



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSGRADO EN BOTÁNICA

**ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN
DE *Trichoderma* spp. E *Hibiscus
sabdariffa*.**

OLIVIA MARTÍNEZ VILLAMIL

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

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO

2022



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: **ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE *Trichoderma spp.* e *Hibiscus sabdariffa***. realizada por el (la) alumno (a): **OLIVIA MARTÍNEZ VILLAMIL** 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
BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO (A)

Dr. F. VICTOR CONDE MARTÍNEZ

ASESOR (A)

Dr. JAVIER HERNANDEZ MORALES

ASESOR (A)

M.C. RUBÉN SAN MIGUEL CHÁVEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, agosto de 2022

ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE *Trichoderma* spp. E *Hibiscus sabdariffa*

Martínez-Villamil, Olivia, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2022

RESUMEN

Se inocularon plantas de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) de dos variedades, criolla (Vc) y tempranera (VT) con 6 cepas diferentes de *Trichoderma* spp. aisladas del suelo de un cultivo familiar de Tepoztlán Morelos. Las plantas se mantuvieron en invernadero hasta su floración, se colectaron los cálices para analizar los compuestos antioxidantes de tipo polifenólico producidos durante la interacción con *Trichoderma* spp., se evaluó la acumulación de antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante. Los resultados indicaron que las plantas de la variedad criolla inoculadas con la cepa M6PMrp2 de *Trichoderma* produjo 8.12 g eq de ác. gálico/ 100g de peso seco (Ps), mientras que las de la variedad tempranera tuvieron un menor efecto en la producción de fenoles. Las plantas de la variedad tempranera inoculadas con la cepa de *Trichoderma* M1rp2 produjeron 2.82g eq de ác. gálico/ 100g de peso seco. La evaluación de antocianinas en las plantas variedad criolla e inoculadas con *Trichoderma* (6 cepas) se obtuvieron valores de 2.16g eq. de cianidina 3-glucocido/ 100g de peso seco mientras que la variedad tempranera inoculada con *Trichoderma* produjo 0.98g eq. de cianidina 3-glucocido/ 100g de peso seco. La variedad criolla en interacción con *Trichoderma* mostró un alto porcentaje en actividad antioxidante por DPPH comparado con la variedad tempranera.

Palabras clave: jamaica, *Trichoderma*, fenoles totales, antocianinas, jamaica tempranera, jamaica criolla.

ANALYSIS OF THE INTERACTION OF *Trichoderma* spp. AND *Hibiscus sabdariffa*.

**Olivia Martínez Villamil, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2022**

ABSTRACT

Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) plants of two varieties, criolla (Vc) and tempranera (VT) were inoculated with 6 different strains of *Trichoderma* spp. isolated from the soil of a family farm in Tepoztlán, Morelos. The plants were kept in a greenhouse until flowering, the calyxes were collected to analyze the antioxidant compounds of polyphenolic type produced during the interaction with *Trichoderma* spp., the accumulation of anthocyanins, total phenols and antioxidant activity were evaluated. The results indicated that the plants of the criolla variety inoculated with the *Trichoderma* strain M6PMrp2 produced 8.12 g eq of ac. gallic/ 100g of dry weight (DW), while those of the tempranera variety had a lower effect on the production of phenols. Plants of the tempranera variety inoculated with the *Trichoderma* M1rp2 strain produced 2.82g eq of ac. gallic / 100g of dry weight. The evaluation of anthocyanins in the criolla variety plants and inoculated with *Trichoderma* (6 strains) values of 2.16g eq. of cyanidin 3-glucocide/ 100g of dry weight while the tempranera variety inoculated with *Trichoderma* produced 0.98g eq. of cyanidin 3-glucocid/ 100g of dry weight. In interaction with *Trichoderma*, the criolla variety showed a higher percentage in antioxidant activity compared with the tempranera variety.

Key words: roselle, *Trichoderma*, total phenols, anthocyanins, roselle criolla, roselle tempranera.

AGRADECIMIENTOS

A CONACyT por haberme brindado una beca para cumplir este grado académico y poder realizar este trabajo de investigación.

Al Colegio de Postgraduados campus Montecillo porque a pesar de todo lo que paso me dio la oportunidad de concluir, y sobre todo por todo lo aprendido, las instalaciones y los investigadores que lo conforman.

Al posgrado en Botánica por haberme aceptado en principio mi solicitud de entrada y brindarme las herramientas para realizar el proyecto.

Al Dr. F. Víctor Conde Martínez por la propuesta de trabajo y motivarme a meter solicitud de ingreso al colegio, además de aceptarme en su laboratorio.

A mi papá Aurelio Martínez por animarme, apoyarme para continuar estudiando y conseguir este grado académico.

Dr. Ebandro Uscanga Mortera, por su apoyo con material (macetas), además de la orientación en el análisis de resultados.

Dr. Javier Hernández Morales por ayudarme con técnicas de laboratorio, literatura y nuevo aprendizaje.

M.C. Victoria Ayala gracias por el apoyo en el laboratorio en todo momento durante el aislamiento de las cepas de *Trichoderma*.

A los amigos que conocí que siempre me mostraron su apoyo, que cuando tuvo alguna duda o necesité un consejo siempre estuvieron ahí: Kari, Uri, Karla, Christian, Ceci, Elsa, Xochitl. Recordar como todos llegamos a un lugar que no conocíamos, el apoyo que brindamos y como poco a poco nos sentimos como una familia.

A René Rodríguez Florentino, llegaste para cambiar mi vida en muchos aspectos y nunca imagine que este cambio sería tan grande, como el hecho de traer pequeñas personas a nuestro presente, gracias por siempre alentarme, regañarme y toda la ayuda que me has dado para continuar con la tesis.

M.C. Rubén San Miguel Chávez gracias por el apoyo brindado en el laboratorio, así como siempre mostrar su disponibilidad para ayudarme a cualquier duda.

DEDICATORIA

“El tiempo perdido no vuelve trayendo las ocasiones que se desperdiciaron”

A la vida

Después de recibir la noticia de emprender una nueva etapa en mi vida, en mi profesión me costó mucho pensar en las personas a las cuales iba a dejar en mi hogar, pero en ese momento tenía que aprovechar la oportunidad que me estaban dando de ingresar a una maestría.

En el camino mis abuelitos Teresa Vargas Ortiz y Gilberto Villamil Ayala, dejaron esta vida y nunca imagine que llegarían nuevas personas a mi vida, personas que cambiarían las cosas tal y como las imaginaba, he aprendido que hay que aprovechar cada oportunidad en el instante que se te presenta, nunca se sabe si mañana tendrás oportunidad de hacerlo, incluso de volver a ver a personas o regresar a un lugar, agradezco el poder llegar a la culminación de esta etapa y saber que no fue en vano, llevo en mi corazón todas esas palabras bonitas que me dieron de aliento para siempre seguir adelante y con mucho cariño vivirán por siempre en mi corazón.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA.....	vii
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
ABREVIATURAS.....	xiv
I.-INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	3
Objetivos	3
Hipótesis	3
III.- REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
3.1. Producción de jamaica en el mundo.	4
3.2 Producción de jamaica en México.....	5
3.3 Rentabilidad del cultivo de jamaica	5
3.4. Variedades de jamaica registradas en México.....	6
3.5.- Características del cultivo de jamaica.....	6
3.6.- Ciclo biológico.....	7
3.7.- Taxonomía de la planta de jamaica	7
3.9.- Propiedades químicas de la jamaica.	8
3.9.1.- Actividad biológica de cáliz de jamaica.....	8
3.10.- Metabolitos secundarios de las plantas.	9
3.11.- Generalidades de los metabolitos secundarios (compuestos fenólicos).....	9
3.11.1.- Antocianinas	9
3.11.2- Antioxidantes y Actividad antioxidante.....	10
3.11.3. Determinación de compuestos fenólicos totales	10
3.11.4. Compuestos fenólicos presentes en extractos de jamaica	12
3.12.- Problemas fitosanitarios que enfrenta el cultivo de jamaica	12
3.13.- Productos químicos utilizados en el cultivo de jamaica.	15
3.14.- El género <i>Trichoderma</i>	15

3.15 <i>Trichoderma</i> como simbiote	17
3.16 <i>Trichoderma</i> como promotor de crecimiento vegetal	17
3.17 Encendido de mecanismo defensa vegetal.....	17
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	19
4.1. Muestreo de suelo.....	19
4.2. Aislamiento de <i>Trichoderma</i>	19
4.3. Inoculo de <i>Trichoderma</i>	20
4.4. Aseptización de semillas de jamaica.....	20
4.5. Germinación de semillas de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	20
4.6. Trasplante de plántulas a macetas	21
4.7. Inoculación de plantas de <i>Hibiscus sabdariffa</i> con <i>Trichoderma</i> spp.....	21
4.8. Crecimiento de plantas.	22
4.9. Secado de material vegetal.....	22
4.10. Extracción de fenoles totales.	23
4.11. Determinación de fenoles totales por método de Folin-Ciocalteu	23
4.12. Extracción de antioxidantes por la técnica 2,2- Difenil-1-Picril-hidrazilo (DPPH).....	24
4.13. Extracción y cuantificación de antocianinas.....	24
4.14. Análisis en cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	25
4.14.1 Antocianidinas.....	25
4.14.2 Compuestos fenólicos.....	25
4.15 Flavonoides.....	27
4.16 Diseño experimental	29
V. RESULTADOS.....	30
5.1. Caracterización morfológica macroscópica de <i>Trichoderma</i> spp.....	30
5.2 Cuantificación de fenoles y actividad antioxidante en dos variedades de jamaica.....	31
5.3. Cuantificación de antocianinas	37
5.4.- Ácidos fenólicos detectados en variedad criolla y tempranera por HPLC.....	38
5.5. Flavonoides detectados en variedad criolla y tempranera por HPLC.....	40
5.6.- Antocianidinas detectados en variedad criolla y tempranera por HPLC	41

VI. DISCUSIÓN.....	42
VII. CONCLUSIONES	45
VIII. LITERATURA CITADA	46
ANEXO.....	49

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.- Compuestos bioactivos presentes en jamaica. (modificado Borrás-Linares <i>et al.</i> , 2015).....	12
Cuadro 2.- Tratamientos usados para determinación de fenoles y DPPH.	21
Cuadro 3.- Tiempo de retención y longitud de onda de ácidos fenólicos.	27
Cuadro 4.- Tiempo de retención y longitud de onda de flavonoides.	28
Cuadro 5 Interacción entre variedades y tratamientos en la concentración de fenoles.....	34
Cuadro 6 Interacción entre variedades y tratamientos en la actividad antioxidante.	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Producción mundial de jamaica (Modificado, FAO, 2010)	4
Figura 2.- Cálices de jamaica.....	5
Figura 3.- Colecta de cálices de flor de jamaica de manera artesanal y separación de capsulas para el resguardo de semillas en cultivo familiar.....	6
Figura 4.- Flor y cáliz de jamaica	7
Figura 5.- Estructura química de cianidina 3- glucosido.....	10
Figura 6.- Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu.	11
Figura 7.- Insectos plaga que causan perdidas en el cultivo de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	12
Figura 8.- Manchado en el haz de las hojas de coloración rojo durante diferentes etapas fenologicas de la planta, estos sintomas estan asociados al genero <i>Phoma sp.</i> (Trujillo- Tapia et al., 2015).	13
Figura 9.- Sintomas de manchado de cáliz, en variedades Criolla, Colima 5, Cotzalzin y Alma blanca. (Trujillo- Tapia et al., 2015).	14
Figura 10.- Estructuras microscópicas de <i>Trichoderma</i>	16
Figura 11.- Mecanismos utilizados por <i>Trichoderma</i> para la promoción de crecimiento vegetal.	18
Figura 12.- Localización y colecta de suelo en el municipio de Tepoztlán, Morelos.	19
Figura 13.- A , calices de jamaica variedad criolla crecida en invernadero sin <i>Trichoderma</i> (Vc s/Tri inv), B , Variedad criolla cultivada en campo Tepoztlán (Vc campo), C , calices de jamaica variedad criolla inoculada con <i>Trichoderma</i> (VcTri), D , variedad tempranera inoculada con <i>Trichoderma</i> (VT Tri).....	22
Figura 14.- Experimento factorial.	29
Figura 15.- Cepas de <i>Trichoderma</i> aisladas de cultivo de jamaica, A M6PM, B M1, C M1rp2, D M6Ld, E M6PMrp2, F M6Eqr2.....	30
Figura 16.- Concentración de fenoles solubles totales en dos variedades de jamaica, variedad criolla (Vc) y variedad tempranera (VT) inoculadas con las 6 cepas de <i>Trichoderma</i> . Se incluyen 2 controles de plantas sin inocular de ambas variedades. (3 repeticiones por tratamiento).	32

Figura 17.- Interacción entre variedad de jamaica, concentración de fenoles y cepas (tratamientos).	34
Figura 18.- Actividad antioxidante (%) de dos variedades de jamaica, inoculados con las seis cepas (tratamientos son la combinación de las variedades y las cepas) y las dos variedades sin inocular.	35
Figura 19.- Interacción entre variedad de jamaica, concentración de actividad antioxidante y cepas (tratamientos).	36
Figura 20.- Contenido de antocianinas en cálices de jamaica (<i>Hibiscus sabdarifa</i>) variedad criolla (Vc) y tempranera (VT) con diferentes tratamientos. Las medias con letras distintas indican diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).	38
Figura 21.- Detección de estándares de compuestos fenólicos en muestras de jamaica, inoculados con seis cepas de <i>Trichoderma</i>	39
Figura 22.- Contenido de flavonoides presentes en ambas variedades de jamaica, inoculados con las seis cepas de <i>Trichoderma</i> , y plantas sin inocular para ambas variedades (criolla y tempranera).	40
Figura 23.- Concentración de antocianidinas presentes en variedad tempranera inoculada con <i>Trichoderma</i> , plantas de la variedad criolla sin inocular crecidas en el invernadero, jamaica criolla crecida en Tepoztlán y plantas de la variedad criolla inoculadas con <i>Trichoderma</i> . Las medias con letras distintas indican diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$)	41

