



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A *Phytophthora*  
*parasitica* Dastur EN JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)**

**RAFAEL ROJAS ROJAS**

**T E S I S**

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

**DOCTOR EN CIENCIAS**

Montecillo, Texcoco, Estado de México.

2017



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

## CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe, “**RAFAEL ROJAS ROJAS**”, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor “**Dr. CARLOS DE LEÓN GARCÍA DE ALBA** por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis “**GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A *Phytophthora parasitica* Dastur EN JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)**”, y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Texcoco, México a 26 de abril de 2017.

Rafael Rojas Rojas

Vo. Bo. del Dr. Carlos de León García de Alba

La presente tesis titulada “**Genética de la resistencia a *Phytophthora parasitica* Dastur en jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)**” realizada por el alumno **Rafael Rojas Rojas** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

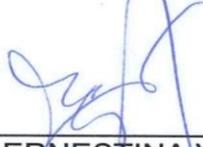
**DOCTOR EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO   
DR. CARLOS DE LEÓN GARCÍA DE ALBA

ASESOR   
DR. VÍCTOR HEBER AGUILAR RINCÓN

ASESOR   
DR. JAVIER HERNÁNDEZ MORALES

ASESORA   
DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

ASESOR   
DR. CIRO VELASCO CRUZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México. Mayo de 2017

# GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A *PHYTOPHTHORA PARASITICA* DASTUR EN JAMAICA (*HIBISCUS SABDARIFFA* L.)

Rafael Rojas Rojas, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2017.

## RESUMEN

Con la finalidad de estudiar la genética de la resistencia a *Phytophthora parasitica* de variedades de jamaica provenientes de los estados de Nayarit, Guerrero, Colima y Puebla, se desarrolló la presente investigación, la cual se dividió en tres etapas. La primera comprendió la evaluación de la resistencia de 51 variedades de jamaica al patógeno, en campo e invernadero. La segunda fue un análisis de medias generacionales para determinar los parámetros genéticos de la resistencia en 14 cruces. En la tercera se analizó con marcadores moleculares ISSR la variabilidad de los genotipos medianamente resistentes y resistentes. En la primera etapa se detectó una gran variación en la severidad a *P. parasitica*, observándose diferenciación de las variedades, de esta forma Criolla supere precoz mostró la mayor resistencia en campo mientras que en invernadero UAN 8 y UAN 25 fueron las más resistentes. La distribución de la severidad infiere una resistencia poligénica. En la segunda etapa, el análisis de medias generacionales mostró que los efectos aditivos fueron más importantes que los efectos de dominancia. La heredabilidad para resistencia tuvo un valor de 37 % y el avance genético fue 0.96 y 0.74 con una intensidad de selección de 1 % y 5 % respectivamente. Los parámetros de variabilidad genética indicaron 72 % de loci polimórficos, un promedio de 48 a 92 %. Los iniciadores fueron capaces de diferenciar cada uno de los genotipos así como encontrar diferencias entre genotipos. Los resultados muestran que en general los marcadores ISSR tuvieron capacidad de separar los genotipos en susceptibles, tolerantes y resistentes. El dendograma obtenido muestra agrupaciones diferentes de los genotipos.

**Plabras clave:** severidad, variedades criollas, variabilidad, heredabilidad.

# GENETICS OF RESISTANCE TO *PHYTOPHTHORA PARASITICA* DASTUR IN ROSELLE (*HIBISCUS SABDARIFFA* L.)

Rafael Rojas Rojas, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2017.

## ABSTRACT

In order to study the genetics resistance to *Phytophthora parasitica* Dastur of varieties of roselle from the states of Nayarit, Guerrero, Colima and Puebla, the present research was developed, that consists of three stages. The first included the evaluation of the resistance of 51 roselle varieties to the pathogen in two different conditions, in field and in greenhouse. The second consisted of a generational means analysis to determine the genetic parameters of resistance in 14 crosses. In the third stage, the variability of the moderately resistant and resistant genotypes was studied with ISSR molecular markers. As results, in the first stage, a great variation in the severity of *P. parasitica* was detected, being observed differentiation of the varieties of following form: Criolla precoz showed the highest resistance in the field, whereas in greenhouse varieties UAN 8 and UAN 25 were the most resistant. The distribution of severity suggests a polygenic resistance. In the second stage, the analysis of generational averages showed that the additive effects were more important than the dominance effects. The inheritance for resistance had a value of 37% and the genetic advance was 0.96 and 0.74 with a selection intensity of 1% and 5%, respectively. The parameters of genetic variability indicated 72% of polymorphic loci, an average of 48 to 92%. The primers were able to differentiate each of the genotypes as well as to show differences between genotypes. The results show that in general the ISSR markers were able to separate the genotypes into sensitive, tolerant and resistant. The obtained dendogram shows different groupings of the genotypes.

**Key words:** Severity, native varieties, variability, heritability.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado para realizar mis estudios de Doctorado.

Al Colegio de Postgraduados, en especial al programa de Fitopatología por brindarme la formación, el espacio y la oportunidad para realizar mis estudios de Doctorado.

Al Dr. Carlos De León García de Alba por su apoyo, confianza y tiempo para la realización de este trabajo, y por compartirme su gran experiencia en el mejoramiento genético.

Al Dr. Víctor Heber Aguilar Rincón por todo el tiempo para la planeación del trabajo y sugerencias para el mejoramiento de mi trabajo.

Al Dr. Javier Hernández Morales por su apoyo.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma por compartir su experiencia, todo su interés, apoyo y orientación en el análisis molecular.

Al Dr. Ciro Velasco Cruz, por toda su ayuda y disposición en los análisis estadísticos por llevar a buen término la presente investigación.

Al Dr. Pandey Shivaji por su apoyo y sugerencias en la realización de los análisis genéticos de la presente investigación.

A todos mis compañeros y amigos por haber compartido tiempo juntos.

A todos los trabajadores que estuvieron disponibles para ayudarme en la fase de invernadero y laboratorio.

## DEDICATORIA

**A dios** por darme la vida y permitirme alcanzar esta meta.

**A mis padres**, Miguel y Bertha, por otorgarme su amor, su respaldo y valiosas enseñanzas.

**A mis hermanos** por siempre estar al pendiente de mí, por su amistad.

**A mi esposa** y a mis hijos Rafa y Mateo.

## FINANCIAMIENTO

Los recursos para esta investigación fueron aportados por el proyecto:

**“Validación de variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) con alta concentración de bioactivos, alto rendimiento y tolerantes a enfermedades, determinación de plagas y enfermedades e innovación de la maquinaria agrícola para una producción sustentable”.** Fondo sectorial SAGARPA-CONACYT con clave-163972.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	iii
ABSTRACT .....	iv
LISTA DE CUADROS .....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xii
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
OBJETIVOS.....	4
HIPÓTESIS.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Hospedante .....	5
El género <i>Phytophthora</i> spp. ....	6
Agente causal.....	7
Clasificación taxonómica de <i>Phytophthora parasitica</i> .....	8
Síntomas de la infección por <i>Phytophthora parasitica</i> en jamaica.....	9
Ciclo biológico.....	9
Factores de patogenicidad.....	11
Factores que determinan el crecimiento del patógeno. ....	12
Control de <i>Phytophthora</i> spp. en los cultivos.....	12
Control biológico .....	12
Control genético .....	13
Control químico .....	14
Genética de la jamaica .....	14
Resistencia genética a <i>Phytophthora parasitica</i> en otras especies .....	15
Marcadores moleculares ISSR .....	15
LITERATURA CITADA.....	17
CAPÍTULO I. RESPUESTA DE VARIEDADES CRIOLLAS DE JAMAICA ( <i>HIBISCUS SABDARIFFA</i> L.) A LA INFECCIÓN POR <i>PHYTOPHTHORA</i> <i>PARASITICA</i> DASTUR EN MÉXICO. ....	24
RESUMEN.....	24

ABSTRACT.....	24
1.1 INTRODUCCIÓN .....	25
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
1.2.1 Material vegetal. ....	27
1.2.2 Evaluación de la resistencia en campo.....	28
1.2.3. Evaluación de la resistencia en invernadero.....	29
1.2.4 Determinación de concentración de inóculo. ....	30
1.2.5 Método de inoculación en plántula para evaluar la resistencia.....	30
1.2.6 Área bajo la curva del progreso de la enfermedad. ....	31
1.2.7 Distribución de la severidad (DS). ....	31
1.2.8 Índice de daño en plántula.....	31
1.2.9 Análisis estadístico. ....	32
1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
1.3.1 Respuesta a la infección de <i>P. parasitica</i> en campo.....	32
1.3.2 Respuesta a la infección de <i>P. parasitica</i> en invernadero. ....	35
1.3.2.1 Evaluación de la concentración de inóculo. ....	37
1.3.2.2 Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE). ....	37
1.3.2.3 Distribución de la severidad. ....	37
1.3.2.4 Índice de daño en plántula. ....	38
1.3.3 Respuesta en campo vs invernadero.....	39
1.4 CONCLUSIONES.....	40
1.5 LITERATURA CITADA.....	41
CAPÍTULO II. HERENCIA DE LA RESISTENCIA A <i>PHYTOPHTHORA</i>	
<i>PARASITICA</i> DASTUR EN JAMAICA ( <i>HIBISCUS SABDARIFFA</i> L.) .....	
RESUMEN.....	44
ABSTRACT.....	44
2.1 INTRODUCCIÓN.....	45
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
2.2.1 Material vegetal.....	47
2.2.2 Obtención de las generaciones.....	47

2.2.3 Fuente de inóculo.....	49
2.2.4 Preparación de inóculo.....	49
2.2.5 Ensayo de la resistencia. ....	50
2.2.7 Análisis estadístico y genético. ....	51
2.2.8 Estimación de medias y comparaciones ortogonales.....	51
2.2.9 Estimacion de los parámetros genéticos.....	52
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	52
2.4 CONCLUSIONES .....	56
2.5 LITERATURA CITADA .....	56
CAPÍTULO III. VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A <i>PHYTOPHTHORA PARASITICA</i> DASTUR EN JAMAICA ( <i>HIBISCUS</i> <i>SABDARIFFA</i> L.) POR MARCADORES ISSR.....	60
3.1 INTRODUCCIÓN.....	61
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
3.2.1 Material vegetal.....	63
3.2.2 Inoculación de las plantas.....	64
3.2.3 Evaluación de la resistencia.....	65
3.2.4 Extracción de ADN.....	65
3.2.5 Cuantificación y calidad del ADN.....	65
3.2.6 Gel de agarosa.....	65
3.2.7 Análisis molecular.....	65
3.2.8 Análisis de segregación.....	66
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	68
3.4 CONCLUSIONES .....	74
3.5 BIBLIOGRAFÍA.....	75

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Variedades criollas evaluadas en el ensayo de resistencia en campo e invernadero.....	<b>27</b>
<b>Cuadro 2.</b> Respuesta a <i>Phytophthora parasitica</i> de 51 variedades de jamaica en etapa productiva en Tecoaapa, Guerrero 2012. ....	<b>33</b>
<b>Cuadro 3.</b> Respuesta a <i>Phytophthora parasitica</i> en plántulas de 51 variedades de jamaica en invernadero en Montecillo, Texcoco, 2014. ....	<b>36</b>
<b>Cuadro 4.</b> Nombre, respuesta y origen de las variedades de jamaica utilizadas como progenitores para el análisis de la resistencia a <i>P. parasitica</i> .....	<b>48</b>
<b>Cuadro 5.</b> Cruzas directas logradas para obtener la F1 y F2 para el análisis de la resistencia a <i>P. parasitica</i> .....	<b>49</b>
<b>Cuadro 6.</b> Modelo utilizado para el análisis de varianza de la severidad en cuatro generaciones de jamaica. ....	<b>52</b>
<b>Cuadro 7.</b> Medias generacionales de severidad en plántulas de jamaica inoculadas con <i>P. parasitica</i> .....	<b>53</b>
<b>Cuadro 8.</b> Componentes de la varianza para severidad en cuatro generaciones de plántulas de jamaica inoculadas con <i>P. parasitica</i> .....	<b>55</b>
<b>Cuadro 9.</b> Generación, nombre y respuesta de las variedades de jamaica evaluadas. ....	<b>63</b>
<b>Cuadro 10.</b> Iniciadores ISSR usados en el estudio de variabilidad de resistencia a <i>P. parasitica</i> .....	<b>66</b>
<b>Cuadro 11.</b> Polimorfismo producido por marcadores ISSR en jamaica.....	<b>68</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Producción mundial de jamaica (Plotto <i>et al.</i> , 2004; Correa, 2011).....	<b>2</b>
<b>Figura 2.</b> Producción nacional de jamaica (SIAP-SAGARPA, 2015). .....	<b>3</b>
<b>Figura 3.</b> Ciclo de vida de <i>Phytophthora parasitica</i> (Graham y Timmer, 1994). ...	<b>10</b>
<b>Figura 4.</b> Escala nominal arbitraria para evaluar la severidad en tallo en variedades de jamaica inoculadas con <i>P. parasitica</i> . .....	<b>28</b>
<b>Figura 5.</b> Agrupamiento de progenitores resistentes, susceptibles y su F1 de jamaica usando coeficiente Dice y el método UPGMA. ....	<b>70</b>
<b>Figura 6.</b> Agrupamiento de progenitores y F1 de jamaica usando coeficiente Dice y el método UPGMA. ....	<b>71</b>
<b>Figura 7.</b> Agrupamiento de F1 y F2 de cruzas de jamaica usando el coeficiente Dice y el método UPGMA. ....	<b>72</b>
<b>Figura 8.</b> Estructura genética obtenida por el programa STRUCTURE de 56 genotipos de jamaica analizados con marcadores ISSR (K=3). ....	<b>73</b>

## INTRODUCCIÓN GENERAL

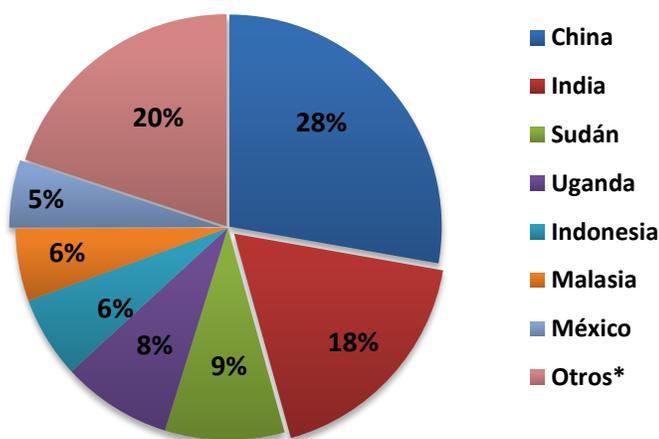
La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es una planta anual de la familia de las malváceas, originaria de África tropical. El género comprende 300 especies, incluyendo *Hibiscus sabdariffa*, *H. cannabinus*, *H. tiliaceus*, *H. surattensis*, *H. acetosella*, *H. physaloides*, *H. lunarifolius* y *H. scotellii*, la mitad originarias de África Central y Oriental y el resto de América, Asia y Australia (Falusi *et al.*, 2014). Se cultiva en regiones del Caribe, América Central, Hawaii, Florida, Filipinas, Brasil, India, África y Australia (Mahadevan *et al.*, 2009). El cáliz fresco (sépalos) que rodea al fruto (cápsula) es la parte comercialmente importante de este cultivo (Mohamed *et al.*, 2012). La jamaica se cultiva intercalada con otros cultivos como maíz (Hernández y Romero, 1990), sorgo y ajonjolí, o en los márgenes de los campos de cultivo (Mohamed, *et al.*, 2012). La floración es inducida con días cortos y reducción de la intensidad de luz. En México la floración inicia en Septiembre y continúa en Octubre. Las flores son diurnas y duran un solo día (Plotto *et al.*, 2004). *Hibiscus sabdariffa* es tetraploide ( $2n = 4x = 72$ ) y está relacionada con *Hibiscus cannabinus* ( $2n = 2x = 36$ ). Existen dos tipos botánicos, *Hibiscus sabdariffa* var. *sabdariffa* cultivada por sus cálices rojos e *Hibiscus sabdariffa* var. *altissima* por su floema fibroso (Mohamed *et al.*, 2012).

Los cálices deshidratados se usan para preparar bebidas tanto frías como calientes. Según la variedad los cálices pueden ser de color verde, rojo o rojo oscuro. Los cálices verdes se usan para elaborar guisados mientras que los cálices rojos y rojo oscuros se usan en la elaboración de bebidas, jaleas, jugos, vinos, conservas e infusiones (Atta *et al.*, 2013).

La jamaica posee propiedades medicinales, es antiséptica, ayuda a controlar la hipertensión arterial, y también se usa para prevenir enfermedades hepáticas (Bakasso *et al.*, 2014; Salah *et al.*, 2002). Amin *et al.*, (2008) mencionan que contiene nueve veces más vitamina C que los

cítricos. Las semillas tienen un contenido que va de 17.8 % a 21% de aceite no comestible y 20 % de proteína que se puede usar para alimentar animales (Mohamed *et al.*, 2012).

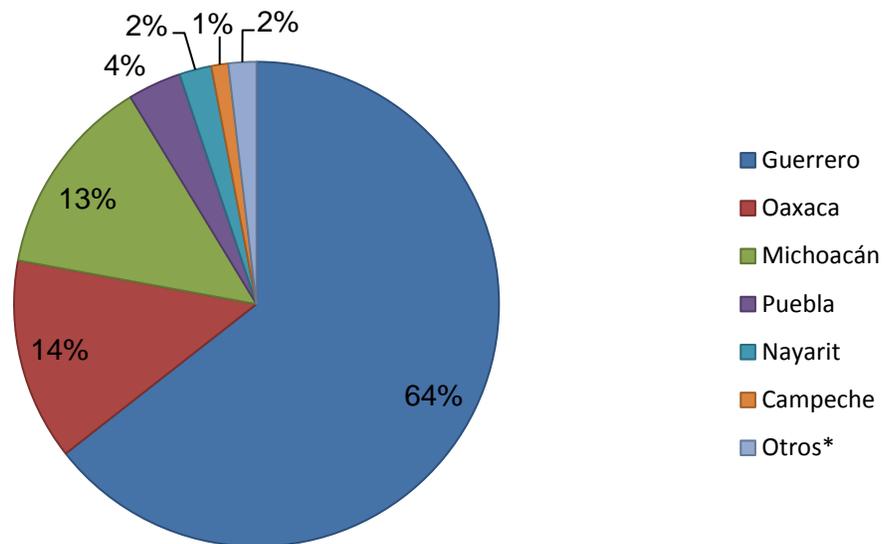
La producción mundial de jamaica se estima en 97 975 toneladas. China es el principal productor, seguido por India, Sudán, Uganda, Indonesia y Malasia (Plotto *et al.*, 2004). México ocupa el séptimo lugar en producción. Otros países productores son Egipto, Senegal, Tanzania, Malí y Jamaica, que al igual que México, su producción se queda para abasto local. Alemania y Estados Unidos son los principales países importadores (Correa, 2011)(Figura 1).



\* Egipto, Senegal, Tanzania, Malí y Jamaica

**Figura 1.** Producción mundial de jamaica (Plotto *et al.*, 2004; Correa, 2011).

En México se cultivan 19 900 ha, con una producción de 6 804 ton, siendo el estado de Guerrero el principal productor con una superficie de 14 067 ha, un rendimiento de 320 Kg ha<sup>-1</sup> y una producción de 4 434 ton, seguido por Oaxaca, Michoacán y Puebla con una producción de 927 ton, 923 ton y 245 ton, respectivamente (Figura 2) (SIAP-SAGARPA, 2015).



\* Morelos, Colima, Jalisco, Edo de México y Tamaulipas

**Figura 2.** Producción nacional de jamaica (SIAP-SAGARPA, 2015).

En Guerrero, los principales municipios productores son Ayutla de los Libres, Tecoaapa, San Luis Acatlán, Acapulco de Juaréz y San Marcos, que componen el 85 % de la producción del estado (SIAP-SAGARPA, 2015).

La jamaica es susceptible al daño de varios insectos (Pérez *et al.*, 2005) y enfermedades. A nivel mundial las enfermedades que limitan su producción incluyen manchas foliares que demeritan la calidad de los cálices, y que son causadas por *Cercospora hibisci* Tracy y Earley, *Rhizotocnia solani* Kuhn, y la pudrición del tallo causado por *Phytophthora parasitica* Dastur (Sin. *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan)(Amusa *et al.*, 2005). En Estados Unidos, se reportan patógenos frecuentemente asociados a marchitamiento y enfermedades de la raíz como *Fusarium oxysporum* Schlecht, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Fusarium equisetii* (Corda) Sacc. (Ploetz, 2007). En Egipto, se encontró que las principales enfermedades en este cultivo son causadas por *Fusarium oxysporum* y *Macrophomina phaseolina* seguida por *Fusarium solani* (Hassan *et al.*, 2014). En México, se ha reportado la presencia de la

enfermedad conocida por los productores como “pata prieta de la jamaica” ocasionada por *Phytophthora parasitica* Dastur, principalmente en los estados de Guerrero, Tabasco, Michoacán, Oaxaca y Colima, en selecciones locales de jamaica (Hernández-Morales et al., 2009; Murillo-De La Rosa, 2007). En el estado de Guerrero, Escalante (1989) reporta pérdidas de producción por esta enfermedad de entre 10% - 30%. Los síntomas típicos que se observan en plantas con la pata prieta son amarillamiento, necrosis en la base del tallo, marchitez de las hojas y muerte prematura de la planta. Una aportación importante encaminada a la caracterización de la enfermedad la dan Escalante et al., 2001, quienes encontraron que en condiciones de invernadero existen diferencias en la virulencia de cepas provenientes de las regiones productoras de jamaica que incluyen a Ayutla de los Libres, Tecoaapa y Tierra Roja, en el Estado de Guerrero.

## **OBJETIVOS**

Evaluar la resistencia genética a *Phytophthora parasitica* en jamaica (*Hibiscus sabdariffa*).

