

Hongos Asociados a Cálices de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) Deshidratados y Almacenados en Guerrero, México

Fungi Associated to Calyxes of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Dried and Stored in Guerrero, México

Rubicela Ruiz-Ramírez, Javier Hernández-Morales, Victoria Ayala-Escobar, Lauro Soto-Rojas, Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carr. México- Texcoco, Montecillo, Texcoco, Edo. México, CP 56230, México; Santos Gerardo Leyva-Mir, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carr. México- Texcoco, Chapingo, Texcoco, Edo. México CP 56230, México; Javier Hernández-Ruiz, Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala, Km 7.5 Carr. San Martín-Tlaxcala, San Diego Xocoyucan Tlax. CP 90122. Correspondencia: (hjavier@colpos.mx).

Recibido: Octubre 20, 2014

Aceptado: Diciembre 28, 2014

Ruiz-Ramírez R, Hernández-Morales J, Ayala-Escobar V, Soto-Rojas L, Leyva-Mir, SG y Hernández-Ruiz J. 2015. Hongos asociados a Cálices de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) deshidratados y almacenados en Guerrero, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 12-30.

Resumen. Con el objetivo de determinar la calidad fitosanitaria de los cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) comercializados en la región de la Costa Chica de Guerrero, México, se colectaron 49 muestras de cálices deshidratados y almacenados en dos centros de acopio. Los resultados mostraron un contenido de humedad promedio de 14.74 % y una incidencia promedio de cálices con presencia de manchas en la superficie y/o tizón en las puntas del 56.1 %. Con base en la caracterización morfológica y molecular se aislaron e identificaron 16 géneros de hongos. Los géneros más frecuentes fueron *Aspergillus*, *Alternaria*, *Nodulisporium*, *Chaetomium* y *Thielavia*. Se determinó una diferencia en la incidencia de cálices enfermos, lo que determinó los diferentes niveles de calidad ($\alpha=0.05$); asimismo, se registraron diferencias significativas en la

Abstract. In order to determine the phytosanitary quality of dried roselle calyxes (*Hibiscus sabdariffa*) marketed in the Costa Chica region of Guerrero, Mexico, 49 samples of dried and stored calyxes were collected in two packing plants. On average, the calyxes had a moisture content of 14.74 %, and 56.1% of calyxes had the presence of spots on the surface and/or blight on the tips. Based on morphological and molecular characteristics, the fungi was isolated and identified into 16 genera of fungi. The common isolates were *Aspergillus*, *Alternaria*, *Nodulisporium*, *Chaetomium* and *Thielavia*. The quality level of the calyxes was significantly affected by the disease incidence ($\alpha=0.05$); likewise, the frequency of the incidence of the different isolates also varied between storage units ($\alpha=0.1$). The storage temperature showed significant correlations with the following variables: relative humidity ($r=-0.967$), light intensity ($r=0.449$), moisture level of calyxes ($r=0.352$) and incidence of diseased calyxes ($r=0.281$); the correlation between the number of isolated genera and their frequency was negative ($r=-0.349$).

frecuencia de géneros aislados entre ambos almacenes ($\alpha=0.1$). La temperatura de almacenamiento mostró correlaciones significativas con las siguientes variables: humedad relativa ($r=-0.967$), luminosidad ($r=0.449$), humedad de los cálices ($r=0.352$) e incidencia de cálices enfermos ($r=0.281$); la correlación entre el número de géneros aislados y su frecuencia fue negativa ($r=-0.349$).

Palabras clave: identificación, humedad, almacenamiento, calidad fitosanitaria

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) pertenece a la familia Malvaceae y su origen se ubica en India y Malasia. De acuerdo al Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), Guerrero es el principal productor de este cultivo; en 2012 se produjeron 3943 ton en una superficie de 13 679 ha; los municipios con mayor producción fueron Ayutla de los Libres, Tecoaapa, Acapulco, San Luis Acatlán y San Marcos, que en conjunto aportaron el 85.4 % del volumen de producción estatal, con un valor de 43.9 millones de pesos.

Aproximadamente el 95 % de la producción nacional, se vende a granel para su consumo en seco. El principal problema de la cadena productiva se deriva de un deficiente manejo postcosecha, ya que el productor, regularmente, descuida la sanidad durante el proceso de deshidratado lo que trae como resultado una baja calidad del producto debido a la presencia de hongos postcosecha, lo que repercute directamente en el precio (Galicía *et al.*, 2008).

El deshidratado de los cálices debe reducir su contenido de humedad al 10-12 % para asegurar un adecuado almacenamiento (Augustburger *et al.*, 2000; FAO, 2004; McClintock y El Tahir, 2004). Lo anterior coincide con lo que indica la Norma Mexicana NMX-FF-115-SCFI-2010, donde se establece que los cálices de jamaica deben ser comercializados con una humedad máxima del 10-12 %, y un máximo de 10 UFC/g de mohos y levaduras.

Key words: identification, humidity, storage, phytosanitary quality.

Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) belongs to the family Malvaceae and has its origins in India and Malaysia. According to the Agriculture and Fisheries Information Service (SIAP), Guerrero is the main producer of roselle. In 2012, 3,943 tons were produced in a surface of 13,679 hectares; the municipalities with the greatest production were Ayutla de los Libres, Tecoaapa, Acapulco, San Luis Acatlán and San Marcos, which in conjunction produced 85.4 % of the volume for the state, with a value of 43.9 million pesos.

Approximately 95 % of the national production is sold in bulk for its dry consumption. The main problem in the production chain derives from poor management in the post-harvest, given that the producer regularly neglects salubrity during the drying process, which results in a low quality product given the fungi in the post-harvest, thus directly affecting the price (Galicía *et al.*, 2008).

The process of drying the calyxes must reduce humidity content to 10-12 % to ensure proper storage (Augustburger *et al.*, 2000; FAO, 2004; McClintock and El Tahir, 2004). The aforementioned coincides with what is indicated by the Mexican Norm NMX-FF115-SCFI-2010, where it is established that the roselle calyxes must be commercialized with a maximum humidity of 10-12 %, and a maximum mildew and yeast of 10 UFC/g.

There is a lack of information on the mycoflora associated with the roselle calyxes, and their importance on the direct damage and possible formation of mycotoxins. Some authors that have addressed this subject are Owusu and Odamtten (1999), Ojokoh *et al.* (2002), Omenu *et al.* (2006), Doughari *et al.* (2007) and Adebayo-tayo and Samuel (2009). Given that in the Mexican Republic no documented information has been found on

Existe escasez de información sobre la micoflora asociada a los cálices jamaica, su importancia en el daño directo y la posible formación de micotoxinas. Algunos autores que han abordado el tema son Owusu y Odamtten (1999), Ojokoh *et al.* (2002), Omemu *et al.* (2006), Doughari *et al.* (2007) y Adebayo-tayo y Samuel (2009). Dado que en la República Mexicana no se ha encontrado información documentada sobre los microorganismos asociados a los cálices de jamaica, durante su almacenamiento, y los factores podrían contribuir a su deterioro; el objetivo de la presente investigación consistió en identificar los hongos asociados a los cálices de jamaica deshidratados y almacenados, así como su incidencia y condiciones de almacenamiento que afectan su calidad fitosanitaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

En los meses de diciembre de 2012, febrero de 2013 y mayo de 2013 y con base en un muestreo al azar (Steel *et al.*, 1997), se colectaron en total 49 muestras de 30 g cada una de cálices deshidratados de la variedad criolla en los almacenes ubicados en Ayutla municipio de Ayutla y Las Mesas municipio de San Marcos, en el estado de Guerrero.

Identificación de hongos asociados a cálices almacenados de jamaica. Para el aislamiento, purificación y caracterización de colonias se tomaron cinco cálices al azar por cada muestra y se cortaron en trozos de 1 cm² aproximadamente, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1 % por 1.5 a 2 minutos y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, se secaron con papel absorbente estéril y se procedió a sembrar cuatro trozos por caja Petri en medio de cultivo PDA (Crous *et al.*, 2009) marca Bioxon®. Las cajas se incubaron a 25-26 °C por 10 días o hasta el desarrollo de

the microorganisms associated with the roselle calyces during their storage, and the factors that could contribute to their decline, the objective of this investigation consisted in identifying the fungi associated with the dried and stored roselle calyces, as well as their incidence and storage conditions that affect their phytosanitary quality.

