

Relationship between spore fluctuations, environmental conditions and severity of calyx spot on roselle (*Hibiscus sabdariffa*)

Relación entre fluctuaciones de esporas, condiciones ambientales y severidad del manchado y tizón de cáliz de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*)

David H. Noriega-Cantú*, Rocío Toledo-Aguilar, Romualdo Vasquez-Ortiz, Antonino Alejo-Jaimes, Campo Experimental Iguala, INIFAP. Carretera Iguala-Tuxpan Km 2.5, Colonia Centro Tuxpan C.P. 40000, Iguala de la Independencia Guerrero; Eduardo R. Garrido-Ramírez, Campo Experimental Centro de Chiapas, INIFAP. Carretera Internacional. Ocozocoautla-Cintalapa Km 3 s/n, Ocozocoautla, Chiapas; Juan Pereyda-Hernández, Ricardo González-Mateos, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales, UAGro. Periférico Pte. S/N, Colonia Villa de Guadalupe, Iguala, Guerrero, México; C.P. 40010. *Autor para correspondencia: noriega.david@inifap.gob.mx.

Recibido: 17 de Septiembre, 2019.

Aceptado: 09 de Noviembre, 2019.

Noriega-Cantú DH, Toledo-Aguilar R, Vasquez-Ortiz R, Alejo-Jaimes A, Garrido-Ramírez ER, Pereyda-Hernández J and González-Mateos R. 2020. Relationship between spore fluctuations, environmental conditions and severity of calyx spot on roselle (*Hibiscus sabdariffa*). Mexican Journal of Phytopathology 38(1): 1-24.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1909-1

Primera publicación DOI: 26 de Noviembre, 2019.

First DOI publication: November 26, 2019.

Resumen. La jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) es afectada por severas enfermedades como tizón y manchado del cáliz (MCJ). El objetivo fue estudiar las relaciones entre fluctuación estacional de esporas de *Corynespora* y *Coniella* patógenos del manchado y tizón de cáliz y hojas, las condiciones de clima y severidad (MCJ) en Ayutla, Gro.,

Abstract. The roselle (*Hibiscus sabdariffa*) is affected by severe diseases such as blight and spotting of the calyx (MCJ). The objective was to study the relationships between seasonal fluctuation of *Corynespora* and *Coniella* spores, pathogenic stains and blight of chalice and leaves, weather conditions and severity (MCJ) in Ayutla, Gro. Mexico. The spores were monitored, in two cycles, the fungi were isolated and the morphological and molecular identification of *Coniella* was performed, the study focused on pathogens reported in Mexico. The pathogenicity tests with *C. diploidiella* and *C. cassiicola* confirmed very similar symptoms between both fungi. *Coniella* was the most abundant (48%) and with least amount *Corynespora* (8.7%). The spore dynamics had a monthly and weather related fluctuation. The population dynamics of spores was closely related to the climate. The maximum and average

México. Las esporas fueron monitoreadas en dos ciclos, se aislaron los hongos y se realizó la identificación morfológica y molecular de *Coniella* el estudio se centró en patógenos reportados en México. Las pruebas de patogenicidad con *C. diplodiella* y *C. cassiicola* confirmaron la sintomatología muy similar entre ambos hongos. *Coniella* fue el más abundante (48%) y con menos cantidad *Corynespora* (8.7%). La dinámica de esporas tuvo una fluctuación mensual y relacionada con el clima. Las temperaturas máximas y medias (°C) y promedio de radiación global (W/m²) mostraron correlaciones positivas significativas con la abundancia de esporas de *Coniella* y el total de esporas, mientras que la precipitación (mm), temperatura mínima, velocidad del viento máxima (Km hr⁻¹) y horas de radiación solar, sus relaciones fueron negativas con las fluctuaciones de esporas de *Corynespora*. La severidad del manchado de hojas y cálices fue correlacionada positiva y significativa con el número de esporas capturadas.

Palabra clave: *Coniella*, *Corynespora*, epidemiología, dinámica poblacional.

En México se cultivan 18,543.5 ha de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y se producen 7,683.2 t de cálices deshidratados, con un valor de la producción superior a \$ 293 millones de pesos (SIAP, 2018). En dicho país, los estados productores son: Guerrero (14,079 ha), Michoacán (1,714 ha) y Oaxaca (1,605 ha), quienes aportan el 93%, de la producción nacional (SIAP, 2018). En Guerrero, los principales municipios productores son: Ayutla de Los Libres, Tecoaapa, Acapulco de Juárez, San Luis Acatlán, Juan R. Escudero y San Marcos, los que aportaron 64% de la producción nacional en 2018. El sistema de producción maíz-jamaica constituye el eje de la economía de las familias campesinas, el

temperatures (°C) and average global radiation (W/m²) showed significant positive correlations with the abundance of *Coniella* spores and the total spores, while precipitation (mm), minimum temperature, wind speed maximum (Km hr⁻¹) and hours of solar radiation, their relations were negative with the fluctuations of *Corynespora* spores. The severity of leaf and calyx staining was positively and significantly correlated with the number of spores captured.

Key words: *Coniella*, *Corynespora*, epidemiology, population dynamic.

Mexico plants 18,543.5 ha of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) and produces 7,683.2 t of dried calyces, with a production value of over \$293 million pesos (SIAP, 2018). In said country, the producing states are Guerrero (14,079 ha), Michoacán (1,714 ha) and Oaxaca (1,605 ha), which supply 93% of the country's production (SIAP, 2018). In Guerrero, the municipal areas with the highest production are Ayutla de Los Libres, Tecoaapa, Acapulco de Juárez, San Luis Acatlán, Juan R. Escudero, and San Marcos, which contributed with 64% of the country's production in 2018. The maize-roselle production system the axis for the economies of farmer families; maize is used as the staple food for the consumption of the families, and roselle, as the commercial crop that provides them with incomes. The "Roselle Calyx Spotting" (RCS) disease, caused by *Corynespora cassiicola*, is considered one of the most severe in Guerrero, since it affects 60% of the total planted surface (Cesavegro, 2018).

However, the fungi *Coniella musaiaensis* var., *hibisci*, *Phomopsis* sp., *Corynespora cassiicola* and *Lasiodiplodia theobromae* are reported in Guerrero as being related to RCS, causing very similar-looking black spots in the calyx and as

maíz se usa como alimento básico de autoconsumo y la jamaica como cultivo comercial para obtención de ingresos económicos. La enfermedad “manchado de cáliz” (MCJ) causada por *Corynespora cassiicola*, es considerada una de las más severas en Guerrero, afecta el 60% de la superficie sembrada (Cesavegro, 2018).

