



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS TABASCO**

**PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL  
TRÓPICO**

**ETIOLOGÍA DE LA MANCHA ACUOSA DE LA JAMAICA  
(*Hibiscus sabdariffa* L.) EN TABASCO, MÉXICO**

**ELIZABETH CORREA SANCHEZ  
T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL  
GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**H. CÁRDENAS, TABASCO.**

**2011**

La presente tesis, titulada: **Etiología de la Mancha Acuosa de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Tabasco, México**, realizada por la alumna: Elizabeth Correa Sánchez, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO:

  
Dr. CARLOS FREDY ORTÍZ GARCÍA

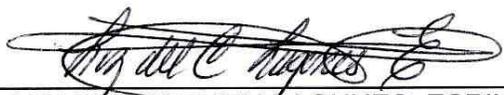
ASESOR:

  
Dr. SAÚL SÁNCHEZ SOTO

ASESOR:

  
Dr. JOSE HILARIO HERNÁNDEZ SALGADO

ASESOR:

  
Dra. LUZ DEL CARMEN LAGUNES ESPINOZA

ASESOR:

  
Dra. MARÍA DEL CARMEN RIVERA CRUZ

H. Cárdenas, Tabasco, 24 de Junio de 2011

# ETIOLOGIA DE LA MANCHA ACUOSA DE LA JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) EN TABASCO, MÉXICO

Elizabeth Correa Sánchez, Mc.

Colegio de Postgraduados, 2011

## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue identificar el agente causal de la “mancha acuosa” en jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) y describir los síntomas externos de la enfermedad. Dos lotes de observación fueron conducidos de Julio a Noviembre de 2009, cada uno con 225 plantas de jamaica. Se colectaron muestras de hojas en 39 plantas por cada uno de los lotes establecidos. Para identificar el patógeno, los procesos de aislamientos se llevaron a cabo a partir de hojas enfermas en cajas de petri con papa-dextrosa-agar (PDA) como medio de cultivo. La patogenicidad se demostró mediante los postulados de Koch. La caracterización morfológica reveló la presencia de picnidios de forma globosa a subglobosa de 250  $\mu\text{m}$  de largo x 233.1  $\mu\text{m}$  de ancho, lisos, inicialmente hialinos tornándose café oscuro, en su interior contenían una masa oscura de conidios centrales. Los conidióforos eran densos, delgados, simples o ramificados, los conidios inmaduros son hialinos llegando a ser marrón claro, inequilaterales, lisos, elipsoidales, rectos a ligeramente curvados, de 10-16.2  $\mu\text{m}$  x 5-7  $\mu\text{m}$  y que corresponde al género *Phoma* sp (Barnett y Hunter, 1998). Por otra parte, la identificación molecular de las cepas aisladas se basó en la amplificación del gen en las regiones ITS DNAr. Las cepas fueron cultivadas en medio líquido YEPD. Se extrajo el ADN cromosómico y se amplificó el gen en las regiones ITS DNAr por PCR empleando los indicadores ITS1-ITS4. Las secuencias del ADN obtenidos fueron analizados por el software Chroma Versión 2.31 (Technelysium Pty Ltd) y alineado con secuencias depositadas en la base de datos de la NCBI (National Center for Biotechnology Information). La amplificación y secuenciación del gen permitió la identificación del hongo aislado como: *Pilidiella diplodiella* (sinónimo: *Phoma diplodiella*). En México este patógeno sólo se ha asociado al cultivo de: *Vitis vinífera* y *Citrus aurantifolia* por lo que este es el primer reporte de *P. diplodiella* causando “mancha acuosa” en el cultivo de jamaica.

**Palabras claves:** mancha acuosa, jamaica, caracterización molecular y morfológica.

**ETIOLOGY OF THE WATERY SPOT OF ROSELLE (*Hibiscus sabdariffa* L.) IN  
TABASCO, MÉXICO**

**Elizabeth Correa Sánchez, Mc.**

**Colegio de Postgraduados, 2011**

**ABSTRACT**

The aim of this study was to identify the causal agent of "water spot" in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) and describe the external symptoms of the disease. Two lots of observation were conducted from July to November 2009, each one with 225 plants of roselle. Leaf samples of 39 plants were collected from each of the established lots. To identify the pathogen, isolation processes were carried out with diseased leaves in Petri dishes using potato-dextrose-agar (PDA) as means of cultivation. The pathogenicity was proved by Koch's postulates. The morphological characterization revealed the presence of *pycnidia* globose to subglobose of 250 microns long for 233.1 microns broad of, smooth, initially hyaline, becoming dark brown, its interior contained a central dark mass of conidia. The conidiophores were dense, slim, and simple or branched. Immature conidias are hyaline and they can be light brown, inequilaterals, smooth, and ellipsoid, straight to slightly curved, 10-16.2 x 5-7 microns long, these characteristics correspond to the genus *Phoma* sp (Barnett and Hunter, 1998). Furthermore, the molecular identification of isolated strains was based on gene amplification in DNAr ITS regions. The strains were grown in YEPD liquid medium. Chromosomal DNA was extracted and the gene in the DNAr ITS regions was amplified by PCR using ITS1-ITS4 indicators. DNA sequences were analyzed by the Chroma software version 2.31 (Technelysium Pty Ltd) and aligned with sequences deposited in the database of the NCBI (National Center for Biotechnology Information). The amplification and gene sequencing allowed the identification of the isolated fungus as *Pilidiella diplodiella* (syn. *Phoma diplodiella*). In Mexico, this pathogen has only been associated with the cultivation of: *Vitis vinifera*, *Citrus aurantifolia*. Therefore this is the first report on *P. diplodiella* causing "water spot" in the cultivation of roselle.

**Keywords:** "water stain", roselle, molecular and morphological characterization.

### *Dedicada*

*Al que ofreció su vida en propiciación por nuestros pecados por ser mi salvador,  
por enseñarme cada día la verdadera razón de la existencia y hacer de aquel  
atardecer de mi vida una hermosa mañana.  
Hoy solo le digo gracias Dios por estar a mi lado.*

## AGRADECIMIENTOS

Al pueblo de México, quienes a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) me brindaron parte del apoyo financiero para la realización mis estudios.

Al **Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco**, por haber hecho posible mi formación profesional.

A mi consejero de tesis **Dr. Carlos Fredy Ortiz García**, por confiar en mí y en este proyecto, por su paciencia, por su amistad, por haberme permitido trabajar con usted y compartir su tiempo, conocimientos y experiencias para la realización de la presente investigación, Dios le bendiga, por ser como es.

A mi Consejo particular: **Dr. Saúl Sánchez Soto, Dr. José Hilario Hernández Salgado, Dra. Luz Del Carmen Lagunes Espinoza y Dra. María Del Carmen Rivera Cruz** por sus acertadas observaciones y apoyo incondicional durante la realización de este trabajo.

A la **Dra. Consuelo del Carmen Bautista Muñoz**, por su asesoría y apoyo incondicional en la extracción e identificación molecular del patógeno.

Al personal del Colegio de Postgraduados campus Tabasco en especial a **doña Isa**, por su apoyo, por su amistad y por su comprensión.

Al **M.C. Gonzalo Cruz Navarro** por sus ideas de continuar la investigación en el cultivo de Jamaica y por todas sus orientaciones.

A mis compañeros campo y del laboratorio de fitopatología y biología molecular en especial a: **Ing. Nelba, Dr. Magdiel e Ing. Héctor**, por su apoyo, intervención y adiestramiento durante la realización de este trabajo.

A mis compañeros de generación **PROPAT 2008-2009**. Por todo lo vivido en compañía de ustedes, por escuchar que Jesucristo sanó mis enfermedades por esos minutos gracias.

A mis padres **Esteban** y **Rosario**, por ser mi fortaleza, mi apoyo incondicional, por sus desvelos, por su cariño, por su amor y por enseñarme el verdadero sentido de la existencia el amor a nuestro Dios y su creación.

**A ti** por existir en mi vida, por ser fuente de mi inspiración, por escucharme, por esos minutos que se convertían en largas horas de espera, por estar pendiente de todo y de todos, gracias.

A mis hermanas y sobrinos, por su comprensión al entender mi ausencia con la familia durante todo este tiempo.

A todos los que directa e indirectamente contribuyeron en la realización de este trabajo, mi sincero agradecimiento.

## CONTENIDO

|   | Página |
|---|--------|
| <b>ÍNCIDE</b> .....                                   | vii    |
| <b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....                        | ix     |
| <b>ÍNCIDE DE FIGURAS</b> .....                        | x      |
| <b>ABREVIATURAS</b> .....                             | xii    |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....                          | 1      |
| <b>2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b> .....                 | 4      |
| 2. 1. Objetivo.....                                   | 4      |
| 2. 2. Hipótesis.....                                  | 4      |
| <b>3. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....                | 5      |
| 3. 1. La jamaica, origen e importancia.....           | 5      |
| 3. 2. Clasificación taxonómica de la jamaica.....     | 7      |
| 3. 3. Morfología de la jamaica.....                   | 8      |
| 3. 4. Composición química.....                        | 9      |
| 3. 5. Requerimientos agroecológicos del cultivo.....  | 9      |
| 3. 6. Cultivo de la jamaica en México.....            | 10     |
| 3. 7. Limitantes fitosanitarias de la jamaica.....    | 11     |
| 3. 8. Etiología de las enfermedades.....              | 16     |
| 3. 9. Identificación de los hongos fitopatógenos..... | 18     |
| <b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....                  | 22     |
| 4. 1. Ubicación del sitio de muestreo.....            | 22     |
| 4.2. Establecimiento del experimento.....             | 23     |
| 4. 3. Material genético.....                          | 24     |
| 4. 4. Época y método de siembra.....                  | 24     |
| 4. 5. Muestreo.....                                   | 25     |
| 4. 6. Caracterización de síntomas.....                | 26     |

|   |           |
|---|-----------|
| 4. 7. Incidencia de la enfermedad.....                                | 27        |
| 4. 8. Determinación del agente causal.....                            | 28        |
| 4. 8. 1. Aislamiento del patógeno.....                                | 29        |
| 4. 8. 2. Purificación de cepas.....                                   | 29        |
| 4. 8. 3. Pruebas de patogenicidad.....                                | 31        |
| 4. 8. 3.1. Inoculación.....   | 31        |
| 4. 8. 3. 2. Reaislamiento.....  | 32        |
| 4. 8. 4. Identificación morfológica.....                              | 32        |
| 4. 8. 5. Identificación molecular.....                                | 33        |
| 4. 8. 5. 1. Extracción de DNA cromosómico.....                        | 33        |
| 4. 8. 5. 2. Amplificación del gen ITS DNAr por PCR.....               | 34        |
| 4. 8. 5. 3. Electroforesis en geles de agarosa.....                   | 35        |
| 4. 8. 5. 4. Purificación de los fragmentos de DNA Amplificados...     | 36        |
| 4. 8. 6. Secuenciación del DNA purificado.....                        | 36        |
| 4. 8. 6. 1. Línearización de las secuencias.....                      | 37        |
| 4. 9. Establecimiento de Dendrograma o árbol de similitud.....        | 37        |
| <b>5. RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>                                 | <b>38</b> |
| 5. 1. Caracterización de síntomas de la “mancha acuosa”.....          | 38        |
| 5. 2. Incidencia de la “mancha acuosa”.....                           | 39        |
| 5. 3. Aislamiento del organismo asociado a la “mancha acuosa”.....    | 42        |
| 5. 3. Pruebas de patogenicidad.....                                   | 42        |
| 5. 4. Identificación del organismo asociado a la “mancha acuosa”..... | 45        |
| 5. 4. 1. Identificación morfológica.....                              | 45        |
| 5. 4. 2. Identificación molecular.....                                | 48        |
| <b>6. CONCLUSIONES.....</b>   | <b>54</b> |
| <b>7. LITERATURA CITADA.....</b>                                      | <b>55</b> |
| <b>8. APÉNDICE.....</b>   | <b>66</b> |

## ÍNDICE DE CUADROS

|  | Página |
|--|--------|
| <b>Cuadro 1.</b> Principales enfermedades de la jamaica en México.....   | 13     |
| <b>Cuadro 2.</b> Aislamientos de tejido foliar con síntomas de “mancha acuosa” en las lotes de observación del cultivo de jamaica y cepas purificadas por punta de hifa.....                       | 30     |
| <b>Cuadro 3.</b> Porcentaje de incidencia de la “macha acuosa” en jamaica tipo precoz y tardía de plantas en campo, durante el periodo de estudio (julio-noviembre de 2009).....                   | 40     |
| <b>Cuadro 4.</b> Incidencia acumulada, temperatura y horas de aparición del síntoma de la enfermedad después de la inoculación de la hoja de jamaica tipo precoz.....                              | 44     |
| <b>Cuadro 5.</b> Incidencia acumulada, temperatura y horas de aparición del síntoma de la enfermedad después de la inoculación de la hoja de jamaica tipo tardía.....                              | 44     |
| <b>Cuadro 6.</b> Medias de largo y ancho de conidios y picnidios del hongo asociados a la “mancha acuosa” de la hoja de jamaica, procedentes de campo.....   | 47     |
| <b>Cuadro 7.</b> Medidas de conidios y picnidios del patógeno asociados la “mancha acuosa” de la hoja de jamaica, de reaíslamientos procedentes de las pruebas de patogeneidad en invernadero..... | 48     |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   | Página |
|---|--------|
| <b>Figura 1.</b> Producción mundial en toneladas de cálices de jamaica seca por país, 2004.....   | 6      |
| <b>Figura 2.</b> Ubicación de los estados productores de jamaica en la República Mexicana.....  | 10     |
| <b>Figura 3.</b> Ubicación geográfica del sitio de muestreo.....  | 22     |
| <b>Figura 4.</b> Distribución de plantas de jamaica en los lotes experimentales de observación.....   | 23     |
| <b>Figura 5.</b> Fragmentos de DNA amplificado por PCR con marcador de tamaño de fragmento 100pb invitrogen DNA Ladder-Gibco BRL. Pista PCR 1 cepa de <i>P. diplodiella</i> proveniente del cultivo de jamaica.....   | 36     |
| <b>Figura 6.</b> Síntomas de la “mancha acuosa” en jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.). A) Mancha foliar, B) Apariencia acuosa, C) presencia de anillos descoloridos, D) invasión del tejido y E) peciolo provocando el secado de la hoja, F) defoliación de la planta.....              | 39     |
| <b>Figura 7.</b> Desarrollo de la colonia de <i>Phoma</i> sp. En medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) asociada a la “mancha acuosa” en plantas de jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.), A) Crecimiento micelial, B) Tonalidad miel, C) Caja totalmente cubierta por el patógeno..... | 42     |

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Figura 8.</b>  | Pruebas de patogenicidad sobre jamaica ( <i>H. sabdariffa</i> ). A). Plantas de jamaica con cámara húmeda, B) mancha foliar, C) avance de la necrosis de color marrón y apariencia acuosa, D) hoja desprendida totalmente necrosada.....  | 43 |
| <b>Figura 9.</b>  | Apariencia externa del hongo asociado a la “mancha acuosa” en plantas del cultivo de jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.), A) Picnidios, B) Ostiolos C) Conodióforos, D) Conidios.....  | 46 |
| <b>Figura 10.</b> | Relaciones de similitud de las secuencias nucleotídicas de aislamientos de <i>Pilidiella diplodiella</i> en el cultivo de jamaica amplificada por PCR-ITS ADNr con los iniciadores ITS1 e ITS4, y sus secuencias agrupadas con el software MEGA 4, que fue comparada filogenéticamente con un análisis basado en el dato de su secuencia nucleotídica con 1000 aleatorizaciones tipo bootstrap, por medio de métodos de distancia y usando el índice P (Poisson) y el método de agrupamiento de Neighbor-joining..... | 50 |

## ABREVIATURAS

|                                   |                                   |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>µg</b>                         | Microgramo                        |
| <b>µl</b>                         | Microlitro                        |
| <b>kg/ha o kg-ha<sup>-1</sup></b> | Kilogramos por hectárea           |
| <b>l ó L</b>                      | Litro                             |
| <b>m</b>                          | Metro                             |
| <b>mg</b>                         | Miligramo                         |
| <b>mm</b>                         | Milímetro                         |
| <b>s</b>                          | Segundo                           |
| <b>t</b>                          | Tonelada                          |
| <b>°C</b>                         | Grados centígrados                |
| <b>µ</b>                          | Micra                             |
| <b>cm</b>                         | Centímetro                        |
| <b>cm<sup>2</sup></b>             | Centímetro cuadrado               |
| <b>DNA</b>                        | Acido ácido                       |
| <b>DNA<sub>r</sub></b>            | Acido ácido ribosomal             |
| <b>dNTPs</b>                      | Desoxirribonucleótidos trifosfato |
| <b>g</b>                          | Gramo                             |
| <b>h</b>                          | Hora                              |
| <b>ha</b>                         | Hectárea                          |
| <b>ITS</b>                        | Espaciador transcribible interno  |
| <b>kg</b>                         | Kilogramo                         |
| <b>km</b>                         | Kilómetro                         |
| <b>M</b>                          | Molar                             |
| <b>mµ</b>                         | Milimicra                         |
| <b>m<sup>2</sup></b>              | Metro cuadrado                    |
| <b>MgCl<sub>2</sub></b>           | Cloruro de magnesio               |
| <b>min</b>                        | Minuto                            |
| <b>ml ó mL</b>                    | Mililitro                         |
| <b>Mm</b>                         | Milimolar                         |
| <b>msnm</b>                       | Metros sobre el nivel del mar     |
| <b>ng</b>                         | Nanogramos                        |
| <b>nm</b>                         | Nanómetro                         |
| <b>pb</b>                         | Pares de bases                    |
| <b>pH</b>                         | Potencial de hidrogeno            |
| <b>rpm</b>                        | Revoluciones por minuto           |
| <b>UV</b>                         | Ultravioleta                      |
| <b>V</b>                          | Voltio                            |

## 1. INTRODUCCIÓN

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es un arbusto anual que se desarrolla en regiones con clima tropicales y subtropicales. En México fue introducida por los españoles durante la colonización (Galicia-Flores *et al.*, 2007), recientemente su cultivo ha alcanzado un notable progreso debido a la diversidad de usos que se le da en la alimentación humana y animal, propiedades medicinales, su uso en la industria cosmética y en la elaboración de colorantes (Ahmed, 2007).