ABREVIATURAS

Kilogramos (Kg)

La organización de las naciones unidas para la alimentación y la Agricultura (FAO)

Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER)

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP)

Toneladas (t)

Variedad criolla (Vc)

Variedad tempranera coneja (VT)

Miligramos mg

Muestra 6 parte media repetición 2 (M6PMrp2)

Muestra 6 parte media (M6PM)

Muestra 6 esquina repetición 2 (M6Eqr2)

Muestra 6 lado (M6Ld)

Muestra 1 (M1)

Muestra 1 repetición 2 (M1rp2)

Papa destroxa agar PDA

Ps peso seco

Eq Equivalente

I.-INTRODUCCIÓN

El consumo de bebidas elaboradas y otros productos a base de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) en México se ha popularizado, aparentando ser un ingrediente originario del país. Sin embargo, la jamaica es originaria del continente asiático (Ruiz-Ramírez *et al.*, 2014) y ha tomado relevancia en la gastronomía a nivel mundial; el cáliz de la flor es el órgano de interés. Es por esto que diferentes estados de la República Mexicana han desarrollado cultivos de jamaica destacando como primer productor el estado de Guerrero con 73.6% (SADER, 2021), pero la alta demanda en relación a la baja producción en México en el periodo de 2008-2018, causó que se importaran un total de 107, 229, 427. 12 kg proveniente de Alemania, China, Nigeria, Senegal entre otros, destacando Senegal con 64% del total importado (SENASICA-SAGARPA, 2017), el producto es distribuido a 16 entidades de la República Mexicana, el 78.4 % se queda en la Ciudad de México, uno de los problemas fitosanitarios presente en esta mercancía es la presencia del gorgojo khapra (*Trogoderma granarium*), (Rodríguez-Vázquez, 2019), por esta razón en 2010 CONACyT solicitó que se realizarán trabajos sobre el mejoramiento genético del cultivo para poder aumentar el rendimiento del cultivo, y aprovechar los compuestos bioactivos para la salud humana, entre ellos se encuentran los ácidos fenólicos y antocianinas, estos últimos son de gran relevancia por ser responsables de la coloración de los cálices. En la comercialización del producto, uno de los factores limitantes es la humedad, el porcentaje mínimo de humedad preferible es del 10 al 12 %, sin embargo, en la etapa de almacén los cálices sirven como sustrato para que se desarrollen hongos, se ha reportado que a 14.7% de humedad hay presencia del crecimiento de hongos del género: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Nodulisporium*, *Chaetomium*, *Thielavia* (Ruiz- Ramirez *et al.*, 2015), *Corynespora cassicola* causando el manchado del cáliz (Hernández *et al.*, 2020), *Fusarium oxysporum* y *Phoma sp.* (Trujillo-Tapia *et al.*, 2015). El daño que producen los hongos fitopatógenos se refleja en la estética y calidad del producto comercial así como la disminución en la producción, este daño se puede contrarrestar por el uso de hongos del género *Trichoderma* debido a su actividad antagonista, ya que promueven el crecimiento de las plantas y activan el sistema de defensa de las mismas, el papel de *Trichoderma* como agente de control biológico que se ha venido estudiando hace varios años, pero se destaca más su papel como

antagonista contra hongos de importancia fitosanitaria, en donde se ha demostrado que gracias a la producción de quitinasas y glucanasas puede llegar a inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum* que es el agente biológico responsable de la enfermedad conocida como pata prieta en jamaica (Osorio-Hernández, 2014), el presente trabajo se evaluó la producción de antocianinas y fenoles totales, así como la actividad antioxidante en dos variedades de jamaica, producidas por la interacción entre *Trichoderma* e *Hibiscus sabdariffa*.

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivos

- Evaluar algunos compuestos antioxidantes en dos variedades de *Hibiscus sabdariffa* en interacción con *Trichoderma* spp.
- Identificar la composición de estos compuestos antioxidantes en *Hibiscus sabdaiffa* por HPLC.

Hipótesis

La interacción de *Trichoderma* spp. con *Hibiscus sabdariffa* favorece la acumulación de compuestos bioactivos en el cáliz de jamaica.

III.- REVISIÓN DE LITERATURA.

3.1. Producción de jamaica en el mundo.

El cultivo de *Hibiscus sabdariffa* (jamaica) proveniente de india y malasia, reconocido a nivel mundial por sus atractivos subproductos ha despertado interés, de tal forma que China se destaca como primer productor con 27 200 toneladas (t), India con 17 550 t, Sudán 8 920t, Uganda 8 230t, Indonesia 6 100t, Malasia 5 420t y México 5 030t ocupando en séptimo lugar en producción. (FAO, 2010) Fig. 1.



Figura 1. Producción mundial de jamaica (Modificado, FAO, 2010)

La alta demanda en el consumo de jamaica en relación a la baja producción en México en el periodo de 2008-2018, ha causado que se importaran un total de 107, 229, 427. 12 kg proveniente de Alemania, China, Nigeria, Senegal entre otros, destacando Senegal con 64% del total importado, el producto es distribuido a 16 entidades de la República Mexicana, el 78.4 % se queda en la Ciudad de México, aunque uno de los problemas fitosanitarios presente en esta mercancía es la presencia de gorgojo khapra (*Trogoderma granarium*), (Rodriguez-Vazquez, 2019). Al parecer la importación se ha encargado de abastecer la necesidad de consumo de este producto, pero debido a la persistencia de gorgojo esto da oportunidad para que México pueda producir y generar el recurso.

3.2 Producción de jamaica en México.

En México se siembran 19 mil hectáreas con un rendimiento de 370 kg ha⁻¹ reportado por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2018), siendo Guerrero el primer productor con 73.6% (SADER, 2021), Michoacán en el segundo lugar con 526 hectáreas (SADER, 2019), Oaxaca, Puebla y Nayarit, cada vez hay más estados que se dedican a la producción de jamaica (Fig. 2).



Figura 2.- Cálices de jamaica

3.3 Rentabilidad del cultivo de jamaica

Su importancia social radica en que el cultivo lo atienden productores de escasos recursos que realizan la cosecha de manera manual, lo que propicia empleo, pero origina incrementos en los costos de producción (Serrano, 2008).

La alta demanda en el consumo de jamaica ha hecho que esta brinde una fuente de empleo como es el caso del estado de Oaxaca, en donde durante la época de invierno genera un ingreso para las familias, la cosecha de cálices debe ser manual debido a la presentación del producto (Fig. 3), los cálices enteros son más llamativos, además que el uso de maquinaria aumentaría el costo, para medir la rentabilidad del cultivo se toma en cuenta la inversión de recursos utilizados para la producción como lo es el consumo de agua, fertilizantes, plaguicidas, mano de obra y adquisición de semillas.



Figura 3.- Colecta de cálices de flor de jamaica de manera artesanal y separación de capsulas para el resguardo de semillas en cultivo familiar.

Caamal-Cauich *et al.* (2020) realizaron un estudio del costo de producción de jamaica en el municipio de Santo Domingo de Morelos, Oaxaca, en donde como indicadores de rentabilidad se aplicó como concepto la inversión total que fue de \$20, 063.68 pesos por hectárea por un total de 60.48kg producidos por hectárea, a esto se le restaron los costos de producción que fueron de \$16, 651.22 pesos, lo que deja una ganancia de \$3, 412.46 pesos. Cabe resaltar que los ingresos dependen de la variedad cultivada.

3.4. Variedades de jamaica registradas en México

A nivel internacional se cuenta con 200 variedades registradas, mientras que en México algunas variedades son la variedad criolla, Alma blanca, Coneja o tempranera, Tecoaapa, Estrella costeña, Patriota, Mulata (SADER,2018), entre otras. Los nombres que reciben pueden variar y dependen de las características del cáliz que producen, así como del lugar en donde se cosecha.

3.5.- Características del cultivo de jamaica.

Se establece principalmente en zonas tropicales y subtropicales, se cultiva generalmente en suelos marginales de baja fertilidad y con poca retención de humedad.

La jamaica es una planta tipo arbustivo con una altura de uno hasta de tres metros, las hojas son lobuladas con margen cerrado o liso (Fig. 4), el cáliz es característico por ser rojo y carnososo, se han encontrado variedades con características tardías y precoces, el ciclo vegetativo (número de días contado a partir de la emergencia hasta la cosecha de cálices) mayor a 198 días para las variedades muy tardías: Una variedad precoz es capaz de disminuir el tiempo de cosecha, menor a 136 días (SAGARPA, 2014).

3.6.- Ciclo biológico

El periodo en el que el cultivo se desarrolla es corto cuando se habla de una variedad precoz como es el caso de la variedad Coneja (tempranera), sin embargo, se debe considerar la temperatura, la jamaica ha tenido éxito en su producción en lugares con temperaturas altas (Fig. 4), en temperaturas bajas el periodo se alarga además de favorecer a microorganismos como es el caso de algunos hongos.

3.7.- Taxonomía de la planta de jamaica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Dilleniidae

Orden: Malvales

Familia: Malvaceae

Subfamilia: Malvoideae

Género: *Hibiscus*



Figura 4.- Flor y cáliz de jamaica

Especie: *H. sabdariffa*.

3.8.- Usos de la jamaica.

La jamaica se usa como ingrediente en diferentes platillos destacando su cualidad gastronómica; como son salsas, mermeladas, concentrados y bebidas, por su alto contenido en fibra se usa en la industria textil, sus extractos son utilizados como

colorantes naturales para teñir telas. En cuanto al campo de la medicina es útil para reducir síntomas de ansiedad, disminuye la presión arterial, purifica los riñones, alivia cólicos menstruales, disminuye el insomnio, baja los niveles de colesterol, previene la aparición de hemorroides, y es considerado como un potente antioxidante (Duarte, 2016). Cada variedad de jamaica brinda los beneficios gracias a la concentración de compuestos bioactivos y esto dependerá del lugar en el que se cultive y de la variedad.

3.9.- Propiedades químicas de la jamaica.

En los cálices de *Hibiscus* se han identificado una apreciable cantidad de compuestos bioactivos (Sayágo-Ayerdi, 2010). Estos compuestos son componentes minoritarios de los alimentos, considerados no nutrientes, son parcialmente biodisponibles en el organismo y que han demostrado tener diversos efectos positivos en la salud del consumidor. Los polifenoles y carotenoides ejercen su principal acción biológica a través de mecanismos antioxidante y secuestro de radicales libres, mientras que el principal efecto de los fitoesteroles se produce a través de la inhibición de la absorción intestinal de colesterol (Saura-Calixto, 2005). En *Hibiscus sabdariffa* se han identificado fitoesteroles tales como el β -sitoesterol, y ergosterol (Ali-Bradeldin, 2005).

3.9.1.- Actividad biológica de cáliz de jamaica

La extracción de compuestos bioactivos se ha realizado en diferentes partes de la planta como es el caso de la semilla, en donde se ha encontrado actividad antioxidante, usando como disolvente agua o metanol, en la hoja se ha estudiado la actividad anticancerígena en las variedades Rosalíz y Teconoapa, esta actividad se ha relacionado principalmente con el compuesto llamado ácido protocatecuico (Ariza-Flores, 2017), el tallo también ha mostrado actividad antioxidante, anti-obesidad e hipertensión (Delia-Prieto, 2013). Sin embargo, la parte de mayor relevancia es el rojo cáliz, debido a que su coloración se debe a la concentración de antocianinas, las cuales es posible extraerlas con extractos acuosos, metanol, hexano, etanol, acetato de etilo y acetona, mientras que en variedades que poseen cálices con coloración clara predomina la presencia de vitamina C (Babalola *et al.*, 2001).

3.10.- Metabolitos secundarios de las plantas.

Las plantas han desarrollado mecanismos de supervivencia que les han dado éxito evolutivo, desde la producción de colores llamativos que les permiten la atracción de polinizadores que garantizan la dispersión de polen, que es básico para la reproducción, o moléculas repelentes a insectos, entre los más conocidos se encuentran los flavonoides, taninos, lignanos, saponinas, alcaloides, polifenoles, entre otros (Avalos-García, 2009).

3.11.- Generalidades de los metabolitos secundarios (compuestos fenólicos)

Derivados del metabolismo secundario de las plantas, que originalmente se caracterizan en la naturaleza como moléculas de defensa y supervivencia al ataque de herbívoros (Azorín y Gómez, 2008), dan sabores astringentes que los herbívoros prefieren evitar. El ser humano ha encontrado ventaja de ellos al grado de aprovecharlos dentro del área de la medicina.

3.11.1.- Antocianinas

Son los principales responsables de la coloración característica de los cálices, tienen un rango de absorción amplio al final del azul del espectro visible por lo cual su rango de absorción es observado de los 500- 535nm (Abdel-Aal *et al.*, 2006). En cálices más oscuros son aquellos en los que se encuentran mayor cantidad de antocianinas, dos de las cuales que se han caracterizado son delfinidina-3-sambubiósido y cianidina-3-glucosido (Cisneros-Zevallos, 2007; Fig. 5), los cuales se han reportado entre 5 a 7 veces más comparados con cálices con coloraciones claras (Salinas-Moreno *et al.*, 2012).