No obstante, se reportan en Guerrero, a los hongos *Coniella musaiaensis* var., *hibisci*, *Phomopsis* sp., *Corynespora cassiicola* y *Lasiodiplodia theobromae* asociados al MCJ, provocando manchas muy similares en el cáliz de color negro, ligeramente hundidas de forma irregular, conforme la infección avanza incrementan en tamaño y número e invaden el cáliz (Martínez, 2010). Correa *et al.* (2011), determinaron que el manchado acuoso del follaje de jamaica en el estado de Tabasco, fue inducido por *Pilidiella diplodiella* (sin. *Phoma diplodiella*) donde causa síntomas con manchas foliares circulares e irregulares color marrón claro, presencia de necrosis con apariencia acuosa en toda la lámina foliar. Conforme avanza la necrosis, se muestran anillos concéntricos marrón claro de consistencia suave; así como, pequeños cuerpos (picnidios) de color marrón oscuro agrupados que sobresalen de la cutícula de la hoja. La necrosis alcanza el peciolo de la hoja, esta se debilita y se desprende de la planta. Las manchas inician en las hojas inferiores y avanzan a las hojas superiores, y cuando el nivel de daño es severo, ocurre defoliación. Mientras que Ortega-Acosta *et al.* (2015) reporta a *Corynespora cassiicola* como agente causal del MCJ en Guerrero, el cual causa manchas circulares irregulares en las hojas con centros de color pajizo, bordes negros y anillos de color púrpura, al crecer se unen en grandes áreas necróticas; en los cálices se observan puntos hundidos necróticos, circulares a irregulares, causando un tizón en el ápice que se extiende a la base del cáliz. Barrón-Coronado *et al.* (2019), en muestras procedentes de Ayutla, reportan

the infection progresses it increases in size and invades the calyx (Martínez, 2010). Correa *et al.* (2011) determined that the aqueous spots on the leaves of roselle plants in the state of Tabasco, was induced by *Pilidiella diplodiella* (syn. *Phoma diplodiella*), which causes symptoms with light brown, circular and irregular spots, necrosis with an aqueous appearance throughout the leaf. As the necrosis progresses, concentric, light brown rings with a soft consistency appear, along with small, grouped, light brown bodies (pycnidia) that stand out of the leaf's cuticle. The necrosis reaches the leaf petiole, which weakens and detaches from the plant. The spots begin with the lower leaves and move upwards until they reach the higher leaves, and when the damage level is severe, defoliation occurs. While Ortega-Acosta *et al.* (2015) report *Corynespora cassiicola* as the causal agent of RCS in Guerrero, causing irregular circular spots on the leaves with light brown colored spots, black edges and purple rings that, when they grow, they join in large necrotic areas; the calyces display sunken necrotic spots, circular to irregular in shape, causing blight in the apex, which extends to the base of the calyx. Barrón-Coronado *et al.* (2019) report the pathogenicity of *Coniella javanica* as the cause of blight in leaves and calyces in samples from Ayutla, describing symptoms with irregular spots, light brown in color, which later increased in size and caused necrosis with the presence of pycnidia; in advanced stages of the disease, an overall wilting of the plant was observed.

The knowledge of the availability and dispersal of the inoculant of the phytopathogen, of the environmental factors that favor the release of spores and the development of the plant are crucial aspects to determine the periods of risk of infection, which may help implement preventive control measures. Therefore, the aim of this investigation was to study the relations between the

la patogenicidad de *Coniella javanica* como el causante del tizón de hojas y cálices, describiendo síntomas con manchas irregulares, de color marrón claro, que luego aumentaron de tamaño y causaron una necrosis con la presencia de picnidios, en etapas avanzadas de la enfermedad, se observó un marchitamiento general de la planta.

El conocimiento de la disponibilidad y dispersión de inóculo de los fitopatógenos, de los factores ambientales que favorecen la liberación de esporas y el desarrollo de la planta, son aspectos fundamentales para determinar los períodos de riesgo de infección, que permita implementar medidas preventivas de control. Por lo que, el objetivo de este trabajo fue estudiar las relaciones entre fluctuación estacional de esporas de *Corynespora* y *Coniella* hongos patógenos al manchado de cálices y al tizón de hojas y cálices, las condiciones de clima y la severidad del manchado de cálices (MCJ) en Ayutla, Gro. México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio. El trabajo se realizó en una plantación de jamaica localizada en Pozolapa, Mpio. de Ayutla de los Libres, Guerrero, México (16° 53' 35.2" N, 99° 05' 59.7" O), a una altitud de 275 msnm, con antecedentes de alta incidencia de la mancha acuosa de hojas, tizón cálices y MCJ, durante dos ciclos de producción en primavera-verano 2017 y 2018. El municipio presenta clima cálido subhúmedo (Aw1) (García, 2004). La plantación bajo estudio fue de una hectárea. La siembra se realizó el 04 y 10 de julio de 2017 y 2018 respectivamente, con espeque, con cuatro a seis semillas por mata del genotipo denominado "Coneja", a distancia de 1.0 m entre surcos y matas. Cuando las plantas tuvieron 10 cm de altura, se realizó un raleo, para dejar dos a tres plantas por mata, con una

seasonal fluctuation of *Corynespora* and *Coniella* pathogenic fungi spores to the calyx spotting and leaf and calyx blight, weather conditions and the severity of calyx spotting (RCS) in Ayutla, Gro. Mexico.

MATERIALS AND METHODS

Area of study. Work was carried out in a roselle plantation located in Pozolapa, in the municipal area of Ayutla de los Libres, Guerrero, Mexico (16° 53' 35.2" N, 99° 05' 59.7" O), at an altitude of 275 masl, with a background of a high incidence of aqueous leaf spotting, calyx slight and RCS during two production cycles in the spring-summer of 2017 and 2018. The municipal area presents a sub-humid warm weather (Aw1) (García, 2004). The plantation under study was of one hectare. Planting was carried out on July 4 and 10, 2017 and 2018 respectively, using a handspike, with four to six seeds per shrub, of the genotype known as "Coneja", at a distance of 1.0 m between furrows and plants. When the plants reached a height of 10 cm, a thinning process was carried out in order to leave two to three plants per shrub, with an approximate density of 25,000 plants ha⁻¹. Fertilization was carried out using the formula 45-30-20 in two applications (Alejo, 2016). No agrochemicals were applied in the plantation for the control of pests and diseases.

Identification of fungi. In 2017, two leaves and two calyces with sunken necrotic spots in the intermediate section of 14 plants were gathered. These plants were cut into 56 fragments of 2.0 mm each, disinfected with sodium hypochlorite at 1.0% for 30 s and rinsed in three successive changes of sterile distilled water and planted in a potato-dextrose-agar (PDA) culture medium; finally, they were incubated for six days at 26 °C with 12-

densidad aproximada de 25,000 plantas ha⁻¹. La fertilización se realizó con la fórmula 45-30-20 en dos aplicaciones (Alejo, 2016). En la plantación no se aplicaron agroquímicos para el control de plagas y enfermedades.

Identificación de hongos. En 2017 se colectaron dos hojas y dos cálices con manchas irregulares con puntos hundidos necróticos de la parte intermedia de 14 plantas, los cuales se cortaron en 56 fragmentos de 2.0 mm, se desinfectó la superficie con hipoclorito de sodio al 1.0% durante 30 s y se enjuagaron en tres cambios sucesivos de agua destilada estéril y se sembraron en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), y se incubó durante seis días a 26 °C por 12 horas de fotoperiodo. De estas colonias en crecimiento se obtuvieron 28 subcultivos y se realizaron cultivos monoconidiales por la técnica de rayado en agar al 2%. Luego de seis días se procedió a identificar hasta nivel de género las colonias fungosas obtenidas en cada muestra, empleando las claves Barnett y Hunter (1998).

