

Factores físicos y microbiológicos en el deterioro del huitlacoche en poscosecha*

Physical and microbiological factors in the deterioration of huitlacoche in post-harvest

Elizabeth López García¹, Artemio Pérez López^{1§}, Marcelo Acosta Ramos¹, María de Jesús Ochoa Rosas¹, Reyna Isabel Rojas Martínez² y Teodoro Espinosa Solares¹

¹Ingeniería Agroindustrial, Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco, km 38.5. Texcoco, Estado de México, México. CP. 56230. (lopez.geliza@gmail.com; aperezl.dia@gmail.com; acostam14@gmail.com; mary_0613@hotmail.com; t.espinosa.s@taurus.chapingo.mx). ²Fitopatología, Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco, km. 36.5. Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. CP. 56230. (rojas@colpos.mx). [§]Autor para correspondencia: aperezl.dia@gmail.com.

Resumen

El huitlacoche (*Ustilago maydis* (DC) Corda) es una buena fuente de aporte de nutrientes en la alimentación. Durante el manejo poscosecha, el producto muestra una rápida senescencia, atribuida a las altas tasas de deshidratación y respiración del producto, además de la composición del mismo. Con la finalidad de prolongar la vida de anaquel, se evaluó el efecto de alta humedad relativa y baja temperatura de almacenamiento sobre las propiedades físicas del huitlacoche (entero y agalla) y la presencia de los hongos fitopatógenos. Los resultados mostraron que a 3 °C la tasa de deshidratación disminuye, manteniendo la calidad visual por más tiempo, tanto del huitlacoche entero como en agalla. El almacenamiento con alta humedad relativa a temperatura ambiente favoreció la proliferación de especies fitopatógenas hospederas como *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer* y *Penicillium expansum*. La mayor incidencia y severidad la presentó *F. oxysporum* inoculada con herida en agalla, mientras que *R. stolonifer*, aunque con menor incidencia que las otras dos especies, fue capaz de sobrevivir hasta 10 °C. Los resultados demuestran que es viable el manejo del huitlacoche a 3 °C y alta humedad relativa en el aire del ambiente, ya

Abstract

The huitlacoche (*Ustilago maydis* (DC) Corda) is a good source of nutrients in the diet. During post-harvest handling, the product shows a rapid senescence, attributed to the high rates of dehydration and respiration of the product, in addition to its composition. In order to prolong shelf life, the effect of high relative humidity and low storage temperature on the physical properties of huitlacoche (whole and in galls) and the presence of phytopathogenic fungi were evaluated. The results showed that at 3 °C the dehydration rate decreased, maintaining the visual quality for longer, both the whole huitlacoche and in galls. Storage with high relative humidity at room temperature favored the proliferation of phytopathogenic host species such as *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer* and *Penicillium expansum*. The highest incidence and severity was shown by *F. oxysporum* inoculated with a wound in the gall, while *R. stolonifer*, although with a lower incidence than the other two species, was able to survive up to 10 °C. The results demonstrate that the management of huitlacoche at 3 °C and high relative humidity in ambient air is feasible, as it counteracts the rate of dehydration and eliminates the risk of proliferation of host phytopathogenic fungi.

* Recibido: febrero de 2017
Aceptado: marzo de 2017

que contrarresta la velocidad de deshidratación y elimina el riesgo de proliferación de hongos fitopatógenos hospederos de la superficie.

Palabras clave: *Ustilago maydis*, hongos fitopatógenos, humedad relativa, refrigeración, vida de anaquel.

Introducción

El *Ustilago maydis* (DC) Corda es un hongo basidiomiceto patógeno biotrófico, causante del carbón de maíz o huitlacoche. Su desarrollo se debe a la infección provocada por *U. maydis* en la región meristemática de la mazorca del maíz (*Zea mays*) inmaduro e induce la formación de tumores llenos de teliosporas diploides, conocidos también como agallas (Valverde *et al.*, 1995; Salmerón-Santiago, 2011). Las agallas representan una fuente interesante de alimento, con buen contenido de proteínas, fibra y ácidos grasos como linoleico, linolénico y palmítico (Valverde *et al.*, 1995). Martínez-Flores *et al.* (2008) reportaron que el aminoácido más abundante en el huitlacoche es la lisina con 27.2% del total de los aminoácidos esenciales. De hecho, se ha considerado como un alimento funcional de alta calidad (Valverde *et al.*, 2012).

En la actualidad se busca mejorar la producción y conservación del huitlacoche para su consumo en fresco (Madrigal-Rodríguez *et al.*, 2010; Aydogdu, 2015). Sin embargo, la principal desventaja es su corta vida de anaquel, tres o cuatro días, debido a su alta actividad metabólica, falta de cutícula y pérdida acelerada de agua, razón por la cual se consume fresco y en forma casi inmediata a su recolección o cosecha. De acuerdo con investigaciones previas, el metabolismo respiratorio del huitlacoche entero es elevado ($> 300 \text{ ml CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) en condiciones normales de almacenamiento ($20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) y en ambientes refrigerados se puede disminuir hasta un 38% ($10 \text{ }^\circ\text{C}$) o hasta 22% ($3 \text{ }^\circ\text{C}$) respecto del ambiente normal (Martínez-Flores *et al.*, 2008; Monroy-Gutiérrez *et al.*, 2012).

El producto generalmente se comercializa desgranado (en agallas) en los mercados locales. Durante la actividad del desgranado, la cubierta externa (peridio) recibe esfuerzos de compresión que rebasan el límite elástico de la cubierta ocasionando daños mecánicos, además de exponer a las agallas individuales a las condiciones del aire del ambiente con mayor superficie de contacto. Esta situación genera

Keywords: *Ustilago maydis*, phytopathogenic fungi, relative humidity, refrigeration, shelf life.

Introduction

Ustilago maydis (DC) Corda is a biotrophic pathogenic basidiomycete fungus, which causes charcoal cob or huitlacoche. Its development is due to the infection caused by *U. maydis* in the meristematic region of the immature corn cob (*Zea mays*) and induces the formation of tumors full of diploid teliospores, also known as galls (Valverde *et al.*, 1995; Salmerón-Santiago, 2011). Galls represent an interesting source of food, with good content of proteins, fiber and fatty acids such as linoleic, linolenic and palmitic (Valverde *et al.*, 1995). Martínez-Flores *et al.* (2008) reported that the most abundant amino acid in huitlacoche is lysine with 27.2% of the total essential amino acids. In fact, it has been considered as a high quality functional food (Valverde *et al.*, 2012).

Nowadays, it is sought to improve the production and conservation of huitlacoche for fresh consumption (Madrigal-Rodríguez *et al.*, 2010; Aydogdu, 2015). However, the main disadvantage is its short shelf life, three or four days, due to its high metabolic activity, lack of cuticle and accelerated water loss, which is why it is consumed fresh and almost immediately to its collection or harvest. According to previous research, the respiratory metabolism of whole huitlacoche is high ($> 300 \text{ ml CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) under normal storage conditions ($20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) and in refrigerated environments it can be reduced up to 38% ($10 \text{ }^\circ\text{C}$) or up to 22% ($3 \text{ }^\circ\text{C}$) compared to its normal environment (Martínez-Flores *et al.*, 2008; Monroy-Gutiérrez *et al.*, 2012).