Calcular la herencia de la resistencia a *Phytophthora parasitica* en jamaica.

Conocer la variabilidad de la resistencia genética en jamaica con marcadores moleculares ISSR.

## **HIPÓTESIS**

Existe variación genética en jamaica en colecciones que muestran severidad variable a *Phytophthora parasitica*.

La herencia de la resistencia genética debido a efectos dominantes

Existen marcadores moleculares de ADN que permiten diferenciar variedades con distinto nivel de resistencia.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Hospedante

La jamaica es una planta anual erecta de hasta 1.5 m. de alto. Hojas alternadas, marcadamente lobuladas (de 5 a 7), anchas en la base de las nervaduras y suaves al tacto. Las flores son actinomorfas, bisexuales, con cáliz y corola pentámero carpelar, estambres monadelfos y corola grande de color amarillo con centro oscuro. Estigma lobulado y anteras no pedunculadas apoyadas sobre el estigma antes de la antesis (Akpan, 2000).

*Hibiscus* es el género tipo de la tribu *Hibisceae* que comprende cerca de 300 especies (Akpan, 2000). Las especies *Hibiscus cannabinus* L. e *Hibiscus sabdariffa* L. conforman una gran serie aloploide al incluir especies desde diploides hasta decaploides con número básico  $x=18$  de cromosomas.

Las especies tetraploides de *Hibiscus* sección *Furcaria* (*H. acetosella* y *H. radiatus*) tienen una constitución genómica AABB. La evolución de aloploidia en la sección *Furcaria* está asociada a mutaciones de secuencias repetidas ocasionando alta variación en el genoma tetraploide. Estudios de diversidad genética con marcadores, ISSR y SSR, indican una asociación de genoma diploide y alta variabilidad de genomas tetraploides por lo que la evolución de tetraploides AABB en la sección *furcaria* se produjo por la hibridación del genoma A y B (Satya *et al.*, 2012).

Estudios citológicos sugieren que el origen de la jamaica está en África, debido a que allí se han encontrado 9 de las 10 especies diploides conocidas, además de la gran homología de genomas de especies sudamericanas, africanas, indias y australianas, lo que además sugiere que

los genomas de esta sección se pudieron haber originado mucho antes, en el supercontinente Gondwana antes de su fragmentación (Areces, 2005).

Según Wester (1911), la primera referencia acompañada de un grabado de la planta se publicó en *Stirpivm*, historia del botánico flamenco M. de L'Obel (1576). Esta especie fue llevada de la India hacia Europa Occidental por los Musulmanes, que invadieron varios siglos la India. Por esto es que conocida primeramente con el nombre de "Sabdariffa", una palabra Turca de acuerdo a Drury (1858). Según Vaidya (2000), la jamaica fue traída de África a América por los esclavos. En México, Francisco Hernández asocia una planta llamada "Quauhxocotl" documentada en *Nova Plantarum Animal et Mineralium Mexicanorum Historia* y señala la similitud con Alce Americana (*Hibiscus sabdariffa*), encontrada en España (Wester, 1911).

### **El género *Phytophthora* spp.**

Las especies de *Phytophthora* son consideradas hemibiotróficas pero difieren en el rango de hospederos; así, *P. Infestans* y *P. sojae* son patógenos especializados, infectan pocos hospederos, mientras otros como *Phytophthora parasitica* puede infectar más de 60 familias de plantas (Erwin y Riveiro, 1996). Los síntomas característicos son ahogamiento, pudrición radical y gomosis en cítricos, pierna negra del tabaco, necrosis de la vaina y granos en frijol, pudrición radicular en ajonjolí, jamaica y fresa, además producen pudrición de frutos en tomate y berenjena (Estrada *et al.*, 2007).

Los oomicetos colonizan el hospedero al reprogramar los mecanismos de defensa en la célula, por medio de un ajuste de proteínas efectoras que pueden ser de dos tipos de acuerdo al sitio de infección: efectores apoplásticos que son secretados en el espacio extracelular de la planta y que interactúan con blancos extracelulares, y otros que son receptores de

superficie (Kamoun, 2006). Hass *et al.*, (2009) mencionan que estas proteínas pueden ser enzimas hidrolíticas como proteasas, lipasas y glicosilasas y efectores citoplasmáticos. Estos son transportados dentro de la célula a través de estructuras especializadas como vesículas o haustorios que se invaginan dentro de la célula del hospedero.

Shan *et al.* (2004) mencionan que el tamaño del genoma de *P. parasitica* es de 95.5 Mb (Megabase), y es similar a *P. sojae* que se estima en 90-95 Mb. Asimismo, Attard *et al.* (2008) señalan las diferencia entre *P. ramorum* y *P. infestans* con tamaño de genomas de 65 y 240 Mb, respectivamente. Hass *et al.* (2009), al secuenciar y comparar el genoma de *P. Infestans*, sugieren que la diferencia en el tamaño de las especies anteriores se debe a un cambio rápido y una expansión de familias de proteínas efectoras que incluyen genes involucrados en la infección o que poseen actividad para alterar la fisiología del hospedero. Estos genes están localizados en regiones altamente dinámicas y expandidas en el genoma de *P. infestans*.

### **Agente causal**

*Phytophthora parasitica* es un oomiceto que produce esporangios limoniformes, papilados y persistentes, de forma elipsoide, ovoide, obpiriforme a esféricos, ocasionalmente con dos papilas y producidos solos o en simpodios sueltos; el micelio es cenocítico con hifas sinuosas de grosor variable (Javier-Alva y Mattos, 2006).

La penetración de la epidermis de la raíz se realiza por medio del apresorio; sin embargo, se ha reportado penetración directa de la hifa en *P. sojae* a través del espacio intercelulares de la raíz (Attard *et al.*, 2010).

## **Clasificación taxonómica de *Phytophthora parasitica***

Los oomicetos se dividen en tres subclases: *Saprolegionietidae*, *Rhipiddiomycetidae* y *Peronosporomycetidae*. La mayoría de los oomicetos fitopatógenos pertenecen a dos órdenes de *Peronosporomycetidae*: *Peronosporales* y *Pythiales*. Asimismo, la mayoría de los oomicetos que infectan la raíz de las plantas son clasificados en la familia *Pythiaceae*, que incluye los géneros *Pythium* y *Phytophthora* (Erwin y Riveiro, 1996).

De acuerdo a Dastur (1913), la clasificación taxonómica de *Phytophthora parasitica* es:

**Reino:** *Stramenopila o chromista*

**División:** *Oomycota*

**Clase:** *Oomycetes*

**Orden:** *Pythiales*

**Familia:** *Pythiaceae*

**Género:** *Phytophthora*

**Especie:** *parasitica*

Kroon *et al.* (2012) dividieron el género *Phytophthora* en 10 grupos usando un análisis filogenético clasificando a *Phytophthora parasitica* en el grupo I, que comprende presencia de esporangios papilados y no papilados, y que entre sus parientes cercanos incluye a *P. infestans*. Existen tres divisiones en este grupo según la presencia de papilas (1a,1b), paraginous, semipapilados (1c) y anfigenous; *P. parasitica* es la única en el grupo 1 debido que no puede ser clasificada en alguna dentro de los subgrupos de acuerdo al análisis de secuencias, a pesar de tener anteridio anfígeno y esporangios papilados.

## **Síntomas de la infección por *Phytophthora parasitica* en jamaica**

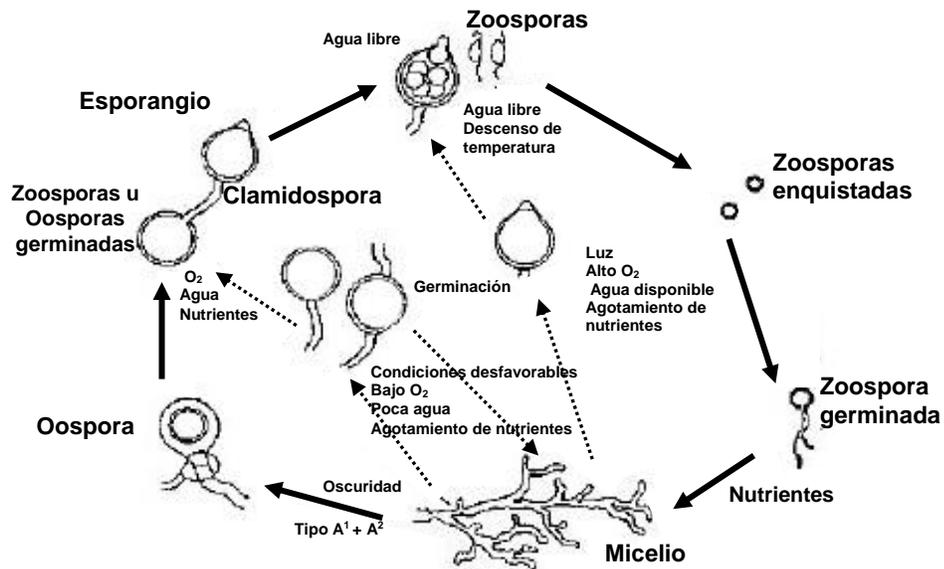
El principal síntoma de la enfermedad es necrosis de la parte basal del tallo que avanza hacia la parte superior provocando agrietamientos en la corteza. En la parte aérea se produce una clorosis general de las hojas, seguido por marchitez, defoliación y, cuando los daños son severos, ocasiona la muerte de la planta (Hernández-Morales, 1988).

Para Timmer y Menge (1988), la infección ocurre por medio de zoosporas liberadas de esporangios en las raíces infectadas. Las zoosporas son atraídas hacia las heridas o hacia la zona de elongación de la raíz apical por acción de exudados.

Las zoosporas enquistadas forman tubos germinativos que penetran la pared periclinal o la lámina media de las células epidérmicas (Widmer *et al.*, 1998). Cuando el patógeno ha logrado penetrar la raíz, la infección avanza por el córtex induciendo la necrosis del tejido.

## **Ciclo biológico**

*Phytophthora parasitica* produce clamidosporas y esporangios que liberan gran cantidad de zoosporas. La temperatura óptima para la germinación de las zoosporas enquistadas, germinación y formación de micelio es de 30-32 °C (Figura 3).



**Figura 3.** Ciclo de vida de *Phytophthora parasitica* (Graham y Timmer, 1994).

El ciclo sexual se caracteriza por la producción de esporangios que pueden germinar sobre agua o alguna otra superficie para generar el tubo germinativo (germinación directa) o puede diferenciarse por procesos de división citoplasmática para formar zoosporas uninucleadas y flageladas (germinación indirecta).

Las zoosporas liberadas buscan el tejido del hospedante, se anclan en la superficie vía adhesinas y se enquistan. Después, la zoospora germina y penetra el tejido directamente o por medio de apresorios (Van West *et al.*, 2003). La zoospora obtiene nutrientes del hospedante, las hifas se ramifican y forman una masa de hifas absorbentes que esporulan, repitiendo el ciclo de la enfermedad.

En el ciclo sexual, el oomiceto produce oosporas con pared celular gruesa adaptadas para sobrevivir al invierno y condiciones ambientales adversas. El proceso de oosporogénesis incluye la producción del oogonio y anteridio que crecen contiguos, ocasionando que el anteridio se fusione con

el oogonio. El anteridio es heterotálico y anfíginal (Erwin y Riveiro, 1996). La fertilización ocurre al vaciar el contenido del anteridio dentro del oogonio originando una oospora de pared interna gruesa (Van West *et al.*, 2003). Esta puede entrar en dormancia y sobrevivir en el suelo para después geminar y originar uno o varios tubos germinativos cuando las condiciones ambientales sean favorables. Los tubos germinativos forman esporangios y se repite el ciclo asexual del patógeno.

*Phytophthora* spp. sobrevive periodos desfavorables en el suelo al desarrollar estructuras de resistencia como clamidiosporas, oosporas, hifas o esporangios en raíces del hospedante (Timmer y Menge, 1988).

Los esporangios son multinucleados hasta que se inicia la citocinesis inducida por un choque con frío que induce la separación de los núcleos en cada zoospora.

El enquistamiento es un proceso rápido que involucra la separación de dos flagelos y la secreción de glicoproteínas y otras moléculas para formar la pared celular primaria. Durante el anclaje las zoosporas se orientan con la abertura ventral hacia la superficie de la raíz (Hardham y Gubler, 1990).

### **Factores de patogenicidad**

Los factores de patogenicidad aislados y estudiados en oomicetos consisten de enzimas degradadoras de la pared celular como endocelulasas, 1,3- $\beta$ -glucanasas,  $\beta$ -glucosidasas, cutinasas, pectina esterasas, galactanasas y endopoligalacturonasas (Van West *et al.*, 2003).

Las zoosporas localizan un sitio potencial para la penetración por aberturas naturales en la superficie. Existen dos mecanismos para la orientación: la taxi y la inmovilización inducida de la zoospora. Estos

mecanismos inducen una orientación con respecto a un gradiente químico, nutritivo, iónico, o eléctrico (Van West *et al.*, 2002).

Las plantas secretan enzimas capaces de degradar la pared celular del patógeno invasor. Estas enzimas son clasificadas como proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) porque la expresión es inducida durante la infección (Desiderio *et al.*, 1997).

### **Factores que determinan el crecimiento del patógeno.**

*Phytophthora* spp. crece activamente a temperaturas entre 10 °C y 35 °C, con un óptimo de 26 °C (Erwin y Ribeiro, 1996).

La humedad del suelo aumenta el proceso de infección debido a la rápida formación de esporangios y favorecer condiciones para liberar las zoosporas y su movilidad al sitio de infección. Los síntomas son más severos en suelos con drenaje deficiente y pH entre 6.0 y 6.5. Adicionalmente, alta o baja humedad puede aumentar la susceptibilidad a la infección (Zentmyer *et al.*, 1994; Erwin y Ribeiro, 1996).

### **Control de *Phytophthora* spp. en los cultivos.**

#### **Control biológico**

Existen reportes de control de enfermedades causadas por *Phytophthora* spp. utilizando microorganismos que suprimen el crecimiento del patógeno como *Trichoderma* sp., y *Bacillus* sp. (Papavizas, 1985), que controlan la enfermedad por mecanismos como antibiosis, lisis, competencia y micoparasitismo. Lioussanne *et al.* (2009) reportaron una reducción en la biomasa y colonización *in vitro* de *P. nicotianae* cuando se preinocularon raíces de tomate con *Glomus intraradices* o *Glomus mosseae*.

Smith *et al.* (1990) reportan aislamientos de *Trichoderma* sp. tolerantes a metalaxyl como parte del manejo integrado contra *Phytophthora* sp. en manzano, asimismo reportan actividad antagonista de *Gliocadium* spp. También, Li *et al.* (2012) encontraron 100% de antagonismo de *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *Paenibacillus pabuli*, *B. atrophaeus*, *B. subtilis*, *B. Pumilus* y *B. endophyticus* contra *P. parasitica* en plántulas de tabaco inoculadas.

### **Control genético**

Alconero y Stone (1969) reportan que las variedades de jamaica A59-57, A61-331 y THS-17 mostraron una respuesta resistente a *P. parasitica* con bajo porcentaje de la enfermedad (0.40-1.77 %) mientras que las variedades THS-44, THS-30, A60-234 y THS-2 fueron susceptibles con mayor porcentaje de la enfermedad (3.5-20 %).

Olunloyo y Andeji (1974) evaluaron la respuesta de 11 variedades de *H. sabdariffa* y 27 de *H. cannabinus* a tres aislamientos de *P. parasitica* y encontraron que THS 2 y THS 17 de *H. sabdariffa* y todas las *H. cannabinus* fueron resistentes. Sugiriendo que la cruce de genotipos resistentes de *H. sabdariffa* con susceptibles de *H. cannabinus* puede conferirle resistencia.

Boccas y Pellegrin (1976) encontraron seis variedades de *H. sabdariffa* (THS 2, THS 3, THS 22, THS 44, Thai Red y RCA) con resistencia poligénica a *P. parasitica*.

Majumder y Mandal (2000) evaluaron la respuesta de 58 genotipos de jamaica, 52 exóticos y 4 mejorados, más un control susceptible (HS 4288) y otro resistente (8434-8434-68 ) a *P. parasitica* durante tres años consecutivos y encontraron que el control resistente mostró resistencia mientras el susceptible presentó susceptibilidad intermedia. El genotipo EC-

153606 fue resistente, mientras seis fueron susceptibles y 49 moderadamente resistentes.

### **Control químico**

Debido a que la mayoría de los fungicidas utilizan como blanco la síntesis de esterol y quitina son ineficientes contra oomicetos (Attard *et al.*, 2008). Los oomicetos poseen características bioquímicas que los distinguen de los hongos verdaderos, incluyendo su pared celular compuesta principalmente de  $\beta$ -1, 3- y  $\beta$ -1, 6 glucano y celulosa ( $\beta$ -1, 4-glucano), además de quitina. Adicionalmente, son incapaces de sintetizar esteroides debido a la ausencia de las enzimas esqualeno epoxidasa y 14  $\alpha$ -demetilasa

Las medidas de manejo para *Phytophthora* spp. se enfocan en la aplicación de pesticidas como fenilamida, metalaxil y mefenoxam. Estos han sido usados para el control de pudrición de raíz y la corona, causadas por *Phytophthora nicotianae* y tienen actividad específica en la inhibición del crecimiento de micelio y esporulación de oomicetos al inhibir la síntesis de RNAr que interfiere con la actividad del complejo de la RNA polimerasa I (Hu y Li, 2014).

En el cultivo de jamaica se ha utilizado el tratamiento de semilla antes de la siembra con Agrosan 5 W a una dosis de 0.2 g por 100 g de semillas para inhibir la germinación de zoosporas (Olunloyo y Adenji, 1974), mientras que Hernández y Romero (1990) redujeron la incidencia de la enfermedad con aplicaciones de Metalaxil (28.35 g i. a.) a 75 % y 100 % en dosis de 900 ppm y 100 ppm, respectivamente.

### **Genética de la jamaica**

Wilson and Menzel (1967) reportaron la primera cruce interespecífica

entre kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) especie diploide ( $2n=36$ ) cultivada por su fibra, y jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) un tetraploide ( $2n=72$ ). Estos autores obtuvieron cinco híbridos de la polinización de 4 445 flores de kenaf y no obtuvieron híbridos de 2 655 cruzas recíprocas. Las progenies  $F_1$  fueron triploides con variación en el vigor y fueron alohexoploides (producto de la hibridación de dos especies).

Vaidya (2000) evaluó el porcentaje de cruzamiento de una variedad con cáliz rojos y otra con cálices verdes y encontró un cruzamiento de 0.20 a 0.68%.

### **Resistencia genética a *Phytophthora parasitica* en otras especies**

En estudios de resistencia a *P. parasitica* en otras especies, Van Jaarsveld *et al.* (2002) mencionan que en tabaco la fuente de resistencia genética a *Phytophthora nicotianae* (Sin. *P. parasitica*) es limitada e incluye la resistencia oligogénica a pierna negra de *Nicotiana tabacum* cv. 301, resistencia dominante y poligénica de *N. plumbaginifolia* y *Nicotiana longiflora* cv. Beinhart 1000-1, y el cv. Coker 371-Gold. Existen cuatro razas de *P. parasitica* reportadas en tabaco (razas 0, 1, 2 y 3). La raza 0 se caracteriza por ser no fitopatógena en *Nicotiana plumbaginifolia* mientras que la raza 1 es patogénica. En tabaco, la resistencia a la Raza 0 es controlada por un solo gen dominante. La raza 2 se reportó en Sudáfrica por la reacción diferencial con tabaco cv. Delerest 202 resistente a la raza 2 pero susceptible a las razas 0 y 1. La raza 3 puede superar la resistencia en *Nicotiana tabacum* cv. Florida 301 tolerante a bajas temperaturas (Antonopoulos *et al.*, 2010).

### **Marcadores moleculares ISSR**

Son marcadores dominantes que involucran la amplificación PCR de ADN al usar un iniciador compuesto de secuencias que se fijan en regiones

microsatélites abundantes del genoma de eucariontes. El análisis de ISSR se ha utilizado para evaluar la diversidad genética en maíz, identificar variedades de crisantemo, oleaginosas y cítricos (Huang y Sun, 2000), debido a que ésta técnica permite la amplificación del ADN genómico y provee información de muchos loci simultáneamente (Ratnaparkhe *et al.*, 1998).

Los marcadores de Inter Secuencia Simple Repetidas (ISSR) son secuencias intermedias flanqueadas por dos SSR invertidas (secuencias simples repetidas) de la misma unidad, basadas en secuencias repetidas de dinucleótidos, tetranucleótidos o pentanucleótidos y nucleótidos anclado (Wang *et al.*, 2009). El método de ISSR-PCR es amplificado por un solo iniciador generando patrones multilocus que son altamente reproducibles, abundantes y polimórficos. Los marcadores ISSR se usan para la detección de híbridos interespecíficos, evaluar el potencial de hibridación e interpretar la diversidad filogenética (Satya, 2012).

La amplitud del polimorfismo varía de acuerdo a la naturaleza (no anclados, 3'-anclados o 5'-anclados) y la secuencia de las repeticiones (motivos) en el iniciador utilizado. Cuando un iniciador no anclado, tiende a deslizarse en las unidades repetidas durante la amplificación produce un barrido en lugar de bandas. Extender el iniciador (anclado) con 1 a 4 nucleótidos degenerados en el extremo 3' o 5' asegura el alineamiento sólo al final del microsatélite en el ADN molde (Satya, 2012).

Los marcadores moleculares ligados a caracteres agronómicos contribuyen a la selección asistida por marcadores. En arroz (*Oryza sativa* L.), el marcador ISSR generado por el iniciador (AG)<sub>8</sub> YC es utilizado como marcador para identificar el gen restaurador de la fertilidad. Mientras que en chícharo (*Pisum sativum* L.), los marcadores UBC-855<sub>500</sub> generado por el iniciador (AG)<sub>8</sub> YT y el UBC-825<sub>1200</sub> usando el iniciador (AG)<sub>8</sub> T fueron ligados

al gen que confiere resistencia a *Fusarium oxisporum* f. sp. *ciceris* raza 4 (Ratnaparkhe *et al.*, 1998).

## LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 1998. Plant pathology. 4<sup>th</sup> edition. Academic Press. New York, USA. 940 p.
- Akpan, G. A. 2000. Cytogenetic characteristics and the breeding system in six *Hibiscus* species. *Theor. Appl. Genet.* 100: 315-318.
- Alconero, R., and Stone, E. 1969. *Phytophthora nicotianae* in roselle and kenaf in Puerto Rico. *Plant Dis. Repr* 53: 702-705.
- Amin, I., Hainida, E. K. I., and Halimatul, S. M. N. 2008. Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seeds-national composition, protein quality and health benefits. *Foods* 2: 1-16.
- Amusa, N. A., Adegbite, A. A., and Oladapo, M. O. 2005. Vascular wilt of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) in the humid forest region of South-Western Nigeria. *Plant Pathol. J.* 4: 122-125.
- Antonopoulos, D. F., Melton, T., and Mila, A. L. 2010. Effects of chemical control, cultivar resistance, and structure of cultivar root system on black shank incidence of tobacco. *Plant disease* 12: 613-620.
- Areces, B. F. 2005. Las especies cubanas de *Hibiscus* sección Furcaria (*Malvaceae*). *Rev. Jardín Bot. Nal.* 25-26: 25-33.
- Atta, S, B. Sarr, Diallo, A. B., Bakasso, Y., Lona, I., and Saadou, M. 2013. Nutrients composition of calyces and seeds of three roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) ecotypes from Niger. *African J. Biotech.* 12: 4174-4178.
- Attard, A., Gourgues, M., Callemeyn-Torre, N., and Keller, H. 2010. The immediate activation of defense responses in *Arabidopsis* roots is not sufficient to prevent *Phytophthora parasitica* infection. *New Phytol.* 187: 449-60.
- Attard, A., Gourgues, M., Galiana, E., Panabieres, F., Ponchet, M., and Keller, H. 2008. Strategies of attack and defense in plant-oomycete

- interactions, accentuated for *Phytophthora parasitica* Dastur (syn. *P. nicotianae* Breda de Haan). J. Plant Physiol. 165: 83-94.
- Bakasso, Y., Zaman-Allah, M., Mariac, C., Billot, C., Vigouroux, Y., Zongo, J., and Saadou, M. 2014. Genetic diversity and population structure in a collection of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) from Niger. Plant Genetic Resources 12: 207-214.
- Boccas, B., and Pellegrin, F. 1976. Evaluation de la résistance de quelques varieties de roselle au *Phytophthora parasitica* Dast. Cotton Fibres Trop. 31: 231-234.
- Correa, S. E., Ortiz, G. C. F., Torres, de la C. M., Bautista, M. C. del C., Muñoz, C. M. del C. Rivera, y Lagunes, E. L. del C. 2011. Etiología de la mancha acuosa de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) en Tabasco, México. Rev. Mex. Fitopatol. 29: 165-167.
- Dastur, J. F. 1913. On *Phytophthora parasitica* nov. sp. A new disease of the castor oil plant. Mem. Dept. Agric. India Bot. 5: 177-231.
- Desiderio, A., Aracri, B., Leckie, F., Mattei, B., Salvi, G., Tigelaar, H., Van Roekel, J. S., Baulcombe, D. C., Melchers, L. S., De Lorenzo, G., and Cervone, F. 1997. Polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) with different specificities are expressed in *Phaseolus vulgaris*. Mol. plant-microbe interact. 10: 852-860.
- Drury, H. Useful plants of India 252. 1858.
- Erwin, D. C., and Ribeiro, O. X. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press, St. Paul, MN., USA. 562 p.
- Escalante, E. Y. I. 1989. Distribución de la enfermedad llamada “pata prieta” de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en un cultivo de Ayutla, Guerrero. Memorias del XVI Cong. Nal. Sociedad Mex. de Fitopatol. Montecillo, Méx. Resumen 39.
- Escalante, E. Y. I., Osada, K. S., y Escalante, E. J. A. 2001. Variabilidad patogénica de *Phytophthora parasitica* Dastur en jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). Rev. Mex. Fitopatol. 19: 84-89.

- Graham, I. H., and Timmer, L. W. 1994. *Phytophthora* diseases of citrus. Florida Coop. Ext. Serv., Univ. Florida, USA. 155 p.
- Haas, B., J. S. Kamoun, M. C. Zody, R. H. Jiang, R. E. Handsaker, L. M. Cano, M. Grabherr, C. D. Kodira, S. Raffaele, T. Torto-Alalibo, T. O. Bozkurt, A. M. V. Ah-Fong, L. Alvarado, V. L. Anderson, M. R. Armstrong, A. Avrova, L. Baxter, J. Beynon, P. C. Boevink, S. R. Bollmann, J. I. B. Bos, V. Bulone, G. Cai, C. Cakir, J. C. Carrington, M. Chawner, L. Conti, S. Costanzo, R. Ewan, N. Fahlgren, M. A. Fischbach, J. Fugelstad, E. M. Gilroy, S. Gnerre, P. J. Green, L. J. Grenville-Briggs, J. Griffith, N. J. Grünwald, K. Horn, N. R. Horner, C.-H. Hu, E. Huitema, D.-H. Jeong, A. M. E. Jones, J. D. G. Jones, R. W. Jones, E. K. Karlsson, S. G. Kunjeti, K. Lamour, Z. Liu, L. Ma., D. MacLean, M. C. Chibucos, H. McDonald, J. McWalters, H. J. G. Meijer, W. Morgan, P. F. Morris, C. A. Munro, K. O'Neill, M. Ospina-Giraldo, A. Pinzón, L. Pritchard, B. Ramsahoye, Q. Ren, S. Restrepo, S. Roy, A. Sadanandom, A. Savidor, S. Schornack, D. C. Schwartz, U. D. Schumann, B. Schwessinger, L. Seyer, T. Sharpe, C. Silvar, J. Song, D. J. Studholme, S. Sykes, M. Thines, P. J. I. van de Vondervoort, V. Phuntumart, S. Wawra, R. Weide, J. Win, C. Young, S. Zhou, W. Fry, B. C. Meyers, P. v. West7, J. Ristaino, F. Govers, P. R. J. Birch, S. C. Whisson, H. S. Judelson and Nusbaum, C. 2009. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* 461: 393-398.
- Hardham, A. R., and Gubler, F. 1990. Polarity of attachment of zoospores of a root pathogen and pre-alignment of the emerging germ tube. *Cell Biology International Reports* 14: 947-956.
- Hassan, N., M. Shimizu, and Hyakumachi, M. 2014. Occurrence of root rot and vascular wilt diseases in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in upper Egypt. *Mycobiology* 42: 66-72.
- Hernández-Morales, J. 1988. Estudio de la interacción entre *Phytophthora parasitica* Dastur y *Meloidogyne* sp. en la "pata prieta" de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) e histología de ambos patógenos. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Méx. 74 p.
- Hernández, M. J. y Romero, C. S. 1990. Identificación del agente causal de "pata prieta de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)" y prueba de fungicidas para su control bajo condiciones de invernadero. *Rev. Chapingo* 67-68: 50-54.

- Hernández-Morales, J., Gonzáles-Santín, L. L., Ayala-Escobar, V., Leyva-Mir, S., G. 2009. Etiología de la “pata prieta” de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México. pp 69-70. *En*: XI Cong. Internacional/XXXVI Cong. Nal. Fitopatol. 19-24 julio, 2009. Acapulco, Gro.
- Huang, J. C., and Sun, M. 2000. Genetic diversity and relationships of sweetpotato and its wild relatives in *Ipomoea* series Batatas (*Convolvulaceae*) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1050-1060.
- Hu, J., and Li, Y. 2014. Inheritance of mefenoxam resistance in *Phytophthora nicotianae* populations from a plant nursery. *Europ. J. Plant Pathol.* 139: 545-555.
- Falusi, O. A., Dangana, M. C., Daudu, O. A. Y., Oluwajobi, A. O., Abejide, D. R., and Abubakar, A. 2014. Evaluation of some roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) germplasm in Nigeria. *Int. J. Biotechnol. Food Sci.* 2: 16-20
- Javier-Alva, J. y Mattos, L. 2006. Nuevo método para aislar *Phytophthora parasitica* Dastur de raicillas de limonero patrón rugoso *Citrus jambhiri* Lush. bajo riego por aspersión. *Universalia* 11: 23-35.
- Kamoun, S. 2006. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 41-60.
- Kroon, L. P., Brouwer, H., De Cock, A. W., and Govers, F. 2012. The genus *Phytophthora* anno 2012. *Phytopathology* 102: 348-364.
- Li, W., Chen, Q., Huang, Y., Li, K., Xia, H., Wang, M., Cai, L., Shang, S., and Shi, J. 2012. A rapid microbioassay for discovery of antagonism bacteria for *Phytophthora parasitica* var *nicotianae*. *Phytopathology* 102: 267-271.
- Lioussanne, L., Jolicoeur, M., and Arnaud, M. St. 2009. Role of the modification in root exudation induced by arbuscular mycorrhizal

- colonization on the intraradical growth of *Phytophthora nicotianae* in tomato. *Mycorrhiza* 19: 443-448.
- L`Obel, M. de. 1576. *Plantarum, sev Stirpivm historia*. 671,457-471, 15, 24.
- Mahadevan, N., Shivaly, P. O. E., and Kamboj, P. 2009. *Hibiscus sabdariffa* Linn: An overview. *Nat. Prod. Radiance* 8: 73-83.
- Majumder, M., and Mandal, M. 2000. Screening of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) genotypes for field resistance to foot and stem rot caused by *Phytophthora parasitica* Dastur. *Indian Agricult.* 44: 75-78.
- Mohamed, B. B., Sulaiman, A. A., and Dahab, A. A. 2012. Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Sudan, cultivation and their uses. *Bull. Environ. Pharmacol. Life Sci.* 1: 48-54.
- Murillo-De la Rosa, A. 2007. Diagnóstico e identificación de enfermedades del cultivo de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en la region Chontalpa, Tabasco. Tesis de licenciatura. Univ. Pop. de la Chontalpa, Cárdenas, Tab. México. 61 p.
- Olunloyo, O. A., and Andeji, M. O. 1974. Relative susceptibility of roselle an kenaf to three isolates of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (Breda De Haan) Tucker. *Nigeria Agric. J.* 11: 66-70.
- Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.* 23: 23-54.
- Pérez, T. B. C., Aragón, G. A., Bautista, M. N., Tapia, R., A. M., y 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: 239-247.
- Ploetz, R. C., Palmateer, A. J., Geiser, D. M., and Juba, J. H. 2007. First report of *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* on roselle in the United States. *Plant Dis.* 91: 639.
- Plotto, A., Mazaud, F., Röttger, A., and Steffel, K. 2004. *Hibiscus*: Post-production management for improved market access organization: Food and Agric. Org. of the United Nations (FAO), August. 19 p.

- Ratnaparkhe, M. B., Tekeoglu, M. and Muehlbauer, F. J. 1998. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theor. Appl. Genet.* 97: 515-519.
- Salah, A. M., Gathumbi, J., and Vierling, W. 2002. Inhibition of intestinal motility by methanol extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae) in rats. *Phytotherapy Res.* 16: 283-285.
- Satya, P., Karan, M., Sarkar, D., and Sinha, M. K. 2012. Genome synteny and evolution of AABB allotetraploids in *Hibiscus* section *Furcaria* revealed by interspecific hybridization, ISSR and SSR markers. *Plant Syst. Evol.* 298: 1257-1270.
- Shan, W., and Hardham, A. R. 2004. Construction of a bacterial artificial chromosome library, determination of genome size, and characterization of an *Hsp70* gene family in *Phytophthora nicotianae*. *Fungal Genet. Biol.* 41: 369-80.
- SIAP-SAGARPA. 2015. Servicio de información agroalimentaria y pesquera Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <http://www.gob.mx/siap/index> (Consulta, marzo 2017).
- Smith, V. L., Wilcox, W. F., and Harman, G. E. 1990. Potential for biological control of *Phytophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocadium* spp. *Phytopathology* 80: 880-885.
- Timmer, L. W., and Menge, J. A. 1988. *Phytophthora*-induced diseases, p. 22-25, *In*: Compendium of citrus diseases. Whiteside, J. O., Garnsey, S. M., and Timmer, L. W. (Ed.). APS Press, MN., USA.
- Tuite, J. 1969. Plant pathological methods-fungi and bacteria. Burgess Publ. Co., Minneapolis, MN. 239 p.
- Vaidya, K. R. 2000. Natural cross-pollination in roselle, *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae). *Genet. Mol. Biol.* 23: 667-669.
- Van Jaarsveld, E., Wingfield, M. J., and Drenth, A. 2002. Evaluation of tobacco cultivars for resistance to races of *Phytophthora nicotianae* in South Africa. *J. Phytopathology* 150: 456-462.

- Van West, P., Appiah, A. A., and Gow, N. A. R. 2003. Advances in research on oomycete root pathogens. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 62: 99-113.
- Van West, P., Morris, B. M., Reid, B., Appiah, A. A., Osborne, M. C., Campbell, T. A., Shepherd, S. J., and Gow, N.A.R. 2002. Oomycete plant pathogens use electric fields to target roots. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 15: 790-798.
- Walker, J. C. H. 1957. *Plant Pathology*. 2nd. Ed. McGraw-Hill Book Co., Inc. USA. 707 p.
- Wester, P. J. 1911. Contributions to the History and Bibliography of the Roselle. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 38: 91-98.
- Widmer, T. L. Graham, J. H, and Mitchell, D. J. 1998. Histological comparison of fibrous root infection of disease-tolerant and susceptible citrus hosts by *Phytophthora nicotianae* and *P. palmivora*. *Genet. and resist.* 88: 389-395.
- Wilson, F. D. and Mezel, M. Y. 1967. Interspecific hybrids between kenaf (*Hibiscus cannabinus*) and roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Euphytica* 16: 33-34.
- Zentmyer, I. A., Menge, I. A., and Ohr, H. D. 1994. *Phytophthora* root rot. p. 76-79. *In: Compendium of tropical fruit diseases*. Ploetz, R. C., Zentmyer, G. A., Nishinma, W. T., Rohrbach, K. G., and Ohr, H. D. (Ed.). APS Press, St. Paul, MN. 111 p.

# **CAPÍTULO I. RESPUESTA DE VARIEDADES CRIOLLAS DE JAMAICA (*HIBISCUS SABDARIFFA* L.) A LA INFECCIÓN POR *PHYTOPHTHORA* *PARASITICA* DASTUR EN MÉXICO.**

Response of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) landraces to *Phytophthora parasitica* Dastur infection in Mexico.

**Rafael Rojas-Rojas<sup>1</sup>, Carlos De León-García de Alba<sup>2</sup>, Víctor Heber Aguilar-Rincón<sup>3\*</sup>, Ciro Velasco-Cruz<sup>4</sup>, Ernestina Valadez-Moctezuma<sup>5</sup>, Javier Hernández-Morales<sup>6</sup> y Francisco de Jesús Caro-Velarde<sup>7</sup>.** <sup>1,2,6</sup> Postgrado de Fitopatología, <sup>3</sup>Postgrado de Genética, <sup>4</sup>Postgrado de Estadística. Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. Km 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, México, C.P. 56230. <sup>5</sup>Dep. de Fitotecnia, Univ. Autón. Chapingo, Km 38.5 Carr. México-Texcoco, Chapingo, Texcoco, Méx., C.P. 56230. <sup>7</sup>Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit. Carr. Tepic-Compostela, Km 9, Xalisco-Nayarit, C.P. 63780. \*Autor de correspondencia: aheber@colpos.mx

**RESUMEN.** Las enfermedades que atacan a la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) limitan su producción. Para evaluar su resistencia a la infección por *Phytophthora parasitica* Dastur, se estudiaron 51 variedades de jamaica en etapa productiva en campo del agricultor con alta incidencia natural del patógeno, y en plántula en condiciones de invernadero bajo inoculación artificial. Se midió la severidad de la planta y se calculó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), y se determinó la distribución de la severidad e índice de daño. La variedad Criolla super precoz mostró mayor resistencia a la enfermedad en campo al presentar la menor severidad e índice de daño, mientras que en invernadero, UAN 8 y UAN 25 fueron las más resistentes al presentar menor ABCPE, índice de daño y una distribución de severidad con 97 % de sus plantas en nivel 1 (planta sana).

**PALABRAS CLAVE:** resistencia genética, susceptibilidad, daño, severidad.

**ABSTRACT.** Diseases affecting roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) significantly reduce its production. In order to evaluate the roselle's resistance to *Phytophthora parasitica* Dastur, a set of 51 landraces were studied. The evaluation was carried out under two different conditions: field conditions

under high natural incidence of the pathogen, and greenhouse conditions at seedling stage under artificial inoculation. In both conditions, incidence of *Phytophthora parasitica* was evaluated. Indexes of severity, area under the curve describing the disease's progress was calculated, and severity distribution were recorded, and index of damage was calculated. In field conditions Criolla super precoz was the less damaged (i.e. the most resistant) with the lowest disease index and damage value, while in the greenhouse evaluation, UAN 8 and UAN 25 were the most resistant with lowest ABCPE, sensitivity index and a severity distribution with 97 % of plants in level 1 (healthy plant).

**KEY WORDS:** Genetic resistance, susceptibility, sanity, severity.

## 1.1 INTRODUCCIÓN

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es una planta arbustiva, anual y autógena (Vaidya, 2000). Según Murdock (1959), es originaria de África Oriental y llegó a Centroamérica durante el comercio de esclavos. La jamaica es un cultivo de importancia comercial y fuente de ingresos para pequeños productores, tolera suelos de baja fertilidad y se establece en condiciones de temporal, normalmente intercalado con otro cultivo (El-Naim y Ahmed, 2010). Los cálices deshidratados son usados para elaborar bebidas, infusiones, jaleas, vino y mermeladas debido al alto contenido de antocianinas y ácidos orgánicos (Abou El-Nasr *et al.*, 2014). En orden de importancia, los principales países productores son China, India, Sudán, Uganda, Indonesia, Malasia y México (Correa *et al.*, 2011). En este último, los principales estados productores son Guerrero, Oaxaca, Michoacán, Puebla y Nayarit, que en conjunto aportan el 98 % de la producción nacional. En México se cultivan 19 315 ha, con una producción de 6 726 ton. El principal estado productor es Guerrero con una superficie de 14 274 ha, un rendimiento de 320 kg ha<sup>-1</sup> y

una producción de 4 634 ton, seguido por Oaxaca, Michoacán, Puebla y Nayarit con una producción de 756, 800, 216 y 181 tons, respectivamente (SIAP-SAGARPA, 2014).

Los principales problemas que limitan la producción y expansión del cultivo de jamaica son régimen de lluvia, prácticas de cultivo muy limitadas y problemas en la cosecha (El-Awad, 2001). Además de estos problemas, se consideran factores bióticos como las enfermedades, entre las que destacan manchas foliares causadas por *Corynespora cassicola*, *Cercospora hibisci*, *Rhizoctonia solani* y pudriciones del tallo por *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum* (Amusa *et al.*, 2005; Ortega-Acosta *et al.*, 2015). En México se reportan pérdidas hasta de 50 % de la producción por la pudrición de tallo conocida como “pata prieta”, causada por *Phytophthora parasitica* en plantas adultas de selecciones locales en los estados de Guerrero, Tabasco, Michoacán, Oaxaca y Colima, (Hernández y Romero, 1990; Hernández-Morales *et al.*, 2009). Los síntomas típicos en planta adulta son amarillamiento, necrosis en la base del tallo, marchitez de las hojas y muerte rápida (Escalante *et al.*, 2001).

Para controlar la enfermedad se han implementado medidas de control químico, pero debido a su elevado costo y residuos en los cálices, no es recomendable (Tripathi y Dubey, 2004). En algunos programas de mejoramiento genético, se buscan genotipos resistentes a enfermedades que pueden ser usados como variedades o como progenitores resistentes para transferir genes a genotipos comerciales susceptibles (Anaya-López *et al.*, 2011), como un manejo para disminuir pérdidas de rendimiento y costos de producción.

Se realizan estudios relacionados a rendimiento, contenido de antocianinas, precocidad, tamaño de cáliz, etc. (Ruelas-Hernández *et al.*, 2008; Ibrahim *et al.*, 2013); sin embargo, los relacionados con resistencia

genética a enfermedades han sido escasos. La resistencia genética a *P. parasitica* en jamaica es una alternativa de control viable debido a la diversidad de genotipos disponibles (Torres-Morán *et al.*, 2011). En Costa de Marfil, Boccas y Pellegrin (1976) evaluaron 6 variedades de jamaica y resaltaron la utilidad de la tasa de infección para la selección de genotipos resistentes e infiriendo una respuesta de resistencia horizontal de acción poligénica. En México no hay trabajos relacionados con resistencia a *Phytophthora parasitica* en variedades de jamaica, estos datos son útiles en los programas de mejoramiento genético, por lo que el objetivo de la presente investigación fue evaluar el nivel de resistencia a *Phytophthora parasitica* en variedades de jamaica disponibles de los estados de Guerrero, Nayarit, Puebla y Colima.

## 1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

**1.2.1 Material vegetal.** Se evaluaron 51 variedades criollas de jamaica por su resistencia a *P. parasitica*, provenientes de los estados de Nayarit, Guerrero, Colima y Puebla, que fueron seleccionadas por características como rendimiento, precocidad, contenido de antocianinas y acidez de cálices (Cuadro 1). La semilla de estas variedades fue donada por la Unidad Académica de Agricultura de la Universidad Autónoma de Nayarit.

