00565	0.00423	0.00429	0.00427	0.00569	0.01722	0.00710	0.00000	0.00709	0.00708	0.00757	0.00899	
[37]	0.02841	0.02779	0.02023	0.02651	0.02779	0.02783	0.02783	0.03139	0.02779	0.02775	0.02775	0.02775	0.02775	0.02974	0.03422	0.02779	0.02818	0.03109	0.03465	0.03928	0.04089	0.02897	0.03174
[38]	0.00875	0.00854	0.01328	0.01773	0.00855	0.00714	0.01000	0.01154	0.00853	0.00851	0.00993	0.00851	0.00851	0.01016	0.01443	0.00858	0.02400	0.01436	0.01317	0.02026	0.02019	0.01709	0.01985
[39]	0.00823	0.00806	0.01205	0.00806	0.00805	0.00808	0.00808	0.01232	0.00805	0.00803	0.00803	0.00803	0.00803	0.01023	0.01624	0.00805	0.02057	0.01419	0.01628	0.02252	0.02456	0.01850	0.02037
[40]	0.01953	0.02201	0.02862	0.02866	0.02197	0.02055	0.02353	0.02363	0.02194	0.02191	0.02336	0.02191	0.02188	0.02515	0.02794	0.02343	0.03907	0.02810	0.02697	0.03255	0.03254	0.02831	0.03090
[41]	0.00728	0.00711	0.01479	0.01775	0.00855	0.00714	0.00856	0.01009	0.00710	0.00851	0.00850	0.00851	0.00708	0.01017	0.01445	0.00860	0.02241	0.01232	0.01598	0.02005	0.01864	0.01555	0.01834
[42]	0.14145	0.14663	0.15618	0.15235	0.14663	0.14686	0.14686	0.15115	0.14616	0.14796	0.14773	0.14796	0.14593	0.14966	0.15167	0.14796	0.15378	0.15082	0.15567	0.15994	0.15641	0.14432	0.15098
[43]	0.14637	0.15143	0.15935	0.15551	0.14971	0.14994	0.15168	0.15599	0.15095	0.15103	0.15251	0.15103	0.15071	0.15452	0.15648	0.15276	0.15909	0.15566	0.15883	0.16480	0.16126	0.14444	0.15602
[44]	0.15198	0.15698	0.16691	0.16304	0.15698	0.15723	0.15723	0.16162	0.15647	0.15830	0.15805	0.15830	0.15622	0.16013	0.16206	0.15820	0.16501	0.16126	0.16637	0.17050	0.16694	0.15533	0.16189
[45]	0.21319	0.21665	0.22248	0.22350	0.21842	0.21665	0.21702	0.22463	0.21802	0.21942	0.21942	0.21942	0.21724	0.21861	0.22456	0.22021	0.20425	0.21963	0.21873	0.22609	0.21971	0.20794	0.21586
[46]	0.23110	0.23327	0.23393	0.23025	0.22799	0.23047	0.22583	0.22817	0.23494	0.23245	0.23206	0.23245	0.23413	0.21913	0.22417								

ANEXO B

**DATOS DE LAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE LOS ESPECÍMENES DE
HUITLACOCHÉ RECOLECTADO**

Anexo B1. Formato de las características fenotípicas de los especímenes de huitlacoche recolectado.

Clave					
Código CP					
Fecha de recolección					
Procedencia: Estado Localidad					
Forma del especimen					
Variedad de maíz: B: blanco, Am:amarillo, Az: azul, R: rojo					
Longitud de mazorca (cm)					
Diámetro de mazorca (cm)					
Peso de mazorca (g)					
Color de agallas (mayoría): N: negras; G: grises-platinadas; B: blancas-verdosas					
Textura de agallas (mayoría): D: duras, F: firmes, B: blandas					
Índice de severidad: 1: 1-25%; 2: 26 - 50%; 3: 51 - 75%; 4: 76 - 100%					
Tamaño de agallas:					
% de agallas pequeñas (1- 2 cm)					
% de agallas medianas (2.1 - 4 cm)					
% de agallas grandes (> 4 cm).					
Peso de agallas(g)					
AGALLA SELECCIONADA					
Textura: Dura (D), Firme (F), Blanda (B).					
Cantidad de teliosporas: E: escasas (la mayor parte con tejido blanco); M: media (pocas partes blancas); A: Abundantes (sin tejidos blancos).					

Anexo B2. Registros de los datos de las características fenotípicas de los especímenes de huitlacoche recolectado.

Clave	Um27	Um28	Um29	Um30	Um31
Código CP	CP-438	CP-439	CP-440	CP-441	
Fecha de recolección	18/07/2008	18/07/2008	18/07/2008	18/07/2008	18/07/2008
Procedencia: Estado Localidad	Puebla Esperanza	Puebla Esperanza	Puebla Esperanza	Puebla Tehuacán	Puebla Tehuacán
Forma del espécimen	Mazorca	Mazorca, formando una agalla	Mazorca, formando una agalla	Mazorca	Mazorca, formando una agalla
Variedad de maíz: B: blanco, Am: amarillo, Az: azul, R: rojo	D	D	D	D	D
Longitud de mazorca (cm)	8.2	7	6	13.5	8
Diámetro de mazorca (cm)	10	8	6	11.3	6
Peso de mazorca (g)	48	11	9	54	9
Color de agallas (mayoría): N: negras; G: grises-platinadas; B: blancas-verdosas	B	N	N	B	N
Textura de agallas (mayoría): D: duras, F: firmes, B: blandas	D	B	B	B	B
Índice de severidad: 1: 1-25%; 2: 26 - 50%; 3: 51 - 75%; 4: 76 - 100%	100	100	100	100	100
Tamaño de agallas:					
% de agallas pequeñas (1- 2 cm)	40			45	
% de agallas medianas (2.1 - 4 cm)	60			55	
% de agallas grandes (> 4 cm).					
Peso de agallas(g)	29			31	
AGALLA SELECCIONADA					
Textura: Dura (D), Firme (F), Blanda (B).	D	B	B	F	B
Cantidad de teliosporas: E: escasas (la mayor parte con tejido blanco); M: media (pocas partes blancas); A: Abundantes (sin tejidos blancos).	M	A	A	M	A

