

# Distribución y Frecuencia de Organismos Asociados a la Enfermedad “Pata Prieta” de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México

## Distribution and Frequency of Organisms Associated to Disease “Black Leg” of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Guerrero, México

Santo Ángel Ortega-Acosta, Javier Hernández-Morales\*, José Sergio Sandoval-Islas, Victoria Ayala-Escobar, Lauro Soto-Rojas. Colegio de Postgraduados, Instituto de Fitosanidad, Programa de Fitopatología, km 36.5 Carretera México- Texcoco, Montecillo, Estado de México CP 59510. Antonino Alejo-Jaimes; CEIGUA/ INIFAP. Iguala, Guerrero. Carretera Iguala-Tuxpan, km 2.5. CP 40000. \*Correspondencia: hjavier@colpos.mx.

Recibido: Junio 22, 2015.

Aceptado: Junio 29, 2015

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

**Resumen.** Se estudió la distribución y frecuencia de organismos asociados a la “pata prieta” de la jamaica en Guerrero durante el 2011, se evaluaron 12 parcelas comerciales. La identificación se hizo con base en características culturales y claves taxonómicas. La caracterización molecular se efectuó amplificando la región intergenética transcripcional (ITS) del rDNA. Los organismos aislados fueron *Phytophthora parasitica*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium incarnatum*, *Fusarium solani*, *Phomopsis longicolla*, *Glomerella cingulata* y *Colletotrichum truncatum*. La mayor frecuencia (72.4 %) se obtuvo con *P. parasitica* distribuido en 10 de 12 sitios, seguido por *F. oxysporum* de amplia distribución pero de baja frecuencia (10.6%), *M. phaseolina* se aisló de cuatro sitios con frecuencia de 10.9 %. *F. incarnatum*,

**Abstract.** The distribution and frequency of organisms associated with the “black leg” of roselle was studied in 2011 in Guerrero, where 12 commercial plots were evaluated. The identification was based on cultural characteristics and taxonomic keys. Molecular characterization was performed by amplifying the internal transcribed spacer region (ITS) of the rDNA. The isolated organisms were *Phytophthora parasitica*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium incarnatum*, *Fusarium solani*, *Phomopsis longicolla*, *Glomerella cingulata* and *Colletotrichum truncatum*. *P. parasitica* was the most frequent specie (72.4 %), distributed in 10 of the 12 sites, followed by *F. oxysporum* widely distributed but with low frequency (10.6 %), *M. phaseolina* was isolated from four sites with frequency 10.9 %. *F. incarnatum*, *F. solani*, *P. longicolla*, *G. cingulata* and *C. truncatum* showed low frequency (0.4 to 2.4 %) and distribution. Molecular analysis corroborated the identification of organisms. In pathogenicity tests, *P. parasitica*, *M. phaseolina* and *F. incarnatum* were pathogenic. This is the first report in Mexico for *M. phaseolina* and *F. incarnatum* as pathogen of roselle.

*F. solani*, *P. longicolla*, *G. cingulata* y *C. truncatum* presentaron baja frecuencia y distribución (0.4 a 2.4 %). Los análisis moleculares corroboraron la identificación de los organismos. En pruebas de patogenicidad, *P. parasitica*, *M. phaseolina* y *F. incarnatum* fueron patógenos. Este es el primer reporte en México para *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium incarnatum* como patógenos de la jamaica.

**Palabras clave:** pudrición de tallo y raíz, oomiceto, complejo fungoso, *Phytophthora parasitica*, *Macrophomina phaseolina*.

En México en 2010 se cultivaron alrededor de 19, 000 ha de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), Guerrero fue el principal productor con más del 70 % (SIAP, 2010); la principal zona productora se ubica en los municipios de Ayutla y Tecoaapa. En esta región, la enfermedad “pata prieta” que se caracteriza por presentar necrosis basal, marchitez generalizada, amarillamiento de hojas y muerte de la planta, constituye una de las principales limitantes fitosanitarias para la producción de esta especie. En estudios realizados en esta zona se concluyó que *Phytophthora parasitica* es el agente causal de esta enfermedad (Hernández y Romero, 1990). Sin embargo, en otros países se han reportado diversos organismos como causantes de pudrición de tallo y raíz en el cultivo de jamaica, entre los que destacan; *Phytophthora parasitica*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium rolfsii*, *Phymatotrichopsis omnivora*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *F. solani* y *F. equiseti* (Ooi y Salleh, 1999; Amusa *et al.*, 2005; Ploetz *et al.*, 2007; Horst, 2008; Hassan *et al.*, 2014). En estos municipios el cultivo se distribuye en rangos de altitudes que van desde los 100 msnm hasta alturas superiores a los 700 msnm, por lo que se consideró realizar el presente trabajo de investigación, mediante un muestro estratificado (Ceja-Torres *et*

**Key words:** root and stem rot, oomycete, fungus complex, *Phytophthora parasitica*, *Macrophomina phaseolina*.

Around 19,000 ha of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) were planted in Mexico in the year 2010, and the state of Guerrero was the main producer, with over 70 % (SIAP, 2010); the main region of production is located in the municipalities of Ayutla and Tecoaapa. In this region, the disease known as “black leg,” the main characteristics of which are basal necrosis, general wilting, leaves acquiring a yellow color, and death of the plant, constitutes one of the main plant health limitations for the production of this species. Studies carried out in this region concluded that *Phytophthora parasitica* is the agent that causes this disease (Hernández and Romero, 1990). However, there have been reports in other countries of diverse organisms as the causing stem and root rot on roselle crops, the most outstanding ones being *Phytophthora parasitica*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium rolfsii*, *Phymatotrichopsis omnivora*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *F. Solani*, and *F. equiseti* (Ooi y Salleh, 1999; Amusa *et al.*, 2005; Ploetz *et al.*, 2007; Horst, 2008; Hassan *et al.*, 2014). In these municipal areas, the crop is distributed in ranges of heights that go from 100 masl to over 700 masl, therefore this research work was considered to be carried out using stratified sampling (Ceja-Torres *et al.*, 2000). Based on the above, the aim of this study was to determine the distribution and frequency of the organisms related to the “black leg” disease on roselle in Ayutla and Tecoaapa, Guerrero.

## MATERIALS AND METHODS

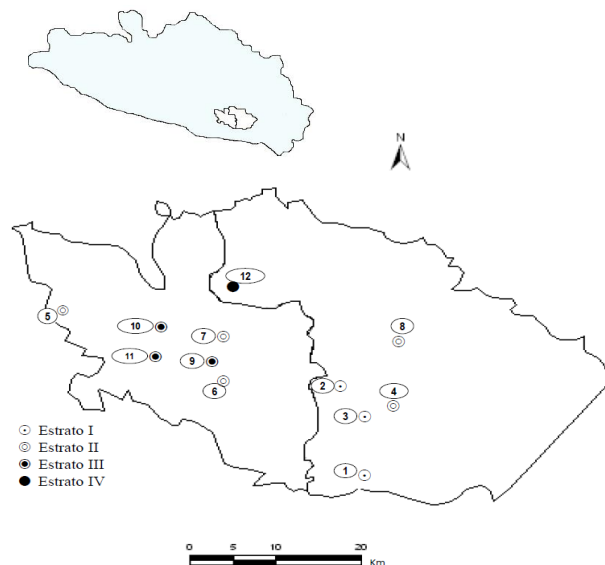
**Area of Study and Sampling.** The area of study was established in the municipalities of

*al.*, 2000). Con base en lo anterior el objetivo del presente estudio fue determinar la distribución y frecuencia de los organismos asociados a la enfermedad “pata prieta” de la jamaica en Ayutla y Tecoaapa, Guerrero.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Zona de estudio y muestreo.** Se estableció el área de estudio en los municipios de Ayutla y Tecoaapa (Figura 1), en el ciclo de producción primavera-verano de 2011. En base a los registros de la estación más cercana (estación: 12012), los municipios registraron temperatura y precipitación promedio anual de 27.7 °C y 1,519.9 mm (SMN, 2012). Para la selección de sitios se utilizó un muestreo estratificado (Ceja-Torres *et al.*, 2000), se consideró la variación que presenta esta zona con respecto a la altitud (msnm). Cuatro estratos quedaron definidos de la siguiente manera: estrato I) 100 a 300, estrato II) 301 a 500, estrato III) 501 a 700 y estrato IV)

Ayutla and Tecoaapa (Figure 1), in the spring-summer production cycle of 2011. Based on records from the nearest station (station 12012), the municipalities recorded an average annual temperature and rainfall of 27.7 °C and 1,519.9 mm (SMN, 2012). For the selection of sites, stratified sampling was used (Ceja-Torres *et al.*, 2000), and the variation presented by the area with regard to altitude (masl) was considered. Four strata were defined as follows: stratum I) 100 to 300, stratum II) 301 to 500, stratum III) 501 to 700, and stratum IV) >701 (Table 1). Twelve producing locations were selected and in each one a sampling site was selected. The altitude and geographic position (latitude and longitude) of each site was determined using a GPS (Garmin Etrex®) (Table 1; Figure 1). In each site selected, four samplings were carried out, directed at plants with “black leg” symptoms in the months of September, October, November, and December. Five plants were taken in each sampling, labeled for their identification, and taken to the laboratory for processing. In each



**Figura 1.** Sitios de muestreo en los municipios de Ayutla y Tecoaapa, Gro. México. Ciclo de producción primavera-verano de 2011.

**Figure 1.** Sampling sites in the municipal areas of Ayutla and Tecoaapa, Gro. Mexico. Spring-summer 2011 production cycle.

>701 (Cuadro 1). Se seleccionaron 12 localidades productoras y en cada una de ellas se seleccionó un sitio de muestreo. La altitud y posición geográfica (latitud y longitud) de cada sitio se determinó mediante un geoposicionador global (GPS, Garmin Etrex®) (Cuadro 1; Figura 1). En cada sitio seleccionado, se realizaron cuatro muestreos dirigidos a plantas con síntomas de “pata prieta” en los meses de septiembre, octubre, noviembre y diciembre. Se colectaron cinco plantas en cada muestreo, las plantas fueron etiquetadas para su identificación y trasladadas a laboratorio para ser procesadas. En cada sitio se determinaron las características físicas y químicas de suelo en el laboratorio de Física de Suelos del Colegio de Postgraduados. La textura se determinó por el método del hidrómetro de Bouyoucos, el pH (relación 1:2 en H<sub>2</sub>O) y la materia orgánica mediante el método de Walkley y Black (1934).