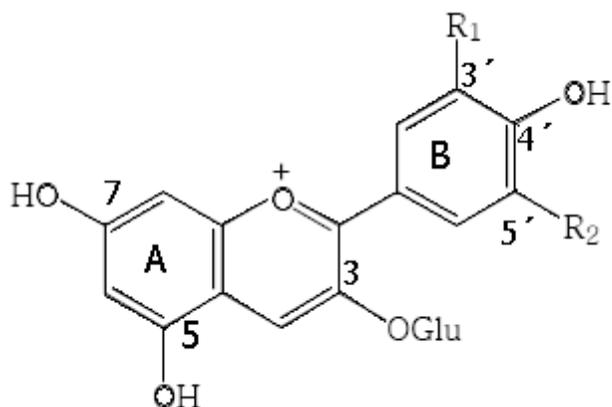


Figura 5.- Estructura química de cianidina 3- glucosido.

3.11.2- Antioxidantes y Actividad antioxidante.

Los antioxidantes contenidos principalmente en frutos rojos, su función es retardar o prevenir la oxidación de las moléculas,

Usualmente se utiliza la técnica 2,2- Difenil- 1- Picrilhidrazilo (DPPH) que se encarga de determinar la actividad antioxidante. Consiste en que este radical libre es susceptible a reaccionar con compuestos antioxidantes, a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrogeno proporcionado por el agente antioxidante, la reacción sigue midiendo la disminución de la absorbancia en función del tiempo. (Brand-Williams *et al.* 1995)



Se describe con la ecuación

$$\frac{d[\text{DPPH}^*]}{dt} = k_{\text{abs}} [\text{DPPH}^*]_t$$

3.11.3. Determinación de compuestos fenólicos totales

Se utiliza el método de Folin- Ciocalteu por Georgé, Brat, Alter & Amiot (2005). como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada

espectrofotométricamente a 765 nm (Fig. 6). Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido en polifenoles.

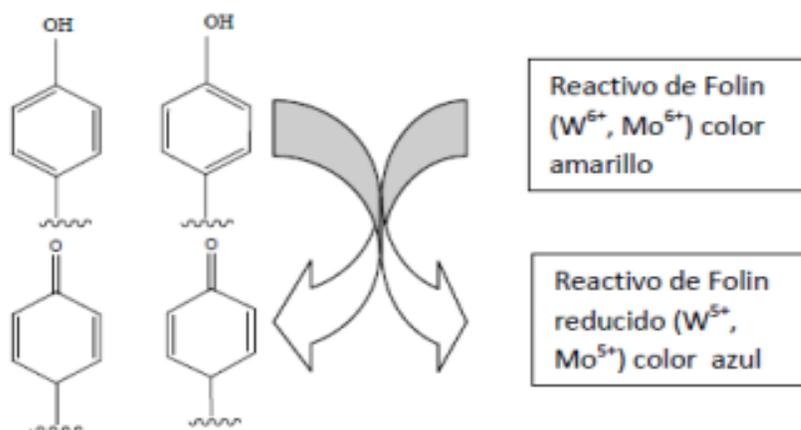


Figura 6.- Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu.

3.11.4. Compuestos fenólicos presentes en extractos de jamaica

Cuadro 1.- Compuestos bioactivos presentes en jamaica. (modificado Borrás-Linares *et al.*, 2015).

Flavonas	Luteolina
Flavonoles	Kaempferol, Quercetina, Miricetina, (+) – Catequina, (-)- Epigallocatechin
Antocianinas	Cianidina, Delfinidina, Hibiscina
Ácidos fenólicos	Ácido protocatéquico, Ácido clorogénico, Ácido hibiscico
Ácidos orgánicos	Ácido cítrico, Ácido hidroxicítrico

3.12.- Problemas fitosanitarios que enfrenta el cultivo de jamaica

Dentro del sitio de cultivo se encuentra una serie de entomofauna de acompañamiento que puede ser desde insectos benéficos para el cultivo o los llamadas insectos plagas, debido a que su presencia representa daño general y como consecuencia la disminución de producto. Entre los insectos plaga podemos encontrar ordenes como coleoptera, orthoptera, homoptera, hymenoptera, lepidóptera y díptera, especies como *Atta mexicana*, *Sphenarium purpurascens*, *Melanoplus spp*, *Aphis gussypii*, *Maconellicocus hirsutus* (Pérez-Torres, 2009) (Fig. 7).



Figura 7.- Insectos plaga que causan perdidas en el cultivo de *Hibiscus sabdariffa*.

Los costos de la producción de jamaica se elevan debido a que la cosecha es de manera artesanal (Caamal Cauich, 2020). Requiere de mano de obra para poder obtener cálices enteros, en la cosecha se deben retirar las capsulas de semilla, el proceso de secado es al aire libre, por un lado no se requiere un equipo especial para la deshidratación de los cálices, el mínimo porcentaje de humedad preferible es del 10 al 12 %, sin embargo, este parámetro no siempre se respeta, el problema surge al momento de la comercialización, en la etapa de almacén los cálices sirven como sustrato para que se desarrollen hongos, se reportado que a 14.74 % de humedad hay crecimiento de hongos del género: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Nodulisporium*, *Chaetomium*, *Thielavia* (Ruiz- Ramirez *et al.* 2015), *Corynespora cassicola* causando el manchado del tejido foliar y del cáliz (P. Hernández *et al.* 2020), *Fusarium oxysporum* y *Phoma* sp. (Trujillo-Tapia *et al.* 2015), Figuras 8 y 9



Figura 8.- Manchado en el haz de las hojas de coloración rojo durante diferentes etapas fenológicas de la planta, estos síntomas estan asociados al genero *Phoma* sp. (Trujillo-Tapia *et al.*, 2015).

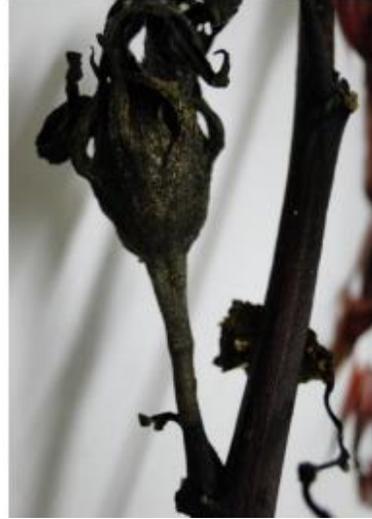


Figura 9.- Síntomas de manchado de cáliz, en variedades Criolla, Colima 5, Cotzalzin y Alma blanca. (Trujillo- Tapia *et al.*, 2015).

3.13.- Productos químicos utilizados en el cultivo de jamaica.

Para la fertilización del suelo se utiliza principalmente nitrógeno, fósforo y potasio que son los nutrientes requeridos por la planta en periodo vegetativo. En caso de presentar enfermedades relacionadas a hongos, se recomienda drenar el suelo y aplicar fungicida de manera preventiva, cal o ceniza (ADEES, 2012).

Aparentemente el uso de fungicidas resuelve el problema, entre ellos se encuentran los siguientes productos de nombre comercial: Mancozep, clorotalonil, benomilo+oxicloruro de cobre que disminuyen el problema de manchado de cáliz de un 50 a 60% (Ortega-Acosta *et al.* 2019), con el tiempo el uso de productos químicos tanto fungicidas como plaguicidas generan resistencia en algunos organismos, que no solo afectan al organismo blanco sino que se infiltran en el suelo, que es considerado un nicho porque ahí no solo se encuentran patógenos sino también hongos benéficos para el suelo y las plantas como es el caso de los hongos del género *Trichoderma*.

3.14.- El género *Trichoderma*

Son un grupo de hongos filamentosos que pertenecen al Reino Mycetozoa (fungi), división Eumycota, subdivisión Ascomycotina, clase Euascomycetes, orden Hypocreales, familia Hypocreaceae, género *Trichoderma* e *Hypocrea* (Druzhinina y Kubicek, 2005).

Las especies más estudiadas han sido *T. atroviride* (teleomorfo *Hypocrea atroviridis*) y *T. virens* (anteriormente *Gliocladium virens*) y el saprófito *T. reesei* (teleomorfo *Hypocrea jecorina*). Los proyectos de secuenciación del genoma se han dirigido también a las especies *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. longibrachiatum* y *T. citrinoviride* (Contreras-Cornejo *et al.* 2016)

La mayoría de las especies de *Trichoderma* se desarrollan rápidamente sobre sustratos muy diversos y emiten grandes cantidades de conidias (Kirk *et al.*, 2001). Los conidióforos son muy ramificados asemejándose a arbustos con forma piramidal, están tabicados y sus células contienen más de un núcleo (Fig. 10). En determinadas condiciones nutricionales o frente a la desecación, se producen unas estructuras de resistencia denominadas clamidosporas. Éstas se forman sobre el micelio, son globosas, con pared

rugosa y más gruesa que la de los conidios, y tienen gran importancia en la supervivencia del hongo (Lewis y Papavizas, 1984).

La temperatura óptima para su crecimiento radial en agar y producción de micelio está entre 20 y 28°C. El contenido mínimo de humedad para su crecimiento vegetativo es del 92% y para su esporulación es de 93 al 95%. Tiene cierta respuesta a la luz, especialmente luz azul y violeta. La luz promueve la formación de esporas, el crecimiento de micelio y la coloración del mismo. Las colonias de *T. atroviride* crecen y maduran rápidamente a los 5 días de incubación en medio de cultivo agar dextrosa papa (PDA) a 28 °C. Las especies de este género prefieren un pH ácido de 4.5 a 5.

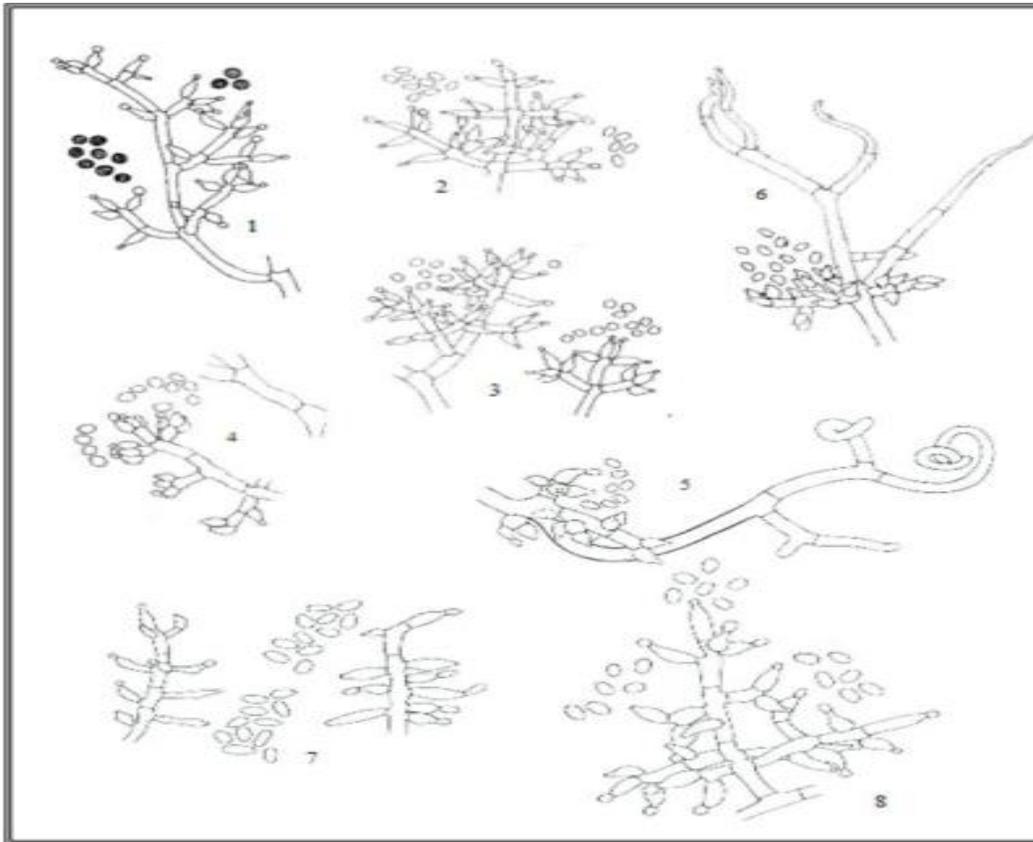


Figura 10.- Estructuras microscópicas de *Trichoderma*

3.15 *Trichoderma* como simbiote

En el medio terrestre las plantas se encuentran en interacción de diferentes organismos y microorganismos, entre ellos diferentes especies de *Trichoderma*, la simbiosis de plantas con hongos tienen ciertos beneficios, como lo son la promoción de crecimiento vegetal, el encendido de mecanismos de defensa, son considerados endófitos, se encargan de colonizar la raíz mediante el mecanismo de aflojamiento de la pared celular mediante la ruptura de puentes de hidrogeno por unas enzimas llamadas expansinas (Sampedro y Cosgrove, 2005), estas principalmente son encontradas en plantas pero *Trichoderma* es capaz de producirlas.

3.16 *Trichoderma* como promotor de crecimiento vegetal

Trichoderma es capaz de promover el crecimiento vegetal dando una mayor cantidad de biomasa, reportando mayor producción de biomasa, tanto para el vástago de la planta como para la raíz (Fig. 11), se da una producción mayor de biomasa esto visto en diferentes especies de solanáceas como es el caso de jitomate, especies de chile, entre otros (Sanchez-Cruz, 2021), al tener un área superior en la raíz esta es capaz de absorber mayor cantidad de micro y macro nutrientes (Brotman *et al.*, 2010), así como *Trichoderma* es capaz de producir ácidos orgánicos (Fig.11), que modifican el pH del suelo mejorando la biodisponibilidad de fosforo, entre otros.