Clave	Um37	Um38	Um39	Um40	Um41
Código CP				CP533	CP534
Fecha de recolección	08/09/2008	09/09/2008	09/09/2008	15/09/2008	19/09/2008
Procedencia: Estado Localidad	Edo.de México Hongos de México	Puebla Sn Felix, Hidalgo Atlixco	Puebla Sta Ma Techachalco Cd. Serdán	Puebla Benito Juárez de Reyes, Tepeaca	Puebla Sn Miguel Papaxtla, Cholula
Forma del espécimen	Agallas	Mazorca	Agallas	Mazorca	Agallas
Variedad de maíz: B: blanco, Am:amarillo, Az: azul, R: rojo	B	B		B	
Longitud de mazorca (cm)		20	6,8	13	
Diámetro de mazorca (cm)		21	5, 6	40	
Peso de mazorca (g)	350	218	3.5, 4.5	288	
Color de agallas (mayoría): N: negras; G: grises-platinadas; B: blancas-verdosas	B	G	G	N	G
Textura de agallas (mayoría): D: duras, F: firmes, B: blandas	D	B	B	B	F
Índice de severidad: 1: 1-25%; 2: 26 - 50%; 3: 51 - 75%; 4: 76 - 100%		50		100	
Tamaño de agallas:					
% de agallas pequeñas (1- 2 cm)	95	10	20	10	
% de agallas medianas (2.1 – 4 cm)	5	20	80	20	86
% de agallas grandes (> 4 cm).		70		70	14
Peso de agallas(g)	150	113	55	258	78
AGALLA SELECCIONADA					
Textura: Dura (D), Firme (F), Blanda (B).	F	F	B	B	F
Cantidad de teliosporas: E: escasas (la mayor parte con tejido blanco); M: media (pocas partes blancas); A: Abundantes (sin tejidos blancos).	E	A	A	A	E

Clave	Um42	Um43	Um44	Um45	Um46
Código CP	CP535	CP536	CP537	CP538	
Fecha de recolección	19/09/2008	22/09/2008	22/09/2008	23/09/2008	23/09/2008
Procedencia: Estado Localidad	Puebla Sn Gregorio Zaxcapexpan, Cholula	Tlaxcala Sn José Atoyatenco	Puebla Tepeaca	Puebla Acatzingo	Puebla Actipan de Morelos
Forma del espécimen	Mazorca	Agallas	Mazorca	Mazorca	Mazorca
Variedad de maíz: B: blanco, Am:amarillo, Az: azul, R: rojo	B		B	B	B
Longitud de mazorca (cm)	17		16	17	13.5
Diámetro de mazorca (cm)	21		18	17	20
Peso de mazorca (g)	234	125	176	194	250
Color de agallas (mayoría): N: negras; G: grises-platinadas; B: blancas-verdosas	G	G	G	G	G
Textura de agallas (mayoría): D: duras, F: firmes, B: blandas	F	F	F	F	F
Índice de severidad: 1: 1-25%; 2: 26 - 50%; 3: 51 - 75%; 4: 76 - 100%	55		85	30	60
Tamaño de agallas:					
% de agallas pequeñas (1- 2 cm)		8	10	29	15
% de agallas medianas (2.1 – 4 cm)	10	90	80	70	65
% de agallas grandes (> 4 cm).	90	2	10	1	20
Peso de agallas(g)	164	125	106	86	182
AGALLA SELECCIONADA					
Textura: Dura (D), Firme (F), Blanda (B).	B	F	F	F	F
Cantidad de teliosporas: E: escasas (la mayor parte con tejido blanco); M: media (pocas partes blancas); A: Abundantes (sin tejidos blancos).	A	A	A	A	A

Clave	Um47	Um48	Um49	Um50	Um51
Código CP			CP539		
Fecha de recolección	23/09/2008	24/09/2008	26/09/2008	26/09/2008	26/09/2008
Procedencia: Estado Localidad	Puebla Altepeixi, Tehuacán	Puebla Sn Jerónimo Tecuanipa	Puebla San Pedro Teyuca	Puebla Izúcar de Matamoros	Puebla Coyula, Atlixco
Forma del espécimen	Mazorca	Mazorca	Mazorca	Mazorca	Mazorca
Variedad de maíz: B: blanco, Am:amarillo, Az: azul, R: rojo	B	B	B	B	R
Longitud de mazorca (cm)	16	15	15	9	15.5
Diámetro de mazorca (cm)	16	20	22	17	23
Peso de mazorca (g)	124	176	228	92	266
Color de agallas (mayoría): N: negras; G: grises-platinadas; B: blancas-verdosas	G, parte inferior casi blancas	G	G	G	G
Textura de agallas (mayoría): D: duras, F: firmes, B: blandas	F	F	F	F	F
Índice de severidad: 1: 1-25%; 2: 26 - 50%; 3: 51 - 75%; 4: 76 - 100%	80	45	75	25	90
Tamaño de agallas:					
% de agallas pequeñas (1- 2 cm)	80		25		
% de agallas medianas (2.1 - 4 cm)	20	67	25	50	90
% de agallas grandes (> 4 cm).		33	50	50	10
Peso de agallas(g)	56	114	178	44	212
AGALLA SELECCIONADA	Todas				
Textura: Dura (D), Firme (F), Blanda (B).	F,D	F	F	F	F
Cantidad de teliosporas: E: escasas (la mayor parte con tejido blanco); M: media (pocas partes blancas); A: Abundantes (sin tejidos blancos).	M	A	A	A	A