De acuerdo a la FAO, en el 2004 se produjo un total de 97,975 t de jamaica en el mundo. México ocupó el séptimo lugar como productor con el 5.14%, después de China que ostenta el primer lugar con 27.76% de la producción, seguido por la India (17.91%), Sudán (9.1%), Uganda (8.40%), Indonesia (6.23%) y Malasia (5.53%).

A nivel nacional, la superficie cultivada con jamaica es de aproximadamente 19 mil hectáreas, de las cuales se cosecharon alrededor de 5,153 t de producto, distribuidas en los Estado de Guerrero (73.22%), Oaxaca (13.43%), Michoacán (5.83%), Nayarit (4.13%), Puebla (1.20%), Campeche (1.55), Colima (0.27%), Veracruz (0.18%), Jalisco (0.16%) y Morelos (0.03%), beneficiando a más de 11 mil familias que dependen de este cultivo (SIAP-SAGARPA, 2009).

Esta especie vegetal fue introducida desde hace muchos años en el estado de Tabasco y su cáliz tiene demanda como bebida refrescante, su cultivo no se ha generalizado debido al desconocimiento de su comportamiento en diferentes

condiciones edafoclimáticas tropicales. A pesar de ello, en el año 2001 se cultivaron alrededor de 233 hectáreas de jamaica distribuidas en los municipios de Centro, Centla, Jalapa, Macuspana, Tacotalpa y Teapa, con una producción de 32.2 ton de cálices de flor de jamaica (SIAP-SAGARPA, 2009).

Es igualmente conocido que una de las principales limitaciones en los estados productores de jamaica en México ha sido el ataque de enfermedades (Pérez-Torres, 2009). Entre ella destaca la pata prieta causada por el hongo *Phytophthora parasítica*, que puede provocar la muerte de las plantas y afectar el rendimiento de cáliz ha<sup>-1</sup> (Hernández-Morales y Romero-Cova 1990 y Escalante-Estrada, 2001). Otra serie de patologías descritas más adelante, han sido reportadas por diversos autores (Hernández-Morales, 1988; González-Satín, 2008) entre los que destacan los trabajos de Hernández-Morales (1988), González-Satín (2008) y recientemente el de Martínez-Sánchez (2010) en etiología.

En el año 2007 Murillo-De La Rosa realizó en el estado de Tabasco un estudio preliminar para determinar los patógenos asociados a este cultivo; en él describe la ocurrencia de siete géneros de hongos asociados a enfermedades del tallo, raíz y hojas de la jamaica. *Phytophthora* sp. y *Fusarium* sp. fueron señalados como causantes de pudriciones en tallo y raíz, mientras que los géneros *Cercospora* sp., *Curvularia* sp., *Helminthosporium* sp., *Peronospora* sp., *Pseudosporonospora* sp., los asoció con la presencia de distintas manchas foliares. Sin embargo, aun se carece de estudios precisos de etiología sobre alguna de tales enfermedades en particular,

que permitan establecer su manejo. Razón por la cual cuando alguna enfermedad se presenta, en la mayoría de los casos se adoptan estrategias de control basadas en el uso de sustancias químicas, y que se revelan en controles erráticos, baja producción y pérdidas de material genético tanto en lotes de observación, como en pequeñas plantaciones comerciales de la jamaica.

Por lo anterior, el presente trabajo que inicialmente tenía como objetivo conocer las enfermedades del cultivo de la jamaica en la región de Cárdenas, Tabasco, se modificó a consecuencia de la alta incidencia de una enfermedad foliar, no reportada por Murillo-De La Rosa en su estudio preliminar de las enfermedades de la jamaica realizado en el 2007, que provocó la senescencia de hojas de las plantas en los lotes establecidos en el año 2008. Esto propició el cambio de los alcances del estudio planteado inicialmente, hacia el conocimiento de la naturaleza y las causas de dicha enfermedad foliar, que fue denominada “mancha acuosa” de las hojas por el aspecto de los síntomas de la jamaica cultivada, en las condiciones del trópico húmedo, en Cárdenas, Tabasco.

## 2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 2. 1. Objetivo

1. Identificar el o los agente (s) causal (es) de la “mancha acuosa” en la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), en Cárdenas, Tabasco.
2. Describir la sintomatología externa de la enfermedad “mancha acuosa” en el cultivo de jamaica.

### 2. 2. Hipótesis

1. La “mancha acuosa” en el cultivo de jamaica es causada por un patógeno de tipo infeccioso.
2. La sintomatología externa de la enfermedad “mancha acuosa” tiene algunas características semejantes a las enfermedades producidas por hongos.

### 3. REVISIÓN DE LITERATURA

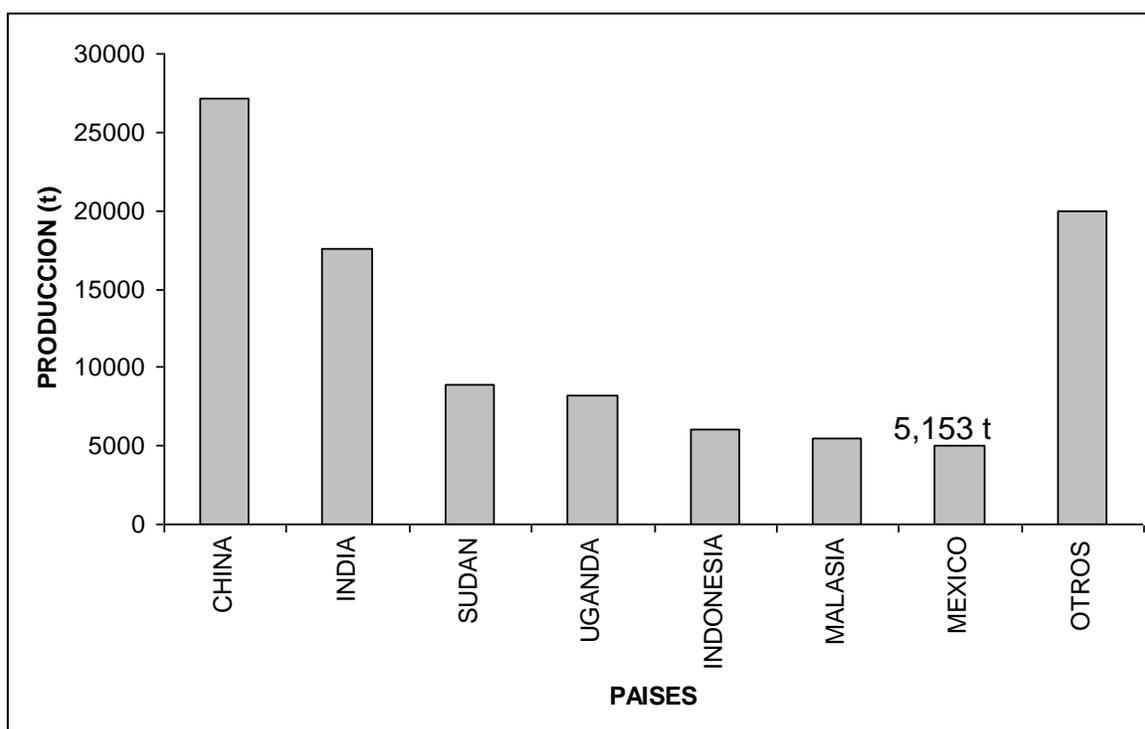
#### 3. 1. La jamaica, origen e importancia

Se cree que la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es originaria del continente Asiático, posiblemente de la India y Malasia. Actualmente se cultiva en regiones tropicales y subtropicales del mundo, Llegó a Brasil en el siglo XVII, y en México fue introducida por los españoles en la época colonial (Galicia-Flores *et al.*, 2007). La jamaica es conocida por diferentes nombres comunes como: Rosa de jamaica, Flor de Dardo, Rosa de Jericó, Té Rojo, Roselle, Flor de Jamaica, Flor Roja, rousellez, rosflee, karkadeh, red sorrel, jamaican sorrel (Carvajal *et al.*, 2006).

La importancia económica de *H. sabdariffa* se basa en la diversidad de usos alimenticios, medicinales e industriales. Los cálices principales tejido utilizado para infusiones, jarabes, harinas, aderezos, salsas, condimentos, colorantes, mermeladas, jaleas, conservas, postres, tortas, preparación de bebidas, esencia de gelatinas, cajeta y usos culinarios. Sus hojas y brotes tiernos son consumidas como verduras, forraje, tinte y abonos orgánicos. La semilla se utiliza para alimento de aves y extracción de aceites (Ahumed, 2007; Domínguez-López *et al.*, 2008).

La jamaica también posee propiedades medicinales como diurético, astringente, digestivo, emoliente, sedativo, laxante, disminuye los niveles de colesterol y triglicéridos en la sangre, reduce la presión arterial, pulveriza cálculos renales y previene el cáncer. La industria aprovecha la fibra de los tallos para la elaboración de telas y arpillera (Chen *et al.*, 2003; González-Satín, 2008).

En el mundo se producen alrededor de 150 mil t de cálices de jamaica seca por año. China es el principal productor, con una producción total de 27 200 t y un rendimiento de 2,000 kg de cálices de jamaica seca ha<sup>-1</sup>. Los países consumidores que más demandan este producto son Japón, Estados Unidos, Francia y Alemania. En América, el principal productor es México con una producción de 5,153 t y un rendimiento de 255 kg de cálices de jamaica seca ha<sup>-1</sup>, (FAO, 2004; Morales-Páramo, 2010). (Figura 1).



**Figura 1.-** Producción mundial en toneladas de cálices de jamaica seca por país, 2004.

### 3. 2. Clasificación taxonómica de la jamaica

Linneo en 1753, ubicó el género *Hibiscus* en la familia Malvácea. *H. sabdariffa* es una de las más de 300 especies de este género (Qi, 2005), de acuerdo con El Afri (1979), su clasificación taxonómica es la siguiente:

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Dilleniidae

Orden: Malvales

Suborden: Malvinas

Familia: Malvácea

Género: *Hibiscus*

Especie: *Hibiscus sabdariffa* L.

Botánicamente se distinguen dos tipos de *H. sabdariffa*, el primero es muy ramificado, con tallos rojos o verdes y carnosos, caracterizado por una alta producción de cálices comestibles de color rojo a amarillo pálido de sabor ácido; mientras que el segundo tipo presenta ramificación escasa y es de gran aptitud para la producción de fibra (Hidalgo-Villatoro *et al.*, 2009).

### **3. 3. Morfología de la jamaica**

La jamaica es una planta hermafrodita, la cual crece como un arbusto y puede alcanzar de 2.5 a 5 m de altura. Posee tallos robustos y con frecuencia leñosos en su base, de color rojo oscuro o claro, tendiendo a morado o lila, las variedades que generalmente son productoras de fibra tienen una coloración verde o amarillenta (Rendón-Aguilar, 1992).

Las hojas son simples, alternas, deciduas; ovadas o lanceoladas-oblongas, no divididas o divididas en tres a cinco lóbulos, ápice truncado hasta cuneado, con márgenes dentados o serrados, de color verde con nervaduras rojas; envés con una glándula característica en su base, pecíolos largos, delgados con terminación gruesa en la base de la hoja, siendo las hojas inferiores enteras y lanceoladas y las superiores palmeadas.

Cáliz con cinco lóbulos profundos, de forma irregular, de 1.2 cm a 4.0 cm de largo, adquiriendo características carnosas después de la antésis y su nervadura central marcada, con una glándula en la base del lóbulo, pubescencia fina en el interior de los lóbulos; el epicáliz y el cáliz pueden ser de un rojo brillante, verde o casi blanco, dependiendo de la variedad (Rendón-Aguilar, 1992).

Las flores nacen solitarias en las axilas de las hojas, con pétalos amarillentos y cáliz rojo con duración de uno a dos días los cuales al desprenderse dejan mostrar los ápices cónicos que están formados la base por 5 o 7 sépalos ovado lanceolados de 2 a 3 cm de largo.

Los frutos son capsulas de forma ovoide, obtusos, ligeramente pilosos, conteniendo numerosas semillas reniformes, pubescentes con hilo rojizo los cuales tardan en desarrollar de 3 a 4 semanas, abriéndose en cinco partes cuando maduran (Carvajal *et al.*, 2006).

### **3. 4. Composición química**

El cáliz de la jamaica deshidratado contiene 4 % de ácido cítrico, 1.5 % de pigmentos, 6.9 % de proteína y 9 % de sólidos solubles a un pH de 2.7. Los principales pigmentos de esta plantas son las antocianinas: delphinidina (70.9 %) y cianidina (29 %) (Gassama-Dia *et al.*, 2004). También contiene flavonoides, saponinas, carbohidratos, fitoesteroles, ácido ascórbico y una mezcla de ácido cítrico y málico (Carvajal *et al.*, 2006).

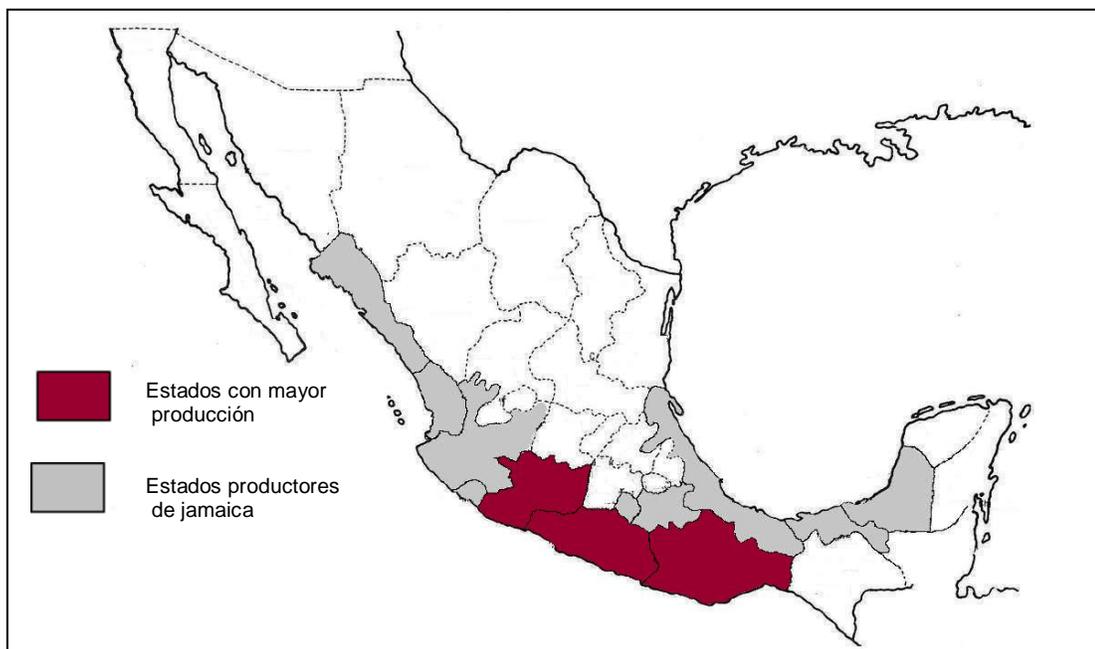
### **3. 5. Requerimientos agroecológicos del cultivo**

La jamaica se desarrolla en climas tropicales y subtropicales, en regiones con altura de 0 a 1300 msnm, temperaturas de 15 °C a 36 °C, con luz continua, precipitación anual superior a los 500 mm, suelos preferentemente con pH de 4.5 a 7.5, con pendiente no mayor del 50 %, drenados, sueltos y de humedad permanente (Urbina-Torres, 2009).

### **3. 6. Cultivo de la jamaica en México**

En México, la producción de jamaica se encuentra concentrada en la costa del Océano pacífico, principalmente en los estados de: Guerrero (73.22%), Oaxaca (13.43%) y Michoacán (5.83%) (SIAP-SAGARPA, 2009) (Figura 2). Aunque existen otras regiones productoras distribuidas en la vertiente del pacífico y el Golfo de México. Entre estos destacan por su calidad las zonas de Puebla (Chiautla de Tapia) y Colima. Asimismo, los estados de Veracruz y Oaxaca son importantes por su producción orgánica para el mercado internacional (Fundación Produce Guerrero, 2004).

En Tabasco, la producción de jamaica es mínima. En el año 2001 se cultivaron 233 ha distribuidas en seis municipios: Centro, Centla, Jalapa, Macuspana, Tacotalpa y Teapa (OEIDRUS, 2009).



**Figura 2.-** Ubicación de los estados productores de jamaica en la República Mexicana.

### **3. 7. Limitantes fitosanitarias de la jamaica**

De acuerdo a los estudios realizados por Dulap (1945), la principal plaga para el cultivo es la hormiga arriera (*Atta* sp.). Sin embargo, Pushpaveni *et al.* (1973) reportó al piojo harinoso (*Maconellicoccus hirsutus*), tortuguillas (*Diabrotica* sp.) y pulgones (*Aphis gossypii*). Por otra parte, Maiti-Ratikanta, (1995) menciona a los insectos devoradores del tallo (*Agrilva acutua*), gusano trozador (*Agrotis ipsilon*) y gusano soldado (*Spodoptera frugiperda*) como los enemigos del cultivo de jamaica y otras plantas de fibra.

En México, sólo se han reportado la presencia de: hormiga arriera (*Atta mexicana*), pulgones (*Aphis gossypii*), piojo harinoso (*Maconellicoccus hirsutus*) y chapulin (*Sphenarium purpurascens*) (García-Martínez, 1995; Castro-Medina, 2002 y Pérez-Torres, 2009).

Dentro de los patógenos mas importantes en el mundo, para *H. sabdariffa*, se reporta a *Phytophthora parasítica* (Adenji, 1970). Este autor señala que en 1968 en Nigeria, en pruebas de patogenicidad se mostró que este organismo fue la principal causa de pudrición del tallo y raíz en el cultivo de jamaica. De igual forma, Hadad (1976) y Visarathanonth (1976), señala a *P. parasítica* como uno de los patógenos más importantes de la jamaica en Indonesia.