3.17 Encendido de mecanismo defensa vegetal

Dentro de los mecanismos que utiliza *Trichoderma*, también se ha descrito la inducción de mecanismo de defensa de las plantas, le confiere resistencia a estrés biótico, como lo es ataque por herbivoría, estrés abiótico, principalmente sequía, estrés por calor.

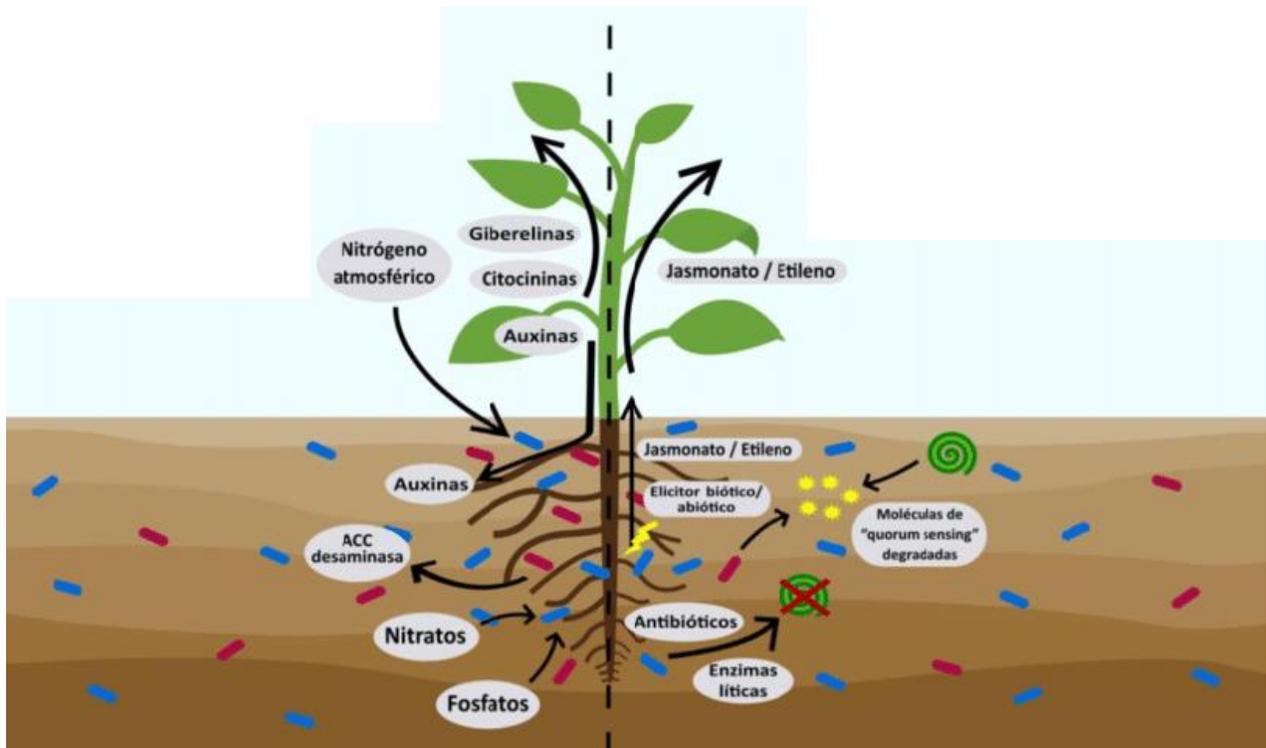


Figura 11.- Mecanismos utilizados por *Trichoderma* para la promoción de crecimiento vegetal.

Por los efectos de defensa que le confiere a la planta, esto ha hecho que diferentes especies de *Trichoderma* se utilicen como antagonistas en la confrontación de hongos fitopatógenos. Osorio-Hernández en el 2014 utilizó cuatro especies de *Trichoderma* para confrontar a *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora parasítica* en donde encontró que en jamaica, *Trichoderma longibrachiatum* es capaz de disminuir la enfermedad de la pata prieta en jamaica.

Existen trabajos en donde se reportan la capacidad de *Trichoderma* de interactuar con *Hibiscus sabdariffa*, tomando como variables la producción de biomasa y el efecto de la confrontación con hongos fitopatógenos, sin embargo, no existen reportes de la producción y acumulación de compuestos bioactivos en la interacción entre la jamaica y *Trichoderma*, es por lo que nos dimos a la tarea de evaluar antocianinas, fenoles, así como la actividad antioxidante en dos variedades de jamaica.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Muestreo de suelo

Se delimitó un área de 300 m² de suelo en un sitio productor de *Hibiscus sabdariffa* (jamaica) en la localidad de “Coauloyo” en el municipio de Tepoztlán, Morelos (Fig. 12), con coordenadas de 18°55'11.8" N y 99°04'36.3" W. Se tomaron 6 muestras de suelo al azar a una profundidad de 20 cm, las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente hasta su procesamiento en el laboratorio.



Figura 12.- Localización y colecta de suelo en el municipio de Tepoztlán, Morelos.

4.2. Aislamiento de *Trichoderma*

Se realizaron diluciones decimales seriadas, se pesaron 10 g de suelo seco y se diluyeron en 90 mL de agua destilada estéril (1:10 p/v) para la solución madre. A partir de ésta, se realizaron tres diluciones seriadas; 1×10^{-3} . Se utilizaron cajas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA; 39 g/1L.) pH 5.6. Se realizaron tres repeticiones por dilución por muestra de suelo (Ferrera-Cerrato, 2019). Las cajas Petri fueron mantenidas en una incubadora a 25 ± 1 °C por 6 días, las cuales se revisaron diariamente. De las cajas con presencia de *Trichoderma* se tomaron colonias de micelio con coloraciones específicas, características morfológicas y de crecimiento típico de *Trichoderma*, las

colonias de micelio se resembraron nuevamente en cajas Petri con tres repeticiones y fueron colocadas en las mismas condiciones de incubadora.

De cada caja con crecimiento micelial de estas cepas, se obtuvo con la ayuda de un microscopio estereoscópico, una sola espora germinada que fue re-sembrada en una caja Petri nueva con medio PDA, con el objetivo de generar aislados monospóricos que garanticen la pureza genética y reduzcan el riesgo de contaminación de las cepas.

4.3. Inoculo de *Trichoderma*.

Se utilizó una cámara de Neubauer para contabilizar el número de esporas y determinar la concentración, se elaboró 600 mL de cada inoculo con una concentración final de 10^6 .

4.4. Aseptización de semillas de jamaica.

En este trabajo se utilizó semillas de una variedad criolla de ciclo tardío (190 días) cultivada en la región de Tepoztlán, Morelos la cual denominamos (Vc) y una variedad precoz de 136- 160 días (SAGARPA, 2014), llamada coneja, a la cual referiremos como variedad temprana (VT).

Las semillas de jamaica fueron embebidas en etanol al 70 % durante un minuto, se desechó el alcohol y las semillas se embebieron en una solución de hipoclorito de sodio al 5 % por diez minutos, finalmente se realizaron 4 lavados sucesivos con agua destilada estéril.

4.5. Germinación de semillas de *Hibiscus sabdariffa*.

En un semillero para 200 semillas se colocó tierra de monte estéril (se esterilizó con ayuda de la autoclave) y las semillas se sembraron hasta un cm de profundidad, el riego con agua se aplicó cada tercer día y se mantuvieron cercano a capacidad de campo. Este procedimiento se realizó para ambas variedades de jamaica, con el propósito de obtener la mayor cantidad de semillas germinadas.

4.6. Trasplante de plántulas a macetas

Al obtener plántulas de 5 cm (dos semanas después de la siembra) se trasplantaron cuatro plántulas por maceta, el sustrato utilizado fue una combinación de peat moss, agrolita, tierra de monte en proporción 1:1:1. Después del trasplante se aplicó riego con solución nutritiva, las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero.

4.7. Inoculación de plantas de *Hibiscus sabdariffa* con *Trichoderma* spp.

Después del trasplante de las charolas a las macetas, a los 7 días las plantas fueron inoculadas con los tratamientos correspondientes como se muestra en el cuadro 2 a una concentración de 10^6 conidias por mL.

Cuadro 2.- Tratamientos usados para determinación de fenoles y DPPH.

Variedad	Tratamientos de inóculo con <i>Trichoderma</i> spp						
Jamaica criolla (Vc)	Control sin inóculo	VcM6PMrp2	VcM1rp2	VcM6PM	VcM1	VcM6Eqr2	VcM6Ld
Jamaica tempranera (VT)	Control sin inóculo	VTM6PMrp2	VTM1rp2	VTM6PM	VTM1	VTM6Eqr2	VTM6Ld

El nombre de los tratamientos es de acuerdo a la cepa y a la variedad utilizada, variedad criolla (Vc), Variedad tempranera (VT). El nombre asignado a las cepas depende de la muestra de suelo donde se obtuvieron (ver Lista de abreviaciones), resaltando que solo logramos encontrar *Trichoderma* en la muestra 6 (M6) y en la muestra 1 (M1)

4.8. Crecimiento de plantas.

Las plantas de jamaica se mantuvieron en invernadero desde su emergencia hasta la colecta de los cálices maduros, que fue el órgano de interés de esta investigación, la temperatura promedio del invernadero fue de 30 °C, con un fotoperiodo 12 h, del 21 de julio hasta el 10 de noviembre.

4.9. Secado de material vegetal

Para este proceso fue necesario retirar las cápsulas de semillas de los cálices, se colocaron en charolas dentro de la estufa de secado a una temperatura de 60 °C, durante 72 horas, hasta alcanzar el peso seco constante (Fig.13).



Figura 13.- **A**, calices de jamaica variedad criolla crecida en invernadero sin *Trichoderma* (**Vc s/Tri inv**), **B**, Variedad criolla cultivada en campo Tepoztlán (**Vc campo**), **C**, calices de jamaica variedad criolla inoculada con *Trichoderma* (**VcTri**), **D**, variedad tempranera inoculada con *Trichoderma* (**VT Tri**).

4.10. Extracción de fenoles totales.

Una vez seco el material vegetal se pesó 1 g de por cada tratamiento, se trituró en un mortero con nitrógeno líquido, el macerado fue colectado en un vaso de precipitado de 125 mL y se adicionaron 40 mL de acetona al 60 %, los vasos se cubrieron con papel aluminio para evitar su posible degradación por la luz. Los vasos de precipitado se colocaron en una parrilla térmica y se calentaron hasta alcanzar una temperatura constante de 40 °C, a partir de ese momento las muestras se mantuvieron durante una hora para una eficiente extracción de fenoles solubles totales, terminado el tiempo se realizó la primera filtración de la muestra en un matraz kitasato conectado a una bomba de vacío. Se realizó una segunda extracción con 20 mL de acetona al 60%, a una temperatura de 40 °C por una hora, finalmente, se colectó el pigmento.

4.11. Determinación de fenoles totales por método de Folin-Ciocalteu.

Para la determinación del contenido de fenoles totales se llevó a cabo usando el reactivo Folin-Ciocalteu (F-C) (Rodríguez Arzuaga *et al.*, 2016; Singleton y Rossi, 1965). Se tomaron muestras de 50 µL y se colocaron, en tubos eppendorf, a estos se le adicionó 200 µL de agua destilada, 125 µL del reactivo de Folin-ciocalteu 1 N, se agitaron por 15 minutos en ausencia de luz y finalmente se adicionó 625 µL de Na₂CO₃ al 20%, las muestras nuevamente se agitaron durante una hora en ausencia de luz. Se tomaron 200 µL de cada muestra y se colocaron en pozos de una placa de plástico y se leyeron en un lector de placas (Termo Scientific Multiskan G0) a una absorbancia de 760nm. Se realizaron 3 repeticiones por cada muestra. Como blanco se usó la solución de extracción sin muestra biológica. Se preparó una curva estándar de ácido gálico para expresar la concentración de los compuestos fenólicos y se expresó en mg equivalentes de ácido gálico 100 g⁻¹ de PS.

4.12. Extracción de antioxidantes por la técnica 2,2- Difenil-1-Picril-hidrazilo (DPPH)

Se pesó 1 g de muestra vegetal (cálices) de cada uno de los tratamientos y se trituraron con nitrógeno líquido, una vez maceradas las muestras se colocaron en matraces Erlenmeyer de 50 mL con 10 mL de metanol absoluto, envueltos en papel aluminio, las muestras se refrigeraron durante 24 horas, al término de este tiempo las muestras se filtraron en matraces Kitasato. La determinación fue por el método 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•) propuesto por Brand-Williams *et al.* (1995). Se tomaron 100 µL del extracto en un tubo eppendorf y se le adicionó 900 µL de solución de DPPH (Sigma Aldrich) 60 µL diluido en metanol. Se tomaron 200 µL de cada muestra y se colocaron en una placa de plástico y se leyeron a una longitud de onda de 517 nm en un lector de placas (Termo Scientific Multiscan G0). El blanco se preparó con metanol y disolución de DPPH. La actividad antioxidante (AA) se expresó en porcentaje

$$AA = \left[\frac{A_{blanco} - A_{muestra}}{A_{blanco}} \right] \times 100$$

4.13. Extracción y cuantificación de antocianinas

La determinación de antocianinas se realizó de acuerdo a lo descrito por Galicia-Flores *et al.* (2008). Se pesaron 2 g de cálices de jamaica de cada muestra se pulverizaron con nitrógeno líquido en un mortero, se le adicionaron 15 mL de la solución extractora de metanol acidificado (En una probeta graduada se midió un volumen de 198 mL de metanol absoluto, al cual se añadió 2 mL de ácido trifluoroacético), los extractos se colectaron en un matraz Erlenmeyer, este se cubrió con papel aluminio para evitar foto-oxidación de la muestra, las mezclas se colocaron en un agitador orbital (Lab-Line) y se mantuvieron en agitación constante durante 24 horas, transcurrido el tiempo se obtuvo la primera extracción soluble, al residuo se le realizó una segunda re-extracción con 15 mL de solución de metanol, ácido acético y agua en una proporción 10:1:9, la muestra se volvió a someter a agitación por 24 horas y se colectó una segunda extracción, cabe mencionar que todas las muestras obtenidas fueron refrigeradas hasta el momento de su lectura. Las muestras se leyeron a una longitud de onda de 520 nm en un lector de placas (Termo Scientific Multiscan G0). Como blanco se usó la solución de extracción

sin muestra biológica. El contenido de antocianinas totales se estimó con base a una curva estándar de pelargonidina clorada ($C_{15}H_{11}ClO_5$, Sigma-Aldrich®, concentración de 1 mg mL^{-1} en metanol) para cada sistema de disolventes. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de pelargonidina clorada por 100 g^{-1} de PS.

