



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

INTERACCIÓN ENTRE *Corynespora cassicola* (Berk & Curt.) C.T. Wei Y *Pilidiella* sp. EN EL MANCHADO DE HOJAS Y CÁLCICES DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) EN GUERRERO

ANA KAREN BARRÓN CORONADO

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO


2019

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe ANA KAREN BARRÓN CORONADO, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor DR. JAVIER HERNÁNDEZ MORALES, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis INTERACCIÓN ENTRE Corynespora cassicola (Berk & Curt.) C.T. Wei Y Piliidiella sp. EN EL MANCHADO DE HOJAS Y CÁLICES DE JAMAICA (Hibiscus sabdariffa L.) EN GUERRERO

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 31 de Enero de 19


Firma del
Alumno (a)


Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada **INTERACCIÓN ENTRE *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt.) C.T. Wei Y *Pilidiella* sp. EN EL MANCHADO DE HOJAS Y CÁLCICES DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) EN GUERRERO** realizada por la alumna: **ANA KAREN BARRÓN CORONADO** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO


DR. JAVIER HERNÁNDEZ MORALES

ASESOR


DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

ASESOR


DR. SERGIO ARANDA OCAMPO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, febrero de 2019

**INTERACCIÓN ENTRE *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt.) C.T. Wei Y *Pilidiella*
sp. EN EL MANCHADO DE HOJAS Y CÁLCICES DE JAMAICA (*Hibiscus*
sabdariffa L.) EN GUERRERO**

Ana Karen Barrón Coronado, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2019

RESUMEN

El tizón y manchado de cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), es una de las enfermedades más importantes que limitan la producción del cultivo en Guerrero. Para determinar el agente causal de esta enfermedad, en 2016 se colectaron plantas de jamaica con síntomas característicos de tizón y manchado en hojas y cálices en los principales municipios productores de jamaica en México. Las muestras de tejido enfermo colectados se procesaron en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA). La caracterización morfológica reveló que los aislados pertenecen al Género *Coniella*. Las pruebas de patogenicidad en plantas de jamaica variedad criolla, mostraron que los aislados indujeron síntomas similares a los de campo, en hojas y cálices de plantas cultivadas en invernadero. La identidad del hongo se confirmó mediante la amplificación de la región ITS, LSU y Tef1 como *Coniella javanica*. Las secuencias ITS, LSU y Tef1 se depositaron en GenBank con número de accesión KX833583, KX833403, MH613977, respectivamente. Asimismo, se realizó un experimento para evaluar los efectos de la interacción de *C. cassiicola* y *C. javanica*. Para lo anterior se usaron plantas de cinco meses de edad y se utilizaron colonias de *C. cassiicola* y *C. javanica* desarrolladas en PDA de siete días de crecimiento. Se realizó un diseño completamente aleatorio con siete repeticiones, los tratamientos fueron los siguientes: T1= *C. cassiicola* T2= *C. javanica* T3= *C. cassiicola* +*C. javanica* inoculadas al mismo tiempo +. T4= *C. cassiicola* +*C. javanica* con la inoculación de esta última siete días después T5= *C. javanica* +*C.*

cassiicola con la inoculación de esta última siete días después T6= Control. Los resultados revelaron que existe diferencias significativas del efecto de los tratamientos en la severidad en hojas, encontrándose los siguientes porcentajes de severidad 46% en T1 65% en T3 66% en T2 82% en T5 y el 90% en T4. Similarmente, los resultados de los efectos de los tratamientos en cálices indican que existe diferencias significativas, observándose los siguientes niveles de severidad 52% en T1, 69% en T2, 71% en T3, 75% en T5 y 93% en T4. Estos resultados muestran que existe un efecto sinérgico, encontrado que el T4 es el que causa el más alto porcentaje de severidad tanto en hojas como en cálices.

Palabras clave: *Coniella javanica*, sinergismo, severidad.

**INTERACTION BETWEEN *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt.) C.T. Wei and
Pilidiella sp. IN THE STAINING OF LEAVES AND CELESTS OF JAMAICA
(*Hibiscus sabdariffa* L.) IN GUERRERO**

Ana Karen Barrón Coronado M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2019

ABSTRACT

The blight and spotting of chalice of hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.), is one of the most important diseases that limit the production of the crop in Guerrero. To determine the causal agent of this disease, in 2016 hibiscus plants were collected with symptoms characteristic of blight and spotting on leaves and chalice in the main producing municipalities of Jamaica in Mexico. The samples of diseased tissue collected were processed in potato-dextrose-agar culture medium (PDA). The morphological characterization revealed that the isolates belong to the Genus *Coniella*. Pathogenicity tests on Jamaican Creole variety plants showed that the isolates induced symptoms similar to those in the field, in leaves and chalice of plants grown in the greenhouse. The identity of the fungus was confirmed by the amplification of the ITS region, LSU and Tef1 as *Coniella javanica*. The ITS, LSU and Tef1 sequences were deposited in GenBank with accession number KX833583, KX833403, MH613977, respectively. Also, an experiment was conducted to evaluate the effects of the interaction of *C. cassiicola* and *C. javanica*. For the above, plants of five months of age were used and colonies of *C. cassiicola* and *C. javanica* developed in PDA of seven days of growth were used. A completely randomized design with seven replications was carried out, the treatments were as follows: T1 = *C. cassiicola* T2 = *C. javanica* T3 = *C. cassiicola* + *C. javanica* inoculated at the same time +. T4 = *C. cassiicola* + *C. javanica* with the inoculation of the latter seven days after T5 = *C. javanica* + *C. cassiicola* with the inoculation of the latter seven

days after T6 = Control. The results revealed that there are significant differences in the effect of the treatments on leaf severity, with the following percentages of severity: 46% in T1 65% in T3 66% in T2 82% in T5 and 90% in T4. Similarly, the results of the effects of the calyx treatments indicate that there are significant differences, observing the following levels of severity: 52% in T1, 69% in T2, 71% in T3, 75% in T5 and 93% in T4. These results show that there is a synergistic effect, found that T4 is the one that causes the highest percentage of severity in both leaves and chalice.

Keywords: *Coniella javanica*, synergism, severity

DEDICATORIA

A mis padres: Virginia Coronado Macías y Rodolfo Barrón Guerrero

Que han sido un pilar fundamental en mi formación como profesional, por brindarme la confianza, consejos, oportunidad y recursos para lograrlo.

A mis hermanos y hermanas: Deysi, Karla, Mariela y Benito

*Por poder disfrutar cada momento y detalle de la vida en compañía de
ustedes*

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados y al Posgrado de Fitosanidad, por permitirme realizar mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento de mis estudios de Maestría.

Al Dr. Javier Hernández por la invaluable dirección en la planeación, ejecución y culminación de esta investigación.

Al Dr. Santos Gerardo Leyva Mir por su amistad y apoyo en diversas etapas de mi vida profesional.

Al Dr. Sergio Aranda Ocampo por sus sugerencias y apoyo en esta investigación.

A la M. C. Victoria Ayala Escobar por su amistad, apoyo y excelente disposición para colaborar en esta investigación.

Al Dr. Cristian Nava Díaz por su apoyo, orientación e innumerables muestras de sencillez y amistad.

Al Dr. Javier Suárez Espinosa por su amabilidad, apoyo y colaboración en el análisis estadístico de esta investigación.

Al Dr. Moisés Camacho Tapia por su apoyo y colaboración en esta investigación.

A Don José por las facilidades brindadas en la fase de invernadero.

A los Doctores del Posgrado de Fitosanidad, por brindarme los conocimientos adquiridos durante mi estancia en la maestría.

A mis amigos y compañeros del postgrado de Fitosanidad: Miguel, Yoana, Mario, Carmen, Emanuel, Ibar, Juan Manuel, Marco, Cristian, Julieta, Hugo, Héctor y Alicia que hicieron mi estancia en el Colegio de Postgraduados una agradable experiencia.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
DEDICATORIA	viii
AGRADECIMIENTOS	ix
LISTA DE CUADROS.	xii
LISTA DE FIGURAS.	xiii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Origen y distribución de la jamaica	1
Importancia de la jamaica	1
Producción mundial, nacional y estatal	1
Principales enfermedades causadas por hongos y Oomicetes	2
Principales enfermedades foliares en México.	2
Literatura citada	6
CAPÍTULO I.- ETIOLOGÍA DEL TIZÓN DE HOJAS Y CÁLCICES DE JAMAICA (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) EN GUERRERO, MÉXICO.....	10
1.1. RESUMEN	10
1.2. ABSTRACT.....	11
1.3 INTRODUCCIÓN	12
1.4 OBJETIVOS	13
1.4.1 Objetivo general	13
1.4.2 Objetivo específico.....	14
1.5 MATERIALES Y MÉTODOS	14
1.5.1 Ubicación de los sitios de muestreo	14
1.5.2 Colecta de muestras.....	14
1.5.3 Aislamiento y purificación	15
1.5.4 Caracterización morfológica y cultural	15
1.5.5 Pruebas de patogenicidad.....	16
1.5.6 Extracción de DNA, amplificación por PCR y secuenciación.....	17
1.5.7Análisis filogenético.....	18
1.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19

1.6.1 Aislamiento de hongos.....	19
1.6.2 Morfología y caracteres de la colonia.....	20
1.6.3 Características morfológicas y culturales.....	21
1.6.4 Pruebas de patogenicidad.....	22
1.6.5 Identificación molecular.....	24
1.6.6 Análisis filogenético.....	25
1.7 CONCLUSIONES.....	26
1.8 LITERATURA CITADA.....	27
CAPÍTULO II. INTERACCIÓN ENTRE <i>Corynespora cassiicola</i> (Berk &Curt.) C.T. Wei Y <i>Pilidiella</i> sp. EN EL MANCHADO DE HOJAS Y CÁLCICES DE JAMAICA (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) EN GUERRERO.....	
2.1 RESUMEN.....	30
2.2 ABSTRACT.....	32
2.3. INTRODUCCIÓN.....	33
2.4. OBJETIVOS.....	35
2.4.1 Objetivo general.....	35
2.4.2 Objetivo específico.....	35
2.5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
2.5.1 Evaluación de interacción bajo condiciones de invernadero.....	36
2.5.2 Fuente de inóculo.....	36
2.5.3 Diseño experimental.....	36
2.5.4 Variable evaluada.....	37
2.5.5 Modelo estadístico.....	38
2.5.6 Análisis Estadístico.....	39
2.6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
2.6.1 Evaluación de severidad en hoja.....	43
2.6.2 Evaluación de severidad en cálices.....	43
2.7 CONCLUSIONES.....	45
2.8 LITERATURA CITADA.....	46

LISTA DE CUADROS.

CAPÍTULO II.

Cuadro 1. Ubicación de los sitios de muestreo.....	19
Cuadro 2. Características morfológicas de 13 aislados, obtenidos de tejido de jamaica, con síntomas del tizón de hojas y cálices, en plantaciones comerciales en Guerrero México.....	20
Cuadro 3. Tratamientos y método de inoculación para evaluar la severidad de <i>C. cassicola</i> y <i>C. javanica</i>	37
Cuadro 4. Promedios de severidad y comparación Tukey de los tratamientos evaluados en hojas y cálices de jamaica.	42

LISTA DE FIGURAS.

CAPÍTULO II.

- Figura 1. Características de etapas avanzadas de la enfermedad “Atizonamiento de hojas y cálices” en plantaciones comerciales. Nótese: (A) Rama con presencia de picnidios (B) cálices completamente dañados (C) hojas con presencia de tizón y picnidios. 15
- Figura 2. Síntomas del tizón de hojas y cálices causado por *C. javanica* A-B Cálices y hoja de jamaica sanas, C-D tizón y presencia de picnidios en cálices y hojas de jamaica variedad criolla. 24
- Figura 3. Características morfológicas y culturales de 13 aislados obtenidos de tejido de jamaica con síntomas del tizón de hojas y cálices, en huertos comerciales de Guerrero México..... 21
- Figura 4 A. Picnidio negro globoso B. Conidias de hialino a marrón claro, desarrollados en PDA 22

CAPÍTULO III.

- Figura 5. Escalas logarítmicas diagramáticas para evaluar la severidad del manchado en jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) inducida por *Corynespora cassiicola*. A) Escala para evaluar la severidad en hojas. B) Escala para evaluar la severidad en cálices. Propuesta por Ortega Acosta *et al.*, 2016)..... 38
- Figura 6. Evaluación de severidad % en hoja de los diferentes tratamientos, bajo condiciones de invernadero. 43
- Figura 7. Evaluación de severidad % en cálices de los diferentes tratamientos, bajo condiciones de invernadero. 43

INTRODUCCIÓN GENERAL

Origen y distribución de la jamaica

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es originaria de África. Actualmente es cultivada en Asia, Oceanía y América (Gomez-Leyva *et al.*, 2008). En América se ha adaptado a regiones tropicales y subtropicales de diferentes países de Centro y Sudamérica. En México fue introducida por los españoles en la Época Colonial (S. XVI y XVII) (Morton, 1987).