**Cuadro 1.** Variedades criollas evaluadas en el ensayo de resistencia en campo e invernadero.

Origen	Variedad
Nayarit	Criolla Puebla precoz, Negra Quiviquinta, Negra UAN, UAN 6 (PUGA), UAN 6 (Novillero), UAN 6-1, UAN 7, UAN 8, UAN 9, UAN 10-1, UAN 10-2, UAN 11, UAN 12, UAN 12-1, UAN 13, UAN 13-1, UAN 15, UAN 16-1, UAN 17, UAN 20, UAN 21, UAN 21-1, UAN 22, UAN 23-1, UAN 24, UAN 24-1, UAN 25, UAN 25-1, UAN 26, UAN 29, UAN 30 y UAN 31.
Guerrero	Q-12 cr., 2MQ2, 3Q3, 4Q4, 6Q6, 7Q7, 9 Cruza negra, 10 y 11 Coneja.
Colima	Colima, Criolla morada, Criolla super precoz, Tempranilla negra, Tempranilla roja y Tempranilla tipo flor.
Puebla	Criolla precoz, Criolla roja, Criolla roja violeta y Jersey acriollada.

**1.2.2 Evaluación de la resistencia en campo.** En el ciclo primavera-invierno 2012 se establecieron las variedades de jamaica en Tecoaapa, Guerrero en condiciones de temporal, bajo un diseño experimental completamente al azar con dos repeticiones, donde la unidad experimental estuvo compuesta por 18 plantas.

Cuando las plantas se encontraban en floración (16 de octubre) se realizó la primera medición de la severidad, y la segunda cuando las plantas estaban terminando su floración (12 de noviembre). Se utilizó una escala nominal arbitraria de cinco niveles: 1) planta sana; 2) necrosis en la base del tallo <10 cm; 3) necrosis de 10 a 20 cm en tallo principal y ramas, clorosis y hojas con marchitez; 4) planta defoliada y necrosis >20 cm y 5) planta muerta (Figura 4).



Severidad 1

Severidad 2

Severidad 3

Severidad 4

Severidad 5

**Figura 4.** Escala nominal arbitraria para evaluar la severidad en tallo en variedades de jamaica inoculadas con *P. parasitica*.

Con los datos de severidad de la segunda evaluación, se calculó el índice de daño (ID) que describe la sanidad de la planta de acuerdo a la media ponderada de cada variedad usando una escala del 1 a 5, donde 1 correspondía a planta sana y 5 planta muerta. El ID se calculó como la media ponderada del número de plantas en cada nivel de infección dividido por el total de plantas (36 plantas), como se describe a continuación:

$$ID = \frac{\sum(n \cdot b)}{N}$$

donde: **ID**= Índice de daño

**n**= Plantas en cada nivel de severidad

**b**= Nivel de severidad

**N**= Total de plantas evaluadas

**1.2.3. Evaluación de la resistencia en invernadero.** La resistencia genética a *P. parasitica* se evaluó en plántula en el invernadero de Fitopatología del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Méx. en 2013. La semilla se sembró en suelo previamente esterilizado con vapor. Se usaron macetas de unicel con aproximadamente de 250 mL de volumen, donde se sembró una semilla de jamaica por maceta para completar un total de 30 plantas por variedad.

Para obtener el inóculo de *P. parasitica* se colectaron tallos de plantas con síntomas de la enfermedad “pata prieta” en Tecoaapa, Guerrero. Se llevaron al laboratorio y se cortaron en trozos de 1 cm. Se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio 1.5 % por 3 min, seguido de 2 enjuagues con agua destilada estéril y se sembraron en cajas Petri con medio papa dextrosa-agar (PDA) incubados a 26 °C por una semana. Los aislamientos se purificaron siguiendo la técnica de punta de hifa. Se seleccionaron seis cepas que se identificaron morfológicamente en base a la clave taxonómica de Erwin y Ribeiro (1996). Previo a la evaluación de la resistencia se realizó una prueba de patogenicidad en invernadero con las cepas seleccionadas inoculando discos de la colonia en la base del tallo en

plántulas de jamaica de variedades susceptibles en campo de 8 semanas de edad y seleccionando la cepa considerada más virulenta al causar los síntomas de necrosamiento, marchitez y muerte de la planta en el menor tiempo. El aislamiento más virulento fue cultivado en cajas de Petri, con medio V8® durante 10 días a 28 °C. Cuando la colonia del patógeno cubrió totalmente la caja Petri con un sacabocado se tomaron rodajas de aproximadamente 15 mm de diámetro del medio de cultivo con micelio, se colocaron en caja Petri con agua destilada estéril y se incubaron una semana a 28 °C para inducir la formación de esporangios. La liberación de zoosporas se indujo manteniendo las cajas Petri a 7 °C por 40 min y dejándolas a temperatura ambiente por 30 min (Tuite, 1969).

**1.2.4 Determinación de concentración de inóculo.** Para determinar la cantidad adecuada del inóculo para evaluar la resistencia de las variedades en invernadero, se evaluaron seis concentraciones con 50 000, 100 000 150 000, 375 000 y 500 000 zoosporas por planta. Estas concentraciones de zoosporas se inocularon en 20 plántulas de seis variedades de jamaica de 35 días de edad, establecidas en macetas de 250 mL con suelo estéril seleccionadas como susceptibles en condiciones de campo en Tecoaapa, Guerrero. La evaluación del daño de las concentraciones se hizo 12 días después de la inoculación.

**1.2.5 Método de inoculación en plántula para evaluar la resistencia.** Una semana antes de la inoculación, dos terceras partes de las macetas con las plántulas fueron sumergidas en tanques con agua con temperatura controlada a  $25 \pm 2$  °C evitando inundar la maceta. Se inocularon 30 plántulas de cada variedad aplicando 5 mL de una suspensión de zoosporas con una concentración de inóculo de  $375 \times 10^3$  zoosporas (de acuerdo a la concentración óptima) en el cuello de la planta, a los 35 días después de la siembra cuando habían alcanzado 20 cm de altura. Para evitar escapes, se

aplicó una segunda dosis similar de inóculo 12 días más tarde. Para mantener la temperatura constante a 24 °C en el agua y suelo, se colocaron termostatos y el agua se mantuvo en agitación para mantener uniforme la temperatura en la tina siguiendo la técnica descrita por Walker (1957). Para mantener la temperatura del invernadero entre 20 °C y 25 °C se usaron calentadores eléctricos.

**1.2.6 Área bajo la curva del progreso de la enfermedad.** A partir del octavo día después de la inoculación se realizaron siete evaluaciones de severidad del daño en cada planta cada 72 h, usando una escala nominal arbitraria de cinco niveles de daño donde: 1) planta sana con hojas turgentes, color verde; 2) necrosis < 2.0 cm en la base del tallo y algunas hojas con clorosis; 3) necrosis de 2.0 a 3.0 cm en la base del tallo y hojas con clorosis; 4) necrosis > 3.0 cm en el tallo, planta curvada con hojas inferiores cloróticas, marchitas o defoliada y 5) planta muerta. Utilizando los datos de severidad y los intervalos de tiempo en que se registraron, se calculó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) por repetición de cada variedad con el método de integración trapezoidal (Campbell y Madden, 1990).

**1.2.7 Distribución de la severidad (DS).** Se determinó en cada variedad contando el número total de plantas en cada uno de los cinco niveles de infección.

**1.2.8 Índice de daño en plántula.** Se calculó como se describió anteriormente para la evaluación en campo.

Debido a que los datos de las variables severidad (campo) y ABCPE (invernadero) no cumplen con los supuestos de normalidad para realizar el análisis de varianza, se transformaron en escala logarítmica natural. Cada repetición consistió de 10 plántulas.

**1.2.9 Análisis estadístico.** Los datos fueron analizados usando el procedimiento GLIMMIX de SAS versión 9.3 (SAS Institute, 2012). La separación de medias se realizó mediante la instrucción lsmeans, con las opciones adjust=tukey ( $\alpha = 0.05$ ) y lines.

## 1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**1.3.1 Respuesta a la infección de *P. parasitica* en campo.** En condiciones de campo, la variedad Criolla super precoz, procedente de Colima, presentó la menor severidad (0.34), por lo que podría considerarse como la más resistente (Cuadro 2). Sin embargo, ésta variedad solo presentó diferencias significativas en severidad contra 11 variedades que mostraron valores de 1.43 a 1.55 y que no formaron frutos debido al daño causado por el patógeno.

De acuerdo a la prueba de comparación de medias, las 39 variedades cuya severidad varió entre 1.38 a 0.69, se agruparon entre la Criolla super precoz y las 11 variedades más susceptibles, y no obstante que no presentaron diferencias significativas en severidad con estas últimas, las plantas de estas variedades alcanzaron la etapa de formación de fruto, por lo que sería factible considerarlas como variedades con resistencia intermedia o con tolerancia a la enfermedad (Schafer, 1971).

La escasa diferencia estadística en severidad de la enfermedad observada en las variedades de jamaica evaluadas, pudo deberse a la limitada diversidad genética entre ellas, dado que la jamaica es un cultivo introducido a México, situación que se podría acentuar si consideramos que la mayoría de las variedades utilizadas provienen de un solo estado del país (Nayarit) que representa solamente el 1.7 % de la superficie total cultivada con jamaica (SIAP-SAGARPA, 2014).

Debido a que en condiciones de campo solo se llevaron a cabo dos evaluaciones de severidad de la enfermedad, no fue posible determinar el momento en el que se pudieron haber mostrado las mayores diferencias entre las variedades, resultando en pocas diferencias entre genotipos. Lo anterior coincide con Boccas y Pellegrin (1976), ellos encontraron escasas diferencias entre variedades de jamaica evaluadas a *P. parasitica* en Costa de Marfil, y sugieren seleccionar la severidad promedio para diferenciar las variedades. A pesar de que en la presente investigación también se usó la severidad promedio, no fue posible obtener diferencias contrastantes entre las variedades.

**Cuadro 2.** Respuesta a *Phytophthora parasitica* de 51 variedades de jamaica en etapa productiva en Tecoaapa, Guerrero 2012.

Variedad	Severidad (Transf.)*	Índice de daño <sup>x</sup>	Variedad	Severidad (Transf.)	Índice de daño
UAN 21-1	1.55 a	5.0	UAN 26	1.17 ab	3.0
UAN 21	1.50 a	5.0	UAN 10-2	1.15 ab	3.0
UAN-17	1.49 a	4.0	11 Coneja	1.09 ab	2.0
UAN 12-1	1.49 a	4.0	UAN 20	1.09 ab	4.0
7Q7	1.49 a	3.0	2MQ2	1.03 ab	2.0
UAN 23-1	1.44 a	4.0	UAN 29	1.00 ab	3.0
Criolla roja violeta	1.43 a	3.0	Jersey acriollada	1.00 ab	3.0
6Q6	1.43 a	3.0	UAN 25	1.00 ab	5.0
UAN 12	1.43 a	3.0	UAN 13	1.00 ab	2.0
UAN 25-1	1.43 a	3.0	UAN 24-1	1.00 ab	2.0
Negra Quiviquinta	1.43 a	4.0	UAN 6-1	0.97 ab	4.0
UAN 9	1.38 ab	5.0	UAN 30	0.97 ab	3.0
10	1.35 ab	3.0	UAN 7	0.89 ab	2.0
Tempranilla roja	1.31 ab	3.0	Criolla roja	0.89 ab	2.0
UAN 24	1.31 ab	4.0	3Q3	0.89 ab	3.0
Criolla Puebla precoz	1.24 ab	3.0	Q12 cr.	0.89 ab	3.0
UAN 16-1	1.24 ab	3.0	UAN 31	0.89 ab	2.0
9 Cruza negra	1.24 ab	2.0	Criolla morada	0.80 ab	2.0
Criolla precoz	1.24 ab	3.0	UAN 6 (puga)	0.80 ab	2.0
UAN 13-1	1.24 ab	3.0	Tempranilla negra	0.75 ab	2.0
UAN 15	1.17 ab	3.0	Colima	0.75 ab	2.0
UAN 6 (novillero)	1.17 ab	4.0	UAN 8	0.69 ab	2.0
UAN 10-1	1.17 ab	3.0	UAN 11	0.69 ab	2.0
UAN 22	1.17 ab	3.0	4Q4	0.69 ab	2.0
Negra UAN	1.17 ab	2.0	Criolla super	0.34 b	1.0
Tempranilla tipo flor	1.17 ab	3.0	precoz		

\* Severidad transformada. Valores de dos fechas de evaluación. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Valores transformados con logaritmo.

<sup>x</sup>Valores de 36 plantas, donde 1= planta sana; 5=Planta muerta.

Considerando el ID de las variedades, en el Cuadro 2 se observa que existe una relación directa entre el valor de severidad y el índice de daño; así, el menor ID lo presentó la variedad Criolla super precoz (1.0), que también presentó la menor severidad (0.34). Las cinco variedades con valores altos de severidad en su mayoría presentaron los índices de daño más altos. Las excepciones a esta relación severidad: ID se presentan con variedades como UAN 25, que mostró un nivel de severidad inferior a las variedades más susceptibles (una tercera parte menor) y todas sus plantas murieron (ID igual a 5), lo que sugiere que son materiales muy susceptibles, ya que con un valor de severidad menor sus plantas mueren. Lo contrario ocurrió con las variedades 7Q7, Criolla roja violeta, 6Q6, UAN 12, y UAN 25-1, cuyos valores de severidad fueron de los más altos el valor de ID indica que sus plantas en promedio no murieron, lo que estaría evidenciando niveles altos de tolerancia a *P. parasitica*.

Se observó que hubo variedades que presentaron una tendencia a ser medianamente resistentes pero con un ID en 5 o 4, como es el caso de la variedad UAN 6 (novillero), UAN 20, UAN 25 y UAN 6-1 con un valor de severidad cercano a 1.0. Estas variedades, con dos terceras partes del valor máximo de severidad (1.55) tuvieron un ID cercano a 5 (éstas variedades con menor severidad alcanzaron rápidamente el ID 5), contrario a las variedades más susceptibles UAN 21 y UAN 21-1 que llegaron a un valor de severidad de 1.55 para presentar el ID 5.

Debido que el trabajo de campo se desarrolló bajo condiciones de inóculo natural, la respuesta en severidad e índice de daño en campo pudieron verse influidos por una distribución heterogénea del inóculo nativo en el suelo, lo que pudo haber ocasionado escape de plantas. Otra posible causa, es la presencia de más de una raza con diferente variabilidad patogénica como lo mencionan Escalante *et al.* (2001), quienes encontraron diferencias en la agresividad de 30 cepas aisladas de tres regiones

productoras de jamaica, y observaron que las cepas más agresivas produjeron necrosis inicial a los 11 días después de la inoculación comparado con los 22 días que necesitaron las cepas menos agresivas. Por su parte, Jaarsveld *et al.* (2003), al evaluar resistencia a *Phytophthora nicotianae* en plantas inoculadas de tabaco, resaltan la variabilidad patogénica y la importancia del aislado para seleccionar variedades con resistencia moderada.

**1.3.2 Respuesta a la infección de *P. parasitica* en invernadero.** En las pruebas de resistencia en condiciones de invernadero, el análisis de varianza y la comparación de medias mostró que de las 51 variedades evaluadas las variedades UAN 8 y UAN 25 procedentes de Nayarit tuvieron el valor más bajo de ABCPE y fueron significativamente diferentes comparados con las 11 variedades más susceptibles. Las 51 variedades mostraron diferencias en la variable ID a la infección por *P. parasitica* en plántula (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Respuesta a *Phytophthora parasitica* en plántulas de 51 variedades de jamaica en invernadero en Montecillo, Texcoco, 2014.

Variedad	ABCPE <sup>1</sup>	Distribución de la severidad <sup>2</sup>					Índice de daño
		1	2	3	4	5	
Tempranilla negra	2.36 a	9				21	3.80
Tempranilla roja	2.35 a	8	1		2	19	3.77
UAN 6 (novillero)	2.32 a	5	1	2		22	4.10
UAN 23-1	2.32 a	8	1	1		20	3.77
3Q3	2.26 a	10		1	3	16	3.50
UAN 20	2.22 a	16			1	13	2.83
UAN 6-1	2.21 a	17		2		11	2.60
Criolla morada	2.18 a	10	1			19	3.56
UAN 30	2.07 a	18		1		11	2.53
Negra Quiviquinta	1.86 a	14		1	1	14	3.03
11 Coneja	1.86 a	15		4	1	10	2.70
Criolla Puebla precoz	1.84 ab	18	2	1		9	2.33
9 Cruza negra	1.82 ab	12		1	2	15	3.27
2MQ2	1.73 ab	26		1		3	1.47
UAN 12-1	1.61 ab	24		1		5	1.73
4Q4	1.60 ab	18		1	3	8	2.43
UAN 6 (puga)	1.56 ab	25	1	1		3	1.50
UAN 9	1.55 ab	21		1	1	7	2.10
UAN 21-1	1.54 ab	20				10	2.33
UAN 25-1	1.51 ab	16	1		3	10	2.67
UAN 10-1	1.50 ab	17		3		10	2.53
UAN 29	1.47 ab	23		2		5	1.80
Tempranilla tipo flor	1.47 ab	19		5	1	5	2.10
7Q7	1.44 ab	21		3		7	2.07
UAN 21	1.37 ab	25		1		4	1.60

Variedad	ABCPE	Distribución de la severidad					Índice de daño
		1	2	3	4	5	
UAN 17	1.36 ab	20	3	2	2	3	1.83
Criolla precoz	1.30 ab	18	2	2	1	7	2.23
UAN 26	1.27 ab	22		1		7	2.00
UAN 31	1.26 ab	25				5	1.67
UAN 22	1.10 abc	19		1	2	8	2.33
UAN 11	1.05 abc	26				4	1.53
Colima	0.98 abc	21		2	1	6	2.03
UAN 12	0.98 abc	23		1		6	1.87
Negra UAN	0.96 abc	21		2		7	2.07
UAN 16-1	0.94 abc	22	1			7	1.97
Jersey acriollada	0.93 abc	27				3	1.40
Q12 cr.	0.92 abc	25		1	1	1	1.43
UAN 15	0.90 abc	23			2	5	1.87
Criolla roja violeta	0.84 abc	24	1	2	1	2	1.53
UAN 7	0.75 abc	27				3	1.40
UAN 24	0.48 abc	28	1			1	1.17
UAN 24-1	0.38 abc	25		1		4	1.60
Criolla roja	0.23 abc	24	1	2	1	2	1.53
6Q6	0.14 abc	25		1	3	1	1.50
UAN 10-2	0.11 abc	26		1	1	2	1.43
Criolla super precoz	0.08 abc	28		1		1	1.23
UAN 13	0.06 abc	26		3		1	1.47
UAN 13-1	-0.09 abc	26		1		3	1.33
10	-0.14 abc	26		2		2	1.33
UAN 25	-0.15 bc	29				1	1.13
UAN 8	-1.07 c	29		1			1.03

<sup>1</sup>Valores transformados con logaritmo. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). <sup>2</sup>Distribución de plantas en cada nivel de severidad, 1) planta sana con hojas turgentes, color verde; 2) necrosis < 2.0 cm en la base del tallo y algunas hojas con clorosis; 3) necrosis de 2.0 a 3.0 cm en la base del tallo y hojas con clorosis; 4) necrosis > 3.0 cm en el tallo, planta curvada con hojas inferiores cloróticas, marchitas o defoliada y 5) planta muerta. Valores de 30 plantas.

**1.3.2.1 Evaluación de la concentración de inóculo.** La concentración de 375 000 zoosporas por planta permitió diferenciar las variedades según su resistencia nueve días después de la inoculación. Con concentraciones inferiores no hubo desarrollo de síntomas, probablemente debido a la baja concentración de inóculo o a un mayor periodo latente. Con 500 000 zoosporas por planta, se indujo la muerte de plantulas cinco días después de la inoculación sin que se pudieran observar diferencias en resistencia entre variedades.

**1.3.2.2 Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE).** Las 51 variedades de jamaica evaluadas en invernadero presentaron síntomas de la enfermedad a partir del sexto día después de la inoculación y tuvieron valores del logaritmo de ABCPE al final de la evaluación de -1.07 a 2.36 (Cuadro 3). De acuerdo a la comparación de medias, las variedades UAN 25 y UAN 8, con promedio de -0.15 y -1.07, respectivamente, fueron las que tuvieron los menores valores del logaritmo de ABCPE y fueron estadísticamente diferentes a las 11 variedades con los mayores valores del ABCPE de 1.86 a 2.36. Las variedades más resistentes no presentaron diferencias significativas con 20 variedades cuyo valor del logaritmo de ABCPE fueron  $\leq 1.1$ . Las variedades Tempranilla negra, Tempranilla roja y UAN 6 (novillero) presentaron los mayores valores del logaritmo de ABCPE, y podrían ser tomadas en cuenta como testigos susceptibles en futuros trabajos de resistencia (Cuadro 3).

Las pocas diferencias estadísticas entre las variedades en sus ABCPE coinciden con lo reportado por Boccas y Pellegrin (1976), en evaluaciones de variedades por lo que es necesario incluir más variables como severidad, incidencia, días transcurridos a la aparición de síntomas y longitud de la necrosis en tallo que permitan establecer una diferencia entre las variedades.

**1.3.2.3 Distribución de la severidad.** Todas las variedades de jamaica evaluadas fueron heterogéneas en su respuesta a *P. parasitica* ya que todas las plantas se encontraron entre los niveles 1 y 5. Este resultado se puede atribuir a que las variedades de jamaica posiblemente estén integradas por mezclas de líneas y presenten variaciones en resistencia a *P. parasitica*. Las variedades más

resistentes como UAN 8 y UAN 25 presentaron el 97% de sus plantas en el nivel 1, al coincidir como las variedades con el menor valor de ABCPE, mientras que las más susceptibles Tempranilla negra, Tempranilla roja, UAN 6 (novillero), UAN 23-1, 3Q3 presentaron aproximadamente 60% de las plantas en nivel 5 (Cuadro 3).

En algunas variedades, como UAN 24, Criolla super precoz, UAN 25 y UAN 8, la DS en el nivel 1 es alta (mayor a 28 plantas), por lo que sería factible hacer una selección de plantas resistentes dentro estas variedades y obtener líneas homogéneas con resistencia genética que puedan ser usada como variedad *per se* por los productores o bien ser incluídas en programas de mejoramiento genético.