MATERIALS AND METHODS

In the months of December 2012, February 2013, and May 2013, and based on a random sampling (Steel *et al.*, 1997), 49 samples in total of dried calyces of a creole variety were collected, of 30 g each, from warehouses located in Ayutla, Ayutla, and Las Mesas, San Marcos, in the state of Guerrero.

Identification of fungi associated with stored roselle calyces. For the isolation, purification and characterization of colonies, five calyces were taken at random for each sample and were cut into pieces of approximately 1 cm²; they were disinfected with 1 % sodium hypochlorite for 1.5 to 2 minutes and rinsed three times with sterile distilled water; they were dried with sterile paper towels; subsequently four pieces were sown in Petri dishes with PDA culture medium (Crous *et al.*, 2009) brand Bioxon®. The dishes were incubated at 25-26 °C for 10 days or until the development of structures. Likewise, five pieces were placed in a humidity chamber and were left in natural light-dark conditions until the development of structures (Crous *et al.*, 2009). After this time, the appearance of fungal microorganisms was verified and the necessary sub-cultures were made in PDA culture medium in order to initiate the purification process with the hyphae point technique and monoconidial sowing (Leslie and Summerell, 2006; Crous *et al.*, 2009).

estructuras. De igual manera, se colocaron cinco trozos en cámara húmeda y se dejaron en condiciones de luz-oscuridad natural hasta el desarrollo de estructuras (Crous *et al.*, 2009). Después de este tiempo se verificó la aparición de microorganismos fungosos y se realizaron los sub-cultivos necesarios en medio de cultivo PDA, con el fin de iniciar el proceso de purificación con la técnica de punta de hifa y siembra monoconidial (Leslie y Summerell, 2006; Crous *et al.*, 2009). Con cada uno de los aislamientos puros, se realizó la identificación a nivel de género con base en características morfológicas macroscópicas observadas en un microscopio estereoscópico Zeiss y características microscópicas (de acuerdo al Sistema de Saccardo) con base en la medida de 100 estructuras vegetativas y reproductivas de los cultivos (Crous *et al.*, 2009), observadas al microscopio compuesto Nikon Eclipse Ci con una cámara de la serie microscopio AmScope MU 1000; la identificación se hizo con base en las claves taxonómicas de Ellis (1971), Sutton (1980), Hanlin (1997), Barnett y Hunter (1998) y Leslie y Summerell (2009).

Para la identificación molecular se realizó la extracción de DNA del micelio de las colonias crecidas en PDA y se siguió el método AP (Sambrook y Russell, 2001). En un Termociclador Techne®, modelo TC-512, se realizó el análisis de PCR para amplificar las regiones internas en los genes ribosomales (rDNA) localizados entre las subunidades 18S-5.8S-28S. Se emplearon los iniciadores universales ITS 4 (TCCTCCGCTTATTGATATG) e ITS 5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) sintetizados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Cada mezcla de reacción contuvo 2.5 µL de amortiguador de reacción 10X, 1.25 µL de MgCl₂, 0.5 µL de dNTP's (Promega®), 1.0 µL de ITS 4, 1.0 µL de ITS 5, 0.5 de Taq DNA polimerasa (Promega 5 µ/µL), 2.0 µL de DNA y 16.25 µL de agua inyectable para tener un volumen final de 25 µL

With each of the pure isolates, an identification was made at the genus level based on macroscopic morphological characteristics observed through a Zeiss stereoscopic microscope, and microscopic characteristics (according to the Saccardo System) based on the measurement of 100 vegetative and reproductive structures of the cultures (Crous *et al.*, 2009), observed through a Nikon Eclipse Ci compound microscope with a series AmScope MU 1000 microscope camera. The identification was made based on the taxonomic keys of Ellis (1971), Sutton (1980), Hanlin (1997), Barnett and Hunter (1998) and Leslie and Summerell (2009).

In order for molecular identification, DNA was extracted from the mycelia of the cultures grown in PDA following the AP method (Sambrook and Russell, 2001). In a Techne® thermal cycler, model TC-512, the PCR analysis was carried out in order to amplify the internal regions in the ribosomal genes (rDNA) located between subunits 18S-5.8S-28S. The universal indicators ITS 4 (TCCTCCGCTTATTGATATG) and ITS 5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) were used, which were synthesized in the Instituto de Biotecnología of the UNAM. Each reaction mix contained 2.5 µL of buffer of 10X reaction, 1.25 µL of MgCl₂, 0.5 µL of dNTP's (Promega®), 1.0 µL of ITS 4, 1.0 µL of ITS 5, 0.5 of Taq DNA polymerase (Promega 5 µ/µL), 2.0 µL of DNA and 16.25 µL of injectable water to obtain a final volume of 25 µL (Innis *et al.*, 1990; Crous *et al.*, 2009). The amplification program was: initial denaturing temperature of 95 °C for 5 minutes, followed by 30 cycles at 95 °C for 45 seconds for the denaturing, 57 °C for 45 seconds for the hybridization and 72 °C for 1 minute for the extension and a final cycle of 72 °C for 5 minutes for the final extension and a final refrigeration temperature of 10 °C (Innis *et al.*, 1990; Crous *et al.*, 2009). The quality of the products of DNA extraction and PCR amplification

(Innis *et al.*, 1990; Crous *et al.*, 2009). El programa de amplificación fue: temperatura de desnaturalización inicial de 95 °C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos a 95 °C por 45 segundos para la desnaturalización, 57 °C por 45 segundos para la hibridación y 72 °C por 1 minuto para la extensión y un último ciclo de 72 °C por 5 minutos para la extensión final y una temperatura final de refrigeración de 10 °C (Innis *et al.*, 1990; Crous *et al.*, 2009). La calidad de los productos de extracción de DNA y amplificación de PCR se verificó con una electroforesis en gel de agarosa (Agarose LE Axygen®) al 1 %; para los productos de PCR se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder Promega®). La electroforesis se realizó en un First Light Illuminator UV a 90 V por 30 min. (Innis *et al.*, 1990; Crous *et al.*, 2009).

El producto obtenido de la amplificación se envió a secuenciar a Macrogen Inc. (Seúl, Corea). Las secuencias se editaron con el programa Gene Runner 5.0.33 Beta y se determinó la homología de la secuenciación en estudio con las bases de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Determinación de la incidencia de cálices enfermos. La incidencia de cálices enfermos se evaluó usando el método propuesto por Campbell y Madden (1990) y se determinó de manera nominal (enfermo o sano), sin considerar la severidad de la enfermedad. Los síntomas de cálices considerados enfermos, podían presentar manchas sobre el cáliz o tizón en las puntas.

Evaluación de condiciones de almacenamiento de los cálices La humedad de los cálices almacenados se determinó de acuerdo al método 14.004 del AOAC (1984). Asimismo, se obtuvieron promedios mensuales de las variables temperatura, luminosidad y humedad relativa de cada uno de los

was verified with an electrophoresis in 1% agarose gel (Agarose LE axygen®); for the PCR products a 100 pb molecular weight marker was used (DNA Ladder Progema®). The electrophoresis was carried out in a First Light Illuminator UV at 90 V for 30 min. (Innis *et al.*, 1990; Crous *et al.*, 2009).

The product obtained from the amplification was sent to be sequenced at Macrogen Inc. (Seoul, Korea). The sequences were edited with the program Gene Runner 5.0.33 Beta and the homology of the sequencing in question was determined based on the data of the NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Determining the incidence of diseased calyxes.

The incidence of diseased calyxes was evaluated using the method proposed by Campbell and Madden (1990) and it was determined in a nominal manner (diseased or healthy), without considering the severity of the disease. The symptoms of calyxes considered diseased could show up as spots on the calyx or smut at the tips.

Evaluation of storage conditions of the calyxes.