Importancia de la jamaica

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es una planta dicotiledónea de la familia Malvacea originaria de África. En México la importancia de este cultivo radica en la obtención de cálices, (Saeed *et al.*, 2008) que son utilizados principalmente para la elaboración de aguas frescas, mermeladas, licores y gelatinas (Tsai *et al.*, 2002). También presenta propiedades medicinales; se utiliza para tratar la hipertensión y como diurético (Faraji y Tarkhani, 1999; Herrera-Arellano *et al.*, 2004). Los cálices deshidratados resultan ser buenos colorantes y antioxidantes naturales (Tee *et al.*, 2002; Tsai *et al.*, 2004).

Producción mundial, nacional y estatal

Los principales países productores de jamaica son China, India, Sudan, Uganda, Indonesia, Malasia y México (FAO, 2010). En México la producción se distribuye en 9 estados: Guerrero, Oaxaca, Michoacán, Puebla, Nayarit, Campeche, Morelos, Colima y Jalisco; siendo Guerrero el principal productor con una superficie sembrada de 14,033 ha, seguido por Oaxaca y Michoacán (SIAP, 2017).

Enfermedades causadas por virus

Las enfermedades virales que afectan al cultivo de jamaica se encuentran las causadas por Begomovirus. En China se ha detectado la presencia de Begomovirus, Cotton Leaf Curl Mu Virus (CLCuMuV), junto con el Cotton Leaf Curl Multan Betasatellite (CLCuMuB),

como agente causal de la enfermedad de enrollamiento de la hoja en jamaica (Wang *et al.*, 2016). Asimismo, en México se ha detectado la presencia de un complejo de Begomovirus, en el que se encuentra presente el OkYMMV, asociado a síntomas de amarillamiento en jamaica (Velázquez-Fernández *et al.*, 2016).

Principales enfermedades causadas por hongos y Oomicetes

Las enfermedades fúngicas constituyen una de las principales limitantes en la producción de jamaica, la planta es afectada por patógenos que causan pudrición de tallo y raíz (Swart y Langenhoven, 2000; Horts, 2008). A nivel mundial se tienen registros de; *Phytophthora parasítica*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Botrytis cinérea*, *Sclerotium rolfsii*, *Phymatotrichopsis omnívora* y *Fusarium oxysporum* (Swart y Langenhoven, 2000; Amusa *et al.*, 2005; Horts, 2008). Asimismo, se reportan enfermedades foliares causadas por: *Cercospora hibisci*, *Coniella musaiensis var. hibisci*, *Oidium abelmoschii* *Phoma sabdariffa*, *Phoma exigua* (Persad y Fortune, 1989; Horst, 2008; Eslaminejad y Zakaria, 2011). En México se han identificado enfermedades foliares causadas por; *Corynespora cassicola*, *Pilidiella diploidiella* y una enfermedad de la raíz causada por *Phytophthora parasítica*. Dastur (Hernández-Morales y Romero-Cova, 1990; Correa, 2011; Ortega *et al.*, 2015).

Principales enfermedades foliares en México.

En los últimos años en Guerrero, se ha presentado una enfermedad de etiología desconocida denominada “tizón de hojas y cálices”. En condiciones favorables causa pérdidas totales en el cultivo. En campo la producción de cálices ha disminuido, se cree que se debe a la asociación del manchado de cálices, causado por *Corynespora cassicola* y por el tizón de hojas (Ortega *et al.*, 2015).

La identificación apropiada del agente causal de una enfermedad es crítica para entender la epidemiología y las medidas de control (Agrios, 2005). La identificación de un fitopatógeno actualmente se basa en caracteres morfológicos, combinados con técnicas moleculares (Álvarez *et al.*, 2016).

C. cassiicola (Berk & Curt.) Wei conocida como la enfermedad “manchado de cálices”, en cálices y hojas, presenta manchas café-oscuras, rodeadas de un halo amarillo rojizo, debido a la producción de la toxina cassiicolina (Kurt, 2004; Ortega-Acosta, 2015). *C. cassiicola* presenta una amplia gama de hospedantes dentro de áreas tropicales y subtropicales (Holliday 1980; Romruensukharom *et al.*, 2005); además de ser un fitopatógeno, en algunos hospedantes también se ha reportado como endófito o saprófito (Collado 1999; Hyde *et al.*, 2001; Lumyong *et al.*, 2003). Las colonias de este patógeno en medio de cultivo PDA, (papa, agar, dextrosa) son de color grisáceo. Presenta conidióforos rectos, simples a ocasionalmente ramificados, pardo pálido, lisos, septados, de 120-800 μm , conidios solitarios, variables en forma, cilíndricos, rectos a curvos, de coloración olivo pálida, lisos de 4-20 pseudoseptos, de 45-200 x 10-20 μm , base truncada, hilum oscuro protuberante. (Ellis ,1971).

El uso de agroquímicos es el método de control más efectivo de *C. cassiicola* en jamaica. La utilización de fungicidas preventivos como famoxate, pyraclostrobin, boscalid, azoxystrobin o trifloxystrobin, obtienen excelentes resultados al ser rotados con fungicidas de amplio espectro como el clorotalonil y Mancozeb. (Date *et al.*, 2004). En el cultivo de soya en campo, se utiliza Mancozeb y Oxicloruro de Cobre, para el control de *Corynespora cassiicola* (Gadoury *et al.*, 1994).

El control cultural de *C. cassicola* consiste en eliminar malezas que son hospedantes silvestres o reservorios y para esto se recomienda el deshierbe manual o la aplicación de herbicidas selectivos (Hernández-Morales *et al.*, 2018)

Otra enfermedad importante presente en México, es la mancha acuosa causada por *Pilidiella diplodiella*, la cual ha sido reportada como una nueva enfermedad en Cárdenas Tabasco, México. En Guerrero no se tienen reportes oficiales sobre la incidencia de este patógeno en el cultivo de jamaica; sin embargo, se han observado síntomas similares a los causados por *Pilidiella diplodiella*, en cálices y hojas de jamaica.

Los síntomas de la mancha acuosa, se caracterizan por presentar manchas foliares circulares e irregulares de color marrón claro, la necrosis avanza a toda la lámina foliar y peciolo. Las manchas inician en las hojas inferiores, avanzan a las hojas superiores, provocan defoliación total con la consecuente pérdida en productividad (Correa *et al.*, 2011).

P. diplodiella se caracteriza por presentar picnidios de forma globosa a subglobosa con ostiolos circulares centrales de 200 a 300 μm de largo, lisos, inicialmente hialinos que posteriormente se tornan color café oscuro. Conidióforos simples o ramificados. Conidios hialinos cuando son inmaduros, llegando a ser marrón claro (Barnett y Hunter, 1998).

En jamaica no existen estudios de la epidemiología de *P. diplodiella*; sin embargo, en vid se caracterizan por formar 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 extenderse al pedicelo en 48 h., germinan con temperaturas que varían entre los 20 a 32 °C y la infección es favorecida por alta humedad relativa (90-100%), pueden sobrevivir por más de dos años en el suelo, de dos a tres años en residuos de cosecha y de once a dieciséis años en condiciones secas o frías (Rafaila, 1966).

En jamaica no existen estudios sobre el control de *Coniella diplodiella*; sin embargo, en vid (*Vitis vinifera* L.) se han empleado fungicidas como captan, chlorothanonil y Dicarboximidas, estos controlan hasta un 75%. Folpet, es un fungicida de contacto, se aplica como spray preventivo para el control de *C. diplodiella* (Gualco y Togni, 2001). Asimismo, el control cultural se basa en una serie de estrategias, el cual consiste en retirar y quemar todos los restos de cosecha que caen al suelo y así evitar albergar inóculo que podría causar infecciones (Ferreira *et al*, 1981; Bisiach, 1985).

Literatura citada

- Agrios, G. 2005. Fitopatología. segunda Edición. *Grupo. Noriega. México DF México* 838p.
- Alvarez, L. V., Groenewald, J. Z., y Crous, P. W. 2016. Revising the Schizoparmaceae: Coniella and its synonyms Pilidiella and Schizoparme. *Studies in mycology*, 85:1-34.
- Amusa, N.A., Adegbite, A. A. and Oladapo, M.O. 2005. Vascular Wilt of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) in the humid forest Region of South-western Nigeria. *Journal of Plant Pathology* 4:122-125.
- Barnett H.L. and Hunter BB. 1998. Illustrated Genera of imperfect Fungi 4 th edition. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA. 218p.
- Bisiach M. y Minervini G. 1985. Libertella blepharis A.L. Smithe altri funghi associati a una sindroma atipica nella vite. *Vignevini*. 10:31-35.
- Collado J, Platas G, Gonzalez I, and Pelaez F. 1999. Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. *New Phytol* 144:525-532.
- Correa S. E., Ortiz G. F, Torres de la C. M, Bautista M. C., Rivera C. MC., Lagunes E. LC. y Hernández S.JH. 2011. Etiología de la mancha acuosa de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) en Tabasco, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 29:165-167. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v29n2/v29n2a8.pdf>.
- Date H, Kataoka E, Tanina K, Sasaki S, Inoue K, Nasu H, Kasuyama S. 2004 Sensitivity of *Corynespora cassicola*, causal agent of Corynespora target spot of tomato (*Lycopersicon esculentum*), to thiophanate-methyl and diethofencarb. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 70:7-9.
- Ellis, M. B. 1971 Dematiaceous Hyphomycetes. CMI, Kew, Surrey, England. 2: 413-414.
- Eslaminejad, T. y Zakaria, M. 2011. Morphological characteristics and pathogenicity of fungi associated with Roselle (*Hibiscus Sabdariffa*) diseases in Penang, Malaysia,

- Microbial Pathogenesis 51:325-337.
- FAO. 2010 Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
Dirección electrónica: <http://www.fao.org/news/archive/news->
- Faraji, M. H., & Tarkhani, A. H. 1999. The effect of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on essential hypertension. *Journal of Ethnopharmacology*, 65(3), 231-236.
- Ferreira J.H.S., Matthee F.N. & Thomas A.C. 1981. Fungi associated with dieback and
Gadoury, DM. Pearson, RC. Riegel, DG. Seem, RC, Becker, CM. Pscheidt, JW. 1994.
Reduction of powdery mildew and other diseases by over-the-trellis applications of lime sulfur to dormant grapevines. *Plant Disease*, 78:83-87.
- Gómez-Leyva JF, Martínez-Acosta A, López-Muraira IG, Silos-Espino H, Ramírez-Cervantes F and Andrade-González I. 2008. Multiple shoot regeneration of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) from a shoot apex culture system. *International Journal of Botany* 4: 326-330. <http://dx.doi.org/10.3923/ijb.2008.326.330>
- Gualco, A., y Togni, S. 2001. Folpet. Present situation and usage perspective [Vitis vinifera L.-grapevine downy mildew]. *Informatore Fitopatologico (Italy)*. 45p.
- Hernández-Morales, J., y Romero-Cova, S. 1990. Identificación del agente causal de “pata prieta de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)” y pruebas de fungicidas para su control bajo condiciones de invernadero. *Revista Chapingo* (67-68):50-54.
- Hernández M.J., Ochoa M.D.L., Ortega A.S.A., Vega M.R. 2018. Survey on alternative host of *Corynespora cassiicola*, the cause of the leaf and calix spot, in the surroundings of roselle fields in Mexico. *Tropical Plant Pathology* 43:263-270, <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0206-9>

- Herrera-Arellano, A, Flores-Romero, S, Chávez-Soto, MA. y Tortoriello, J.2004. Effectiveness and tolerability of a standardized extract from *Hibiscus sabdariffa* in patients with mild to moderate hypertension: a controlled and randomized clinical trial. *Phytomedicine*. 11 (5): 375-382.
- Holliday P. 1980. Fungus Diseases of Tropical Crops. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Horts, R. K. 2008. Westcott's Plant Disease Handbook. 7th edition. Springer Verlag Berlin Heidelberg. New York. 1317 p.
- Hyde KD, McKenzie EHC, Dalisay TU. 2001. Saprobiic fungi on bamboo culms. *Fungal Divers*. 7:35-48.
- Kurt S. 2004 Host-specific toxin production by the tomato target leaf spot pathogen *Corynespora cassiicola*. *Turk J Agric and Fores* 28:389-395.
- Lumyong P, Photita W, McKenzie EHC, Hyde KD, Lumyong S. 2003. Saprobiic fungi on dead wild banana. *Mycotaxon* 85:345-346.
- Morton FJ. 1987. Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *In: Fruits of warm climates*, ed. C.F. Dowling Jr. Creative Resources Systems, Inc. Miami, Florida. 2: 281-286.
- Ortega-Acosta SÁ, Hernández-Morales J, Ochoa-Martínez DL and Ayala-Escobar V. 2015. First report of *Corynespora cassiicola* causing leaf and calyx spot on roselle in Mexico. *Plant Dis*. 99(7):1041. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-04-14-0438-pdn>.
- Persad, C. and 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.
- Rafaila, C.D. 1966. Study on white rot of Grapevine caused by *Coniella diplodiella*. *An Inst. Cerc. Prot. Plant* 4: 143–153.