The product is usually marketed threshed out (galls) in the local markets. During the threshing activity, the outer shell (peridium) receives compressive stresses that exceed the elastic limit of the cover, causing mechanical damage, besides exposing the individual galls to the ambient air conditions with a larger contact surface. This situation generates significant changes in respiration rate and weight loss due to dehydration. Martínez-Flores *et al.* (2008) report weight losses of nearly 30% in whole huitlacoche (cob) and up to 65% in galls after three days storage at room temperature. The most evident visual change in dehydrated galls is the external color change due to the rupture of the peridium and the consequent exposure of the

cambios significativos en la velocidad de respiración y pérdida de peso debido a la deshidratación. Martínez-Flores *et al.* (2008) reportan pérdidas de peso del orden de 30% en huitlacoche entero (mazorca) y hasta de 65% en producto desgranado (agallas) después de tres días de almacenamiento a la temperatura ambiente. El cambio visual más evidente en la agalla deshidratada es el cambio de color externo debido al rompimiento del peridio y la consecuente exposición del micelio del hongo (color oscuro). Estos cambios significativos en la deshidratación sugieren que el aire del ambiente de almacenamiento se mantenga con alta humedad relativa para minimizar el gradiente de concentración de humedad entre el aire y la superficie del peridio, ya que de ello depende en gran medida la velocidad de difusión del agua a través de aire.

El almacenamiento del huitlacoche en cámaras de alta humedad puede ser una alternativa para solucionar el problema de la deshidratación; sin embargo, esta condición puede favorecer la proliferación de la flora patogénica que pudiera hospedarse en la superficie del hongo, aunado con que el huitlacoche contiene altos niveles de azúcares libres (56.2-268 mg g⁻¹, base seca) (Valdez-Morales *et al.*, 2010), como la glucosa y fructosa, que son un medio de cultivo natural para el crecimiento de estos microorganismos. La concentración en azúcares libres es superior a lo que se reporta para granos de maíz híbrido normal y extra-dulce (Reyes *et al.*, 1982) y en otras especies como papaya y banano (Torija *et al.*, 1998). Por lo tanto, en la búsqueda de nuevas alternativas para prolongar la vida de anaquel del producto, es importante identificar los factores físicos y microbiológicos que coadyuvan a su rápida senescencia. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia que tiene las condiciones de alta humedad relativa y temperatura de almacenamiento bajas sobre las propiedades físicas del huitlacoche y la presencia de los hongos fitopatógenos.

Materiales y métodos

Material vegetal

Las mazorcas enteras de maíz infectadas por el hongo del huitlacoche se compraron en la central de abasto de la Ciudad de México, aproximadamente 12 h después de haberse cosechado. En el laboratorio de experimentación, localizado en el Departamento de Ingeniería Agroindustrial de la

fungus mycelium (dark color). These significant changes in dehydration suggest that the air in the storage environment is maintained at high relative humidity to minimize the gradient of moisture concentration between the air and the peridium surface, as the water diffusion rate through air depends mostly on it.

The storage of huitlacoche in high humidity chambers can be an alternative to solve the problem of dehydration; however, this condition may favor the proliferation of pathogenic flora that may be present on the fungus surface, in addition to the fact that huitlacoche contains high levels of free sugars (56.2-268 mg g⁻¹, dry basis) (Valdez-Morales *et al.*, 2010), such as glucose and fructose, which are a natural growth medium for microorganisms. The free sugars concentration is higher than that reported for normal and extra-sweet hybrid maize (Reyes *et al.*, 1982) and other species such as papaya and banana (Torija *et al.*, 1998). Therefore, in the searching for new alternatives to prolong shelf life it is important to identify the physical and microbiological factors that contribute to its rapid senescence. In this context, the objective of this paper was to evaluate the influence of conditions of high relative humidity and low storage temperature on the physical properties of huitlacoche and the presence of phytopathogenic fungi.

Materials and methods

Vegetal material

Whole corn cobs infected with the huitlacoche fungus were purchased at a Mexico City market approximately 12 hours after harvesting. In the experimental laboratory, located in the Department of Agroindustrial Engineering of the Universidad Autónoma Chapingo, a selection was made to eliminate the damaged cobs. The complete corn cob covered of the *Ustilago maydis* fungus and groups formed by 10 galls of huitlacoche, both randomly selected, were managed as experimental units.

Post-harvest characterization

The following treatments according with ambient air temperatura were established: a) 3 ±2 °C, b) 10 ±2 °C and c) 20 ±2 °C. For each treatment the following variables were measured over a period of 20 days. The weight was measured on an Ohaus digital electronic scale (Adventurer™

Universidad Autónoma Chapingo, se realizó una selección eliminando la mazorca dañada. Se manejaron como unidades experimentales, la mazorca completa de maíz cubierta del hongo *Ustilago maydis* y grupos conformados por 10 agallas de huitlacoche, ambos seleccionados al azar.

Caracterización poscosecha

Se establecieron los siguientes tratamientos de acuerdo con la temperatura del aire del ambiente de almacenamiento: a) 3 ± 2 °C, b) 10 ± 2 °C y c) 20 ± 2 °C. De cada tratamiento se midieron las siguientes variables durante un periodo de 20 días. El peso se midió en una balanza electrónica digital Ohaus (Adventurer™ Pro AV8101, Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ USA). Con estos datos se calculó el porcentaje de pérdida de peso diario. El color se midió con colorímetro Hunter Lab® (modelo Mini Scan XE Plus núm. 45/0-L, Reston, VA, USA) en la superficie de las agallas y se reportan valores en la escala CIELab. Se midió la firmeza del peridio de las agallas con un analizador de textura Stable Micro System (Mod. TA-XT2i, Stable Micro Systems Ltd., Godalming, Surrey, UK) adaptado con un accesorio cónico de punta redondeada de 2.6 cm de diámetro y ángulo de 75°. Se midió la fuerza de compresión, con una distancia de deformación de 5 mm y una velocidad de ensayo de 5 mm s^{-1} . Los resultados se expresan en newtons (N) (Monroy-Gutiérrez *et al.*, 2012). Diariamente se tomaron fotografías y se realizaron anotaciones sobre los cambios observados visualmente en las agallas y mazorcas para evaluar la apariencia.

Diagnóstico e identificación de hongos patógenos

Para inducir el crecimiento de los microorganismos que albergan en la superficie de las agallas y mazorcas de huitlacoche, se tomaron muestras y se colocaron en cámaras húmedas que fueron colocadas a diferentes temperaturas (3, 10 y 20 °C) hasta alcanzar el grado de descomposición (pérdida de firmeza y aparición de color oscuro y olores extraños). La cámara húmeda consistió en colocar una toalla de papel humedecida, con agua destilada esterilizada, sobre una charola de poliestireno expandido y sobre la toalla húmeda se colocaron las muestras de huitlacoche. Inmediatamente, la charola se colocó dentro de una bolsa de polietileno y se cerró herméticamente. La humedad relativa en el ambiente interno de la bolsa se mantuvo a 95% aproximadamente.

En la etapa de aislamiento de los microorganismos se tomaron porciones rectangulares de la parte sana y enferma de las agallas de 1 cm*0.5 cm cada una. Los cortes se

Pro AV8101, Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, USA). With these data the percentage of daily weight loss was calculated. Color was measured with the Hunter Lab® color gauge (Mini Scan XE Plus núm. 45/0-L, Reston, VA, USA) on the galls surface and reported on CIELab scale. Firmness of the gill peridium was measured with a Stable Micro System texture analyzer (Mod. TA-XT2i, Stable Micro Systems Ltd., Godalming, Surrey, UK) it was fitted with a rounded-tipped conical fixture of 2.6 cm diameter and 75° angle. The compression force, with a deformation distance of 5 mm and a test speed of 5 mm s^{-1} was measured. The results are expressed in newtons (N) (Monroy-Gutiérrez *et al.*, 2012). Photographs were taken daily and annotations were made on visually observed changes in the gills and cobs to assess the appearance.