The humidity of the stored calyxes was determined according to method 14.004 of the AOAC (1984). Likewise, monthly averages were obtained for the following variables: temperature, luminosity and relative humidity from each of the sampled warehouses. The evaluated period was from December 2012 to May 2013, registering the values of each variable, every four hours with the aid of a Hobo Data Loggers U12.

Data analysis. With the data obtained from all the variables under study, analyses of variance were carried out with the SAS System version 9 software, and a comparison of measures was done using the Least Significant Difference (LSD) method with a significance level of 5 % (Steel *et*

almacenes muestreados. El periodo evaluado fue de diciembre de 2012 a mayo de 2013, registrando valores de cada variable, cada cuatro horas con la ayuda de un Hobo Data Loggers U12.

Análisis de datos. Con los datos obtenidos de todas las variables bajo estudio se realizaron análisis de varianza con el software The SAS System versión 9, y se realizó una comparación de medias mediante el método de Diferencia Mínima Significativa (DMS) con un nivel de significancia del 5% (Steel *et al.*, 1997). Además de realizó un análisis de correlación (Steel *et al.*, 1997) entre las variables temperatura, humedad relativa, luminosidad, humedad de cálices, incidencia de cálices enfermos, número de géneros aislados y su frecuencia con los datos observados de ambos almacenes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aun cuando la norma NMX-FF-115-SCFI-2010 clasifica un solo grado de calidad designado como *Flor (cáliz) deshidratada de jamaica*, se identificaron tres grados de calidad de mayor a menor: Extra, Suprema y Comercial. Dicha clasificación fue establecida por los acopiadores y está en función de la apariencia visual del producto y por tanto varía su valor económico en el mercado (Figura 1).

El 40.8 % de las muestras colectadas correspondió a la calidad Comercial, la cual presentó cálices rotos, color rojo oscuro, con presencia de manchas y/o tizón en las puntas, el 24.5 % fueron cálices de calidad Extra los cuales se observaron enteros, de color rojo intenso y limpios visualmente; la calidad Suprema es un grado intermedio que correspondió al 34.7 %.

Identificación de hongos asociados a los cálices almacenados de jamaica. De acuerdo a la

al., 1997). In addition, a correlation analysis was done (Steel *et al.*, 1997) between the following variables: temperature, relative humidity, luminosity, humidity of the calyxes, incidence of diseased calyxes, isolated number of genera and their frequency with the data observed from both warehouses.

RESULTS AND DISCUSSION

Even while the norm NMX-FF-115-SCFI-2010 classifies a sole quality level designated as *dried roselle flower (calyx)*, three quality levels were identified from greatest to least: Extra, Supreme and Commercial. Such classification was established by the collectors and is in function of the visual appearance of the product, therefore its economic value varies in the market (Figure 1).

40.8% of the collected samples corresponded to the Commercial quality, which presented broken calyxes, a dark red color, and showed spots and/or smut at the tips; 24.5% were calyxes of Extra quality which were observed whole, with an intense red color and visually clean; the Supreme quality is an intermediate level and corresponded to 34.7%.

Identification of fungi associated with stored roselle calyxes. According to the cultural and morphological characterization, 16 genera of fungi were isolated and identified as associated with dried and stored roselle calyxes, their identity and accumulated frequency are shown in figure 2. No significant difference was found in the frequency between *Aspergillus* when compared to *Alternaria* and *Nodulisporium*, though there was a significant difference between *Aspergillus* and the rest of the isolates.

Crous *et al.* (2009) mentioned that the most common genera that could be found dispersed in the

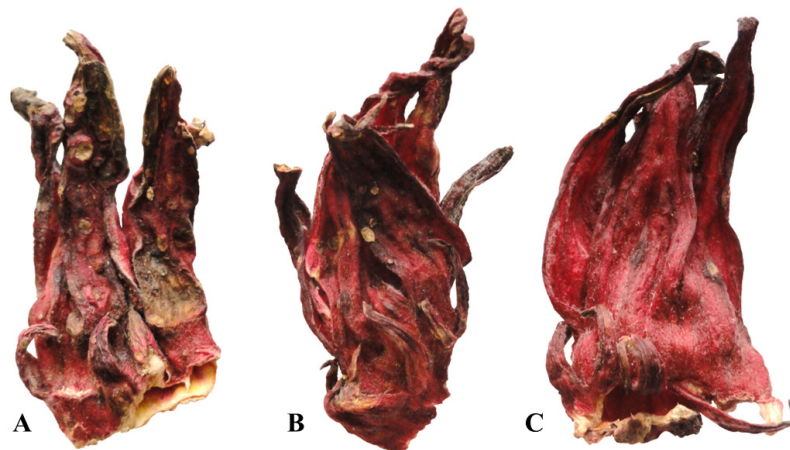


Figura 1. Calidad comercial de cálices de jamaica nacional A) Comercial B) Suprema C) Extra, colectados en Ayutla y Las Mesas, diciembre de 2012 - mayo de 2013.

Figure 1. Commercial quality of national roselle calyces A) Commercial B) Supreme C) Extra, collected in Ayutla and Las Mesas, December 2012 - May 2013.

caracterización cultural y morfológica se aislaron e identificaron 16 géneros de hongos asociados con cálices deshidratados y almacenados de jamaica, su identidad y frecuencia acumulada se muestra en la Figura 2. No se encontró diferencia significativa de la frecuencia entre *Aspergillus* al compararlo con *Alternaria* y *Nodulisporium*, pero si entre *Aspergillus* y el resto de los aislamientos.

air were *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Phoma*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis*, *Stachybotrys*, *Ulocladium* and *Wallemia*. On the other hand, in a study carried out by Essien *et al.* (2013), the following were frequently isolated from the spore atmosphere: *Curvularia*, *Drechslera*, *Nigrospora*, *Pithomyces* and *Stemphylium*. The

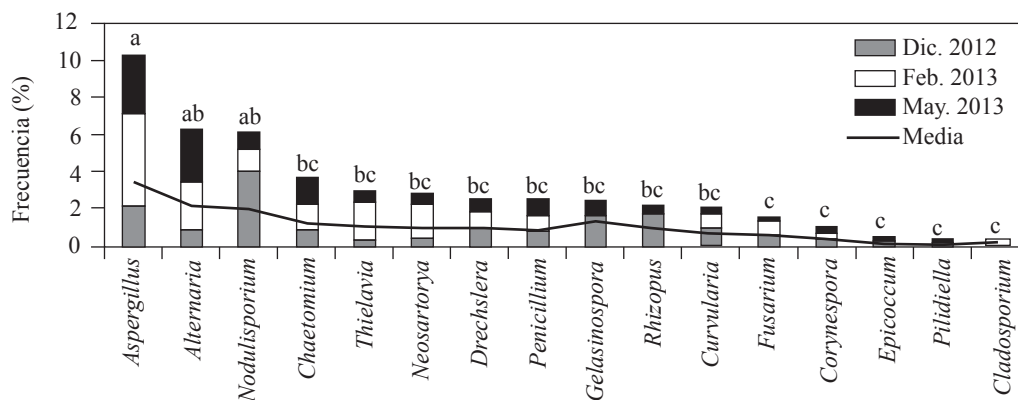


Figura 2. Frecuencia acumulada y media de los 16 géneros de hongos aislados en los diferentes periodos de muestreo.

Figure 2. Accumulated frequency and average of the 16 genera of fungi isolated in the different sampling periods.

Crous *et al.* (2009), mencionan que los géneros más comunes que se pueden encontrar dispersos en el aire son *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Phoma*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis*, *Stachybotrys*, *Ulocladium* y *Wallemia*, por otro lado, en un estudio realizado por Essien *et al.* (2013), se aislaron frecuentemente de la atmosfera esporas de *Curvularia*, *Drechslera*, *Nigrospora*, *Pithomyces* y *Stemphylium*. Lo anterior hace suponer que algunos de los géneros aislados en esta investigación pueden encontrarse de manera regular en el área de estudio. No obstante, algunos géneros han sido aislados también de cálices frescos aun sin cosechar, lo que apoya la teoría de que algunos hongos son acarreados desde el campo de cultivo.