- Romruensukharom P, Tragoonrung S, Vanavichit A, Toojinda T. 2005. Genetic variability of *Corynespora cassiicola* populations in Thailand. *J Rub Res* 8:38-49.
- Saeed, I.E., Sopian, K. and Abidin, Z.Z. 2008. Thin-Layer drying characteristics of roselle (1): mathematical modeling and drying experiments. *Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal*. Manuscript FP 08 015 Vol X: 1-25.
- SIAP. 2017 Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Anuario estadístico de la producción agrícola. Dirección electrónica: <http://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Swart L. and P. Langenhoven 2000. First report of Botrytis blight, caused by Botrytis cinerea on Hibiscus in South Africa. *Plant Disease* 84 (4): 487-48.
- Tee, P. L., Yusof, S., & Mohamed, S. 2002. Antioxidative properties of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in linoleic acid model system. *Nutrition & Food Science*, 32(1), 17-20.
- Tsai, P. J., Hsieh, Y. Y. and Huang, C. T. 2004. Effect of Sugar on Anthocyanin Degradation and Water Mobility in a Roselle Anthocyanin Model System Using 17 O NMR. *Journal Agriculture Food Chem.* 52 (10): 3097–3099.
- Tsai, P. J., McIntosh, J., Pearse, J., Camden, B. and Jordan, B. R. 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Food Research International* 35: 351-356.
- Velázquez-Fernández P, Zamora-Macorra EJ, Ochoa-Martínez DL, Hernández-Morales J. 2016. Virus asociados al amarillamiento de *Hibiscus sabdariffa* en Guerrero, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34: 200-207. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1602-1>.
- Wang J, Tang Y, Yang Y, Ma N, Ling X, Kan J, 2016. Cotton Leaf Curl Multan Virus-Derived Viral Small RNAs Can Target Cotton Genes to Promote Viral Infection. *Front Plant Sci.* 7:1162. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01162>

CAPÍTULO I.- ETIOLOGÍA DEL TIZÓN DE HOJAS Y CÁLCICES DE JAMAICA

(Hibiscus sabdariffa L.) EN GUERRERO, MÉXICO.

1.1.RESUMEN

En el cultivo de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa L.*), en los últimos años se ha incrementado una enfermedad de etiología desconocida, denominada tizón de hojas y cálices; la cual disminuye la producción del cultivo. En este estudio, se realizaron pruebas de patogenicidad, caracterización morfológica y análisis molecular, con la región LSU, ITS y tef1, con el objetivo de identificar el agente responsable de causar la enfermedad presente en Guerrero México. En 2016 se colectaron cálices con síntomas de tizón en el municipio de Ayutla, Guerrero. Se obtuvieron aislados en medio de cultivo papa-dextrosa-agar. El hongo aislado fue *Coniella javanica* con una frecuencia de 100%. Las pruebas de patogenicidad fueron realizadas en invernadero en plantas de jamaica. Después de 12 días, *C. javanica* indujo síntomas similares a los observados en campo. El organismo, fue reaislado a partir de tejidos de plantas con síntomas inducidos e identificado por morfología y técnicas moleculares como *C. javanica*. El análisis BLAST de las secuencias mostró una identidad del 100% con *C. javanica*, Accesoión (ITS: KX833583, LSU: KX833403 y TEF 1- α : MH613977). Las secuencias se depositaron en GenBank (ITS: MH503948, LSU: MH578600 y TEF 1- α : MH613977). Se realizó un análisis filogenético por el método de máxima verosimilitud e incluyendo el conjunto de datos de secuencias publicadas ITS, LSU y EF1- α para *C. javanica* y otras especies de *Coniella*. *C. javanica* se identifica por primera vez como agente causal del tizón de hojas y cálices de jamaica en Guerrero México.

Palabras clave: *Hibiscus sabdariffa L.*, *C. javanica*, ITS.

1.2.ABSTRACT

In the cultivation of the hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.), in the last years a disease of unknown etiology, known as leaf and calyx blight, has increased; which decreases the production of the crop. In this study, tests of pathogenicity, morphological characterization and molecular analysis were carried out, with the LSU, ITS and *tef1* region, with the objective of identifying the agent responsible for causing the disease present in Guerrero, Mexico. In 2016, chalice with symptoms of blight were collected in the municipality of Ayutla, Guerrero. Isolates were obtained in potato-dextrose-agar culture medium. The isolated fungus was *Coniella javanica* with a frequency of 100%. Pathogenicity tests were carried out in greenhouses in Jamaican plants. After 12 days, *C. javanica* induced symptoms similar to those observed in the field. The organism was re-isolated from the induced symptoms and identified by morphology and molecular techniques as *C. javanica*. The BLAST analysis of the sequences showed a 100% identity with *C. javanica*, Accession (ITS: KX833583, LSU: KX833403 and TEF 1- α : MH613977). The sequences were deposited in GenBank (ITS: MH503948, LSU: MH578600 and TEF 1- α : MH613977). A phylogenetic analysis was performed by the maximum likelihood method and including the data set of published ITS, LSU and EF1- α sequences for *C. javanica* and other *Coniella* species. *C. javanica* is identified for the first time as a causal agent of leaf blight and chalice of hibisco in Guerrero, Mexico.

Key words: *Hibiscus sabdariffa* L., *C. javanica*, ITS.

1.3 INTRODUCCIÓN

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es un cultivo importante para México, anualmente se destinan alrededor de 18,000 ha para su producción. En Guerrero se cultiva alrededor del 75% de la superficie nacional (SIAP, 2017).

Las enfermedades constituyen las principales limitantes en la producción de jamaica, la planta es susceptible al ataque de varios patógenos. A nivel mundial se tienen reportes de *Phytophthora parasítica*, causante de pudriciones radicales en África Malasia y Puerto Rico, (Erwin y Ribeiro, 1996) *Coniella musaiaensis*, induce manchas en hojas en Trinidad y Tobago (Persad y Fortune, 1989) y *Corynespora cassiicola*, formando manchas foliares en Brasil (Poltronieri *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014).

En México las principales enfermedades que afectan al cultivo son *Corynespora cassiicola* (Ortega *et al.*, 2015), causante del “manchado de cálices, *Phytophthora parasitica* (Hernández y Romero, 1990) agente causal de “Pata prieta” y *Pilidiella diplodiella* inductor de la “mancha acuosa” (Correa *et al.*, 2011).

En los últimos años, en la zona productora de Guerrero, se detectó una enfermedad de etiología desconocida en este cultivo. Los síntomas consisten de manchas en hojas y cálices, que al coalescer forman lesiones necróticas y presencia de picnidios. Debido al daño que causa en los cálices, disminuye la producción del cultivo. De acuerdo con las características morfológicas observadas al microscopio corresponden al Genero *Coniella*. En México, el único reporte de síntomas similares a los observados en campo, son los de *Pilidiella diplodiella*, agente causal de la mancha acuosa en Tabasco, los síntomas en este cultivo, presentan pequeñas manchas de aspecto acuoso de color café, que se extienden por la lámina foliar, que causa una necrosis de hojas y cálices, con presencia de picnidios (Correa *et al.*, 2011). En Trinidad y Tobago se detectó a *Coniella musaiaensis* var. *hibisci* B. Sutton.

Los síntomas en hojas consisten en pequeñas manchas, que se extienden en grandes lesiones de color café claro, con presencia de picnidios de color negro. En etapas avanzadas, la infección puede causar la muerte de la planta (Persad y Fortune, 1989).

Von Arx (1981), separara el género *Coniella* Höhn de *Pilidiella* en base a características morfológicas, menciona que *Coniella* se caracteriza por presentar conidios de color marrón oscuro y *Pilidiella* conidios hialinos a marrón. Sin embargo, Sutton, (1980) y Nag Raj (1993) mencionan que la coloración conidial, la morfología de la célula conidiogénica y conidióforos, no son una característica distintiva para separar a ambos géneros. Posteriormente Álvarez *et al.*, (2016) a través de un análisis filogenético basado en la región (ITS, LSU, tef1 y rpb2), confirmaron que solo existe un solo género en Schizoparmaceae y que todas las especies de *Pilidiella* y *Schizoparme* con características de conidios hialino o marrón se consideren sinónimos de *Coniella*, debido a lo anterior las características observadas en esta investigación corresponden al Genero *Coniella*.

En los últimos años esta enfermedad se ha incrementado y ha causado pérdidas en la producción de este cultivo. Por lo anterior, el objetivo de este estudio es identificar el agente causal del tizón de hojas y cálices de jamaica, mediante caracterización morfológica, cultural y técnicas moleculares.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo general

- Conocer la etiología del tizón de hojas y cálices de jamaica mediante morfología y técnicas moleculares.

1.4.2 Objetivo específico

- Identificar el agente causal del tizón de hojas y cálices de jamaica, mediante caracterización morfológica, cultural y técnicas moleculares.

1.5 MATERIALES Y MÉTODOS

1.5.1 Ubicación de los sitios de muestreo

Los muestreos se realizaron en la región de la costa chica del estado de Guerrero, en el municipio de Ayutla; el cual se localiza en las coordenadas 16°46' y 17°12' de latitud norte y en los 98°56' y 99°15' de longitud oeste respecto al meridiano de Greenwich. El clima predominante es semicálido subhúmedo, presenta una temperatura media anual de 28°C. La precipitación promedio anual es de 1,400 milímetros (INEGI, 2010).

1.5.2 Colecta de muestras

En 2016, cuando los cálices están próximos a ser cosechados, se visitaron plantaciones comerciales de jamaica. En los sitios de estudio, mediante un muestreo dirigido, se colectaron plantas (cálices y hojas) de jamaica de variedad criolla de Guerrero, con síntomas de la enfermedad, en cinco parcelas comerciales (Figura 1). Adicionalmente también se colectaron plantas asintomáticas como control.

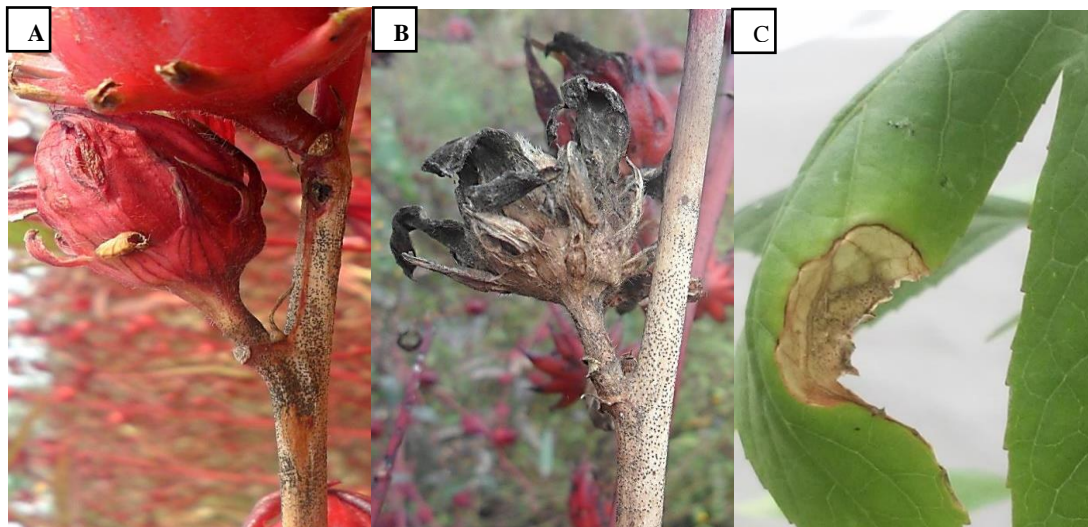


Figura 1. Características de etapas avanzadas de la enfermedad “Atizonamiento de hojas y cálices” en plantaciones comerciales. Nótese: (A) Rama con presencia de picnidios (B) cálices completamente dañados (C) hojas con presencia de tizón y picnidios.

1.5.3 Aislamiento y purificación

El aislamiento del agente causal, se realizó mediante los procedimientos descritos por Cai *et al.* (2009). Se eligieron cinco cálices enfermos al azar por muestra y se cortaron en trozos de 5 x 5 mm aproximadamente, del área de avance del tejido enfermo, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 3 minutos, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, se secaron con papel absorbente estéril y posteriormente los trozos desinfectados se sembraron en cajas Petri en medio de cultivo PDA (Bioxon®, México).

Las cajas Petri se incubaron a 25°C bajo condiciones de oscuridad durante 5 días. Después de este tiempo se transfirieron discos miceliales de 5 mm de diámetro a cajas Petri con PDA y se incubaron a 25 °C por 7 días. Los aislados se transfirieron y purificaron mediante la técnica de cultivos monospóricos, en medio de agua-agar (AA). Posteriormente se transfirieron a PDA para la identificación morfológica.