Amusa *et al.* (2005), menciona a *Fusarium oxysporum* como el agente causal de la marchitez vascular de la jamaica en el suroeste de Nigeria. Las plantas afectadas por este hongo, mostraron marchitez completa en los brotes, lesiones necróticas sobre el tallo, comenzando desde la base del suelo hacia arriba afectando la

mayoría de las ramas. La marchitez afectó tanto a las plantas jóvenes como a las maduras ocasionando pérdidas del orden del 26% de las plantas cultivadas. Este hongo ha sido aislado con frecuencia a partir de residuos de cosecha en este cultivo. Ooi y Salleh (1999) identificaron a *Fusarium* sp. como el agente causal de la enfermedad marchitamiento vascular de la jamaica en Malasia.

Otras especies fungosas consideradas de menor importancia para este cultivo son: *Rhizoctonia solani*, *Pythium pernicioso*, *Phymatotrichum omnivorum*, *Macrophoma phaesolina*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Oidium* sp (Morton, 1987; Augstburger *et al.*, 2000; Amusa, 2005) que en su mayoría causan lesiones a nivel de raíz, cuello y tallo.

En el centro de África, Nigeria, la región del Caribe y la India se reporta a *Coniella musaiaensis* en planta y cáliz; causando lesiones irregulares de color marrón pálido en hojas inferiores; aumentando de tamaño en unas horas, cubriendo la superficie foliar induciendo la necrosis total de los tejidos (McClintock y el Tahir, 2004).

En varias regiones productoras de jamaica del mundo mencionan a *Phoma sabdariffae* como uno de los patógenos foliares de este cultivo. Morton (1987) señala que en las Filipinas plantas de Jamaica cultivadas para cosecha de flor mostraron daños severos en hojas. De igual forma, Singh (1987), Augstburger *et al.* (2000), Sié *et al.* (2011) reportaron a este organismo provocando manchas foliares de importancia económica.

Rendón-Aguilar (1992), describe a las enfermedades causadas por hongos como las enfermedades de mayor importancia para la producción de jamaica en México. En el Cuadro 1 se describen los síntomas de las enfermedades producidas en este cultivo y los agentes causales.

**Cuadro 1.-** Principales enfermedades de la jamaica en México.

| Síntomas de la Enfermedad      | Agente causal   | Autor  |
|--------------------------------|---|--|
| Manchas foliares               | <i>Cercoposra sp.</i> ,<br><i>Leptosphaerulina sp.</i> ,<br><i>Corynespora sp.</i> ,<br><i>Glomerella sp.</i> ,<br><i>Phomopsis sp.</i> | Hernández-Morales <i>et al.</i> (2008)   |
| Pudrición basal o pata prieta  | <i>Phytophthora parasitica</i>  | Hernández-Morales, (1988);<br>Escalante-Estrada, (2001);<br>González-Satín, (2008) |
| Pudriciones de la raíz y tallo | <i>Fusarium oxysporium</i>  | González-Satín, (2008)   |
| Agallamiento de raíces         | <i>Meloidogyne areanaria</i>  | Hernández-Morales, (1988)  |

Hernández-Morales (1988), reporta a *Phytophthora parasitica* como el agente causal de la pudrición basal negra de la jamaica en el estado de Guerrero; localmente conocida como “pata prieta”. Esta enfermedad provoca una pudrición en la parte del cuello y parte subterránea del tallo, que invade frecuentemente las raíces. La infección avanza hacia la parte superior del tallo y provoca agrietamientos de la corteza. En el follaje se observa una clorosis que invade todas las hojas, ocasionando marchitez, caída prematura de las hojas, y en daños severos, la muerte de la planta.

Dicha enfermedad se presenta desde que la planta alcanza 20 cm de altura hasta que está en producción. Escalante-Estrada (2001), complementariamente evaluó la variabilidad patogénica de 30 cepas de *P. parasítica*, aisladas de diferentes localidades de la región jamaquera del estado de Guerrero y de 25 cultivos monospóricos; con relación al tamaño, el inicio y finalización en días de la necrosis producida en plantas. Dicho autor, concluyó que existe diferencia patogénica en cuanto al comportamiento de esta enfermedad. En estudios recientes se ha asociado al género *F. oxysporium* con la enfermedad “pata prieta” en este mismo estado (González-Satín, 2008), y propone que ambos patógenos producen la misma enfermedad.

En plantaciones de Guerrero y Colima, en el follaje, se presentaban manchas blanquecinas o grisáceas rodeadas de un halo rojizo, que al paso del tiempo aumentaban en número y tamaño, llegando en ocasiones a cubrir la lámina foliar. Dentro de los organismos asociados con este daño reportan a los hongos del género *Leptosphaerulina* sp, *Corynespora* sp y *Glomerella* sp. En menor frecuencia identificaron a los géneros *Cercospora* sp y *Phomopsis* sp (Hernández-Morales *et al.*, 2008; Dulap, 1945) Estos autores han evaluado la incidencia de dicha enfermedad cercana al 100%, en plantaciones de jamaica en Guerrero; sin embargo, el daño ocasionado a la producción es menor.

Menos comunes son los reportes de daños causados por nematodos en plantas de jamaica, sin embargo Hernández-Morales (1988) identifica a *Meloidogyne arenaria*

como el causante de agallamiento en raíces de plantas de jamaica en el estado de Guerrero, nemátodo reconocido como uno de los patógenos que mayor daño provoca a los cultivos hortícolas (Escalante-Estrada, 2001).

En Tabasco, Murillo-De La Rosa (2007), identificó siete géneros de hongos asociados con distintas enfermedades del cultivo de jamaica, en la región de Cárdenas, Tabasco. En dicho estudio describe a *Phytophthora* sp provocando pudrición radicular, marchitamiento generalizado y muerte de plantas. En el cuello de la raíz reportó la presencia de pudrición húmeda y señaló que existen signos de ataque del mismo hongo. Enfermedad que se encuentra reconocida como el problema patológico más importante de la jamaica en Tabasco. En el caso de *Fusarium* sp lo asoció con la pudrición seca en la raíz y cuello de las plantas.

En el follaje *Cercospora* sp asociada con *Curvularia* sp el mismo autor los reporta originando manchas foliares de forma circular con bordes color rojizo púrpura y centro color crema o café. Asimismo a *Helminthosporium* sp lo señala como el responsable del manchado púrpura o rojizo oxidado en las hojas de jamaica, manchas que pueden llegar a cubrir cubrir la lamina foliar, en su totalidad.

*Peronospora* sp, provoca manchas de color verde claro en el haz de la hoja, luego se tornan amarillentas y después marrón. Tanto en el haz como en el envés. Se observa pelusilla blanca o grisácea que llega a cubrir la hoja en su totalidad y que representa el signo de la enfermedad.

Finalmente Murillo-De La Rosa (2007) señala al género *Pseudosperonospora* sp, el cual induce las manchas amarillas en el haz y púrpura en el envés con centro seco de color café claro de forma y tamaño irregular que se extienden lentamente sobre las hojas. Estas dos últimas enfermedades pertenecen al grupo de los mildius causadas por hongos de orden de los Peronosporales.

### **3.8. Etiología de las enfermedades**

Holliday (1995) define la etiología como el estudio de las causas de las enfermedades de las plantas, en este sentido Agrios (2006) y Carrero y Planes (2008) señalan que el objetivo principal de los estudios etiológicos es el conocer las alteraciones fisiológicas o anormalidades funcionales del hospedero o cualquiera de sus partes o productos que se suscitan durante el desarrollo de las enfermedades. En este contexto se ubica la descripción de los síntomas ocasionados por el agente que las provoca.

Al respecto González-Satín (2008), en el estado de Guerrero estudió la etiología de la enfermedad pata prieta del cultivo de jamaica, encontró que los hongos *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora parasitica* provocan marchitamiento generalizado en las partes aéreas de las plantas, adelgazamiento y necrosamiento de la parte basal del tallo y un escaso desarrollo de raíces primarias y secundarias. Asimismo, evaluó incidencia del 40% bajo condiciones de campo.

Respecto a la patogenicidad, la misma autora reprodujo síntomas de la enfermedad mediante la inoculación con suspensiones conidiales de *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora parasítica* depositadas en la base del tallo de las plantas. En ambos casos los hongos tuvieron la capacidad de ocasionar síntomas similares a las plantas infectadas, por lo tanto concluyó que, ambos patógenos son agentes causales de la enfermedad “pata prieta” en plantas de jamaica. Siendo este el primer reporte que señalaba a *Fusarium oxysporum* como otro patógeno que producía síntomas semejantes a los de la “pata prieta” en jamaica.

Valencia-Botín (2002), en trabajos realizados en el cultivo de pitahaya describió la etiología de la enfermedad ojo de pescado, en el estado de Puebla. En base a las características morfológicas y fisiológicas, así como de patogenicidad, concluyó que el hongo que produce la enfermedad conocida como ojo de pescado es *Botryosphaeria dothidea* (Moug:Fr) Ces & De Not. En México, la enfermedad sólo se había asociado a la pitahaya, pero no se había descrito su etiología. Este autor señaló que las principales alteraciones inducidas por *B. dothidea* en los tallos enfermos fueron: hiperplasia de células epidérmicas y del colénquima, inducción de formación de esclereidas, deposición de fenoles y necrosis de las células epidérmicas e hipodérmicas. Asimismo describe los síntomas iniciales del hongo en el tallo de pitahaya como: manchas pequeñas de color café claro de 1 a 3 mm de diámetro, las cuales posteriormente se tornan café oscuro e inmersos en estas lesiones se pueden encontrar los picnidios del hongo.

González-Pacheco (2004), identificó la etiología de la marchitez del tomate de cáscara en el estado de Guanajuato y su control, con base a las claves taxonómicas identificó a los hongos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporium* como los agentes causales de la enfermedad, provocando ahogamiento en plántulas, estrangulamiento del cuello de la raíz, achaparamiento, clorosis, oscurecimiento en el xilema, marchitez y muerte en la planta. Por su parte, *R. solani* indujo un desarrollo más rápido de la enfermedad que el provocado por ambas especies de *Fusarium*. Además, encontró un efecto diferencial de ambos patógenos dependiendo del ciclo del cultivo. *Rhizoctonia* fue aislado en mayor proporción en el ciclo del cultivo otoño-invierno, a diferencia de *Fusarium* sp que se aisló en igual proporción en ambos ciclos del cultivo.

Con base en lo anterior González-Pacheco (2004), llegó a la conclusión que estos hongos causan el síntoma de marchitez del tomate de cáscara, pero no descartó la posibilidad de que exista sinergismo entre estos hongos.

### **3.9. Identificación de los hongos fitopatógenos**

La identificación correcta de hongos fitopatógenos es de suma importancia para el manejo y conservación. Esto permite manejar las especies vegetales a cultivar y minimizar los daños de las enfermedades, mediante la utilización oportuna y controlada de fungicidas químicos o mejor aún, para aplicar metodologías de control biológico efectivas, u otro tipo (Zambrano-Bullones, *et al.*, 2002). Entre los procedimientos de hoy en día, los biólogos evolutivos usan tanto criterios

morfológicos como moleculares para establecer relaciones filogenéticas entre organismos. Sin embargo, se han observado incongruencias entre los análisis basados en datos morfológicos y los basados en datos moleculares.

Por todo lo mencionado anteriormente resulta oportuna la identificación rápida y confiable de hongos, considerando, la limitación de los caracteres morfológicos para diferenciar hongos estrechamente relacionados.

Franco (2005) y Bridge *et al.* (1998) señalan que se conocen numerosas técnicas moleculares para el estudio taxonómico de los hongos, desde las clásicas técnicas de DNA, basadas en la determinación del contenido guanina/citosina del DNA nuclear hasta la hibridación DNA-DNA, para establecer la identidad de cepas morfológicamente similares.

Desde su primera descripción por Kary Mullis en 1983, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha tenido un efecto importante en muchos de los campos de investigación de la Biología (Ayra *et al.*, 2007). La técnica amplifica fragmentos específicos de DNA desde un pequeñísimo número de células fúngicas, de una sola espora, incluyendo especímenes que están extintos.

Su principio es muy simple y se basa en la amplificación *in vitro* del DNA, lo que trae como resultado la replicación exponencial de la secuencia blanco hasta en un millón de veces, aun en presencia de gran cantidad de moléculas de DNA no relacionadas,

obteniéndose como producto un DNA altamente homogéneo que se convierte en fuente excelente para diversas manipulaciones moleculares (Ayra *et al.*, 2007).

La reacción consiste en la repetición de un ciclo de tres etapas, cada una de las cuales se realiza a una temperatura determinada.

1ra. Etapa la muestra se calienta, hasta lograr la separación de las dos cadenas que constituyen el DNA, hecho que se conoce como "desnaturalización", la temperatura oscila entre 92-95 °C.

2da. Etapa la temperatura se reduce para permitir el "anillamiento" de cada una de las cadenas cortas de nucleótidos (oligonucleótidos) con cada una de las hebras separadas del DNA molde. Se trata de segmentos de DNA de cadena simple, sintetizados en el laboratorio y diseñados de manera tal que permiten definir los límites del tramo de DNA que se desea replicar. Obviamente, para que se pueda producir el apareamiento, cada uno de estos oligonucleótidos, a los que se denomina "iniciadores" o *primers*, debe ser complementario del tramo al que tienen que unirse en las cadenas separadas del DNA molde.

3ra. Etapa la enzima DNA polimerasa, sintetiza las secuencias complementarias de las hebras del DNA molde. Para ello, la enzima usa desoxidonucleósidos trifosfato (dNTPs) agregados a la mezcla de reacción. La temperatura a la que se realiza el tercer paso está condicionada por aquella a la cual "trabaja" la enzima DNA polimerasa (Pecina-Quintero, 2001).

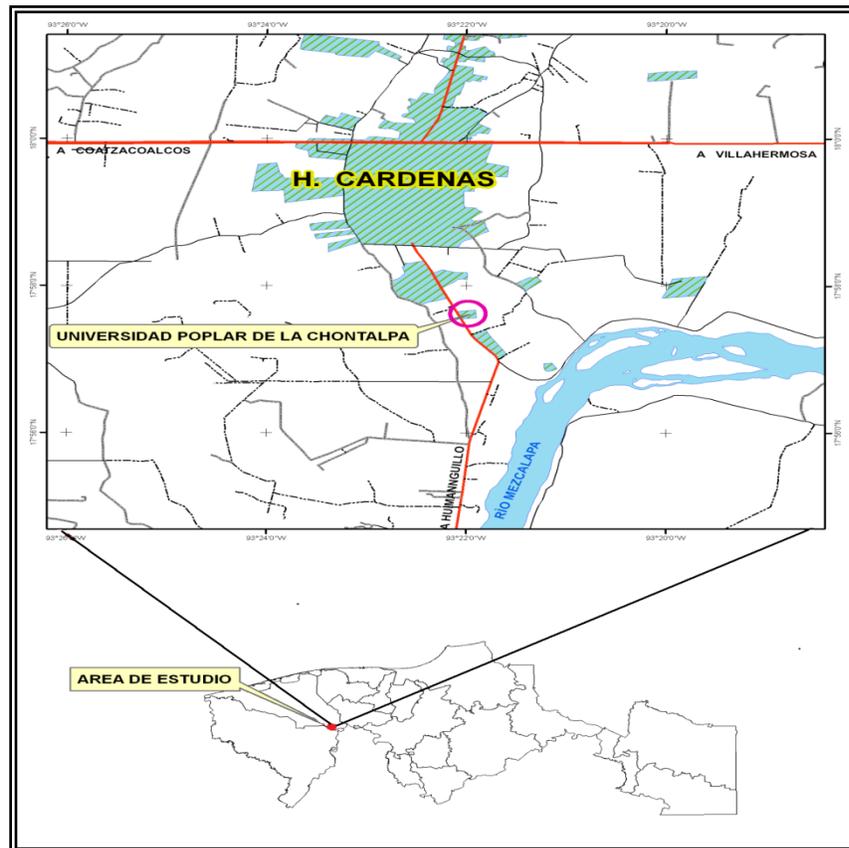
Al cabo del primer ciclo de tres reacciones (desnaturalización, anillamiento, extensión) el tramo de DNA elegido se ha duplicado y el doble de su cantidad original se encuentra disponible para ser nuevamente replicado en un segundo ciclo. El resultado de la aplicación de numerosos ciclos "en cadena" da lugar a la amplificación geométrica del segmento de DNA delimitado por los primeros (Costa, 2004). Los ciclos se repiten de 25 a 45 veces. La estandarización del funcionamiento del termociclador es esencial para garantizar la calidad y repetibilidad de los resultados. Los productos de la reacción se separan por tamaño (peso) en un gel de electroforesis. La electroforesis en gel de agarosa es de las más utilizadas para analizar y caracterizar ácidos nucleicos de distintas procedencias. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de DNA de diferente tamaño van a emigrar de forma distinta en una electroforesis en gel de agarosa.

Es importante la utilización de marcadores de tamaño conocido porque nos permitirán calcular los pesos moleculares de las muestras de DNA problema. En el caso de los geles de agarosa, se le añade bromuro de etidio, sustancia que se intercala entre las bases del DNA y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta. Tras la electroforesis, se visualiza el gel con una lámpara de luz UV, y se verán las bandas correspondientes a las muestras de DNA aplicado y los marcadores de peso molecular (Ochoa-Cuevas, 2008).

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4. 1. Ubicación del sitio de muestreo

El muestreo de material vegetal se realizó en dos lotes de jamaica establecidas el 13 de julio de 2009 en el campo experimental de la Universidad Popular de la Chontalpa, ubicado en el km 2 de la carretera Cárdenas-Huimanguillo, en la ranchería Paso y Playa de Cárdenas, Tabasco; en las coordenadas geográficas: 17° 57' 35.1" latitud norte y 93° 21' 58.3" longitud oeste. El tipo de suelo es arcilloso con pH medianamente alcalino (Arias-Trinidad, 2008).



**Figura 3.-** Ubicación geográfica del sitio de muestreo.

De acuerdo con García-De Miranda (1998). El clima es cálido húmedo (Am (f)) con temperatura media anual de 26.1 °C y precipitación media anual de 2229 mm con un periodo de baja precipitación (57-92 mm) en los meses de febrero a mayo.

#### 4. 2. Establecimiento de los lotes de observación

El presente estudio se realizó bajo el sistema de lotes de observación, los cuales tenían las siguientes dimensiones: 15 m de largo por 15 m de ancho, donde se tenía un número total de 225 plantas de jamaica. Los lotes sembrados fueron dos correspondiendo al número igual de tipos de plantas de jamaica.