La secuenciación de los amplicones confirmó la identificación de los organismos aislados, mediante un BLAST que arrojó ≥ 97 % de similitud con estudios realizados por otros autores y reportados en el GenBank, a excepción de *Neosartorya* que fue del 88 %. Por las características de fácil reconocimiento, *Rhizopus* y *Penicillium* solo se identificaron a nivel género con base en sus características culturales y morfológicas. El Cuadro 1, muestra el porcentaje de identidad con el BLAST de 14 géneros aislados de cálices de jamaica deshidratados y almacenados.

Se identificaron dos especies de *Chaetomium* y dos especies de *Fusarium*. Es importante mencionar que estudios filogenéticos demuestran que *Drechslera* ha sido aceptado dentro de las especies de *Curvularia* y *Bipolaris*, siendo sinónimo por tanto de *C. australiensis* y *B. australiensis*, respectivamente (Manamgoda *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2014).

El género más frecuentemente aislado fue *Aspergillus* y de acuerdo con Hedayati *et al.* (2007) y Adebayo-tayo y Samuel (2009), las esporas de *Aspergillus* pueden contaminar fácilmente el producto durante el deshidratado de los cálices, siendo

aforementioned supposes that some of the isolated genera in this investigation could be regularly found in the area of study. Nevertheless, some of the genera have also been isolated from fresh calyces yet to be harvested, which supports the theory that some of the fungi are carried from the field.

The sequencing of the amplicons confirmed the identification of the isolated organisms through a BLAST that produced a ≥ 97 % similarity with the studies done by other authors and reported in the GenBank, with the exception of *Neosartorya* which was 88%. Through the characteristics of easy recognition, *Rhizopus* and *Penicillium* were identified only at the genus level based on their cultural and morphological characteristics. Table 1 shows the identity percentage with the BLAST of 14 isolated genera of dried and stored roselle calyces.

Two species of *Chaetomium* and two species of *Fusarium* were identified. It is important to mention that phylogenetic studies show that *Drechslera* has been accepted within the species *Curvularia* and *Bipolaris*, therefore a synonym of *C. australiensis* and *B. australiensis*, respectively (Manamgoda *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2014).

The most frequently isolated genus was *Aspergillus* and according to Hedayati *et al.* (2007) and Adebayo-tayo and Samuel (2009), the spores of *Aspergillus* could easily contaminate the product during the drying process of the calyces, with relative humidity being the most important variable, this is attributed to its high frequency and again the post-harvest management plays an important role in the contamination of the product. Various authors have reported the presence of *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. glaucus*, *A. candidus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *A. rubrum*, *A. wentii* and yeast in beverages based on roselle extract (Owusu and Odamtten, 1999; Adebayo-tayo and Samuel, 2009), therefore it has not been ruled out that its presence could stem from storage practices.

Cuadro 1. Ubicación en el GenBank de 14 géneros de hongos obtenidos en cálices deshidratados y almacenados en centros de acopio de Ayutla y Las Mesas.

Table 1. Location in the GenBank of 14 genera of fungi obtained from dried calyxes stored in the collection centers in Ayutla and Las Mesas.

Código de muestra	Id. Molecular	pb	Comparación de la secuencia con el GenBank	
			Identidad	Acceso
R13	<i>Aspergillus japonicus</i>	552	98 %	KJ192202.1
r4	<i>Alternaria alternata</i>	574	99 %	KJ739872.1
R9	<i>Nodulisporium</i> sp.	515	99 %	JN635501.1
N1	<i>Chaetomium cupreum</i>	414	99 %	KF668034.1
R12	<i>Chaetomium globosum</i>	519	98 %	KJ528988.1
N2	<i>Thielavia terricola</i>	567	99 %	GU966509.1
R11	<i>Neosartorya spinosa</i>	660	88 %	EF669965.1
R2	<i>Curvularia australiensis</i>	568	97 %	KJ475805.1
R8	<i>Gelasinospora brevispora</i>	585	99 %	AY681196.1
R3	<i>Curvularia trifolii</i>	564	99 %	KJ188716.1
r8	<i>Fusarium equiseti</i> (<i>Gibberella intricans</i>)	540	99 %	HM008677.1
r5	<i>Fusarium proliferatum</i> (<i>Gibberella intermedia</i>)	541	99 %	KJ439101.1
r2	<i>Corynespora cassiicola</i>	551	99 %	KJ747095.1
R6	<i>Epicoccum nigrum</i>	540	99 %	FJ424261.1
R1	<i>Pilidiella diplodiella</i>	562	98 %	EU301051.1
r1	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	552	99 %	KF938436.1

la humedad relativa la variable más importante, a esto se atribuye su alta frecuencia y nuevamente el manejo postcosecha juega un papel importante en la contaminación del producto. Varios autores han reportado la presencia de *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. glaucus*, *A. candidus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *A. rubrum*, *A. wentii* y levaduras en bebidas a base de extracto de jamaica (Owusu y Odamtten 1999; Adebayo-tayo y Samuel, 2009); por lo que no se descarta que su presencia provenga desde el almacenamiento.

Algunos organismos aislados, también son reportados por Owusu y Odamtten (1999), al evaluar la microflora de té de hierbas ghanés, compuesto de hojas secas de *Cinnamon*, *Hibiscus* y *Citronella*, donde aislaron 16 especies de hongos en *Hibiscus* pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Manoascus*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Septodochium*, *Rhizopus* y *Syncephalastrum*. También

Some organisms isolated also reported by Owusu and Odamtten (1999) in evaluating the microflora of tea of Ghanaian herbs, composed of dried leaves of *Cinnamon*, *Hibiscus* and *Citronella*, where 16 fungi species isolated in *Hibiscus* belonging to the genera *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Manoascus*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Septodochium*, *Rhizopus* and *Syncephalastrum*. They also determined samples in the field infected with *A. candidus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *C. cladosporioides*, *C. herbario*, *Penicillium digitatum*, *Syncephalastrum* spp. with the capacity to infect samples of dried leaves in storage. Furthermore, Omemu *et al.* (2006) found a total count of 3.2×10^4 UFC/ml of fungi on dried roselle calyxes, isolating *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida krusei*, *Rhizopus oligosporum*, *Mucor* spp., *A. flavus* and *Penicillium citrinum*. Other authors have isolated *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *Trichoderma* sp., *Rhizopus stolonifera*,

determinaron muestras infectadas en campo con *A. candidus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *C. cladosporioides*, *C. herbario*, *Penicillium digitatum*, *Syncephalastrum* spp. con capacidad para infectar muestras de hojas secas en el almacén. Además, Omemu *et al.* (2006), encontraron una cuenta total de 3.2×10^4 UFC/ml de hongos en cálices deshidratados de jamaica, aislando *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida krusei*, *Rhizopus oligosporum*, *Mucor* spp., *A. flavus* y *Penicillium citrinum*. Otros autores han aislado *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *Trichoderma* sp., *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium citrinum*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Geotrichum* en bebidas a base de cálices de jamaica (Ojokoh *et al.*, 2002; Doughari y Elmahmood, 2008; Nwafor y Ikenebomeh, 2009). La consecuencia más notable de *Aspergillus* es la posible producción y acumulación de micotoxinas; es muy frecuente encontrar en productos agrícolas la presencia de aflatoxinas producidas por *A. flavus* y *A. parasiticus* y ocratoxinas producidas por *A. niger*, *A. ochraceus* y *A. carbonarius* (Perrone *et al.*, 2007). Battilani *et al.* (2003) reportaron *A. japonicus* como productor de ocratoxina A (OA) en cultivo de uvas, sin embargo, lo anterior no fue corroborado en estudios realizados por Parenicová *et al.* (2001), Samson *et al.* (2004) y Perrone *et al.* (2007). En el presente trabajo solo se determinó la identidad de los hongos asociados a cálices de jamaica deshidratados y almacenados, por lo que no se puede aseverar la presencia de alguna toxina en el producto como consecuencia de la presencia de los hongos aislados.