**Distribución y frecuencia de organismos.** Fragmentos de tejido de plantas enfermas de aproximadamente 0.5 cm se desinfectaron y sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 1.5 % durante 2 min, posteriormente se enjuagaron tres

site, the physical and chemical characteristics were determined in the Soil Physics Lab of the Colegio de Postgraduados. Texture was determined using the Bouyoucos hydrometer method, and pH (ratio 1:2 in H<sub>2</sub>O) and organic matter, using Walkley and Black’s method (1934).

**Distribution and Frequency of Organisms.** Fragments of tissue from diseased plants of approximately 0.5 cm were disinfected in a sodium hypochlorite solution at 1.5 % for 2 min. Later, they were rinsed three times with sterile distilled water, dried with sterilized paper towels, transferred to PDA culture medium, and incubated at 24±2 °C under controlled conditions for a week; the growth of each organism was then quantified. From the data obtained for each isolated organism for each sampling site, a distribution map was created. A means difference test (Tukey, p=0.05) was performed of the frequencies obtained from each species of microorganism (SAS Institute, 1988).

**Cultural and Morphological Characterization.** The mycelial growths were transferred and purified using the monosporic culture and hyphal

**Cuadro 1.** Ubicación geográfica de sitios de muestro en Ayutla y Tecoaapa, Guerrero, México.

**Table 1.** Geographic ubication of samples sites in Ayutla and Teconapa, Guerrero, Mexico.

Estrato	No	Comunidad	Municipio	Altitud (msnm)	N	O
I	1	Tlachimala	Ayutla	103	16° 48' 42.6"	99° 06' 15.6"
I	2	Tutepec	Ayutla	261	16° 55' 64.1"	99° 08' 20.0"
I	3	Pozolapa	Ayutla	279	16° 53' 56.7"	99° 05' 96.3"
II	4	Tepango	Ayutla	365	16° 54' 09.6"	99° 04' 56.5"
II	5	Pochotillo	Tecoanapa	388	17° 01' 42.9"	99° 25' 78.9"
II	6	Parota Seca	Tecoanapa	425	16° 56' 19.2"	99° 14' 98.5"
II	7	Tecoanapa	Tecoanapa	427	16° 59' 56.4"	99° 15' 17.4"
II	8	San José la Hacienda	Ayutla	460	16° 59' 00.3"	99° 03' 94.5"
III	9	Las Parotillas	Tecoanapa	637	16° 57' 39.2'	99° 15' 64.2"
III	10	Xalpatláhuac	Tecoanapa	659	17° 00' 14.1"	99° 18' 94.6"
III	11	Las Animas	Tecoanapa	667	16° 57' 98.6"	99° 19' 28.3"
IV	12	Los Tepetates	Ayutla	722	17° 03' 32.8"	99° 14' 69.1"

veces con agua destilada estéril, se secaron con papel absorbente estéril, se transfirieron a medio de cultivo PDA y se incubaron a  $24\pm 2$  °C en condiciones controladas durante una semana, se cuantificó el desarrollo de cada organismo. A partir de los datos obtenidos para cada organismo aislado por sitio de muestreo, se generó un mapa de distribución. Se realizó una prueba de comparación de medias (Tukey,  $p=0.05$ ) de las frecuencias obtenidas de cada especie de microorganismo (SAS Institute, 1988).

**Caracterización cultural y morfológica.** Los crecimientos miceliales se transfirieron y purificaron utilizando la técnica de cultivos monospóricos y punta de hifa en medio agua-agar al 2 %. En la identificación preliminar, las colonias con características culturales a *Phytophthora* se transfirieron en medio de cultivo V8-agar por catorce días, y para inducir esporulación se retransfirieron discos de un centímetro de diámetro en cajas Petri con 25 mL de agua destilada estéril. Los aislamientos restantes se transfirieron en medio de cultivo PDA. En todos los casos, los organismos se incubaron nuevamente a  $24\pm 2$  °C. La identificación morfológica se efectuó con base en las claves taxonómicas de Holliday y Punithalingam (1970), Booth (1971), Mordue (1971), Sutton (1980), Hobbs et al. (1985), Hanlin (1990), Sutton (1992), Erwin y Ribeiro (1996), Leslie y Summerell (2006), Barnett y Hunter (2006), Gallegly y Hong (2008) y Damm et al. (2009).

**Caracterización molecular.** Del micelio de las colonias de los diferentes aislados de una semana de edad en medio PDA, se realizó la extracción de DNA con el método de CTAB (Murray y Thompson, 1980) con algunas modificaciones (uso de buffer STE1x y adición de PVP40 al 4 % al buffer de extracción). El micelio de cada especie

tip techniques in a water-agar medium at 2 %. In the preliminary identification, the colonies with cultural characteristics to *Phytophthora* were transferred on V8-agar culture medium for fourteen days, and in order to induce sporulation, disks, with a centimeter in diameter were retransferred in Petri dishes containing 25 mL of sterile distilled water. The remaining isolations were transferred on PDA culture medium. In all cases, the organisms were incubated once more at  $24\pm 2$  °C. The morphological isolation was carried out based on the taxonomical keys by Holliday and Punithalingam (1970), Booth (1971), Mordue (1971), Sutton (1980), Hobbs et al. (1985), Hanlin (1990), Sutton (1992), Erwin and Ribeiro (1996), Leslie and Summerell (2006), Barnett and Hunter (2006), Gallegly and Hong (2008), and Damm et al. (2009).

**Molecular Characterization.** DNA was extracted from the mycelia of the colonies of the different week-old isolations on PDA medium using the CTAB method (Murray and Thompson, 1980) with some modifications (use of STE1x buffer and addition of PVP40 at 4 % to the extraction buffer). The mycelium of each species was macerated with 1 mL de STE1x buffer (Tris-HCl 100 mM pH8, EDTA 50 mM pH8, NaCl 100mM,  $\beta$ -mercaptoethanol 0.3 %). The samples were centrifuged at 14,000 rpm (revolutions per minute) for 8 min. The supernatant was decanted and 800  $\mu$ L of extraction de buffer were added (Tris-HCl 100 mM pH8, NaCl 1.5 M, EDTA 20 mM pH8, CTAB 3 %, PVP40 4 %,  $\beta$ -mercaptoethanol 0.3 %). It was incubated for 40 min at 65 °C, and later, 700  $\mu$ L of chloroform/isoamylalcohol were added (24:1); it was mixed and centrifuged for 8 min at 14,000 rpm. The supernatant was transferred to a new tube containing 800  $\mu$ L of absolute ethanol. The DNA was precipitated for an hour at -20 °C, and then centrifuged for 8 min at 13,000 rpm.

se maceró con 1 mL de buffer STE1x (Tris-HCl 100 mM pH8, EDTA 50 mM pH8, NaCl 100mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.3 %). Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm (revoluciones por minuto) durante 8 min. El sobrenadante se decantó y se adicionaron 800  $\mu$ L de buffer de extracción (Tris-HCl 100 mM pH8, NaCl 1.5 M, EDTA 20 mM pH8, CTAB 3 %, PVP40 4 %,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.3 %). Se incubó durante 40 min a 65°C, posteriormente, se adicionaron 700  $\mu$ L de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se mezcló y se centrifugó por 8 min a 14,000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo que contenía 800  $\mu$ L de etanol absoluto. El DNA se precipitó por una hora a -20 °C. Posteriormente se centrifugó por 8 min a 13,000 rpm, el sobrenadante se decantó y el precipitado se secó a 37 °C por 20 min para resuspender el DNA obtenido en 100  $\mu$ L de agua ultrapura estéril. Para amplificar las regiones espaciadoras internas transcritas (ITS1-ITS2) y la región intermedia 5,8S del rDNA de todos los organismos aislados, con excepción de *Fusarium* spp., se utilizaron los iniciadores ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990). Mientras que para las especies de *Fusarium* se emplearon los iniciadores ITS5 y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'), para amplificar además los dominios D1/D2 del gen 28S (O'Donnell, 1993). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 $\mu$ L, que contenían 2.5 de buffer 10X, 1  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> a 50mM, 0.5  $\mu$ L de la mezcla de dNTPs 10 mM, 2  $\mu$ L de cada iniciador 10 pmol/ $\mu$ L y 0.2  $\mu$ L de Taq-DNA polymerase 5U/ $\mu$ L (Invitrogen®, USA). Las reacciones se realizaron en un termociclador Biometra, con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 seg (segundos), alineamiento a 55 °C por 45 seg, y extensión a 72 °C por 45 seg; una extensión final de 72 °C por 7 min. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al

The supernatant was decanted and the precipitate was dried at 37 °C for 20 min to resuspend the DNA obtained in 100  $\mu$ L of sterile ultrapure water. To amplify the internal transcribed spacer regions (ITS1-ITS2) and the intermediate region 5,8S of the rDNA of all the isolated organisms, except for *Fusarium* spp., the initiators ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990) were used. Meanwhile, for the species of *Fusarium*, the initiators ITS5 and NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') were used, and to also amplify the dominions D1/D2 of the gene 28S (O'Donnell, 1993). The reactions took place in a final volume of 25 $\mu$ L that contained 2.5 of 10X buffer, 1  $\mu$ L of MgCl<sub>2</sub> at 50mM, 0.5  $\mu$ L of the mixture of dNTPs 10 mM, 2  $\mu$ L of each initiator 10 pmol/ $\mu$ L and 0.2  $\mu$ L of Taq-DNA polymerase 5U/ $\mu$ L (Invitrogen®, USA). The reactions took place in a Biometra thermocycler, with the following program: initial denaturalization at 95 °C for 3 min, 35 denaturalization cycles at 95 °C for 30 sec (seconds), alignment at 55 °C for 45 sec and extension at 72 °C for 45 sec; a final extension of 72 °C for 7 min. The products of PCR were viewed by electrophoresis in agarose gel at 2 %. Once the presence of only one stripe was observed, the amplified DNA was sent to the company MacroGen ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)) to be sequenced.