En el cultivo de jamaica se ha reportado una resistencia no específica (tipo horizontal) a *P. parasitica* (Boccas y Pellegrin, 1976); sin embargo, en el presente trabajo el hecho de que la mayoría de las variedades tuvieran plantas distribuidas en todas las categorías, incluyendo plantas sanas (Nivel 1), muertas (Nivel 5) y con severidad intermedia (Nivel 2 a 4), hace suponer que las variedades de jamaica tuvieran simultáneamente tanto resistencia de tipo específica (presencia de plantas completamente sanas) como resistencia no específica (presencia de plantas con diferente grado de severidad), como se reporta contra *Phytophthora infestans* en variedades de papa (Mosquera *et al.*, 2008) .

**1.3.2.4 Índice de daño en plántula.** Esta variable presentó valores de 1.03 a 4.1 y su valor estuvo directamente relacionado con el número de plantas muertas. Así, las variedades con menor ID lo presentaron UAN 8 y UAN 25 con 1.03 y 1.13 respectivamente, ya que 29 de las 30 plantas tuvieron una calificación de 1 (plantas sanas), en tanto que la variedad UAN 6 (novillero) con 22 plantas en el nivel 5 (planta muerta) tuvo el mayor ID (Cuadro 3).

El ID en UAN 8 la incluyó entre las variedades más resistente en campo y en invernadero mostrando que su resistencia es efectiva en las dos etapas de desarrollo de la planta. En campo, en etapa adulta, la variedad UAN 25, aunque

presentó una baja severidad, todas sus plantas murieron mostrando un alto ID (5.0). Por el contrario, en invernadero en etapa de plántula, la misma variedad presentó una baja severidad y un bajo ID (1.13) con 29 plantas sanas, sugiriendo que la resistencia que presenta ésta variedad en etapa de plántula no es eficaz en planta adulta, lo que coincide con lo reportado por Ansar *et al.* (2010), quienes encontraron selecciones de chícharo con resistencia a *Fusarium* spp. en fase de plántula pero fueron susceptibles en etapa productiva señalando que esta diferencia es producto de la acción de diferentes genes en cada etapa de la planta o debido a la diferencia en el modo de infección del patógeno en cada etapa de crecimiento.

Se observó que la variedad UAN 6 (novillero) mostró ser muy susceptible a *P. parasitica* tanto en campo como en invernadero, presentando un valor de ID (4.0) en campo similar al valor observado en invernadero (valor de 4.1), seguido por la respuesta de las variedades Tempranilla roja, UAN 23-1 y 3Q3, mostrando que cuatro variedades fueron muy susceptibles a pesar que tuvieron de 5 a 10 plantas en el nivel 1 en plántula.

La respuesta de las variedades conjuntó grupos de acuerdo a los valores de severidad, ID y DS; de ésta forma, las variedades más susceptibles se agruparon de acuerdo a valores de ABCPE de 2.26 a 2.36 y al ID de 3.50 a 3.80, en donde la mayor parte de las plantas estuvieron en el nivel 5. Las variedades estadísticamente iguales a las más resistentes (UAN 25 y UAN 8), con valores de ABCPE entre -1.07 a 1.05, también se agruparon de acuerdo a la DS considerando que más del 60% de sus plantas estuvieron en el nivel 1.

**1.3.3 Respuesta en campo vs invernadero.** Al comparar la respuesta de todas las variedades en campo e invernadero, se observa que, en campo, el ID en las variedades presentó el valor promedio más alto (2.9), incluyendo 34 variedades con valores mayores a 3.0, comparado con su resistencia en invernadero donde mostraron un valor promedio de 2.12 y en donde solo 8 variedades tuvieron un ID mayor a 3. Esto probablemente se debe factores como son la mayor variabilidad del patógeno en campo, posibles aislamientos más agresivos, además, periodo

de cultivo y doble evaluación de plántulas en invernadero, y que en condiciones de campo se tuvo un tiempo mayor para el desarrollo de la enfermedad.

Se observó que aunque no se realizó la inoculación artificial de plantas en campo, hubo 11 variedades (UAN 11, Colima, Jersey acriollada, Q12 cr., UAN 7, UAN 24-1, Criolla roja, Criolla super precoz, UAN 13, UAN 25 y UAN 8) con un valor bajo en severidad (menor a 1.0), que coincidieron con los resultados en invernadero donde las mismas variedades mostraron valores de severidad menores a 1.05. Esta tendencia hace suponer que la resistencia en plántula es efectiva en planta adulta aunque no se descarta la presencia de genes que sólo se expresan en una etapa inicial de desarrollo de la planta.

Es necesario seguir evaluando las variedades para incluir o descartar aquellas con respuesta medianamente resistente como UAN 24-1, UAN-31, 2MQ2 con características agronómicas sobresalientes, y utilizarlas en un programa de mejoramiento.

## **1.4 CONCLUSIONES**

Todas las variedades presentaron algún grado de resistencia.

En todas las variedades existen plantas resistentes en mayor o menor grado.

La variedad con respuesta resistente en condiciones de campo fue Criolla super precoz al mostrar la menor severidad e índice de daño en etapa productiva, y en invernadero fueron UAN 8 y UAN 25 en etapa de plántula.

Las variedades con bajos en Índices de Severidad en campo e invernadero podrían utilizarse en desarrollar germoplasma con buenas características agronómicas y resistencia genética a la enfermedad.

## 1.5 LITERATURA CITADA

- Abou El-Nasr, T. H. S., El-Enany, M. A., and Ibrahim, M. M. 2014. Genetic parameters evaluation among some selected lines of Sudanese roselle variety in Egypt, using morpho-agronomic traits and ISSR markers. *Middle East J. of App. Sci.* 4:181-190.
- Amusa, N. A., Adegbite, A. A., and Oladapo, M. O. 2005. Vascular wilt of roselle (*Hibiscus sabdarifa* L. var. *sabdariffa*) in the humid forest region of South-Western Nigeria. *Plant Pathol. J.* 4:122-125.
- Anaya-López, J. L., Gónzales-Chavira, M. M., Villordo-Pineda, E., Rodríguez-Guerra, R., Rodríguez-Martínez, R., Guevara-González, R. G., Guevara-Olveda, L., Montero-Tavera, V. y Torres-Pacheco, I. 2011. Selección de genotipos de chile resistentes al complejo patogénico de la marchitez. *Rev. Mex. Ciencias Agríc.* 2:373-383.
- Ansar, M., Sheikh, M. I., Najma, A., Yasmeen, A. and Abida, A. 2010. Identification of resistant sources in chickpea against *Fusarium* wilt. *Pakistan J. Bot.* 42:417-426.
- Boccas, B., and Pellegrin, F. 1976. Evaluation de la résistance de quelques varieties de roselle au *Phytophthora parasitica* Dast. *Cotton Fibres Trop.* 31:231-234.
- Campbell, C. L. and Madden, L. V. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley and Sons. USA. 532 p.
- Correa, S. E., Ortíz, G. C. F., Torres de la, C. M., Bautista, M. C. C., Rivera, C. M. C., Lagunes, E. L. C. y Hernández, S. J. H. 2011. Etiología de la mancha acuosa de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) en Tabasco, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 29:165-167.
- Erwin, D. C. and Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 562 p.
- El-Awad, H. O. 2001. Roselle production in Sudan during the seasons (1970/71-84/85 and 95/96-2000/01). *Elobied Res. Stat Elobied, Sudan.*
- El-Naim, A. M. and Ahmed, S. E. 2010. Effect of weeding frequencies on growth and yield of two roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) varieties under rain fed. *Australian J. Basic and Appl. Sci.* 4:4250-4255.

- Escalante, E. Y. I., Osada, K. S. y Escalante, E. J. A. 2001. Variabilidad patogénica de *Phytophthora parasitica* Dastur en jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). Rev. Mexi. Fitopatol. 19:84-89.
- Hernández, M. J. y Romero, C. S. 1990. Identificación del agente causal de “pata prieta de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa*, L.)” y pruebas de fungicidas para su control bajo condiciones de invernadero. Rev. Chapingo (67-68):50-54.
- Hernández-Morales, J., Gonzáles-Santín, L. L., Ayala-Escobar, V. y Leyva-Mir, S. G. 2009. Etiología de la “pata prieta” de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México. p. 69-70. In: XI Cong. Internal/XXXVI Cong. Nal. Fitopatol. 19-24 Julio, 2009. Acapulco, Gro. México.
- Ibrahim, E. B., Abdalla, A. W. H., Ibrahim, E. A., and El Naim, A. M. 2013. Variability in some roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) genotypes for yield and its attributes. International Journal of Agriculture and Forestry. 3:261-266.
- Jaarsveld, E. V., Wingfield, M. J. and Drenth, A. 2003. A rapid seedling based screening technique to assay tobacco for resistance to *Phytophthora nicotianae*. J. Phytopathol. 151:7-8.
- Mosquera, T., Fernández, C., Martínez, L., Acuña, A. y Cuéllar, D. 2008. Genética de la resistencia de la papa (*Solanum tuberosum*) a patógenos. Estado de arte. Agron. Colomb. 26:7-15.
- Murdock, G. P. 1959. Africa, its peoples and their culture history. McGraw-Hill, New York. 456 pp.
- Ortega-Acosta, S.A., Hernández-Morales, J., Ochoa-Martínez, D.L., and Ayala-Escobar, V. 2015. First report of *Corynespora cassiicola* causing leaf and calyx spot on roselle in Mexico. Plant Dis. 99:1041.
- Ruelas-Hernández, P.G., Caro-Velarde, F. de J., Pérez-González, R. y Valdivia-Bernal, R. 2008. Aptitud combinatoria y heterosis en un cruzamiento dialélico en jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). Rev. Chapingo Serie Horticultura 14:325-330.
- SAS Institute. 2012. SAS release 9.3 ed. Cary, NC: SAS Institute.
- Schafer, J. F. 1971. Tolerance to plant disease. Ann. Rev. Phytopathol. 9: 235-252.

- SIAP-SAGARPA. 2014. Servicio de información agroalimentaria y pesquera Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <http://www.gob.mx/siap/index> (Consulta, noviembre 2016).
- Torres-Morán, M. I., Escoto-Delgadillo, M., Ron-Parra, J., Parra-Tovar, G., Mena-Munguía, S., Rodríguez-García, A., Rodríguez-Sahagún, A. y Castellanos-Hernández, O. 2011. Relationships among twelve genotypes of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) cultivated in western Mexico. *Indust. Crops and Prod.* 34:1079-1083.
- Tripathi, P., and Dubey, N. K. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharv. Biol. Technol.* 32:235-245.
- Tuite, J. 1969. *Plant pathological methods. Fungi and bacteria.* Burgess Publ. Co., Minneapolis, MN. 239 p.
- Vaidya, K. R. 2000. Natural cross-pollination in roselle, *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae). *Geneti. Molec. Biol.* 23: 667-669.
- Walker, J. C. 1957. *Plant Pathology.* 2nd. Ed. McGraw-Hill Book Co., Inc. USA. 707 p.

## **CAPÍTULO II. HERENCIA DE LA RESISTENCIA A *PHYTOPHTHORA* *PARASITICA* DASTUR EN JAMAICA (*HIBISCUS SABDARIFFA* L.)**

### **Inheritance of resistance to *Phytophthora parasitica* Dastur in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.)**

Rafael Rojas-Rojas<sup>1</sup>, Carlos De León-García de Alba<sup>2\*</sup>, Víctor Heber Aguilar-Rincón<sup>3</sup>, Ciro Velasco-Cruz<sup>4</sup>, Ernestina Valadez-Moctezuma<sup>5</sup>, Javier Hernández-Morales<sup>6</sup> y Francisco de Jesús Caro-Velarde<sup>7</sup>. <sup>1,2,6</sup> Posgrado de Fitopatología, <sup>3</sup>Posgrado de Genética, <sup>4</sup>Posgrado de Estadística. Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. Km 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Edo. México, C.P. 56230. <sup>5</sup>Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carr. México-Texcoco, Chapingo, Texcoco, Edo. México, C.P. 56230. <sup>7</sup>Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit. Carr. Tepic-Compostela, Km 9, Xalisco, Nayarit, C.P. 63780. \*Autor de correspondencia: cdleon@colpos.mx.

**RESUMEN.** Conocer la acción génica que controla un carácter en plantas es importante para implementar un programa eficiente de mejoramiento genético. Para determinar la genética de la resistencia a *P. parasitica* en jamaica, se analizaron las medias generacionales para estimar los parámetros genéticos de resistencia a *P. parasitica* en cruza de variedades de jamaica. El análisis de medias generacionales indica que en la resistencia a *P. parasitica* los efectos aditivos fueron más importantes que los efectos de dominancia. La heredabilidad en sentido amplio fue de 37 %. Para incrementar la resistencia genética a *P. parasitica* en variedades susceptibles de jamaica se sugiere implementar un programa de mejoramiento de selección recurrente.

**PALABRAS CLAVE:** cruza, heredabilidad, aditividad, avance genético

**ABSTRACT.** Knowledge of gene action controlling a trait is critical in plants to implement an efficient breeding program in any species. To determine the

genetics of resistance to *Phytophthora parasitica* in roselle, the generation means were analyzed to estimate the genetic parameters of resistance to *P. parasitica* in crosses of roselle varieties. Generation mean analysis indicated that the additive effects were more important than dominance effects for resistance to *P. parasitica*. Heritability, in the broad sense, was 37%. Results indicated that a recurrent selection breeding program would be highly effective and the most appropriate to develop roselle varieties resistant to *P. parasitica*.

**KEY WORDS:** crosses, heritability, additive effects, genetic advance.

## 2.1 INTRODUCCIÓN

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es una planta anual de la familia de las Malvaceas, de crecimiento arbustivo, de día corto y originaria de África Oriental (Omalsaad *et al.*, 2012). Es una planta autógama, con número cromosómico  $2n=4x=72$ . En México, se cultiva para la obtención de cálices que se utilizan para la elaboración de infusión, jugo, mermelada, etc., con un alto contenido de vitamina C, antocianinas y otros antioxidantes (Anel *et al.*, 2016).

A nivel mundial, uno de los principales problemas en la producción de jamaica son las enfermedades causadas por patógenos que afectan raíz y tallo incluyendo *Phytophthora parasitica*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium equiseti*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Meloidogyne javanica* y *Meloidogyne incognita* (Minton y Adamson, 1979; Ooi *et al.*, 1999; Amusa *et al.*, 2005; Ploetz, *et al.*, 2007; Hassan *et al.*, 2014).

La infección por el oomiceto *Phytophthora parasitica* Dastur causa el necrosamiento de la base del tallo de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) provocando la muerte de la planta (Hernández y Romero, 1990), principalmente durante la etapa de floración afectando el rendimiento en plantaciones comerciales. El patógeno se presenta en condiciones de clima cálido, de alta humedad relativa (Erwin y Riveiro, 1996) y en variedades susceptibles a la enfermedad.

Los escasos estudios relacionados con la herencia genética de diferentes caracteres en jamaica se enfocan principalmente en el análisis de caracteres morfológicos, acidez del cáliz, contenido de antocianinas, precocidad y rendimiento (Ibrahim y Hussein, 2006; Bandi y Appalaswamy, 2014). Falusi (2008) menciona que la coloración del tallo es un carácter monogénico, mientras que Adamson y O'Bryan (1981), reportan que la fotosensibilidad en ésta especie está regulada por dos genes dominantes. Referente a resistencia genética a enfermedades en jamaica, Boccas y Pellegrin (1976) reportan que la resistencia a *P. parasitica* es poligénica.

Para formular un programa eficiente de mejoramiento genético en un cultivo, es necesario conocer los parámetros genéticos del carácter a estudiar (Sher *et al.*, 2012). El análisis de medias generacionales (GMA) es un análisis cuantitativo simple utilizado para estimar los efectos génicos de un carácter poligénico (Mather y Jinks, 1971; Said, 2014), ya que calcula la media de diferentes generaciones obtenidas de la cruce de dos líneas y describe las medias en diferentes efectos génicos. Bernardo (2002) menciona que la estimación e interpretación de las interacciones no-alélicas (epistasia) en el GMA se realiza en forma mas continúa que en el análisis basado en varianzas, debido a que el efecto de las medias son frecuentemente identificables y porque los experimentos requeridos para análisis de medias son más pequeños y más fáciles de implementar que aquellos utilizados para estudiar las varianzas. Asimismo, las inferencias para estudiar los efectos génicos se pueden basar en contrastes de las medias generacionales, por ejemplo mediante comparación de medias entre dos niveles de los factores genéticos, utilizando una prueba de t (Piepho y Möhring, 2010).

Varios investigadores reportan el papel de la acción génica en rendimiento y otros caracteres con ayuda del análisis de medias generacionales (Checa *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2006; El-Refaey y Abd El-Razek, 2013; Said, 2014). Este análisis también es utilizado en estudios de resistencia a enfermedades donde un progenitor tiene alta resistencia y otro alta susceptibilidad (Acquaah, 2007) en patosistemas como *Sphacelotheca reiliana* en maíz (Bernardo *et al.*, 1992),

*Alternaria alternata* en tomate (Cassol y Clair, 1994) y *Xanthomonas* spp en Chile (Silva *et al.*, 2017).

La heredabilidad se ha usado para evaluar el grado en el que un carácter es transmitido del progenitor a la progenie (Akhshi *et al.*, 2014). Sin embargo su valor no tiene importancia práctica sin el cálculo del avance genético que muestra el grado de ganancia obtenido en un carácter bajo una selección de presión particular. Un valor de heredabilidad alto y un avance genético alto sugieren las condiciones para la selección (Husseini *et al.*, 2017).

En México no existen referencias relacionadas con la evaluación de búsqueda de genotipos o variedades nativas de Jamaica para resistencia a *P. parasitica*, por lo que es importante estudiar el tipo de acción génica en la resistencia genética a esta enfermedad para implementar un programa eficiente de mejoramiento genético en éste cultivo. El objetivo de la presente investigación, fue analizar las medias generacionales de cruces intervarietales de colectas nativas de Jamaica para estimar los parámetros genéticos de resistencia a *P. parasitica*.

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

**2.2.1 Material vegetal.** Se usaron como progenitores cinco variedades resistentes y cuatro susceptibles de Jamaica con buenas características agronómicas (Cuadro 4), clasificadas por su respuesta a *P. parasitica* en el capítulo 2.

**2.2.2 Obtención de las generaciones.** En la siembra de los progenitores, se usaron tres semillas de cada progenitor en condiciones de invernadero en Montecillo, Méx. Cuando las plántulas alcanzaron 20 cm de altura se trasplantaron a bolsas de polietileno negras (35 cm de diámetro por 40 cm de altura) con suelo estéril. El control de plagas y manejo de las plantas fue el convencional y se aplicaron riegos con solución nutritiva Steiner 75% (Steiner, 1961). Siete meses después de la siembra, cuando todas las plantas comenzaron la etapa de floración, se realizaron las cruces en dialélo (Griffing, 1956), deseando

obtener un total de 36 posibles cruzas directas entre los progenitores, sin embargo, solo se logró obtener 14 cruzas. Las cruzas se realizaron emasculando flores próximas a su apertura en horas de la tarde y polinizando el día siguiente antes de las 9:00 h.

**Cuadro 4.** Nombre, respuesta y origen de las variedades de jamaica utilizadas como progenitores para el análisis de la resistencia a *P. parasitica*.

<b>No.</b>	<b>Nombre</b>	<b>Respuesta</b>	<b>Origen</b>
1	UAN 6 (novillero)	Susceptible	Nayarit
2	UAN 23-1	Susceptible	Nayarit
3	3Q3	Susceptible	Guerrero
4	UAN 6-1	Susceptible	Nayarit
5	UAN 13	Resistente	Nayarit
6	Jersey acriollada	Resistente	Puebla
7	UAN 13-1	Resistente	Nayarit
8	10	Resistente	Guerrero
9	UAN 8	Resistente	Nayarit

UAN=Universidad Autónoma de Nayarit.

En el siguiente ciclo, cinco plántulas de cada F1 se establecieron en invernadero en bolsas de polietileno con suelo estéril para que se autopolinizaran (Cuadro 5) y obtener semilla F2.

**Cuadro 5.** Cruzas directas logradas para obtener la F1 y F2 para el análisis de la resistencia a *P. parasitica*.

Número	Cruza
1	UAN 6 (novillero) x Jersey acriollada
2	UAN 6 (novillero) x UAN 13-1
3	UAN 6 (novillero) x 10
4	UAN 6 (novillero) x UAN 8
5	UAN 23-1 x UAN 13
6	UAN 23-1 x Jersey acriollada
7	UAN 23-1 x UAN 13-1
8	UAN 23-1 x 10
9	UAN 23-1 x UAN 8
10	3Q3 x UAN 13
11	3Q3 x Jersey acriollada
12	UAN 6-1 x Jersey acriollada
13	UAN 6-1 x UAN 13-1
14	UAN 6-1 x 10

**2.2.3 Fuente de inóculo.** Se colectaron plantas con síntomas de la enfermedad en Tecoaapa, Gro, región reportada con alta incidencia de *P. parasitica* (Ortega-Acosta *et al.*, 2015). Se cortaron trozos de aproximadamente 1 cm en la zona de avance de la enfermedad, se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio 1.5 % por 3 min, seguido de 2 enjuagues con agua destilada estéril. Se sembraron en cajas Petri con medio papa dextrosa-agar (PDA) e incubaron a 26 °C por una semana. Los aislamientos se purificaron siguiendo la técnica de punta de hifa. La identificación se realizó morfológicamente en base a la clave taxonómica de Erwin y Ribeiro (1996).