1.5.4 Caracterización morfológica y cultural

Los cultivos puros se transfirieron a medio de cultivo PDA, y se mantuvieron a temperatura ambiente bajo luz blanca. Posteriormente se midió el crecimiento de todas las colonias cada 24 h durante 5 días, después del tiempo transcurrido se caracterizaron visualmente y se registró el color y forma de la colonia. Posteriormente se realizaron montajes de conidios y picnidios en glicerina, a partir de colonias con crecimiento de 14 días,

y se observaron en un microscopio compuesto (Nikon Eclipse Ci-L®). El sistema de análisis de imágenes Toup View (x86) (Toup View ®, EE.UU) se usó para determinar la forma y el tamaño (largo x ancho) de 50 conidios y 50 picnidios de cada aislado. De la medida de los conidios se calculó la media.

1.5.5 Pruebas de patogenicidad

Paralelamente a lo descrito anteriormente, una vez obtenido el microorganismo puro, se realizaron pruebas de patogenicidad. Para la obtención del material vegetativo en invernadero, se utilizó semilla de jamaica criolla de Guerrero, la cual fue desinfectada con hipoclorito de sodio al 2% antes de la siembra. El crecimiento y desarrollo de la semilla, se dio mediante el uso de charolas de unicel, que contenían una mezcla de Peat Moss y suelo estéril en una proporción 50:50. Las charolas se mantuvieron en cámaras de ambiente controlado, con una temperatura de 25°C durante el día y la noche, con periodos de luz/oscuridad de 12 horas.

El trasplante de las plantas de jamaica, se realizó después de 10 días de crecimiento en cámaras bioclimáticas. Se trasplantaron a macetas que contenían una mezcla de Peat Moss y suelo estéril. Las plantas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero hasta la obtención de hojas y cálices desarrollados.

El organismo aislado de hojas y cálices de jamaica colectadas en campo y desarrolladas en v-8 agar, se inoculó con una densidad de 1×10^5 esporas/ml (KC. y Vallad, 2016) en plantas sanas de jamaica de cuatro meses de edad desarrolladas bajo condiciones de invernadero. El microorganismo fue asperjado con un atomizador manual de forma independiente en diez hojas y cálices/planta, en 5 plantas. En plantas control se asperjó agua estéril en cinco hojas y cálices/plantas, en un total de 5 plantas. Las plantas se mantuvieron

en invernadero y se utilizó un humidificador para mantener una humedad relativa alta. Después de 12 días se registró la presencia de lesiones en cálices de jamaica.

1.5.6 Extracción de DNA, amplificación por PCR y secuenciación

El hongo aislado de hojas y cálices con síntomas de manchado y que resultó patogénico, se identificó también por técnicas moleculares. El DNA se extrajo por el método de AP (Alkaline Phosphatase) descrito por Sambrook y Russel (2001). Para esto, 13 aislados se seleccionaron y se cultivaron en medio PDA por 14 días a 25 °C en luz blanca. El micelio se raspó de la superficie de la colonia, con la ayuda de una espátula de metal, y se adicionaron 250 µL de buffer AP en una cápsula de porcelana estéril para la maceración, el macerado se pasó a tubos eppendorf y se aforó con agua libre de nucleasas, hasta obtener un volumen de 750 µL. Los tubos eppendorf, se incubaron por 30 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12,000 rpm por 1 min. El sobrenadante se decantó y se adicionaron 500 µL de fenol cloroformo 1:1 volumen a un nuevo tubo eppendorf. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 3 min, se recuperó el sobrenadante y se adicionaron nuevamente 500 µL de fenol cloroformo 1:1 volumen a un nuevo tubo de eppendorf y se centrifugó 12,000 rpm durante 3 min. Posteriormente se agregaron 500 µL de Isopropanol y 50 µL de acetato de amonio a una concentración de 10M, el DNA se sedimentó mediante centrifugación a 12,000 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante, se lavó la pastilla con 50 µL de etanol al 70%, se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm por 3 min y se suspendió en 50 µL de agua libre de nucleasas. La concentración de DNA se cuantificó mediante espectrofotometría con ayuda de NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific®, EE.UU.). Una vez obtenido el DNA cuantificado, se almacenó a una temperatura de -20 °C. La región ITS fue amplificada con los primers: ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (5'-

TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990), la región LSU se amplificó con los primers: LR0R (ACCCGCTGAACTTAAGC) (Rehner y Samuels.,1994) e LR7 (5'-TACTACCACCAAGATCT) (Vilgalys y Hester., 1990) y la región tef1 con los primers: EF1-728F (5'CATCGAGAAGTTCGAGAAGG) e EF1-986R (5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC) (Carbone y Kohn., 1999). Las amplificaciones se realizaron con los parámetros de ciclados reportados por Álvarez *et al.* 2016. Las reacciones Forward y Reversed se realizaron en un volumen final de 25µL, que contenían 2.5µL de buffer 10X, 1.25 µL de MgCl₂ a 50mM, 0.5 µL de dNTPs a 10 mM, 1 µL de cada iniciador, agua 16.25 µL Taq- polymerase 0.5 µL (Promega®, USA) y 2µL de cDNA. Las reacciones de ITS, tef1y LSU se realizaron en un termociclador Biometra, con las condiciones siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineamiento a 54 °C por 1 min, y extensión a 72 °C por 1.5 min; y una extensión final de 72 °C por 5 min. Los productos de PCR se observaron por electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Una vez constatada la presencia de una sola banda, el DNA amplificado se envió con la compañía Macrogen (www.macrogen.com), para su secuenciación.

Con las secuencias obtenidas se generó una secuencia consenso por alineamiento (forward y reverse) con DNABaser® Ver. 2.1., y se comparó en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), EE.UU., con la herramienta BLASTN 2.2.26. La secuencia consenso se depositó en el GenBank.

1.5.7Análisis filogenético

Para determinar la relación filogenética entre los aislamientos, las secuencias consenso de la región (ITS+TEF+LSU) fueron procesadas por el programa MEGA ver. 7. Primero, las secuencias fueron alineadas con la ayuda del programa Clustal W (MEGA 7)

(Tamura *et al*, 2011). El análisis filogenético fue realizado con el método de UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Means) (Tamura *et al.*,2007) utilizando las secuencias múltiples de nucleótidos con bootstrap de 1000 repeticiones. Las secuencias tipo, de las especies de *Coniella* obtenidas del GenBank se incluyeron en los análisis.

1.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.6.1 Aislamiento de hongos.

Del muestreo realizado se procesaron 60 fragmentos de tejidos con síntomas en cálices; de los cuales se obtuvieron 13 aislados, de estos 2 pertenecen a la localidad San Miguel, 2 de Tutepec, 2 de Cerro gordo nuevo, 2 de San José la hacienda y 5 de Cuanacazapa. (Cuadro 1). En cálices se aisló a *Coniella* sp con una frecuencia del 100%.

Cuadro 1. Ubicación de los sitios de muestreo.

Código de aislado	Localidad	Municipio	Altitud (msnm)	Latitud N	Longitud O	Fecha de coleta
GUE-11	San Miguel	Ayutla	370	16°58'57.3"	-99°5'59.7"	Diciembre 2016
GUE-25	San Miguel	Ayutla	370	16°58'57.3"	-99°5'59.7"	Diciembre 2016
GUE-14	Tutepec	Ayutla	286	16°56'08.8"	-99°7'46.7"	Diciembre 2016
GUE-20	Tutepec	Ayutla	286	16°56'08.8"	-99°7'46.7"	Diciembre 2016
GUE-39	Cerro gordo nuevo	Ayutla	280	16°56'8"	-99°7'45.2"	Diciembre 2016
GUE-47	Cerro gordo nuevo	Ayutla	280	16°56'8"	-99°7'45.2"	Diciembre 2016
GUE-6	San José la Hacienda	Ayutla	466	16°56'43.5"	-99°7'20"	Diciembre 2016
GUE-29	San José la Hacienda	Ayutla	466	16°56'43.5"	-99°7'20"	Diciembre 2016
GUE-5	Cuanacazapa	Ayutla	410	17°0'53"	-99°9'34.5"	Diciembre 2016
GUE-22	Cuanacazapa	Ayutla	410	17°0'53"	-99°9'34.5"	Diciembre 2016
GUE-12	Cuanacazapa	Ayutla	410	17°0'53"	-99°9'34.5"	Diciembre 2016
GUE-27	Cuanacazapa	Ayutla	410	17°0'53"	-99°9'34.5"	Diciembre 2016
GUE-31	Cuanacazapa	Ayutla	410	17°0'53"	-99°9'34.5"	Diciembre 2016

1.6.2 Morfología y caracteres de la colonia

Las colonias de los 13 aislados del tizón de hojas y cálices, obtenidos de jamaica en parcelas comerciales de Guerrero, México, se muestran en el cuadro 2. Figura. 2.

Colonia en PDA		Conidio (n=20)			Picnidio (n=20)	
Aislado	Color	TC (mm día)	Longitud (µm) media min-máx.)	Ancho (µm) media (min-máx.)	Longitud (µm) media (min-máx.)	Ancho (µm) media (min-máx.)
GUE-5	Bl	6.05	10.03 (8.74-12.44)	3.90 (3.12-4.78)	328.46 (309.01-338.91)	340.19 (302.25-368.49)
GUE-6	Bl	5.02	10.08 (8.22-10.93)	3.51 (2.46-4.75)	316.40 (270.74-356.27)	325.22 (300.04-363.71)
GUE-11	Bl	6.53	10.03 (8.12-11.34)	4.38 (3.81-5.06)	343.90 (324.12-358.33)	302.89 (281.72-315.11)
GUE-12	Bl	7.54	10.39 (8.47-12.43)	3.68 (2.91-4.48)	292.43 (278.57-309.97)	289.82 (268.81-304.82)
GUE-14	Bl	8.91	9.27 (8.04-10.39)	3.86 (2.47-5.03)	190.39 (177.6-200)	207.79 (203.43-216.08)
GUE-20	Bl	8.87	8.50 (6.75-10.18)	3.88 (3.11-4.72)	194.32 (107.72-353.7)	168.28 (108.63-287.53)
GUE-22	Bl	7.53	10.72 (9.6-12.95)	3.64 (3.33-4.2)	313.01 (297.11-327.33)	318.12 (303.54-340.84)
GUE-25	Bl	8.76	10.68 (9.62-12.09)	3.79 (3.14-4.28)	330.25 (300.32-356.27)	309.78 (267.52-351.85)
GUE-27	Bl	6.20	11.81 (10.07-13.96)	4.60 (3.88-5.67)	331.62 (297.11-392.28)	332.94 (293.25-405.12)
GUE-29	Bl	5.25	8.96 (8.02-10.51)	3.24 (2.65-4.35)	265.56 (159.01-327.69)	272.41 (187.43-346.84)
GUE-31	Bl	6.24	10.49 (9.48-11.7)	4.24 (3.11-4.99)	234.73 (181.35-264.95)	256.16 (164.63-302.25)
GUE-39	Bl	6.51	10.64 (9.33-12.12)	4.17 (3.27-5.25)	299.46 (264.95-363.99)	294.97 (258.53-324.76)
GUE-47	Bl	5.53	11.50 (9.57-12.66)	4.42 (3.64-5.48)	316.64 (300.32-348.6)	333.23 (308.68-349.53)

Cuadro 2. Características morfológicas de 13 aislados, obtenidos de tejido de jamaica, con síntomas del tizón de hojas y cálices, en plantaciones comerciales en Guerrero México.

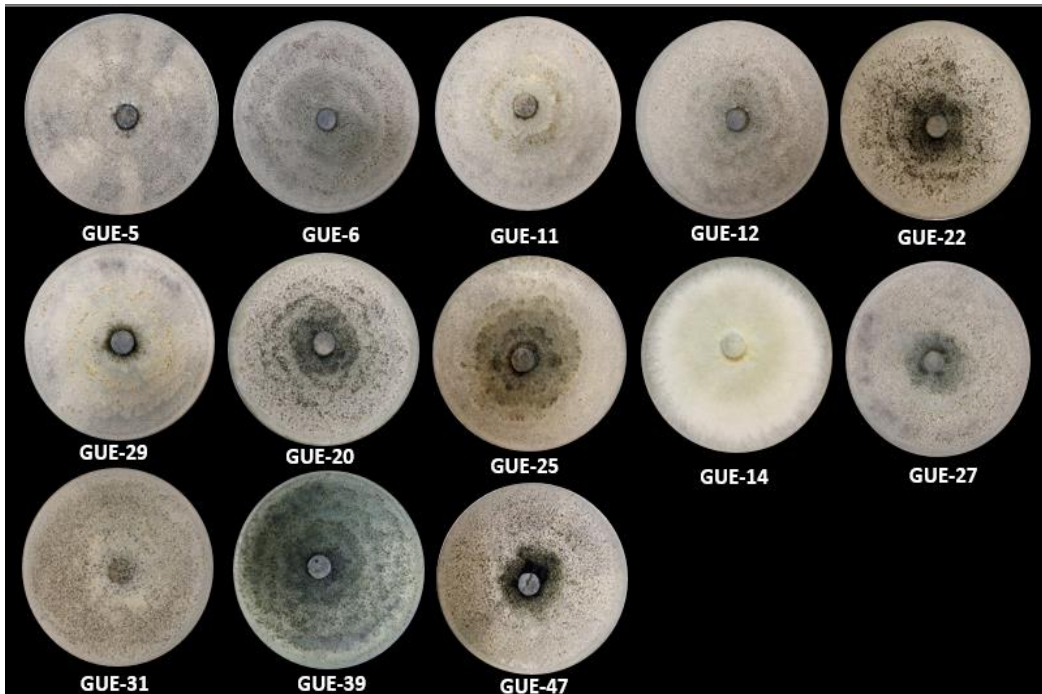


Figura 2. Características morfológicas y culturales de 13 aislados obtenidos de tejido de jamaica con síntomas del tizón de hojas y cálices, en huertos comerciales de Guerrero México.