A consensus sequences of each species was obtained by alignment (forward and reverse) using the software DNA Baser® ver. 4.16, and they were compared and aligned with those available in the database from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene Bank, U.S.A. using BLASTN 2.2.26 (Zhang *et al.*, 2000) and they were deposited in the Gene Bank.

**Pathogenicity Tests.** In October of 2011, each isolated pathogen was inoculated in three-month

2 %. Una vez constatada la presencia de una sola banda, el DNA amplificado se envió con la compañía MacroGen ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)), para su secuenciación.

Una secuencia consenso de cada especie fue obtenida por alineamiento (forward y reverse) con el software DNA Baser® ver. 4.16, se compararon y alinearon con las disponibles en la base de datos del Banco de Genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI), EE.UU. utilizando BLASTN 2.2.26 (Zhang *et al.*, 2000) y se depositaron en el GenBank.

**Pruebas de patogenicidad.** En octubre de 2011, cada patógeno aislado se inoculó en plantas de jamaica de tres meses de edad, el material vegetal utilizado, se multiplicó por semilla botánica “criolla” de Guerrero, sembradas en macetas con suelo estéril y cultivadas en cámara de ambiente controlado con temperatura de 28 °C durante el día y 18 °C en la noche, con periodos de luz/oscuridad de 12 h. El inóculo de *Phytophthora parasitica* se incrementó en medio V8-agar durante 14 días, posteriormente, para inducir la liberación de zoosporas, discos de 1cm de diámetro fueron transferidos a cajas Petri con 25 mL de agua destilada estéril sometidos a 5 °C por 5 min, y después a temperatura ambiente (24-27 °C) por 10-15 min; mientras que para el incremento de inóculo de los otros organismos aislados, solo se utilizaron cajas Petri con PDA. Así, para *Fusarium oxysporum*, *Fusarium incarnatum*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina* y *Colletotrichum truncatum* el desarrollo fue por 14 días, y 30 días para *Phomopsis longicolla* y *Glomerella cingulata*. La concentración de inóculo se estimó con una cámara de Neubauer. Para *P. parasitica* fue de  $2 \times 10^3$  zoosporas mL<sup>-1</sup>. Suspensiones conidiales de *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. incarnatum*, *P. longicolla*, y *C. truncatum* se inocularon a concentraciones de  $1 \times 10^6$  conidios mL<sup>-1</sup>. La inoculación de *Macro-*

*roselle* plants; the plant material used was multiplied by “criolla” Guerrero botanical seeds, planted in pots with sterile soil and cultivated in a controlled environment chamber with a temperature of 28 °C during the day and 18 °C by night, with periods of light/darkness of 12 h. The *Phytophthora parasitica* inoculum increased on V8-agar medium for 14 days, and after this time, in order to induce the release of zoospores, discs with a diameter of 1cm were transferred into Petri dishes with 25 mL of sterile distilled water subjected to 5 °C for 5 min, and then to room temperature (24-27 °C) for 10-15 min; whereas for the increase in inoculum of the other isolated organisms, only Petri dishes with PDA were used. In this way, for *Fusarium oxysporum*, *Fusarium incarnatum*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, and *Colletotrichum truncatum* growth was for 14 days, and 30 days for *Phomopsis longicolla* and *Glomerella cingulata*. The concentration of inoculum was estimated using a Neubauer chamber. For *P. parasitica* it was  $2 \times 10^3$  zoospores mL<sup>-1</sup>. Conidial suspensions of *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. incarnatum*, *P. longicolla*, and *C. truncatum* were inoculated at concentrations of  $1 \times 10^6$  conidia mL<sup>-1</sup>. The inoculation of *Macrophomina phaseolina* was carried out with microsclerotia suspensions. In all cases, 10 mL of the suspension were inoculated per plant. For *G. cingulata*, ten PDA discs (1 cm diameter) were used, placed at the base of the stem of each plant. Five plants for each organism species (treatment) were inoculated and a control treatment with no inoculation was added.

A second test was carried out in the open cast, in the INIFAP- Campo Experimental Iguala, Guerrero in February of 2012, with average annual temperatures and rainfalls of 26.7 °C and 965.4 mm respectively (SMN, 2012). For the increase of the inoculum, we once again used PDA and V8-agar medium. Five three-month old plants were

*phomina phaseolina* se realizó con suspensiones de microsclerocios. En todos los casos se inocularon 10 mL de la suspensión por planta. Para *G. cingulata* se utilizaron diez discos de PDA (1 cm diámetro), colocados en la base del tallo de cada planta. Cinco plantas por cada especie de organismo (tratamiento) fueron inoculadas y se adicionó un tratamiento testigo sin inocular.

Una segunda prueba se realizó en condiciones a cielo abierto, en el INIFAP-Campo Experimental Iguala, Guerrero en febrero de 2012, con temperaturas y precipitación promedio anual de 26.7 °C y 965.4 mm respectivamente (SMN, 2012). Para el incremento de inóculo nuevamente se utilizó medio PDA y V8-agar. Se inocularon cinco plantas de tres meses de edad por cada especie de hongo u oomiceto (tratamiento) mediante la inserción en el tallo de un palillo esterilizado impregnado con micelio del microorganismo, más un testigo sin la aplicación de inóculo. Las plantas en estudio quedaron a cielo abierto después de ser inoculadas. Cuando se manifestaron síntomas inducidos por los patógenos inoculados, éstos fueron reaislados con la técnica descrita.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Distribución y frecuencia de organismos.** De las plantas colectadas y procesadas, se identificaron cinco géneros de hongos y un oomiceto. *Phytophthora parasitica* (oomiceto) se detectó en 10 sitios con frecuencias que variaron de 85 a 92.2 % (promedio de 72.4 %); *Macrophomina phaseolina* fue aislado en cuatro sitios y en dos de ellos, que fueron Tlachimala y Pozolapa, con altas frecuencias de 66.7 y 56.3 % respectivamente y con promedio de 10.6 %; *Fusarium oxysporum* se distribuyó en 11 sitios con frecuencias de aislamientos bajas (3.6 a 18.8 %) y el promedio fue de 10.6 %. Los hongos

inoculados para cada especie de fungi or oomicete (tratamiento) by inserting a sterilized toothpick impregnated with mycelium of the microorganism into the stem, plus a control without the inoculum. The plants under study remained opencast after being inoculated. When the symptoms induced by the inoculated pathogens presented themselves, these pathogens were reisolated using the technique described.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Distribution and Frequency of Organisms.

From the plants collected and processed, five genres of fungi and one oomycete were identified. *Phytophthora parasitica* (oomycete) was found in 10 sites, with frequencies that varied between 85 and 92.2 % (average of 72.4 %); *Macrophomina phaseolina* was isolated in four sites and in two of them, which were Tlachimala and Pozolapa, had high frequencies of 66.7 and 56.3 % respectively, and with an average of 10.6 %; *Fusarium oxysporum* was distributed in 11 sites with low isolation frequencies (3.6 to 18.8 %), and the average was 10.6%. The fungi *Fusarium incarnatum*, *Phomopsis longicolla*, *Fusarium solani*, *Colletotricum truncatum*, and *Glomerella cingulata*, with low frequencies (average of 0.4 to 2.4 %) and distribution (Figure 2, Table 2).

Table 2 shows that the frequency of *Phytophthora parasitica* was significantly higher ( $p=0.05$ ); the other organisms showed no significant differences between groups, yet in terms of numbers, the above was followed by *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium oxysporum*.

The diseased plants in which *Phytophthora parasitica* was most frequently isolated displayed generalized wilting, a yellow color, flabby leaves, necrosis in the base of the stem, which often

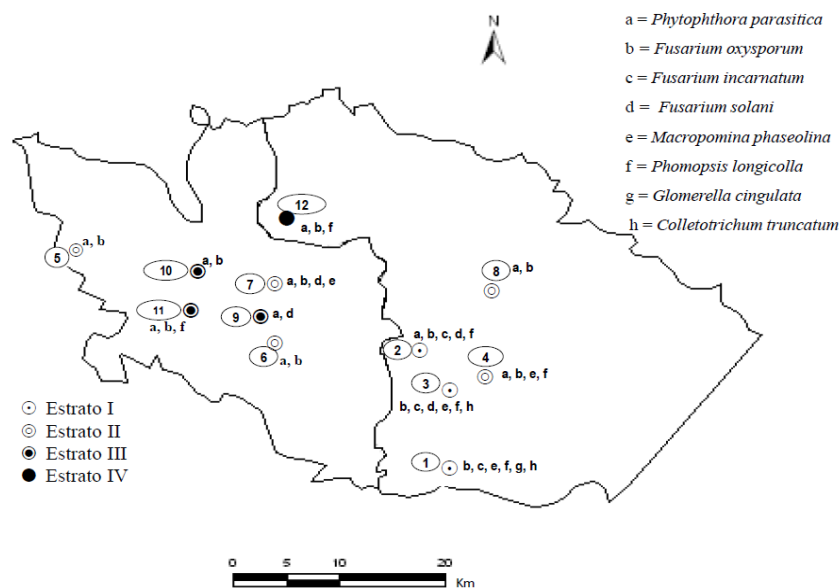


*Fusarium incarnatum*, *Phomopsis longicolla*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum truncatum* y *Glomerella cingulata* de baja frecuencia (promedio de 0.4 a 2.4 %) y distribución (Figura 2, Cuadro 2).

En el Cuadro 2 se observa que la frecuencia de *Phytophthora parasitica* fue significativamente mayor ( $p=0.05$ ), los otros organismos no mostraron diferencias significativas entre grupos, sin embargo numéricamente le siguen *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium oxysporum*.