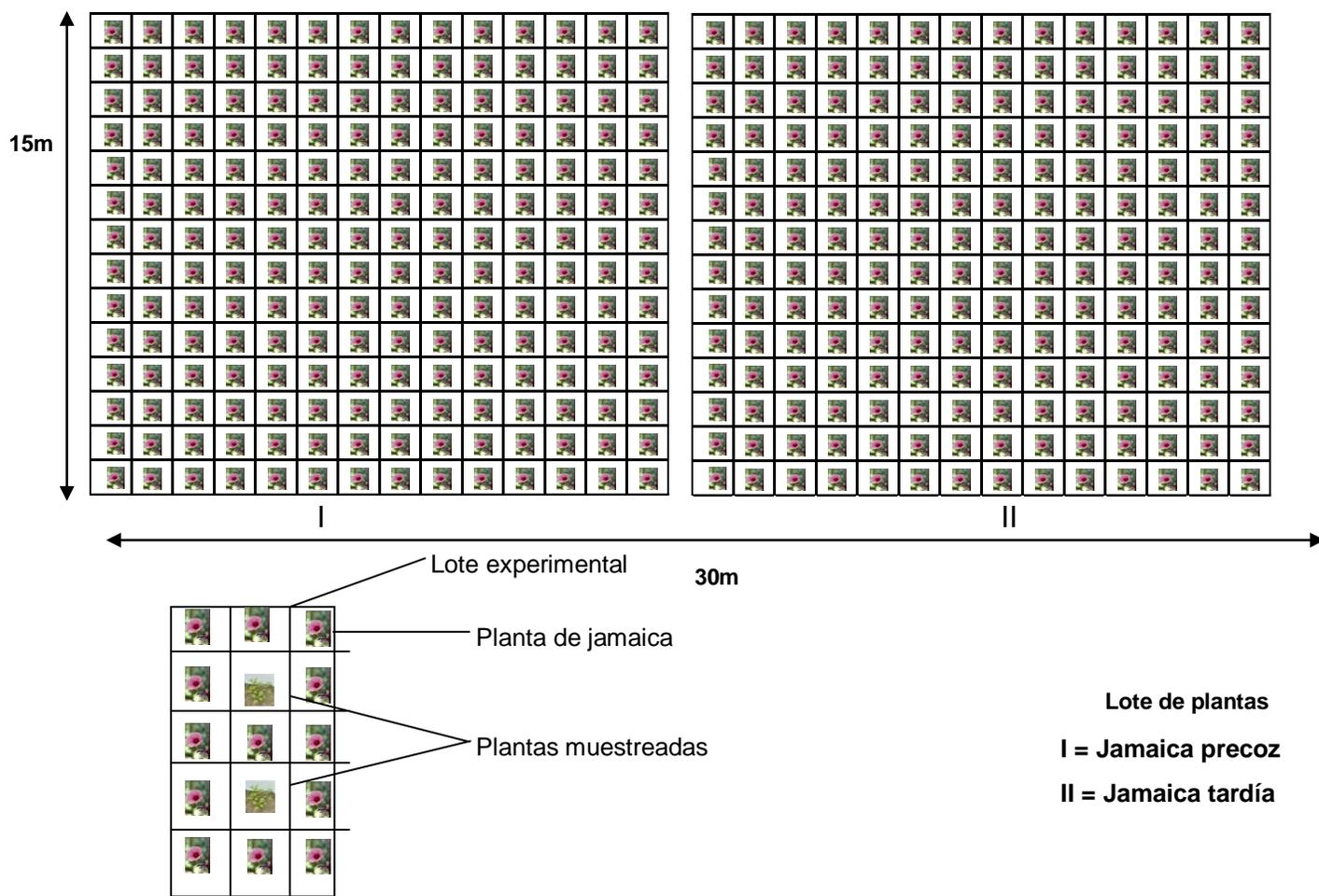


Figura 4.- Distribución de plantas de jamaica en los lotes experimentales de observación.

#### **4. 3. Material genético**

Las semillas de jamaica usadas para la realización de la presente investigación fueron donadas por el M. C. Gonzalo Cruz Navarro profesor investigador de la Universidad Popular de la Chontalpa, Cárdenas, Tabasco, y corresponden a dos tipos según su ciclo de vida.

- I. **jamaica precoz:** de semillas más grandes en relación a las de la tardía, sus cálices son de color rojo oscuro con menor acidez y su ciclo de vida es corto (5 meses).
  
- II. **jamaica tardía:** sus semillas son más pequeñas que las de la precoz, el color de sus cálices es más claro con mayor cantidad de ácidos orgánicos y su ciclo de vida es considerado como tardío (6 meses).

#### **4. 4. Época y Método de siembra**

La siembra se realizó el día 13 de julio de 2009. De acuerdo al calendario agrícola de siembra de jamaica en el país y en función a las características de crecimiento y desarrollo del cultivo este queda comprendido durante el ciclo agrícola Primavera-Verano.

La siembra se realizó en forma manual y directa, depositando de 4 a 5 semillas por golpe a una profundidad de 2.5 cm aproximadamente; la distancia entre planta fue de un metro y la distancia entre hileras de un metro.

#### 4. 5. Muestreo

Para el estudio de la etiología de la “mancha acuosa”, se llevaron a cabo observaciones de campo y muestreos durante los meses de julio a noviembre de 2009 durante el ciclo primavera-verano. Con este fin se calculó un tamaño de muestras de plantas a observar dentro de cada lote, sin considerara las plantas de las orillas.

El tamaño de la muestra obtenido con un 95% de confianza y un error admitido del 10% fue de 39 plantas distribuidas aleatoriamente en cada uno de los lotes evaluados, y se determinó mediante la aplicación de la siguiente formula citada por Mateu *et al.* (2003), para muestras pequeñas ( $N < 1000$ ).

$$n = \frac{z^2 pq}{B^2}$$

Donde:

n= Tamaño de la muestra

z= 1.96 para el 95% de confianza

p= Frecuencia esperada del factor a estudiar

q= 1- p

B= Precisión o error admitido del 10%

Sin embargo, cuando la población es pequeña, la muestra obtenida mediante esta fórmula es demasiado grande, en estos casos se debe aplicar la siguiente fórmula correctora:

$$\frac{1}{n'} = \frac{1}{n} + \frac{1}{N}$$

Donde

n'= Tamaño de la muestra necesario

n= Tamaño de la muestra según la primera de las fórmulas

N= Tamaño de la población

#### **4. 6. Caracterización de síntomas**

La caracterización de síntomas se realizó en 39 plantas determinadas como tamaño de muestras para cada uno de los dos lotes evaluados. En cada una de las 39 plantas seleccionadas al azar se observaron hojas enfermas conforme se presentaba la enfermedad en los lotes, los primeros síntomas se manifestaron a los 56 días después de la emergencia de la semilla de jamaica.

Las hojas enfermas se observaban cada ocho días con el fin de evaluar el avance del síntoma, se registraba en bitácora las características visuales del daño del tejido foliar; la forma de la mancha (regular, irregular), el color, lugar de la hoja en que iniciaba la infección, la textura y estructura de organismos.

En total se realizaron tres muestreos de hojas enfermas a los 56 (8 de septiembre 2009), 63 (15 de septiembre de 2009) y 70 días (22 de septiembre de 2009).

La colecta de hojas para evaluar la “mancha acuosa” fue tomada de la parte media de la planta. En cada uno de los muestreos se colectaron cuatro hojas por planta.

Las hojas muestreadas se almacenaron en bolsas de polietileno de 30 x 25 cm, se etiquetó y se refrigeró a una temperatura de 20 °C, se trasladaron al laboratorio de Fitopatología del Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco para su estudio.

#### **4. 7. Incidencia de la enfermedad**

En cada uno de los lotes plantados con jamaica, se evaluó la incidencia de la “mancha acuosa”, para esto se utilizó un muestreo sistemático en la plantación o cultivo, es decir, después de calcular el tamaño de muestra se seleccionaron al azar conforme a una tabla de números aleatorios 39 plantas en las cuales se realizaron evaluaciones de la enfermedades por medio de una observación detallada, estas cuantificaciones se llevaron a cabo cada 8 días a partir de la fecha de la aparición de la primera planta enferma, durante un periodo de hasta 30 días.

La Incidencia de la enfermedad (IE) se calculó cuantificando el número de plantas enfermas de la muestra seleccionada entre el tamaño de muestra según la fórmula citada por Nieto-Ángel *et al.* (2001) y modificada para esta prueba:

$$IE (\%) = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de plantas enfermas con síntoma de "mancha acuosa" en hojas}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de plantas muestreadas}} \times 100$$

Para conocer las condiciones ambientales prevalecientes durante el periodo de investigación se obtuvieron los datos diarios de Temperatura máxima y mínima y de precipitación de la estación meteorológica de la Comisión Nacional del Agua en Cárdenas, Tabasco, ubicada a un radio de 2 km de la zona de estudio. La información correspondió al mes de septiembre del 2009 donde la enfermedad estuvo presente. Para relacionar la presencia de la enfermedad con las variables ambientales se generaron la precipitación mensual acumulada y el rango de las temperaturas con su respectiva media mensual.

#### **4. 8. Determinación del agente causal**

Para determinar el agente causal de la “mancha acuosa” en hojas de jamaica, se procedió de la siguiente manera y en apego a probar los postulados de Koch basados en los principios Bauer (1987) y Agrios (2006).

1. El microorganismo debe estar presente en todos los individuos con la misma enfermedad.
2. El microorganismo debe ser recuperado del individuo enfermo y poder ser aislado en medio de cultivo.
3. El microorganismo proveniente de ese cultivo debe causar la misma enfermedad cuando se lo inocula a otro huésped.
4. El individuo experimentalmente infectado debe contener el microorganismo.

#### **4. 8. 1. Aislamiento del patógeno**

Para poder aislar los microorganismos presentes en el tejido dañado, se consideraron las recomendaciones de French y Herbert (1980), modificadas para esta prueba.

A partir de hojas sintomáticas que presentaron poco avance de la enfermedad, se seleccionó tejido donde se observó la zona de avance de la “mancha acuosa”. Se cortaron secciones de 0.5 cm<sup>2</sup>. Se desinfectó el material con hipoclorito de sodio al 2% (producto comercial) durante dos minutos con agitación constante, posteriormente se pasaron a tres recipientes con agua destilada esterilizada para eliminar los residuos de hipoclorito de sodio, después se secaron en papel filtro estéril. Una vez que los tejidos foliares fueron desinfectados se procedió a la siembra en el medio de cultivo papa dextrosa agar PDA contenido en cajas de petri bajo una cámara de flujo laminar e incubadas por 48 horas a 25 °C en oscuridad para esperar el crecimiento de los microorganismos, del síntoma de “mancha acuosa” se obtuvieron 225 aislamientos procedentes del follaje de las plantas del cultivo de jamaica establecidas en los lotes de observación ver (Apéndice 3).

#### **4. 8. 2. Purificación de cepas**

Las colonias desarrolladas se purificaron a través del método descrito por Valencia-Botín (2002), denominado punta de hifa, que consiste en tomar una hifa con una aguja o pinza de disección a partir del crecimiento externo del hongo y transferirlo a

medio de cultivo esto con la ayuda de un microscopio estereoscópico y bajo cámara de flujo laminar.

En el Cuadro 2 las cepas purificadas a partir de los aislamientos procedentes de los lotes de observación, las cuales se mantuvieron en medio de cultivo PDA (Apéndice 1) a una temperatura ambiente de  $25\pm 1$  °C. en una cámara de crecimiento y fueron empleados posteriormente para la identificación y las pruebas de patogenicidad.

**Cuadro 2.-** Aislamientos de tejido foliar con síntomas de “mancha acuosa” en las lotes de observación del cultivo de jamaica y cepas purificadas por punta de hifa.

| No. | Fecha     | Tipo   | Aislamientos | Cepas    |
|-----|-----------|--------|--------------|----------|
| 1   | 14-sep-09 | Tardía | MATJ-15      | MATJ15.2 |
| 2   | 21-sep-09 | Precoz | MAPJ-03      | MAPJ03.2 |
| 3   | 21-sep-09 | Precoz | MAPJ-07      | MAPJ07.4 |
| 4   | 21-sep-09 | Precoz | MAPJ-09      | MAPJ09.2 |
| 5   | 21-sep-09 | Precoz | MAPJ-11      | MAPJ11.3 |
| 6   | 21-sep-09 | Tardía | MATJ-20      | MATJ20.1 |
| 7   | 21-sep-09 | Tardía | MATJ-24      | MATJ24.1 |
| 8   | 21-sep-09 | Tardía | MATJ-27      | MATJ27.4 |
| 9   | 21-sep-09 | Tardía | MATJ-30      | MATJ30.2 |
| 10  | 28-sep-09 | Precoz | MAPJ-15      | MAPJ15.3 |
| 11  | 28-sep-09 | Precoz | MAPJ-27      | MAPJ27.2 |
| 12  | 28-sep-09 | Precoz | MAPJ-40      | MAPJ40.2 |
| 13  | 28-sep-09 | Precoz | MAPJ-52      | MAPJ52.4 |
| 14  | 28-sep-09 | Tardía | MATJ-38      | MATJ38.1 |
| 15  | 28-sep-09 | Tardía | MATJ-50      | MATJ50.2 |
| 16  | 28-sep-09 | Tardía | MATJ-55      | MATJ55.1 |
| 17  | 28-sep-09 | Tardía | MATJ-73      | MATJ73.1 |
| 18  | 05-oct-09 | Precoz | MAPJ-67      | MAPJ67.3 |
| 19  | 05-oct-09 | Precoz | MAPJ-80      | MAPJ80.3 |
| 20  | 05-oct-09 | Precoz | MAPJ-77      | MAPJ77.1 |
| 21  | 05-oct-09 | Precoz | MAPJ-96      | MAPJ96.1 |

|              |           |        |          |           |
|--------------|-----------|--------|----------|-----------|
| Continuación |           |        |          |           |
| 22           | 05-oct-09 | Tardía | MATJ-79  | MATJ79.3  |
| 23           | 05-oct-09 | Tardía | MATJ-88  | MATJ88.3  |
| 24           | 05-oct-09 | Tardía | MATJ-91  | MATJ91.4  |
| 25           | 05-oct-09 | Tardía | MATJ-116 | MATJ116.4 |

---

Nota: T= tardía; P= precoz

Los hongos se identificaron primeramente a nivel género mediante el uso de claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998).

### **4. 8. 3. Pruebas de patogenicidad**

#### **4. 8. 3. 1 Inoculación**

Para probar la patogeneidad del organismo aislado, se consideró realizar los postulados de Koch, siguiendo lo descrito por Valencia-Botín (2002).

En plantas juveniles de 30 días de edad de *H. sabdariffa* crecidas bajo condiciones de invernadero en suelo estéril. Se utilizaron cinco plantas y diez hojas por planta las cuales fueron inoculadas superficialmente con aplicación de discos de micelio de 0.5 cm de diámetro, obtenidos a partir de colonias de 10 días de edad a partir de jamaica tipo tardía debido a que las cepas de jamaica precoz presento problemas de conservación. Los discos de la cepa de jamaica tipo tardía MATJ91.4 fueron colocados sobre hojas con heridas provocadas artificialmente por punción con una aguja de disección estéril.

Cinco plantas adicionales fueron utilizadas como testigo. A estas solo se les causó la herida y colocaron discos de medio de cultivo PDA. Todas las plantas (incluyendo al testigo) fueron cubiertas con bolsas de polietileno de manera individual para proveer de humedad relativa y favorecer el establecimiento de la infección del patógeno. Las plantas se observaron cada 12 horas para poder registrar el desarrollo del síntoma.

#### **4. 8. 3. 2. Reaislamiento**

Una vez que se observan los síntomas, de “mancha acuosa” en las plantas, 12 para jamaica precoz y 36 horas después de la inoculación en la jamaica tipo tardía, se colectaron las hojas afectadas, y se procesaron de acuerdo a las técnicas de aislamiento de French y Herbert (1980) con el fin de hacer el reaislamiento del hongo inicialmente inoculado. Diariamente se observaron las cajas y después de 3 días, las cajas de Petri donde se observó el crecimiento del hongo se realizaron preparaciones semipermanentes, para confirmar su identificación.

#### **4. 8. 4. Identificación morfológica**

Después del reaislamiento, se compararon las características del crecimiento en el medio de cultivo y las características microscópicas del patógeno con las observadas en el aislamiento original. Observaciones morfológicas también fueron realizadas de cortes de tejido foliar con síntomas, con la finalidad de observar estructuras del patógeno. Los montajes se observaron al microscopio compuesto utilizando el objetivo de 40X. El hongo a nivel de género se identificó morfológicamente con las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998) de acuerdo con los criterios de:

morfología y color de colonia, picnidios, arreglo de las células conidiogénicas, tipo de conidiogénesis, y largo y ancho de conidios. Para este fin se emplearon colonias de 7 días de edad.

#### **4. 8. 5. Identificación molecular**

Las cepas fueron crecidas en medio líquido YEPD enriquecido (extracto de levadura al 1%, Dextrosa al 2% y peptona al 2% y 10µl de Vancomicina). Las cepas y el medio fueron contenidos en matraces de 125 ml de capacidad, con 25 ml de medio líquido e incubaron durante 96 h a temperatura ambiente, en agitación orbital a 150 rpm. Las células fueron cosechadas a partir de 3 ml de cultivo, en un microtubo de 1.5 ml.

##### **4. 8. 5. 1. Extracción de DNA cromosómico**

La extracción de DNA se realizó siguiendo la metodología descrita por Ausubel *et al.*, (1999). Las células fueron sometidas a lisis mecánica, agregando 0.3 g de perlas de vidrio (Ballotini 0.5 µm diámetro), 200µl de regulador de lisis (Tritón X-100 al 2%, SDS al 1%, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8.0 y EDTA 1 mM) y 200µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). La muestra se agitó vigorosamente en vortex durante 20 min hasta completar 20 ciclos con pulsos de 30 s en agitación y 30 s en baño de hielo. Posteriormente se adicionaron 200µl de regulador TE (Tris 10 mM, pH 8.0 y EDTA 1 mM) y se sometió a centrifugación.