De los aislamientos realizados se seleccionaron dos colonias de *Phoma*, se purificaron mediante transferencias de puntas de hifas. Para la extracción de ADN se realizaron transferencias a medio líquido papa-dextrosa, se incubaron por 24 horas en agitación y se colectó el micelio. La extracción del ADN se realizó mediante el método de Dellaporta *et al.* (1983), su concentración, calidad y pureza se cuantificó en un nanodrop One marca Thermo Scientific®, colocando 2 uL de ADN por muestra. Para confirmar la identificación de las cepas, se amplificaron las regiones del espacio transcrito interno (ITS) usando los iniciadores ITS1 / ITS4 (White *et al.*, 1990), las PCR se realizaron con el kit de QIAGEN Top Taq Master mix, en el termociclador Bio-RadT-100®. Las condiciones para la amplificación fueron una etapa inicial de pre-incubación por dos min a 95 °C seguida de 35 ciclos de desnaturalización por

hour photoperiod. From these colonies in growth, 28 subcultures were obtained and monoconidial cultures were carried out using the technique of scratch in agar at 2%. After six days, the fungal colonies of each sample were identified up to the genus level, using the key by Barnett and Hunter (1998).

From the isolations carried out, two *Phoma* colonies were chosen and purified using hyphae tip transfers. For the extraction of DNA, transfers were made to a liquid potato-dextrose medium, incubated for 24 hours while shaking and the mycelium was collected. The DNA extraction was carried out using the method by Dellaporta *et al.* (1983); its concentration, quality and purity was quantified in a nanodrop Thermo Scientific® One, placing 2 uL of DNA per sample. To confirm the identification of the strains, regions of the internal transcribed space (ITS) was amplified, using the primers ITS1 / ITS4 (White *et al.*, 1990). PCRs were carried out using the Top Taq Master mix QIAGEN kit, in the Bio-RadT-100® thermocycler. The conditions for amplification consisted of an initial stage of pre-incubation for two minutes at 95 °C followed by 35 denaturalization cycles for 30 s at 95 °C, hibridation for 30 s at 55 °C and a minute-long extension at 72 °C, and a final extension stage for 10 min at 72 °C (White *et al.*, 1990). The amplified fragments were observed using agarose gel in TAE at 1.0%, stained with GelRed. The fragment of amplified DNA was sent for sequencing in both directions using the method of dideoxynucleotides marked in the 3130 Genetic Analyzer sequencer (Applied Biosystems®) to the National Agricultural, Medical and Environmental Biotechnology Laboratory of the Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. (IPICYT). The sequences obtained were compared for their identification with a search of sequences in the database of the gene bank of the National

30 s a 95 °C, hibridación por 30 s a 55 °C y extensión por un minuto a 72 °C y una etapa final de extensión durante 10 min a 72 °C (White *et al.*, 1990). Los fragmentos amplificados fueron visualizados mediante gel de agarosa en TAE al 1.0%, teñidos con GelRed. El fragmento de ADN amplificado se envió a secuenciar en ambas direcciones con el método de dideoxinucleótidos marcados en el secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®) en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. (IPICYT). Las secuencias obtenidas se compararon para su identificación con una búsqueda de secuencias en las bases de datos del banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando el algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2000).

Para confirmar la patogenicidad de dos cepas seleccionadas, se utilizaron plantas sanas de Jamaica susceptibles de los genotipos Ayutla y Tecoanapa. La cepa de *C. cassiicola* proveniente de *H. sabdariffa* (MF000878.1) fue obtenida de la colección de micología del Colegio de Postgraduados México (Dr. Javier Hernández-Morales) y la segunda cepa, identificada por morfología como *Phoma*, seleccionada para su identificación con marcadores ITS. Cada cepa se consideró un tratamiento y la unidad experimental fue una planta. Seis plantas por genotipo fueron inoculadas con *C. cassiicola* y otras seis por genotipo con *Phoma* y se usaron tres plantas por genotipo como testigo (aspersión con agua destilada estéril) de 28 días de edad en un bioespacio ubicado en el Campo Experimental Iguala en 2017 (28 °C y 66% de humedad relativa). La inoculación se realizó rociando las hojas sanas con una suspensión de esporas (6×10^7 esporas/mL para *C. cassiicola* y 1×10^7 esporas/mL para *Phoma*). Posteriormente, las plantas se cubrieron durante tres días con una bolsa plástica, desinfectada con

Center for Biotechnology Information (NCBI) using the BLAST algorithm (Altschul *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2000).

In order to confirm the pathogenicity of two selected strains, healthy yet susceptible roselle plants of genotypes Ayutla and Tecoanapa were used. The *C. cassiicola* strain from *H. sabdariffa* (MF000878.1) was obtained from the mycological collection of the Colegio de Postgraduados Mexico (Dr. Javier Hernández-Morales) and the second strain, identified by morphology as *Phoma*, was chosen for its identification with ITS markers. Each strain was considered a treatment and the experimental unit was a plant. Six plants of every genotype were inoculated with *C. cassiicola*, another six per genotype, with *Phoma*, and three plants were used per genotype as a control (sprayed with sterile distilled water) each one aged 28 days, in a biospace located in the Iguala Experimental Field in 2017 (28 °C and 66% of relative humidity). Inoculation was carried out by spraying the healthy leaves with a spore suspension (6×10^7 spores/mL for *C. cassiicola* and 1×10^7 spores/mL for *Phoma*). Afterwards, the plants were covered for three days using a plastic bag, disinfected with alcohol. In order to maintain a temperature of 28.9 °C and a humidity of 88%, the first 12 leaves were evaluated to determine the incidence of the symptoms. A second inoculation was carried out when the plants were 77 days old; the temperature was 27.3 °C and a relative humidity of 70%, the flower buds were sprayed with a spore suspension (6×10^7 spores/mL for *C. cassiicola* and 10×10^7 spores/mL for *Phoma*) and the control treatment was sprayed with sterile distilled water. The first three calyces of each plant were evaluated. The incidence of the disease was calculated by dividing the number of leaves and calyces with symptoms by the total number of leaves and calyces, multiplied by 100. Evaluations were performed on leaves and calyces 3, 5 and

alcohol, para mantener una temperatura de 28.9 °C y 88% de humedad relativa, se evaluaron las 12 primeras hojas para determinar la incidencia de los síntomas. Una segunda inoculación se realizó a los 77 días de edad de las plantas, la temperatura fue 27.3 °C y 70% humedad relativa, los botones de flor fueron asperjados con una suspensión de esporas (6×10^7 esporas/mL para *C. cassiicola* y 10×10^7 esporas/mL para *Phoma*) y el tratamiento testigo se asperjó con agua destilada estéril, se evaluaron los tres primeros cálices por planta. La incidencia de la enfermedad se calculó dividiendo el número de hojas y cálices con síntomas entre el número total de hojas y cálices multiplicado por 100. Las evaluaciones en hojas y cálices se hicieron a los 3, 8 y 15 días después de la inoculación. Una hoja y cáliz por planta fue sembrado en PDA por tratamiento con la metodología anteriormente descrita y se volvió a aislar de los tejidos con manchas, las colonias y sus estructuras reproductivas, las que se compararon con las características de las colonias inoculadas originalmente.