Diagnosis and identification of pathogenic fungi

In order to induce growth of microorganisms harboring on the surface of huitlacoche galls and cobs, samples were respectively taken and placed in moist chambers that were placed at different temperatures (3, 10 and 20 °C) until reaching the decomposition degree (loss of firmness and appearance of dark color and strange odors). The wet chamber consisted of placing a moistened paper towel with sterilized distilled water on an expanded polystyrene tray and placing the huitlacoche samples on the wet towel. Immediately, the tray was placed inside a polyethylene bag and sealed. The relative humidity in the internal environment of the bag was maintained at approximately 95%.

In the isolation stage of the microorganisms rectangular portions of the healthy and diseased part of the gills were taken 1 cm*0.5 cm each. The sections were disinfested with 1.5% sodium hypochlorite for 1.5 min. Subsequently, they were rinsed with sterilized distilled water and four cuts were seeded in each petri dish with potato agar and dextrose (PDA) culture medium. Three days after planting different growth forms and fungal, stains were observed, which were isolated and purified in Petri dishes with PDA. Isolation of the fungi was done using the hyphal tip technique using the same culture medium, where rifampicin and chloramphenicol (500 ppm) were previously added to inhibit bacterial growth (Rodríguez-Mejía, 2010). The boxes were incubated for 72 h at 25 °C. After eight days of sowing, observations were made under a microscope and monoconidial cultures were obtained. The obtained isolates were seeded in PDA and incubated at 24 °C in white light for 15 days to increase the inoculum. The identification

desinfestaron con hipoclorito de sodio al 1.5% durante 1.5 min. Posteriormente, se enjuagaron con agua destilada esterilizada y se sembraron cuatro cortes en cada caja petri con medio de cultivo agar de papa y dextrosa (PDA). Tres días después de la siembra se observaron diferentes formas de crecimiento y coloraciones de hongos, los cuáles se aislaron y purificaron en cajas Petri con PDA. El aislamiento de los hongos se hizo con la técnica de punta de hifa utilizando el mismo medio de cultivo, donde previamente se agregaron riphampicina y cloranfenicol (500 ppm) para inhibir el crecimiento de bacterias (Rodríguez-Mejía, 2010). Las cajas se incubaron durante 72 h a 25 °C. Después de ocho días de la siembra se hicieron observaciones en el microscopio y se obtuvieron cultivos monoconidiales. Los aislamientos obtenidos se sembraron en PDA y se incubaron a 24 °C en luz blanca durante 15 días para incrementar el inóculo. La identificación de los hongos aislados se realizó por medio de sus estructuras morfológicas y características culturales con la ayuda de las claves de Barnett y Hunter (1998).

Asimismo, los hongos se identificaron por medio de la técnica de PCR-ITS (Polymerase Chain Reaction-Internal Transcribed Spacer), lo que dio una mayor confiabilidad a la identificación debido a la precisión de la técnica. Para ello, la extracción de DNA de los microorganismos se realizó ocho días después del crecimiento, de acuerdo con los métodos de Ahrens y Seemüller (1992) y Lee *et al.* (1993). La calidad del ADN se verificó en un gel de agarosa al 1% mediante electroforesis. El gel se observó en un transiluminador Bio Rad® (Bio Rad Laboratories Inc., CA, USA). La región interna ITS (ITS1 e ITS2) de los genes ribosomales RNA 18S-5.8S-28S se amplificó mediante PCR. Los iniciadores utilizados fueron ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) e ITS5 (GGAAGTAAACTCGTAACAAGG) (White *et al.*, 1990).

La mezcla de reacción para PCR estuvo compuesta por amortiguador 1X, 1.5 mM (milimolar) de MgCl₂, 1 U (unidad) de ADN polimerasa, 200 mM dNTP'S, 10 pm de iniciadores, 80 ng de muestra de DNA y agua desionizada esterilizada para ajustar un volumen final de 50 µL. La reacción se desarrolló en un termociclador Perkin Elmer (Mod. 2400, PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, USA) con el siguiente programa de amplificación: un ciclo de desnaturalización inicial (95 °C por 2 min); 30 ciclos de desnaturalización (95 °C por 1 min), alineación (50 °C por 30 s) y extensión (72 °C por 2 min); y una extensión final (72 °C por 10 min) (White *et al.*, 1990). La calidad de la amplificación de los fragmentos se

of the isolated fungi was carried out by means of their morphological structures and cultural characteristics using Barnett and Hunter keys (1998).

Also, fungi were identified by the PCR-ITS technique (the polymerase chain reaction-internal transcribed spacer), which gave greater reliability to identification due to the accuracy of the technique. In order to do this, the microorganisms DNA extraction was performed eight days after growth, according to the methods of Ahrens and Seemüller (1992) and Lee *et al.* (1993). The quality of the DNA was verified on a 1% agarose gel by electrophoresis. The gel was observed in a Bio Rad® transilluminator (Bio Rad Laboratories Inc., CA, USA). The internal ITS region (ITS1 and ITS2) of the ribosomal RNA genes 18S-5.8S-28S was amplified by PCR. The primers used were ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) and ITS5 (GGAAGTAAACTCGTAACAAGG) (White *et al.*, 1990).

The PCR reaction mixture consisted of 1X buffer, 1.5 mM (millimolar) MgCl₂, 1 U (unit) DNA polymerase, 200 mM dNTP'S, 10 pm of primers, 80 ng of DNA sample, and sterilized deionized water To set a final volume of 50 µL. The reaction was conducted in a Perkin Elmer thermocycler (Mod. 2400, PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, USA) with the following amplification program: an initial denaturation cycle (95 °C for 2 min); 30 denaturation cycles (95 °C for 1 min), alignment (50 °C for 30 s) and extension (72 °C for 2 min); and a final extension (72 °C for 10 minutes) (White *et al.*, 1990). The amplification quality of the fragments was visualized by electrophoresis on a 1% agarose gel in the Bio Rad® transilluminator (Bio Rad Laboratories Inc., CA, USA). Amplification was purified with the QIAquick PCR purification kit (QIAGEN® N.V, Venlo, The Netherlands). Genes were sequenced in two directions 5'-3' and 3'-5' with the ITS4 and ITS5 primers (White *et al.*, 1990). The sequencer used was an ABI PRISM 3700 (Macrogen Inc., Seoul, Republic of Korea). Finally, the sequences were analyzed in Lasergene 2001 software version 5 (DNASar® Inc, Madison, Wisconsin, USA). The alignment was performed in the GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information) database.

Pathogenicity tests

The tests consisted in inoculating the fungi identified at known concentrations on the harvested huitlacoche (10 galls) and on the cobs. Prior to inoculation, galls and cob were disinfested by

visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en el transiluminador Bio Rad® (Bio Rad Laboratories Inc., CA, USA). La amplificación se purificó con el QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN® N.V, Venlo, Netherlands). Los genes se secuenciaron en dos direcciones 5'-3' y 3'-5' con los iniciadores ITS4 e ITS5 (White *et al.* 1990). El secuenciador utilizado fue un ABI PRISM 3700 (Macrogen Inc., Seúl, Republica de Korea). Finalmente, las secuencias se analizaron en el software Lasergene 2001 versión 5 (DNASTar® Inc, Madison, Wisconsin, USA). La alineación se realizó en la base de datos del GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Pruebas de patogenicidad

Las pruebas consistieron en inocular los hongos identificados en concentraciones conocidas sobre el huitlacoche desgranado (10 agallas) y en las mazorcas. Previo a la inoculación, las agallas y la mazorca se desinfectaron sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio al 1.5% por 3 min. y posteriormente, se enjuagaron con agua destilada esterilizada. El inóculo se preparó a partir de los cultivos monoconidiales de cada uno de los hongos identificados en la fase anterior (*Fusarium oxysporum*, *Penicillium expansum* y *Rhizopus stolonifer*), con los cuales se prepararon soluciones madre. Posteriormente, la concentración de los conidios se ajustó a 8×10^6 conidios mL⁻¹ con ayuda de la cámara Neubauer (Marienfeld, Laboratory Glassware, Königshofen, Alemania).