**2.2.4 Preparación de inóculo.** El aislamiento más virulento se incrementó y cultivó en cajas Petri con medio V8<sup>®</sup> durante 10 días a 28 °C. Cuando la colonia del patógeno cubrió totalmente la caja Petri, con sacabocado se tomaron rodajas de aproximadamente 15 mm de diámetro del medio de cultivo con micelio, se colocaron en caja Petri con agua destilada estéril y se incubaron una semana a 28 °C para inducir la formación de esporangios. La liberación de zoosporas se indujo manteniendo las cajas Petri a 7 °C por 40 min y después a temperatura ambiente por 30 min (Tuite, 1969). La concentración de zoosporas fue ajustada a 75 000 zoosporas<sup>-1</sup> mL usando una cámara de Neubauer. Esta concentración había sido

determinada como óptima para la evaluación de la resistencia en un estudio previo.

**2.2.5 Ensayo de la resistencia.** Para la evaluación de la resistencia, semillas de las cuatro generaciones a evaluar, incluyendo el progenitor susceptible (P1), progenitor resistente (P2), F1 y F2, se sembraron en invernadero en macetas de 250 mL con suelo estéril. Las generaciones se establecieron en un diseño completamente al azar con tres repeticiones: 25 plantas de cada progenitor, 20 de cada F1 y 30 de cada F2.

Las plántulas se inocularon aplicando 5 mL de una suspensión de zoosporas con una concentración de inóculo de 375 000 zoosporas mL<sup>-1</sup>(concentración óptima en ensayo previo) en el cuello de la planta a los 35 días después de la siembra, cuando éstas habían alcanzado 20 cm de altura. Para evitar escapes, se aplicó una segunda dosis similar de inóculo 12 días más tarde. Las condiciones óptimas para favorecer la infección de *P. parasitica* fueron proporcionadas siguiendo la técnica de tanques de agua con temperatura controlada descrita por Walker (1957), manteniendo la temperatura constante a 24 °C en el suelo sumergiendo los contenedores con las plántulas en tres cuartas partes en agua (sin hundir la maceta) y colocando termostatos en el agua a 28 °C en constante agitación con difusores para transferir el calor del agua al suelo de la maceta. Para mantener la temperatura del invernadero entre 24 °C y 28 °C se usaron calentadores eléctricos.

**2.2.6 Medición de la severidad.** La severidad de la enfermedad se registró en dos fechas con espacio de siete días, iniciando la evaluación seis días después de la inoculación. Para esta medición se utilizó una escala arbitraria con cinco niveles donde: 1) planta sana con hojas turgentes y color verde; 2) necrosis < 2.0 cm en la base del tallo y algunas hojas con clorosis; 3) necrosis de 2.0 a 3.0 cm en la base del tallo y hojas con clorosis; 4) necrosis > 3.0 cm en el tallo, planta curvada con hojas inferiores cloróticas, marchitas o defoliada y 5) planta muerta. Se evaluaron 56 genotipos: 9 progenitores (con 28 combinaciones), 14 cruas

directas F1 y sus 14 F2, en un diseño completamente al azar con tres repeticiones.

**2.2.7 Análisis estadístico y genético.** Para analizar la información se agruparon en cuatro generaciones, incluyendo progenitores susceptibles (P1), progenitores resistentes (P2), F1 y F2.

**2.2.8 Estimación de medias y comparaciones ortogonales.** El cálculo de las medias se realizó para confirmar la diferencia en incidencia y severidad entre P1, P2, F1 y F2. Se evaluó la significancia de tres contrastes de interés, entre los cuales dos son ortogonales. Estos contrastes permitieron evaluar el efecto de factores genéticos lo que representa una alternativa de análisis debido a la falta de retrocruzas.

Debido a que el modelo propuesto por Mather y Jinks (1971) no era adecuado para este estudio por la falta de retrocruzas y algunas cruzas que no se lograron en el dialélo, se procedió a realizar el análisis de medias generacionales con las cruzas disponibles utilizando el modelo para efectos aleatorios descrito por Steel y Torrie (1960) para parcelas divididas (Cuadro 3). La significancia de los efectos genéticos fue determinada aplicando la prueba de *t*. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa SAS 9.3 (SAS Institute, 2012).

**Cuadro 6.** Modelo utilizado para el análisis de varianza de la severidad en cuatro generaciones de jamaica.

Fuentes de variación	Grados de libertad (gl)	Cuadrados medios (CM)
Fechas (R)	(r-1)	$\sigma_{\varepsilon}^2 + b\sigma_{\delta}^2 + ab\sigma_p^2$
Cruzas (A)	(a-1)	$\sigma_{\varepsilon}^2 + b\sigma_{\delta}^2 + r\sigma_{\alpha\beta}^2 + rb\sigma_{\alpha}^2$
Error (a)	(r-1)(a-1)	$\sigma_{\varepsilon}^2 + b\sigma_{\delta}^2$
Generaciones (B)	(b-1)	$\sigma_{\varepsilon}^2 + r\sigma_{\alpha\beta}^2 + ra\sigma_{\beta}^2$
CruzasxGeneraciones (AXB)	(a-1)(b-1)	$\sigma_{\varepsilon}^2 + r\sigma_{\alpha\beta}^2$
Error (b)	a(b-1)(r-1)	$\sigma_{\varepsilon}^2$

**2.2.9 Estimacion de los parámetros genéticos.** La heredabilidad en sentido amplio se calculó aplicando la fórmula propuesta por Warner (1952):

$$H^2 = [V_{F2} - (V_{P1} + V_{P2} + V_{F1})/3]/V_{F2}$$

donde:

$H^2$ = heredabilidad en sentido amplio

$V_{P1}$ = varianza fenotípica de progenitor susceptible

$V_{P2}$ = varianza fenotípica de progenitor resistente

$V_{F1}$ = varianza fenotípica de F1

$V_{F2}$ = varianza fenotípica de F2

El avance genético se calculó de acuerdo a Johnson *et al.* (1955) con una intensidad de selección de  $i = 1\%$  y  $i = 5\%$  como sigue:

$$AG = i \times H_A \times \sqrt{V_{F2}}$$

donde:

$H_A$ = heredabilidad en sentido amplio

$i$  = nivel de intensidad de selección

$V_{F2}$ = varianza fenotípica de la F2

## 2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las severidades promedio de las cuatro generaciones fueron diferentes numéricamente, lo que no implica que esas diferencias fueran estadísticamente significativas (Cuadro 4). El promedio del progenitor resistente (P2) fue de 1.43 y el promedio del progenitor susceptible (P1) de 2.42. Para definir el umbral que permita decidir si las cruzas de estos progenitores tienen características dominantes o recesivas a la susceptibilidad, se usó el promedio de los progenitores  $((P1+P2)/2)$ , o sea 1.94. La dominancia o no de la cruza se deduce al comparar la media en la generación F1, con promedio de 2.25 y en la F2 con 2.37. Dado que en la F1 el promedio de la susceptibilidad fue mayor de 1.94 y muy cercano al promedio del progenitor susceptible (2.4285), se infiere que la craza tuvo características dominantes en la susceptibilidad al patógeno que coincide por lo reportado en algunas cruza al estudiar la resistencia de maíz a *Aspergillus flavus* (Hamblin y White, 2000), información que se presenta en el Cuadro 7.

**Cuadro 7.** Medias generacionales de severidad en plántulas de jamaica inoculadas con *P. parasitica*.

Generación	Severidad promedio
<sup>1</sup> P1	2.4285
P2	1.4357
F1	2.2464
F2	2.3678

P1= Progenitor susceptible, P1= Progenitor resistente

De acuerdo con los resultados del Cuadro 8, no hubo diferencias significativas para el efecto principal de las cruza, sin embargo la interacción fechas x cruza es significativa, indicando que los resultados permiten concluir objetivamente en función del modelo utilizado. El análisis de varianza de las cuatro generaciones (P1, P2, F1 y F2) permite deducir que algunas generaciones comparadas en pares son estadísticamente altamente significativas (1% de nivel de significancia).

Con este resultado, se verificó la suposición de normalidad en el análisis. Como resultado, la validación confirma que el modelo utilizado es apropiado para los datos obtenidos (Cuadro 6).

La comparación ortogonal entre los progenitores P1 vs P2, mostró que la diferencia de sus promedios es significativamente diferente de cero al 1% de significancia, mientras que la comparación entre F1 y F2 resultó en una diferencia no significativa. Un contraste de interés, aunque no ortogonal, es el que compara el efecto promedio de los progenitores contra la F1, que resultó no significativa. Se puede observar que las comparaciones ortogonales fueron una opción viable debido a la ausencia de las retrocruzas, mencionado con anterioridad.

Al analizar la suma de cuadrados que corresponde al factor generaciones, resultó en que 77% es debido a los progenitores (i.e. el contraste ortogonal P1 vs P2 contribuye con el 13.8 del total de 17.94 debido a progenitores). Estos resultados muestran la gran importancia de los efectos aditivos en la determinación de la resistencia en jamaica a *P. parasitica* que coincide con otros trabajos donde se reporta mayor importancia de los efectos aditivos en la resistencia en maíz a *Sphacelotheca reiliana* (Bernardo *et al.*, 1992), *Aspergillus* (Hamblin y White, 2000). La suma de cuadrados correspondiente al contraste  $(P1+P2)/2$  vs F1 (conocida como heterosis) es pequeña, aunque significativa y la falta de significancia de la diferencia entre F1 y F2 sugieren baja importancia de los efectos de dominancia. La presencia de heterosis se debió principalmente a efectos aditivos, lo que se evidencia en la falta de endogamia (indicada por la no significancia de la diferencia entre los valores de los promedios de la F1 y F2).

**Cuadro 8.** Componentes de la varianza para severidad en cuatro generaciones de plántulas de jamaica inoculadas con *P. parasitica*.

Fuentes de variación	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrados Medios (CM)
Fechas (a-1)	1	52.94	52.94*
Cruzas (c-1)	13	4.17	0.32 <sup>ns</sup>
Fechas x cruzas (a-1)(c-1)	13	1.095	0.08
Generaciones (g-1):	3	17.94	
P1 vs P2	1	13.8	13.8*
F1 vs F2	1	0.21	0.21 <sup>ns</sup>
(P1+P2)/2 vs F1	1	1.84	1.8*
CruzasxGeneraciones (A x B)	39	6.84	0.175
Error C(a-1)(g-1)	42	10.99	
Error Total	111	93.58	

\* Significativo a nivel de probabilidad del 1 %. <sup>ns</sup> No significativo.

El efecto de la interacción cruzas x generaciones resultó no significativa (1 %). El valor de la heredabilidad, en sentido amplio, es relativamente alto (37 %) comparado con valores de 9 y 16 % reportado en tomate para *Alternaria alternata* (Cassol y Clair, 1994), lo que sugiere que el carácter pueden ser fijado fácilmente con un programa de selección simple resultando un progreso rápido (Wannows *et al.*, 2015) y las ganancias predichas por intensidad de selección de 1 o 5 % son 0.96 y 0.74 unidades, respectivamente. El alto valor de heredabilidad y genética acoplados sugieren que la selección recurrente puede ser un método efectivo (Márquez, 1988) en el desarrollo de variedades de jamaica resistentes a *P. parasitica*.

## 2.4 CONCLUSIONES

- Los efectos aditivos fueron más importantes que los efectos de dominancia para la resistencia en jamaica a *P. parasitica*.
- La heredabilidad de resistencia, en sentido amplio, fue de 37 %.
- Para incrementar la resistencia genética a *P. parasitica* en variedades susceptibles de jamaica, se puede implementar un programa recurrente de mejoramiento.

## 2.5 LITERATURA CITADA

- Acquaah, G. 2007. Principles of plant genetics and breeding. Blackwell, Oxford Publ. 385 p.
- Adamson, W. C., and O'Bryan, J. E. 1981. Inheritance of photosensitivity in roselle, *Hibiscus sabdariffa*. J. Heredity 72:443-444.
- Akhshi, N., Cheghamirza, K., Nazarian-Firouzabadi, F., and Ahmadi, H. 2014. Generation mean analysis for yield components in common vean. Iranian J. Plant Physiol. 4:1079-1085.
- Amusa, N. A., Adegbite, A. A., and Oladapo, M. O. 2005. Vascular wilt of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) in the humid forest region of south-western Nigeria. Plant Pathol. J. 4:122-125.
- Anel, C. T., Thockhom, R., Subapriya, S. M., Thockhom, J., and Singh, S. S. 2016. *Hibiscus sabdariffa*- A natural micronutrient source. Int. J. Adv. Biol. Sci. 3:243-248.
- Bandi, K. H. R., and Appalaswamy, A. 2014. Variability, heritability and genetic advance studies on roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). Environ. Ecol. 32:150-153.
- Bernardo, R. 2002. Breeding for quantitative traits in plants. 2nd ed. Stemma Press, Woodbury, MN. 369 p.
- Bernardo, R., Bourrier, M., and Olivier, J. L. 1992. Generation means analysis of resistance to head smut in maize. Agronomie 12:303-306.

- Boccas, B., and Pellegrin, F. 1976. Evaluation de la résistance de quelques varieties de roselle au *Phytophthora parasitica* Dast. Cotton Fibres Trop. 31:231-234.
- Cassol, T., and Clair, D. A. St. 1994. Inheritance of resistance to blackmold (*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler) in two interspecific crosses of tomato (*Lycopersicon esculentum* x *L. cheesmanii* f. *typicum*). Theor. Appl. Genet. 88:581-588.
- Checa, O., Ceballos, H., and Blair, M. W. 2006. Generation means analysis of climbing ability in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). J. Heredity 97:456-465.
- El-Refaey, R. A., and Abd El-Razek, U. A. 2013. Generation mean analysis for yield, its components and quality characteristics in four crosses of Egyptian cotton (*Gossypium barbadense* L.). Asian J. Crop Sci. 5:153-166.
- Erwin, D. C., and Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathol. Soc. St. Paul, Minnesota, USA. 562 p.
- Falusi, O. A. 2008. Inheritance of stem pigmentation in two local varieties of *Hibiscus sabdariffa* in Nigeria. African J. Plant Sci. Biotechnol. 2:107-108.
- Griffing, B. 1956. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel-crossing system. Aust. J. Biol. Sci. 9:463-493.
- Hamblin, A. M., and White, D. G. 2000. Inheritance of resistance to Aspergillus ear rot and aflatoxins production of corn from Tex6. Gen. Phytopathol. 90:292-296.
- Hassan, N., Shimizu, M., and Hyakumachi, M. 2014. Occurrence of root rot and vascular wilt diseases in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in upper Egypt. Mycobiology 42:66-72.
- Hernández, M. J. y Romero, C. S. 1990. Identificación del agente causal de “pata prieta de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa*, L.)” y pruebas de fungicidas para su control bajo condiciones de invernadero. Rev. Chapingo 67-68:50-54.
- Hussein, M. A., Othman, M., and Mourad, F. H. 2017. Generation mean analysis using generation variance in maize traits. Iraqi J. Agric. Sci. 48:24-29.
- Ibrahim, M. M., and Hussein, R. M. 2006. Variability, heritability and genetic advance in some genotypes of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). World J. Agric. Sci. 2:340-345.

- Johnson, H. W., Robinson, H. F., and Comstock, R. E. 1955. Estimates of genetic and environmental variability in soybean. *Agron. J.* 47:314-318.
- Márquez, S. F. 1988. *Genotecnia vegetal: Métodos, teoría, resultados*. Tomo II. AGT ed. S.A. 665 p.
- Mather, K., and Jinks, J. L. 1971. *Biometrical genetics*. 2<sup>nd</sup> ed. Chapman and Hall Ltd. 382 p.
- Minton, A. N., and Adamson, W. C. 1979. Control of *Meloidogyne javanica* and *M. arenaria* on kenaf and roselle with genetic resistance and nematicides. *J. Nematol.* 11:37-41.
- Omalsaad, M. O., and Islam, A. K. M. A. 2012. Characterization of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) and kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) accessions from different origins based on morpho-agronomic traits. *Internatl. J. Plant Breed.* 6:1-6.
- Ooi, K. H., Salleh, B., Hafiza, M. H., and Zainal, A. A. A. 1999. Interaction of *Fusarium oxysporum* with *Meloidogyne incognita* on roselle. *J. Perlindungan Tanaman Indonesia* 5:83-90.
- Ortega-Acosta, S. A., Hernández-Morales, J., Sandoval-Islas, J. S., 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. *Rev. Mex. Fitopatol.* 33:173-194.
- Piepho, H. P., and Möhring, J. 2010. Generation means analysis using mixed models. *Crop Sci.* 50:1674-1680.
- Ploetz, R.C., Palmateer, A.J., Geiser, D. M., and Juba, J. H. 2007. First report of *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* on roselle in the United States. *Plant Dis.* 91:639.
- Said, A. A. 2014. Generation mean analysis in wheat (*Triticum aestivum* L.) under drought stress conditions. *Ann. Agric. Sci.* 59:177-184.
- SAS Institute. 2012. SAS release 9.3 ed. Cary, NC: SAS Institute.
- Sher, H., Iqbal, M., Khan, K., Yasir, M., and Rahman, H. 2012. Genetic analysis of maturity in flowering characteristic in maize (*Zea mays* L.). *Asian Pacific J. Trop. Biomed.* 2:621-626.

- Silva, L. R. A., Rodrigues, R., Pimenta, S., Correa, J. W. S., Araújo, M. S. B., Bento, C. S., and Sudré, C. P. 2017. Inheritance of bacterial spot resistance in *Capsicum annum* var. *annum*. Genet. Mol. Res. 16:1-11.
- Steel, R. G. D., and Torrie, J. H. 1990. Bioestadística: principios y procedimientos. 2ª ed. McGraw-Hill. 622 p.
- Steiner, A. A. 1961. A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. Plant Soil 15:134-154.
- Sun, Z., Lower, R. L., and Staub, J. E. 2006. Analysis of generation means and components of variance for parthenocarpy in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plant Breed. 125:277-280.
- Tuite J. 1969. Plant pathological methods. Fungi and bacteria. Burgess Publ. Co., Minneapolis, MN. 239 p.
- Walker, J. C. 1957. Plant Pathology. 2nd. Ed. McGraw-Hill Book Co., Inc. USA. 707 p.
- Wannows, A. A., Sabbouh, M. Y., and AL-Ahmad, S. A. 2015. Generation means analysis technique for determining genetic parameters for some quantitative traits in two maize hybrids (*Zea mays* L.). Jordan J. Agric. Sci. 11:59-72.
- Warner, J. N. 1952. A method of estimating heritability. Agron. J. 44:427-430.

**CAPÍTULO III. VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A  
*PHYTOPHTHORA PARASITICA* DASTUR EN JAMAICA (*HIBISCUS  
SABDARIFFA* L.) POR MARCADORES ISSR.**

**Variability of the resistance response to *Phytophthora parasitica* Dastur in  
roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) by ISSR markers**

Rafael Rojas-Rojas<sup>1</sup>, Carlos De León-García de Alba<sup>2</sup>, Víctor Heber Aguilar-Rincón<sup>3</sup>, Ciro Velasco-Cruz<sup>4</sup>, Ernestina Valadez-Moctezuma<sup>5\*</sup> y Javier Hernández-Morales<sup>6</sup>. <sup>1,2,6</sup> Posgrado de Fitopatología, <sup>3</sup>Posgrado de Genética, <sup>4</sup>Posgrado de Estadística. Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. Km 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Edo. México, C.P. 56230. <sup>5</sup>Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carr. México-Texcoco, Chapingo, Texcoco, Edo. México, C.P. 56230. \*Autor de correspondencia: nestty56@yahoo.com.mx

RESUMEN. El cultivo de jamaica es afectado por la presencia de enfermedades como la pudrición del tallo causada por *Phytophthora parasitica*. El uso de genotipos resistentes es la estrategia de manejo económica y ecológicamente segura para controlar la enfermedad. Los ISSR fueron evaluados para determinar la variabilidad genética de variedades de jamaica. Los iniciadores ISSR mostraron variación en el número de bandas polimórficas, porcentaje de bandas polimórficas, información contenida en el iniciador y poder de resolución. El porcentaje de bandas polimórficas fue 72%, el promedio varió de 48% a 92%, mientras que el poder de resolución varió de 0.96 a 1.85. Los once iniciadores polimórficos mostraron variación con respecto a la información contenida en el iniciador y el poder de resolución. Se encontró que los marcadores ISSR son útiles para identificar la variabilidad genética entre las variedades de jamaica. El dendrograma muestra que los 56 genotipos evaluados generalmente se agruparon de acuerdo a su respuesta susceptible, tolerante y resistente a *P. parasitica*. El análisis de la estructura genética mostró un valor  $K=3$  formando 3 subpoblaciones.

**PALABRAS CLAVE:** severidad, polimorfismo, resistencia

ABSTRACT. Roselle crop is affected by the presence of diseases such as stem rot caused by *Phytophthora parasitica*. The use of resistant genotypes is the economically and ecologically safe management strategy to control the disease. ISSRs were evaluated to determine the genetic variability of roselle varieties. The ISSR primers showed variation in the number and percentage of polymorphic bands, percentage of polymorphic bands, information contained in the primer and the resolution power. The percentage of polymorphic bands was 72%, the average ranged from 48% to 92%, while the resolution power ranged from 0.96 to 1.85. The eleven polymorphic primers showed variation with respect to the information contained in the initiator and the resolution power. ISSR markers were found to be useful for identifying genetic variability among roselle varieties. The dendrogram shows that the 56 genotypes evaluated were generally grouped according to their susceptible, tolerant and resistant response to *P. parasitica*. The analysis of the genetic structure with STRUCTURE software showed a value  $K=3$  forming 3 sub-populations.

**KEY WORDS:** severity, polymorphism, resistance

### 3.1 INTRODUCCIÓN

La jamaica es una planta autógama que pertenece a la familia de las Malváceas originaria de África Oriental. Es una especie tetraploide con número de cromosomas  $2n=4x=72$  (Wilson, 2006) y que se cultiva en zonas tropicales y subtropicales y se adapta a una gran variedad de climas y condiciones de suelo (Fasoyiru *et al.*, 2005).