Muestreo de esporas. En 2017 y 2018, durante julio a noviembre, se capturó y se contaron las esporas presentes en el aire, en la plantación experimental, se utilizó una trampa volumétrica tipo Burckard, la que trabaja mediante un proceso de succión de aire continuo, con un registro de siete días (Gadoury y MacHardy, 1983). La trampa de esporas se colocó en el centro de la plantación, a 1.7 m de altura por encima del dosel de la jamaica. Las esporas succionadas fueron impactadas sobre un tambor cilíndrico, cubierto por una cinta Janel transparente recubierta con vaselina, la cinta fue cortada en secciones de 39.5 mm correspondientes a cada período de 24 horas y montada sobre un portaobjetos. El conteo de esporas fue en tres transectos a 400x de aumento, calculando el promedio observado por 24 h. Cuando menos de cinco esporas

8 days after inoculation. One leaf and calyx from each plant per treatment were planted in PDA using the method described above, and re-isolated it from the tissues with spots, the cultures and their reproductive structures, which were compared with the characteristics of the cultures inoculated originally.

Sampling of spores. From July to November, 2017 and 2018, spores present in the air were captured and counted in the experimental plantation; a Burckard volumetric trap was used, which works with a continuous air suction process, with a record of seven days (Gadoury and MacHardy, 1983). The spore trap was placed in the center of the plantation, 1.7 m above the roselle canopy. The spores drawn in hit a cylindrical drum, covered by Janel sticky tape covered in Vaseline. The tape was cut into 39.5 mm sections, one for each 24-hour period, and placed on a slide. The spore count was in three transects at 400x magnification, calculating the average observed during 24 h. At least five spores were observed, another three transects were counted and the average was calculated to report the concentration of spores accumulated in seven days. Spores were monitored for 133 and 122 days in 2017 and 2018 respectively, and in the phenological stages of growth, development of flower buds, fruition and before harvest.

Weather measurements. The weather factors of rainfall, relative humidity, global radiation and wind speed were recorded in a Davis Vantage PRO2 weather station from July to December in 2017 and 2018 respectively. Using the records of global radiation, the number of sunlight hours per day were recorded.

Monitoring the disease severity. The level of damage by the disease was determined in 25 plants

fueron observadas, otros tres transectos fueron contados y se calculó el promedio; para reportar la concentración de esporas acumuladas en siete días. El monitoreo de esporas se realizó durante 133 y 122 días en 2017 y 2018 respectivamente, en las etapas fenológicas de crecimiento vegetal, desarrollo de yemas florales, fructificación y previo a cosecha.

Mediciones meteorológicas. Los factores climáticos de precipitación, temperatura, humedad relativa, radiación global y velocidad del viento se registraron en una estación meteorológica Davis Vantage PRO2, desde julio a diciembre, en 2017 y 2018 respectivamente. Con los registros radiación global se estimó el número de horas con luz solar por día.

Monitoreo de la severidad de la enfermedad. El nivel de daño de la enfermedad se determinó en 25 plantas seleccionadas al azar, en cada una se seleccionó una hoja y cáliz por rama de la base, intermedia y superior de la planta por punto cardinal, contabilizando 12 hojas y cálices por planta y con una escala diagramática de Ortega-Acosta *et al.* (2016), con rango de 0 al 5, en hoja 0=sano (0% de daño) y 5=daño severo (>57% de daño); en cáliz 0=sano (0% de daño) y 5=daño severo (>77% de daño) para determinar la severidad. El periodo de evaluación para hojas fue en septiembre previo a la emergencia de flores y para cálices en noviembre antes de la cosecha de 2017 y 2018.

Análisis estadístico. Los registros de captura de esporas se agruparon en periodos de siete días y se analizaron con estadísticas descriptivas y la correlación de Spearman (SAS, 2010) entre densidad de esporas acumuladas semanalmente y datos de clima. También se utilizó la correlación de Spearman para relacionar la cantidad de esporas acumuladas semanalmente con severidad de la enfermedad en hojas y cálices.

chosen at random. In each one, a leaf and a calyx were chosen per branch on the lower, intermediate and lower sections of the plant, per cardinal point, counting 12 leaves and calyces per plant and with a diagrammatic scale by Ortega-Acosta *et al.* (2016), with a range of 0 to 5; in leaves 0=healthy (0% damage) and 5= severe damage (>57% damage); in calyces 0=healthy (0% damage) and 5= severe damage (>77% damage) to determine the severity. The evaluation period for leaves was in September before the emergence of flowers, and for flowers and calyces, in November, before harvesting in 2017 and 2018.

Statistical analysis. The spore capture records were grouped in seven-day periods and analyzed with descriptive statistics and the Spearman correlation (SAS, 2010) between spores accumulated every week and weather data. The Spearman correlation was also used to relate the number of spores accumulated every week with the severity of the disease in leaves and calyces.

RESULTS

Identification of fungi. A white mycelial growth later turned gray, eight days later formed hyalin-colored pycnidial conidiomaths, which then turned dark brown and round, covering the Petri dish. The conidiophores were very dense, thin, simple and sometimes branched. The immature hyalin spores were unicellular, elliptical, they later turned light brown, smooth, ellipsoidal, and measured 10-16.2x 5-7 μm , characteristics which place them in the genus *Phoma* (Barnett and Hunter (1998). Two representatives were placed in the Collection of Phytopathogenic Fungi of the Phytopathology Lab, Campo Experimental Centro de Chiapas, CIRPAS-INIFAP, as Gro-1701 and Gro-1702. The DNA sequencing of this strain had a similarity of 99%

RESULTADOS

Identificación de hongos. Un crecimiento de micelio color blanco que se tornó grisáceo, a los ocho días estas colonias formaron conidiómatas picnidiales de color hialino y posterior color marrón oscuro de forma redonda cubriendo la caja Petri. Los conidióforos muy densos, delgados, simples y a veces ramificados. Las esporas inmaduras hialinas unicelulares, elípticos, posteriormente color marrón claro, lisas, elipsoidales, de 10-16.2x 5-7 μm características que los ubican dentro del género *Phoma* (Barnett y Hunter (1998)). Dos aislados representativos se depositó en la Colección de Cultivos de Hongos Fitopatógenos en el Laboratorio de Fitopatología, Campo Experimental Centro de Chiapas, CIRPAS-INIFAP, como Gro-1701 y Gro-1702. La secuenciación de ADN de ésta cepa tuvo 99% de similitud con *Coniella diplodiella* (= *Phoma.diplodiella*) (KC771899.1).

El segundo crecimiento de micelio septado con conidióforos cilíndricos cortos y conidios terminales individuales o en cadenas cortas con formación acropetala, color café, multicelulares, con exospora gruesa incolora y una prominente cicatriz oscura, características que coinciden con el género *Corynespora* (Barnett y Hunter, 1998). El tercer crecimiento micelial fue rápido y abundante, en 1 a 3 días, de color gris a oliváceo, conidiomas picnidiales se observaron después de 13 días, de color negro, obpiriformes, ostiolados, con conidios hialinos inmaduros a los 17 días, elipsoidales a subovoides, a los 22 días se observaron los conidios maduros de color café oscuro, elipsoidales a ovoides y con estriaciones longitudinales irregulares características morfológicas que coinciden con el género *Lasiodiplodia* (Sutton, 1980; Barnett y Hunter, 1998).