1.6.3 Características morfológicas y culturales

El hongo aislado de cálices de jamaica fue: *Coniella javanica* L. V. Alvarez & Crous. El hongo formó colonias blancas a grisáceas con un crecimiento micelial de 5.37 a 7.21 mm día⁻¹ (media= 6.21 mm día⁻¹) (Figura 2); conidióforos densamente agregados y ramificados de color marrón claro; los conidios midieron de 11.81-8.96 x 4.60 -3.64 (largo x ancho), de formas fusiforme a elipsoidal, de hialinos a marrón y de base truncada; los picnidios midieron 256.16-343.9 µm de formas globosas a subglobosas, de color negro.(Figura 3, A y B) Características distintivas de *C. javanica* (Álvarez *et al.*,2016).

Von Arx (1981), separara el género *Coniella* Höhn de *Pilidiella* en base a características morfológicas, menciona que *Coniella* se caracteriza por presentar conidios de

color marrón oscuro y *Pilidiella* conidios hialinos a marrón. Sin embargo, Sutton, (1980) y Nag Raj (1993) mencionan que la coloración conidial, la morfología de la célula conidiogénica y conidióforos, no son una característica distintiva para separar a ambos géneros. Posteriormente Álvarez *et al.*, (2016) a través de un análisis filogenético basado en la región (ITS, LSU, *tef1* y *rpb2*), confirmaron que solo existe un solo género en Schizoparmaceae y que todas las especies de *Pilidiella* y *Schizoparme* con características de conidios hialino o marrón se consideren sinónimos de *Coniella*, debido a lo anterior las características observadas en esta investigación corresponden al Genero *Coniella*.

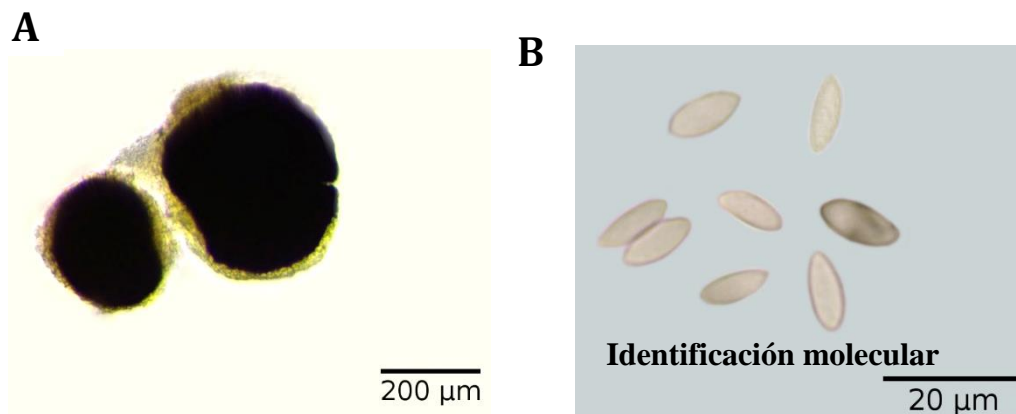


Figura 3 A. Picnidio negro globoso B. Conidias de hialino a marrón claro, desarrollados en PDA

1.6.4 Pruebas de patogenicidad

En invernadero, el promedio de temperatura y humedad fue de 25°C y 80%, respectivamente. En estas condiciones ambientales, las plantas inoculadas con el organismo aislado de las muestras originales, manifestaron síntomas típicos del tizón de hojas y cálices (Figura 4) a los 8 días después de la inoculación (ddi). En hojas, los síntomas consistieron en

manchas circulares o irregulares de color café. En etapas avanzadas coalescieron en extensas lesiones necróticas (Figura 4-D). Los cálices infectados presentaron manchas de color café de formas circulares a irregulares. En etapas avanzadas del proceso de inoculación (28 ddi), se formó un atizonamiento general de la planta y presencia de picnidios. Tanto en hojas como en cálices, los síntomas fueron similares a los observados en plantas afectadas en campo. Para el reaislamiento del patógeno se tomó tejido infectado de las plantas inoculadas y se llevó el mismo procedimiento de invernadero (Figura 4). Por lo tanto, es el primer reporte de *C. javanica* causando atizonamiento de hojas y cálices en Guerrero México. Álvarez *et al.* (2016) indicaron que, en Indonesia *C. javanica* en hojas de jamaica, causa manchas necróticas con presencia de picnidios. En México no existen reportes de la presencia de *C. javanica* en cultivos agrícolas, sin embargo; Correa *et al.* (2011) en el Estado de Tabasco identificaron a *Pilidiella diplodiella* como agente causal de la enfermedad “mancha acuosa” en jamaica; los síntomas se caracterizaron por ser similares a los reportados por *C. javanica*. En hojas, los síntomas consisten en pequeñas manchas que se extienden en grandes lesiones de color café, y presencia de picnidios. En etapas avanzadas de la enfermedad, la infección puede causar la muerte de la planta. Asimismo, Martínez (2010) reportó a *C. musaiaensis* Sutton var. *Hibisci* asociada al manchado necrótico, en cálices de jamaica (Martínez, 2010; Correa *et al.*, 2011). En Trinidad y Tobago Persad y Fortune (1989) informaron que *Coniella musaiaensis* var. *hibisci* B. Sutton, causa síntomas en hojas de jamaica similares a los descritos en el presente estudio. Por otro lado, en el cultivo de vid *Coniella diplodiella*, fue reportado como agente causal de la podredumbre blanca en la vid, los síntomas consistieron en la presencia de picnidios y atizonamiento general de la planta (Rossman *et al.*, 2007).

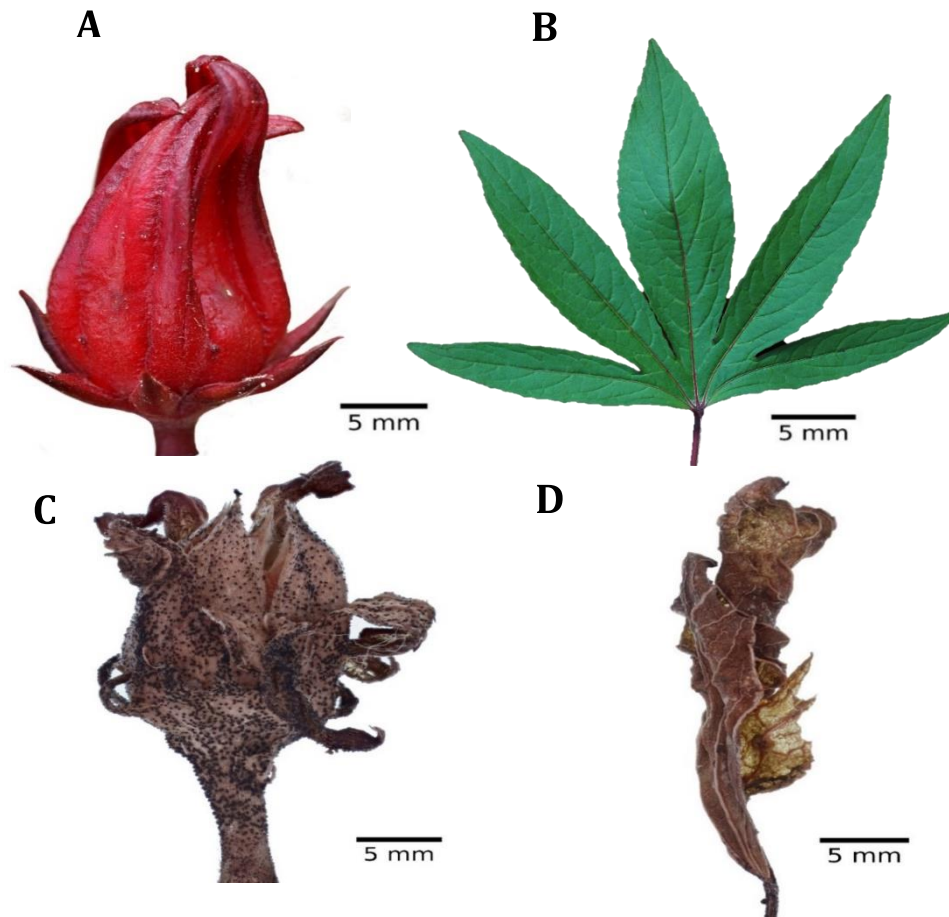


Figura 4. Síntomas inducidos por *C. javanica* en jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) bajo condiciones de invernadero. A-B Cálices y hoja de jamaica sanas, C-D tizón y presencia de picnidios en cálices y hojas de jamaica variedad criolla.

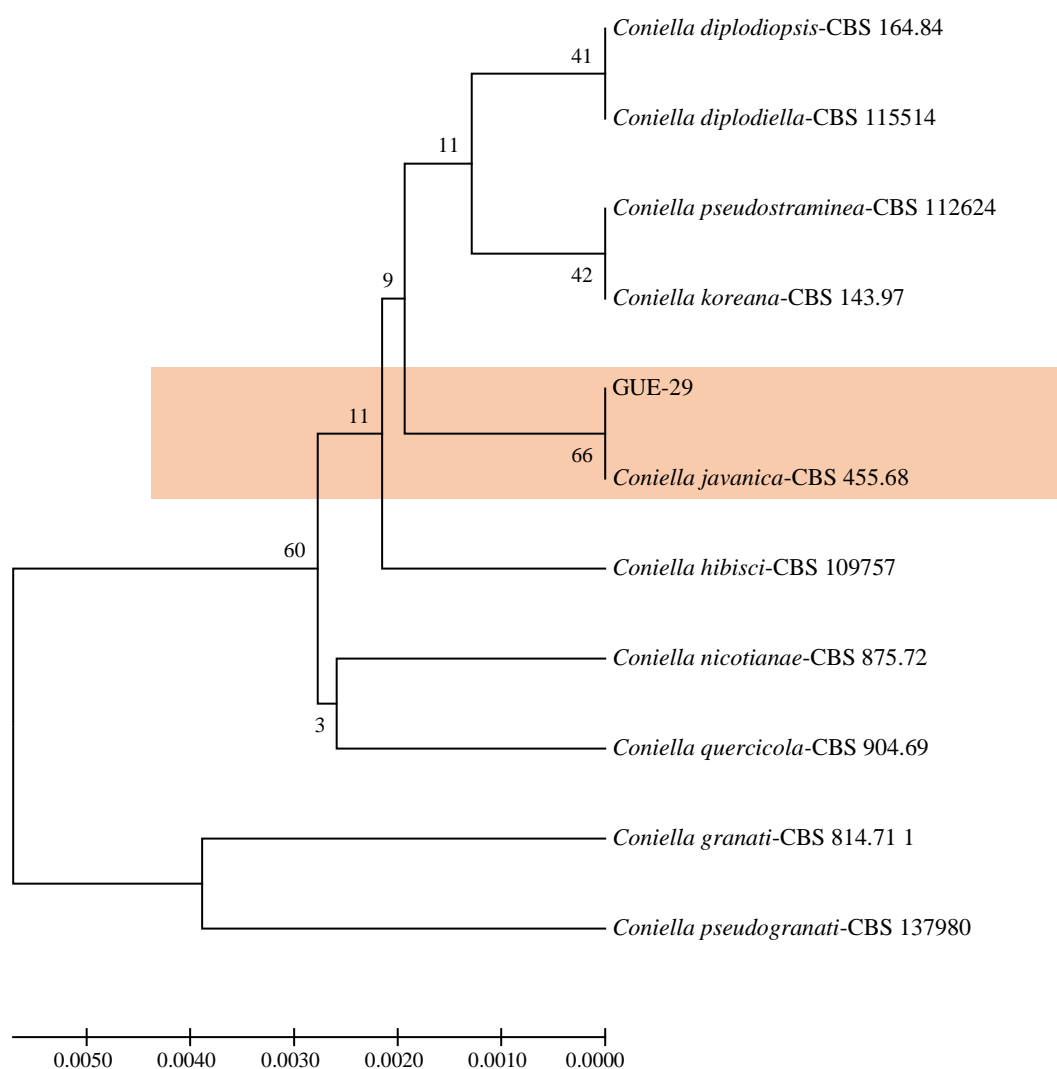
1.6.5 Identificación molecular

Con base en las regiones amplificadas (ITS, LSU, Tef1) de los aislamientos fúngicos; aislado de cálices con síntomas de atizonamiento, se obtuvo unasecuencias consenso por región amplificada. La comparación mediante una búsqueda (BLAST) en GenBank reveló 100% de identidad con otros aislamientos de *Coniella javanica*, por ejemplo: ITS: KX833583, LSU: KX833403 y TEF 1- α : MH613977 aislado de *hibiscus sabdariffa*., provenientes de Indonesia. (Álvarez *et al.*, 2016), lo que confirmó la identidad del hongo

como *C. javanica*. Las secuencias consenso se depositaron en GenBank con el número de acceso (ITS: MH503948, LSU: MH578600 y TEF 1- α : MH613977).