La inoculación de los hongos se hizo por deposición con herida y por deposición sin herida. En la primera, se realizaron incisiones de 2 mm de profundidad sobre las agallas y mazorcas, y con una aguja esterilizada se depositó 0.1 mL del inóculo. La deposición sin herida se hizo de manera directa sobre la superficie del producto inoculando la misma cantidad. Las mazorcas y agallas se colocaron en cámaras húmedas a 3, 10 y 20°C, con humedad relativa del 95% durante ocho días. La cámara húmeda consistió en colocar el material en charolas de poliestireno expandido con una toalla de papel humedecida con agua destilada esterilizada dentro de una bolsa cerrada de polietileno. Se evaluaron las variables de incidencia y severidad de los hongos.

Análisis estadístico

Se empleó un diseño completamente al azar para el estudio de los cambios en la pérdida de peso, firmeza y color en el peridio del huitlacoche, así como el porcentaje de incidencia

immersing them in a solution of sodium hypochlorite at 1.5% for 3 min. And subsequently, rinsed with sterile distilled water. The inoculum was prepared from the monoconidial cultures of each fungi identified in the previous phase (*Fusarium oxysporum*, *Penicillium expansum* and *Rhizopus stolonifer*), with which stock solutions were prepared. Subsequently, the conidia concentration was adjusted to 8×10^6 conidia mL⁻¹ with the help of the Neubauer chamber (Marienfeld, Laboratory Glassware, Königshofen, Germany).

The fungi inoculation was made by wound deposition and by deposition without wounding. In the first, 2 mm deep incisions were made on the galls and cobs, and 0.1 mL of the inoculum was deposited with a sterilized needle. The woundless deposition was done directly on the surface of the product by inoculating them with the same amount. Cobs and galls were placed in humid chambers at 3, 10 and 20°C, at 95% relative humidity for eight days. The wet chamber consisted of placing the material in expanded polystyrene trays with a paper towel moistened with sterile distilled water inside a closed polyethylene bag. The variables of incidence and severity of the fungi were evaluated.

Statistic analysis

A completely randomized design was used to study the changes in weight loss, firmness and color in the peritoneum of huitlacoche, as well as the percentage incidence and severity of the fungi. A simple classification variance analysis was used in the variable weight loss and L* to determine differences between the manipulation degree and storage temperature. The results are shown in the respective graph as the mean of the observations with the respective standard error bar. A multivariate analysis of variance was applied to determine the effect of the factor (temperature, manipulation and inoculation method) on the percentage of incidence and severity of fungi on huitlacoche. The Tukey test ($p < 0.001$) was used to determine significant differences with Statistical Analysis System for Windows 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Results and discussion

Postharvest characterization

The storage temperature showed influence on weight loss in the galls and cob of huitlacoche. A higher rate of weight loss was observed in the galls compared to the whole

y severidad de los hongos. Se empleó un análisis de varianza de clasificación simple en la variable pérdida de peso y L^* para determinar diferencias entre los factores grado de manipulación y temperatura de almacenamiento. Los resultados se presentan en la gráfica respectiva como la media de las observaciones con la respectiva barra de error estándar. Se aplicó un análisis de varianza multifactorial para determinar el efecto del factor (temperatura, manipulación y método de inoculación) sobre el porcentaje de incidencia y severidad de los hongos sobre el huitlacoche. Se empleó la prueba de Tukey ($p \leq 0.001$) para determinar las diferencias significativas con el software estadístico Statistical Analysis System for Windows 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Resultados y discusión

Caracterización poscosecha

La temperatura de almacenamiento mostró influencia sobre la pérdida de peso en las agallas y mazorca del huitlacoche. En las agallas se observó una mayor velocidad de pérdida de peso en comparación con la mazorca entera (Figura 1). Técnicamente, en vegetales frescos, una pérdida de peso entre 5-10% es considerado no apto para la venta como producto fresco (Kays, 1991). A la temperatura del ambiente, tanto la agalla (ATA) como la mazorca (MTA) perdieron aproximadamente 8% de su peso después de uno y dos días de almacenamiento, respectivamente. A la temperatura de 10 °C se observaron valores de pérdida de peso similares que en el tratamiento anterior en periodos de tiempo similares. A la temperatura de 3 °C, tanto en agalla como en mazorca, la pérdida se mantuvo por debajo de 10% hasta por 4 días de almacenamiento.

En los días de almacenamiento subsecuentes, la tendencia continuó en un orden ascendente como sigue: 20 °C > 10 °C > 3 °C y agalla (A) > mazorca (M) (Figura 1). Este comportamiento refleja que, además de los factores ambientales, el grado de manipulación del producto en el desprendimiento de la agalla y área superficial que queda expuesto al ambiente son un factor importante en la velocidad de deshidratación y que conducen a la senescencia del producto (Whitelock *et al.*, 1999; Martínez-Flores *et al.* 2008). El almacenamiento del huitlacoche a 3 °C fue la mejor condición para mantener a un ritmo bajo la velocidad de deshidratación y mantener la calidad visual del producto un periodo de tiempo mayor.

cob (Figure 1). Technically, in fresh vegetables, a 5-10% weight loss is considered unfit for sale as a fresh product (Kays, 1991). At ambient temperature, both the gall (ATA) and the cob (MTA) lost approximately 8% of their weight after one and two days of storage, respectively. Similar weight loss values were observed at 10 °C compared to the previous treatment at similar time periods. At 3 °C, both in gall and cob, the loss was kept below 10% for up to 4 days of storage.

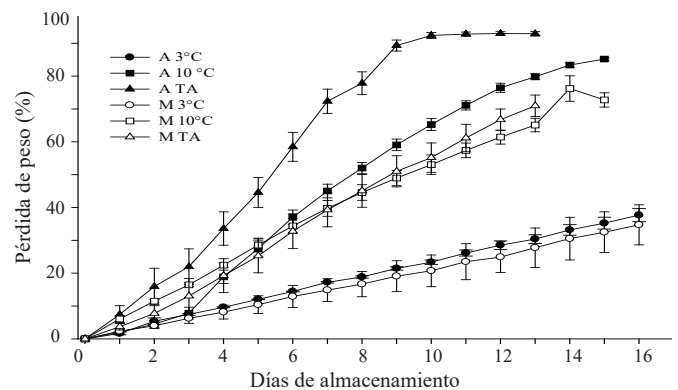


Figura 1. Pérdidas de peso en agallas (A) y mazorcas (M) de huitlacoche almacenadas a diferentes temperaturas.
Figure 1. Weight losses in galls (A) and cobs (M) of huitlacoche stored at different temperatures.

On subsequent storage days, the trend continued in ascending order as follows: 20 °C > 10 °C > 3 °C and gall (A) > cob (M) (Figure 1). This behavior reflects that in addition to the environmental factors, the manipulation of the product in the shredded gall and surface area that is exposed to the environment are important factors in the dehydration rate and that lead to the product senescence (Whitelock *et al.*, 1999; Martínez-Flores *et al.*, 2008). The storage of huitlacoche at 3 °C was the best condition to keep the dehydration rate at a low rate and maintain the visual quality of the product for a longer period of time.

On the other hand, the firmness of the galls and the cobs was reduced during the post-harvest storage time. Treatments stored at room temperature showed a greater reduction in peridium compression force, which indicates that the loss of firmness was greater compared to the refrigerated material. Treatments stored at 3 and 10 °C did not show significant differences ($p \leq 0.05$).