Clave	Um52	Um53	Um54	Um55	Um56	Um57
Código CP		CP540	CP541	CP542		
Fecha de recolección	29/09/2008	02/10/2008	02/10/2008	04/10/2008	04/10/2008	04/10/2008
Procedencia: Estado	Puebla	Puebla	Puebla	Puebla	Puebla	Puebla
Localidad	San Salvador Huixcolotla	San Felipe Otlaltepec, T.R	San Felipe Otlaltepec, T.R.	Huaquechula	Huaquechula	Huaquechula
Forma del espécimen	Mazorca	Mazorca	Mazorca	Mazorca	Mazorca en 2 partes	Mazorca
Variedad de maíz: B: blanco, Am: amarillo, Az: azul, R: rojo	B	B	B	Am	B	B
Longitud de mazorca (cm)	14	15	18	9	9,5, 16	12
Diámetro de mazorca (cm)	24	41	42	10	12,13	22
Peso de mazorca (g)	236	312	378	38	80, 104	144
Color de agallas (mayoría): N: negras; G: grises-platinadas; B: blancas-verdosas	G	G/N	N	B	B	N
Textura de agallas (mayoría): D: duras, F: firmes, B: blandas	F	F	B	D	D	B
Índice de severidad: 1: 1-25%; 2: 26 - 50%; 3: 51 - 75%; 4: 76 - 100%	99	98	99	90	100	90
Tamaño de agallas:						
% de agallas pequeñas (1- 2 cm)		20	25	60	0, 50	10
% de agallas medianas (2.1 – 4 cm)		60	74	40	0, 25	90
% de agallas grandes (> 4 cm).		20	1		100, 25	
Peso de agallas(g)	172	268	328	36	40, 68	122
AGALLA SELECCIONADA						
Textura: Dura (D), Firme (F), Blanda (B).	F	F	F	D	D	B
Cantidad de teliosporas: E: escasas (la mayor parte con tejido blanco); M: media (pocas partes blancas); A: Abundantes (sin tejidos blancos).	A	A	A	E	M	A

Clave	Um 58a 58-4	Um58b 58-6	Um58c 58-7	Um59	Um60	Um61
Código CP						
Fecha de recolección				06/10/2008	06/10/2008	06/10/2008
Procedencia: Estado				Edo. de México	Edo. de México	Puebla o
Localidad				Tlalomulco, Toluca	Toluca	Guanajuato?
Forma del espécimen				Mazorca	Agallas	Mazorca
Variedad de maíz: B: blanco, Am: amarillo, Az: azul, R: rojo				D	D	B
Longitud de mazorca (cm)	8	9	9	9		12.5
Diámetro de mazorca (cm)	11	13	6	18		19.5
Peso de mazorca (g)	14.8	22.3	15.4	80		158
Color de agallas (mayoría): N: negras; G: grises-platinadas; B: blancas-verdosas	V	V	N/V	G/N	G	G
Textura de agallas (mayoría): D: duras, F: firmes, B: blandas	D	D	D	B	F	F
Índice de severidad: 1: 1-25%; 2: 26 - 50%; 3: 51 - 75%; 4: 76 - 100%	30	40	10			99
Tamaño de agallas:						
% de agallas pequeñas (1- 2 cm)	50	50	50			20
% de agallas medianas (2.1 - 4 cm)	50	50	50	40	50	80
% de agallas grandes (> 4 cm).				60	50	
Peso de agallas(g)	5.3	4.7	1.8	78		84
AGALLA SELECCIONADA						
Textura: Dura (D), Firme (F), Blanda (B).	D	D	D	F	F	F
Cantidad de teliosporas: E: escasas (la mayor parte con tejido blanco); M: media (pocas partes blancas); A: Abundantes (sin tejidos blancos).	E	E	E	A	A	A

Clave	Um62	Um63	Um64	Um65	Um66
Código CP	CP-482	CP-543	CP-483	CP-484 y CP-485	CP-544
Fecha de recolección	06/10/2008	06/10/2008	06/10/2008	10/10/2008	13/10/2008
Procedencia: Estado	Hidalgo	Edo.de México	Edo.de México	Tlaxcala	Hidalgo
Localidad		Toluca Ixtahuaca	Toluca, Ixtlahuaca	Sn.Diego, Xocoyucan	Zaragoza
Forma del espécimen	Agallas	Agallas	Agallas	2 Mazorcas	Agallas
Variedad de maíz: B: blanco, Am:amarillo, Az: azul, R: rojo	D	D	D	B (Híbrido: HS2)	D
Longitud de mazorca (cm)				16,18.5	
Diámetro de mazorca (cm)				23,26	
Peso de mazorca (g)				224,140	
Color de agallas (mayoría): N: negras; G: grises-platinadas; B: blancas-verdosas	G	G	G	N,N	G
Textura de agallas (mayoría): D: duras, F: firmes, B: blandas	F	F	F	B	F
Índice de severidad: 1: 1-25%; 2: 26 - 50%; 3: 51 - 75%; 4: 76 - 100%				100,40	
Tamaño de agallas:					
% de agallas pequeñas (1- 2 cm)				50,0	50
% de agallas medianas (2.1 - 4 cm)	20	10	80	50,20	50
% de agallas grandes (> 4 cm).	80	90	20	0,80	
				profundidad de 5 y 6 cm	
Peso de agallas(g)				216,56	
AGALLA SELECCIONADA					
Textura: Dura (D), Firme (F), Blanda (B).	F	F	F	F,F	F
Cantidad de teliosporas: E: escasas (la mayor parte con tejido blanco); M: media (pocas partes blancas); A: Abundantes (sin tejidos blancos).	A	A	A	A,A	A