Determinación de la incidencia en cálices enfermos. Al comparar la incidencia media de cálices enfermos entre almacenes, no se encontró diferencia significativa entre Ayutla (60.5 %) y Las Mesas (48.6 %) (DMS=14.99); sin embargo, al compararla por fecha de colecta, en el mes de mayo de 2013

Penicillium citrinum, *Saccharomyces cerevisiae* and *Geotrichum* in beverages based on roselle calyxes (Ojokoh *et al.*, 2002; Doughari and Elmahmood, 2008; Nwafor and Ikenebomeh, 2009). The most notable consequence of *Aspergillus* is the possible production and accumulation of mycotoxins. The presence of aflatoxins produced by *A. flavus* and *A. parasiticus* and ochratoxins produced by *A. niger*, *A. ochraceus* and *A. carbonarius* are frequently found in agricultural products (Perrone *et al.*, 2007). Battilani *et al.* (2003) reported *A. japonicus* as the producer of ochratoxin A (OA) in the cultivation of grapes; however, the aforementioned was not corroborated in the studies carried out by Parenicová *et al.* (2001), Samson *et al.* (2004) and Perrone *et al.* (2007). In this work, only the identification of the fungi associated with dried and stored roselle calyxes was determined, therefore the presence of any toxin in the product cannot be asserted as a consequence of the presence of the isolated fungi.

Determination of the incidence of diseased calyxes. In comparing the average incidence of diseased calyxes between warehouses, no significant difference was found between Ayutla (60.5 %) and Las Mesas (48.6 %) (DMS=14.99); however, when compared by date of collection, in the month of May 2013, a greater average value (71.11 %) was obtained compared to the months of December 2012 (42.04%) and February 2013 (53.79 %) (DMS=16.5).

Meanwhile in Ayutla, no significant difference was found comparing the three dates of collection in the same warehouse; in Las Mesas a greater incidence was observed in May 2013 when compared to December 2012. When comparing the two warehouses, in December 2012 a greater incidence was observed in Ayutla. The aforementioned is attributed to the fact that in the first months of harvest, in the warehouse in

se obtuvo un valor medio mayor (71.11 %) comparado con los meses de diciembre de 2012 (42.04 %) y febrero de 2013 (53.79 %) (DMS=16.5).

Mientras que en Ayutla, no se encontró diferencia significativa al comparar las tres fechas de colecta en el mismo almacén, en Las Mesas se observó una incidencia mayor en mayo de 2013 comparado con diciembre de 2012. Al comparar los dos almacenes, en diciembre de 2012 se observó mayor incidencia en Ayutla. Lo anterior se atribuye a que durante los primeros meses de cosecha, en el almacén de Ayutla se almacenó jamaica en sus diferentes grados de calidad, mientras que en Las Mesas solo se recibió producto calidad Extra y Suprema en donde no se permite que haya cálices con necrosamiento. Sin embargo, ya para los meses de abril en adelante, que hay escases del producto, en Las Mesas también se recibió la calidad Comercial, consecuentemente, hubo la presencia de cálices con manchas, igualando la incidencia entre los dos almacenes.

La incidencia de cálices enfermos se determinó de manera nominal (enfermo o sano), por tanto un cáliz calidad Extra podría considerarse enfermo al igual que un cáliz calidad Comercial, aun cuando el primero presente apenas una pequeña mancha; lo anterior es poco confiable al momento de determinar la calidad del producto final, ya que el acopiador solo se basa en la apariencia visual y el criterio de selección varía entre acopiadores. El grado Comercial mostró una incidencia mayor de cálices enfermos (67.66 %) comparada con la calidad de mayor precio económico, la Extra (44.02 %) (DMS=17.276); lo anterior se atribuye al número de muestras colectadas por grado de calidad; es decir, fue más frecuente encontrar cálices manchados y/o con tizón en las puntas (40.8 %) que cálices sanos (24.5 %). La media del número de géneros de hongos aislados en cálices con diferente grado de calidad no mostró una diferencia significativa,

Ayutla, roselle was stored in its different quality grades, meanwhile, in Las Mesas only product with Extra and Supreme quality was received where no calyxes with necrosing were allowed. However, for the months of April onward, in which there was a product shortage, Las Mesas also received Commercial quality, and consequently there was the presence of calyxes with spots, matching the incidence between the two warehouses.

The incidence of diseased calyxes was determined in a nominal manner (diseased or healthy), therefore a calyx of Extra quality could be considered as diseased in the same manner as a Commercial quality calyx, even when the former barely shows a small spot. The aforementioned is unreliable at the time of determining the quality of the final product, given that the collector only bases on the visual appearance and the selection criteria varies between collectors. The Commercial grade showed a greater incidence of diseased calyxes (67.66%) compared to the quality of greater economical price, Extra (44.02%) (DMS=17.276). The aforementioned is attributed to the number of samples collected by quality grade, that is to say, it was more frequent to find calyxes with spots and/or smut on the tips (40.8%) than healthy calyxes (24.5%). The average number of genera of fungi isolated in calyxes with different quality grades did not show a significant difference, this is related to the visual criteria of the collectors at the time of classifying the Commercial qualities of roselle and the aforementioned consideration.

The statistical analysis, with a 5% level of significance, did not indicate differences between warehouses, in the number of isolated genera (11.6 for both warehouses, DMS=4.719) and their frequency (9.9 % and 5.8 % for Ayutla and Las Mesas, respectively, DMS=4.7405); however, by increasing the level of significance to 10 % a significant difference was found in the frequency of

lo anterior se relacionó con el criterio visual de los acopiadores al momento de clasificar las calidades comerciales de jamaica y con la consideración hecha anteriormente.

El análisis estadístico, con un nivel de significancia del 5 %, no indicó diferencia entre almacenes, en el número de géneros aislados (11.6 para ambos almacenes, DMS=4.719) y su frecuencia (9.9 % y 5.8 %, para Ayutla y Las Mesas, respectivamente, DMS=4.7405); sin embargo, al aumentar el nivel de significancia a 10 % se encontró una diferencia significativa en la frecuencia de los géneros aislados entre Ayutla y Las Mesas (DMS=3.6399); esta diferencia se atribuye a los grados de calidad recibidos en cada almacén y al manejo postcosecha dentro de los mismos, ya que en Ayutla, fue común observar la recepción de cálices calidad Comercial, el almacenamiento se realiza por mayor tiempo en cúmulos a granel, compartiendo el mismo espacio para los diferentes grados de calidad, aunado a esto, la humidificación y traspaleo constante del producto favorece que las esporas liberadas se distribuyan fácilmente en el aire, y de acuerdo con Omemu *et al.* (2005) y Adebayo-tayo y Samuel (2009), pueden caer sobre el producto para dañarlo posteriormente.

Evaluación de condiciones de almacenamiento.

En cuanto al porcentaje de contenido de humedad promedio de cálices, no se determinó diferencia significativa entre las muestras colectadas en Las Mesas (15.0 %) y Ayutla (14.5 %) (DMS=2.0656). La Figura 3 muestra la humedad determinada para las 49 muestras procesadas y su ubicación respecto a los límites que establece la NMX-FF-115-SCFI-2010. El 81.63% de las muestras reportaron un contenido de humedad mayor al 12 %; condición que favorece el desarrollo de hongos durante el almacenamiento (Augustburger, 2000); además Gradinaru *et al.* (2003) y Galicia *et al.* (2008),

the isolated genera between Ayutla and Las Mesas (DMS=3.6399). This difference is attributed to the quality grades received in each warehouse and to the post-harvest management between the same. Given that in Ayutla it was common to observe the reception of Commercial quality calyxes, storage was carried out for a greater amount of time in bulk hosts, sharing the same space for the different quality grades. In conjunction with this, the humidification and the constant shoveling of the product favors that the spores released are easily distributed in the air, and according to Omemu *et al.* (2005) and Adebayo-tayo and Samuel (2009), that could fall on the product to damage it afterwards.