De tejido enfermo, en hojas, los hongos *Coniella* sp. y *Corynespora* sp. mostraron la más alta frecuencia de aislamientos con 71.4 y 21.4%

with *Coniella diplodiella* (= *Phoma.diplodiella*) (KC771899.1).

The second growth of septated mycelia short, cylindrical conidiophora and conidia, either individual, terminal or short-chained conidia, with a brown acropetal formation, multicellular, with a thick, colorless exospore and a dark, prominent scar, characteristics coincide with the genus *Corynespora* (Barnett and Hunter, 1998). The third mycelial growth was fast and abundant, in 1 to 3 days, colored gray to olive greenish, with pycnidial conidiomes that appeared after 13 days, black in color, obpiriform, ostiolated, with ellipsoidal to sub-ovoidal, immature hyaline conidia after 17 days; after 22 days, we observed mature, dark brown, ellipsoidal to ovoidal conidia with longitudinal and irregular striations, morphological characteristics that coincide with the genus *Lasiodiplodia* (Sutton, 1980; Barnett and Hunter, 1998).

The fungi *Coniella* sp. y *Corynespora* sp. Displayed the highest frequency of diseased tissue in leaves isolations with 71.4 and 21.4% respectively, and in calyces, both fungi, with 57.1 and 35.7% respectively (Table 1). The fungus with the least isolation was *Lasiodiplodia* sp., which was isolated with a low frequency in leaves and calyces, with 7.1%.

The fungus *C. diplodiella* caused the typical RCS symptoms in the Ayutla and Tecoanapa genotypes, with 88.9 and 22.2% of symptoms in leaves and calyces of the plants, respectively. The fungus *C. cassicola* also caused similar RCS symptoms in both genotypes, with 56.3 and 25% of symptoms in leaves and calyces. With both fungi, the symptoms on leaves began with irregular spots and the formation of a red halo and a necrotic center measuring 1-3 mm at 72 and 192 h after inoculation with *C. diplodiella* and *C. cassicola* respectively. The calyces displayed slightly sunken black spots, irregularly shaped, with a diameter

respectivamente y en cálices, ambos hongos con 57.1 y 35.7% respectivamente (Cuadro 1). El de menor aislamiento fue *Lasiodiplodia* sp. se aisló con baja frecuencia en hojas y cálices de 7.1%.

El hongo *C. diplodiella* causó los síntomas típicos del MCJ en los genotipos Ayutla y Tecoaapa, con 88.9 y 22.2% de síntomas en hojas y cáliz de las plantas respectivamente. El hongo *C. cassiicola* también causó síntomas similares de MCJ en ambos genotipos, con 56.3 y 25% de síntomas en hojas y cálices. Con ambos hongos, los síntomas en hojas iniciaron con manchas irregulares y la formación de un halo rojo y centro necrótico de 1-3 mm, a las 72 y 192 h después de la inoculación con *C. diplodiella* y *C. cassiicola* respectivamente. En cáliz se presentaron las manchas de color negro ligeramente hundidas, de forma irregular de aproximadamente 1-2 mm de diámetro a los 53 y 91 días después de la segunda inoculación con *C. diplodiella* y *C. cassiicola* respectivamente. Sin embargo, en hojas, el aislamiento de *C. diplodiella* fue más agresivo al causar mayor incidencia en el genotipo Tecoaapa y Ayutla, mientras que *C. cassiicola* tuvo una menor incidencia e incluso hubo tres plantas del genotipo Ayutla que no mostraron síntomas. En contraste, en el cáliz la incidencia de la enfermedad fue ligeramente mayor, *C. cassiicola* con una incidencia del 25.0% y *C. diplodiella* fue de 22.2%. La infección de la hoja y cáliz fue confirmada con estos aislamientos, volviendo a re-aislar los dos hongos de las manchas típicas.

Muestreo de esporas. Del muestreo de esporas en el aire se identificaron cinco géneros de hongos por sus características morfológicas: *Coniella*, *Corynespora*, *Lasiodiplodia*, *Curvularia* y *Alternaria* (Barnett y Hunter 1998). Los géneros *Curvularia*, *Alternaria* y *Lasiodiplodia* tienen habilidades patogénicas reconocidas en numerosos hospedantes. *Lasiodiplodia* fue reportada en cálices frescos de

Cuadro 1. Frecuencia de aislamientos en hoja y cáliz de jamaica con síntomas de manchado. Pozolapa, Mpio. Ayutla de los libres, Guerrero, México. 2017.

Table 1. Frequency of isolation in roselle leaves and calyces with symptoms of spotting. Pozolapa, Mpal area of Ayutla de los libres, Guerrero, Mexico. 2017.

Tipo de espora	Frecuencia en hoja (%)	Frecuencia en cálices (%)
<i>Coniella</i> sp.	71.4	57.1
<i>Corynespora</i> sp.	21.4	35.7
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	7.1	7.1

of approximately 1-2 mm on days 53 and 91 after the second inoculation with *C. diplodiella* and *C. cassiicola* respectively. However, the *C. diplodiella* isolation was more aggressive on leaves, since it caused a greater incidence on the Tecoaapa and Ayutla genotype, whereas *C. cassiicola* had a lower incidence and there were even three plants of the Ayutla genotype that displayed no symptoms. By contrast, the incidence of the disease in the calyx was slightly higher, since *C. cassiicola* had an incidence of 25.0% and *C. diplodiella*, it was 22.2%. The infection of leaves and calyces was confirmed with these treatments when re-isolating the two fungi from the typical spots.

Spore sampling. From the sample of spores in the air, five genera were identified using their morphological characteristics: *Coniella*, *Corynespora*, *Lasiodiplodia*, *Curvularia* and *Alternaria* (Barnett and Hunter 1998). The genera *Curvularia*, *Alternaria* and *Lasiodiplodia* have pathogenic abilities, recognized in several hosts. *Lasiodiplodia* was reported in fresh roselle calyces by Martínez (2010), while Ruiz (2014) reported *Alternaria* in dried calyces. However, in the ethiology of the spotting of roselle calyces, the presence and pathogenicity of *Pilidella* (= *Coniella*) *diplodiella* (Correa et al., 2011), *Coniella javanica*

jamaica por Martínez (2010) mientras que Ruíz (2014) reportó *Alternaria* en cálices deshidratados. No obstante, en la etiología del manchado de cálices de jamaica, ha sido consistente la presencia y patogenicidad de *Pilidella* (= *Coniella*) *diploidiella* (Correa *et al.*, 2011), *Coniella javanica* (Barrón *et al.*, 2019) y *Corynespora cassiicola* (Ortega-Acosta *et al.*, 2015). Por tal razón el estudio se centró a éstos patógenos.

En el Cuadro 2 se presenta la abundancia de esporas desde la siembra a la cosecha. El género *Coniella*, con 19.3 y 32.3 esporas/semana en 2017 y 2018 respectivamente (con un máximo de 223.6 esporas/semana del 19 al 25 de septiembre 2018). Con una detección de 44.4 y 52.0% para 2017 y 2018 respectivamente y promedio de 48.2% en ambos ciclos. El género *Corynespora* con menores concentraciones de 3.9 y 5.3 esporas/semana en 2017 y 2018 (con un máximo de 12.4 esporas/semana del 24 al 30 de noviembre 2018). Con una detección de 9.0 y 8.5% en 2017 y 2018 respectivamente y promedio de 8.7% en ambos ciclos. Las esporas de *Lasiodiplodia* fueron menos abundantes y con bajo porcentaje de detección en ambos ciclos.