Clave	Um67	Um68 a,b,c	Um69 a,b	Um70	Um71
Código CP	CP-486		SC, CP-545		
Fecha de recolección	13/10/2008	13/10/2008	13/10/2008	13/10/2008	13/10/2008
Procedencia: Estado	Edo. de Mex.	Puebla	Puebla	Puebla	Puebla
Localidad	Milpa Alta	Huaquechula	Huaquechula	Zacapoaxtla	Zacapoaxtla
Forma del espécimen	Agallas	3 mazorcas	2 mazorcas	Mazorca	Mazorca
Variedad de maíz: B: blanco, Am:amarillo, Az: azul, R: rojo	D	Am	B	B	B
Longitud de mazorca (cm)		28,22,19	12,11	10,10	
Diámetro de mazorca (cm)		24,20,21	14,28	21	19
Peso de mazorca (g)		434,236,104	160, 158	122	62
Color de agallas (mayoría): N: negras; G: grises-platinadas; B: blancas-verdosas	G	G, G/N, G	G/N, N	N	G
Textura de agallas (mayoría): D: duras, F: firmes, B: blandas	F	F,F,F	F, B	B	F
Índice de severidad: 1: 1-25%; 2: 26 - 50%; 3: 51 - 75%; 4: 76 - 100%		25,25,10	25,80	99	90
Tamaño de agallas:					
% de agallas pequeñas (1- 2 cm)	100	100,20,0	0,0	20	
% de agallas medianas (2.1 - 4 cm)		0, 80, 100	80,30	80	25
% de agallas grandes (> 4 cm).		0,0,0	20,70		75
Peso de agallas(g)		162,126,50	136, 150	110	52
AGALLA SELECCIONADA					
Textura: Dura (D), Firme (F), Blanda (B).	F	F,F,F	F, B	F	F
Cantidad de teliosporas: E: escasas (la mayor parte con tejido blanco); M: media (pocas partes blancas); A: Abundantes (sin tejidos blancos).	A	A,A,A	A,A	A	A

Clave	Um72	Um73	Um74	Um75	Um76
Código CP		CP546	CP547	CP548	CP549
Fecha de recolección	13/10/2008	15/10/2008	15/10/2008	15/10/2008	15/10/2008
Procedencia: Estado Localidad	Puebla Azumiatla	Puebla San Mateo	Puebla San Mateo	Puebla San Mateo	Puebla San Mateo
Forma del espécimen	Mazorca	Capultitlán, Hjtz. Mazorca	Capultitlán, Hjtz. Mazorca	Capultitlán, Hjtz. Mazorca medio fresca	Capultitlán, Hjtz. Mazorca seca
Variedad de maíz: B: blanco, Am:amarillo, Az: azul, R: rojo	B	B-cremoso	Az	B-cremoso	B-cremoso
Longitud de mazorca (cm)	10	17	8	15	16
Diámetro de mazorca (cm)	19	22	12		
Peso de mazorca (g)	155	172	184		
Color de agallas (mayoría): N: negras; G: grises-platinadas; B: blancas-verdosas	N/G	N/G	G		
Textura de agallas (mayoría): D: duras, F: firmes, B: blandas	F/B	F/B	F		
Índice de severidad: 1: 1-25%; 2: 26 - 50%; 3: 51 - 75%; 4: 76 - 100%	97	80	10	20	30
Tamaño de agallas:					
% de agallas pequeñas (1- 2 cm)	10	5	50		
% de agallas medianas (2.1 – 4 cm)	50	85	50		
% de agallas grandes (> 4 cm).	40	10			
Peso de agallas(g)	145	128	50		
AGALLA SELECCIONADA					
Textura: Dura (D), Firme (F), Blanda (B).	F	F	F		
Cantidad de teliosporas: E: escasas (la mayor parte con tejido blanco); M: media (pocas partes blancas); A: Abundantes (sin tejidos blancos).	A	A	A		

Clave	Um77	Um78	Um79	Um80	Um81
Código CP	CP550			CP551	
Fecha de recolección	15/10/2008	15/10/2008	15/10/2008	15/10/2008	15/10/2008
Procedencia: Estado Localidad	Puebla San Mateo Capultitlán, Hjtz.	Puebla San Mateo Capultitlán, Hjtz.	Puebla San Mateo Capultitlán, Hjtz.	Puebla San Mateo Capultitlán, Hjtz.	Puebla San Mateo Capultitlán, Hjtz.
Forma del espécimen	Mazorca seca	Mazorca seca	Mazorca seca	Mazorca seca	Mazorca seca
Variedad de maíz: B: blanco, Am:amarillo, Az: azul, R: rojo	B-cremoso (Ochenteño)	Az-intenso	B-cacahuacintle	B-cremoso	B-cremoso
Longitud de mazorca (cm)	16	11	19	12	15
Diámetro de mazorca (cm)					
Peso de mazorca (g)					
Color de agallas (mayoría): N: negras; G: grises-platinadas; B: blancas-verdosas					
Textura de agallas (mayoría): D: duras, F: firmes, B: blandas					
Índice de severidad: 1: 1-25%; 2: 26 - 50%; 3: 51 - 75%; 4: 76 - 100%	25	40	60	35	20
Tamaño de agallas:					
% de agallas pequeñas (1- 2 cm)					
% de agallas medianas (2.1 - 4 cm)					
% de agallas grandes (> 4 cm).					
Peso de agallas(g)					
AGALLA SELECCIONADA					
Textura: Dura (D), Firme (F), Blanda (B).					
Cantidad de teliosporas: E: escasas (la mayor parte con tejido blanco); M: media (pocas partes blancas); A: Abundantes (sin tejidos blancos).					