Evaluation of the storage conditions. Regarding the percentage of the average humidity content of calyxes, no significant difference was determined between the samples collected in Las Mesas (15.0 %) and Ayutla (14.5 %) (DMS=2.0656). Figure 3 shows the humidity determined for the 49 processed samples and their location regarding the limits established by the NMX-FF-115-SCF-2010. 81.63% of the samples reported a humidity content greater than 12%, a condition that favors the development of fungi during storage (Augustburger, 2000); in addition, Gradinaru *et al.* (2003) and Galicia *et al.* (2008) mention that this factor also affects the stability of the color of the calyxes, given that it increases the reaction velocities of the degradation of Anthocyanins, a component responsible for the coloration of the calyxes.

When comparing the humidity content of the calyxes by date of collection, it was significantly determined that in both warehouses the more humid calyxes were collected in the months of February and May 2013 (Figure 4).

The variations in the percentage of humidity in the product between the different sampling dates

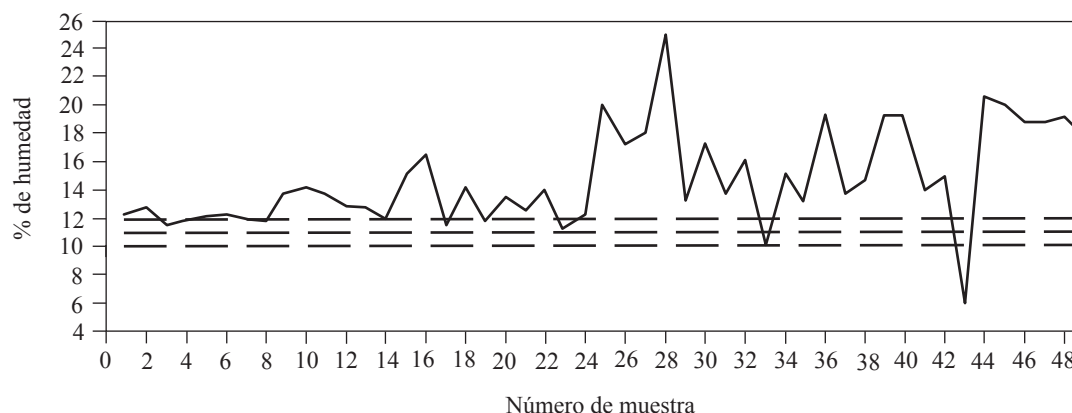


Figura 3. Humedad de cálices de jamaica almacenados; la secuencia de las muestras corresponde al orden de colecta. Las líneas punteadas corresponden a los valores, mínimo, medio y superior establecidos por la NMX-FF-115-SCFI-2010.

Figure 3. Humidity of the stored roselle calyces; the sequence of the samples corresponds to the collection order. The dotted lines correspond to the values, minimum, medium and maximum established by the NMX-FF-115-SCFI-2010.

mencionan que este factor repercute también en la estabilidad del color de los cálices, ya que incrementa las velocidades de reacción de degradación de antocianinas, componente responsable de la coloración de los cálices.

Al comparar el contenido de humedad de los cálices por fecha de colecta, en ambos almacenes se determinó significativamente que los cálices más húmedos se colectaron en los meses de febrero y mayo de 2013 (Figura 4).

Las variaciones en el porcentaje de humedad del producto entre las diferentes fechas de muestreo se debe a las prácticas postcosecha que se realizan en cada almacén; generalmente el acopio de los cálices se realiza en los meses de noviembre y diciembre, poco después de que el productor los ha deshidratado y envasado; mientras que en los meses más calurosos el producto ya se encuentra en el almacén y se asperja con agua para evitar que se quiebre y pierda peso, lo anterior ocasiona que los cálices reabsorban humedad (Juliani *et al.*, 2009). Vallecillo y Gómez (2004) mencionan que de las condiciones de almacenamiento y manejo del producto depende que la jamaica no reabsorba humedad del ambiente

are due to the post-harvest practices that are carried out in each warehouse; generally, the collection of the calyces is carried out in the months of November and December, shortly after the producer has dried and packaged them. Meanwhile, in the hotter months the product is already in storage and sprayed with water in order to avoid it breaking and losing weight, which causes the calyces to reabsorb humidity (Juliani *et al.*, 2009). Vallecillo and Gómez (2004) mention that the storage conditions and the management of the product depend on the roselle not reabsorbing humidity from the ambiente and favoring the growth of fungi, which results in it being necessary to design and evaluate practices that inhibit this condition. During the material gathering, the average temperature that was registered in Las Mesas was greater (27.6 °C) than that of Ayutla (27.1 °C) (DMS=0.162), while the relative humidity in Ayutla was greater (58.4 %) compared to Las Mesas (52.4 %) (DMS=0.8993). The luminosity of Las Mesas was greater (38.3 lux) than the luminosity of Ayutla (16.8 lux) (DMS=4.5752). The collection center of Ayutla is located at an altitude of 391 m above sea level and

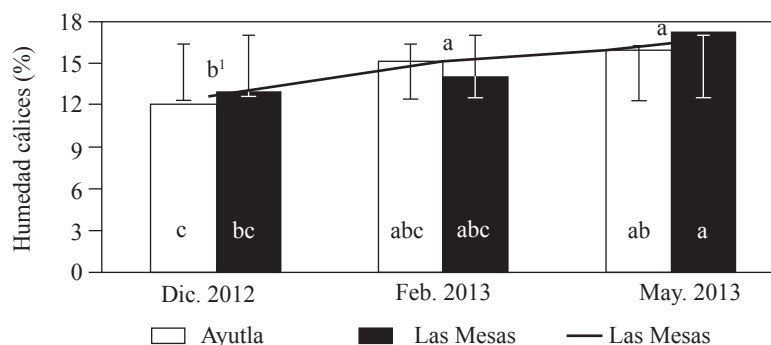


Figura 4. Humedad promedio de cálices en diferentes periodos de muestreo. ¹Medias con la misma letra dentro de línea y dentro de barras son estadísticamente iguales (DMS entre almacenes, $P < 0.05 = 3.3361$; DMS media, $P < 0.05 = 2.2185$).

Figure 4. Average humidity of the calyxes in different sampling periods. ¹Averages with the same letter inside the line and within the bars are statistically the same (DMS between warehouses, $P < 0.05 = 3.3361$; DMS average, $P < 0.05 = 2.2185$).

y favorezca el crecimiento de hongos, por lo que resulta necesario diseñar y evaluar prácticas que inhiban esta condición.

Durante la colecta de material, la temperatura media que se registró en Las Mesas fue mayor ($27.6\text{ }^{\circ}\text{C}$) que la de Ayutla ($27.1\text{ }^{\circ}\text{C}$) (DMS=0.162); mientras que la humedad relativa en Ayutla fue mayor (58.4 %) comparada con Las Mesas (52.4 %) (DMS=0.8993). La luminosidad de Las Mesas fue mayor (38.3 lux) que la luminosidad de Ayutla (16.8 lux) (DMS=4.5752). El centro de acopio de Ayutla se ubica a una altitud de 391 msnm y el almacén de Las Mesas a 432 msnm.

Augustburger *et al.* (2000) recomiendan almacenar el producto empacado en bolsas de polietileno, polipropileno o cajas de cartón en espacios protegidos del sol a temperaturas máximas de $15\text{--}20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una humedad ambiental máxima de 60% y bajo estas condiciones el producto puede conservarse por 12 a 18 meses.

Las condiciones de almacenamiento que se practican en la zona de estudio difieren de las recomendaciones de Augustburger *et al.* (2000); ya que el producto se almacena en su mayoría en cúmulos a granel a temperatura ambiente, la cual registró un

the warehouse of Las Mesas at 432 m above sea level.

Augustburger *et al.* (2000) recommends storing the product packaged in polyethylene or polypropylene bags or cardboard boxes in spaces protected from the sun at maximum temperatures of $15\text{--}20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and a maximum ambient humidity of 60% and under these conditions the product could be preserved for up to 12 to 18 months.