4.14. Análisis en cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Los extractos de antocianinas, ácidos fenólicos y flavonoides se analizaron en un cromatógrafo (Angilet Technologies® 61362A) con un detector de diodos (DAD). Previo a la inyección, las muestras se depuraron en microfiltros de $0.45 \mu\text{m}$ (tipo GV, Millex®, millipore).

4.14.1 Antocianidinas

Los extractos de antocianinas se analizaron en una columna C18 de resolución rápida (Zorbax®, $50 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $1.8 \mu\text{m}$) y una fase móvil integrada por dos sistemas de solventes: (A) agua: ácido fosfórico (99.5:0.05 v/v) y (B) agua: acetonitrilo: ácido acético: ácido fosfórico (50.0: 48.5: 1.0: 0.5 v/v/v). Se usaron cinco gradientes: 9 % de B por 0.01 min, 9 % a 36 % de B por 8.5 min, 36 % a 60 % de B por 9.0 min, 60 % a 80 % de B por 9.1 min y 80 % a 9 % de B por 1.4 min. El volumen de inyección y la velocidad de flujo fueron de $5.0 \mu\text{L}$ y 0.5 mL min^{-1} , respectivamente, y la detección se efectuó a 520 nm . Las antocianinas se identificaron con dos antocianinas estándar: cianidina y petunidina (Sigma®). La concentración de las antocianinas identificadas se expresó en $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ de PF.

4.14.2 Compuestos fenólicos

Para la detección de los compuestos fenólicos, los extractos se separaron en una columna C_{18} de resolución rápida (Hypersyl ODS®, $4.6 \times 50 \text{ mm.}$, $1.8 \mu\text{m}$) se separaron los extractos de ácidos fenólicos y flavonoides. La fase móvil se preparó con (A) agua pH 2.5 ajustado con ácido trifluoroacético y (B) acetonitrilo. Se usaron tres gradientes: 15 % de B por 0.1 min, 15 % a 35 % de B por 20.0 min y 35 % de B por 25.0 min. El volumen de inyección y la velocidad de flujo fueron de $20.0 \mu\text{L}$ y 1.0 mL min^{-1} , respectivamente, y la detección se llevó a cabo a $254, 280, 330$ y 365 nm . Los flavonoides

se identificaron por los tiempos de retención y áreas de los picos de doce estándares: catequina, quercetina, miricetina, rutina, naringenina, apigenina, florizidina, floretina, kaemferol, morina, hesperidina, Isorhamnetina. La concentración de los flavonoides identificados se expresó en mg 100 g⁻¹ de PF. La identificación de los ácidos fenolólicos se efectuó al comparar los tiempos de retención y áreas de los picos de catorce estándares: ácido protocatecuico, gálico, siríngico, vainillínico, p-hidroxibenzoico, β-resorcílico, sinápico, coumárico, clorogénico, cafeico, 3,5-dihidroxibenzoico, rosmárinico y felúrico (Cuadro 3). La concentración de los fenoles identificados se expresó en mg 100 g⁻¹ de PS.

Cuadro 3.- Tiempo de retención y longitud de onda de ácidos fenólicos.

Estándar	Longitud de onda	Tiempo de retención (min)
Ácido p-hidroxibenzoico	254 nm	2.56
Ácido β- Resorcilico	254nm	4.26
Ácido protocatecuico	254nm	2.09
Ácido cafeico	254nm	3.387
Ácido 3,5 di-OH-bezoico	254nm	11.271
Ácido siringico	280 nm	3.00
Ácido gálico	280nm	1.55
Ácido p-cumarico	280nm	5.289
Ácido sinápico	330nm	6.038
Ácido clorogénico	330nm	3.70
Ácido ferúlico	330nm	6.056
Ácido rosmárico	330nm	9.279

4.15 Flavonoides

La extracción de flavonoides se efectuó con base en las condiciones empleadas por Stankovié (2011). El contenido de flavonoides se cuantificó por el método de cloruro de aluminio (AlCl₃) descrito por Martínez-Cruz *et al.* (2011), Cuadro 4.

Cuadro 4.- Tiempo de retención y longitud de onda de flavonoides.

Estándar	Longitud de onda	Tiempo de retención (min)
Rutina	254nm	5.73
Morina	254nm	11.05
Quercetina	254nm	13.29
Catequina	280nm	2.43
Hesperidina	280nm	8.25
Floritzina	280nm	9.06
Naringenina	280nm	15.8
Florentina	280nm	16.2
Apigenina	330nm	17.1
Miricetina	365nm	9.1
Kaempferol	365nm	17.5
Isorhamnetina	365nm	18.2

4.16 Diseño experimental

El análisis de los resultados de fenoles y actividad antioxidante se realizó con un diseño factorial para poder estudiar dos factores a la vez, el primer factor es la variedad de plantas de jamaica (tempranera y criolla), mientras que el segundo factor sería la inoculación de las seis cepas de *Trichoderma* aisladas de las muestras de suelo.

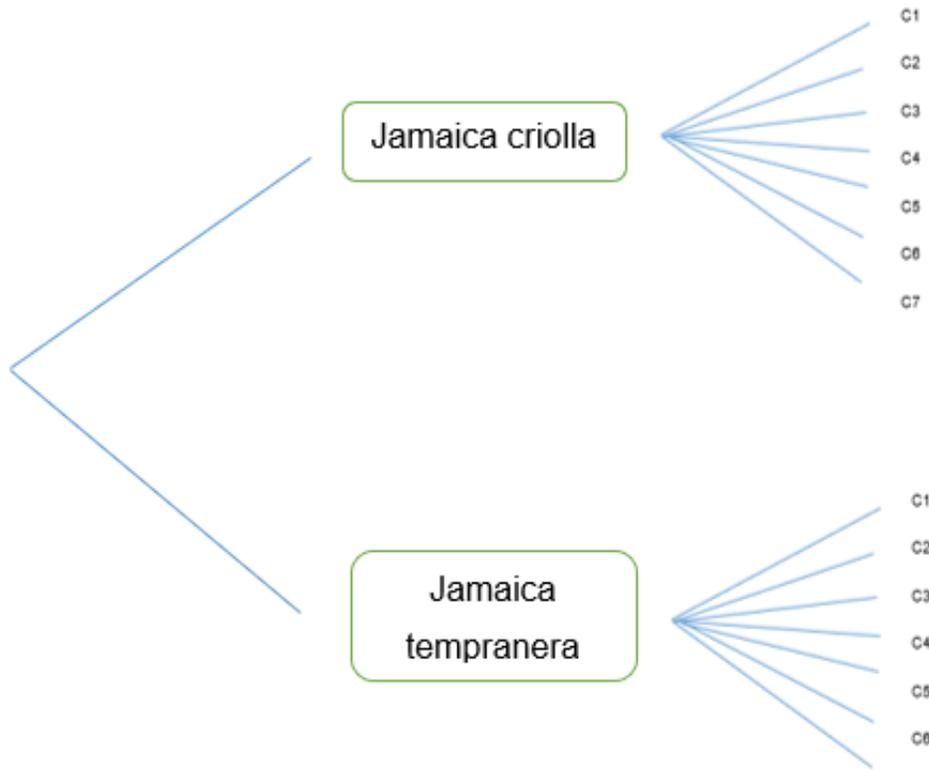


Figura 14.- Experimento factorial.

Para el análisis de las antocianinas se utilizó un diseño completamente al azar para la determinación de diferencia significativa a través de una Anova (Análisis de varianza) en conjunto con una prueba de Tukey ($p < 0.05$) con el paquete estadístico SAS® versión 9.0 (SAS Institute Inc., USA), en este caso las variables a medir fueron concentración de antocianinas por tratamiento.

V. RESULTADOS

5.1. Caracterización morfológica macroscópica de *Trichoderma* spp.

En la Fig. 15 se evidencia el crecimiento de *Trichoderma* aislada de las muestras de suelo 1 y 6 del huerto familiar de Tepoztlán, Morelos, las cuales entre ellas dos se consideraron diferentes por sus características morfológicas específicas. En las cepas M1 (B) y M6PM (A) se observó un halo con coloración amarillenta en el revés de la caja petri y de las que pueden indicar antibiosis, *Trichoderma* segrega enzimas específicas como lo son glucanasas y quitinasas que están asociadas a la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos, esto se ha observado en la confrontación antagónica, forman un halo de color amarillento (Osorio-Hernández, 2015). A partir del cultivo monospórico se observó el crecimiento de micelio después de 5 días de incubación y aquí se destaca la presencia de conidias con coloración verde.

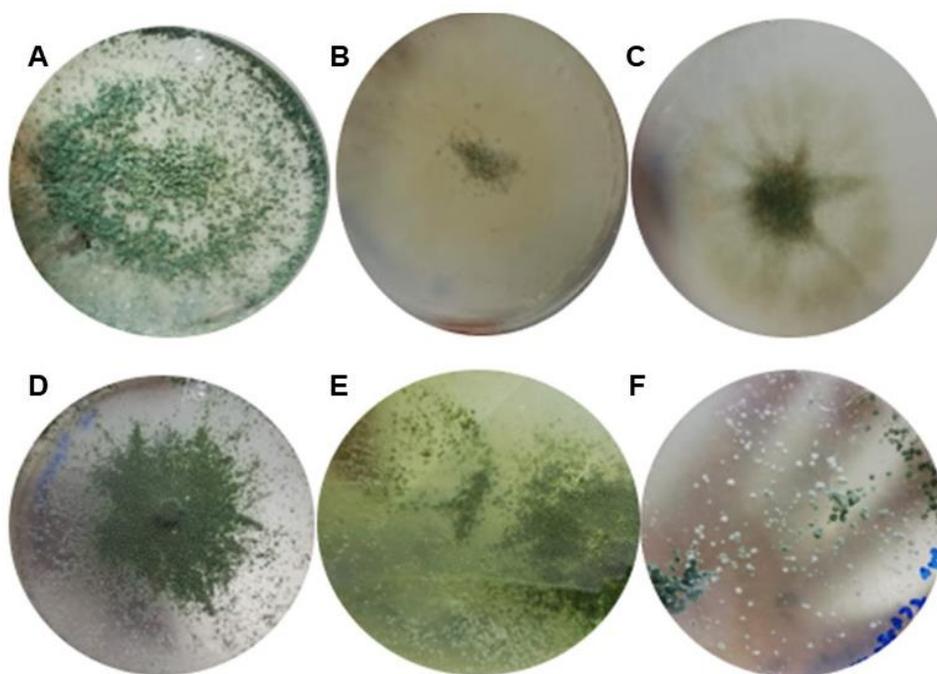


Figura 15.- Cepas de *Trichoderma* aisladas de cultivo de jamaica, **A** M6PM, **B** M1, **C** M1rp2, **D** M6Ld, **E** M6PMrp2, **F** M6Eqr2.

En la cepa M6PM (A) durante los 5 días de crecimiento se logró un crecimiento radial, en donde se destacan conidias que muestran una coloración verde, rápida reproducción

y crecimiento. La cepa M1 (B) presentó mayor cantidad de micelio, solamente la parte del pellet sembrado fue la única que mostró coloración verde. En comparación con la cepa M1rp2 (C) que mostró un crecimiento radial y presencia de conidias, la cepa M6Ld (D) muestra la esporulación mediante conidias a pesar de que el crecimiento es abundante no se extiende por toda la caja, en cuanto a la M6PMrp2 (E) el crecimiento se expande por toda la caja, en forma dispersa presenta conidias y parte de crecimiento de micelio, la M6Eqr2 (F) tuvo crecimiento disperso y pobre, en donde se pueden observar partes de micelio y conidias.

5.2 Cuantificación de fenoles y actividad antioxidante en dos variedades de jamaica

Los resultados indicaron la presencia de fenoles solubles totales en los cálices de las variedades de jamaica criolla y tempranera. La concentración de fenoles obtenidos fue variable y está en función del tratamiento, así como de la variedad (Fig. 16). Es así que en las plantas de la variedad criolla inoculadas con la cepa de *Trichoderma* M6PMrp2 presentó un valor de hasta 8129.43 mg equivalentes de ácido gálico por 100g de peso seco (Ps) de muestra, mientras que el control de la jamaica criolla sin inocular mostró una concentración de 7383.77 mg equivalentes de ácido gálico por 100g de Ps de muestra, en la variedad criolla la inoculación de las cepas M1 y M1rp2 (7244.95 y 7205.45 mg, respectivamente) fueron las que menor concentración de fenoles presentaron con respecto a las plantas control sin inocular, y el tratamiento que produjo menor concentración de fenoles fue con la cepa M6Eqr2 con una concentración de 6590.05 mg equivalentes de ácido gálico por 100g de Ps.