Las plantas enfermas en donde se aisló con mayor frecuencia a *Phytophthora parasitica* exhibieron marchitez generalizada, amarillamiento, flacidez de hojas, necrosis en la parte basal del tallo, la cual en ocasiones se extendió hacia la parte aérea, abarcando parte de las ramas (Figura 3a y b). También en menor grado fueron observados síntomas de necrosis más agrietamiento en la base del tallo con producción de exudados, lo cual en ocasiones

extended up to the aerial section, reaching parts of the branches (Figure 3a and b). Also, yet in a lesser degree, there were symptoms of necrosis observed along with cracking at the base of the stem with the production of exudates, which occasionally caused the flattening and death of the plant; these symptoms correspond to those reported by Hernández and Romero (1990), and Erwin and Ribeiro (1996). However, in diseased plants from Tlachimala and Pozolapa, where *P. parasitica* was not isolated, similar symptoms were found; in these places, necrosis was limited to the base of the plant's stem; plants were frequently found with detached epidermis and constriction in the area of progress of the disease (Figure 3d). Plants displayed generalized wilting, a yellow color, flabby leaves (Figure 3c), and death of the plant. In these sites *Macrophomina phaseolina* was frequently isolated (Table 2). Locally, both symptomatologies are known as roselle "black leg".



**Figura 2.** Distribución de organismos asociados a la “pata prieta” de la jamaica durante el ciclo primavera-verano 2011, en Ayutla y Tecoanapa, Guerrero.

**Figure 2.** Distribution of organisms related to “black leg” of roselle during the spring-summer 2011 cycle in Ayutla and Tecoanapa, Guerrero.

**Cuadro 2.** Frecuencia de organismos aislados de plantas de jamaica con síntomas de “pata prieta” en 12 localidades de los municipios de Ayutla y Tecoaapa, Guerrero, México. En el ciclo de cultivo primavera-verano de 2011.

**Table 2.** Frequency of isolated organisms in roselle plants with “black leg” symptoms in 12 localities of Ayutla and Tecoaapa, Guerrero, México. Crop cycle Spring-Summer 2011.

Estrato	No	Localidad	Frecuencia de aislamiento (%)							
			Pp <sup>¶</sup>	Fox	Fso	Fin <sup>¶</sup>	Map <sup>¶</sup>	Pho	Col	Glo
I	1	Tlachimala	0	10	0	11.7	66.7	3.3	3.3	5
I	2	Tutepec	89.3	3.6	1.8	1.8	0	3.6	0	0
I	3	Pozolapa	0	18.8	3.8	15	56.3	3.8	2.5	0
II	4	Tepango	87.5	6.3	0	0	4.2	2.1	0	0
II	5	Pochotillo	87.5	12.5	0	0	0	0	0	0
II	6	Parota seca	85	15	0	0	0	0	0	0
II	7	Tecoaapa	90	5	1.3	0	3.8	0	0	0
II	8	San José la Hacienda	90.6	9.4	0	0	0	0	0	0
III	9	Las Parotillas	92.2	0	5.9	0	0	2	0	0
III	10	Xalpatláhuac	85	15	0	0	0	0	0	0
III	11	Las Animas	76.8	19.6	0	0	0	3.6	0	0
IV	12	Los Tepetates	85	12.5	0	0	0	2.5	0	0
		Medias <sup>©</sup> (%)	72.4*	10.6	1.1	2.4	10.9	1.7	0.5	0.4

<sup>¶</sup>Pp= *Phytophthora parasitica*, Fox=*Fusarium oxysporum*, Fso=*Fusarium solani*, Fin=*Fusarium incarnatum*, Map=*Macrophomina phaseolina*, Pho=*Phomopsis longicolla*, Col=*Colletotrichum truncatum*, Glo=*Glomerella cingulata*.

<sup>¶</sup>Pp, Fin, Map = Patogénicos.

<sup>©</sup>Medias con asterisco (\*), son estadísticamente diferentes (p=0.05).

provocó el acame y muerte de la planta, éstos síntomas corresponden a los ya reportados por Hernández y Romero (1990) y Erwin y Ribeiro (1996). Sin embargo, en plantas enfermas provenientes de Tlachimala y Pozolapa en donde *P. parasitica* no fue aislado, se detectaron síntomas similares, en estos lugares la necrosis se limitó a la base del tallo de la planta, frecuentemente se encontraron plantas con desprendimiento de epidermis y constricción en la zona de avance de la enfermedad (Figura 3d), las plantas presentaron marchitez generalizada, amarillamiento y flacidez de hojas (Figura 3c) y muerte de la planta, en estos sitios *Macrophomina phaseolina* fue aislado con alta frecuencia (Cuadro 2). Localmente ambas sintomatologías son conocidas como “pata prieta” de la jamaica.

Este es el primer reporte de *M. phaseolina*, *F. incarnatum*, *F. solani*, *P. longicolla*, *C. truncatum* y *G. cingulata*, como organismos asociados a la enfermedad “pata prieta” en esta zona del estado

This is the first report on *M. phaseolina*, *F. incarnatum*, *F. solani*, *P. longicolla*, *C. truncatum*, and *G. cingulata*, as organisms related to the “black leg” disease in this area of the state of Guerrero, in which we proved, based on pathogenicity tests, that not all were pathogenic.

On the other hand, the pH ranges varied from 4.7 to 6.9, organic matter content varied between 1.2 and 2.9 % and soil types were loam, sandy loam, and sandy clay loam. The organism *Phytophthora parasitica* was isolated from diseased plants in 10 sites which characteristically present soils with pH ranging from 4.7 to 5.5, whereas in two sites it was not isolated: Pozolapa and Tlachimala (Table 2) and presented a pH of 6.6 and 6.8, respectively (Table 3), sites located in stratum I. This indicates that the conditions of soils with pH close to neutral did not favor the presence of *P. parasitica*.

There is evidence of soil pH being a critical factor for the formation of sporangia in some



**Figura 3.** Síntomas de “pata prieta” causada por diferentes organismos. a) marchitez generalizada, amarillamiento y flacidez de hojas. b) necrosis de tallo, extendiéndose hacia las ramas. c) marchitez generalizada, amarillamiento y flacidez de hojas. d) pudrición en raíces y base del tallo con desprendimiento de epidermis y constricción en la zona de avance.

**Figure 3.** Symptoms of “black leg” caused by different organisms. a) generalized wilting, yellowing, and leaf flabbiness; b) stem necrosis, extending to the branches, c) generalized wilting, yellowing, and leaf flabbiness. d) root and stem base rot with peeling of epidermis and constriction in the area of progress.

de Guerrero, en donde se comprobó con base en pruebas de patogenicidad, que no todos fueron patogénicos.

Por otra parte, los rangos de pH variaron de 4.7 a 6.9, el contenido de materia orgánica de 1.2 a 2.9 % y los tipos de suelo fueron franco, franco arenoso y

species of *Phytophthora*. In general, a high pH is toxic for the sporangia; in this sense, Dasgupta *et al.* (2012), evaluated the behavior of *P. parasitica* in soils with a pH of 5.4, 7.0, and 8.5, and established that the pathogen presented a better growth in a pH of 5.4. Likewise, Besoain (2013), reported that

franco arcillo arenoso. El organismo *Phytophthora parasitica* fue aislado de plantas enfermas en 10 sitios caracterizadas por presentar suelos con pH de 4.7 a 5.5, mientras que en dos sitios no fue aislado, estos fueron Pozolapa y Tlachimala (Cuadro 2) y presentaron un pH de 6.6 y 6.8 respectivamente (Cuadro 3), sitios ubicados en el estrato I. Lo anterior indica que las condiciones del suelo con pH cercanos a la neutralidad no favoreció la presencia de *P. parasitica*.

Existen evidencias de que el pH del suelo es un factor crítico para la formación de esporangios en algunas especies de *Phytophthora*. En general un pH alto resulta tóxico para los esporangios; en este sentido, Dasgupta *et al.* (2012), evaluaron el comportamiento de *P. parasitica* en suelos con pH de 5.4, 7.0 y 8.5, determinaron que el patógeno presentó el mejor crecimiento en pH de 5.4. De igual forma Besoain (2013), reportó que las colonias de *Phytophthora parasitica* se desarrollan a pH entre 5.5 y 6, y su crecimiento fue afectado cuando éste era superior a 6.5. En el presente estudio *P. parasitica* fue

the colonies of *Phytophthora parasitica* grow in a pH of between 5.5 and 6, and their growth was affected when it was higher than 6.5. In this study *P. parasitica* was isolated in soils with a pH of between 4.7 and 5.5, whereas in soils with a pH between 6.6 and 6.8 this organism was not isolated; these results are similar to those reported by Dasgupta *et al.* (2012) and Besoain (2013). On the other hand, in other crops, Jha and Dubey (2000); Surinder *et al.* (2013), determined that *Macrophomina phaseolina* prefers pH ranges between 6 and 7, similar to those found in Tlachimala and Pozolapa, where this pathogen was frequently isolated. No relation was found between the content of organic matter and texture (Table 3).

**Cultural and Morphological Characterization.** In the plants processed, eight species of microorganisms were identified: 1) *Phytophthora parasitica* Dastur developed dense colonies of a cotton-like growth in the shape of rosette, coenocytic mycelia, mostly presenting spider-like growth, predominantly oval-

**Cuadro 3.** Características edáficas en parcelas de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) de Ayutla y Tecoaapa, Guerrero, México.  
**Table 3.** Soil characteristics in plots of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Ayutla and Tecoaapa, Guerrero, Mexico.

Estrato	Localidad	Proporción (%)					
		pH <sup>†</sup>	MO <sup>‡</sup>	Arena	Limo	Arcilla	Textura
I	Tlachimala	6.8	1.8	67	18	15	Franco arenoso
I	Tutepec	5	1.9	59	14	27	Franco arcillo arenoso
I	Pozolapa	6.6	2.9	69	16	15	Franco arenoso
II	Tepango	5.5	2.9	63	16	21	Franco arcillo arenoso
II	Pochotillo	5.2	1.3	51	32	17	Franco
II	Parota Seca	5	2.5	67	14	19	Franco arenoso
II	Tecoanapa	4.8	2.6	51	24	25	Franco arcillo arenoso
II	San José la Hacienda	5	1.6	65	20	15	Franco arenoso
III	Las Parotillas	4.9	2.2	59	18	23	Franco arcillo arenoso
III	Xalpatláhuac	4.7	1.8	71	4	25	Franco arcillo arenoso
III	Las Animas	5.1	1.2	45	32	23	Franco
IV	Los Tepetates	4.9	1.2	39	42	19	Franco

<sup>†</sup>pH= Potencial de Hidrógeno.