The storage conditions used in the zone of study differ from those recommended by Augustburger *et al.* (2000); given that the product is mostly stored in bulk hosts at ambient temperature, which had an average registered value of up to $28.6\text{ }^{\circ}\text{C}$, while the relative humidity registered values of up to 66.4 % in Ayutla. According to Arauz (1998), the majority of the pathogenic fungi sporulate better in high relative humidity than at low levels. The variation in the luminosity was related to the conditions of the very facilities, the collection volume and the post-harvest practices that are used in each warehouse; however, the light influence on the development of the diseases, in particular in natural conditions, has a lesser importance than that of the temperature or the humidity.

valor medio de hasta 28.6 °C, mientras que la humedad relativa registró valores hasta de 66.4 % en Ayutla; de acuerdo a Arauz (1998), la mayoría de los hongos patógenos esporulan mejor a humedades relativas altas que a niveles bajos. La variación en la luminosidad se relacionó con las condiciones propias de las instalaciones, el volumen de acopio y las practicas postcosecha que se practican en cada almacén; sin embargo, la influencia de la luz sobre el desarrollo de enfermedades, en particular en condiciones naturales, tiene una importancia mucho menor que la que tiene la temperatura o la humedad.

Se realizó un análisis de correlación entre las variables: temperatura, humedad relativa, luminosidad, humedad de cálices, incidencia de cálices enfermos, número de géneros aislados y frecuencia de géneros aislados. Los coeficientes de correlación de las variables de almacenamiento de ambos almacenes, se presentan en el Cuadro 2.

Se determinó una correlación negativa muy alta entre la temperatura y la humedad relativa. Así, Arauz (1998) menciona que una influencia indirecta de la temperatura en el desarrollo de patógenos es su efecto en la humedad; conforme aumenta la

A correlation analysis was carried out between the variables: temperature, relative humidity, luminosity, humidity of the calyxes, incidence of diseased calyxes, number of isolated genera and frequency of the isolated genera. The correlation coefficients of the storage variables of both warehouses are shown in table 2.

A rather high negative correlation was determined between the temperature and relative humidity. Similarly, Arauz (1998) mentions that an indirect influence of the temperature on the development of pathogens is its effect on humidity; as the temperature increases, the relative humidity decreases and the foliar surfaces dry faster.

On the other hand, the storage temperature and the humidity of the calyxes showed a low positive correlation, by increasing the temperature the humidity of the stored calyxes also increased, this is due to it decreasing the relative humidity, the calyxes continue to dry and the collectors spray the product with water during its stay at the collection centers in order to facilitate their management and avoid weight loss, therefore, as it has already been mentioned, the calyxes can reabsorb humidity (Juliani *et al.*, 2009).

Cuadro 2. Coeficientes de correlación entre las variables de almacenamiento evaluadas en Ayutla y Las Mesas.

Table 2. Correlation Coefficients between the storage variables evaluated in Ayutla and Las Mesas.

Variabes	Temp	HR	Lum	Hum-cal	Inc	Ngén	Frec
Temp	1.000						
HR	<i>-0.967</i>	1.000					
Lum	<i>0.449</i>	<i>-0.449</i>	1.000				
Hum-cal	<i>0.352</i>	<i>-0.419</i>	0.086	1.000			
Inc	<i>0.281</i>	<i>-0.326</i>	-0.113	0.149	1.000		
Ngén	-0.040	0.015	-0.182	-0.083	0.049	1.000	
Frec	-0.168	0.202	-0.024	-0.182	-0.036	<i>-0.349</i>	1.000

Las correlaciones en cursivas indican una diferencia significativa de P<0.05. Temp= Temperatura, HR=Humedad relativa, Lum=Luminosidad, Hum-cal=Humedad de cálices, Inc=Incidencia de cálices enfermos, Ngén=Número de géneros aislados, Frec=Frecuencia de géneros aislados / The correlations in italic show a significant difference of P< 0.05. Temp= Temperature, HR=Relative humidity, Lum=Luminosity, Hum-cal=Humidity of the calyxes, Inc=Incidence of diseased calyxes, Ngén=Number of isolated genera, Frec=Frequency of the isolated genera.

temperatura, la humedad relativa disminuye y más rápidamente se secan las superficies foliares.

Por otro lado, la temperatura de almacenamiento y la humedad de los cálices mostraron una correlación positiva baja, al aumentar la temperatura también aumenta la humedad de los cálices almacenados, esto se debe a que disminuye la humedad relativa, se siguen deshidratando los cálices y los acopiadores asperjan con agua el producto durante su permanencia en los centros de acopio para facilitar su manejo y evitar pérdidas de peso, por lo que, como ya se mencionó, los cálices pueden reabsorber humedad (Juliani *et al.*, 2009).

La correlación positiva baja entre la temperatura y la incidencia de cálices enfermos se atribuye a las prácticas postcosecha, donde se debe evitar que el producto no vuelva a absorber humedad del ambiente, lo que favorecería el crecimiento de hongos (Vallecillo y Gómez, 2004) y por tanto aumentaría la incidencia de cálices enfermos.

Al aumentar la temperatura aumenta la luminosidad de almacenamiento, esta correlación positiva moderada, depende del diseño y/o prácticas postcosecha propias de cada almacén, sin embargo, la luminosidad es un factor de menor importancia para el desarrollo de enfermedades.

El número de géneros aislados mostró una correlación negativa baja con su frecuencia acumulada, esto se atribuye a la clasificación visual de las calidades que realizan los acopiadores al momento de recibir la jamaica, mismas que no están basadas en criterios científicos; ya que podría recibirse un cáliz aparentemente sano, calidad extra y éste estar contaminado superficialmente con esporas presentes en el aire.

La jamaica es un producto no perecedero, que requiere de cuidados para conservar su estado natural después de la cosecha. El proceso de deshidratación de los cálices debe ser rápido para evitar enmohecimiento, y de esta manera el producto se

The low positive correlation between the temperature and the incidence of diseased calyxes is attributed to the post-harvest practices, where it must be avoided for the product to reabsorb ambient humidity, which would favor the growth of fungi (Vallecillo and Gómez, 2004) and therefore the incidence of diseased calyxes would increase.

By increasing the temperature, the luminosity of the storage increases. This moderate positive correlation depends on the design and/or post-harvest practices of each warehouse; however, the luminosity is a factor of lesser importance for the development of diseases.

The number of isolated genera showed a low negative correlation with its accumulated frequency, this is attributed to the visual classification of the qualities, which is carried out by the collectors at the time of receiving the roselle, and which is not based on scientific criteria; given that an apparently healthy calyx could be received, of Extra quality, and this same calyx could be superficially contaminated with spores found in the air.

Roselle is a non-perishable product, which requires certain instructions to conserve its natural state after harvest. The drying process of the calyxes must be fast in order to avoid mildew, and in this fashion the product is stored at a humidity below 12%, with adequate ventilation.

CONCLUSIONS

The average humidity content of the analyzed roselle samples was 14.5% above what is technically recommended by various authors, including what is established in the NMX-FF-115-SCF-2010; this favored the development of fungi. 81.63% of the samples exceeded the upper limit established by the accepted humidity content for its commercialization.

almacene con una humedad menor al 12 %, con una adecuada ventilación.

CONCLUSIONES

La media de contenido de humedad de las muestras analizadas de jamaica fue de 14.5 %, superior a lo técnicamente recomendado por varios autores, incluyendo lo establecido en la NMX-FF-115-SCFI-2010; esto favoreció el desarrollo de hongos. El 81.63 % de las muestras superó el límite superior establecido para el contenido de humedad aceptado para su comercialización.

La incidencia de cálices enfermos fue mayor en el mes de mayo de 2013 (71.11 %) comparada con los meses de diciembre de 2012 (42.04 %) y febrero de 2013 (53.79 %). No se encontró diferencia significativa en la incidencia de cálices enfermos colectados en los almacenes de Ayutla (60.5 %) y Las Mesas (48.6 %). Asimismo, los cálices calidad Comercial mostraron una incidencia mayor que los cálices de calidad Extra.

Se aislaron 16 géneros de hongos asociados a los cálices deshidratados y almacenados de jamaica; los 5 géneros aislados más frecuentemente fueron *Aspergillus*, *Alternaria*, *Nodulisporium*, *Chaetomium* y *Thielavia*.