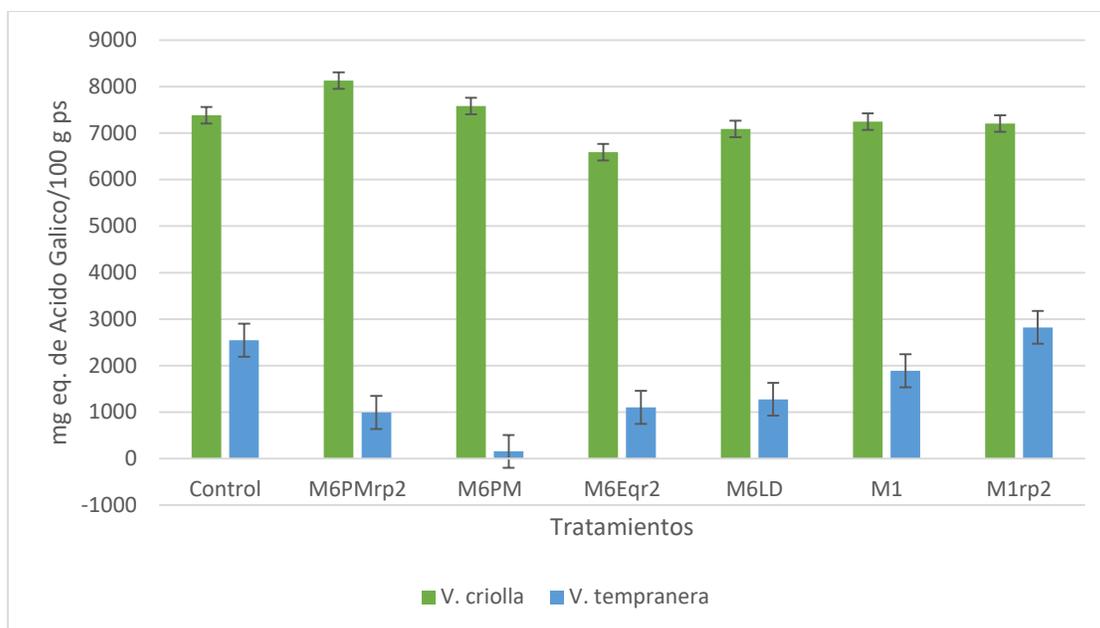


Figura 16.- Concentración de fenoles solubles totales en dos variedades de jamaica, variedad criolla (Vc) y variedad tempranera (VT) inoculadas con las 6 cepas de *Trichoderma*. Se incluyen 2 controles de plantas sin inocular de ambas variedades. (3 repeticiones por tratamiento).

En cuanto a la variedad tempranera, como se muestra en la Figura 16, la inoculación de las plantas de jamaica con las diferentes cepas aisladas no favoreció sustancialmente la acumulación de fenoles totales, el valor más alto fue en el caso de la cepa aislada de la muestra 1 de suelo denominada M1rp2 que tiene una concentración de 2821,97 mg equivalentes de ácido gálico por 100g de peso seco, en segunda posición el control (plantas sin inocular) con una concentración de 2545.82 mg equivalentes de ácido gálico por 100g de peso seco, el tratamiento con muy poca acumulación fue M6PM de 156.86 mg.

En la gráfica de interacción (Fig.17) se puede destacar que los 3 factores interaccionan (concentración de fenoles, cepa o tratamiento y variedad), mostrando una mayor concentración de fenoles para la variedad criolla y la cepa preferente que resulta ser un mejor tratamiento para esta variedad es la M6PMrp2, en el caso de la variedad tempranera este tratamiento es el segundo con una menor concentración de fenoles, la

cepa (M1) resultó tener una concentración mayor. El tratamiento M6PM en la variedad tempranera es la que menos interacciona con respecto a los demás tratamientos.

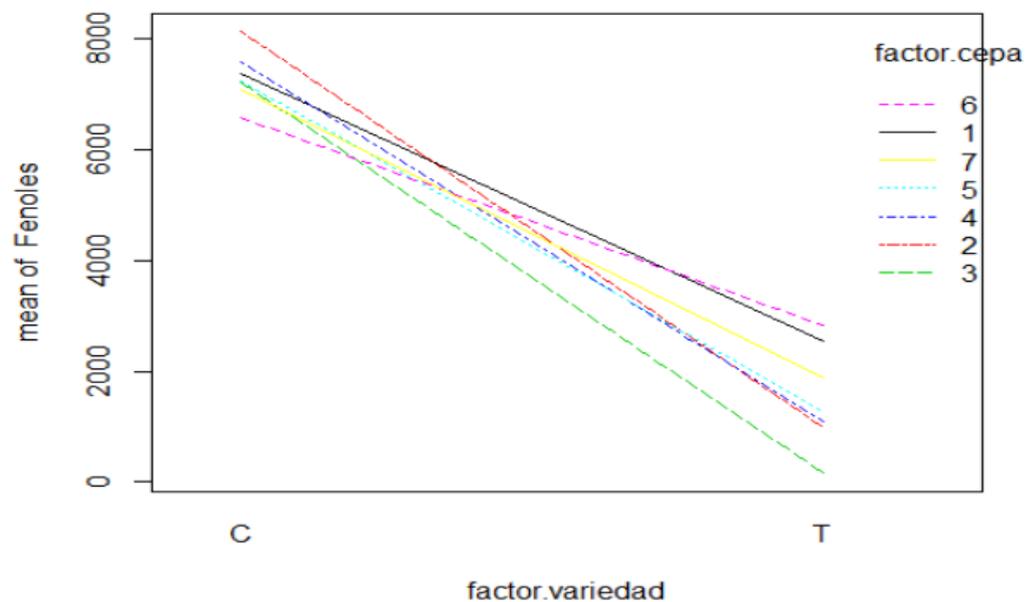


Figura 17.- Interacción entre variedad de jamaica, concentración de fenoles y cepas (tratamientos).

Cuadro 5 Interacción entre variedades y tratamientos en la concentración de fenoles.

Fenoles, mg	Control	M6PMrp2	M6PM	M6Eqr2	M6LD	M1	M1rp2	P>F		
								Variedad	Cepa	Interacción Va x ce
Criolla (Vc)	7383.77 ab	8129.43 a	7205.45 ab	7582.64 ab	7244.97 ab	6590.05 b	7086.62 ab	p<0.05	0.0041	p<0.05
Tempranera (Vt)	2545.82 cd	994.12 ef	156.86 f	1102.63 def	1277.02 def	2821.97 c	1889.53 cde			

Las medias con letras distintas indican diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

En la Fig.18 se muestra que las plantas de jamaica de la variedad criolla son las que mayor actividad antioxidante presentaron, esto fue para el caso de aquellas plantas que fueron inoculadas con la cepa M6PMrp2 y M6Eqr2. El porcentaje de actividad antioxidante por la técnica de DPPH alcanzó un valor de hasta un 95%, mientras que las plantas control (plantas variedad criolla sin inocular) presentaron actividad del 75%. Para el caso de la variedad tempranera la actividad antioxidante en las plantas control la actividad fue baja comparada con la actividad antioxidante de la variedad criolla, y la variedad tempranera inoculada con la cepa M6PM de *Trichoderma* la actividad antioxidante fue del 32%.

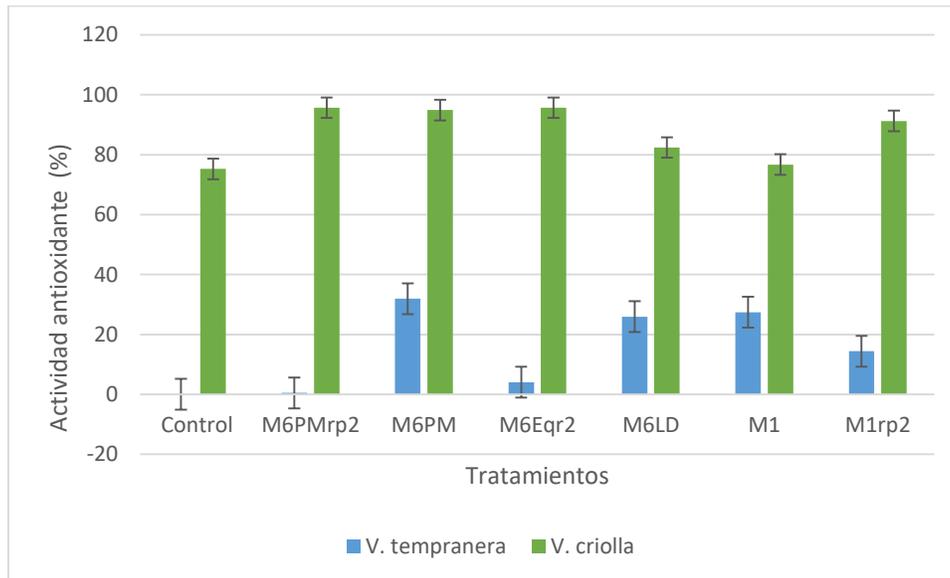


Figura 18.- Actividad antioxidante (%) de dos variedades de jamaica, inoculados con las seis cepas (tratamientos son la combinación de las variedades y las cepas) y las dos variedades sin inocular.

En la Figura 19 de interacciones entre variedad de jamaica, concentración de actividad antioxidante y cepas (tratamientos) se muestra que el tratamiento M1rp2 para ambas variedades es el que no interactúa con los demás tratamientos, además de que en ambas variedades la inoculación con la cepa M1rp2 tuvo menor actividad antioxidante.

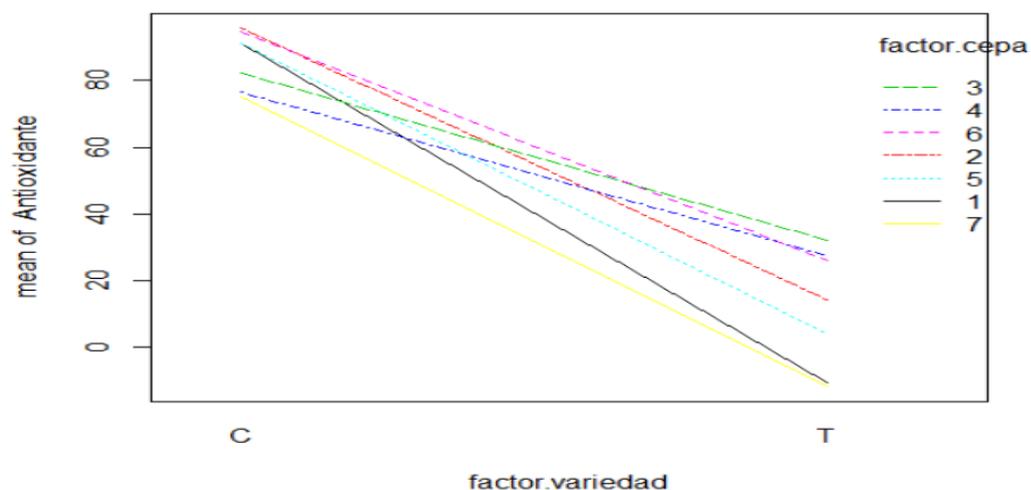


Figura 19.- Interacción entre variedad de jamaica, concentración de actividad antioxidante y cepas (tratamientos).

Cuadro 6 Interacción entre variedades y tratamientos en la actividad antioxidante.

Actividad antioxidante %	Control	M6PMrp2	M6PM	M6Eqr2	M6LD	M1	M1rp2	P>F		
								Variedad	Cepa	Interacción Va x ce
Criolla (Vc)	75.25 a	95.68 a	94.90 a	95.68 a	82.43 a	76.7 a	91.25 a	p< 0.05	0.0011	0.0016
Tempranera (VT)	11.91 c	10.5 c	34.29 b	4.03 bc	25.96 b	27.41 b	14.43 bc			

Las medias con letras distintas indican diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Tukey (p< 0.05)

5.3. Cuantificación de antocianinas

Los resultados obtenidos demuestran la presencia de compuestos antocianicos en las diferentes variedades de jamaica en interacción con *Trichoderma* y la concentración de estos compuestos parece depender del tratamiento aplicado. La cuantificación de antocianinas en el extracto de los cálices de la variedad criolla inoculados con *Trichoderma* presentaron una concentración de antocianinas de hasta 2162.68 mg eq. de cianidina 3-glucocido/100 g de peso seco como se muestra en la figura 20, seguidos de las plantas de la misma variedad que no fueron inoculadas y que alcanzaron un valor de 1295.78 mg eq. de cianidina 3-glucocido/100 g de peso seco, Esta concentración de antocianinas se comparó con una muestra de cálices cultivados en campo abierto, la cual presentó la misma cantidad de antocianinas que la variedad criolla cultivada en el invernadero sin inocular. Se aclara que de la variedad tempranera solo se evaluaron los cálices de las plantas inoculadas con *Trichoderma* las cuales tuvieron un valor de 983.14 mg eq. de cianidina 3-glucocido/100 g de peso seco, las plantas sin inocular se contaminaron con cenicilla (*Erysiphe cichoracearum*), por lo que el cáliz estaba contaminado, así que se decidió no procesarlo para evitar cualquier interferencia en el resultado.