1.6.6 Análisis filogenético

Se realizó un análisis filogenético por el método de máxima verosimilitud e incluyendo el conjunto de datos de secuencias publicadas ITS, LSU y EF1- α para *C. javanica*, y otras especies de *Coniella*.



Árbol de máxima verosimilitud basado en el análisis filogenético del conjunto de secuencia de la región ITS, factor de elongación (TEF 1- α) y subunidad 28S del ARN ribosómico

nuclear LSU. El árbol muestra las relaciones filogenéticas de las especies de *Coniella* publicadas en GenBank. GUE-29 se alinea con *Coniella javanica*.

1.7 CONCLUSIONES

Las características morfológicas y culturales de los aislados obtenidos de tejidos de jamaica con síntomas de mancha acuosa pertenecen a *C. javanica*.

El análisis de datos de las secuencias de la región, ITS, LSU y tef1, revelaron que *C. javanica* es la especie responsables de causar la enfermedad del tizón de hojas y cálices. Asimismo, *C. javanica* se identifica por primera vez en el cultivo de jamaica en México.

1.8 LITERATURA CITADA

- Álvarez, L.V; Groenewald, J.Z; Crous, P.W. 2016. Revising the Schizoparmaceae: Coniella, Pilidiella and Schizoparme. *Studies in Mycology*. 85:1-34.
- Cai L., Hyde, K.D., Taylor, P. W. J., Weir, B. S., Waller, J., Abang, M. M., Zhang, J. Z., Yang Y. L., Phoulivong S., Liu, Z. Y., Prihastuti, H., Shivas, R. G., McKenzie, E. H. C., and Johnston P. R. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* 39: 183–204.
- Carbone I, Kohn LM 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553–556.
- Correa Sánchez, E., Ortiz García, C. F., Torres de la Cruz, M., Muñoz, B., del Carmen, C., Rivera Cruz, M. D. C., & Hernández Salgado, J. H. 2011. Etiología de la Mancha Acuosa de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) en Tabasco, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 29(2), 165-167.
- Erwin, D. C., & Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora diseases worldwide*. American Phytopathological Society (APS Press).
- Hernández M. J. y Romero C. S. 1990. Identificación del agente causal de “pata prieta de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)” y pruebas de fungicidas para su control bajo condiciones de invernadero. *Revista Chapingo* (67-68):50-54.
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía 2010. disponible en: <https://www.inegi.org.mx/>
- KC A. N. and G. E. Vallad. 2016. First Report of Pilidiella granati Causing Fruit Rot and Leaf Spots on Pomegranate in Florida. *Plant Disease* 100 (6):1238.

- Martinez-Sanchez C. 2010. Etiología e incidencia de hongos asociados al manchado de cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) En Guerrero, México. Maestría, Colegio de Postgraduados. 101 p.
- Nag Raj, T. R. 1993. *Coelomycetous anamorphs with appendage-bearing conidia*. Mycologue Publications.
- Ortega-Acosta S.A., Javier H.M.J., S.I J.S., A.E.V., S.R.L. 2015. Distribución y Frecuencia de Organismos Asociados a la Enfermedad “Pata Prieta” de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México en Texcoco, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25 (2): 125-134.
- 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(4), 615-617.
- Poltronieri, T. P. D. S., Poltronieri, L. S., Verzignassi, J. R., Benchimol, R. L., & Carvalho, E. D. A. 2012. Vinagreira: novo hospedeiro de *Corynespora cassicola* no Pará. *Summa Phytopathologica*, 38(2), 167-167.
- Rehner SA, Samuels GJ. 1994. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* 98: 625–634.
- Rossmann, A. Y., Farr, D. F., & Castlebury, L. A. 2007. A review of the phylogeny and biology of the Diaporthales. *Mycoscience*, 48(3), 135-144.
- Sambrook J and Russel DW. 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory manual* third edition. New York. Cold Spring Harbour Laboratory Press. 46 p.
- SIAP 2017. Servicio de información Agroalimentaria y pesquera Consultado el 2 de Febrero de 2018 en <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>

- Silva GS., Rego AS and Leite RR. 2014. Doenças da vinagreira no Estado do Maranhão. *Summa phytopathol.* 40 (4): 378-380. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/2002>.
- Sutton, B. C. 1980. *The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia Acervuli and Stomata* Kew, England: Commonwealth Mycological Institute 696 p.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA 7: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Tamura, K., Peterson, N., Stecher, G., and Nei, M. 2011. MEGA 7: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731-2739.
- Vilgalys R, Hester M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238–4246.
- Von Arx J. A. 1981. The genera of fungi sporulating in pure culture 3:10-320
- White TJ, Bruns T, Lee S. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: a guide to methods and applications* (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, San Diego: USA: 315–322.

**CAPÍTULO II. INTERACCIÓN ENTRE *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt.) C.T.
Wei Y *Pilidiella* sp. EN EL MANCHADO DE HOJAS Y CÁLCICES DE JAMAICA
(*Hibiscus sabdariffa* L.) EN GUERRERO**

2.1 RESUMEN

El manchado de cálices, causado por *Corynespora cassiicola*, y la “pata prieta” causado por *Phytophthora parasitica* son las enfermedades más importantes de jamaica en México; ya que afectan la producción de cálices. En los últimos años, la asociación de *C. cassiicola* con *Coniella javanica*, ha causado una reducción importante en la producción de jamaica. Con el objeto de investigar las dimensiones de dicha reducción, se realizó un experimento para evaluar los efectos de la interacción de *C. cassiicola* y *C. javanica* bajo condiciones de invernadero. Para lo anterior, se usaron plantas de cinco meses de edad y se utilizaron colonias de *C. cassiicola* y *C. javanica* desarrolladas en PDA de siete días de crecimiento. Se realizó un diseño completamente aleatorio con siete repeticiones, los tratamientos fueron los siguientes: T1= *C. cassiicola* T2= *C. javanica* T3= *C. cassiicola* +*C. javanica* inoculadas al mismo tiempo + T4= *C. cassiicola* +*C. javanica* con la inoculación de esta última siete días después T5= *C. javanica* +*C. cassiicola* con la inoculación de esta última siete días después T6= Control. Los resultados revelaron que existe diferencias significativas del efecto de los tratamientos en la severidad en hojas, encontrándose los siguientes porcentajes de severidad 46% en T1, 65% en T3, 66% en T2, 82% en T5 y el 90% en T4. Similarmente, los resultados de los efectos de los tratamientos en cálices indican que existe diferencias significativas, observándose los siguientes niveles de severidad 52% en T1, 69% en T2, 71% en T3, 75% en T5 y 93% en T4. Estos resultados muestran que existe un efecto sinérgico, encontrado que el T4 es el que causa el más alto porcentaje de severidad tanto en hojas como

en cáliz. Lo anterior es relevante para tomar medida de control con el fin de disminuir las pérdidas por esta enfermedad en este cultivo.

Palabras clave: Interacción, *C. javanica*, severidad

2.2 ABSTRACT

Calyx spotting, caused by *Corynespora cassiicola*, and the "brown leg" caused by *Phytophthora parasitica* are the most important diseases of Hibisco in Mexico; since they affect the production of chalices. In the last association of *C.* with *Coniella javanica*, has caused a significant reduction in the production of Jamaica. In order to investigate the dimensions of this reduction, an experiment was carried out to evaluate the effects of the interaction of *C. cassiicola* and *C. javanica* under greenhouse conditions. For the above, plants of five months of age were used and colonies of *C. cassiicola* and *C. javanica* developed in PDA of seven days of growth were used. A completely randomized design with seven replications was carried out, the treatments were as follows: T1 = *C. cassiicola* T2 = *C. javanica* T3 = *C. cassiicola* + *C. javanica* inoculated at the same time + T4 = *C. cassiicola* + *C. javanica* with the inoculation of the latter seven days after T5 = *C. javanica* + *C. cassiicola* with the inoculation of the latter seven days after T6 = Control. The results revealed that there are significant differences in the effect of the treatments on leaf severity, with the following percentages of severity 46% in T1, 65% in T3, 66% in T2, 82% in T5 and 90% in T4. Similarly, the results of the effects of the calyx treatments indicate that there are significant differences, observing the following levels of severity: 52% in T1, 69% in T2, 71% in T3, 75% in T5 and 93% in T4. These results show that there is a synergistic effect, found that T4 is the one that causes the highest percentage of severity in both leaves and calyx. The above is relevant to take control measure in order to reduce losses from this disease in this crop.

Keywords: Interaction, *C. javanica*, severity

2.3. INTRODUCCIÓN

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es una planta dicotiledónea de la familia Malvácea, cuyos cálices son utilizados principalmente para la elaboración de aguas frescas (Tsai *et al.*, 2002). También presenta propiedades medicinales; se utiliza para tratar la hipertensión y como diurético (Faraji y Tarkhani, 1999; Herrera-Arellano *et al.*, 2004).

Según la FAO (2004), México es el séptimo país a nivel mundial en producción de jamaica, en donde el estado de Guerrero es el principal productor con una superficie sembrada de 14,033 ha, seguido por Oaxaca y Michoacán (SIAP, 2017).

La jamaica es susceptible a diversas enfermedades que disminuyen su producción (Amusa *et al.*, 2005). En México, el manchado de cálices, causado por *Corynespora cassiicola* y la pata prieta, causado por *Phytophthora parasitica* (Hernández y Romero, 1990; Ortega-Acosta *et al.*, 2015), son las enfermedades más importantes en el cultivo de jamaica; ya que afectan su producción. La incidencia de *Corynespora cassiicola* puede llegar a 100%, infectando hojas y cálices frescos. En los últimos años *C. cassiicola* en asociación con la enfermedad de atizonamiento de hojas y cálices, ha causado una nueva problemática que impacta la producción de jamaica en Guerrero.

C. cassiicola ha sido reportada comúnmente como un hongo fitopatógeno foliar con una amplia gama de hospedantes dentro de áreas tropicales y subtropicales (Holliday 1980; Romruensukharom *et al.*, 2005), también se ha reportado como endófito o saprófito (Collado 1999; Hyde *et al.*, 2001; Gond *et al.*, 2007). La enfermedad inicia en hojas inferiores y avanza a hojas superiores, caracterizándose por presentar manchas foliares circulares e irregulares de color marrón claro, rodeado por un halo amarillo, debido a la síntesis de una toxina llamada cassicolina. En estado avanzado se presenta una necrosis en toda la lámina foliar y

peciolo, como consecuencia una defoliación total, y por tanto perdida en la productividad de hasta un 100%. (Deón *et al.*, 2012; Ortega-Acosta *et al.*, 2015)

En los últimos años en Guerrero, se presentó una enfermedad denominada atizonamiento de hojas y cálices de jamaica; cuyos síntomas son similares a los causados por *Pilidiella diplodiella* (*Coniellaa diplodiella*) responsable de la mancha acuosa en el cultivo de jamaica, la cual fue reportada como una nueva enfermedad en Cárdenas Tabasco, México. (Correa, 2011). Las plantas enfermas se caracterizan por presentar manchas irregulares de color marrón claro la necrosis con apariencia acuosa se extiende a toda la lámina foliar y peciolo, estas inician en las hojas inferiores y se expanden a las hojas superiores, provocan defoliación total con la consecuente pérdida en productividad (Correa *et al.*, 2011).

Aunque los hongos pueden causar enfermedades en las plantas por sí solos, existen interacciones de sinergismo o antagonismo entre diferentes hongos fitopatógenos, que dan como resultado una mayor incidencia y severidad. El sinergismo se define como parasitismo concurrente que sufre un hospedante por dos patógenos, en el que los síntomas u otros efectos producidos son más notables que en el caso del conjunto de los síntomas que causa cada patógeno por separado (Agrios, 2005). En México existen estudios que demuestran sinergismo, en la pudrición negra del fruto de cítricos, entre *Alternaria citri* y *Colletotrichum gloeosporioides*. *A. citri* se caracteriza por ser el agente primario de la enfermedad, el hongo penetra por la cicatriz estilar y provoca en el interior de ésta una pudrición, que después de la recolección se produce un oscurecimiento del eje central, mientras que *C. gloeosporioides* actúa como organismo secundario ya que interviene indirectamente en el proceso infeccioso, y se comporta como un hongo saprófito. (Prendes, 2002).