Clave	Um82	Um83	Um84	Um85	Um86
Código CP			CP552		
Fecha de recolección	15/10/2008	15/10/2008	15/10/2008	15/10/2008	15/10/2008
Procedencia: Estado	Puebla	Puebla	Puebla	Puebla	Puebla
Localidad	San Mateo Capultitlán, Hjtz.	San Mateo Capultitlán, Hjtz.	San Mateo Capultitlán, Hjtz.	San Mateo Capultitlán, Hjtz.	San Mateo Capultitlán, Hjtz.
Forma del espécimen	Mazorca seca	Mazorca seca	Mazorca seca	Mazorca seca	Mazorca seca
	B-cremoso (Ochenteño)	Az-intenso	B-cacahuacintle	B-cremoso	B-cremoso
Variedad de maíz: B: blanco, Am:amarillo, Az: azul, R: rojo	B-cremoso (Ochenteño)	Az-intenso	B-cacahuacintle	B-cremoso	B-cremoso
Longitud de mazorca (cm)	16	11	19	12	15
Diámetro de mazorca (cm)					
Peso de mazorca (g)					
Color de agallas (mayoría): N: negras; G: grises-platinadas; B: blancas-verdosas					
Textura de agallas (mayoría): D: duras, F: firmes, B: blandas					
Índice de severidad: 1: 1-25%; 2: 26 - 50%; 3: 51 - 75%; 4: 76 - 100%	25	40	60	35	20
Tamaño de agallas:					
% de agallas pequeñas (1- 2 cm)					
% de agallas medianas (2.1 - 4 cm)					
% de agallas grandes (> 4 cm).					
Peso de agallas(g)					
AGALLA SELECCIONADA					
Textura: Dura (D), Firme (F), Blanda (B).					
Cantidad de teliosporas: E: escasas (la mayor parte con tejido blanco); M: media (pocas partes blancas); A: Abundantes (sin tejidos blancos).					

Clave	Um87	Um88	Um89	Um90	Um91
Código CP		CP-553		CP-487	
Fecha de recolección	18/10/2008	18/10/2008	18/10/2008	18/10/2008	18/10/2008
Procedencia: Estado Localidad	Puebla San Mateo Capultitlán, Hjtz.	Puebla San Mateo Capultitlán, Hjtz.	Puebla San Mateo Capultitlán, Hjtz.	Puebla San Mateo Capultitlán, Hjtz.	Puebla San Mateo Capultitlán, Hjtz.
Forma del espécimen	Marzoeca seca	Marzoeca seca	Marzoeca seca	Marzoeca seca	Marzoeca seca
Variedad de maíz: B: blanco, Am:amarillo, Az: azul, R: rojo	B-cacahuacintle	B-cacahuacintle	D	B-cremoso	B-cremoso
Longitud de mazorca (cm)	14	17	15	15	16
Diámetro de mazorca (cm)					
Peso de mazorca (g)					
Color de agallas (mayoría): N: negras; G: grises-platinadas; B: blancas-verdosas					
Textura de agallas (mayoría): D: duras, F: firmes, B: blandas					
Índice de severidad: 1: 1-25%; 2: 26 - 50%; 3: 51 - 75%; 4: 76 - 100%	40	40	30	25	70
Tamaño de agallas:					
% de agallas pequeñas (1- 2 cm)					
% de agallas medianas (2.1 - 4 cm)					
% de agallas grandes (> 4 cm).					
Peso de agallas(g)					
AGALLA SELECCIONADA					
Textura: Dura (D), Firme (F), Blanda (B).					
Cantidad de teliosporas: E: escasas (la mayor parte con tejido blanco); M: media (pocas partes blancas); A: Abundantes (sin tejidos blancos).					

Clave	Um92	Um93	Um94	Um95	Um96
Código CP					
Fecha de recolección	18/10/2008	18/10/2008	18/10/2008	18/10/2008	18/10/2008
Procedencia: Estado Localidad	Puebla San Mateo Capultitlán, Hjtz.	Puebla San Mateo Capultitlán, Hjtz.	Querétaro La Solana, Sta. Rosa Jauregui	Querétaro La Solana, Sta. Rosa Jauregui	Querétaro La Solana, Sta. Rosa Jauregui
Forma del espécimen	Mazorca seca	Mazorca seca	Mazorca	Mazorca	Mazorca
Variedad de maíz: B: blanco, Am:amarillo, Az: azul, R: rojo	B-cremoso	B-cremoso	B	B y R	R
Longitud de mazorca (cm)	13	12	15	15	12
Diámetro de mazorca (cm)			25	20	17
Peso de mazorca (g)			218	146	88
Color de agallas (mayoría): N: negras; G: grises-platinadas; B: blancas-verdosas			G	G	G
Textura de agallas (mayoría): D: duras, F: firmes, B: blandas			F	F	F
Índice de severidad: 1: 1-25%; 2: 26 - 50%; 3: 51 - 75%; 4: 76 - 100%	20	30	50	25	95
Tamaño de agallas:					
% de agallas pequeñas (1- 2 cm)			70		30
% de agallas medianas (2.1 - 4 cm)			30	66	70
% de agallas grandes (> 4 cm).				34	
Peso de agallas(g)			168	68	76
AGALLA SELECCIONADA					
Textura: Dura (D), Firme (F), Blanda (B).			F	F	F
Cantidad de teliosporas: E: escasas (la mayor parte con tejido blanco); M: media (pocas partes blancas); A: Abundantes (sin tejidos blancos).			A	A	A