The changes of color and flavor in the huitlacoche, during the period of storage, constitute a parameter of quality measurement (Tracy *et al.*, 2007). In this sense, Martínez-

Por otra parte, la firmeza de las agallas y las mazorcas se redujo durante el tiempo de almacenamiento postcosecha. Los tratamientos almacenados a temperatura ambiente mostraron mayor reducción en la fuerza de compresión del peridio, lo cual indica que la pérdida de firmeza fue mayor en comparación con el material refrigerado. Los tratamientos almacenados a 3 y 10 °C no mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Los cambios de color y sabor en el huitlacoche, durante el periodo de almacenamiento, constituyen un parámetro de medida de la calidad (Tracy *et al.*, 2007). En este sentido, Martínez-Flores *et al.* (2008) concluyeron que los cambios más significativos en el color fue la brillantez (L^*) de la superficie del peridio del huitlacoche. En la Figura 2 que observa una disminución en la luminosidad durante los días de almacenamiento, encontrando diferencia significativa ($p \leq 0.05$), entre las temperaturas de almacenamiento, a partir del día seis cuya disminución fue de acuerdo con la siguiente relación 20 °C > 10 °C > 3 °C.

El peridio del huitlacoche mostró un aspecto rugoso después de tres días de almacenamiento a temperatura ambiente, lo cual coincide con la manifestación de una alta pérdida de humedad (>10%) en el producto. Después de cuatro días hubo ruptura del peridio y como consecuencia liberación de teleosporas, aunque no hubo manifestación de olor desagradable que fuera indicio de pudrición (Figura 3). Esta apariencia visual es indicador de rápida senescencia en el producto, tal como fueron reportados por Martínez-Flores *et al.* (2008).

Apariencia visual

El almacenamiento a 10 °C mostró un comportamiento similar que el tratamiento anterior; en tanto que, a 3 °C el peridio de las agallas desgranadas mostraron una apariencia visual aceptable por un mayor tiempo de almacenamiento (superior a 12 días) que la mazorca entera (Figura 3).

La prolongación en el tiempo de almacenamiento de la agalla desgranada a bajas temperaturas, a pesar del grado de manipulación que experimenta y mayor área superficial expuesta, indica la idea que la poca compactación de agallas de la mazorca entera deja espacios que funcionan como reservorio de humedad y microorganismos fitopatógenos que se encargan de iniciar los procesos de descomposición.

Flores *et al.* (2008) concluded that the most significant changes in color were the brightness (L^*) of the peridium surface. Figure 2 shows a decrease in luminosity during storage days, with a significant difference ($p \leq 0.05$) between storage temperatures, from day six whose decrease was in accordance with the following relation 20 °C > 10 °C > 3 °C.

The peritoneum of huitlacoche showed a rough appearance after three days of storage at room temperature, which coincides with the manifestation of a high moisture loss (> 10%) in the product. After four days the peridium presented a rupture and as a consequence teleosporas were released, although there was no manifestation of unpleasant odor that was indicative of rot (Figure 3). This visual appearance is indicative of rapid senescence in the product, as reported by Martínez-Flores *et al.* (2008).

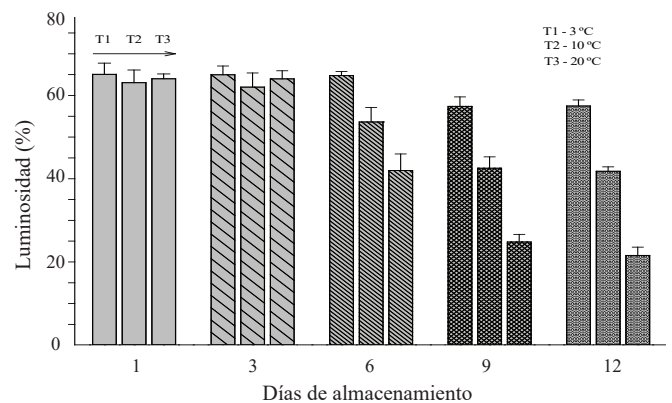


Figura 2. Promedio del porcentaje de luminosidad (L^*) de agallas y mazorca, almacenadas a diferentes temperaturas.

Figure 2. Average percentage of galls and cob brightness (L^*) stored at different temperatures.

Visual appearance

10 °C storage showed a similar behavior as the previous treatment; while at 3 °C, the peridium of the galls showed an acceptable visual appearance for a longer storage time (greater than 12 days) than the whole cob (Figure 3).

The prolongation of shelf life at low temperatures, despite the manipulation and greater exposed surface area, suggests that the low compaction of galls of the whole cob leaves spaces that function as reservoir of moisture and phytopathogenic microorganisms that are responsible for initiating decomposition processes.

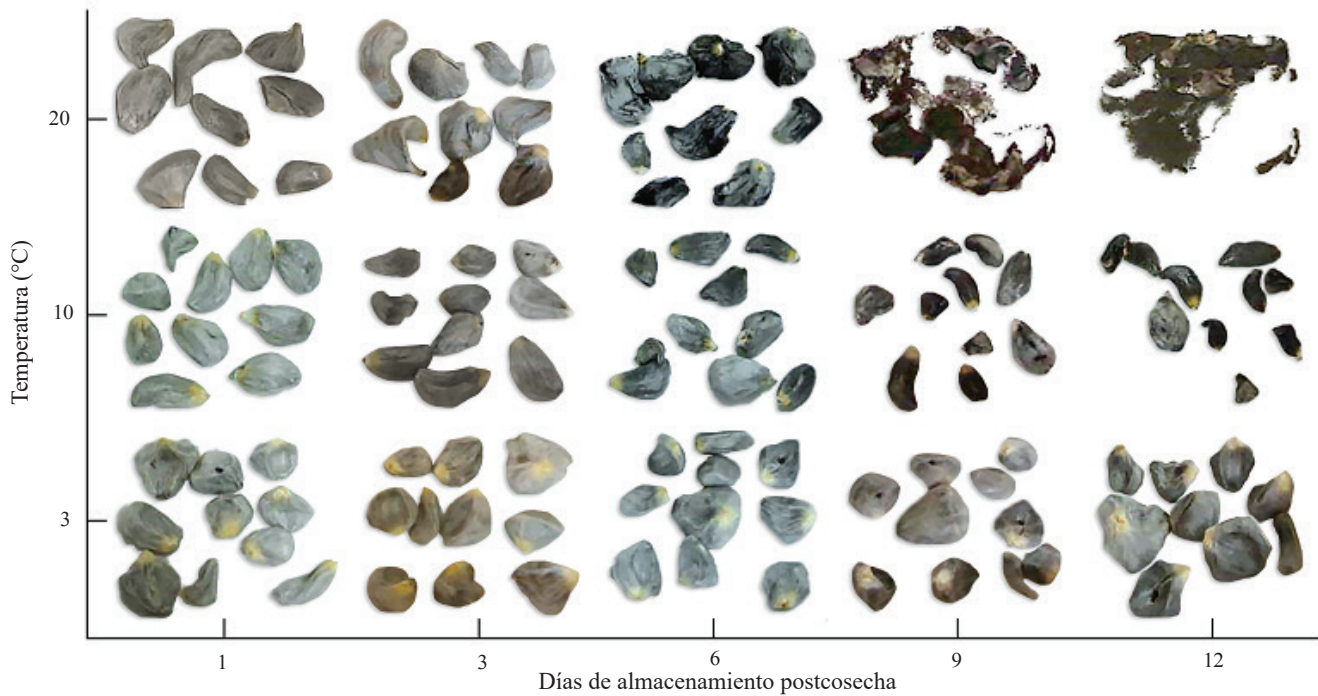


Figura 3. Efecto de la temperatura en la apariencia visual de agallas desgranadas de huitlacoche durante el periodo de almacenamiento.