La fase acuosa se transfirió a otro tubo de 1.5 ml al que se le agregaron 200µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), nuevamente se agitó en vortex por 30

s y se centrifugó (1200 revoluciones por 5min). El sobrenadante se recuperó y se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto, enfriado a -20 °C. La muestra se incubó a -20 °C durante 2 h, se centrifugó y eliminó el etanol residual se dejó evaporar a temperatura ambiente. El DNA se resuspendió en 400µl de regulador TE y se trató con 10µg RNAsa (Gibco BRL) a partir de una solución patrón de 10 mg/µL en Tris-HCl 0.01M, pH 7.5 y NaCl 0.015 M. La mezcla fue incubada a 37°C, durante 15 min Posteriormente, el DNA fue precipitado con 10µl de acetato de amonio 4 M y 2 volúmenes de etanol absoluto, a continuación se mezcló por inversión y se incubó a -20 °C durante 2 h, el etanol absoluto fue decantado y la pastilla de DNA fue lavada con 500µl de etanol al 75%. Finalmente, el DNA fue resuspendido en 20µl de agua ultra pura e incubado a 50 °C durante 10 min. El DNA se almacenó a -20 °C.

La concentración y pureza del DNA se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm y considerando que 1U  $A_{260}$  equivale a 50µg/mL de DNA de doble cadena. La calidad del DNA se determinó por la relación de absorbancias  $A_{260}/A_{280}$  (Sambrook, J. 1989).

#### **4. 8. 5. 2. Amplificación del gen ITS DNAr por PCR**

La amplificación del gen en la región ITS DNAr se usó como gen blanco para la identificación molecular de la cepa aislada. La amplificación fue realizada empleando los siguientes iniciadores universales:

- 1) ITS1-5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3'.
- 2) ITS4-5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'.

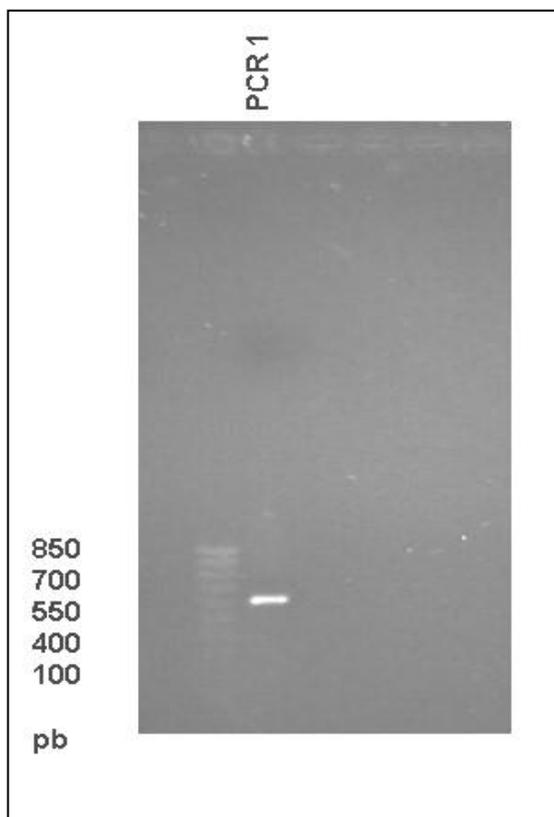
Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo con 10µg del DNA molde, en un volumen final de 25µl bajo la siguiente formulación: 16.3µl de agua grado PCR, regulador de reacción 1X, MgCl<sub>2</sub> 2mM, dNTPs 200mM, iniciadores 0.4 mM y 1U de Taq DNA polimerasa. El DNA fue amplificado en un termociclador Techgene® con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min; 35 ciclos de una desnaturalización a 94 °C por 1 min; alineamiento a 67 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min; y una extensión final a 72 °C por 5 min.

#### **4. 8. 5. 3. Electroforesis en geles de agarosa**

Los fragmentos de DNA amplificados fueron sometidos a electroforesis convencional en geles de agarosa, siguiendo el método descrito por Meyers *et al.*, (1993). Se prepararon geles horizontales de agarosa al 1.2% en regulador TAE 1X (Tris Base 40mM, ácido acético 20mM y EDTA 1 mM). El corrimiento electroforético fue llevado a cabo a 100 V, durante 1 h. El gel fue teñido con bromuro de etidio a una concentración de 0.5µg/mL en regulador TAE 1X, durante 15 min. Finalmente los geles fueron expuestos a luz UV en un transiluminador UV/Vis (MiniBis, Bio Imaging Systems), para visualizar los fragmentos de DNA amplificados. El tamaño de los fragmentos de DNA amplificados fue calculado por comparación con un marcador de DNA de talla molecular de 100 pb (Invitrogen) y con la ayuda del programa Sigma Gel Versión 1.0 (Jandel Scientific Co., 1995).

#### 4. 8. 5. 4. Purificación de los fragmentos de DNA amplificados

Los fragmentos de DNA amplificados fueron purificados empleando el kit QIAquick Gel Extracción Kit (250) QIAquick Spin Columns, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. El DNA fue diluido con 50 µl de agua grado PCR (Figura 5).



**Figura 5.-** Fragmentos de DNA amplificado por PCR con marcador de tamaño de fragmento 100pb invitrogen DNA Ladder-Gibco BRL. Pista PCR 1 cepa de *P. diplodiella* proveniente del cultivo de Jamaica.

#### 4. 8. 6. Secuenciación del DNA purificado

El producto de PCR purificado fue enviado para secuenciación al Instituto de Biotecnología de Universidad Nacional Autónoma de México. La secuencia de DNA obtenida se analizó con el software Chromas Versión 2.31 (Technelysium Pty Ltd.) y

se alineó con la base de datos del banco de genes utilizando el método Blast National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2010) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, consultada en octubre 2010).

#### **4. 8. 6. 1. Línearización de las secuencias**

Las secuencias nucleotídicas codificantes de genes ITS DNAr de hongos descritas y depositadas en la base de datos de la NBCI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), fueron alineadas con las secuencias de los fragmentos amplificados de la cepa PCR1-ITS1 aislada. Los alineamientos múltiples de secuencias nucleotídicas se realizaron con el programa CLUSTAL X versión 1.8 (Thompson *et al.*, 1997). La edición de los alineamientos se realizó con el programa GeneDoc versión 2.3 (Nicholas y Nicholas, 1997).

#### **4. 9. Establecimiento de Dendrogramas o árbol de similitud**

Con la última linearización se estableció un árbol de similitud con el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analisis) versión 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) utilizando el método de agrupamiento de Neighbour-joining con el índice Poisson (P) y se valoraron estadísticamente para lo cual se hicieron 1000 aleatorización tipo "bootstrap". Con base a la organización de este dendrograma filogenético se determinó la especie asociada al aislamiento en el cultivo de jamaica.

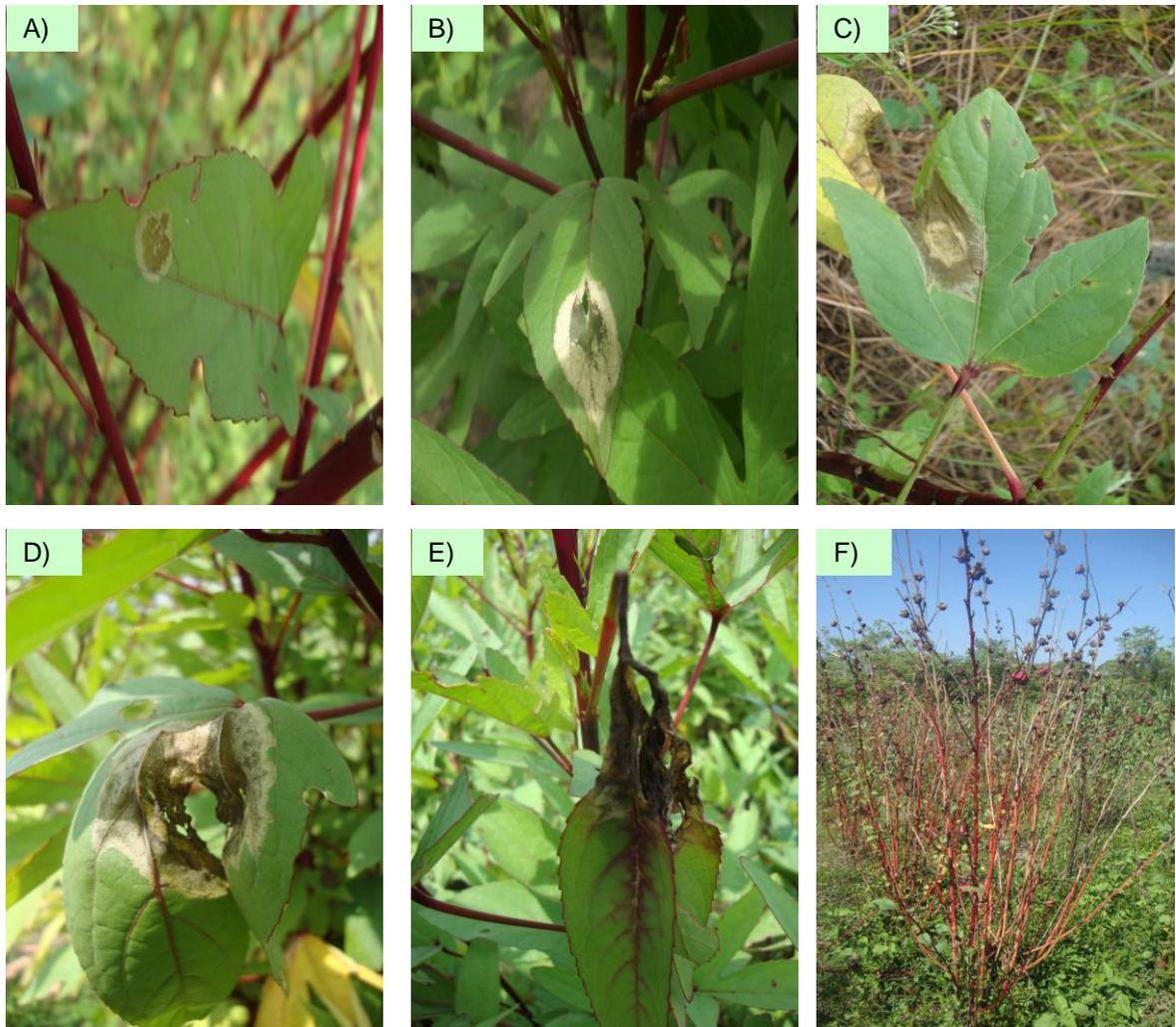
## 5. RESULTADOS Y DISCUSION

### 5. 1. Caracterización de síntomas de la “mancha acuosa”

En las plantas de ambos tipos de jamaica (tardía y precoz) sembradas en el municipio de Cárdenas, Tabasco se presentó la enfermedad “mancha acuosa”, mostrando el siguiente patrón de síntomas.

Las plantas enfermas inicialmente registraban la presencia de pequeñas manchas circulares (de 2 mm de diámetro) de color blanco a crema en el haz de las hojas; 24 horas después, la mancha circular se tornaba a color café claro y a su alrededor aumentaba el área necrosada, misma que al avanzar el tejido afectado este adquirió una apariencia flácida y húmeda (de donde se toma la característica de acuosa del nombre asignado). Asimismo, se observó la formación de anillos irregulares concéntricos sobre el tejido de aspecto suave y de color café claro. Posteriormente a que la lámina foliar fuese totalmente invadida, se observó necrosis del peciolo y finalizando con la caída de las hojas (Figura 6).

Los anillos concéntricos referidos en la necrosis foliar del 100% de las hojas según el análisis microscópico corresponden a la formación de picnidios (Figura 6) estructura que indica el desarrollo de ciclos secundarios de un hongo.



**Figura 6.-** Síntomas de la “mancha acuosa” en Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). A) Mancha foliar, B) Apariencia acuosa, C) presencia de anillos descoloridos, D) invasión del tejido y E) peciolo provocando el secado de la hoja, F) defoliación de la planta.

## 5. 2. Incidencia de la enfermedad

Las primeras planta con síntomas de “mancha acuosa” se observaron a los 56 días después de la siembra, cuando las plantas estaban en etapa de desarrollo vegetativo. Dichos síntomas se registraban en cuatro de las 39 plantas de jamaica tipo tardía seleccionadas como muestra del lote evaluado, es decir un 10.26%. El segundo muestreo fue realizado 63 días después (15 de septiembre de 2009) la

enfermedad incidía en diez plantas de jamaica tardía. En este mismo muestreo, se registraron las primeras siete plantas enfermas de la jamaica precoz. El 100% de plantas enfermas, se registró en el tercer muestreo; a los 70 días después del trasplante de ambos tipos de especies de jamaica, que indicaba una alta tasa de desarrollo de la enfermedad. En el Cuadro 3, se presenta el porcentaje de incidencia por muestreo y por tipo de jamaica.

**Cuadro 3.-** Porcentaje de incidencia de la “mancha acuosa” en jamaica tipo precoz y tardía de plantas en campo, durante el periodo de estudio (julio-noviembre de 2009).

| TIEMPO DE MUESTREO | ENFERMAS |        |         |        | INCIDENCIA (%) |        |
|--------------------|----------|--------|---------|--------|----------------|--------|
|                    | HOJAS    |        | PLANTAS |        | PLANTAS        |        |
|                    | PRECOZ   | TARDÍA | PRECOZ  | TARDÍA | TARDIA         | PRECOZ |
| 56                 | 4        | 0      | 4       | 0      | 10.26          | 0.00   |
| 63                 | 29       | 17     | 10      | 7      | 25.64          | 17.95  |
| 70                 | 156      | 156    | 39      | 39     | 100.00         | 100.00 |

Durante el periodo de observación las condiciones ambientales se caracterizaron por ser en promedio de altas temperaturas con una precipitación mensual acumulada de 101.14mm y rangos de temperaturas mínima y máxima de 22 a 37 °C con media de 27 °C. Características favorables para el desarrollo de enfermedades de origen fungoso (Apéndice 2).

El patrón de síntomas que se manifiestan en las hojas de las plantas enfermas de jamaica, no corresponden a los descritos para alguna de las enfermedades reportadas en estudios previo en el cultivo de jamaica en Tabasco (Murillo-De La Rosa, 2007) ni en otros estados de México (Hernández-Morales *et al.*, 2008;

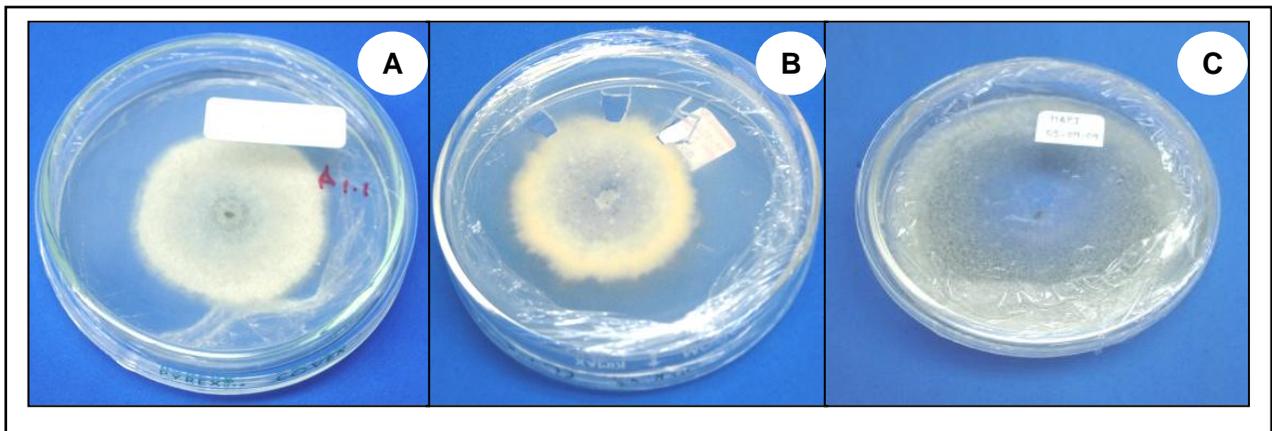
González-Satín, 2008; Escalante-Estrada, 2001; Hernández-Morales, 1988). Sin embargo si se asemeja parcialmente a lo reportado por Persad y Fourte (1989) en Trinidad y Tobago para el cultivo de *Hibiscus sabdariffa* var. *Sabdariffa* en donde las plantas afectadas presentan inicialmente pequeñas lesiones irregulares, de color marrón claro en las hojas inferiores de las plantas, aumentando de tamaño, blanqueando el tejido de la hoja, extendiéndose por la superficie, el tejido infectado se necrosó, a partir de estas hojas necrosadas a los pocos días se formaban picnidios negro. La afección descrita alcanzaba rápidamente una amplia incidencia y grado de severidad muy alto, caracterizado por una defoliación completa de las plantas.

Igualmente McClintonk y El Tahir (2004) en el centro de África, Nigeria, región del Caribe y la India describieron otras infecciones en hojas y cálices del cultivo de jamaica, la presencia de lesiones irregulares de color marrón pálido en hojas inferiores aumentando de tamaño, la cual cubrió la superficie, resultando en la necrosis de los tejidos afectados. Patrón de síntomas que se asemejan parcialmente a lo observado en las plantas de jamaica enfermas en Cárdenas, Tabasco.

Así, considerando que los síntomas descritos por McClintonk y El Tahir (2004) y Persad y Fourte (1989) tienen semejanza parcial en las secuencias de los síntomas observados en el presente estudio. Esto sustentó la hipótesis de la presencia de una nueva enfermedad en jamaica en los lotes de observación; por lo cual se continuó con las pruebas de los postulados de Koch.