<sup>‡</sup>MO=Materia orgánica (%).

aislado en suelos con pH de 4.7 a 5.5, mientras que en suelos con pH entre 6.6 y 6.8 no se aisló este organismo, resultados similares a los reportados por Dasgupta *et al.* (2012) y Besoain (2013). Por otra parte en otros cultivos Jha y Dubey (2000); Surinder *et al.* (2013), determinaron que *Macrophomina phaseolina* prefiere rangos de pH entre 6 y 7, similares a los presentes en las localidades de Tlachimala y Pozolapa donde este patógeno fue aislado en alta frecuencia. No se detectó relación con el contenido de materia orgánica y textura (Cuadro 3).

**Caracterización cultural y morfológica.** De las plantas procesadas se identificaron ocho especies de microorganismos. 1) *Phytophthora pasitica* Dastur, desarrolló colonias densas, de crecimiento algodonoso, en forma de roseta, micelio cenocítico, en su mayoría de crecimiento aracnoide, esporangios predominantemente de forma oval y con una papila prominente, en promedio midieron de 44.4 x 35.3  $\mu\text{m}$  (largo por ancho), clamidosporas intercalares y terminales (28  $\mu\text{m}$  en promedio), características que coinciden con lo descrito para esta especie por Erwin y Ribeiro (1996) y Gallegly y Hong (2008). 2) *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid., las colonias presentaron coloración gris en su fase de crecimiento y desarrollo, oscureciéndose con la edad, desarrollaron microesclerocios muy variables en tamaño (33-54  $\mu\text{m}$ ), de redondos a irregular con coloración negra, articulados y duros, micelio septado, características que coinciden para esta especie con base en lo descrito por Holliday y Punithalingam (1970), Abawi y Pastor-Corrales (1990), Kaur *et al.* (2012). 3) *Fusarium incarnatum* (Robergge) Sacc. (= *F. semitectum*), colonias inicialmente blancas, con pigmento anaranjado en el centro, posteriormente se volvieron color marrón. En medio de cultivo CLA (Carnation Leaf Agar) produjo macroconidios con septos que variaron en número de 3 a 5 (28.3-35.4  $\mu\text{m}$ ) y con

shaped sporangia, and with a prominent papilla; average measurements were 44.4 x 35.3  $\mu\text{m}$  (length x width), intercalary and terminal chlamyospores (28  $\mu\text{m}$  on average). These characteristics coincide with descriptions for this species by Erwin and Ribeiro (1996), and Gallegly and Hong (2008). 2) *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid. colonies displayed a gray color in their phase of growth and development, and became darker with age; they developed microsclerotia that varied in size (33-54  $\mu\text{m}$ ), round to irregular in shape with a black color, articulate and hard, septate mycelia; these characteristics for the species coincide with descriptions by Holliday and Punithalingam (1970), Abawi and Pastor-Corrales (1990), Kaur *et al.* (2012). 3) *Fusarium incarnatum* (Robergge) Sacc. (= *F. semitectum*), initially white colonies with an orange pigment in the center, later became brown. In CLA (Carnation Leaf Agar) medium, it produced macroconidias with septa that varied in numbers from 3 to 5 (28.3-35.4  $\mu\text{m}$ ) and with a foot-shaped base cell, microconidias from 0 to 3 septa, these characteristics coincide with descriptions by Nelson *et al.* (1983) y Leslie y Summerell (2006) for this species. 4) *Fusarium oxysporum* Snyder and Hansen, pinkish-white colonies that turned violet with time, presented fusiformed conidias, generally with 3 septa measuring 23.3-49.9 x 3.1-5.2  $\mu\text{m}$ , an abundance of microconidias, without septa and cylindrical, intercalary and terminal chlamyospores; these characteristics coincide with those reported by Nelson *et al.* (1983), Leslie and Summerell (2006). 5) *Fusarium solani* Snyder and Hansen displayed cream-colored colonies, scarce mycelia, abundant sporodochia present, frequently with a greenish pigmentation in the center, macroconidias between 5 and 7 septa measuring 28.3-41.5 x 4.3-6.4  $\mu\text{m}$ , microconidias from 0 to 2 septa, conidiogenous cells in long monophialides; these characteristics coincide with

célula basal en forma de pie, microconidios de 0 a 3 septos, estas características coinciden a lo descrito por Nelson *et al.* (1983) y Leslie y Summerell (2006) para esta especie. 4) *Fusarium oxysporum* Snyder y Hansen, colonias de color blanco-rosada, con el tiempo se tornaron violeta, presentaron macroconidios fusiformes, generalmente con 3 septos, de 23.3-49.9 x 3.1-5.2  $\mu\text{m}$ , microconidios abundantes, sin septos y cilíndricos, clamidosporas intercalares y terminales, características que coinciden con las reportadas por Nelson *et al.* (1983), Leslie y Summerell (2006). 5) *Fusarium solani* Snyder y Hansen, presentó colonias de color crema, micelio escaso, esporodocios presentes en abundancia, frecuentemente con pigmentación verdosa en el centro, macroconidios de 5 a 7 septos de 28.3-41.5 x 4.3-6.4  $\mu\text{m}$ , microconidios de 0 a 2 septos, células conidiogénicas en monofialides largas, características que coinciden para esta especie de acuerdo a Nelson *et al.* (1983), Leslie y Summerell (2006). 6) *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. y H. Schrenk, colonias de color blanco grisáceo a oscuras, las ascas se formaron después de 3 a 4 semanas, de forma clavada a cilíndrica (45.8-62.6 x 9.2-11.6  $\mu\text{m}$ ) ligeramente curvadas, con ocho ascosporas por asca de forma cilíndricas (11.7-18.5 x 3.8-5.3  $\mu\text{m}$ ), unicelulares y hialinas, esto concuerda con las características culturales y morfológicas señaladas para esta especie por Mordue (1971). (7) *Colletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus y W.D. Moore, colonias planas, blanco grisáceas, desarrollaron acérvulos. Las setas midieron en promedio 80-150  $\mu\text{m}$ , conidióforos más de 90  $\mu\text{m}$  y conidios ligeramente curvados, con promedio de 17.5-21.5 x 2.55-3.32  $\mu\text{m}$ , estas características fueron consistentes para la descripción de *Colletotrichum truncatum* (Damm *et al.*, 2009). 8) *Phomopsis longicolla* Hobbs (= *Diaporthe longicolla*) (Santos *et al.*, 2011), las colonias presentaron crecimiento algodonoso de color blanco, se observaron picnidios

the description by Nelson *et al.* (1983), and Leslie and Summerell (2006). 6) *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. and H. Schrenk, grayish-white to dark colonies, with asci that formed after 3 to 4 weeks, with nailed to cylindrical shapes (45.8-62.6 x 9.2-11.6  $\mu\text{m}$ ) slightly curved, with eight ascospores for every cylinder-shaped ascus (11.7-18.5 x 3.8-5.3  $\mu\text{m}$ ), unicellular and hyaline; this coincides with the cultural and morphologic description for this species by Mordue (1971). (7) *Colletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus and W.D. Moore, flat colonies, grayish-white, they develop acervuli. Setae measured on average 80-150  $\mu\text{m}$ , conidiophores were over 90  $\mu\text{m}$  and conidia, slightly curved, measuring an average of 17.5-21.5 x 2.55-3.32  $\mu\text{m}$ ; these characteristics were consistent with the description of *Colletotrichum truncatum* (Damm *et al.*, 2009). 8) *Phomopsis longicolla* Hobbs (= *Diaporthe longicolla*) (Santos *et al.*, 2011), the colonies presented white, cottonlike growth, long pycnidia were observed which produced alpha-conidia and beta-conidia. The alpha-conidia were hyaline, ellipsoidal, to fusiform, measuring 4.05-7.57 x 1.48-3.25  $\mu\text{m}$ . Beta-conidia, scarce, hyaline, threadlike, and with a hook-shaped tip, measured 18.2-34.5 x 1.3-2.9  $\mu\text{m}$ . Cultural and morphological characteristics adjust to the description of *Phomopsis longicolla* reported by Hobbs *et al.* (1985).

**Molecular Characterization.** The amplifications performed with the ITS5/ITS4 initiators amplified a fragment of approximately 900 pb for *Phytophthora parasitica*, and of approximately 600 pb for *Macrophomina phaseolina*, *Glomerella cingulata*, *Colletotrichum truncatum*, and *Phomopsis longicolla*. With the ITS5/NL4 initiators, a fragment of approximately 1100 pb was amplified in the *Fusarium* spp isolations. The consensus sequences of nucleotides obtained when compared to those

alargados y produjeron alfa-conidios y beta-conidios. Los alfa-conidios fueron hialinos, elipsoides a fusiformes de 4.05-7.57 x 1.48-3.25  $\mu\text{m}$ . Beta-conidios, escasos, hialinos, filiformes y con punta en forma de gancho, con dimensiones de 18.2-34.5 x 1.3-2.9  $\mu\text{m}$ . Las características de cultivo y morfológicas se ajustan a la descripción de *Phomopsis longicolla* reportadas por Hobbs *et al.* (1985).

**Caracterización molecular.** Las amplificaciones realizadas con los iniciadores ITS5/ITS4 amplificaron un fragmento aproximado de 900 pb para *Phytophthora parasitica*, y de aproximadamente 600 pb para *Macrophomina phaseolina*, *Glomerella cingulata*, *Colletotricum truncatum* y *Phomopsis longicolla*. Con los iniciadores ITS5/NL4 se amplificó un fragmento aproximado de 1100 pb en los aislamientos de *Fusarium* spp. Las secuencias consenso de nucleótidos obtenidas al ser comparadas con las disponibles en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), indicaron un 99% de porcentaje de similitud (Cuadro 4). Lo que confirmó la identidad de los organismos aislados a nivel de especie. La secuencia consenso de cada microorganismo fue depositada en el GenBank (Cuadro 4).