Clave	Um97	Um98	Um99	Um100	Um101
Código CP					
Fecha de recolección	31/10/2008	31/10/2008	31/10/2008	31/10/2008	31/10/2008
Procedencia: Estado Localidad	Edo.de Mex. Temac, Texcoco (Montecillos)	Edo.de Mex. Temac, Texcoco (Montecillos)	Edo.de Mex. Temac, Texcoco (Montecillos)	Edo.de Mex. Temac, Texcoco (Montecillos)	Edo.de Mex. Temac, Texcoco (Montecillos)
Forma del espécimen	Tallo, agallas secas	Agallas secas	Agallas secas	Agallas secas	Agallas secas
Variedad de maíz: B: blanco, Am: amarillo, Az: azul, R: rojo	B (Jala)	B (Jala)	B (H48)	Am	B (HS-2) (línea x)
Longitud de mazorca (cm)		19	15	9	12
Diámetro de mazorca (cm)					
Peso de mazorca (g)					
Color de agallas (mayoría): N: negras; G: grises- platinadas; B: blancas-verdosas					
Textura de agallas (mayoría): D: duras, F: firmes, B: blandas					
Índice de severidad: 1: 1-25%; 2: 26 - 50%; 3: 51 - 75%; 4: 76 - 100%	100	75	100	50	50
Tamaño de agallas: % de agallas pequeñas (1- 2 cm) % de agallas medianas (2.1 – 4 cm) % de agallas grandes (> 4 cm).					
Peso de agallas(g)					
AGALLA SELECCIONADA					
Textura: Dura (D), Firme (F), Blanda (B).					
Cantidad de teliosporas: E: escasas (la mayor parte con tejido blanco); M: media (pocas partes blancas); A: Abundantes (sin tejidos blancos).					

Clave	Um102	Um103	Um104	Um105	Um106
Código CP			CP-488		CP-489
Fecha de recolección	31/10/2008	31/10/2008	03/11/2008	03/11/2008	03/11/2008
Procedencia: Estado Localidad	Edo.de Mex. Temac, Texcoco (Montecillos)	Edo.de Mex. Temac, Texcoco (Montecillos)	Guanajuato Celaya INIFAP-Bajío	Guanajuato Celaya INIFAP-Bajío	Guanajuato Celaya INIFAP-Bajío
Forma del espécimen	Agallas secas	Agallas secas	Tallo, agallas s.	Agallas secas	Agallas secas
Variedad de maíz: B: blanco, Am:amarillo, Az: azul, R: rojo	B (HS-2) (línea y)	B	B	B	B
Longitud de mazorca (cm)	14	18			
Diámetro de mazorca (cm)					
Peso de mazorca (g)					
Color de agallas (mayoría): N: negras; G: grises-platinadas; B: blancas-verdosas					
Textura de agallas (mayoría): D: duras, F: firmes, B: blandas					
Índice de severidad: 1: 1-25%; 2: 26 - 50%; 3: 51 - 75%; 4: 76 - 100%	50	25	100	100	100
Tamaño de agallas:					
% de agallas pequeñas (1- 2 cm)					
% de agallas medianas (2.1 - 4 cm)					
% de agallas grandes (> 4 cm).					
Peso de agallas(g)					
AGALLA SELECCIONADA					
Textura: Dura (D), Firme (F), Blanda (B).					
Cantidad de teliosporas: E: escasas (la mayor parte con tejido blanco); M: media (pocas partes blancas); A: Abundantes (sin tejidos blancos).					

Clave	Um107	Um108	Um109	Um110	Um111
Código CP			CP-490		
Fecha de recolección	03/11/2008	03/11/2008	03/11/2008	03/11/2008	03/11/2008
Procedencia: Estado Localidad	Guanajuato Celaya INIFAP-Bajío	Guanajuato Celaya INIFAP-Bajío	Guanajuato Celaya INIFAP-Bajío	Guanajuato Celaya INIFAP-Bajío	Guanajuato Celaya INIFAP-Bajío
Forma del espécimen	Agallas secas	Tallo	Agallas secas	Agallas secas	Agallas secas
Variedad de maíz: B: blanco, Am:amarillo, Az: azul, R: rojo	B	B	R	AzRAm	Az
Longitud de mazorca (cm)					
Diámetro de mazorca (cm)					
Peso de mazorca (g)					
Color de agallas (mayoría): N: negras; G: grises-platinadas; B: blancas-verdosas					
Textura de agallas (mayoría): D: duras, F: firmes, B: blandas					
Índice de severidad: 1: 1-25%; 2: 26 - 50%; 3: 51 - 75%; 4: 76 - 100%	5	100	100	100	100
Tamaño de agallas:					
% de agallas pequeñas (1- 2 cm)					
% de agallas medianas (2.1 – 4 cm)					
% de agallas grandes (> 4 cm).					
Peso de agallas(g)					
AGALLA SELECCIONADA					
Textura: Dura (D), Firme (F), Blanda (B).					
Cantidad de teliosporas: E: escasas (la mayor parte con tejido blanco); M: media (pocas partes blancas); A: Abundantes (sin tejidos blancos).					