Mediciones meteorológicas. La precipitación más alta fue de 141.2 mm el 14 de septiembre 2017 y

(Barrón *et al.*, 2019) and *Corynespora cassiicola* (Ortega-Acosta *et al.*, 2015) have been consistent. This is the reason why this study was focused on these pathogens.

Table 2 shows the abundance of spores from planting to harvest. The genus *Coniella* displayed 19.3 and 32.3 spores/week in 2017 and 2018 respectively (with a maximum of 223.6 spores/week from September 19 to 25, 2018), with a detection rate of 44.4 and 52.0% for 2017 and 2018 respectively, and an average of 48.2% in both cycles. The genus *Corynespora* displayed lower concentrations, with 3.9 and 5.3 spores/week in 2017 and 2018 (with a maximum of 12.4 spores/week from November 24 to 30, 2018), with a detection rate of 9.0 and 8.5% in 2017 and 2018 respectively, and an average of 8.7% in both cycles. The *Lasiodiplodia* spores were less abundant and with a low detection rate in both cycles.

Weather measurements. The highest rainfall levels were 141.2 mm on September 14, 2017 and 71.9 mm on October 10, 2018 (Table 3). The highest temperatures occurred in 2018, with an average of 32.7 °C, whereas in 2017 it was 31.9 °C. The lowest temperature occurred in 2018 with 14.9 °C, and in 2017, it was 15.8 °C. The highest

Cuadro 2. Abundancia y porcentaje de detección de esporas promedio por semana, en el sistema de producción de jamaica. Pozolapa, Mpio. Ayutla de los Libres, Guerrero, México.

Table 2. Average abundance and percentage of detection of spores per week in the roselle production system. Pozolapa, Mpal area of Ayutla de los Libres, Guerrero, Mexico.

Hongo	Primer ciclo 2017		Segundo ciclo 2018		Promedio 2017-2018 (%)
	Abundancia ^z	%	Abundancia	%	
<i>Coniella</i>	19.3	44.3	32.3	52.0	48.2
<i>Corynespora</i>	3.9	9.0	5.3	8.5	8.7
<i>Lasiodiplodia</i>	2.1	4.8	1.5	2.4	3.7
<i>Curvularia</i>	13.2	30.4	18.9	30.3	30.3
<i>Alternaria</i>	5.0	11.5	4.2	6.8	9.1
Total	43.5	100	62.2	100	100

^z Periodo de julio a noviembre / ^z Period between July and November.

de 71.9 mm el 10 de octubre 2018 (Cuadro 3). Las temperaturas máximas se presentaron en 2018, con una media de 32.7°C mientras que en 2017 fue de 31.9°C. La menor temperatura se presentó en 2018 con 14.9°C y en 2017 fue de 15.8°C. La mayor radiación global que fue de 600.5 W/m² se presentó el 11 de agosto de 2018 y de 553.7 W/m² el 31 de julio de 2017. El mayor rango de velocidad del viento alcanzó hasta 3.2 km hr⁻¹ en 2017, mientras que en 2018 fue de 2.7 km hr⁻¹. La media de humedad relativa fue de 86.4 y 84.4% en 2017 y 2018 respectivamente.

Distribución temporal de inóculo en el aire. La captura de esporas dentro del sitio de estudio en el periodo de julio a noviembre de 2017 y 2018, mostró presencia de *Coniella* y *Corynespora* durante todo el ciclo del cultivo (Figura 1). La detección de esporas fue a partir de la emergencia de las primeras hojas verdaderas en las plantas de jamaica y continuó hasta la cosecha, observándose clara variación mensual.

En julio de 2017, a los 10 días después de la siembra, se registró la presencia de esporas de *Coniella* y *Corynespora* con un promedio de 20 y 4.5 esporas/semana respectivamente. En el desarrollo

global radiation, of 600.5 W/m², took place on August 11, 2018 and 553.7 W/m² on July 31, 2017. The highest wind speed range reached up to 3.2 km hr⁻¹ in 2017, and in 2018, it was 2.7 km hr⁻¹. Mean relative humidity was 86.4 and 84.4% in 2017 and 2018, respectively.

Seasonal distribution of inoculant in the air.

The capture of spores in the study area in the period between July and November, 2017 and 2018, displayed the presence of *Coniella* and *Corynespora* during the entire planting cycle (Figure 1). The detection of spores began with the emergence of the first true leaves in roselle plants and it continued until the harvest, with the observation of a clear monthly variation.

In July, 2017, 10 days after planting, we registered the presence of *Coniella* and *Corynespora* spores, with an average of 20 and 4.5 spores/week, respectively. During vegetative development, the population levels of both fungi were reduced. *Coniella*, with an average of 0.7 spores/week between August 25 and October 13, 2017, and of 0.2 spores/week between August 29 and September 11, 2018. *Corynespora* presented slightly higher populations, with an average of 1.9 spores/week

Cuadro 3. Rango y promedio diario de variables climáticas del 01 de julio al 10 de diciembre, de los años 2017 y 2018. Pozolapa, Mpio. Ayutla de los Libres, Guerrero, México.

Table 3. Range and daily average of weather variables between July 01 and December 10, 2017 and 2018. Pozolapa, Mpal area of Ayutla de los Libres, Guerrero, Mexico.

Variables climáticas	2017		2018	
	Rango	Media	Rango	Media
Precipitación (mm)	0-141.2	10.4	0-71.9	4.8
Temperatura máxima (°C)	22.1-36.8	31.9	21.5-36.2	32.7
Temperatura mínima (°C)	15.8-22.7	20.5	14.9-22.4	19.5
Temperatura media (°C)	21.2-28.1	24.9	20.2-28.7	25.8
Radiación global promedio (W/m ²)	40.9-553.2	436.1	61.4-600.5	460.9
Velocidad Viento promedio (Km h ⁻¹)	0.0-3.2	1.2	0.24-2.7	1.4
Humedad Relativa (%)	52.5-99.4	86.4	67.8-99.8	84.4