**Pruebas de patogenicidad.** En los ensayos realizados en cámara de ambiente controlado y a cielo abierto *Phytophthora parasitica* resultó ser el organismo de mayor patogenicidad, al causar la muerte del 100 % de las plantas inoculadas. Plantas inoculadas con este organismo en cámara de ambiente controlado, mostraron síntomas de la enfermedad 10 días después de inocularse (ddi) (Cuadro 5). A cielo abierto los síntomas de la enfermedad fueron observados a los 7 ddi. Resultados similares a los obtenidos por Hernández y Romero (1990) para *P. parasitica*. El hongo *Macrophomina phaseolina*, en cámara de ambiente controlado indujo síntomas

available in the GenBank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), indicated a 99 % similarity (Table 4), which confirmed the identity of the isolated organisms at the species level. The consensus sequence of each microorganism was deposited in the GenBank (Table 4).

**Pathogenicity Tests.** In the tests performed in a controlled environment chamber and in the opencast, *Phytophthora parasitica* turned out to be the organism with the highest pathogenicity, causing the deaths of 100 % of the inoculated plants. The plants that were inoculated with this organism in a controlled environment chamber showed symptoms of the disease 10 days after inoculation (dai) (Table 5). Opencast, the symptoms of the disease were observed 7 dai. Similar results were obtained by Hernández and Romero (1990) for *P. parasitica*. The fungus *Macrophomina phaseolina*, in a controlled environment chamber, produced symptoms in a plant at 28 dai (Table 5), and later, at an advanced stage of the disease (34 dai) formed microsclerotia in the base of the stem; whereas opencast, it produced symptoms in two plants at 13 dai (Table 5). In the sites where *M. phaseolina* was isolated in high frequently, with 66.7 % and 56.3 % (Tlachimala and Pozolapa, respectively), were the only ones in which the presence of *Phytophthora parasitica* was not detected, therefore we considered that *M. phaseolina* caused the symptoms observed. However, in Tepango and Tecoanapa, where *M. phaseolina* was also detected, though less frequently (4.2 % and 3.8 %) respectively, *P. parasitica* was isolated more frequently (Table 2), which is why the latter was considered to be the cause of the disease. In Mexico, up until the moment in which this investigation was carried out, there were no reports on the pathogenicity of *M. phaseolina* on roselle.

**Cuadro 4.** Caracterización molecular por alineamiento de las secuencias reportadas en el banco de genes con las secuencias intergénicas (ITS) de los genes rDNA de los organismos aislados de plantas de jamaica con síntomas de “pata prieta”.

**Table 4.** Molecular characterization by alignment of sequences reported in the gene bank with the intergenic sequences (ITS) of the rDNA genes of organisms isolated roselle plants with symptoms of “black leg”.

Identificación morfológica	No. de depósito en el NCBI <sup>y</sup>	Secuencia más cercana en el NCBI	BLAST (%) de similitud	No. de acceso en el NCBI
<i>Phytophthora parasitica</i>	KM519189	<i>Phytophthora parasitica</i>	99	GU111682
<i>Macrophomina phaseolina</i>	KM519193	<i>Macrophomina phaseolina</i>	99	HQ649832
<i>Fusarium incarnatum</i>	KM519192	<i>Fusarium incarnatum</i>	99	AY633745
<i>Fusarium oxysporum</i>	KM519188	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	AY188919
<i>Fusarium solani</i>	KM519190	<i>Fusarium solani</i>	99	KF938479
<i>Glomerella cingulata</i>	KM519191	<i>Glomerella cingulata</i> ( <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ) <sup>z</sup>	99	JN697580
<i>Colletotrichum truncatum</i>	KM519187	<i>Colletotrichum truncatum</i>	99	KC460308
<i>Phomopsis longicolla</i>	KM519194	<i>Diaporthe longicolla</i> ( <i>Phomopsis longicolla</i> ) <sup>z</sup>	99	KF577911

<sup>y</sup>NCBI (National Center of Biotechnology Information).

<sup>z</sup>Anamorfo.

en una planta a los 28 ddi (Cuadro 5), posteriormente en la etapa avanzada de la enfermedad (34 ddi) formó microesclerocios en la base del tallo; mientras que a cielo abierto, indujo síntomas en

*Fusarium incarnatum* caused symptoms of the disease only in opencast tests, in two of the five inoculated plants. The symptoms were observed 15 dai (Table 5), and characteristically included

**Cuadro 5.** Pruebas de patogenicidad con organismos asociados a la “pata prieta” de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.).

**Table 5.** Pathogenicity tests with organisms associated to “black leg” of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.).

Organismo inoculado	Plantas con síntomas		Días a inicio de síntomas		Incidencia (%)		Incidencia total (%)
	1 <sup>o</sup>	2	1	2	1	2	
<i>Phytophthora parasitica</i>	5/5 <sup>†</sup>	5/5	10	7	100	100	100
<i>Fusarium oxysporum</i>	0/5	0/5	-	-	-	-	-
<i>Fusarium solani</i>	0/5	0/5	-	-	-	-	-
<i>Fusarium incarnatum</i>	0/5	2/5	-	15	-	40	20
<i>Macrophomina phaseolina</i>	1/5	2/5	28	13	20	40	30
<i>Glomerella cingulata</i>	0/5	0/5	-	-	-	-	-
<i>Phomopsis longicolla</i>	0/5	0/5	-	-	-	-	-
<i>Colletotrichum truncatum</i>	0/5	0/5	-	-	-	-	-
Testigo	0/5	0/5	-	-	-	-	-

<sup>o</sup>1=Ensayo 1, realizado en cámara de ambiente controlado. 2= Ensayo 2, realizado a cielo abierto / 1=Assay 1, tested in inviromental controled chamber. 2=Assay 2, tested on opencast.

<sup>†</sup> Proporción de plantas que mostraron síntomas en cada ensayo / Proportion of plants that showed symptoms on every assay.



dos plantas a los 13 ddi (Cuadro 5). En los sitios donde se aisló *M. phaseolina* en alta frecuencia con 66.7 % y 56.3 % (Tlachimala y Pozolapa respectivamente), fueron los únicos donde no se detectó la presencia de *Phytophthora parasitica*, por lo que se consideró que *M. phaseolina* es el que causó los síntomas observados. Sin embargo, en los sitios de Tepango y Tecoaapa en donde también se detectó a *M. phaseolina* con baja frecuencia (4.2 % y 3.8 %) respectivamente, *P. parasitica* se aisló con mayor frecuencia (Cuadro 2), por lo que se considera a este último como el causante de la enfermedad. En México hasta el momento en que se desarrolló esta investigación, no se encontraron reportes de la patogenicidad de *M. phaseolina* en jamaica.

*Fusarium incarnatum* ocasionó síntomas de la enfermedad únicamente en ensayo a cielo abierto, en dos de cinco plantas inoculadas. Los síntomas se observaron a los 15 ddi (Cuadro 5), y se caracterizaron por marchitez y necrosis basal. Al aislarse a este organismo con una baja frecuencia (2.4 %) (Cuadro 2), se considera en este estudio, como patógeno secundario de la enfermedad “pata prieta” en los sitios donde se detectó.

Los resultados de las inoculaciones con *Phytophthora parasitica* indicaron que este organismo fue el de mayor patogenicidad, seguido por *Macrophomina phaseolina* y el de menor patogenicidad fue *Fusarium incarnatum* (Cuadro 5). En Egipto *M. phaseolina* y *F. incarnatum* fueron aislados de plantas con síntomas de pudrición radical y marchitez de plantas de jamaica. En inoculaciones artificiales en invernadero y a cielo abierto determinaron que *M. phaseolina* fue más patogénico que *F. incarnatum* (Hassan *et al.*, 2014), lo que coincide con lo determinado en el presente estudio.

A partir de plantas inoculadas en forma independiente con *P. parasitica*, *M. phaseolina* y *F. incarnatum*, y que indujeron síntomas se obtuvo

wilting and basal necrosis. Because this organism was isolated at a low frequency (2.4 %) (Table 2), it is considered by this study as a secondary pathogen of the “black leg” disease in the areas in which it was detected.

The results of the inoculations with *Phytophthora parasitica* indicated that this organism had the highest pathogenicity, followed by *Macrophomina phaseolina*, and the lowest pathogenicity was *Fusarium incarnatum* (Table 5). In Egypt, *M. phaseolina* and *F. incarnatum* were isolated from plants with symptoms of rooting rot and wilt of roselle. In artificial inoculations in greenhouses and in the open cast *M. phaseolina* was found to be more pathogenic than *F. incarnatum* (Hassan *et al.*, 2014), which coincides with the findings by this investigation.

From plants independently inoculated with *P. parasitica*, *M. phaseolina*, and *F. incarnatum*, and that produced symptoms, we obtained the same species that was inoculated when reisolating.

In the tests performed in a controlled environment chamber and open cast, as shown in Table 5, the other inoculated organisms and control plants did not show symptoms of the disease.

In a similar study carried out in Nigeria on roselle with stem and root rot, *Phytophthora parasitica*, *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium solani* were isolated. In pathogenicity tests *P. parasitica* was found to be the main cause of the disease; *R. solani* only caused the death of plantlets, and *F. solani* was not pathogenic (Adeniji, 1970).

*Phytophthora parasitica* has been reported in Guerrero by Hernández and Romero (1990) as being the cause of “black leg,” in India, it causes root and stem rotting in roselle (Kumar and Mandal, 2010), and its presence has also been reported in Africa, Indonesia, Puerto Rico, Malaysia, Philippines, Ivory Coast, Brazil, and other countries, as the cause of root rot and stem in this species (Erwin

la misma especie que fue inoculada, al realizar los reaislamientos.