Figure 3. Effect of temperature on the visual appearance of huitlacoche galls during the storage period.

Cuadro 1. Caracterización molecular por PCR-ITS de genes ribosomales rRNA de tres hongos aislados causantes de pudriciones en agallas de huitlacoche.

Table 1. Molecular characterization by PCR-ITS of ribosomal rRNA genes of three isolated fungi causing rot in huitlacoche galls.

Identificación morfológica	Número de nucleótidos	Comparación de secuencia en NCBI (alineamiento)	Similaridad (%)	Número NCBI
<i>Fusarium</i>	567	<i>Fusarium oxysporum</i>	97	EU839403
<i>Penicillium</i>	1 680	<i>Penicillium expansum</i>	98	EU590663
<i>Rhizopus</i>	876	<i>Rhizopus stolonifer</i>	99	FN401528

Diagnóstico e identificación de hongos patógenos

Las agallas se mantuvieron en cámaras húmedas a 3, 10 y 20 ± 2 °C para inducir el crecimiento de microorganismos. Tres días después del establecimiento del experimento se observó crecimiento de *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. y *Rhizopus* sp., los cuales fueron identificados por sus características culturales y morfológicas con la ayuda de las claves de Barnett y Hunter (1998) y posteriormente corroborados mediante la técnica de PCR-ITS. En el Cuadro 1 se presenta la caracterización molecular de los hongos identificados,

Diagnosis and identification of pathogenic fungi

Galls were kept in moist chambers at 3, 10 and 20 ± 2 °C to induce the growth of microorganisms. Three days after the establishment of the experiment, growth of *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. and *Rhizopus* sp., were identified by their cultural and morphological characteristics with the help of the Barnett and Hunter (1998) keys and later corroborated by the PCR-ITS technique. Table 1 shows the molecular characterization of the identified fungi, the genus morphologically classified as *Fusarium* sp. corresponds to *F.*

el género clasificado morfológicamente como *Fusarium* sp. corresponde a *F. oxysporum* con una similitud de 97%, el género *Penicillium* sp. a *P. expansum* con una similitud de 98% y el género *Rhizopus* sp. a *R. stolonifer* con 97% de similitud (%) por sus rasgos moleculares.

Pruebas de patogenicidad

Las especies de hongos, identificados previamente, *F. oxysporum*, *P. expansum* y *R. stolonifer* fueron inoculados en las agallas y mazorcas de huitlacoche, mediante las técnicas de punción y deposición, en tres temperaturas de almacenamiento. Se observó que los hongos no se desarrollaron en temperaturas de refrigeración (3 y 10 °C), excepto *Rhizopus* que a 10 °C tuvo una incidencia de 46% (Cuadro 2). El resultado indica que el riesgo de incidencia de hongos fitopatógenos en huitlacoche es menor en ambientes por debajo de los 10 °C y alta humedad relativa. Esta condición de alta humedad en el ambiente de refrigeración resultaría benéfico pues contrarrestaría su acelerada velocidad de deshidratación (Whitelock *et al.*, 1999).

oxysporum with a similarity of 97%, the genus *Penicillium* sp. to *P. expansum* with a similarity of 98% and the genus *Rhizopus* sp. to *R. stolonifer* with 97% similarity (%) due to its molecular features.

Pathogenicity tests

Fungus species previously identified as *F. oxysporum*, *P. expansum* and *R. stolonifer* were inoculated in the galls and cobs of huitlacoche, using puncture and deposition techniques, in the three storage temperatures. It was observed that fungi did not develop at refrigeration temperatures (3 and 10 °C), except *Rhizopus* that at 10 °C had an incidence of 46% (Table 2). The result indicates that the risk of phytopathogenic fungi in huitlacoche is lower in environments below 10 °C and high relative humidity. This condition of high humidity in the refrigeration environment would be beneficial for huitlacoche, as it would counteract its accelerated rate of dehydration (Whitelock *et al.*, 1999).

Cuadro 2. Porcentaje de incidencia de *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer* y *Penicillium expansum* inoculados por herida (punción) y sin herida (deposición) en agallas desgranadas y en mazorcas de huitlacoche almacenadas a tres temperaturas en poscosecha.

Table 2. Percentage of incidence of *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer* and *Penicillium expansum* inoculated by wound (puncture) and without wound (deposition) on shredded galls and on huitlacoche cobs stored at three post-harvest temperatures.

Factor	Hongo fitopatógeno		
	<i>Fusarium oxysporum</i> (%)	<i>Rhizopus stolonifer</i> (%)	<i>Penicillium expansum</i> (%)
Temperatura			
3 °C	-	-	-
10 °C	-	46 a	-
20 °C	76.7 a	36.7 a	54 a
DMSH	13.9	20.7	15.3
Manipulación			
Agalla	90 a	46 a	78.3 a
Mazorca	63.3 b	38.5 b	17.5 b
DMSH	19.7	20.7	22
Inoculación			
Punción	90 a	45 a	68 a
Deposición	63.3 b	36 a	40 b
DMSH	19.7	20.7	21.6
R ²		0.7047	

= no se presentaron síntomas del hongo en el periodo de evaluación; DMSH= Diferencia mínima significativa honesta. Letras diferentes dentro de la misma columna corresponde a un factor indica que la media difiere significativamente ($p \leq 0.001$).

A la temperatura del ambiente, las tres especies inoculadas desarrollaron favorablemente con porcentaje de incidencia decreciente como sigue: *R. stolonifer* < *P. expansum* < *F.*

At ambient temperature, the three inoculated species developed favorably with decreasing percentage incidence as follows: *R. stolonifer* < *P. expansum* < *F. oxysporum*.

oxysporum. No hubo diferencia significativa en el porcentaje de incidencia de *R. stolonifer* a 10 °C y 20 °C. El grado de manipulación mostró que la incidencia de las tres especies de hongo fue alta ($p \leq 0.05$) en la agalla que en mazorca, siendo de mayor incidencia la especie *F. oxysporum* (90%), seguido de *P. expansum* (78.3%) (Cuadro 2). Asimismo, el efecto del método de inoculación por punción fue mayor ($p \leq 0.05$) que el método de deposición, excepto en *R. stolonifer*. Thompson *et al.* (2013) reportaron que la pudrición en la mazorca de maíz se atribuye en gran medida a los hongos de la especie *F. oxysporum*, lo cual explica el alto porcentaje de incidencia de esta especie, sobre el hospedero de *Ustilago maydis*, en los tres factores estudiados. La especie *F. oxysporum* sobrevive en condiciones severas en el suelo, que lo convierte en un agente patógeno muy agresivo al momento de infestar a las plantas hospederas (Momma *et al.*, 2010), aunque la invasión puede completarse en cualquier etapa poscosecha con la consecuente producción de toxinas (Logrieco *et al.* 2002; Agrios, 2005).

En otras especies de vegetales se ha observado que la patogenicidad de *Penicillium* y *Fusarium* no es tan severa cuando la inoculación se realiza sin herida (Hernández *et al.*, 2006), lo cual resalta la importancia del grado de manipulación del huitlacoche, ya que en la agalla se presentó el porcentaje más alto de incidencia.

El porcentaje de severidad de *P. expansum* < *R. stolonifer* < *F. oxysporum* a la temperatura del ambiente (Cuadro 3). En las temperaturas de refrigeración no hubo efecto del hongo, excepto *R. stolonifer* con 8.3% de severidad a 10 °C. La manipulación del huitlacoche influyó en la severidad de la invasión de los hongos fitopatógenos, siendo que en la especie *F. oxysporum* hubo diferencia significativa ($p \leq 0.001$) con respecto a la mazorca entera. Esto sugiere que el esfuerzo aplicado sobre la agalla durante su desprendimiento manual del olote de maíz ocasiona daños en la superficie del peridio que favorecen la entrada del patógeno (Pérez-López *et al.*, 2012).