### 5. 3. Aislamiento del organismo asociado a la “mancha acuosa”

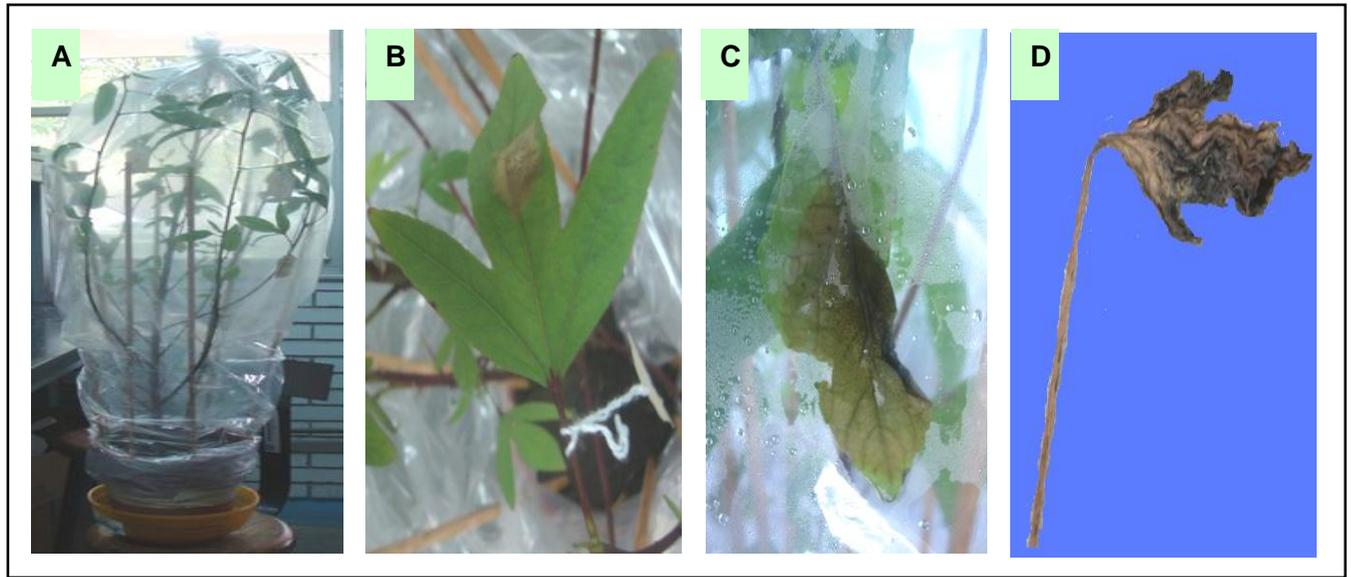
Del tejido foliar enfermo se lograron obtener un total de 25 aislamientos. Los hongos aislados de plantas con síntomas de “mancha acuosa” producen colonias circulares, el crecimiento de un hongo gris claro con un suave micelio blanquecino superficial y de aspecto aterciopelado (Figura 7A) y color miel al reverso (Figura 7B). Después de siete días de incubación a 25 °C de temperatura promedio la colonia cubrió completamente la superficie de la caja Petri con medio de cultivo PDA. Al tercer día después de la siembra se observó la producción de numerosos cuerpos fructíferos asexuales (picnidios) de color castaño oscuro a negro (Figura 7C).



**Figura 7.-** Desarrollo de la colonia de *cepas* asociada a la “mancha acuosa” en plantas de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) A) Crecimiento micelial, B) Tonalidad miel, C) Caja totalmente cubierta por el patógeno.

### 5. 4. Prueba de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad realizadas en invernadero en plantas de jamaica (precoz y tardía) de 30 días de desarrollo, con la cepa MATJ 91.4 aisladas en tejidos foliares asociados al síntoma de la “mancha acuosa”, se presentan en la Figura 8.



**Figura 8.-** Pruebas de patogenicidad sobre Jamaica (*H. sabdariffa*). A). Plantas de Jamaica inoculada en cámara húmeda, B) mancha foliar, C) avance de la necrosis de color marrón y apariencia acuosa, D) hoja desprendida totalmente necrosada.

Las plantas precoces inoculadas presentaron los primeros síntomas de la enfermedad 12 horas después de la inoculación (Cuadro 4). Las plantas de jamaica tipo tardías inoculadas presentaron los primeros síntomas de la enfermedad 36 horas después de la inoculación (Cuadro 5). En estas plantas, las hojas inicialmente mostraron síntomas de manchas foliares circulares a irregulares color blanco a crema; después las manchas se tornaron de color café claro. Y las hojas tomaron la apariencia flácida. Posteriormente, en el tejido necrosado se puede observar la presencia de anillos concéntricos, iniciando la producción de picnidios. Estos cuerpos inicialmente tenían apariencia color café oscuro a negro. Entre los cinco y seis días después de la inoculación, la necrosis abarcó toda la lámina foliar, y se dió la caída de las hojas para todas las plantas inoculadas tanto en las tipo tardía como en las precoces (Figura 8).

**Cuadro 4.-** Incidencia acumulada, temperatura y horas de aparición del síntoma de la enfermedad después de la inoculación de la hoja de jamaica tipo precoz.

| Fecha de muestreo | Temperatura (° C) | Horas | Incidencia (hojas)             |       |       |       |       |
|-------------------|-------------------|-------|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|
|                   |                   |       | Plantas inoculadas con heridas |       |       |       |       |
|                   |                   |       | 1                              | 2     | 3     | 4     | 5     |
| 28/11/2009        | 23                | 0     | 0                              | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 29/11/2009        | 24.3              | 12    | 10/10                          | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |

**Cuadro 5.-** Incidencia acumulada, temperatura y horas de aparición del síntoma de la enfermedad después de la inoculación de la hoja de jamaica tipo tardía.

| Fecha de muestreo | Temperatura (° C) | Horas | Incidencia (hojas)             |       |       |       |       |
|-------------------|-------------------|-------|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|
|                   |                   |       | Plantas inoculadas con heridas |       |       |       |       |
|                   |                   |       | 1                              | 2     | 3     | 4     | 5     |
| 28/11/2009        | 23                | 0     | 0                              | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 29/11/2009        | 24.3              | 12    | 0                              | 0     | 0     | 0     | 0     |
|                   |                   | 24    | 0                              | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 30/11/2009        | 23                | 36    | 2/10                           | 2/10  | 1/10  | 3/10  | 3/10  |
|                   |                   | 48    | 2/10                           | 2/10  | 2/10  | 4/10  | 4/10  |
| 01/12/2009        | 24                | 60    | 4/10                           | 4/10  | 3/10  | 7/10  | 8/10  |
|                   |                   | 72    | 6/10                           | 7/10  | 5/10  | 10/10 | 10/10 |
| 02/12/2009        | 26                | 84    | 8/10                           | 8/10  | 7/10  | 10/10 | 10/10 |
|                   |                   | 96    | 10/10                          | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |

En el Cuadro 5, se presenta las observaciones del número de hojas inoculadas con presencia de síntomas típicos de la “mancha acuosa” por cada una de las cinco plantas tardías empleadas en el ensayo. Además se presenta la temperatura promedio diaria.

El patrón de síntomas desarrollados por las plantas tanto precoces como tardías en las pruebas de patogenicidad coincidió completamente con los síntomas observados

en campo. Por los que se puede asegurar que el organismo empleado en dichas pruebas forma parte de la etiología de la enfermedad estudiada.

## **5. 5. Identificación del organismo asociado a la “mancha acuosa”**

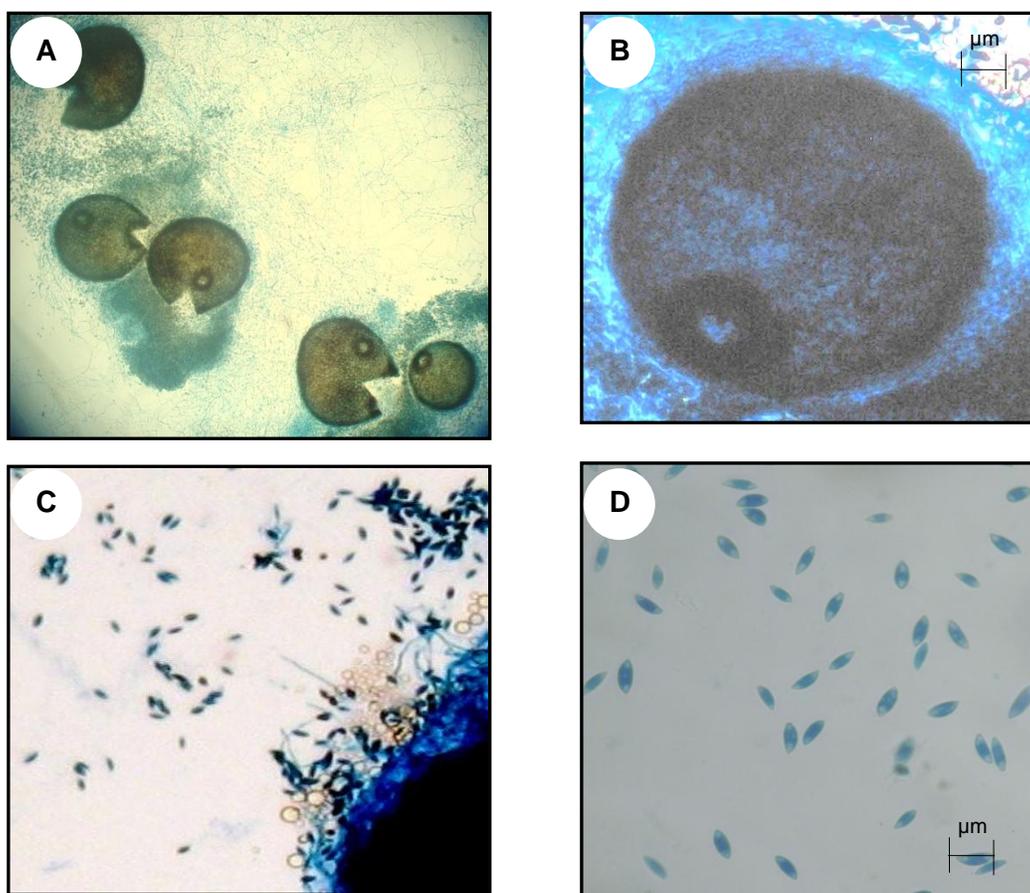
La identificación del organismo asociado a la “mancha acuosa” en el cultivo de jamaica se realizó de dos formas: morfológica y molecular.

### **5. 5. 1. Identificación morfológica**

Las colonias estaban constituidas de un micelio septado y de color hialino. Además presentaron la formación de picnidios de color café oscuro a negro, de forma globosa a subglobosa de 247.8  $\mu\text{m}$  de largo x 237.2  $\mu\text{m}$  de ancho (Cuadro 6), con ostiolos circulares centrales con aberturas o poros (Figura 9A), para los asilamientos procedentes de campo; mientras que para las cepas reisladas de las pruebas de patogenicidad las dimensiones de los picnidio fueron de 250.0  $\mu\text{m}$  de largo x 233.1  $\mu\text{m}$  de ancho (Cuadro 7). Los picnidios presentaban la formación de una masa de conidios centrales (Figura 9B), conidióforos densos, delgados, simples o ramificados (Figura 9C), conidios hialinos que varían a café claro cuando maduran, inequilaterales, lisos, elipsoidales, de forma elíptica a ovalada, (Figura 9D) presentan una medida de 13.0  $\mu\text{m}$  largo y ancho de 5.9  $\mu\text{m}$  en los asilamientos de campo y de 13.2  $\mu\text{m}$  de largo por 6.0  $\mu\text{m}$  de ancho en las obtenidas a partir de las pruebas de patogenicidad. Las dimensiones promedio de picnidios, el tamaño y forma de los conidios; además, de los tipos de colonias observados fueron semejantes a las

descritas por Barnett & Hunter, (1998), Holliday (1995) y Alexopoulos, (1985), Koneman *et al.* (2006), para el género *Phoma*.

En los Cuadros 6 y 7, se presenta la descripción de los aislamientos realizados en campo y de los reaislamientos obtenidos a partir de las pruebas de patogenicidad y sus promedios de largo y ancho de picnidios y de conidios.



**Figura 9.-** Apariencia externa del hongo asociado a la mancha acuosa en plantas del cultivo de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), A) Picnidios, B) Ostiolos C) Conodióforos y D) Conidios.

**Cuadro 6.-** Medias de largo y ancho de conidios y picnidios del hongo asociados la “mancha acuosa” de la hoja de jamaica, procedentes de campo.

| NÚMERO DE MEDICIONES      | CEPAS     | CONIDIOS (µm) |            | PICNIDIOS (µm) |              |
|---------------------------|-----------|---------------|------------|----------------|--------------|
|                           |           | LARGO         | ANCHO      | LARGO          | ANCHO        |
| 1                         | MATJ15.2  | 13.5          | 6.3        | 300            | 280.9        |
| 2                         | MAPJ03.2  | 11.8          | 5.0        | 296.1          | 280.1        |
| 3                         | MAPJ07.4  | 12.6          | 5.6        | 240.9          | 229.7        |
| 4                         | MAPJ09.2  | 10.1          | 5.2        | 233.4          | 213.5        |
| 5                         | MAPJ11.3  | 16.0          | 6.9        | 223.9          | 209.3        |
| 6                         | MATJ20.1  | 13.3          | 6.2        | 243.8          | 237.5        |
| 7                         | MATJ24.1  | 15.9          | 6.7        | 299.6          | 285.7        |
| 8                         | MATJ27.4  | 12.7          | 5.5        | 248.5          | 268.4        |
| 9                         | MATJ30.2  | 11.4          | 5.1        | 237.3          | 223.7        |
| 10                        | MAPJ15.3  | 13.1          | 6.1        | 229.9          | 202.7        |
| 11                        | MAPJ27.2  | 10.2          | 5.4        | 279.2          | 269.3        |
| 12                        | MAPJ40.2  | 15.8          | 6.9        | 299.3          | 287.2        |
| 13                        | MAPJ52.4  | 14.2          | 5.9        | 273.7          | 251.5        |
| 14                        | MATJ38.1  | 12.4          | 5.6        | 257.6          | 249.8        |
| 15                        | MATJ50.2  | 13.9          | 6.6        | 219.8          | 201.4        |
| 16                        | MATJ55.1  | 11.8          | 5.4        | 240.3          | 234.9        |
| 17                        | MATJ73.1  | 10.9          | 5.1        | 230.1          | 214.1        |
| 18                        | MAPJ67.3  | 12.9          | 5.9        | 239.6          | 227.3        |
| 19                        | MAPJ80.3  | 14.6          | 6.8        | 244.9          | 233.2        |
| 20                        | MAPJ77.1  | 10.0          | 5.1        | 237.8          | 228.2        |
| 21                        | MAPJ96.1  | 10.4          | 5.2        | 223.2          | 208.5        |
| 22                        | MATJ79.3  | 11.9          | 5.5        | 227.6          | 206.1        |
| 23                        | MATJ88.3  | 12.5          | 6.1        | 236.4          | 220.8        |
| 24                        | MATJ91.4  | 16.1          | 7.0        | 265.9          | 254.1        |
| 25                        | MATJ116.4 | 15.9          | 6.5        | 218.2          | 211.9        |
| <b>PROMEDIO DE MEDIAS</b> |           | <b>13.0</b>   | <b>5.9</b> | <b>247.8</b>   | <b>237.2</b> |

Nota: T= tardía; P= precoz

**Cuadro 7.-** Medidas de conidios y picnidios del patógeno asociados la “mancha acuosa” de la hoja de jamaica, de reaíslamientos procedentes de las pruebas de patogenicidad en invernadero.

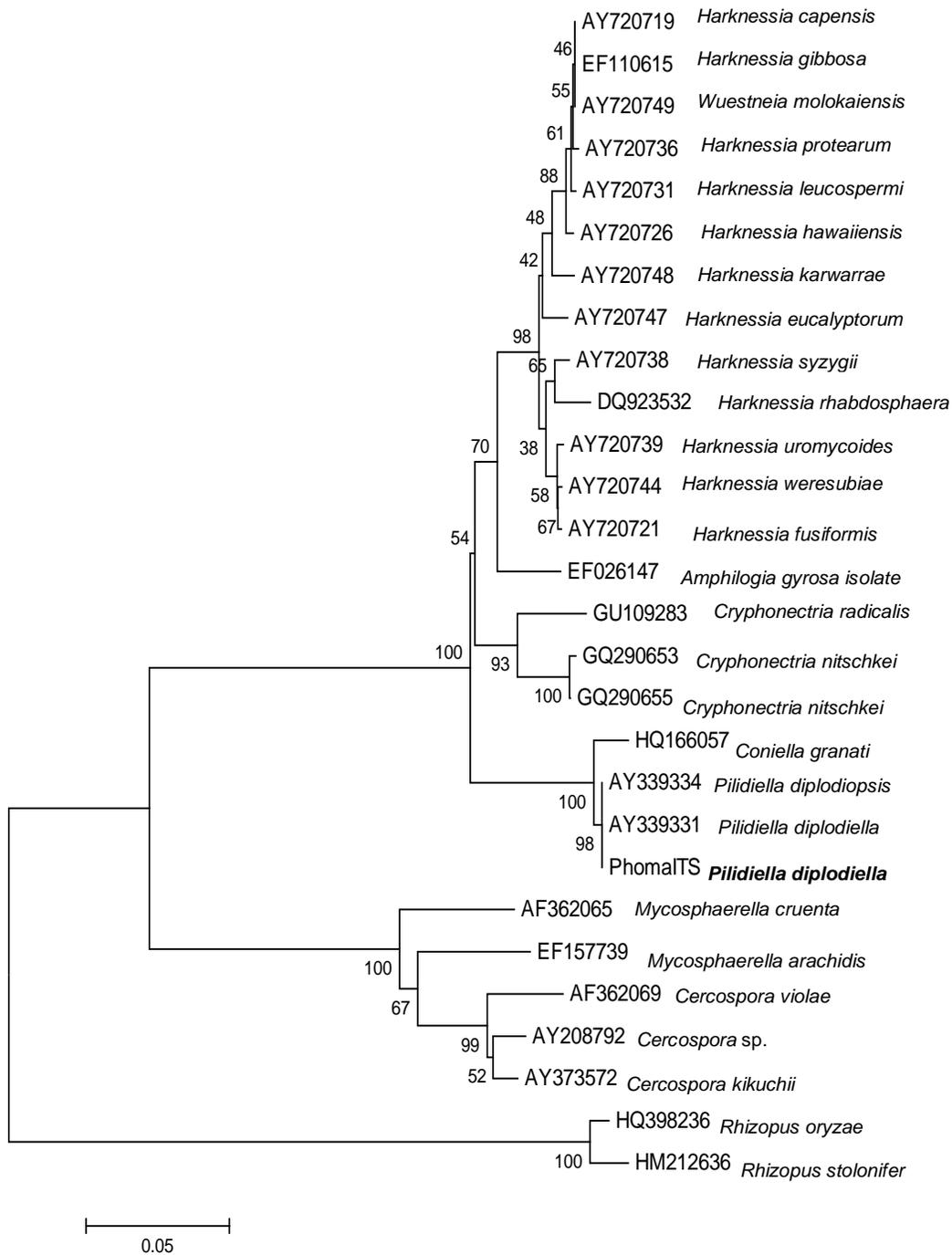
| NÚMERO DE MEDICIONES      | CEPA AISLAMIENTO | CONIDIOS (µm) |            | PICNIDIOS(µm) |              |
|---------------------------|------------------|---------------|------------|---------------|--------------|
|                           |                  | LARGO         | ANCHO      | LARGO         | ANCHO        |
| 1                         | MATJS-1.3        | 10.0          | 5.1        | 231.6         | 233.5        |
| 2                         | MATJS-1.5        | 10.3          | 5.2        | 226.8         | 200.3        |
| 3                         | MATJS-1.7        | 13.6          | 6.2        | 201           | 193.5        |
| 4                         | MATJS-1.6        | 12.9          | 5.9        | 300.9         | 282          |
| 5                         | MATJS-1.9        | 14.8          | 6.5        | 297.2         | 200.1        |
| 6                         | MATJS-2.1        | 11.9          | 5.7        | 297.6         | 286.2        |
| 7                         | MATJS-2.3        | 14.5          | 6.9        | 279.8         | 255          |
| 8                         | MATJS-2.4        | 11.7          | 5.3        | 268.5         | 248.1        |
| 9                         | MATJS-2.7        | 14.3          | 6.7        | 283.1         | 277          |
| 10                        | MATJS-2.2        | 12.9          | 5.3        | 299.3         | 282.5        |
| 11                        | MATJS-3.2        | 13.6          | 6.5        | 265           | 257.7        |
| 12                        | MATJS-3.4        | 12.5          | 5.6        | 249.1         | 226          |
| 13                        | MATJS-3.6        | 12.4          | 5.9        | 259.9         | 236.4        |
| 14                        | MATJS-3.7        | 12.0          | 5.5        | 247.1         | 229.8        |
| 15                        | MATJS-3.9        | 11.2          | 5.7        | 222.3         | 198.6        |
| 16                        | MAPJS-4.3        | 15.8          | 7.0        | 210           | 189          |
| 17                        | MAPJS-4.7        | 16.2          | 7.0        | 234           | 223.3        |
| 18                        | MAPJS-4.35       | 12.4          | 5.3        | 209.8         | 167.9        |
| 19                        | MAPJS-4.37       | 12.8          | 5.1        | 239.3         | 234.9        |
| 20                        | MAPJS-4.10       | 13.6          | 6.3        | 217.7         | 208.4        |
| 21                        | MAPJS-5.4        | 13.8          | 6.8        | 243.8         | 228.8        |
| 22                        | MAPJS-5.2        | 15.5          | 6.9        | 298.5         | 286.2        |
| 23                        | MAPJS -5.5       | 14.8          | 6.1        | 246.5         | 233.7        |
| 24                        | MAPJS-5.7        | 12.8          | 5.8        | 238.7         | 231.9        |
| 25                        | MAPJS-5.8        | 12.8          | 5.9        | 200.9         | 189.2        |
| <b>PROMEDIO DE MEDIAS</b> |                  | <b>13.2</b>   | <b>6.0</b> | <b>250.0</b>  | <b>233.1</b> |