En los ensayos realizados en cámara de ambiente controlado y a cielo abierto, como se observa en el Cuadro 5, los otros organismos inoculados y las plantas testigos no manifestaron síntomas de la enfermedad.

En un estudio similar realizado en Nigeria, en jamaica con pudrición de tallo y raíz, se aisló a *Phytophthora parasitica*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani*. En pruebas de patogenecidad *P. parasitica* resultó ser el principal agente causal de la enfermedad; *R. solani* solo causó muerte de plántulas y *F. solani* no fue patogénico (Adeniji, 1970).

*Phytophthora parasitica* ha sido reportado en Guerrero por Hernández y Romero (1990) como agente causal de la “pata prieta”, en la India causa la pudrición radical y de tallo en jamaica (Kumar y Mandal, 2010), también se ha informado de su presencia en África, Indonesia, Puerto Rico, Malasia, Filipina, Costa de Marfil, Brasil, entre otros países, como causante de pudrición radical y de tallo en esta especie (Erwin y Ribeiro, 1996; Drenth y Guest, 2004; Silva *et al.*, 2014).

Por otra parte, en Cuba y el Salvador, Wellman (1977) reportó que *Macrophomina phaseolina* es causante de pudrición del tallo en plantas de jamaica, recientemente en Egipto se menciona como inductor de pudrición radical y marchitez de plantas en esta misma especie (Hassan *et al.*, 2014). En Bangladés, se ha aislado de semilla de jamaica, como patógeno que afecta la germinación (Islam *et al.*, 2013). También se menciona en otras especies del género *Hibiscus*. Así, en la India causa la “pudrición del cuello” en hibisco de coral (*Hibiscus schizopetalus*) (Santhakumari, 2002).

El hongo *Fusarium incarnatum* (= *F. semitectum*) en Egipto se reporta como causante de pudrición radical y marchitez de jamaica (Hassan *et al.*, 2014). Además en otros países se tienen registros

and Ribeiro, 1996; Drenth and Guest, 2004; Silva *et al.*, 2014).

Likewise, in Cuba and El Salvador, Wellman (1977) reported that *Macrophomina phaseolina* causes stem rot in roselle plants, and recently, in Egypt, it was mentioned as inducing root rot and wilting of plants of this same species (Hassan *et al.*, 2014). In Bangladesh, it has been isolated from roselle seeds as a pathogen that affects germination (Islam *et al.*, 2013). It is also mentioned in other species of the genus *Hibiscus*. In India it causes “collar rot” in coral hibiscus (*Hibiscus schizopetalus*) (Santhakumari, 2002).

In Egypt, the fungus *Fusarium incarnatum* (= *F. semitectum*) has been reported as the cause of root rot and roselle wilting (Hassan *et al.*, 2014). Also, in other countries, there are records of it being pathogenic in other species of the genus *Hibiscus*. For example, Farr and Rossman (2015) report *F. incarnatum* in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) in Iran and Kenya, and on tulip (*Hibiscus rosasinensis* L.) in the Island of Barbados. Leslie *et al.* (1990) indicate that *F. incarnatum* is a common pathogenic agent in the soil, distributed mostly in tropical and subtropical regions.

The fungus *Fusarium oxysporum* was not considered pathogenic, despite reports of its pathogenicity in roselle in Malaysia, Nigeria, United States, and other countries (Ooi and Salleh, 1999; Amusa *et al.*, 2005; Ploetz *et al.*, 2007; Hassan *et al.*, 2014).

Additionally, in India *Hibiscus sabdariffa* is reported as a new host for *Fusarium solani* (Padaganur *et al.*, 1988). In Egypt, Hassan *et al.* (2014) mention that *F. solani* is a pathogenic agent for roselle, and Chehri *et al.* (2014) in Malaysia isolated it from roselle plants with symptoms of root rot. However, in this study it was not pathogenic.

The genus *Colletotrichum* includes several pathogenic species of plants with economic

como patógeno de otras especies del género *Hibiscus*, por ejemplo; Farr y Rossman (2015) reportan a *F. incarnatum* en kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) en Irán y Kenia, y sobre tulipán (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) en la Isla de Barbados. Leslie *et al.* (1990) indica que *F. incarnatum* es un agente patogénico común en el suelo, distribuido principalmente en regiones tropicales y subtropicales.

El hongo *Fusarium oxysporum* no fue patogénico, sin embargo existen reportes como patógeno de jamaica en Malasia, Nigeria, EUA, entre otros países (Ooi y Salleh, 1999; Amusa *et al.*, 2005; Ploetz *et al.*, 2007; Hassan *et al.*, 2014).

Por otra parte en la India reportan a *Hibiscus sabdariffa* como nuevo hospedante de *Fusarium solani* (Padaganur *et al.*, 1988). En Egipto Hassan *et al.* (2014) mencionan que *F. solani* es agente patogénico para la jamaica, además Chehri *et al.* (2014) en Malasia lo aisló de plantas de jamaica con síntomas de podredumbre de raíz, sin embargo en el presente estudio no fue patogénico.

El género *Colletotrichum* incluye a numerosas especies patógenas de plantas de importancia económica. Distribuido principalmente en regiones tropicales y subtropicales (Cannon *et al.*, 2012). El hongo *Colletotrichum truncatum* es patógeno de jamaica en la India (Farr y Rossman, 2015) y además se ha reportado en otras especies del género *Hibiscus*, por ejemplo: *H. esculentum* en la India y Pakistán; mientras que en Malasia sobre *H. rosa-sinensis* (Farr y Rossman, 2015). *Glomerella cingulata* también se ha reportado en especies del género *Hibiscus* tales como *H. tiliaceus* como causante de antracnosis en los EUA (Farr y Rossman, 2015) y en *H. rosa-sinensis* en Argentina (Rivera *et al.*, 2000). Tanto *C. truncatum* y *G. cingulata* también han sido reportadas como especies endófitas de plantas de la familia Malvaceae, además de otras

importance distributed mainly in tropical and subtropical regions (Cannon *et al.*, 2012). The fungus *Colletotrichum truncatum* is a pathogen of roselle in India (Farr and Rossman, 2015), and it has also been reported in other species of the genus *Hibiscus*, such as *H. esculentum* in India and Pakistan or *H. rosa-sinensis* in Malaysia (Farr and Rossman, 2015). *Glomerella cingulata* has also been reported on species of the genus *Hibiscus* such as *H. tiliaceus* as the cause of anthracnose in the United States (Farr and Rossman, 2015) and on *H. rosa-sinensis* in Argentina (Rivera *et al.*, 2000). Both *C. truncatum* and *G. cingulata* have also been reported as endophytic species of the Malvaceae family, as well as other plant species (Costa *et al.*, 2012; Kumar and Kaushik, 2013). This coincides with findings from this study, in which they were not found to be pathogenic in roselle plants.

The genus *Phomopsis* is related to diseases in herbaceous plants, although it can attack bushes and some fruit trees (Agrios, 2005). *P. longicolla* cause stem blight in peanut plants (*Arachis hypogaea* L.) (Sanogo and Etarock, 2009); in soybean, it induces cankers in the stem, and it can infect pods and seeds (Lu *et al.*, 2010; Li, 2010). It has also been reported as being an endophyte in soybean and other species (Larran *et al.*, 2002; Wagenaar and Clardy, 2001; Rhoden *et al.*, 2012). No reports were found on this organism as a pathogen of roselle (Farr and Rossman, 2015), and in this study it was not found to be pathogenic.

Due to the above, the fungi *F. oxysporum*, *F. solani*, *G. cingulata*, *C. truncatum*, and *P. longicolla* are considered organisms associated to roselle and of low risk for this area of study, since they were not found to be pathogenic (Table 5). The frequency of isolation was low and in general terms, they displayed a limited distribution.

especies de plantas (Costa *et al.*, 2012; Kumar y Kaushik, 2013). Lo que coincide con lo obtenido en este estudio, al no ser patogénicos en plantas de jamaica.

El género *Phomopsis* se relaciona con enfermedades de plantas herbáceas, aunque puede atacar arbustos y algunos árboles frutales (Agrios, 2005). *P. longicolla* en cacahuate (*Arachis hypogaea* L.) causa tizón del tallo (Sanogo y Etarock, 2009), en soya induce canchales en tallo, y es capaz de infectar vainas y semillas (Lu *et al.*, 2010; Li, 2010), también ha sido reportado como endófito en soya y otras especies (Larran *et al.*, 2002; Wagenaar y Clardy, 2001; Rhoden *et al.*, 2012), no se encontraron reportes de este organismo como patógeno de jamaica (Farr y Rossman, 2015), además en el presente estudio, este organismo no fue patogénico. Por lo anterior los hongos *F. oxysporum*, *F. solani*, *G. cingulata*, *C. truncatum* y *P. longicolla* se consideran organismos asociados a la jamaica y de bajo riesgo para esta zona en estudio, debido a que no fueron patogénicos (Cuadro 5), la frecuencia de aislamiento fue baja y en general presentaron distribución limitada.