Con un $\alpha=0.1$ se determinó diferencia significativa en la frecuencia acumulada de éstos hongos aislados entre almacenes, la principal causa de la diferencia se debe a las prácticas de manejo que se realizan en cada almacén.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, permitieron conocer las condiciones bajo las que se almacena la jamaica cosechada y deshidratada en Guerrero, mismas que deben corregirse para evitar el favorecimiento de la presencias de los organismos identificados.

The incidence of diseased calyces was greater in the month of May 2013 (71.11 %) compared to the months of December 2012 (42.04 %) and February 2013 (53.79 %). No significant difference was found in the incidence of diseased calyces collected in the warehouses in Ayutla (60.5 %) and Las Mesas (48.6 %). Likewise, the Commercial quality calyces showed greater incidence than the calyces of Extra quality.

16 genera of fungi associated with the dry and stored roselle calyces were isolated; the 5 most frequently isolated genera were *Aspergillus*, *Alternaria*, *Nodulisporium*, *Chaetomium* and *Thielavia*.

Considering $\alpha=0.1$, a significant difference in the accumulated frequency of this fungi was determined between warehouses. The main cause of the difference is due to the management practices used in each warehouse.

The obtained results in this study allowed knowledge of the conditions under which the harvested and dried roselle are stored in Guerrero, which must be corrected to avoid favoring the presence of the identified organisms.

Acknowledgements.

To the Sectorial Fund SAGARPA-CONACYT for financing the project with key-163972

~~~~~ Finaliza la versión en Inglés ~~~~~

### Agradecimientos

Al Fondo Sectorial SAGARPA-CONACYT por el financiamiento del proyecto con clave-163972.

## LITERATURA CITADA

Adebayo-tayo BC and Samuel UA. 2009. Microbial quality and proximate composition of dried Hibiscus sabdariffa calyces

- in Uyo, Eastern Nigeria. *Malaysian Journal of Microbiology* 5 (1): 13-18.
- Arauz CLF. 1998. Fitopatología un enfoque agrocológico. Primera Edición. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, C.R. pp. 201-228
- Association of Official Analytical Chemist Inc. (AOAC). 1984. Official methods of analysis. Twelfth Edition. St. Paul. Minnesota, USA.
- Augustburger F, Berger J, Censkowsky U, Heid P, Milz J, y Streit C. 2000. Agricultura orgánica en el trópico y subtropico. Guía de 18 cultivos. Hibisco. Asociación Naturland. Primera Edición. Gräfelfing, Alemania. 13p.
- Barnett HL and Hunter BB. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth Edition. APS Press. St. Paul, Minesota, USA. 218p.
- Battilani P, Pietri A, Bertuzii T, Languasco L, Giorni P and Kozakiewicz Z. 2003. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. *Journal of Food Protection* 66 (4): 633-636.
- Campbell C and Madden LV. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. Jhon Wiley and Son. New York, USA. 532p.
- Crous PW, Verkley GJM, Groenewald JZ and Samson RA. 2009. Fungal Biodiversity. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht. The Netherlands. 269p.
- Deng H, Pei TP, Shivas RG and Chon NY. 2014. *Curvularia tsudae* comb. nov. et nom. nov., formerly *Pseudocochliobolus australiensis*, and a revised synonymy for *Curvularia australiensis*. *Mycoscience* XXX: 1-5.
- Doughari JH, Alabi G, and Elmahmood AM. 2007. Effect of some chemical preservatives on the shelf-life of sobo drink. *African Journal Microbiology Research* 2: 037-041.
- Ellis MB. 1971. More Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, UK. 507p.
- Essien BC, Taiga A, Suleiman, MN, Idachaba SO, Aniama SO and Edegbo E. 2013. A study of airborne fungal spores of Anyigba, Kogi state, Nigeria. *American Journal of Biomedical and Life Science* 1 (49): 70-74.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2004. Hibiscus: Post-production management for improved market acces. operation. 19 p. [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/inpho/docs/Post\\_Harvest\\_Compendum\\_-\\_Hibiscus.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compendum_-_Hibiscus.pdf) (consulta, mayo 2014).
- Galicia FLA, Salinas MY, Espinoza GBM y Sánchez FC. 2008. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) nacional e importada. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14 (2): 121-129.
- Gradinaru G, Biliaderis CG, Kallithraka S, Kefalas P and Garcia-Viguera C. 2003. Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins in solution and solid state: effects of copigmentation and glass transition. *Food Chemistry* 83: 423-436.
- Hanlin RT. 1997. Illustrated genera of Ascomycetes. APS Press. St. Paul, Minnesota, USA. 263p.
- Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P and Denning DW. 2007. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 153: 1677-1692.
- Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ and White TJ. 1990. PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press. San Diego, USA. 482p.
- Juliani HR, Welch CR, Wu Q, Diouf B, Malainy D and Simon JE. 2009. Chemistry and quality of hibiscus (*Hibiscus sabdariffa*) for developing the natural-product industry in Senegal. *Journal of Food Science: Sensory and Food Quality* 74(2): 113-121.
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 388p.
- Manamgoda DS, Cai L, McKenzie EHC, Crous PW, Madrid H, Chukeatirote E, Shivas RG, Tan YP and Hyde KD. 2012. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris - Cochiobolus - Curvularia* complex. *Fungal Diversity* 56: 131-144.
- McClintock NC and El Tahir IM. 2004. *Hibiscus sabdariffa* L. In: Grubben GJH and Denton OA PROTA 2: Vegetable/Légumes. PROTA, Wagening, Netherlands. [http://database.prota.org/PROTAhtml/Hibiscus%20sabdarriffa\\_En.htm](http://database.prota.org/PROTAhtml/Hibiscus%20sabdarriffa_En.htm) (consulta, junio 2014).
- Norma Mexicana MX-FF-115-SCFI-2010. Productos Agrícolas destinados para consumo humano –flor (cáliz) de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) – especificaciones y métodos de prueba. 21p.
- Nwafor OE and Ikenebomeh MJ. 2009. Effects of different packaging materials on microbiological, physio-chemical and organoleptic quality of zobo drink storage at room temperature. *African Journal of Biotechnology* 8 (12): 2848-2852.
- Ojokoh AO, Adeyuti FC, Akinyosoye FA and Oyetayo VO. 2002. Fermentation studies on roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyces neutralised with trona. *The Journal of Food Technology in Africa* 7 (3): 75-78.
- Omemu AM, Edema MO, Atayese AO and Obadina AO. 2006. A survey of the microflora of *Hibiscus sabdariffa* (roselle) and the resulting “zobo” juice. *African Journal of Biotechnology* 5 (83): 254-259.
- Owusu E and Odamtten GT. 1999. Quality of Ghana herbal tea: microflora and control measures. *Journal of the Ghana Science Assosiation* 1 (3): 84-99.
- Parenicová L, Skouboe P, Frisvad J, Samson RA, Rossen L, Hoor-Suykerbuyk H and Visser J. 2001. Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (29): 521-527.
- Perrone G, Susca A, Cozzi G, Ehrlich K, Varga J, Frisvad JC, Meijer M, Mahakarnchanakul W and Samson RA. 2007. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology* 59: 53-66
- Sambrook J and Russell DW. 2012. Molecular cloning. A Laboratory Manual. Third Edition. 1. 1.32-1.34. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York.
- Samson RA, Houbraken JAMP, Kuijpers AFA, Frank JM and Frisvad JC. 2004. New ochatoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology* 50: 45-61.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2012. Anuario estadístico de la producción agrícola. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/> (consulta, mayo 2014).



Steel RGD, Torrie JH and Dickey DA. 1997. Principles and procedures of statistics a biometrical approach. 3<sup>th</sup> Edition. McGraw-Hill. USA. 139-201; 286-290.

Sutton BC. 1980. The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidio, acervuli and stroma. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 696p.

Vallecillo SMS y Gómez E. 2004. Cultivo de Rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L). Programa de Política Económica y Desarrollo de Agronegocios, IICA USAID, Primera Edición. Editarte. Managua. 50 p.