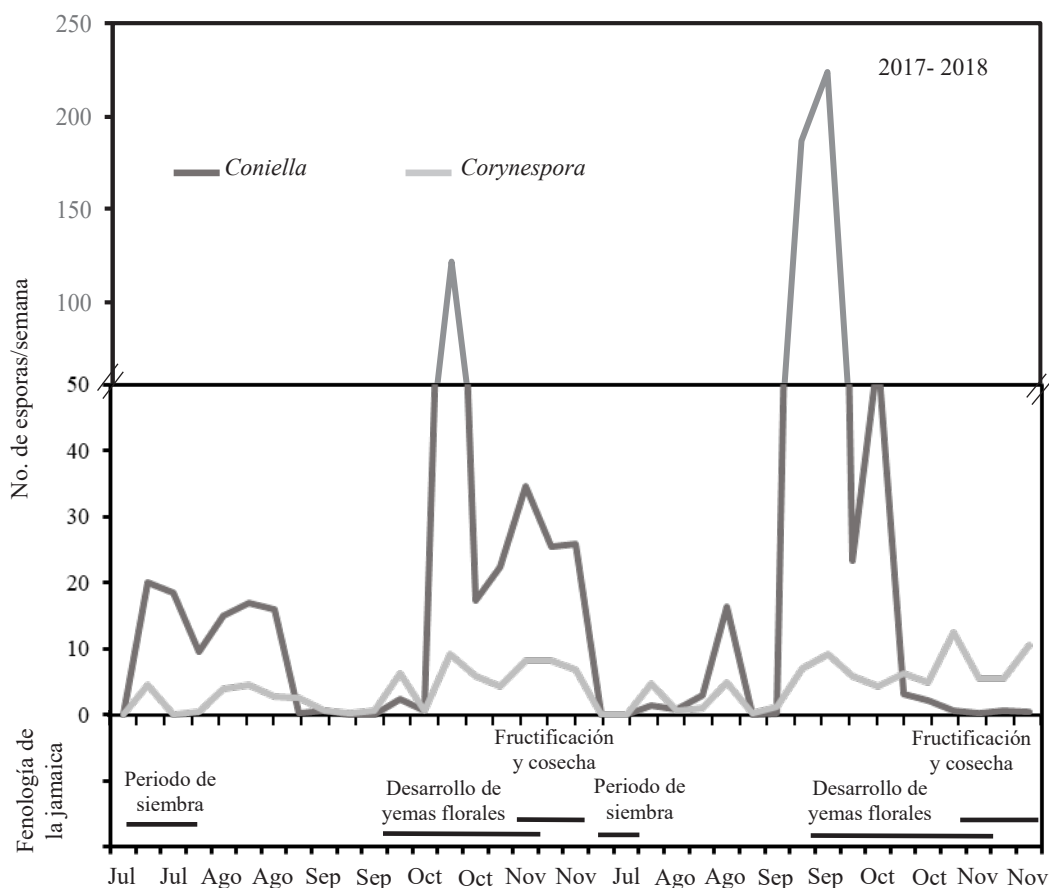


Figura 1. Distribución semanal de esporas de *Coniella* y *Corynespora* presentes en el aire, desde julio hasta noviembre de 2017 y 2018. La fenología de la jamaica se muestra en la parte inferior. Los periodos típicos de siembra, floración y cosecha en Guerrero se indican con líneas negras.

Figure 1. Weekly distribution of *Coniella* and *Corynespora* spores in the air, from July to November, 2017 and 2018. The phenology of roselle is shown below. The typical planting, flowering and harvesting periods in Guerrero are indicated with black lines.

vegetativo, ambos hongos, bajaron sus niveles poblacionales. *Coniella* con 0.7 esporas/semana en promedio, del 25 de agosto al 13 de octubre de 2017 y 0.2 esporas/semana en promedio entre el 29 de agosto al 11 de septiembre de 2018. *Corynespora* presentó poblaciones un poco más altas con 1.9 esporas/semana en promedio entre el 25 de agosto al 13 de octubre de 2017 y 0.7 esporas/semana en promedio entre el 29 de agosto al 11 de septiembre de 2018. Sin embargo, durante el desarrollo de yemas florales, fructificación y madurez fisiológica

between August 25 and October 13, 2017, and of 0.7 spores/week between August 29 and September 11, 2018. However, during the development of flower buds, the fruition and physiological maturity of calyces increased their population levels. *Coniella*, with an average of 41.2 spores/week between October 13 to November 24, 2017, and of 49.5 spores/week between September 12 and November 30, 2018. Meanwhile, *Corynespora* registered lower population averages, with 7.1 spores/week between October 13 and November

de cálices incrementaron sus niveles poblacionales. *Coniella* con 41.2 esporas/semana en promedio del 13 de octubre al 24 de noviembre de 2017 y 49.5 esporas/semana en promedio desde el 12 de septiembre al 30 de noviembre 2018. Mientras que *Corynespora* registró poblaciones promedio más bajas con 7.1 esporas/semana del 13 de octubre al 24 de noviembre de 2017 y 7.2 esporas/semana del 12 de septiembre al 30 de noviembre de 2018.

Correlación entre esporas y clima. Las concentraciones de captura de esporas de los hongos fueron correlacionadas con las variables meteorológicas mediante la prueba de Spearman y los valores se presentan en el Cuadro 4. Las poblaciones individuales de esporas de los cinco géneros estudiados y el total de esporas mostraron sensibilidad a las variaciones climáticas. La lluvia indujo un efecto negativo significativo solamente para la concentración de inoculo de *Corynespora*. La temperatura

24, 2017, and 7.2 spores/week between September 12 and November 30, 2018.

Correlation between spores and weather.

The concentrations of captures of fungal spores were correlated with the weather variables using Spearman's test, and the values are shown in Table 4. The individual spore populations from the five genera studied, along with the total of spores, displayed sensitivity to weather variations. Rainfall led to a significant negative effect only on the concentration of the *Corynespora* inoculant. Temperature was the variable that favored the dynamics of fungi population in the air the most. The highest temperature showed a significant positive correlation with the fluctuations in population of *Coniella* and *Curvularia* inoculants and the total of spores, whereas *Alternaria* displayed a negative correlation, and the minimum temperature, only with the dynamics of the *Corynespora* population.

Cuadro 4. Coeficiente de correlación de Spearman entre concentración de esporas acumulada semanalmente y variables meteorológicas. Ciclos 2017-2018. Pozolapa, Mpio. Ayutla de los Libres, Guerrero, México.

Table 4. Spearman correlation coefficient between the concentration of spores accumulated weekly and weather variables. Ciclos 2017-2018. Pozolapa, Mpal area of Ayutla de los Libres, Guerrero, Mexico.

Hongo	PP ^y	Tmax	Tmin	Tmed	VVmax	RGprom	HRG
<i>Coniella</i>	-0.3009 ^z 0.0837 [*]	0.3957	-0.0512	0.4976	-0.1500	0.41278	0.0002
<i>Corynespora</i>	-0.4259 0.0120	0.0120	-0.3631	0.0178	-0.3553	-0.03883	-0.5536
<i>Lasiodiplodia</i>	-0.1513 0.3930	0.1353	-0.0903	0.1047	0.2997	0.12448	0.0940
<i>Curvularia</i>	-0.2682 0.1251	0.3408	-0.0785	0.4318	-0.1039	0.38521	0.0104
<i>Alternaria</i>	-0.0492 0.7824	-0.3526	0.0019	-0.2675	0.1998	-0.20753	0.0694
Total de esporas	-0.3184 0.0665	0.3451	-0.0780	0.4521	-0.1220	0.3839	-0.0108
		0.0457	0.6611	0.0073	0.4920	0.025	0.9518

^y PP=precipitación (mm); Tmax=temperatura máxima (°C); Tmin=temperatura mínima; Tmed=temperatura promedio; VVmax=velocidad del viento máxima (km hr⁻¹); RGprom=radiación global promedio(W/m²) y HRG=horas de radiación global / ^y PP=rainfall (mm); Tmax=maximum temperature (°C); Tmin=minimum temperature; Tmed=mean temperature; VVmax=maximum wind speed (km hr⁻¹); RGprom=mean global radiation (W/m²) and HRG=hours of global radiation.