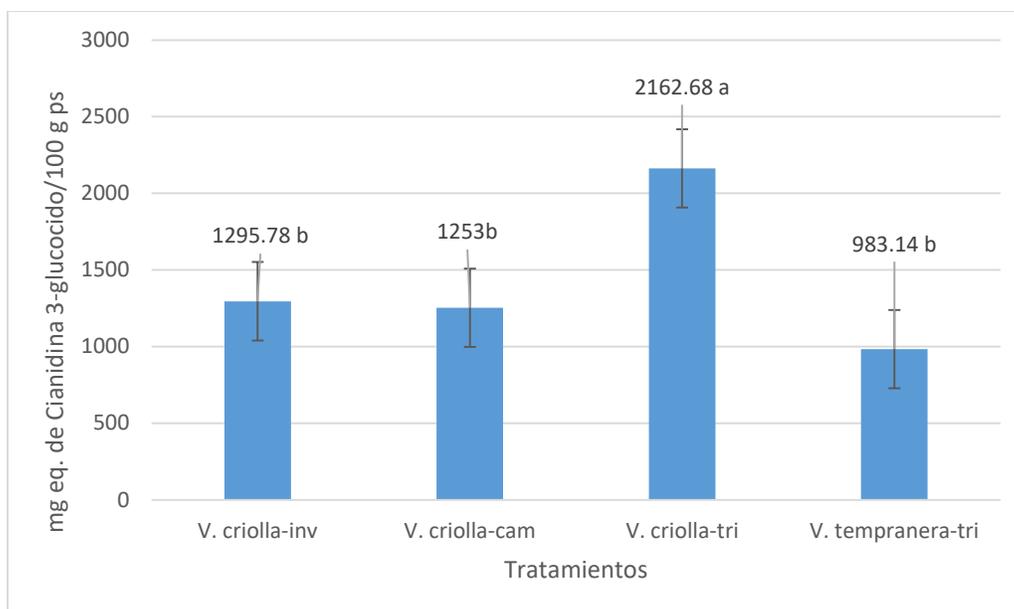


Figura 20.- Contenido de antocianinas en cálices de jamaica (*Hibiscus sabdarifa*) variedad criolla (Vc) y tempranera (VT) con diferentes tratamientos. Las medias con letras distintas indican diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

5.4.- Ácidos fenólicos detectados en variedad criolla y tempranera por HPLC.

Entre los ácidos fenólicos, se identificó el ácido β resorcilico en las plantas de jamaica de la variedad criolla que fueron inoculadas con las seis cepas, y la concentración estuvo en un intervalo de 0.112 a 0.173 mg por 1g de peso seco. Se indica que este compuesto fenólico no fue detectado en las plantas control (sin inocular) de esta variedad (Fig. 21). En cuanto a la variedad tempranera, las plantas que estaban inoculadas con las cepas M6PM, M1rp2, y M6LD tampoco evidenciaron la presencia de este compuesto, mientras que las plantas de la variedad tempranera inoculadas con la cepa M1 fueron la que mayor concentración de este compuesto tuvieron con 0.191mg por 1g de peso seco.

El ácido clorogénico fue el compuesto con mayor concentración respecto a los otros compuestos fenólicos identificados, como se muestra en Figura 21. La concentración más alta fue detectada en las plantas de la variedad tempranera inoculadas con la cepa M1rp2, éste estuvo presente en todos los tratamientos excepto en las plantas de la

variedad tempranera inoculadas con la cepa M6LD, siendo el que presentó ausencia de todos los compuestos fenólicos detectados.

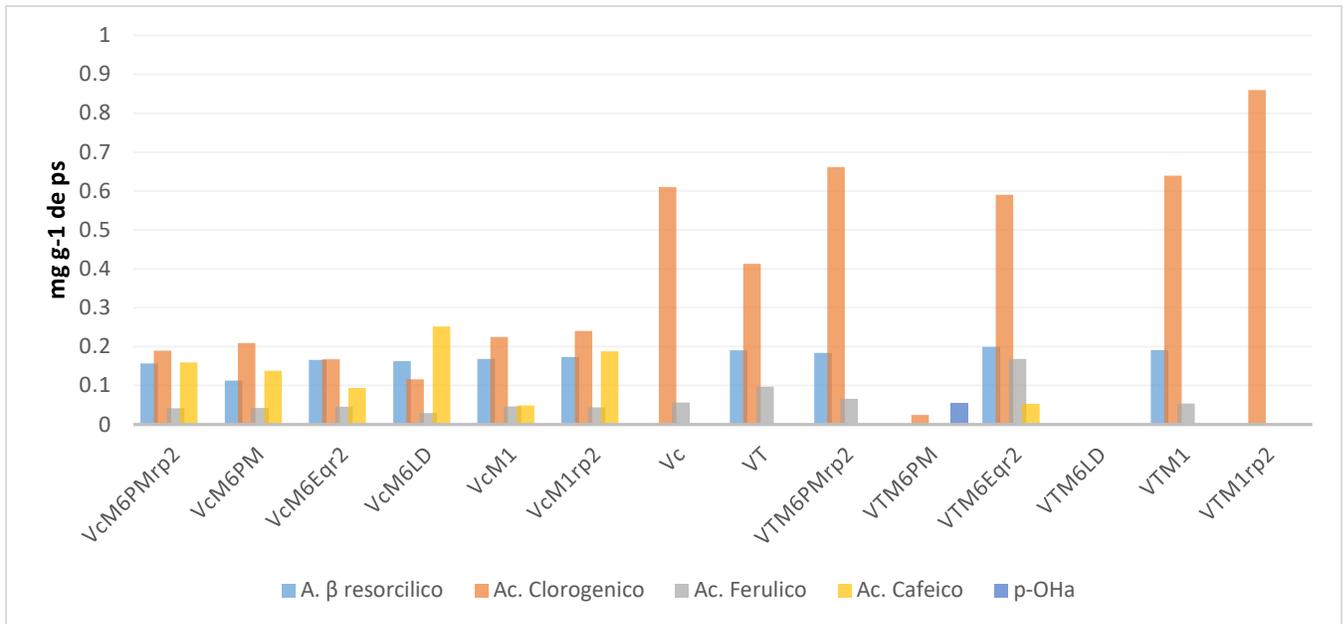


Figura 21.- Detección de estándares de compuestos fenólicos en muestras de jamaica, inoculados con seis cepas de *Trichoderma*.

El ácido ferúlico está presente en todos los tratamientos de la variedad criolla, incluso en las plantas sin inocular, en cuanto a la variedad tempranera esta no se detectó en las plantas que están inoculadas con las cepas M6PM, M6LD, y M1rp2, las plantas con mayor concentración fueron las plantas de variedad tempranera sin inocular con 0.096mg por 1g de peso seco.

El ácido cafeico estuvo ausente en todos los tratamientos de la variedad tempranera excepto en las plantas inoculadas con la cepa M6Eqr2, y tuvo mayor concentración en las plantas de variedad criolla inoculadas con la cepa M6LD.

El ácido p-hidroxibenzoico se encontró únicamente en las plantas de la variedad tempranera inoculadas con la cepa M6PM.

5.5. Flavonoides detectados en variedad criolla y tempranera por HPLC

En la Fig. 22 se muestran los flavonoides identificados en los cálices de dos variedades de jamaica en interacción con *Trichoderma* spp. La apigenina fue el flavonoide con mayor concentración (0.646mg por 1g de peso seco) y se detectó únicamente en las plantas de la variedad tempranera inoculadas con la cepa M6PMrp2. La rutina con una concentración de 0.462mg por 1g de muestra de peso seco y quercetina con 0.338mg, se encontraron en ambas variedades, tanto para plantas inoculadas con las seis cepas como para las de los controles. La floritzina fue la que tuvo una mayor concentración en la variedad criolla inoculada con el tratamiento M1rp2. La mircetina solo estuvo presente en 3 tratamientos, en la variedad criolla sin inocular, y en dos tratamientos de la variedad tempranera (M6PMrp2 y M1rp2), en el caso con mayor concentración fue la variedad tempranera inoculada con la cepa M1rp2 con 0.230 mg por 1g de muestra de peso seco. La catequina únicamente estuvo presente en las plantas de la variedad tempranera, inoculadas con la capa M6PM.

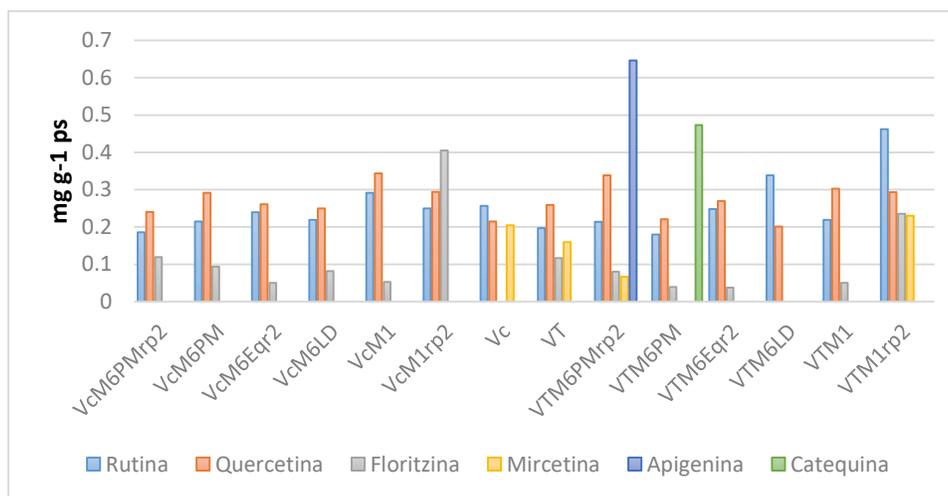


Figura 22.- Contenido de flavonoides presentes en ambas variedades de jamaica, inoculados con las seis cepas de *Trichoderma*, y plantas sin inocular para ambas variedades (criolla y tempranera).

5.6.- Antocianidinas detectados en variedad criolla y tempranera por HPLC

En el análisis de antocianidinas por HPLC, se encontró que en ambas variedades está presente la cianidina y la petunidina. La concentración de cianidina fue mayor en la variedad de jamaica criolla inoculada con *Trichoderma*, con concentración de 11.53mg por 2g de peso seco, las plantas de la variedad tempranera tuvieron una menor concentración de este compuesto con 1.67mg por 2g de peso seco, en cuanto a la petunidina también tuvo mayor concentración en las plantas criollas inoculadas con *Trichoderma*, con concentración de 3.65 mg por 2g de peso seco (Fig.23).

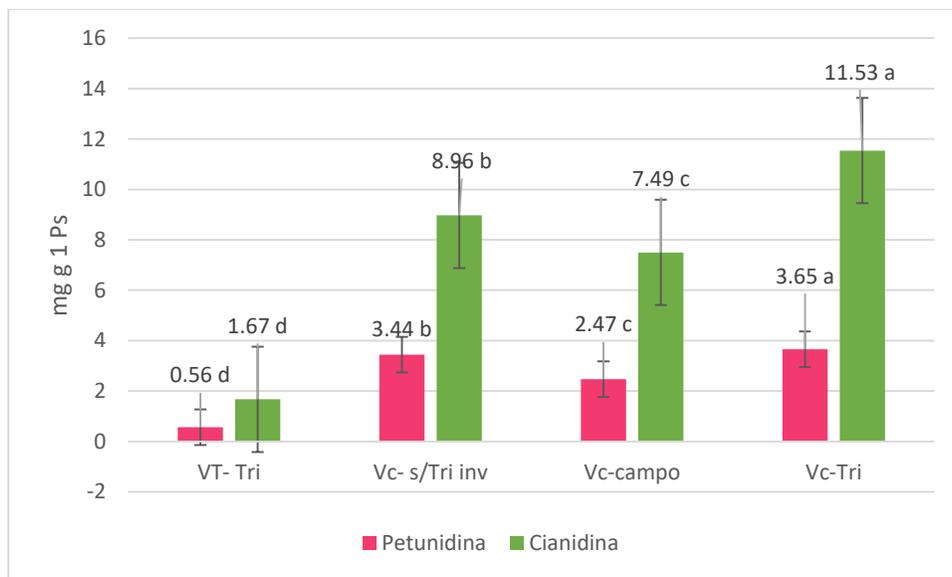


Figura 23.- Concentración de antocianidinas presentes en variedad tempranera inoculada con *Trichoderma*, plantas de la variedad criolla sin inocular crecidas en el invernadero, jamaica criolla crecida en Tepoztlán y plantas de la variedad criolla inoculadas con *Trichoderma*. Las medias con letras distintas indican diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

VI. DISCUSIÓN

La acumulación de compuestos bioactivos en los cálices de jamaica cosechados en la etapa de madurez depende de la variedad de jamaica y del lugar en donde se cultiva, ya que, en el suelo se encuentran diversas cepas nativas de *Trichoderma* y nutrientes, los cuales influyen en la acumulación de compuestos antioxidantes. Se ha reportado que la variedad de jamaica criolla de Michoacán en presencia de cobre (Cu) y zinc (Zn) aumentó notablemente la concentración de antocianinas, hasta 185% y 173%, respectivamente (Apaéz-Barrios *et al.*, 2017), cabe resaltar que en la naturaleza la biodisponibilidad de nutrientes es diferente, cuando se puede resaltar la presencia de microorganismos benéficos, como es el caso de los hongos del género *Trichoderma*, que promueven el crecimiento vegetal y activan el sistema de defensa de las plantas (Brotman *et al.*, 2010), las antocianinas, fenoles y actividad antioxidante están relacionadas con el metabolismo secundario de las plantas, en el cual algunos metabolitos son un sistema de defensa de las plantas contra herbívoros o como promotores de crecimiento.

En esta investigación se muestra que las plantas que tuvieron mayor concentración de fenoles y antocianinas, así como mayor actividad antioxidante fueron las de la variedad criolla en interacción con *Trichoderma*, cabe mencionar que las semillas fueron colectadas en Tepoztlán, Morelos, localidad que cuenta con condiciones de temperatura semejantes a las que se presentan en Texcoco en la época de verano y durante el desarrollo del cultivo. Las plantas de la variedad tempranera mostraron un crecimiento rápido, esto puede deberse a que está considerada como una variedad precoz, su ciclo vegetativo es corto siempre y cuando tenga condiciones favorables de temperatura, lo cual no se dio, las plantas crecieron desde el mes de agosto y se cosecharon en el mes de noviembre, aunque el experimento se había contemplado para el periodo de primavera- verano no se pudo realizar en esas fechas.