Nota: T= tardía; P= precoz

### 5. 5. 2. Identificación Molecular

El aislamiento del ADN permitió comparar la secuencia de nucleótidos obtenida del cepa MATJS-3.7, respecto a las secuencias de especies depositadas en el Banco de Genes del NCBI, se obtuvo 99% de similitud con el hongo *Pilidiella diploidiella* con número de acceso AY339331 (Figura 10).

De acuerdo con Van Niekerk *et al.* (2004) *P. diplodiella* es sinónimo de *Phoma diplodiella* (Speg.); *Coniothyrium diplodiella* (Speg.) y *Coniella diplodiella* (Speg.). Estos resultados confirman a *Pilidiella diplodiella* como la especie de hongo asociada a la “mancha acuosa” del cultivo de jamaica en Cárdenas, Tabasco México. Así, nuestros resultados morfológicos previos que identificaron al hongo patógeno como *Phoma* sp queda explícito por la sinonimia señalada por Van Niekerk *et al.* (2004) y nuestros datos moleculares que se trata mas bien de *Pilidiella diplodiella*.



**Figura 10.-** Relaciones de similitud de las secuencias nucleotídicas de aislamientos de *Pilidiella diplodiella* en el cultivo de jamaica amplificada por PCR-ITS rADN con los iniciadores ITS1 e ITS4, y sus secuencias agrupadas con el software MEGA 4, que fue comparada filogenéticamente con un análisis basado en el dato de su secuencia nucleotídica con 1000 aleatorizaciones tipo bootstrap, por medio de métodos de distancia y usando el índice P (Poisson) y el método de agrupamiento de Neighbor-joining.

Van Niekerk *et al.* (2004) precisa además que *Pilidiella* corresponde a un género anamorfo con distribución cosmopolita e incluye especies fitopatógenas que causan enfermedades en hojas, ramas y raíces sobre una amplia variedad de hospederos (Van Niekerk *et al.*, 2004) y Maas *et al.* (1979) relacionan a *Pilidiella* con el teleomorfos del género *Schizoparme* (Orden: Diaporthales). De acuerdo con Bisby (2007) la clasificación de *P. diplodiella* es la siguiente:

**Reino:** Fungi

**Phyllum:** Ascomycota

**Clase:** Sordariomycetes

**Subclase:** Sordariomycetidae

**Orden:** Diaporthales

**Familia:** Schizoparmaceae

**Género:** *Pilidiella*

**Especie:** *Pilidiella diplodiella*

*Pilidella diplodiella* como *Coniothyrium diplodiella*, fue reportada por primera vez en el cultivo de la vid en Italia en 1878, y en 1887 causó graves pérdidas en Francia (Ponti, *et al.*, 2003). En Sudáfrica se reportó como *Coniella diplodiella* en 1977 por Verbeek en el Annual Report of the Secretary for Agricultural Services (Crous y Cartens, 2000); un segundo reporte en Sudáfrica fue publicado por Matthee y Thomas (1981), también ha sido reportado en países como: China (Chen *et al.*,

1979; Liu *et al.*, 1999), Corea, Japón, Grecia, Alemania, Australia e India (Sutton *et al.*, 1992; Crous *et al.*, 2000).

Van Niekerk *et al.* (2004) confirma que *P. diplodiella* ocurre sobre vid en Sudáfrica. *P. diplodiella* como *Coniella diplodiella* fue reportado en *Rosa* sp, *Anogeisus latifolia*, *Geranium* sp. en la India por Singh *et al.* (1966), y en *Pisum sativum* para Australia por Shreemali (1973) y en plantas de *Citrus aurantifolia* en México por McGuire y Grandall (1967). Por otro lado Ponti *et al.* (2003) señala que *Pilidiella diplodiella* se encuentra en todas las áreas donde se cultiva la vid a nivel mundial.

El género *P. diplodiella* fue reportado como *Coniella* en *Hibiscus cannabinus* por Khatura y Maiti (1978) en Nigeria y por Abbas *et al.* (2004) en Bengal. Mientras que en estudios realizados por Persad y Fortune (1989) lo describen como *Coniella musaseae* causando manchas foliares y fuertes desfoliaciones para *Hibiscus sabdariffa* en Trinidad y Tobago. Por su parte McClintock y El Tahir (2004), lo mencionan como el causante de las lesiones irregulares, color marrón claro que aparecen en hojas y cálices de jamaica en la región del Caribe.

Martínez-Sánchez (2010) reporta a *Coniella* por primera vez en México en cálices de jamaica en las cuales provocó la aparición de manchas necróticas de 29.2 mm<sup>2</sup> en promedio, de forma circular ovoide, color negro. Sin embargo, no se ha encontrado ningún reporte de *P. diplodiella* relacionada con el manchado de la hoja en las diferentes regiones productoras de *Hibiscus sabdariffa* L. en el mundo. Lo que

confirma la hipótesis que la “mancha acuosa” es una nueva enfermedad de la jamaica registrada por primera vez para México en Cárdenas Tabasco.

De acuerdo con Turian (1954) y Faes *et al.* (1932), en el cultivo de vid, *Phoma diplodiella* forma picnidios que descargan un gran número de conidios (~80,000/picnidio). Los conidios se dispersan por el viento y por la lluvia. Su periodo de incubación es de solo 12 h y la infección puede dispersarse al pedicelo en 48 h. Igualmente Rafaila *et al.* (1968) señala que Los conidios germinan con temperaturas que oscilan entre los 20 a 32 °C y la infección es favorecida por alta humedad relativa (90–100%), sin embargo los conidios pueden sobrevivir por más de 2 años en el suelo, de 2 a 3 años en residuos de cosecha y de 11 a 16 años en condiciones secas o frías (Turian, 1954; Faes *et al.*, 1932).

Considerando que en nuestro estudio se presentó el ataque de *Pilidiella diplodiella* sinónimo de *Phoma diploidiella* (Van Niekerk *et al.*, 2004), esto explicaría la rápida manifestación de los síntomas obtenidos en campo y en las pruebas de patogenicidad. Asimismo, las condiciones de humedad y temperatura registradas en la zona de estudio se manifiestan a favor del ataque severo de este nuevo organismo que se manifestó en las siembras de jamaica en Cárdenas Tabasco. Esto indica que investigaciones relacionadas con la etiología y factores abióticos causales de la enfermedad deberán seguir realizándose en el cultivo de jamaica en la región de estudio.

## 6. CONCLUSIONES

- Los síntomas iniciales de la enfermedad “mancha acuosa” en hojas de plantas de jamaica son: manchas foliares circulares e irregulares con centro de color marrón claro que al avanzar adquieren apariencia acuosa, posteriormente se observan anillos concéntricos de consistencia suave, en estas lesiones se encuentran los picnidios del hongo. Al avanzar la necrosis al peciolo provoca el secado de la hoja y la defoliación total.
- El agente causal de la enfermedad “mancha acuosa” de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Tabasco, México es el hongo *Pilidiella diplodiella*, y constituyen el primer reporte de *P. diplodiella* causando una enfermedad en el cultivo de jamaica.

## 7. LITERATURA CITADA

Abbas, S.Q., Sutton, B.C., Ghaffar, A. and Abbas, A. 2004. *Cytopleastrum* Gen. Nov., an addiccion to Coelomycetes from Pakistan. *Pakistan Journal Botanic*, 36(2): 457-461.

Adenji, M.O. 1970. Root and tem rot of the fiber crop Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Nigeria. *Pl. Dis. Rptr.* 54(1): 23-25.

Agrios, N.G. 2006. *Fitopatología*. Segunda Edición. Limusa, S. A. de C. V. México. 759p.

Ahumed, M.M. 2007. The Effect of Feeding Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) Seed on Broiler Chick's Performance. *Journal of Animal and Veterinary Sciences*. 2: 21-23.

Amusa, N.A.; Adegbite, A.A.; Oladapo, M.O. 2005. Vascular Wilt of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) in the Humid Forest Región of South- western Nigeria. *Plant Pathology Journal* 4(2): 122-125.

Aquiahuatl-Ramos, M.A.; Perez-Chabela, M.L. 2004. *Manual de practicas del laboratorio de microbiología general*. primera edición. Universidad Autonoma Metropolitana unidad Iztapalapa. México D.F. 123p.

Arias-Trinidad, A. 2008. Evaluación toxicología de suelos afectados por petróleo a partir de plantas y plántulas de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis de licenciatura. Universidad Popular de la Chontalpa, H. Cárdenas, Tabasco, México. 68p.

Augstburger, F., Berger, J., Censkowsky, U., Heid, P., Milz, J., and Streit, C. 2000. *Organic farming in the tropics and subtropics, guides 18 crops*. First edition. Association Naturland e. V., Bavaria, Germany. 13p.

Ausubel, F.M. 1999. *Short Protocols in Molecular Biology*: a compendium of methods from Current protocols in molecular biology. 4th Edition. Wiley. Michigan, USA. 1104p.

Ayra, L., Cabrera, I., Gómez, M., Hernández, D. 2007. Empleo de marcadores bioquímicos y de DNA en la caracterización molecular de hongos entomopatógenos. Dpto. de ácaros y hongos entomopatógenos, Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT). Habana.

Barnett, H.L. and Hunter, B.B. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Fourth edition. APS Press. St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.

Bridge, P.D., Arora, D.K. Reddy, C.A. and Elander, R.P. 1998. *Applications of PCR in Mycology*. CAB International. Oxon, UK. 357p.

Bauer, M.L. 1987. *Fitopatología*. Ed. Limusa. México. 384 p.

Carvajal, O.; Waliszewski, S.; Infanzón, R.M. 2006. Los usos y maravillas de la jamaica. *La Ciencia y el hombre revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana* 19 (2): 20-25.

Carrero, J.M.; Planes, S. 2008. *Plagas del campo*. 13a. Edición Rev. Ampl. Madrid, España. 775 p.

Castro-Medina, M. 2002. Análisis de la comercialización de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) al mercado de la unión Europea. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Económico-Administrativas, Chapingo edo. de México. 91p.

Chen, T.W., Ye, Y.F., Peng, F.Y. and Shiao, T.M. 1979. Studies on the white rot (*Coniothyrium diplodiella* (Speg.) Sacc.) of grapevine. The occurrence of white rot of

grapevine in relation to the microclimate of vine yard. *Acta Phytophylacica Sinica* 6(3): 9–18.

Chen, C.C., Hsu, J.D., Wang, S.F., Chiang, H.C., Yang, M.Y., Kao, E. S., Ho Y.C., Wang, C.J. 2003. *Hibiscus sabdariffa* extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51: 5472-5477.

Crous, P.W. and Carstens, E. 2000. Confusion surrounding white rot disease of grapevines. *Winelands* 9: 89–90.

Crous, P.W., Phillips, A.J.L. and Baxter, A.P. 2000. *Phytopathogenic Fungi from South África*. University of Stellenbosch, Department of Plant Pathology Press, New York, USA. 358 p.

Costa J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Servicio de Microbiología. Hospital Clínica Provincial. Barcelona. España. Cap12.

Domínguez-López, A., Remondetto-Gabriel, E., Navarro-Galindo, S. 2008. Thermal kinetic degradation of anthocyanins in a roselle (*Hibiscussabdariffa* L. cv .Criollo.) Infusión. *International Journal of Food Science and Technology*.43: 322-325.

Dunlap, V.C. 1945. Launching new crops. Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) In Wilson, C.M. compilation. *New crops for new world*. The Macmillan Company. New York. 284-285.

El Afri, M.F. and Prinz, R.S. 1979. Morphology studies in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var *sabdariffae*). *Trope landwisch* 1 (80): 83-93.

Escalante-Estrada, Y.I. 2001. Variabilidad patogénica de *Phytophthora parasitica* Dastur en jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). Revista Mexicana de Fitopatología. 19(1): 84-89.

Faes, H., Staehelin, M., Bovey, P. 1932. The campaign against fungous and insect parasites of the Vine in 1930 and 1931. Ann. Agric. de la Suisse 33(1): 1–34pp.

Fundación Produce. 2004. Panorama actual de la jamaica. Guerrero si produce en: órgano informativo de la fundación 8: 4-6.

Franco, A. 2005. Estudio fisiológico y molecular de especies Ocratoxigénicas. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. 165p.

French, E.R., Herbert, T.T. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. Primera edición. IICA. san José, Costa Rica. 289p.

García-Martínez, E. 1995. Efecto del deterioro de tres tamaños de semilla de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) bajo diferentes periodos de envejecimiento. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia, Chapingo edo. de México. 81p.

García-de Miranda, E. 1998. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koopen. 4a. Edición corregida y aumentada. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 217p.

Gassama-Dia, Y.K., Sané, D. and Ndoye, M. 2004. Direct genetic transformation of *Hibiscus sabdariffa* L. African Journal of Biotechnology 3: 226-228.

Galicia-Flores, L.A., Salinas-Moreno Y., Espinoza-García B.M., Sánchez-Feria, C. 2007. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) nacional e importada. Tesis de Licenciatura. Universidad

Autónoma Chapingo, Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Chapingo edo. de México. 74p.

González-Satín, L.L. 2008. Etiología de la enfermedad pata prieta de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) Guerrero, México. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola, Chapingo edo. de México. 63p.

González-Pacheco, B.E. 2004. Etiología de la marchites del tomate de cáscara (*Physalis philadelphica* LAM.) en el estado de Guanajuato y su control. Tesis de maestría en ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, edo. de México. 49p.

Hadad, E.A., Hasman, N., Sitepu, D. 1976. Testing of roselle varieties for resistance to *Phytophthora* Pemberitoan-Lembago penelitian tonaman Industri, Bogar (Indonesia) 22: 7-14.

Hernández-Morales, J. y Romero-Cova, S. 1990. identificación del agente causal de la “pata prieta de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)” y prueba de fungicidas para su control bajo condiciones de invernadero. Revista Chapingo, México 15:50-54.

Hernández-Morales, J. 1988. Estudio de la interacción entre *Phytophthora parasitica* Dastur y *Meloidogyne* sp. en la “pata prieta” de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) e histología de ambos patógenos. Tesis de maestría en ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, edo. de México. 75p.

Hernández-Morales, J., Ayala-Escobar, V.; Alanís-Martínez, L. 2008. Caracterización de hongos asociados al síntoma de 'ojo de gallo' de follaje de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México. Memorias del XXXV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana Fitopatología. Monterrey Nuevo León, México. Resumen, C.45.

Hidalgo-Villatoro, G.S., Cifuentes-Reyes, W.A., Ruano-Solís, H.H., Cano-Castillo, L.E. 2009. Caracterización de trece genotipos de rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guatemala, *Agronomía Mesoamericana* 20(1): 101-109.

Holliday, P. 1995. *Fungus diseases of tropical crops*. 2da. Edition. Dover Publications, inc. New York, USA. 607p.

Khatura, D. C. and Maiti, S. 1978. A new leaf blight disease of *Hibiscus cannabinus* in West Bengal. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology Journal* 7: 87.

Koneman, E., Stephen, A. 2006. *Koneman's Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Sixth edition. Lippincott Williams & Wilkins. USA. 1691p.