El antagonismo se define como una interacción entre microorganismos donde uno interfiere con el otro, es decir causa la pérdida o la actividad de uno de ellos. Esta es la base

sobre la que se sustenta el verdadero control biológico de microorganismos fitopatógenos en las plantas (Pérez, 2004). Un ejemplo de antagonismo es *Trichoderma* spp., este es un agente que muestra gran capacidad para el control de fitopatógenos, ya que ejerce efecto antagónico ya sea por antibiosis, micoparasitismo o competencia. (Chet *et al.*, 1981). En plantas de jitomate cultivadas *in vitro*, se demostró que *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride*, mostró antagonismo sobre *C. cassiicola* ya que inhibió el crecimiento micelial en un 100% durante 72 horas (Ruiz *et al.*, 2005).

En virtud de que *C. cassiicola* y *C. javanica*, se han observado únicamente al final del ciclo del cultivo de jamaica en Guerrero y hasta ahora el manchado de cálices, solo se ha atribuido a *C. cassiicola*, se desconoce la interacción que pudiera existir entre estos patógenos.

Por ello el objetivo fue determinar si existe interacción de sinergismo o antagonismo entre *C. cassiicola* y *C. javanica*, en el manchado de hojas y cálices en jamaica bajo condiciones de invernadero.

2.4.OBJETIVOS

2.4.1 Objetivo general

- Determinar el sinergismo o antagonismo de *Corynespora cassiicola* y *Coniella javanica* en el manchado de hojas y cálices de jamaica.

2.4.2 Objetivo específico

- Evaluar el efecto sinérgico o antagónico cuando los patógenos infectan al mismo tiempo.
- Evaluar el efecto sinérgico o antagónico cuando se inocula primero a *C. cassicola* y siete días posteriores a *C. javanica* y viceversa

- Evaluar el efecto sinérgico o antagónico cuando los patógenos se inoculan por separado

2.5.MATERIALES Y MÉTODOS

2.5.1 Evaluación de interacción bajo condiciones de invernadero

Se realizaron los ensayos para medir el efecto *C. cassiicola*, *C. javanica* y su interacción en plantas sanas de jamaica variedad criolla de aproximadamente cinco meses de edad. cultivadas en invernadero. Se verificó que todas las plantas tuvieran cálices y hojas desarrolladas.

2.5.2 Fuente de inóculo

Se utilizaron colonias de *C. cassiicola* y *C. javanica*, aisladas de material vegetal proveniente del municipio de Ayutla, cultivadas en PDA de siete días de crecimiento. Para ambos patógenos se utilizó una concentración de esporas de 2×10^5 conidios por mililitros (Ortega-Acosta *et al*, 2015; KC. y Vallad, 2016).

2.5.3 Diseño experimental

El estudio se realizó bajo un diseño experimental completamente aleatorio, el cual consistió en la evaluación de seis tratamientos (Cuadro 3) con siete repeticiones por tratamiento. La unidad experimental fue una planta cultivada en maceta en condiciones de invernadero, se evaluaron diez hojas y cinco cálices por cada unidad experimental.

Cuadro 3. Tratamientos y método de inoculación para evaluar la severidad de *C.*

cassiicola y *C. javanica*

Tratamientos	Descripción del método de inoculación
T1. <i>C. cassiicola</i>	Aspersión de suspensión de espora sobre follaje y cálices.
T2. <i>C. javanica</i>	Aspersión de suspensión de espora sobre follaje y cálices.
T3. <i>C. cassiicola</i> + <i>C. Javanica</i>	Aspersión de suspensión de espora de ambos patógenos al mismo tiempo.
T4. <i>C. cassiicola</i> + <i>C. javanica</i>.	Aspersión de suspensión de espora de <i>C. cassiicola</i> y 7 días después la inoculación con <i>C. javanica</i>
T5. <i>C. javanica</i> + <i>C. cassiicola</i>.	Aspersión de suspensión de espora de <i>C. javanica</i> y 7 días después la inoculación con <i>C. cassiicola</i> .
T6 Control	Aplicación de agua destilada estéril

3.5.4 Variable evaluada

La variable respuesta a los tratamientos fue la severidad en hojas y cálices. Se realizaron nueve evaluaciones. Las evaluaciones se registraron con intervalos de cuatro días. Las escalas logarítmicas diagramáticas para evaluar la severidad del manchado y atizonamiento de cálices, utilizada en hojas y cálices consistió de seis clases. En hojas: la clase 0 es sin grado de severidad (0%), 1 (>0-2-4), 2 (>4-7-12), 3 (>12-19-29), 4 (>29-42-57) y 5 (>57-70-≤100); y para cálices: la clase 0 es sin grado de severidad (0%), 1 (>0-3-5), 2 (>5-10-18), 3 (>18-30-46), 4 (>46-63-77) y 5 (>77-87-≤100) (Figuras 5A y 5B).

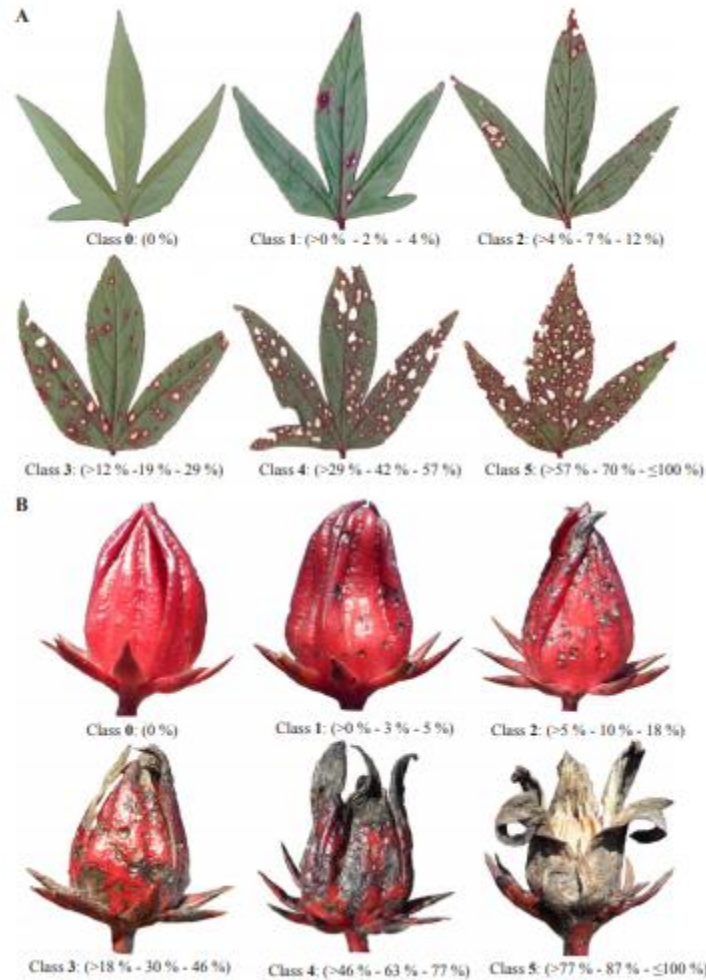


Figura 2. Escalas logarítmicas diagramáticas para evaluar la severidad del manchado en jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) inducida por *Corynespora cassiicola*. A) Escala para evaluar la severidad en hojas. B) Escala para evaluar la severidad en cálices. Propuesta por Ortega-Ortega-Acosta *et al.*, 2015).

3.5.5 Modelo estadístico

El modelo estadístico que se utilizó es el siguiente:

$$Y_i = X_i\beta + Z_i b_i + q_i \quad (Z_i K_i = X_i)$$

$$b_i \sim N(0, D) \quad q_i \sim N(0, \Sigma)$$

$b_1, \dots, b_m, q_1, \dots, q_m$: mutuamente independientes

Donde:

β : Efectos fijos.

b_i y q_i : Efectos aleatorios

Componentes de varianza: Elementos de las matrices D y Σ_i

Note que la matriz de varianzas y covarianzas del vector aleatorio Y_i es $Cov(Y_i) = Z_i D Z_i' + \Sigma_i$

3.5.6 Análisis Estadístico

El análisis se realizó usando un modelo mixto donde los tratamientos se consideraron como un factor fijo, y la hoja anidada en la planta como un factor aleatorio. La comparación de medias que permite el ordenamiento según el grado de severidad de cada uno de los tratamientos, se realizó mediante el procedimiento de Tukey-Kramer al nivel $\alpha=0.05$, con el programa SAS® versión 9 (SAS Institute, Cary, NC, EE.UU.) Previamente, se realizó una prueba de normalidad y homogeneidad de varianza a fin de verificar el cumplimiento de los supuestos del modelo.

2.6.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los tratamientos inoculados en plantas de jamaica mostraron síntomas en hojas. El T4 mostró la mayor severidad, debido a que en la última evaluación alcanzó una severidad del 90% (Figura 6). Sin embargo, la severidad se incrementó desde la cuarta evaluación, donde se observó con mayor frecuencia síntomas en hojas. Posteriormente, de la quinta a la octava evaluación la severidad presentó un aumento constante, en la mayoría de los tratamientos, mientras que en la evaluación nueve la severidad aumentó drásticamente, en la Figura 6 se muestra el comportamiento temporal de los tratamientos que resultaron con mayor o menor severidad.

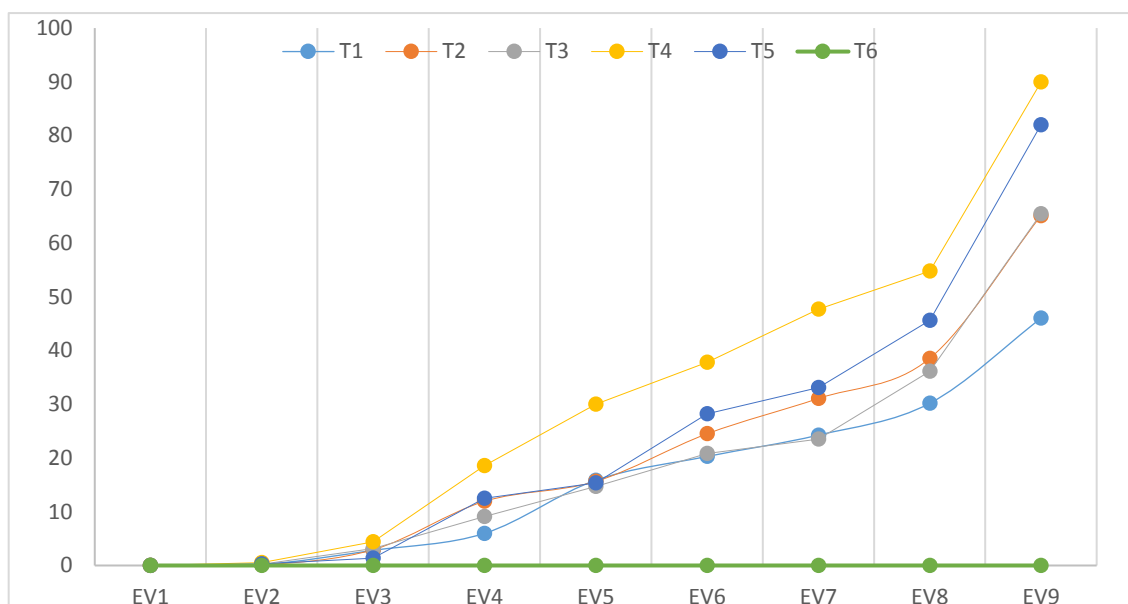


Figura 6. Progreso de la enfermedad en hojas de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en los diferentes tratamientos, durante las nueve evaluaciones.

Todos los tratamientos inoculados en plantas de jamaica mostraron síntomas en cálices. El T4 mostró la mayor severidad, en la última evaluación alcanzó una severidad del 93% (Figura 7). Sin embargo, la severidad se incrementó desde la cuarta evaluación, donde

se observó con mayor frecuencia síntomas en cálices. Posteriormente, de la cuarta a la quinta evaluación la severidad presentó un aumento drástico, en la mayoría de los tratamientos, mientras que de la quinta a la novena evaluación la severidad aumentó constantemente, en la Figura 7 se muestra el comportamiento temporal de los tratamientos que resultaron con mayor o menor severidad.