Clave	Um112	Um113	Um114	Um115	Um116
Código CP					
Fecha de recolección	03/11/2008	03/11/2008	03/11/2008	03/11/2008	03/11/2008
Procedencia: Estado Localidad	Guanajuato Celaya INIFAP-Bajío	Guanajuato Celaya INIFAP-Bajío	Guanajuato Celaya INIFAP-Bajío	Guanajuato Celaya INIFAP-Bajío	Guanajuato Celaya INIFAP-Bajío
Forma del espécimen	Agallas secas	Agallas secas	Tallo, agallas s	Espiga, agallas s.	Agallas secas
Variedad de maíz: B: blanco, Am:amarillo, Az: azul, R: rojo	AzR	AzR	B	Az	B
Longitud de mazorca (cm)					
Diámetro de mazorca (cm)					
Peso de mazorca (g)					
Color de agallas (mayoría): N: negras; G: grises-platinadas; B: blancas-verdosas					
Textura de agallas (mayoría): D: duras, F: firmes, B: blandas					
Índice de severidad: 1: 1-25%; 2: 26 - 50%; 3: 51 - 75%; 4: 76 - 100%	15	100	100	100	100
Tamaño de agallas:					
% de agallas pequeñas (1- 2 cm)					
% de agallas medianas (2.1 - 4 cm)					
% de agallas grandes (> 4 cm).					
Peso de agallas(g)					
AGALLA SELECCIONADA					
Textura: Dura (D), Firme (F), Blanda (B).					
Cantidad de teliosporas: E: escasas (la mayor parte con tejido blanco); M: media (pocas partes blancas); A: Abundantes (sin tejidos blancos).					

Clave	Um117	Um118	Um119	Um120	Um121
Código CP					
Fecha de recolección	03/11/2008	03/11/2008	03/11/2008	03/11/2008	03/11/2008
Procedencia: Estado Localidad	Guanajuato Celaya INIFAP-Bajío	Guanajuato Celaya INIFAP-Bajío	Guanajuato Celaya INIFAP-Bajío	Guanajuato Celaya INIFAP-Bajío	Guanajuato Celaya INIFAP-Bajío
Forma del espécimen	Agallas secas	Agallas secas	Agallas secas	Agallas secas	Agallas secas
Variedad de maíz: B: blanco, Am:amarillo, Az: azul, R: rojo	AzRB	AzR	Am	B	B
Longitud de mazorca (cm)					
Diámetro de mazorca (cm)					
Peso de mazorca (g)					
Color de agallas (mayoría): N: negras; G: grises-platinadas; B: blancas-verdosas					
Textura de agallas (mayoría): D: duras, F: firmes, B: blandas					
Índice de severidad: 1: 1-25%; 2: 26 - 50%; 3: 51 - 75%; 4: 76 - 100%	100	100	10	100	100
Tamaño de agallas:					
% de agallas pequeñas (1- 2 cm)					
% de agallas medianas (2.1 – 4 cm)					
% de agallas grandes (> 4 cm).					
Peso de agallas(g)					
AGALLA SELECCIONADA					
Textura: Dura (D), Firme (F), Blanda (B).					
Cantidad de teliosporas: E: escasas (la mayor parte con tejido blanco); M: media (pocas partes blancas); A: Abundantes (sin tejidos blancos).					

Clave	Um122	Um123	Um124	Um125	Um126
Código CP					
Fecha de recolección	03/11/2008	03/11/2008	31/10/2008	03/11/2008	18/11/2008
Procedencia: Estado Localidad	Guanajuato Celaya INIFAP-Bajío	Guanajuato Celaya INIFAP-Bajío	Edo.de Mex. Temac, Texcoco (Montecillos)	Puebla Chietla	Edo.de Mex. Temac, Texcoco (Montecillos)
Forma del espécimen	Tallo, agallas s.	Agallas secas	Agallas secas	Mazorca seca	Mazorca seca
Variedad de maíz: B: blanco, Am:amarillo, Az: azul, R: rojo	B	B	B	B	B
Longitud de mazorca (cm)					
Diámetro de mazorca (cm)					
Peso de mazorca (g)					
Color de agallas (mayoría): N: negras; G: grises-platinadas; B: blancas-verdosas					
Textura de agallas (mayoría): D: duras, F: firmes, B: blandas					
Índice de severidad: 1: 1-25%; 2: 26 - 50%; 3: 51 - 75%; 4: 76 - 100%	100	100	80	100	50
Tamaño de agallas:					
% de agallas pequeñas (1- 2 cm)					
% de agallas medianas (2.1 - 4 cm)					
% de agallas grandes (> 4 cm).					
Peso de agallas(g)					
AGALLA SELECCIONADA					
Textura: Dura (D), Firme (F), Blanda (B).					
Cantidad de teliosporas: E: escasas (la mayor parte con tejido blanco); M: media (pocas partes blancas); A: Abundantes (sin tejidos blancos).					