Liu, C.Y., Zhao, K.H., Wang, K. and Bai, J. 1999. Redesignation of the causal agent of grape white rot in China. *Acta Phytopathologica Sinica* 29(2): 174–176.

Maas, J.L., Pollack, F.G. and Uecker, F.A. 1979. Morphology and development of *Pilidiella quercicola*. *Mycologia* 71: 93–102.

Maiti-Ratikanta. K. 1995. *Fibras Vegetales en el Mundo: aspectos botánicos, calidad y utilidad*. Primera edición. Editorial Trillas. México, 300p.

Martínez-Sánchez, C. 2010. *Etiología e incidencia de hongos asociados al manchado de cálices de Jamaica (Hibiscus sabdariffa L.) en Guerrero, México*. Tesis de maestría en ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, edo. de México. 101p.

Mateu, E., Casal, J. 2003. Tamaño de la muestra. *Revista de Epidemiología y Medicina Preventiva*. 1: 8-14.

Matthee, F.N. & Thomas, A.C. 1981. Rot Blanc in vines: a new disease in South Africa. *Deciduous Fruit Grower* 31: 268–273.

McGuire J., J.U., and Crandall, B.S. 1967. Survey of insect pests and plant diseases of selected food crops of México, Central America and Panamá. Int. Agriculture Department Services. USDA, AID, 157 p.

McClintock, N.C. & El Tahir, I.M., 2004. *Hibiscus sabdariffa* L. pp. 321-326. In: G.J.H. Grubben. *Vegetables de Plant resources of tropical Africa*. Vol. II. Prota. Wageningen, Netherlands. 667p.

Meyer, W., Lieckfeldt, E., Kuhls, K., Freedman, E., Börner, T. and Mitchell, T.G. 1993. DNA and PCR- fingerprinting of fungi. In “DNA Fingerprinting: State of the Science”, ed. Pena, S.D.J., R. Chakraborty, J.T. Jeffreys, Birkhäuser, Basel. 311-320.

Morales-Páramo, M. 2010. Flor de jamaica orgánica, el economista, S. A. de C. V., México D. F., 26 de abril de 2010, col. Agro-negocios.

Morton, J.F. 1987. *Fruits of warm climates*. Incorporated Educational Concerns for Hunger Organization. Miami. USA. 281-286 pp.

Murillo-De La Rosa, A. 2007. Diagnostico e identificación de enfermedades del cultivo de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en la región Chontalpa, Tabasco. Tesis de licenciatura. Universidad Popular de la Chontalpa, Cárdenas Tabasco, México. 61p.

Nieto-Ángel D., Acosta, R.M., Valencia, A.M. y Mena-Nevárez, G. 2001. Estudio de efectividad biológica con fungicidas. *In bases para realizar estudios de efectividad biológica de plaguicidas*. Colegio de Postgraduados-Instituto de Fitosanidad. México. 106-129p.

Ooi, K.H.; Salleh, B. 1999. Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum*, the causal organism of vascular wilt on Roselle in Malaysia. *Biotropia*. 12: 31-41.

García-Martínez, E. 1995. Efecto del deterioro de tres tamaños de semilla de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) bajo diferentes periodos de envejecimiento. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia, Chapingo edo. de México. 81p.

Ochoa-Cuevas, D.V. 2008. Caracterización molecular de 60 hongos que forman parte del cepario micológico C.B.C.M. de la Universidad Técnica Particular de Loja. Tesis de Bioquímico Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador. 51p.

Pecina-Quintero, V., Martínez-de la Vega, O., Alvarado-Balleza, M. de J., Vandemark, G.J. y Williams-Alanis, H. 2001. Comparación de dos sistemas de marcadores moleculares en el análisis de las relaciones genéticas de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Revista de Fitopatología Mexicana* 19: 128-139.

Persad, C. & Fortune, M., 1989. A new disease of sorrel (*Hibiscus sabdariffa* var. *sabdariffa*) caused by *Coniella musaiaensis* var. *hibisci* from Trinidad and Tobago. *Plant Pathology* 38: 615–617.

Ponti, I., Pollini A. and Laffi, F. 2003. *Vite*. 3. Edition Verona. Italia. 178p.

Pérez-Torres, B.C. 2009. Entomofauna asociado al cultivo de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en el municipio de Chiautla, Puebla. *Acta Zoológica Mexicana* 25 (2): 239-247.

Pushpaveni, G.M., Rama, R. and Appa P. 1973. Note on pests of mest in Andhra Pradesh. *Jute Bulletin*. 36: 106-111.

Qi, Y., Chin, K.L., Malekian, F. and Berhame M. 2005. Biological characteristics, nutritional and medicinal value of roselle *Hibiscus sabdariffa*. Forestry Natural Resources and Circular-silvicultura Environment, No. (604): 1-2.

Rafaila, O.M. and Sevensco, V. 1968. Contribution to the study on the biology of *Coniella diplodiella*. Microbiología 1: 585–588.

Rendón-Aguilar, B. 1992. Estudio de la variación morfológica y aspectos etnobotánicos en *Hibiscus sabdariffa* L. en relación a su uso y manejo. Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencia Biológicas. México. 223p.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Michigan, USA. 1659p.

Shreemali, P.G. 1973. A new disease of *Artabotrys hexapetalous*. Indian Phytopathology. 26(3): 605–607.

Sié, R.S., Charles G., Atta, D.H., Koné, D., Y Toueix, Y., Djè, Y. and Branchard, M. 2011. Breeding of *Hibiscus sabdariffa* L.: evaluation of resistance to *Fusarium oxysporum* Schlecht. Emend. Snyd. and Hans in two varieties. Agriculture and Biology Journal of North America 2(1):125-133.

Singh, D.P. and Sinch, R.S. 1966. Occurrence of *Coniella diplodiella* (Speg.) Petrak and Sydow on *Geranium* sp. Science and Culture. 32(10): 504.

Singh, D.P. and Mishra, C.B.P. 1987. Field reaction of mesta (*Hibiscus cannabinus* and *H. sabdariffa*) strains to foot and stem rot and root rot diseases. Indian Journal of Plant Pathology 5(2): 203-204.

Sutton, B.C. 1992. Mycological Institute (CMI). Distribution of *Coniella petrakii*. Commonwealth. 3rd. Edition. Map 335p.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Pluwniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. 1997. The Clustal IX windows interface: flexible strategies for múltiples sequences alinement aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 24: 4876-4882.

Turian, G. 1954. Recent progress in the control of the white rot of Vine. *Revue romanded'Agriculture, de Viticulture et d'Arboriculture*. 10(2): 12–14.

Urbina-Torres, F. 2009. Manual de Proyecto de desarrollo de la cadena de valor conglomerado agrícola Cultivo de Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L) y (*Hibiscus cruentus* Bertol), MCA, Nicaragua, 9p.

Valencia-Botín, A.J. 2002. Etiología de la enfermedad “ojo de pescado” en pitahaya (*Hylocereus undatus* H). Tesis de maestría en ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, edo. de México. 62p.

Visarathanonth, N. 1976. Phytophthora foot rot of roselle. *Kasetsar journal*. 10 (1): 5-13.

Van Niekerk, J.M., Groenewald, J.Z., Verkley, G.J.M., Fourie, P.H., Wingfield, M.J., Crous, P.W. 2004. Systematic reappraisal of *Coniella* and *Pilidiella*, with specific reference to species occurring on *Eucalyptus* and *Vitis* in South Africa. *The British Mycological Society, Mycological Research* 108 (3) 283-303.

Verbeek, W.A. 1977. Plant Pathology. In: Annual Report of the Secretary for Agricultural Technical Services for the.

Zambrano-Bullones, K., Dávila, M., Castillo, M. A. 2002. Detección de fragmentos de ADN de hongos y su posible relación con la síntesis de proteínas de actividad

entomopatógena. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía, 19: 185-193.

Bisby, F.A., Roskov, Y.R., Ruggiero, M.A., Orrell, T.M., Paglinawan, L.E., Brewer, P.W., Bailly, N., Hertum, J.V. 2007. Species 2000 and ITIS Catalogue of Life: Annual Checklist Taxonomic Classification. Disponible en <http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2010/search/all>. Consultado octubre 2010.

FAO. 2004. Food and Agriculture Organization. (en línea): <http://faostat.fao.org>. Consultado enero 2010.

Jandel Scientific Co. 1995. Analysis software sigma gel. Version 1.0..

NCBI. 2010. National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Nicholas K.B., Nicholas H.B. 1997. GeneDoc: A tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Version 2.3.

OEIDRUS., 2009. Oficina estatal de información para el desarrollo rural sustentable en el Estado de Tabasco. [www.oeidrustab.gob.mx](http://www.oeidrustab.gob.mx). Tabasco, México.

SIAP-SAGARPA. 2009. Servicio de información agroalimentaria y pesquera (en línea). SAGARPA, México. Disponible en <http://infosiap.siap.gob.mx>. Consultado enero 2010.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software versión 4.0. Mol Biol Evol. 24:1596-1599.

## 8. APÉNDICE

### Apéndice 1.-

#### Medio de Cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA)

Componentes:

Papa.....200 g

Dextrosa..... 20 g

Agar..... 15 g

Agua destilada.....aforada a 1000 ml

Preparación:

A partir de 200 g de papa sin cáscara, introducirlos en un matraz de un litro de capacidad, enjuagarlos dos o tres veces, agregar 500 ml de agua destilada. Incorporar el agar en 500ml de agua destilada dentro de un matraz de un litro de capacidad. Poner la papa y el agar a 15 lb de presión por pulgada cuadrada y 120°C durante diez a quince minutos en una olla de presión de autoclave.

Concluido este tiempo, se filtra la infusión de papa a través de manta de cielo; agrega la dextrosa a la solución de agar y disolver rotando ligeramente. Juntar la solución de agar-dextrosa con la infusión de papa filtrada, mezclar bien y aforar con agua destilada a 1000 ml. (Aquiahuatl-Ramos y Pérez-Chabela, 2004).

### Apéndice 2.-

**Condiciones Ambientales:** precipitación y temperatura promedio registradas durante el periodo de investigación\*.

| Fechas                    | Precipitación<br>(mm)<br>pp | Temperatura<br>(°C) |       | INCIDENCIA<br>(%) |           |
|---------------------------|-----------------------------|---------------------|-------|-------------------|-----------|
|                           |                             | Max.                | Min   | J. Tardía         | J. Precoz |
| 02/09/2009                | 0.00                        | 35.00               | 22.00 | 0.00              | 0.00      |
| 03/09/2009                | 1.50                        | 33.50               | 23.00 |                   |           |
| 04/09/2009                | 0.00                        | 34.50               | 24.00 |                   |           |
| 05/09/2009                | 0.00                        | 35.00               | 24.50 |                   |           |
| 06/09/2009                | 0.00                        | 36.00               | 25.00 |                   |           |
| 07/09/2009                | 5.00                        | 36.00               | 23.00 |                   |           |
| 08/09/2009                | 40.00                       | 37.00               | 25.00 | 10.26             | 0.00      |
| 09/09/2009                | 0.00                        | 36.00               | 24.00 |                   |           |
| 10/09/2009                | 0.00                        | 34.00               | 23.00 |                   |           |
| 11/09/2009                | 0.00                        | 34.00               | 22.00 |                   |           |
| 12/09/2009                | 7.00                        | 36.00               | 24.50 |                   |           |
| 13/09/2009                | 0.00                        | 35.00               | 24.00 |                   |           |
| 14/09/2009                | 1.00                        | 36.00               | 24.50 |                   |           |
| 15/09/2009                | 0.00                        | 35.00               | 23.00 | 25.64             | 17.95     |
| 16/09/2009                | 30.00                       | 35.00               | 22.00 |                   |           |
| 17/09/2009                | 1.00                        | 33.00               | 22.00 |                   |           |
| 18/09/2009                | 2.00                        | 35.00               | 23.00 |                   |           |
| 19/09/2009                | 0.00                        | 34.50               | 24.00 |                   |           |
| 20/09/2009                | 1.00                        | 33.50               | 23.50 |                   |           |
| 21/09/2009                | 0.00                        | 33.00               | 23.00 |                   |           |
| 22/09/2009                | 0.00                        | 35.00               | 24.00 | 100.00            | 100.00    |
| <b>SUMA<br/>ACUMULADA</b> | 101.14                      | 34.9                | 23.5  |                   |           |

\*Estación meteorológica Cárdenas, Comisión Nacional del Agua, Cárdenas, Tabasco.

### Apéndice 3.-

Aislamientos del síntoma de “mancha acuosa” en el follaje de plantas del cultivo en lotes de observación de jamaica tipo precoz y tardía en el municipio de Cárdenas, Tabasco.

| Aislado de hongo | Tipo de jamaica | Lugar de colecta | Fecha     |
|------------------|-----------------|------------------|-----------|
| MATJ01           | Tardía          | Cárdenas         | 08-sep-09 |
| MATJ02           | Tardía          | Cárdenas         | 08-sep-09 |
| MATJ03           | Tardía          | Cárdenas         | 08-sep-09 |
| MATJ04           | Tardía          | Cárdenas         | 08-sep-09 |
| MATJ05           | Tardía          | Cárdenas         | 08-sep-09 |
| MATJ06           | Tardía          | Cárdenas         | 08-sep-09 |
| MATJ07           | Tardía          | Cárdenas         | 08-sep-09 |
| MATJ08           | Tardía          | Cárdenas         | 08-sep-09 |
| MATJ09           | Tardía          | Cárdenas         | 08-sep-09 |
| MATJ10           | Tardía          | Cárdenas         | 08-sep-09 |
| MATJ11           | Tardía          | Cárdenas         | 08-sep-09 |
| MATJ12           | Tardía          | Cárdenas         | 08-sep-09 |
| MATJ13           | Tardía          | Cárdenas         | 08-sep-09 |
| MATJ14           | Tardía          | Cárdenas         | 08-sep-09 |
| MATJ15           | Tardía          | Cárdenas         | 08-sep-09 |
| MATJ16           | Tardía          | Cárdenas         | 08-sep-09 |
| MAPJ01           | Precoz          | Cárdenas         | 15-sep-09 |
| MAPJ02           | Precoz          | Cárdenas         | 15-sep-09 |
| MAPJ03           | Precoz          | Cárdenas         | 15-sep-09 |
| MAPJ04           | Precoz          | Cárdenas         | 15-sep-09 |
| MAPJ05           | Precoz          | Cárdenas         | 15-sep-09 |
| MAPJ06           | Precoz          | Cárdenas         | 15-sep-09 |
| MAPJ07           | Precoz          | Cárdenas         | 15-sep-09 |
| MAPJ08           | Precoz          | Cárdenas         | 15-sep-09 |
| MAPJ09           | Precoz          | Cárdenas         | 15-sep-09 |
| MAPJ10           | Precoz          | Cárdenas         | 15-sep-09 |
| MAPJ11           | Precoz          | Cárdenas         | 15-sep-09 |
| MAPJ12           | Precoz          | Cárdenas         | 15-sep-09 |
| MATJ17           | Tardía          | Cárdenas         | 15-sep-09 |
| MATJ18           | Tardía          | Cárdenas         | 15-sep-09 |
| MATJ19           | Tardía          | Cárdenas         | 15-sep-09 |
| MATJ20           | Tardía          | Cárdenas         | 15-sep-09 |
| MATJ21           | Tardía          | Cárdenas         | 15-sep-09 |
| MATJ22           | Tardía          | Cárdenas         | 15-sep-09 |
| MATJ23           | Tardía          | Cárdenas         | 15-sep-09 |
| MATJ24           | Tardía          | Cárdenas         | 15-sep-09 |

---

|        |        |          |           |
|--------|--------|----------|-----------|
| MATJ25 | Tardía | Cárdenas | 15-sep-09 |
| MATJ26 | Tardía | Cárdenas | 15-sep-09 |
| MATJ27 | Tardía | Cárdenas | 15-sep-09 |
| MATJ28 | Tardía | Cárdenas | 15-sep-09 |
| MATJ29 | Tardía | Cárdenas | 15-sep-09 |
| MATJ30 | Tardía | Cárdenas | 15-sep-09 |
| MATJ31 | Tardía | Cárdenas | 15-sep-09 |
| MATJ32 | Tardía | Cárdenas | 15-sep-09 |
| MATJ33 | Tardía | Cárdenas | 15-sep-09 |
| MAPJ13 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ14 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ15 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ16 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ17 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ18 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ19 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ20 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ21 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ22 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ23 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ24 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ25 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ26 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ27 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ28 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ29 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ30 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ31 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ32 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ33 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ34 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ35 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ36 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ37 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ38 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ39 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ40 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ41 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ42 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ43 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ44 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ45 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ46 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ47 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ48 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |

|        |        |          |           |
|--------|--------|----------|-----------|
| MAPJ49 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ50 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ51 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ52 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ53 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ54 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ55 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ56 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ57 | Precoz | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ34 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ35 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ36 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ37 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ38 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ39 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ40 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ41 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ42 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ43 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ44 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ45 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ46 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ47 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ48 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ49 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ50 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ51 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ52 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ53 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ54 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ55 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ56 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ57 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ58 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ59 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ60 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ61 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ62 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ63 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ64 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ65 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ66 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ67 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ68 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ69 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |

|        |        |          |           |
|--------|--------|----------|-----------|
| MATJ70 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ71 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ72 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ73 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ74 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ75 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ76 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ77 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MATJ78 | Tardía | Cárdenas | 22-sep-09 |
| MAPJ58 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ59 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ60 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ61 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ62 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ63 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ64 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ65 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ66 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ67 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ68 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ69 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ70 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ71 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ72 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ73 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ74 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ75 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ76 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ77 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ78 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ79 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ80 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ81 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ82 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ83 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ84 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ85 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ86 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ87 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ88 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ89 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ90 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ91 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ92 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ93 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |

|         |        |          |           |
|---------|--------|----------|-----------|
| MAPJ94  | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ95  | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ96  | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ97  | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ98  | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ99  | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ100 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ101 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MAPJ102 | Precoz | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ79  | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ80  | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ81  | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ82  | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ83  | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ84  | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ85  | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ86  | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ87  | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ88  | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ89  | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ90  | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ91  | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ92  | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ93  | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ94  | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ95  | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ96  | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ97  | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ98  | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ99  | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ100 | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ101 | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ102 | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ103 | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ104 | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ105 | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ106 | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ107 | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ108 | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ109 | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ110 | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ111 | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ112 | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ113 | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ114 | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |

|         |        |          |           |
|---------|--------|----------|-----------|
| MATJ115 | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ116 | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ117 | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ118 | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ119 | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ120 | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ121 | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ122 | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |
| MATJ123 | Tardía | Cárdenas | 29-sep-09 |

---

Nota: T= tardía; P= precoz