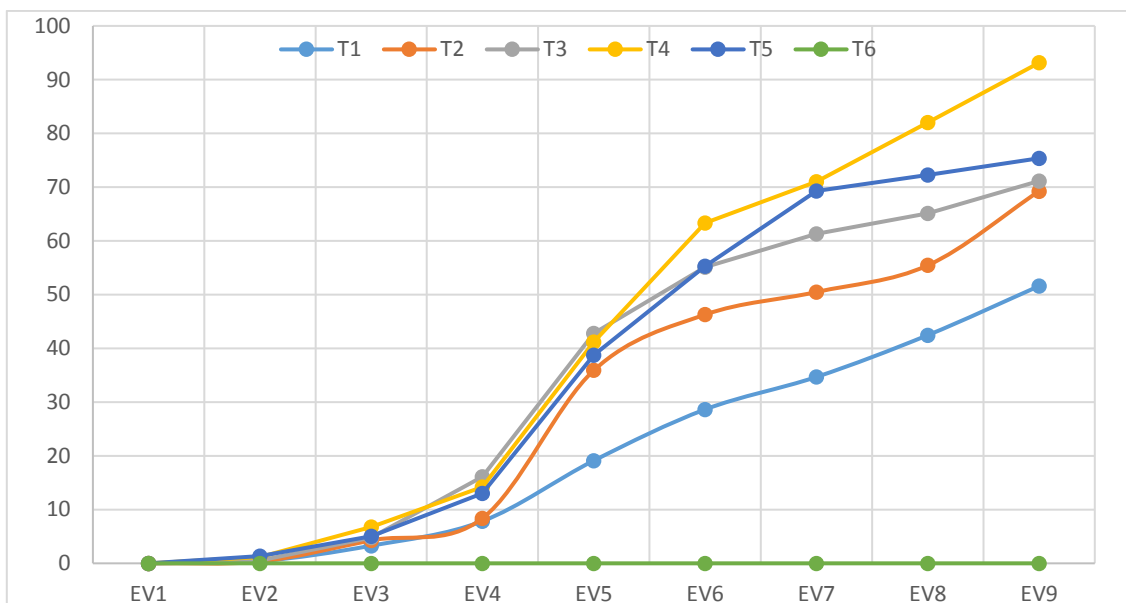


Figura 7. Progreso de la enfermedad en cálices en los diferentes tratamientos, durante las nueve evaluaciones.

En la comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$) en hojas, se encontró que T1 (*C. cassicola*), presentó una severidad significativamente menor al resto de los tratamientos (Cuadro 5), con excepción del testigo. Los tratamientos T2 (*C. javanica*) y T3 (*C. cassicola* + *C. javanica*) no mostraron diferencia significativa en la severidad entre ellos mientras que el tratamiento T5 (*C. javanica* + 6 *C. cassicola*) presentó una severidad significativamente mayor a los tratamientos T2 y T3. El T4 (*C. cassicola* + 6 *C. javanica*) presentó una severidad significativamente mayor al resto de los tratamientos (Figura 6).

En la comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$) en cálices, se encontró que T1 (*C. cassicola*), presentó una severidad significativamente menor al resto de los tratamientos (Cuadro 5), con excepción del testigo. Los tratamientos T2 (*C. javanica*) y T3 (*C. cassicola* + *C. javanica*) no mostraron diferencia significativa en la severidad entre ellos mientras que el tratamiento T5 (*C. javanica* + 6 *C. cassicola*) presentó una severidad significativamente mayor a los tratamientos T2 y T3. El T4 (*C. cassicola* + 6*C. javanica*) presentó una severidad significativamente mayor al resto de los tratamientos (Figura 7).

Cuadro 4. Promedios de severidad y comparación Tukey de los tratamientos evaluados en hojas y cálices de jamaica.

Tratamientos	Hojas		Cálices		
	Promedios (%)	Tukey Agrupación	Tratamientos	Promedios (%)	Tukey Agrupación
T4	89.9	A	T4	93.14	A
T5	82.0	B	T5	75.37	B
T2	65.8	C	T3	71.14	C
T3	65.4	C	T2	69.25	C
T1	46.0	D	T1	51.60	D
T6	0.0	E	T6	0.0	E

2.6.1 Evaluación de severidad en hoja

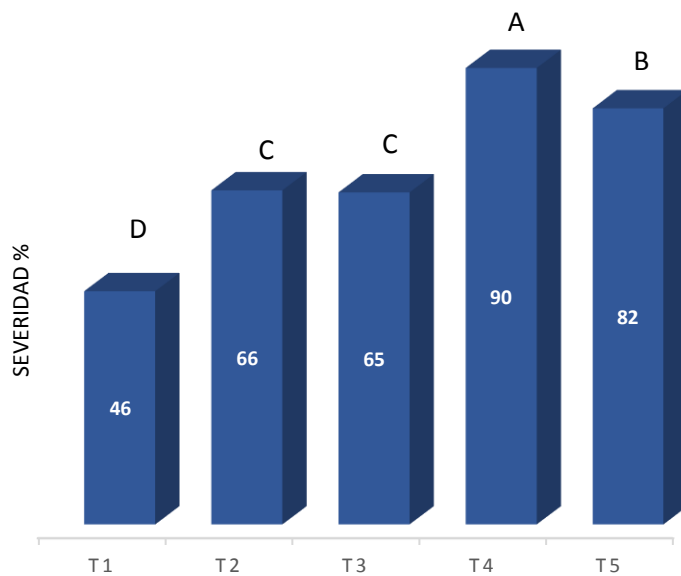


Figura 8. Evaluación de severidad % en hoja de los diferentes tratamientos, bajo condiciones de invernadero.

2.6.2 Evaluación de severidad en cálices

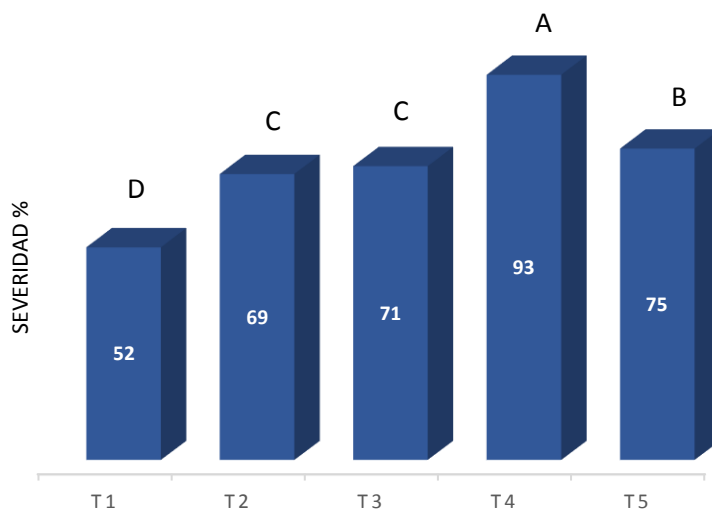


Figura 9. Evaluación de severidad % en cálices de los diferentes tratamientos, bajo condiciones de invernadero.

Los resultados mostraron diferencia cuando el T4 presentó un porcentaje de severidad mayor al resto tanto en hojas como en cálices, por lo que se determina que existe una interacción de sinergismo cuando se inocula *C. cassiicola* y seis días posteriores a *C. javanica* que cuando se inocularon los dos patógenos por separado o de manera simultánea. Los resultados sugieren que al causar infección *C. cassiicola* primero, esto le permite ser una puerta de entrada a *C. javanica* para un ataque más agresivo. Estos resultados son similares con Ferrerira *et al.* (1989) y Ely (2004) quienes mencionan que en hojas de Eucalipto *Cylindrocladium pteridis*, constituye una puerta de entrada a *Coniella fragariae*; permitiendo que esta penetre los tejidos debilitados del hospedante y necrose rápidamente la hoja; por lo que al estar en asociación las dos enfermedades, la severidad es mayor que cuando se encuentra *Cylindrocladium pteridis* de forma aislada en el hospedante. Asimismo, Ferrerira *et al.* (1989), encontraron que plántulas de eucalipto afectadas por *C. fragariae* en asociación con *Rhizoctonia solani* presentan una mayor severidad que cuando éstas plántulas son infectadas solamente por *Rhizoctonia solani*. Además, Prendes (2002), menciona que en cítricos existe interacción de sinergismo entre *Alternaria citri* y *Colletotrichum gloeosporioides* cuando se encuentran en el mismo hospedante, debido a que la severidad aumenta en presencia de ambos a diferencia de cuando afecta *Colletotrichum gloeosporioides* únicamente. Cabe mencionar que la sinergia del T5 también tiene un grado de severidad importante, lo cual indica un sinergismo en este caso.

2.7 CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados, en este estudio se concluye que existe sinergismo en el ataque de los hongos *C. javanica* y *C. cassiicola* al infectar plantas de jamaica bajo condiciones de invernadero siendo este mayor cuando se da la interacción. Por lo anterior se debe tomar las medidas pertinentes en el manejo de este cultivo.

2.8 LITERATURA CITADA

- Agrios, G. 2005. Fitopatología. segunda Edición. Grupo. Noriega. México DF México 838p.
- Amusa, N.A., Adegbite, A. A. and Oladapo, M.O. 2005. Vascular Wilt of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) in the humid forest Region of South-western Nigeria. *Journal of Plant Pathology* 4:122-125.
- Campbell, C.L. and Madden, L.V. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley and Sons. New York, USA. 532 p.
- Chet, I., Harman, G. E. and Baker, R. 1981. *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora* spp. *Microbial Ecology* 7:29-38
- Collado J, Platas G, Gonzalez I, and Pelaez F. 1999. Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. *New Phytol* 144:525-532
- Correa Sánchez, E., Ortiz García, C. F., Torres de la Cruz, M., Muñoz, B., del Carmen, C., Rivera Cruz, M. D. C., & Hernández Salgado, J. H. 2011. Etiología de la Mancha Acuosa de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) en Tabasco, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 29(2), 165-167.
- Déon M, et al, 2012. Characterization of a cassiicolin-encoding gene from *Corynespora cassiicola*, pathogen of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Sci* 185-186: 227-237.
- Ely F. A., Otón H. y Sari M. 2004. Aislamiento e Identificación de hongos foliares patógenos a *Eucalyptus urophylla* en Venezuela. *Revista Fitopatología Venezuela* ,17(1), 12-16.
- FAO. 2004 Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
Dirección electrónica: <http://www.fao.org/news/archive/news->

- Faraji, M. H., & Tarkhani, A. H. 1999. The effect of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on essential hypertension. *Journal of Ethnopharmacology*, 65(3), 231-236.
- Ferreira, F.A. 1989. Patologia forestal. Sociedad de Investigación Forestal Brasil 570 pp.
- Ferreira, F.A., Alfenas, A. C. and Coelho, L. 1997. Portas de entrada para *Coniella fragariae* em folhas de Eucalipto Rev. Arvore 21:307-311.
- Gond SK, Verma VC, Kumar A, Kumar V, Kharwar RN. 2007. Study of endophytic fungal community from different parts of *Aegle marmelos* Correae (Rutaceae) from Varanasi (India). *World J Microbiol Biotechnol* 23:1371-1375
- Hernández-Morales, J., y Romero-Sanchez S. 1990. Identificación del agente causal de “pata prieta de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)” y pruebas de fungicidas para su control bajo condiciones de invernadero. *Revista Chapingo* 68:50-54.
- Herrera-Arellano, A, Flores-Romero, S, Chávez-Soto, MA. y Tortoriello, J.2004. Effectiveness and tolerability of a standardized extract from *Hibiscus sabdariffa* in patients with mild to moderate hypertension: a controlled and randomized clinical trial. *Phytomedicine*. 11 (5): 375-382.
- Holliday P. 1980. Fungus Diseases of Tropical Crops. Cambridge University Press. Cambridge, UK. Romruensukharom P, Tragoonrung S, Vanavichit A, Toojinda T. 2005. Genetic variability of *Corynespora cassiicola* populations in Thailand. *J Rub Res* 8:38-49.
- Hyde KD, McKenzie EHC, Dalisay TU. 2001. Saprobic fungi on bamboo culms. *Fungal Divers*. 7:35-48.
- KC A. N. and G. E. Vallad. 2016. First Report of *Pilidiella granati* Causing Fruit Rot and Leaf Spots on Pomegranate in Florida. *Plant Disease* 100 (6):1238.

- Ortega-Acosta S.A., Javier H.M.J., S.I J.S., A.E.V., S.R.L. 2015. Distribución y Frecuencia de Organismos Asociados a la Enfermedad “Pata Prieta” de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México en Texcoco, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25 (2): 125-134.
- Ortega-Acosta, S.A., Velasco-C., Hernández-Morales, J., Ochoa-Martínez, D L., Hernández-Ruiz, J. 2015 Diagrammatic logarithmic scales for assess the severity of spotted leaves and calyces of roselle *Revista Mexicana de Fitopatología* 34(3): 270-285.
- Pérez Consuegra Nilda 2004 Manejo Ecológico de Plagas. La Habana, Cuba. Editorial Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural. 3:127-284.
- Prendes, C., Lorenzo, C. D., Melo, C., Cabrera, R., Giménez. 2002 Identificación de Hongos Fitopatógenos en cultivos de Terceira, Azores. 18 p
- Romruensukharom P, Tragoonrung S, Vanavichit A, Toojinda T. 2005. Genetic variability of *Corynespora cassiicola* populations in Thailand. *J Rub Res* 8:38-49.
- Ruiz, M. A., Soto-Hernandez, M., & Escalante, A. E. 2005. Inhibición del crecimiento micelial de hongos fitopatogenos in vitro con lupanina y un extracto alcaloideo obtenido de semillas de *Lupinus exaltatus* Zucc. (Fabacea). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(2), 124-129.
- SIAP. 2017 Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Anuario estadístico de la producción agrícola. Dirección electrónica: <http://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Tsai, P. J., McIntosh, J., Pearse, J., Camden, B. and Jordan, B. R. 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Food Research International* 35: 351-356.