Clave	Um127	Um128	Um129	Um130	Um131
Código CP					
Fecha de recolección	18/11/2008	18/11/2008	20/11/2008	20/11/2008	29/12/2008
Procedencia: Estado Localidad	Edo.de Mex. Temac, Texcoco (Montecillos)	Edo.de Mex. Temac, Texcoco (Montecillos)	Puebla Libres	Puebla Libres	Chiapas San Cristobal de las Casas
Forma del espécimen	Mazorca seca	Mazorca deteriorada	Tallo (tierra)	Tallo (tierra)	Mazorca deteriorada
Variedad de maíz: B: blanco, Am:amarillo, Az: azul, R: rojo	Am	B			B
Longitud de mazorca (cm)	8	19			18
Diámetro de mazorca (cm)					17.4
Peso de mazorca (g)					325
Color de agallas (mayoría): N: negras; G: grises-platinadas; B: blancas-verdosas					N
Textura de agallas (mayoría): D: duras, F: firmes, B: blandas					B
Índice de severidad: 1: 1-25%; 2: 26 - 50%; 3: 51 - 75%; 4: 76 - 100%	100	50			75
Tamaño de agallas:					
% de agallas pequeñas (1- 2 cm)					45
% de agallas medianas (2.1 – 4 cm)					50
% de agallas grandes (> 4 cm).					5
Peso de agallas(g)					160
AGALLA SELECCIONADA					
Textura: Dura (D), Firme (F), Blanda (B).					B
Cantidad de teliosporas: E: escasas (la mayor parte con tejido blanco); M: media (pocas partes blancas); A: Abundantes (sin tejidos blancos).					A

Anexo B3. Fotografías de mazorcas de huitlacoche recolectadas en el centro de México.

Um 38



Um 40



Um 42



Um 44



Um 45



Um 46



Um 47



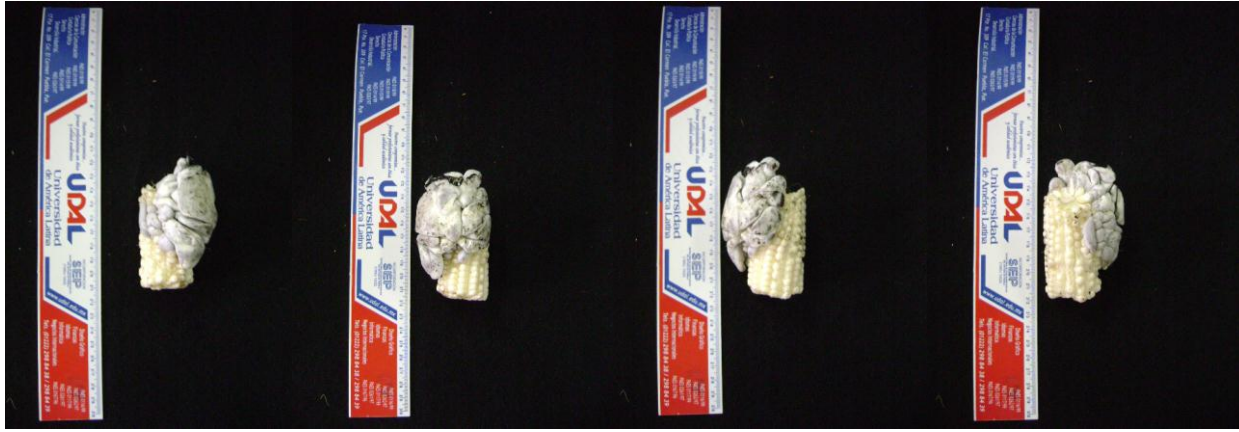
Um 48



Um 49



Um 50



Um 51



Um 52



Um 53



Um 54



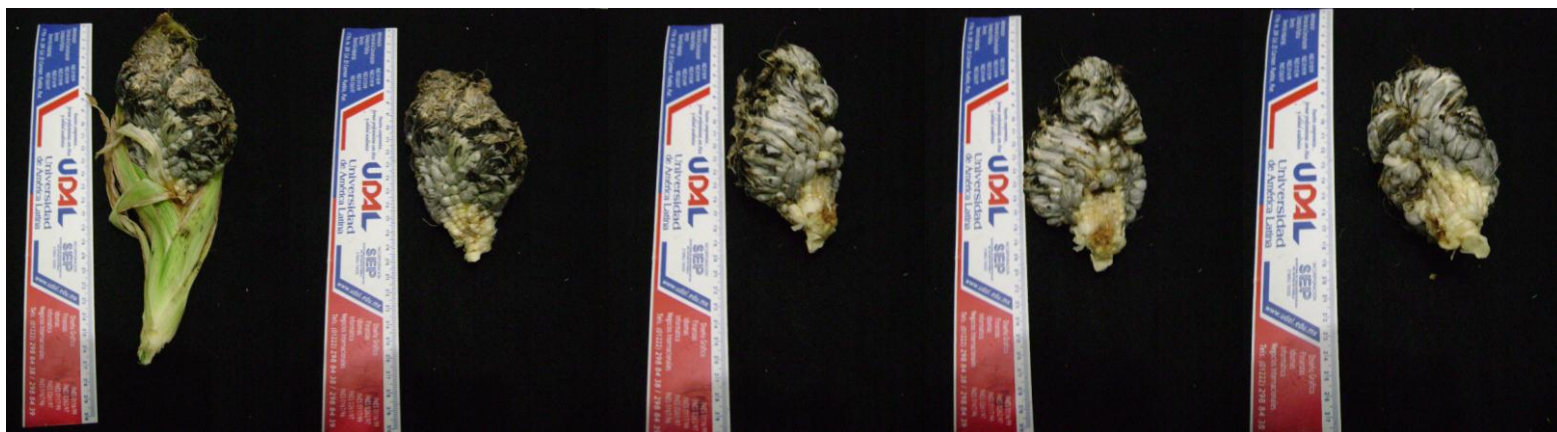
Um 55



Um 56



Um 57



Um 58



Um 59



Um 61



Um 65



Um 68



Um 69



Um70,71



Um 72



Um 73



Um 74



Um 94



Um 95



Um 96