La jamaica se cultiva para la producción de cálices deshidratados que se utilizan para la elaboración de bebidas, gelatinas, mermeladas, saborizantes en la industria alimentaria y en la medicina herbolaria. El extracto de cálices presenta efecto antibacterial, antioxidante, diurético, reductor de colesterol y antidiabético (Lin *et al.*, 2007; Borrás-Linares *et al.*, 2015; Jiménez-Ferrer *et al.*, 2015; Garbi *et al.*, 2016; Mozaffari-Khosravi *et al.*, 2009) debido a la fuerte acción antioxidante inducida por el contenido de ácidos fenólicos, ácidos orgánicos y antocianinas (Da-Costa-Rocha *et al.*, 2014).

Uno de los principales factores que reducen el rendimiento son las enfermedades, como la pudrición del tallo de la jamaica causado por el oomiceto *Phytophthora parasitica* que reduce hasta en un 30% el rendimiento. La enfermedad se presenta principalmente en parcelas con antecedentes del patógeno (Hu *et al.*, 2008). El control químico tiene la desventaja de ser costoso además que se reportan cepas resistentes (Hu, 2008; Parkunan *et al.*, 2010). La eliminación del patógeno en el suelo es difícil debido a la capacidad de producir estructuras de resistencia y sobrevivir por muchos años en otros hospederos (Matheron y Porchas, 2009). La resistencia genética es el método más confiable de control (Erwin y Riveiro, 1996) y el uso de genotipos resistentes es la estrategia de manejo más duradera, económica y ecológicamente segura para el control de *P. parasitica* (Meziadi *et al.*, 2005; Parkunan *et al.* 2010).

A pesar de que México no es centro de origen de la jamaica (Areces, 2005) la identificación de accesiones sobresalientes y el análisis de la variabilidad es esencial para iniciar un programa de selección de germoplasma (Mostofa *et al.*, 2002; Ibrahim *et al.*, 2013) ya que permite detectar y mostrar el nivel de variación genética dentro y entre las poblaciones.

Las huellas de DNA asistidas por marcadores moleculares pueden diferenciar especies, establecer relaciones filogenéticas y ayudar a determinar el nivel de variabilidad genética de las poblaciones (Iqbal *et al.*, 2010). Los marcadores ISSR son altamente sensibles para detectar polimorfismo genómico y ofrecen un gran potencial para determinar niveles de variación intra e interespecíficos cuando no hay información genómica disponible. Los marcadores ISSR incluyen una unidad central de microsatélites, con iniciadores de oligonucleótidos de 15-35 pb de longitud no anclados o anclados en el extremo 3' o 5' conteniendo de uno a diez nucleótidos degenerados, que se heredan de manera Mendeliana (Ratnaparkhe *et al.*, 1998; Bishoyi *et al.*, 2016;).

La mayoría de los trabajos del género *Hibiscus* se basan en el estudio de la estructura y diversidad de las poblaciones utilizando marcadores moleculares

como RAPD, AFLP, ISSR y SSR principalmente en la especie *Hibiscus cannabinus* y muy pocos en *Hibiscus sabdariffa* (Satya, 2013).

Se ha reportado que la variabilidad fenotípica no siempre coincide con el patrón de variación y diversidad genotípica de la población en otras especies (Douaihy *et al.*, 2012), aunque también se ha reportado la congruencia parcial.

No existen estudios relacionados con la variabilidad de la respuesta a *P. parasitica* sustentados con marcadores moleculares en jamaica, por lo que es necesario analizar la variabilidad fenotípica de variedades con tolerancia al patógeno.

El objetivo de la presente investigación fue analizar con marcadores moleculares ISSR la variabilidad genética de variedades de jamaica en respuesta a la infección por *Phytophthora parasitica*.

### 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

**3.2.1 Material vegetal.** Se utilizó una planta proveniente de cinco variedades clasificadas previamente como susceptibles y cinco variedades resistentes a *P. parasitica* (Capítulo 2), además de sus cruzas 10 progenies de la generación F1 y 45 progenies de la generación F2 (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Generación, nombre y respuesta de las variedades de jamaica evaluadas.

Generación	Nombre	Respuesta
Progenitor	UAN 6 (novillero)	Susceptible
Progenitor	UAN 23-1	Susceptible
Progenitor	3Q3	Susceptible
Progenitor	UAN 20	Susceptible
Progenitor	UAN 6-1	Susceptible
Progenitor	UAN 13	Resistente
Progenitor	Jersey (acriollada)	Resistente
Progenitor	UAN 13-1	Resistente
Progenitor	10	Resistente
Progenitor	UAN 8	Resistente
F1 A	UAN 6 (novillero) x UAN 13 + UAN 6 (novillero) x Jersey (acriollada)	Tolerante
F1 B	UAN 6 (novillero) x UAN 13-1 + UAN 6 (novillero) x 10 + UAN 6 (novillero) x UAN 8	Tolerante
F1 C	UAN 23-1 x UAN 13 + UAN 23-1 x Jersey (acriollada)	Tolerante
F1 D	UAN 23-1 x UAN 13-1 + UAN 23-1 x 10 + UAN 23-1 x UAN 8	Tolerante

F1 E	3Q3 x UAN 13 + 3Q3 x Jersey (acriollada)	Tolerante
F1 F	3Q3 x UAN 13-1 + 3Q3 x 10 + 3Q3 x UAN 8	Tolerante
F1 G	UAN 20 x UAN 13 + UAN 20 x Jersey (acriollada)	Tolerante
F1 H	UAN 20 x UAN 13-1 + UAN 20 x 10 + UAN 20 x UAN 8	Tolerante
F1 I	UAN 6-1 x UAN 13 + UAN 6-1 x Jersey (acriollada)	Tolerante
F1 J	UAN 6-1 x UAN 13-1 + UAN 6-1 x 10 + UAN 6-1 x UAN 8	Tolerante
F2	UAN6(novillero) x UAN 13	Tolerante
F2	UAN6(novillero) x UAN 13	Resistente
F2	UAN6(novillero) x Jersey acriollada	Tolerante
F2	UAN6(novillero) x Jersey acriollada	Resistente
F2	UAN6(novillero) x UAN 13-1	Tolerante
F2	UAN6(novillero) x UAN 13-1	Resistente
F2	UAN6(novillero) x 10	Tolerante
F2	UAN6(novillero) x 10	Resistente
F2	UAN6(novillero) x UAN 8	Tolerante
F2	UAN 23-1 x UAN 13	Tolerante
F2	UAN 23-1 x UAN 13	Resistente
F2	UAN 23-1 x Jersey acriollada	Tolerante
F2	UAN 23-1 x UAN 13-1	Resistente
F2	UAN 23-1 x UAN 13-1	Tolerante
F2	UAN 23-1 x 10	Resistente
F2	UAN 23-1 x UAN 8	Tolerante
F2	UAN 23-1 x UAN 8	Resistente
F2	3Q3 x UAN 13	Tolerante
F2	3Q3 x UAN 13	Resistente
F2	UAN 23-1 x Jersey acriollada	Tolerante
F2	UAN 23-1 x Jersey acriollada	Resistente
F2	UAN 23-1 x UAN 13-1	Tolerante
F2	UAN 23-1 x UAN 13-1	Resistente
F2	UAN 20 x UAN 13	Tolerante
F2	UAN 20 x UAN 13	Resistente
F2	UAN 20 x UAN 13-1	Tolerante
F2	UAN 20 x 10	Tolerante
F2	UAN 20 x UAN 25	Resistente
F2	UAN20 x UAN8	Tolerante
F2	UAN6-1 x UAN13	Tolerante
F2	UAN6-1 x UAN13	Resistente
F2	UAN6-1 x Jersey acriollada	Tolerante
F2	UAN6-1 x Jersey acriollada	Resistente
F2	UAN6-1 x UAN13-1	Tolerante
F2	UAN6-1 x 10	Tolerante
F2	UAN6-1 x 10	Resistente

**3.2.2 Inoculación de las plantas.** En el año 2016, las plantas fueron establecidas en macetas con 250 mL de suelo estéril en invernadero. Una semana antes de la inoculación, dos terceras partes de las macetas con las plántulas fueron sumergidas en tanques con agua para controlar la temperatura. Se inocularon 30 plántulas de cada variedad aplicando 5 mL de una suspensión de zoosporas de *P. parasitica* con una concentración de inóculo de 375 000 zoosporas en el cuello de la planta 35 días después de la siembra y cuando alcanzaron 20 cm de altura. Se aplicó una segunda inoculación con una concentración similar de inóculo a los 12 días para evitar escapes. Con la finalidad de mantener la temperatura constante a 24 °C en el agua y suelo, se colocaron termostatos y el agua se mantuvo en agitación y tener condiciones adecuadas para la infección siguiendo la técnica

descrita por Walker (1957). Se usaron calentadores eléctricos para mantener la temperatura del invernadero entre 20 y 25 °C.

**3.2.3 Evaluación de la resistencia.** A los 8 y 15 días después de la inoculación se registró la severidad del daño en las plantas usando una escala nominal de cinco niveles donde: 1) planta sana; 2) necrosis < 2.0 cm en la base del tallo; 3) necrosis de 2.0 a 3.0 cm en la base del tallo y hojas con clorosis; 4) necrosis > 3.0 cm en el tallo, planta curvada con hojas inferiores cloróticas, marchitas o defoliada y 5) planta muerta.

**3.2.4 Extracción de ADN.** Se seleccionaron plantas medianamente resistentes (Nivel 3) y plantas resistentes (Nivel 1) a los 15 días después de la inoculación. No fue posible evaluar las plantas susceptibles en F1 y F2 debido que el tejido estaba degradado. La extracción se realizó en hojas jóvenes, por el método SDS-acetato de potasio descrito por Weising *et al.*, 2005.

**3.2.5 Cuantificación y calidad del ADN.** La concentración de ADN se determinó con espectrofotómetro (Eppendorf, Germany) (Accesolab S. A. De C.V.) calibrado a una absorbancia de 680 nm.

**3.2.6 Gel de agarosa.** La integridad del ADN de la extracción se verificó por electroforesis en gel de agarosa 1.4 %. El tiempo de corrida fue de 90 min a 90 voltios. Se usó marcador de 1 kb para estimar el peso de los fragmentos amplificados. El revelado se realizó sumergiendo el gel en una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/mL) por 10 min, seguido de un enjuague con agua destilada por 10 min y finalmente se llevo al fotodocumentador.

**3.2.7 Análisis molecular.** Se usaron 100 iniciadores ISSR del Kit UBC # 9 de la Universidad de British Columbia, Canadá (Sigma®) (Cuadro 10). Previo a la amplificación, se evaluaron los iniciadores con una variedad resistente y otra susceptible para seleccionar los 11 que mostrarán mayor polimorfismo.

La amplificación se realizó en un volumen de 25  $\mu$ L (100 ng del templado de ADN, 200  $\mu$ M de dNTPs, 2.5 mM de  $MgCl_2$ , 10 pmol de cada primer y 3 U de DNA polimerasa (Promega) con 1X Taq buffer) utilizando un termociclador MaxyGene Thermal Cycler (Applied Biosystem, USA). Las condiciones de termociclaje fueron: un ciclo a 94  $^{\circ}$ C por 5 min para la desnaturalización inicial, seguido por 35 ciclos (45 s a 94  $^{\circ}$ C para la desnaturalización, 45 s a temperatura de alineamiento específica para cada iniciador y una extensión a 72  $^{\circ}$ C por 2 min) y una extensión final a 72  $^{\circ}$ C por 10 min. Los productos de PCR fueron separados en gel de poliacrilamida 8 % en 1X TBE buffer por electroforesis a 230 volts por 110 min.

**Cuadro 10.** Iniciadores ISSR usados en el estudio de variabilidad de resistencia a *P. parasitica*.

Nombre	Secuencia (5´-3´)	Bases	T. alineamiento ( $^{\circ}$ C)
UBC 826	(AC) <sub>8</sub> C	17	54
UBC 827	(AC) <sub>8</sub> G	17	54
UBC 834	(AG) <sub>8</sub> YT	18	56
UBC 836	(AG) <sub>8</sub> YA	18	54
UBC 840	(GA) <sub>8</sub> YT	18	52
UBC 842	(GA) <sub>8</sub> YG	18	54
UBC 864	(ATG) <sub>6</sub>	18	54
UBC 874	(CCCT) <sub>4</sub>	16	56
UBC 890	VHV(GT) <sub>7</sub>	17	52
UBC 891	HVH(TG) <sub>7</sub>	17	54
UBC 895	AGAGTTGGTAGCTCTTGATC	20	54

H=(A,T,C), V=(G,A,C), Y=(C,T)

**3.2.8 Análisis de segregación.** Los fragmentos amplificados de DNA se codificaron en una matriz binaria donde “1= presencia” y “0= ausencia”. La estimación de la variabilidad se realizó en los progenitores, generación F1 y familias F2 segregantes. Los datos se analizaron con el programa FREE TREE 0.9.1.5 y el cálculo de la distancia genética se determinó usando el coeficiente Dice. Los árboles filogenéticos fueron construidos con el método de agrupamiento (UPGMA) y visualizados en el programa FigTree versión 1.4.3.

La capacidad de los iniciadores más informativos para diferenciar los individuos estudiados respecto a resistencia se evaluó calculando el contenido de información genética (PIC), índice de marcador (MI) y poder de resolución (Rp). El PIC se calculó usando la fórmula descrita por Roldán-Ruíz *et al.*, 2000:  $PIC_i = 2f_i(1-f_i)$ , donde:  $PIC_i$  es la información contenida en el iniciador  $i$ ,  $f_i$  la frecuencia de bandas presentes, y  $(1-f_i)$  la frecuencia de las bandas ausentes. El valor máximo de PIC para marcadores dominantes es 0.5 (De Riek *et al.*, 2001).

MI se calculó como  $MI = PIC \times \text{número de bandas polimórficas}$  y  $R_p$  (Prevost y Wilkinson, 1999) de acuerdo a la fórmula propuesta por Gilbert *et al.*, (1999) donde  $R_p = \sum lb$ ,  $lb$  representa la información de las bandas calculado con la fórmula:  $lb = 1 - (2 \times (0.5 - p))$ , donde  $p$  es la proporción de genotipos con  $b$  y  $l$ ; así como el porcentaje de bandas polimórficas (PPB).

Para el análisis de la estructura genética se empleo el programa STRUCTURE versión 2.3.4 (Pritchard y Wen, 2000); bajo las siguientes condiciones: 40 000 iteraciones y 20 000 repeticiones; se calcularon nueve valores de  $K$  y se estimó el número de grupos ( $K$ ) como el número maximizado al parámetro  $\Delta K$ .

### 3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los 11 iniciadores ISSR amplificaron 123 alelos de las cuales el 72% fueron polimórficos. En promedio, cada iniciador produjo en promedio de 11.2 alelos de los cuales 7.68 fueron polimórficos. El iniciador anclado UBC 834 produjo el 92 % de bandas polimórficas (Cuadro 11).

El mayor poder de resolución fue encontrado con lo iniciadores 826, 827 y 834, lo que sugiere la riqueza alélica y alto polimorfismo de los marcadores ISSR en las variedades evaluadas (Satya *et al.*, 2013).

**Cuadro 11.** Polimorfismo producido por marcadores ISSR en jamaica.

Iniciador	Secuencia	NTB	NPB	PPB	RP	PIC	MI
826	(AC) <sub>8</sub> C	10	8.5	85	1.70	0.17	1.18
827	(AC) <sub>8</sub> G	9	7.5	83	1.66	0.16	0.91
834	(AG) <sub>8</sub> YT	6	5.57	92	1.85	0.09	0.36
836	(AG) <sub>8</sub> YA	12	8.75	72	1.45	0.32	2.82
840	(GA) <sub>8</sub> YT	14	9.42	67	1.34	0.42	3.99
842	(GA) <sub>8</sub> YG	15	9.44	62	1.21	0.45	4.32
864	(ATG) <sub>6</sub>	10	7.41	74	1.48	0.29	1.85
874	(CCCT) <sub>4</sub>	5	3.83	76	1.53	0.10	0.33
890	VHV(GT) <sub>7</sub>	17	8.17	48	0.96	0.47	3.98
891	HVH(TG) <sub>7</sub>	15	8.53	56	1.13	0.44	3.92
895	AGAGTTGGTAGCTCTTGATC	10	7.39	73	1.47	0.25	1.51
<b>Total</b>		<b>123</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Promedio</b>		<b>11.2</b>	<b>7.68</b>	<b>72</b>	<b>1.43</b>	<b>0.28</b>	<b>2.28</b>

NTB=número total de bandas, NP=Número de bandas polimórficas, PPB=Porcentaje de bandas polimórficas, RP= Poder de resolución, PIC= Información contenida en el iniciador, MI= índice del marcador. H=(A,T,C), V=(G,A,C), Y=(C,T)

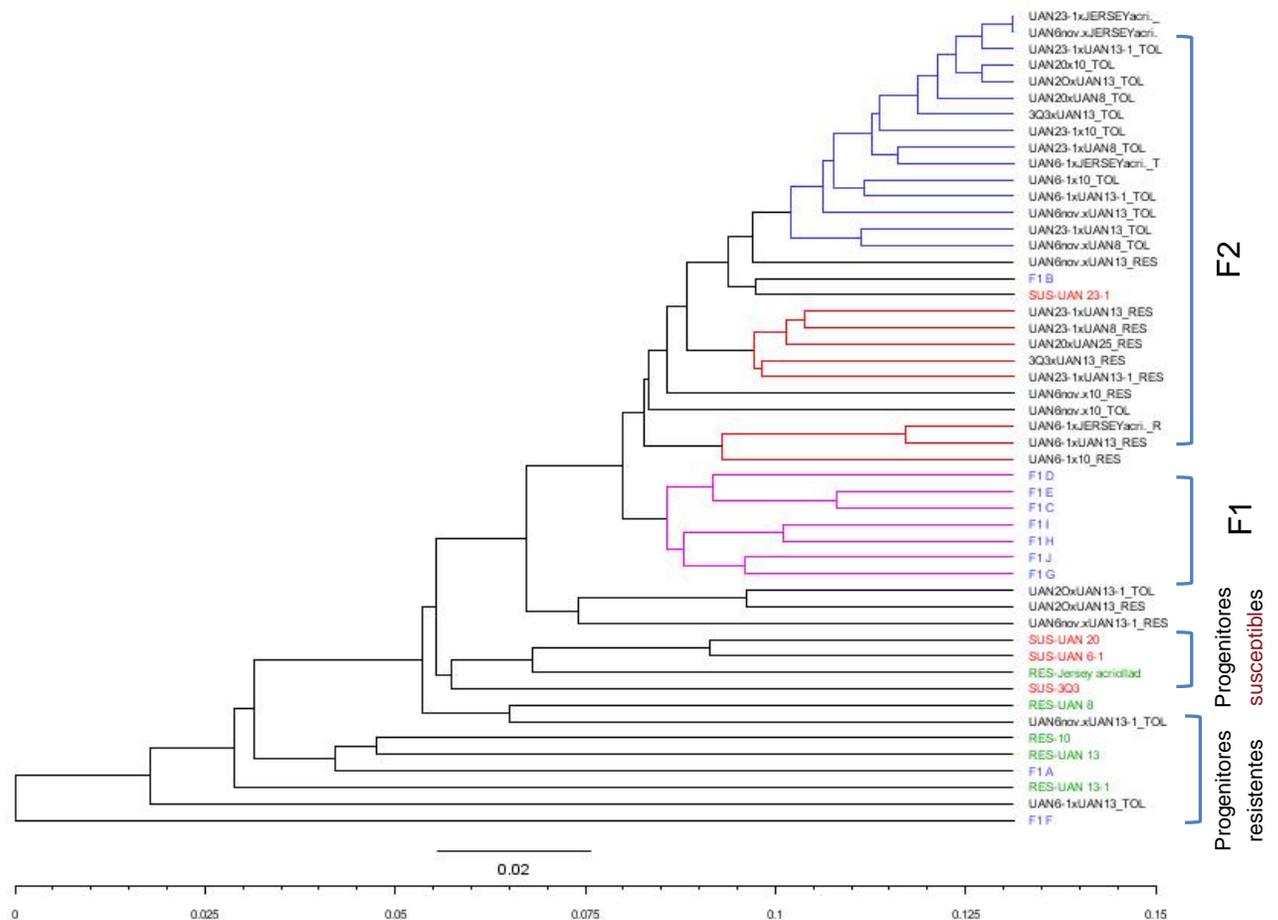
En este trabajo los ISSR detectaron variación entre los genotipos de jamaica con valores altos de polimorfismo(PBP=72 % y PIC=0.28) comparado con estudios de diversidad de 124 accesiones de jamaica donde reportan valores más bajos (PBP=18.41 % y PIC =0.106) (Bakasso *et al* 2013). Lo que sugiere que al realizar las cruces entre progenitores contrastantes se produjo hasta cierto polimorfismo lo que influyo en grado variabilidad detectada por los marcadores.

En general se observó que el número alto de alelos se pudo deber a que las repeticiones de dinucleótidos generan mayor número de amplicones, debido a que su distribución es más frecuente en el genoma de la planta comparado con las repeticiones de tri, tetra, y pentanucleótidos (Bishoyi *et al.*, 2016).

Las secuencias de los 11 iniciadores indican que los microsatélites más frecuentes encontrados en los genotipos de Jamaica contienen los nucleótidos repetidos (AC)<sub>n</sub>, (AG)<sub>n</sub>, (TG)<sub>n</sub> (Fernández *et al.*, 2002). En este sentido los iniciadores 890 y 891 produjeron mayor número de bandas, 17 y 15 respectivamente, aunque el porcentaje de bandas polimórficas fue bajo. Además que el mayor valor de Rp lo presentaron tres ISSR (826, 827 y 834) los cuales confirman que estos marcadores son capaces de distinguir cada uno de los genotipos (Fernández *et al.*, 2002).

El análisis de agrupamiento dividió los genotipos en 3 grupos de acuerdo a la respuesta en severidad (Figura 5). Los genotipos segregantes F2, tolerantes y resistentes, se agruparon separándose del grupo donde se ubicaron las F1.

Aunque los segregantes susceptibles F2 no se analizaron debido a que se usaron como indicador para clasificar las plantas tolerantes y resistentes, su expresión se puede observar en las F1 debido a que se usó la variedad susceptible en las cruces.