La concentración más alta de antocianinas fue de 2162.68 mg eq. de cianidina 3-glucosido/100 g de peso seco en plantas de la variedad criolla inoculadas con *Trichoderma* lo que resultó ser favorecedor, comparada con el trabajo de Salinas-Moreno (2012). La jamaica variedad Sudan presentó una concentración de 1448.mg eq. de cianidina 3-glucosido/100 g peso seco, la variedad Colima 6 1250.7 mg y la china 746.2

mg, lo que demuestra que *Trichoderma* es capaz de aumentar la concentración de antocianinas.

En cuanto a fenoles totales en la variedad sudan, Reyes-Lenguas (2015) reportó una concentración de 1071 mg eq. de ácido gálico por 100g de peso seco, mientras que en esta investigación la variedad criolla inoculada con *Trichoderma* presentó un valor de 8129.43 mg eq. de ácido gálico por 100g de peso seco, este valor también es más alto comparado con la concentración reportada para la variedad criolla de Nayarit con 6570 mg eq. de ácido gálico por 100g de peso seco Reyes-Lenguas (2015).

Los compuestos fenólicos detectados por HPLC de la variedad tempranera presentaron un rango de concentración de 0.184 – 0.199 mg para el ácido β resorcilico, mientras que la variedad criolla tuvo menor concentración de este compuesto. La variedad criolla sin inocular no presentó ác. β resorcilico, pero este sí estuvo presente en las plantas en la interacción con *Trichoderma*, lo que indica que *Trichoderma* puede favorecer la acumulación de este compuesto en la variedad criolla. De los 5 estándares detectados la variedad criolla inoculada con las 6 diferentes cepas presentaron cuatro de ellos. La variedad tempranera inoculada con la cepa M6PM fue presentó el ácido p-hidroxibenzoico que no estuvo presente ni en la variedad criolla ni en la variedad tempranera.

Se detectaron 6 estándares de flavonoides, la variedad tempranera inoculada con la cepa M6PMrp2 presentó 5 de ellos, y el tratamiento M6PM fue el único que presentó catequina y fue además el compuesto con mayor concentración (0.473mg), lo que nos da referencia que *Trichoderma* en interacción con jamaica variedad tempranera causa un efecto positivo en la acumulación de flavonoides. En la variedad criolla no inoculada la floritzina no se detectó y en interacción con las cepas *Trichoderma* la floritzina se detectó con una concentración de 0.404 mg con el tratamiento M1rp2.

La detección de antocianidinas (cianidina y la petunidina) en la variedad criolla inoculada con *Trichoderma* fue mayor con respecto a las plantas criollas sin inocular, lo que indica la contribución notable de *Trichoderma* en jamaica. La variedad tempranera mostro una

menor concentración de estos compuestos, lo cual también podría indicar que la variedad criolla mostró mayor grado de especificidad con estas cepas de *Trichoderma*.

Los resultados obtenidos en esta investigación son potenciales para dar un valor agregado a la jamaica que se produce en las regiones de la República Mexicana.

VII. CONCLUSIONES

Las plantas de la variedad criolla en interacción con *Trichoderma* tuvieron mejor éxito de crecimiento y acumulación de compuestos polifenólicos, comparado con la variedad tempranera, que se vio afectada en su desarrollo por presentar mayor grado de sensibilidad a plagas. Las plantas de jamaica con mayor concentración de antocianinas, así como con mayor porcentaje de actividad antioxidante fueron las de la variedad criolla inoculadas con *Trichoderma*.

La concentración de fenoles con mayor acumulación se presentó en la variedad criolla inoculada con la cepa obtenida de la muestra 6 de suelo denominada M6PMrp2, proveniente de Tepoztlán, Morelos, mientras que en la variedad tempranera tuvo mayor especificidad con la cepa aislada M1rp2.

PERSPECTIVAS

- Identificación de cepas de *Trichoderma*, utilizando técnicas de extracción de ADN.
- Confrontaciones con fitopatógenos.
- Inocular las plantas en diferentes etapas fenológicas para determinar en qué etapa es mejor.
- Determinar concentración de antioxidantes mediante otras técnicas.
- Probar capacidad antimicrobiana de extractos de jamaica.
- Analizar el perfil de los fitoreguladores en diferentes etapas fenológicas.

VIII. LITERATURA CITADA

- Apáez-Barrios, P., Pedraza-Santos, M. E., Rodríguez-Mendoza, M. N., Raya-Montaño, Y. A., & Jaén-Contreras, D. 2018. Yield and anthocyanin concentration in *Hibiscus sabdariffa* L. with foliar application of micronutrients. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 24(2), 107-120. doi: 10.5154/r.rchsh.2017.06.020
- Abdel-Aal E-S., Young C. y Rabalski I. 2006. Anthocyanin Composition in Black, Blue, Pink, Purple and Red Cereal Grains. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 54:4696-4704.
- Ali-Bradeldin H, Al-Wabel N, Gerald B. 2005. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L: A review. *Phytother Res*.19: 369-375.
- Ávalos García A., Pérez-Urria Carril E. 2009. Metabolismo secundario de las plantas; Reduca (Biología). *Serie Fisiología Vegetal*. 2 (3): 119-145.
- Azorín A., J. y D. Gómez G. 2008. Estrategias de las plantas frente al consumo de los herbívoros. pp. 189-203. *In*: F. Fillat, R. García-González, D. Gómez y R. Reiné (eds.). *Pastos del Pirineo*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, España. ISBN: 978-84-00-08614-5.
- Babalola, S. O.; Babalola, A. O.; Aworth, O. C. 2001. Composition attributes of the calyces of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *The Journal of Food Technology in Africa* 6: 133–134. <http://hdl.handle.net/1807/3404>.
- Borrás-Linares, I., Fernández-Arroyo, S., Arráez-Roman, D., Palmeros-Suárez, P. A., Del Val-Díaz, R., Andrade-González, I., ... Segura-Carretero, A. 2015. Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Industrial Crops and Products*, 69, 385–394. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.053>
- Brand- Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci Technol*. 28 (1): 25 -30.
- Brotman, Y., Kapuganti, J. G., & Viterbo, A. 2010. *Trichoderma*. Quick guide. *Current Biology*, 20(9), 390–391. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2010.02.042>
- Prieto, Delia, Añez, Roberto, Rojas, Joselyn, & Bermúdez, Valmore. 2013. Efecto de la administración de una infusión acuosa de *Hibiscus sabdariffa* L. sobre el índice de masa corporal, apetito y saciedad en individuos con obesidad grado I. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 32(3), 34-40.
- Dios-López, A. de, Montalvo-González, Andrade-González, I., & Gómez-Leyva, J.F. 2011. Inducción de antocianinas y compuestos fenólicos en cultivos celulares de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) in vitro. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 17(2), 77-87. Recuperado en 03 de julio de 2022, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2011000200002&lng=es&tlng=es.

Ferrera-Cerrato R., Alarcón A., Almaraz-Suárez J.J., Lara-Hernández M.E. 2019. Manual de practicas de microbiología del suelo.

Galicia-Flores, L. A.; Salinas, M. Y.; Espinosa-García, B. M.; Sánchez-Feria, C. 2008. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) nacional e importada. Revista Chapingo Serie Horticultura 14(2): 121-129. www.chapingo.mx/revistas/revistas/articulos/doc/abe2f9c3ec926a671fddfdb99e82d1ef.pdf

García, J. C, Hernández, Annia, Acebo, Yanelis, & Rives, Narovis. 2008. Obtención de un nuevo método de desinfección de semillas de arroz. *Cultivos Tropicales*, 29(4), 55-59.

García-Núñez, H.G, Martínez-Campos, A.R., Hermosa-Prieto, M.R., Monte-Vázquez, E, Aguilar-Ortigoza, C.J., & González-Esquivel, C.E. 2017. Caracterización morfológica y molecular de cepas nativas de *Trichoderma* y su potencial de biocontrol sobre *Phytophthora infestans*. *Revista mexicana de fitopatología*, 35(1), 58-79. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1605-4>

Georgé, S., Brat, P., Alter, P. and Amiot, M.J. 2005. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in PlantDerived Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1370-1373. <http://dx.doi.org/10.1021/jf048396b>

Ortega-Acosta SA, Hernández-Morales J, SandovalIslas JS, Ayala-Escobar V, Soto-Rojas L y Alejo-Jaimes A. 2015. Distribución y Frecuencia de Organismos Asociados a la Enfermedad “Pata Prieta” de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), en Guerrero, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 173-194.

Osorio-Hernández E. 2014. Efectividad de *Trichoderma* spp. sobre la enfermedad “pata prieta” en jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) *In vitro* E *In vivo* en Guerrero, México. Tesis de doctorado. Posgrado en fitopatología. Colegio de Postgraduados.

Pacheco-Coello, F., Ramírez-Azuaje, D., Pinto-Catari, I., Peraza-Marrero, M., & Orosco-Vargas, C. 2019. Comparación de compuestos fenólicos totales en *Hibiscus sabdariffa* L. Venezuela. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*, 48(3), 521-527. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v48n3.84956>

Pérez-torres, B.C., Aragón-García, A., Bautista-Martínez, N., Tapia-Rojas, A.M., & López-Olguín, J.F. 2009. Entomofauna asociada al cultivo de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en el municipio de Chiautla de Tapia, Puebla. *Acta zoológica mexicana*, 25(2), 239-247.

Ramos-Gutiérrez, F. A., Ramírez-Cortés, B., Sánchez-Machuca, M. L., Caro-Velarde, F. J., & García Paredes, J. D. 2020. Rendimiento y calidad de tres variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) obtenidos en cosecha continua y cosecha única. *Revista Biociencias*, 7, e707. <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e707>

Rodríguez Arzuaga, M. Salsi, M. S., Piagentini, A. M. 2016. Efecto del mínimo procesamiento y tratamiento con yerba mate sobre el potencial saludable y los atributos de calidad de manzanas Granny Smith. Revista Del Laboratorio Tecnológico del Uruguay INNOTEC, 12, 7- 14. ISSN 1688-6593

Rodriguez- Vazquez 2019. Análisis de las importaciones de flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) ingresada a través del puerto de Veracruz en el periodo 2008-2018

Ruiz-González, Rosey O., & Victorino-Ramírez, Liberio. 2015. Respuesta del policultivo jamaica-frijol-maíz a tratamientos de fertilización en Villaflores, Chiapas, México. *Agrociencia*, 49(5), 545-557. Recuperado en 11 de julio de 2022, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952015000500006&lng=es&tlng=es.

Ruiz-Ramírez R., Hernández-Morales J., Ayala-Escobar V., Soto-Rojas L., Leyva-Mir S., Hernández-Ruiz J. 2015. Hongos Asociados a Cálices de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) Deshidratados y Almacenados en Guerrero, México. Revista mexicana de fitopatología, vol. 33, núm. 1, pp. 12-30.

Sáyago-Ayerdi S.G.; Goñi I. 2010. *Hibiscus sabdariffa* L. Fuente de fibra antioxidante; Vol.60, No.1.<http://www.alanrevista.org/ediciones/2010/1/art-12/>

Salinas-Moreno, Y; Zúñiga-Hernández, A.R.E.; Jiménez-De la Torre, L.B.; Serrano-Altamirano, V.; Sánchez-Feria, C. 2012. Color en cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) y su relación con características fisicoquímicas de sus extractos acuosos. Revista Chapingo Serie Horticultura, vol. 18, núm. 3, septiembre-diciembre, pp. 395-407

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), Guía técnica para la descripción varietal de jamaica [*Hibiscus sabdariffa* (L.) Torr.]. 2014.

Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), Refrescante y nutritivo sabor de la jamaica. 2021.

SENASICA, 2017. Oficina de Inspección de Sanidad Agropecuaria (OISA) del AICM. México: Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Recuperado de: <https://www.aicm.com.mx/dependencias/sagarapa-senasica>

Singleton, V y Rossi, J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Amer. J. Enol. Vitic. 16:144-158.

Trujillo-Tapia M. N, Ramírez-Fuentes E. 2015. Fitopatógenos asociados al manchado del cáliz de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)

ANEXO

Reactivo de Folin-Ciocalteu

Se prepararon 5 mL de la solución del reactivo, el cual se encontraba a 2N, la metodología que se uso indicaba utilizar a 1N por lo cual se utilizó 2.5 mL del reactivo y 2.5 mL de agua destilada.

Na₂CO₃ al 20% (Carbonato de Sodio)

Pesar 4.6 g de Na₂CO₃ (--), en un vaso de precipitado se le coloca 23 mL de agua destilada, se coloca sobre en una parrilla, la solución estuvo en constante agitación colocándole un agitador magnético para facilitar que el Na₂CO₃ se disolviera completamente.

Reactivo de DPPH (2, 2 Difetil-1-Picril-Hidrazilo).

Se preparó 65mL, en la balanza analítica se pesó 1.54 mg del reactivo 2, 2 Difetil-1-Picril-Hidrazilo y se diluyó en 65 mL de metanol absoluto, cuando el reactivo se mezcló por completo se le tomó la absorbancia la cual fue de 0.850 nm.

Metanol acidificado

En una probeta graduada se midió un volumen de 198 mL de metanol absoluto, al cual se añadió 2 mL de ácido trifluoroacético.

Metanol, ácido acético y agua

Para preparar 500 mL de solución se midió 250 mL de metanol absoluto, 25 mL de ácido acético y 225 mL de agua destilada.