## CONCLUSIONES

Se concluye que *Phytophthora parasitica* es el organismo de mayor frecuencia y distribución en la región estudiada, por lo que se considera el principal agente causal de la enfermedad “pata prieta”. El hongo *Macrophomina phaseolina* presentó baja distribución, sin embargo fue aislado en alta frecuencia en dos sitios, por lo que es el causante de la enfermedad en tales lugares. *Fusarium incarnatum* fue patogénico, sin embargo se requiere de más estudios, debido a su baja frecuencia y distribución. Se reporta por primera vez a *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium incarnatum* como patógeno de la jamaica en México. *Fusarium oxysporum*

## CONCLUSIONS

We conclude that *Phytophthora parasitica* is the organism with the greatest frequency and distribution in the region studied, and is therefore considered the main cause of the “black leg” disease. The fungus *Macrophomina phaseolina* presented low distribution, although it was isolated with high frequency in two sites, and therefore it is the cause of the disease in these places. *Fusarium incarnatum* was pathogenic, although it requires further study, due to its low frequency and distribution. *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium incarnatum* are reported as pathogenic for roselle for the first time in Mexico. *Fusarium oxysporum* was found widely distributed, yet it presented a low frequency and it was not pathogenic. The fungi *Fusarium solani*, *Glomerella cingulata*, *Colletotrichum truncatum*, and *Phomopsis longicolla* are considered low risk for the crop, since they are not pathogenic and their isolation frequency was low.

~~~~~ End of English version ~~~~~

se encontró ampliamente distribuido, no obstante presentó baja frecuencia y no fue patogénico. Los hongos *Fusarium solani*, *Glomerella cingulata*, *Colletotrichum truncatum* y *Phomopsis longicolla* se consideran de bajo riesgo para el cultivo, debido a que no fueron patogénicos y su frecuencia de aislamiento fue baja.

## LITERATURA CITADA

Abawi GS and Pastor-Corrales MA. 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa: Diagnosis, research methodologies and management strategies. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 114 p.

- Adeniji MO. 1970. Root and stem rot of the fiber crop roselle (*Hibiscus sabdariffa*) in Nigeria. *Plant Disease Reporter* 54:23-25.
- Agrios GN. 2005. *Plant pathology*. Fifth edition. Academic Press. New York, USA. 922p.
- Amusa NA, Adegbite AA and Oladapo MO. 2005. Vascular wilt of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) in the humid forest region of South-western Nigeria. *Plant Pathology Journal* 4:122-125.
- Besoain CAX. 2013. Control biológico de *Phytophthora* en tomates y pimientos desarrollados bajo invernadero. Pp: 65-68. In: Montealegre ARJ y Pérez RLM (Eds). *Control biológico de enfermedades de las plantas en Chile*. Santiago, Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 147 p.
- Barnett LH and Hunter BB. 2006. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Fourth Edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 218p.
- Booth C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycology Institute. Kew, Surrey, United Kingdom. 237 p.
- Cannon PF, Damm U, Johnston PR and Weir BS. 2012. *Colletotrichum* – current status and future directions. *Studies in Mycology* 73: 181–213.
- Ceja-Torres LF, Téliz OD, Osada KS y Morales-García LJ. 2000. Etiología, distribución e incidencia del cancro del aguacate *Persea americana* Mill. En cuatro municipios del estado de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fito-patología* 18 (002): 79-86.
- Chehri K, Salleh B and Zakaria L. 2014. *Fusarium virguliforme*, a soybean sudden death syndrome fungus in Malaysian soil. *Australasian Plant Disease Notes* 9:128.
- Costa IPMW, Assuncao MMC, Lima TEF, Oliveira RJV and Cavalcanti MAQ. 2012. Checklist of endophytic fungi from tropical regions. *Mycotaxon* 119: 494.
- Damm U, Woudenberg JHC, Cannon PF and Crous PW. 2009. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Diversity* 39: 45-87.
- Dasgupta B, Mohanty B and Datta P. 2012. Survival of *Phytophthora parasitica* causing foot and leaf rot of betelvine under different soil pH, moisture and temperature regimes. *SAARC Journal of Agriculture* 10 (1):29-43
- Drenth A and Guest DL. 2004. Diversity and management of *Phytophthora* in Southeast Asia. *ACIAR Monograph No. 114*, 238p.
- Erwin DC and Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 562 p.
- Farr DF and Rossman AY. 2015. *Fungal databases, systematic mycology and microbiology laboratory, ARS, USDA*. <http://nt.ars-grin.gov/fungaldbases/> (consulta, marzo 2015).
- Gallegly ME and Hong C. 2008. *Phytophthora*: Identifying species by morphology and DNA fingerprints. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 158 p.
- Hanlin RT. 1990. *Illustrated genera of ascomycetes*. Vol. 1. APS Press, The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 263 p.
- 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(1): 66-72.
- Hernández MJ y Romero CS. 1990. Identificación del agente causal de “pata prieta de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa*, L.)” y pruebas de fungicidas para su control bajo condiciones de invernadero. *Revista Chapingo* (67-68):50-54.
- Hobbs TW, Schmitthenner AF and Kuter GA. 1985. A new *Phomopsis* species from soybean. *Mycologia* 77, 535–44.
- Horst RK. 2008. *Westcott's plant disease handbook*. Seventh Edition. Springer Verlag Berlin Heidelberg . New York, USA. 1317 p.
- Holliday P and Punithalingam E. 1970. *Macrophomina phaseolina*. Commonwealth Mycological Institute. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, N° 275. Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute.
- Islam MS, Uzzal MSI, Mallick K and Monjil MS. 2013. Management of seed mycoflora of mesta (*Hibiscus sabdariffa*) by seed washing, garlic extract and knowin. *Progressive Agriculture*. 24(1 and 2): 1-7.
- Jha AK and Dubey SC. 2000. Occurrence of collar rot of (*Abelmoschus esculentus*) in the plateau region of Bihar. *Journal of Research Birsa Agriculture University* 12 (1): 67-72.
- Kaur S, Dhillon GS, Brar SK, Vallad GE, Chand R and Chauhan VB. 2012. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. *Critical Reviews in Microbiology* 38(2):136–151.
- Kumar R and Mandal RK. 2010. Effect of different fungicides on *Phytophthora parasitica* var. *sabdariffae* and *Sclerotium rolfsii* infecting mesta. *Pestology* 34:23-27.
- Kumar S and Kaushik N. 2013. Endophytic fungi isolated from oil-seed crop *Jatropha curcas* produces oil and exhibit antifungal activity. *PLoS ONE* 8(2):e56202.
- Larran S, Rollan C, Bruno HA, Alippi HE and Urrutia MI. 2002. Nota corta: endophytic fungi in healthy soybean leaves. *Investigación Agraria. Producción y protección vegetales*. 17 (1):173–178.
- Leslie JF and Summerell BA 2006. *The Laboratory Fusarium. Manual*. Blackwell Publishing. Ames, Iowa, USA. 388 p.
- Leslie JF, Pearson AC, Nelson EP and Touson AT. 1990. *Fusarium* species from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology* 80:343-350.
- Li S, Hartman GL and Boykin DL. 2010. Aggressiveness of *Phomopsis longicolla* and other *Phomopsis* spp. on soybean. *Plant Disease* 94(8):1035-1040.
- Lu X, Robertson EA, Byamukama ZE, and Nutter WF. 2010. Evaluating the importance of stem canker of soybean in Iowa. *Plant Disease* 94 (2):167-173.
- Mordue JEM. 1971. *Glomerella cingulata*. No. 315. In: CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. CAB, Kew, UK.
- Murray HG and Thompson WF. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Research*. 8:4321-4325.

- Nelson PE, Toussoun TA and Marasas WFO. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University. University Park, Pennsylvania, USA. 193 p.
- O'Donnell K. 1993. *Fusarium* and its near relatives. In: The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics, pp. 225–233. Edited by Reynolds DR and Taylor JW. Wallingford, UK: CAB International.
- Ooi KH and Salleh B. 1999. Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum*, the causal organism of vascular wilt on roselle in Malaysia. *Biotropia* 12:31-41.
- Padaganur, GM, Kachapur, MR, Naik KS and Patil NK. 1988. *Hibiscus sabdariffa* L., a new host to *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. *Plant Pathol Newsl* 6 (1-2):13.
- Ploetz RC, Palmateer AJ, Geiser DM and Juba JH. 2007. First report of *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* on roselle in the United States. *Plant Disease* 91:639.
- Rhoden SA, Garcia A, Bongiorno VA, Azevedo JL and Pamphile JA. 2012. Antimicrobial activity of crude extracts of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Trichilia elegans* A. Juss. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 02 (08): 57-59.
- Rivera MC, Wright ER and Carballo S. 2000. First report of *Colletotrichum gloeosporioides* on chinese rose in Argentina. *Plant Disease* 84: 1345. (34598).
- Sanogo S and Etarock FB. 2009. First report of *Phomopsis longicolla* causing stem blight of valencia peanut in New Mexico. *Plant Disease* 93 (9):965.1-965.1.
- Santhakumari P, Kavitha K and Nisha MS. 2002. Occurrence of collar rot in coral *Hibiscus*: a new record. *Journal of Mycology and Plant Pathology* 32(2):258-258.
- Santos JM, K. Vrandečić K, Čosić J, Duvnjak T and Phillips AJL. 2011. Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia. *Persoonia* 27: 9-19.
- SAS Institute. 1988. SAS User's Guide: Statistics. Release 6.03 Edition. SAS Institute, Inc. Cary, N.C. USA.
- SIAP. 2010. Anuario estadístico de la producción agrícola. [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=351](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351) (consulta, mayo 2012).
- Silva GS, Rêgo AS and Leite RR. 2014. Doenças da vinagreira no Estado do Maranhão. *Summa Phytopathologica* 40 (4): 378-380.
- SMN. 2012. Servicio meteorológico nacional. Comisión Nacional del Agua. Normales climatológicas. Periodo (1981-2010). [http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=182:guerrero&catid=14:normal-es-por-estacion](http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=182:guerrero&catid=14:normal-es-por-estacion) (consulta, enero 2012).
- Surinder K, Bahadur VC, Kaur SB and Singh GD. 2013. Adaptability of *Macrophomina phaseolina* isolates of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) to different temperature and pH. *International Journal of Life Sciences* 1 (2): 81-88.
- Sutton BC. 1980. The coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute. Kew, England 696 p.
- Sutton BC. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey JA, Jeger MJ, eds. *Colletotrichum*. Biology, pathology and control. Wallingford, UK: CAB International. pp 1–26.
- Wagenaar MM and Clardy J. 2001. Dicerandrols, new antibiotic and cytotoxic dimers produced by the fungus *Phomopsis longicolla* isolated from an endangered mint. *Journal of Natural Products* 64: 1006–1009.
- Walkley A and Black IA. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science* 37: 29–38.
- Wellman LF. 1977. Dictionary of tropical American crops and their diseases. The Scarecrow Press, Inc. Metuchen, New Jersey. 666 p.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds.) *PCR Protocols. A guide to methods and applications*. New York NY. Academic Press, Inc. pp. 315-322.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L and Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7:203-214.