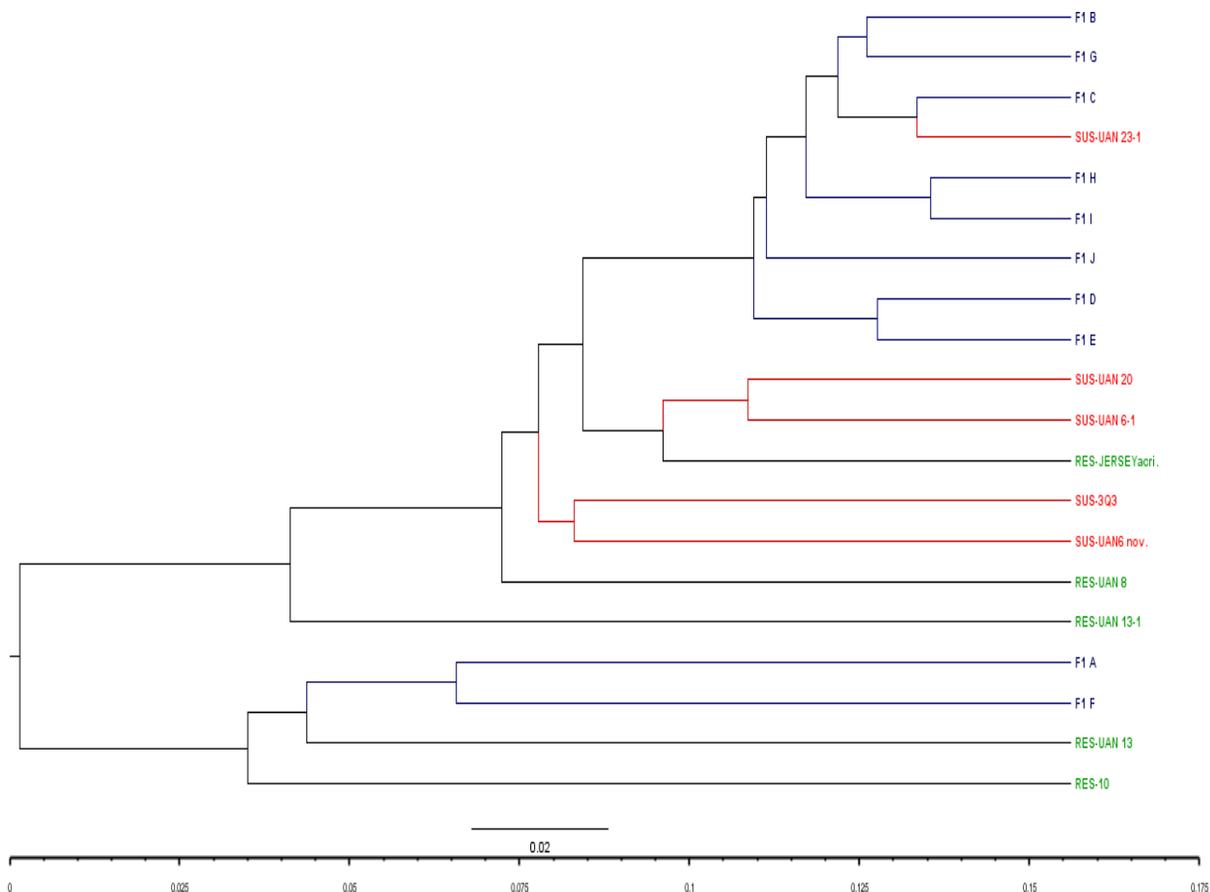


**Figura 5.** Agrupamiento de progenitores resistentes, susceptibles y su F1 de jamaica usando coeficiente Dice y el método UPGMA.

Los 11 iniciadores ISSR produjeron polimorfismo en los genotipos de jamaica lo que permitió su agrupamiento de acuerdo a su respuesta fenotípica entre genotipos, así como entre poblaciones susceptibles, tolerantes y resistentes. Lo cual coincide con Guasmi *et al.* (2012) quienes mencionan que los marcadores ISSR son útiles tanto en estudios de diversidad genética, pudiendo además estar asociados con caracteres como resistencia a enfermedades por lo que estos marcadores pueden aumentar la eficiencia y precisión del mejoramiento.

Se observa en general que los genotipos se agruparon de acuerdo a la genealogía (Figura 6) en dos grupos, de las F1 y progenitores, esto concuerda con estudios de diversidad genética en cebada al analizar genotipos con ISSR

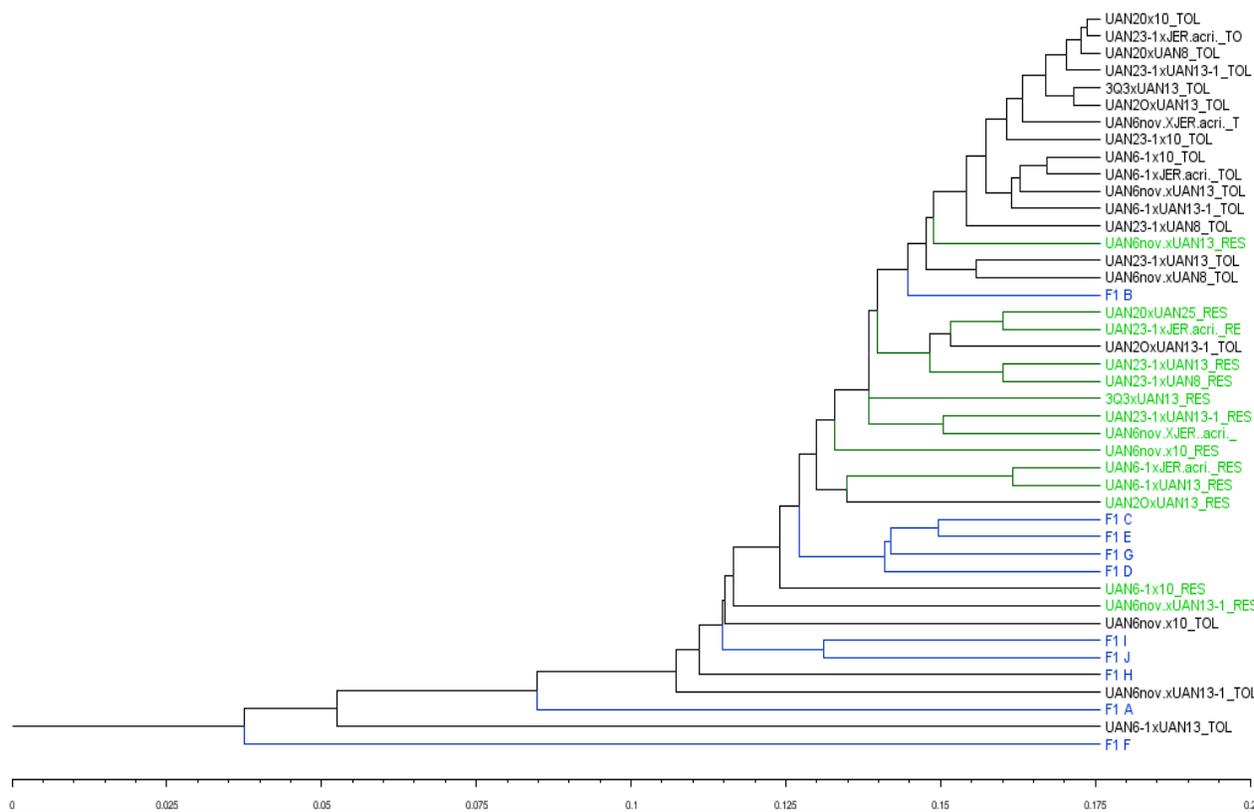
también observaron que los genotipos se agruparon de acuerdo a la genealogía (Fernández *et al.*, 2002; Guasmi *et al.*, 2012).



**Figura 6.** Agrupamiento de progenitores y F1 de jamaica usando coeficiente Dice y el método UPGMA.

Algunas progenies F1 no siempre se presentaron cercanas a sus progenitores. Probablemente se deba a que los análisis con la progenie F1 fueron realizados usando la mezcla de dos o tres genotipos de diferente genealogía. Dado que se usaron muestras mezcladas para producir ISSR pudo haber una mezcla de secuencias con diferente grado de homología con el iniciador, que pudieron amplificarse por lo que no es posible obtener información acerca de la variabilidad genética dentro de la población, sin embargo es posible obtener variabilidad entre diferentes población (Fernández *et al.*, 2002)

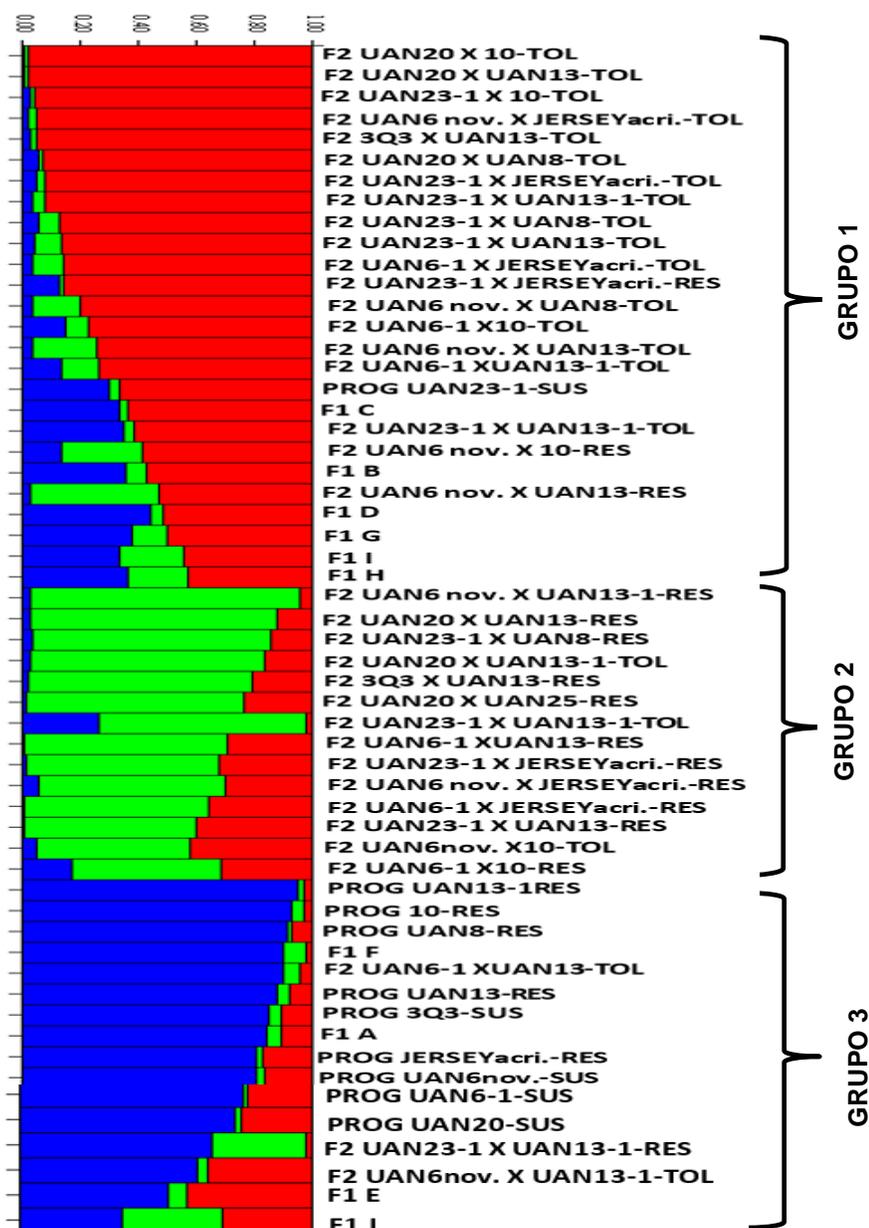
En la figura 7, la mayoría de los segregantes F2 con respuesta resistente se agruparon y cuatro genotipos F1 se mantuvieron cercanas, probablemente a que son genéticamente similares a los resistentes. Por otra parte, los genotipos F2 tolerantes en general se separaron del grupo de los resistentes. Por lo anterior se observó que el análisis molecular fue útil para diferenciar cada uno de los genotipos de acuerdo a su respuesta a la infección por *P. parasitica*. Esto coincide con reportes donde fue posible encontrar variabilidad genética con marcadores morfológicos y moleculares entre variedades de jamaica (Torres-Morán *et al.*, 2011) lo que puede ser de utilidad para diferenciar variedades etiquetadas con el mismo nombre pero con características morfológicas diferentes (Cheng *et al.*, 2002).



**Figura 7.** Agrupamiento de F1 y F2 de cruces de jamaica usando el coeficiente Dice y el método UPGMA.

La estructura genética de la población generada mediante el programa STRUCTURE (Figura 8), muestra un valor  $K=3$  como el número maximizado del parámetro  $\Delta K$ , indicando la presencia de tres grupos. El Grupo 1 esta formado por

19 segregantes F2 de los cuales el 76 % fueron tolerantes. En este grupo se ubicaron el 60 % de las F1's, se observa que están compuestas genéticamente por características de los tres grupos.



**Figura 8.** Estructura genética obtenida por el programa STRUCTURE de 56 genotipos de jamaica analizados con marcadores ISSR (K=3).

El Grupo 2 esta formado por 14 segregantes F2, de los cuales el 73 % tuvieron una respuesta resistente. En el Grupo 3 se incluyen el 90 % de los progenitores, lo que señala que la diferencia es muy estrecha. A excepción de

UAN 23-1-SUS que comparte su estructura con el Grupo 1, también se incluyen en este grupo el 40 % de las F1's. Esto indica que la jamaica a pesar de ser una especie introducida los genotipos mostraron variabilidad lo que demuestra su adaptación (Reed y Frankham, 2013).

Los resultados obtenidos sustentados con la caracterización fenotípica al inocular las variedades con el patógeno, sugieren que se podría iniciar un programa de mejoramiento genético para resistencia genética a *P. parasitica* en jamaica cruzando los progenitores resistentes, como las variedades 10 y UAN 13 con materiales agrupados como tolerantes o resistentes para fijar los caracteres de resistencia.

### **3.4 CONCLUSIONES**

Molecularmente se diferencio cada uno de los genotipos.

Los marcadores ISSR fueron capaces de diferenciar los genotipos susceptibles, tolerantes y resistentes.

Con base al análisis de la estructura genética, los ISSR permiten seleccionar genotipos elite en base a su respuesta al ataque del patógeno con la finalidad de iniciar cruzamientos dirigidos asistidos por marcadores moleculares.

El análisis de la estructura genética permitió obtener grupos donde se ubican los genotipos resistentes, tolerantes y susceptibles.

### 3.5 BIBLIOGRAFÍA

- Areces, B. F. 2005. Las especies cubanas de *Hibiscus* sección Furcaria (Malvaceae). Rev. Jardín Bot. Nal. 25-26:25-33.
- Bishoyi, A. K., Sharma, A., Kavane, A., and Geetha, K. 2016. Varietal discrimination and genetic variability analysis of *Cymbopogon* using RAPD and ISSR markers analysis. Appl. Biochem. Biotechnol. 179:659-670.
- Borrás-Linares, I., Fernández-Arroyo, S., Arráez-Roman, D., Palmeros-Suárez, P. A., Del Val-Díaz, R., Andrade-González, I., Fernández-Gutiérrez, A., Gómez-Leyva, J. F., and Segura-Carretero, A. 2015. Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican roselle (*Hibiscus sabdariffa*). Indust. Crops Prod. 69:385-394.
- Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., and Heinrich, M. 2014. *Hibiscus sabdariffa* L. A phytochemical and pharmacological review. Food Chem. 165:424-443.
- De Riek, J., Calsyn, E., Everaert, I., Van Bocksteal, E., and De Loose, M. 2001. AFLP based alternative for the assessment of the distinctness, uniformity and stability of sugar beet varieties. Theor. Appl. Genet. 103:1254-1256.
- Douaihy, B., Sobierajska, K., Jasińska, A. K., Boratyńska, K., Ok, T., Romo, A., Machon, N., Didukh, Y., Dagher-Karrat, B., and Boratinsky, A. 2012. Morphological versus molecular markers to describe variability in *Juniperus excels* subsp. *excelsa* (Cupressaceae). AoB Plants pls:13.
- Erwin, D. C., Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. eds Erwin, D. C., Ribeiro, O. K., editors. St. Paul, MN: APS Press. 562 p.
- Fernández, M. E., Figueiras, A. M., and Benito, C. 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. Theor. Appl. Genet. 104:845-851.
- Garbi, M. I., Saleh, M. S., Badri, A. M., Ibrahim, I. T., Mohammed, S. F., Alhassan, M. S., Elshikh, A. A., and Kabbashi, A. S. 2016. Antibacterial activity, phytochemical screening and cytotoxicity of *Hibiscus sabdariffa* (calix). Advanc. Med. Plant Res. 4:116-121.

- Guasmi, F., Elfalleh, W., Hannachi, H., Fères, K., Touil, L., Marzougui, N., Triki, T., and Ferchichi, A. 2012. The use of ISSR and RAPD markers for genetic diversity among South Tunisian barley. *Internal. Scholarly Res. Networks* 1:1-10.
- Hu, H. J., Hong, C. X., Stromberg, E. L., and Moorman, G. M. 2008. Mefenoxam sensitivity and fitness analysis of *Phytophthora nicotianae* isolates from nurseries in Virginia, USA. *Plant Pathology* 57: 728-736.
- Ibrahim, E. B., Abdalla, A. W. H., Ibrahim, E. A., and El Naim, A. M. 2013. Variability in some roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) genotypes for yield and its attributes. *Internal. J. Agric. Forestry.* 3:261-266.
- Iqbal, M. S., Nadeem, S., Mehboob, S., Ghafoor, A., Rajoka, M. I., Qureshi, A. S., and Niaz, B. 2011. Exploration of genotype specific fingerprinting of *Nigella sativa* L. using RAPD markers. *Turk. J. Agric. For.* 35:569-578.
- Jiménez-Ferrer, E., Alarcón-Alonso, J., Aguilar-Rojas, A., Zamilpa, A., Jiménez-Ferrer, C. I., Tortoriello, J., and Herrera-Ruiz, M. 2012. Diuretic effect of compounds from *Hibiscus sabdariffa* by modulation of the aldosterone activity. *Planta Med*:1893-1898.
- Lin, T. L., Lin, H. H., Chen, C. C., Lin, M. C., Chou, M. C., and Wang, C. J. 2007. *Hibiscus sabdariffa* extract reduces serum cholesterol in men and women. *Nutr. Res.* 27:140-145.
- Matheron, M. E., and Porchas, M. 2009. Impact of different preplant cultural treatments on survival of *Phytophthora nicotianae* in soil. *Plant Dis.* 93:43-50.
- Meziadi, C., Richard, M. M. S., Derquennes, A., Thareau, V., Blanchet, S., Gratias, A., Pflieger, S., and Geffroy, V. 2005. Development of molecular markers linked to disease resistance genes in common bean based on whole genome sequence. *Plant science* <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.09.006>
- Mostofa, M. G. Islam, M. R. Morshed Alam, A. T. M., Mahbub Ali, S. M., and Mollah, M. A. F. 2002. Genetic variability, heritability and correlation studies in Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Online J. Biol. Sci.* 2:422-424.
- Mozaffari-Khosravi, H., Jalali-Khanabadi, B. A., Afkhami-Ardekani, M., Fatehi, F., and Noori-Shadkam, M. 2009. The effects of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*)

- on hypertension in patients with type II diabetes. *J. Human Hypert.* 23:48-54.
- Parkunan, V., Johnson, C. S., and Bowman, B. C., and Hong, C. X. 2010. Population structure, mating type, and mefenoxan sensitivity of *Phytophthora nicotianae* in Virginia tobacco fields. *Plant Dis.* 94:1361-1365.
- Prevost, A., and Wilkinson, M. J. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98:107-112.
- Pritchard, J. K., and Wen, X. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Ratnaparkhe, M. B., Santra, D. K., Tullu, A., and Muehlbauer, F. J. 1998. Inheritance of inter-simple-sequence-repeat polymorphisms and linkage with a fusarium wilt resistance gene in chickpea. *Theor. Appl. Genetics* 96: 348-353.
- Reed, D. H., and Frankham, R. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conserv. Biol.* 17: 230-237.
- Roldán-Ruiz, I., Dendauw, J., Van Bockstaele, E., Depicker, A., De Loose, M. 2000. AFLP Markers reveal high polymorphic rates in Ryegrasses (*Lolium* spp.). *Mol. Breed.* 6:125-135.
- Satya, P., Karan, M., Kar, C. S., Mahapatra, A. K., and Mahapatra, B. S. 2013. Assessment of molecular diversity and evolutionary relationship of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.), roselle (*H. sabdariffa* L.) and their wild relatives. *Plant Syst. Evol.* 299:619-629.
- Satya, P., Karan, M., Sarkar, D., and Sinha, M. K. 2012. Genome synteny and evolution of AABB allotetraploids in *Hibiscus* section *Furcaria* revealed by interspecific hybridization, ISSR and SSR markers. *Plant Syst. Evol.* 298:1257-1270.
- Torres-Moran, M. I., Escoto-Delgadillo, M., Ron-Parra, J., Tarra-Tovar, G., Mena-Munguia, S., Rodriguez-Garcia, A., Rodriguez-Sahagun, A., and Castellanos-Hernandez, O. 2011. Relationship among twelve genotypes of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) cultivated in western Mexico. *Ind. Crops Prod.* 34:1079-1083.

- Walker, J. C. 1957. Plant Pathology. 2nd. Ed. McGraw-Hill Book Co., Inc. USA. 707 p.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., and Kahl, G. 2005. DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications, 2nd ed. Boca Raton: CRC Press. 472 p.
- Wilson, D. F. 2006. A distributional and cytological survey of the presently recognized taxa of *Hibiscus* section *Furcaria* (Malvaceae). *Bonplandia* 15:53-62.