La severidad fue significativamente mayor ($p \leq 0.001$) en el método de inoculación por punción, en las especies *F. oxysporum* y *P. expansum*, que en inoculación por deposición. Los resultados indican que la incidencia y severidad en la invasión de las especies de hongos fitopatógenos incrementa conforme el grado de daño en el peridio es mayor, tal es que las especies *P. expansum* y *R. stolonifer*, que son considerados patógenos de herida, incrementan su nivel de severidad (Agrios, 2005).

There was no significant difference in the percentage incidence of *R. stolonifer* at 10 °C and 20 °C. The manipulation degree showed that the incidence of the three fungus species was higher ($p \leq 0.05$) in the galls than in the cob, with the highest incidence being *F. oxysporum* species (90%), followed by *P. expansum* (78.3 %) (Table 2). Likewise, the effect of the puncture inoculation method was higher ($p \leq 0.05$) than the deposition method, except in *R. stolonifer*. Thompson *et al.* (2013) reported that corn cob rot (*Zea mays* L.) is largely attributed to fungi of the species *F. oxysporum*, which explains the high incidence rate of this species, on the host of *Ustilago Maydis*, in the three factors studied. The species *F. oxysporum* survives in the soil under severe conditions, which makes it a very aggressive pathogen when infesting host plants (Momma *et al.*, 2010), although the invasion can be completed at any post-harvest stage with the consequent production of toxins (Logrieco *et al.*, 2002; Agrios, 2005).

In other plant species it has been observed that the pathogenicity of *Penicillium* and *Fusarium* is not as severe when inoculation is performed without injury (Hernández *et al.*, 2006), which highlights the importance of the manipulation degree of huitlacoche, since the galls presented the highest incidence percentage.

The percentage severity of *P. expansum* < *R. stolonifer* < *F. oxysporum* at room temperature (Table 3). At cooling temperatures there was no effect of the fungus except *R. stolonifer* with 8.3% severity at 10 °C. The manipulation of huitlacoche influenced the severity of the phytopathogenic fungi invasion, being that in the *F. oxysporum* species there was significant difference ($p \leq 0.001$) with respect to the whole cob. This suggests that the stress applied to the galls during its manual shred from the corn cob causes damage to the peridium surface that favors the pathogen entrance (Pérez-López *et al.*, 2012).

The severity was significantly higher ($p < 0.001$) in the puncture inoculation method in the species *F. oxysporum* and *P. expansum* than in inoculation by deposition. The results indicate that the incidence and severity of the phytopathogenic fungi invasion increases as much as the damage shown by the peridium, such that the species *P. expansum* and *R. stolonifer*, which are considered as wound pathogens, increase their severity level (Agrios, 2005).

Cuadro 3. Severidad de invasión de *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer* y *Penicillium expansum*, inoculados por herida (punción) y sin herida (deposición) en agallas desgranadas y en mazorca de huitlacoche almacenadas a tres temperaturas en poscosecha.

Table 3. Severity of *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer* and *Penicillium expansum* invasion inoculated by wound (puncture) and without wound (deposition) on shredded galls and on cob of huitlacoche stored at three postharvest temperatures.

Factor	Hongo fitopatógeno		
	<i>Fusarium oxysporum</i> (%)	<i>Rhizopus stolonifer</i> (%)	<i>Penicillium expansum</i> (%)
Temperatura			
3 °C	-	-	-
10 °C	-	8.375 b	-
Ambiente	64.12 a	26.8 a	25.1 a
DMSH	11.43	15.96	12.52
Manipulación			
Agalla	76.67 a	19.71 a	31.67 a
Mazorca	51.67 b	10.5 a	15.25 a
DMSH	16.16	15.57	18.07
Inoculación			
Punción	76.67 a	18.14 a	40 a
Deposición	51.67 b	12.33 a	10.2 b
DMSH	16.16	15.57	17.7
R ²		0.7849	

-= no se presentaron síntomas del hongo en el periodo de evaluación; DMSH= diferencia mínima significativa honesta. Letras diferentes dentro de la misma columna correspondientes a un factor indica que la media difiere significativamente ($p \leq 0.001$).

La presencia de patógenos en productos frescos para consumo es indeseable. En la actualidad, existen alternativas de control en poscosecha como el control biológico que ayudan a reducir la incidencia y severidad de los patógenos. Guevara-Vázquez *et al.* (2009) aislaron e identificaron, mediante técnicas moleculares, levaduras asociadas al huitlacoche que pertenecen a las especies *Candida railenensis*, *C. quercitrusa* y *Pichia guilliermondii*. Estas especies han mostrado efecto antagónico contra algunos patógenos, especialmente *P. guilliermondii* que se ha evaluado contra especies de *Rhizopus* (Zhang *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2010), *Fusarium* (Laitila *et al.*, 2007) y *P. expansum* (Pacheco *et al.*, 2008). La evaluación de las levaduras asociadas al huitlacoche para el control de los patógenos encontrados podría representar una oportunidad para el control efectivo de los mismos.

Conclusiones

Los factores desgranado del huitlacoche y la temperatura de almacenamiento ≥ 10 °C afectan significativamente la pérdida de peso del huitlacoche, mientras que la temperatura de 3 °C ayuda a mantener baja la tasa de

The presence of pathogens in fresh products for consumption is undesirable. Nowadays, there are post-harvest control alternatives such as biological control that help reduce the incidence and severity of pathogens. Guevara-Vázquez *et al.* (2009) isolated and identified, by molecular techniques, yeast associated with huitlacoche belonging to the species *Candida railenensis*, *C. quercitrusa* and *Pichia guilliermondii*. These species have shown an antagonistic effect against some pathogens, especially *P. guilliermondii* which has been evaluated against *Rhizopus* species (Zhang *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2010), *Fusarium* (Laitila *et al.*, 2007) and *P. Expansum* (Pacheco *et al.*, 2008). The evaluation of the yeast associated with huitlacoche for the control of the pathogens found could represent an opportunity for its effective control.

Conclusions

The huitlacoche shred factors and storage temperature ≥ 10 °C significantly affect huitlacoche weight loss, while the 3 °C temperature helps to keep the dehydration rate low ($< 10\%$) and is favorable for maintaining quality visual appearance of the product over a longer period of time.

deshidratación (<10%) y es favorable para mantener la calidad visual del producto en un periodo de tiempo mayor. Las técnicas de identificación empleadas revelaron, con una similitud de 98, 97 y 97% respectivamente, que las especies *P. expansum*, *R. stolonifer* y *F. oxysporum* son los patógenos que se hospedan en la superficie del hongo de huitlacoche en poscosecha. Las pruebas de patogenicidad confirmaron la severidad del daño, de dichas especies, en la calidad y vida de anaquel del huitlacoche. El hongo *F. oxysporum* fue el que mostró mayor porcentaje de incidencia y severidad en agalla almacenada a temperatura normal del aire del ambiente. La especie *R. stolonifer* mostró una alta incidencia en ambientes de refrigeración ≥ 10 °C, lo cual sugiere que los ambientes más idóneos para el almacenamiento del huitlacoche son los cercanos a 3 °C con un alto porcentaje de humedad relativa (95%). Con ello se obtiene una velocidad de deshidratación menor en el huitlacoche, además de ofrecer condiciones que disminuyen los riesgos de desarrollo de hongos fitopatógenos en la superficie.

Agradecimientos

Los autores agradecemos el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT); a través, del proyecto SEP-2004-C01-47725 y a la Universidad Autónoma Chapingo (UACH). También se valora la ayuda de L. D. G. Carlos de la Cruz Ramírez con la preparación de las imágenes.

Literatura citada

- Agrios, G. N. 2005. Fitopatología. 5th. (Ed.). México: Ed. Limusa.
- Ahrens, U. and Seemüller, E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*. 82:828-832.
- Aydogdu, M. 2015. Huitlacoche yield in some maize varieties in the mediterranean region of Turkey. *Food Sci. Technol*. 35(2):386-390.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi 4th. (Ed.) Minnesota: APS Press.
- Guevara, V. E.; Valadez, M. E.; Acosta, R. E.; Espinosa, S. T. y Villanueva, V. C. 2009. Identificación de levaduras asociadas al huitlacoche. *Rev. Chapingo Ser. Hortic*. 15:225-230.
- Hernández, A. A. Ma.; Juárez, L. G.; Fucikovsky, Z. L.; Zavaleta, M. E. y González, H. V. A. 2006. Impacto del almacenamiento en la brotación de bulbos de ajo y especies patógenas de *Penicillium* y *Erwinia* asociadas. *Rev. Fitotec. Mex*. 29(4):283-290.

The identification techniques employed revealed, with a similarity of 98, 97 and 97% respectively, that *P. expansum*, *R. stolonifer* and *F. oxysporum* are the pathogens that are hosted on the surface of the post-harvest huitlacoche fungus. Pathogenicity tests confirmed the severity of the damage of these species on the quality and shelf life of huitlacoche. The fungus *F. oxysporum* showed the highest percentage of incidence and severity in galls stored at normal ambient air temperature. The *R. stolonifer* species showed a high incidence in refrigeration environments ≥ 10 °C, which suggests that the most suitable environments for the storage of huitlacoche are those close to 3 °C with a high percentage of relative humidity (95%). This results in a lower rate of dehydration in the huitlacoche, in addition to providing conditions that reduce the risks of development of phytopathogenic fungi on the surface.

End of the English version



- Kays, S. J. 1991. Postharvest physiology of perishable plant products 1th. (Ed.). New York: Van Nostrand Reinhold.
- Laitila, A.; Sarlin, T.; Kotaviita, E.; Huttunen, T.; Home, S. and Wilhelmson, A. 2007. Yeasts isolated from industrial maltings can suppress *Fusarium* growth and formation of gushing factors. *J. Industrial Microbiol. Biotechnol*. 34:701-713.
- Lasergene. 2001. Expert Sequence Analysis Software. Version 5. DNASTAR, Inc. Madison, Wisconsin, USA.
- Lee, I. M.; Hammond, R. R.; Davis, E. and Gundersen, D. E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*. 83:834-842.
- Logrieco, A.; Mulé, G.; Moretti, A. and Bottalico, A. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *Eur. J. Plant Pathol*. 108:597-609.
- Madrigal, R. J.; Villanueva, V. C.; Sahagún, C. J.; Acosta, R. M.; Martínez, M. L. y Espinosa, S. T. 2010. Ensayos de producción de huitlacoche (*Ustilago maydis* Cda.) hidropónico en invernadero. [Production test of greenhouse hydroponic huitlacoche (*Ustilago maydis* Cda.)]. *Rev. Chapingo Ser. Hortic*. 16(3):177-182.
- Martínez, F. A.; Corrales, G. J. J.; Espinosa, S. T.; García, G. P. G. y Villanueva, V. C. 2008. Cambios poscosecha del hongo comestible huitlacoche (*Ustilago maydis* (DC) Corda). *Rev. Chapingo Ser. Hortic*. 14(3):339-346.
- Monroy, G. T.; Valle, G. S.; Espinosa, S. T.; Martínez, D. M. T. and Pérez, L. A. 2012. Effect of microperforation and temperature on quality of modified atmosphere packaged huitlacoche (*Ustilago maydis*). *CyTA. J. Food*. 11(4):309-317.
- Momma, N.; Momma, M. and Kobara, Y. 2010. Biological soil disinfection using ethanol: effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and soil microorganisms. *J. Gen. Plant Pathol*. 76(5):336-344.

- Pacheco, N.; Larralde, C. C. P.; Sepulveda, J.; Trombotto, S.; Domard, A. and Shirai, K. 2008. Evaluation of chitosans and *Pichia guilliermondii* as growth inhibitors of *Penicillium digitatum*. *Int. J. Biol. Macromol.* 43:20-26; 76(5):336-344.
- Pérez, L. A., Villaseñor, P. C. A., Espinosa, S. T., Ortega, H. C. y Reyes, V. M. 2012. Caracterización física, geométrica y mecánica de huitlacoche (*Ustilago maydis* (D.C.) Corda). *Ing. Agrí Bio.* 4(1):41-45.
- Reyes, F. G. R.; Varseveld, G. W. and Kuhn, M. C. 1982. Sugar composition and flavor quality of high sugar (Shrunken) and normal sweet corn. *J. Food Sci.* 47(3):753-755.
- Rodríguez, M. M. L. 2010. Manual de identificación de bacterias fitopatógenas. México: UACH.
- Salmerón, S. K. G.; Pardo, J. P. Flores, O. H. G.; Mendoza, H. M.; Miranda, A. and Guerra, S. 2011. Response to osmotic stress and temperature of the fungus *Ustilago maydis*. *Arch. Microbiol.* 193:701-709.
- SAS Institute Inc. 2008. SAS/STAT® 9.2 Software. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Thompson, R. S.; Avelinga, T. A. S. and Blanco, P. R. 2013. New semi-selective medium for *Fusarium graminearum*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* and *F. verticillioides* in maize seed. *South Afr. J. Bot.* 84:94-101.
- Torija, E.; Díez, C.; Matallana, C.; Camara, M.; Camacho, E. and Mazarío, P. 1998. Influence of freezing process on free sugars content of papaya and banana fruits. *J. Sci. Food Agric.* 76(3):315-319.
- Tracy, W. F.; Vargas, C.; Zepeda, L.; Pataky, J. K. and Chandler, M. A. 2007. Production and marketing of huitlacoche. Issues in new uses. Alexandria, VA: ASHS Press.
- Valdéz, M. M.; Barry, K.; Fahey, J. G. C.; Domínguez, J.; González, M. E.; Valverde, M. E. and Paredes, L. O. 2010. Effect of maize genotype, developmental stage, and cooking process on the nutraceutical potential of huitlacoche (*Ustilago maydis*). *Food Chem.* 119:689-697.
- Valverde, M. E.; Paredes, L. O.; Pataky, J. K. and Guevara, L. F. 1995. Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a food source - biology, composition, and production. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.* 35(3):191-229.
- Valverde, M. E.; Hernandez, P. T. and Paredes, L. O. 2012. Huitlacoche - a 21st century culinary delight originated in the aztec times. *In: Tunick, M. H. and De Mejia, E. G. (Eds.). Hispanic Foods: chemistry and bioactive compounds.* Washington: Amer Chemical Soc. 1109:83-100.
- White, T. J.; Bruns, S.; Lee, T. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: Innis, M. (Ed). PCR Protocols: a guide to methods and applications.* San Diego, CA: Academic Press.
- Whitelock, D. P.; Brusewits, G. H. and Ghajar, A. J. 1999. Thermal/physical properties affect predicted weight loss of fresh peaches. *Trans. ASAE.* 42(4):1047-1053.
- Zhang, H.; Zheng, X.; Wang, L.; Li, S. and Liu, R. 2007. Effect of yeast antagonist in combination with hot water dips on postharvest *Rhizopus* rot of strawberries. *J. Food Eng.* 78:281-287.
- Zhao, Y.; Tu, K.; Tu, S.; Liu, M.; Su, J. and Hou, Y. 2010. A combination of heat treatment and *Pichia guilliermondii* prevents cherry tomato spoilage by fungi. *Int. J. Food Microbiol.* 137:106-110.