^z Coeficiente de correlación; * Nivel de significancia; número de observaciones 34 / ^z Correlation coefficient; * Level of significance; number of observations 34.

fue la variable que más favoreció la dinámica de población de los hongos en el aire. La temperatura máxima mostró una correlación positiva significativa con las fluctuaciones poblacionales de inóculo de *Coniella* y *Curvularia* y el total de esporas, mientras que *Alternaria*, presentó correlación negativa. Y la temperatura mínima con una correlación negativa significativa solamente con la dinámica de población de *Corynespora*. La temperatura diaria promedio manifestó una correlación positiva con la fluctuación de esporas de *Coniella* y *Curvularia* y el total de esporas. De la misma manera, la velocidad máxima del viento se correlacionó negativamente con la cantidad de esporas de *Corynespora*. En este estudio la radiación global fue otra variable con influencia en la dinámica de población de hongos en el aire, la radiación global promedio mostró una influencia positiva sobre la dinámica de población de *Coniella* y *Curvularia* y el total de esporas, mientras que el número de horas de radiación solar mostraron una influencia negativa con las esporas de *Corynespora*.

Correlación entre severidad de MCJ y esporas de *Coniella* y *Corynespora*. En 2017, la severidad del MCJ en las hojas alcanzó un índice de 2.6, en septiembre y la concentración de esporas de *Coniella* y de *Corynespora* fue de 121.2 y 9.1 esporas/semana respectivamente, en la última semana de este mes (Figura 2a); en septiembre se presentó la más alta precipitación acumulada de 936.6 mm. La severidad de la enfermedad en los cálices alcanzó un índice de 3.9 en noviembre, la concentración de esporas de *Coniella* y de *Corynespora* fueron de 34.7 y 8.3 esporas/semana respectivamente, en la segunda semana de noviembre (Figura 2a); en la cuarta semana de octubre a la tercera semana de noviembre se presentó una precipitación acumulada de 9.7 mm. En 2018, la severidad del MCJ en las hojas fue alta, con 3.2 de la escala, en septiembre

The average daily temperature displayed a positive correlation with the fluctuation of *Coniella* and *Curvularia* spores and the total of spores. Likewise, the maximum wind speed had a negative correlation with the amount of *Corynespora* spores. In this study, global radiation was another variable that had an influence on the dynamics of the population of fungi in the air; average global radiation presented a positive influence on the dynamics of the *Coniella* and *Curvularia* populations and the total spores, while the number of hours of solar radiation displayed a negative influence with the *Corynespora* spores.

Correlation between the severity of RCS and *Coniella* and *Corynespora* spores. In September 2017, the severity of the RCS in leaves reached an index of 2.6 and the concentration of *Coniella* and *Corynespora* spores was 121.2 and 9.1 spores/week, respectively, in the last week of said month (Figure 2a). The highest accumulated rainfall level was 936.6 mm and occurred in September. The disease severity in the calyces reached an index of 3.9 in November, and the concentrations of *Coniella* and *Corynespora* was 34.7 and 8.3 spores/week, respectively, in the second week of November (Figure 2a), whereas between the second week of October and the third week of November, accumulated rainfall was 9.7 mm. In 2018, the severity of RCS in leaves was high, with 3.2 on the scale in September, and the concentration of *Coniella* and *Corynespora* spores was higher, with 223.6 and 9.1 spores/week, respectively, in the last week of said month (Figure 2b); in September, there was an accumulated rainfall of 48.3 mm. The severity of the disease in the calyces reached an index of 3.55 in November, whereas the concentrations of *Coniella* and *Corynespora* spores were 0.6 and 12.4 spores/week, respectively, in the third week of November (Figure 2b). The time

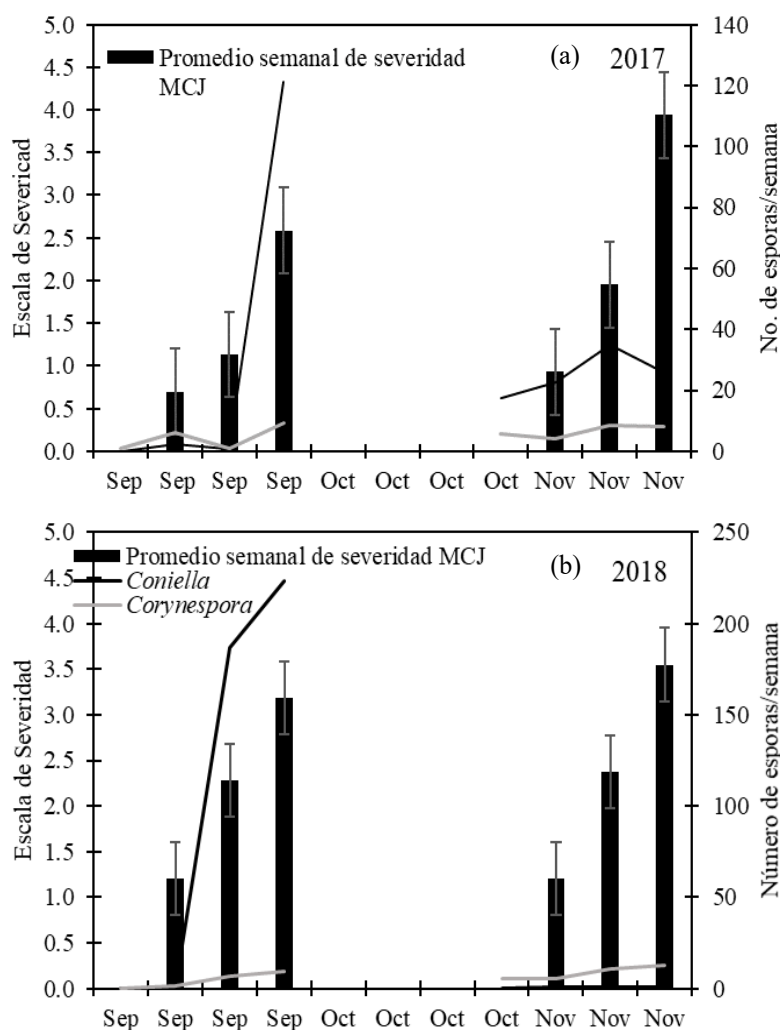


Figura 2. Promedio de severidad semanal del manchado de hoja (septiembre) y cáliz (noviembre) en jamaica (MCJ) estimada con la escala de 0 al 5, donde 0=sano y 5=daño severo en plantas no tratadas en 2017 (a) y 2018 (b). Número de esporas por semana de *Coniella* y *Corynespora* atrapadas en la parcela por una trampa de esporas volumétrica de Burkard. Las barras verticales representan errores estándar.

Figure 2. Mean weekly severity of leaf (September) and calyx spotting (November) in roselle (RCS) estimated on a scale of 0 to 5, where 0=healthy and 5=severe damage to untreated plants in 2017 (a) and 2018 (b). Number of *Coniella* and *Corynespora* spores per week trapped in the field using a Burkard volumetric spore trap. Vertical bars represent standard errors.

y la concentración de esporas de *Coniella* y de *Corynespora* fue más alta con 223.6 y 9.1 esporas/semana respectivamente, en la última semana de este mes (Figura 2b); en septiembre se presentó una precipitación acumulada de 48.3 mm. La severidad de la enfermedad en los cálices alcanzó

period lasting from the third week in October to the first week in November displayed accumulated rainfalls of 261.7 mm.

The variations in severity of the RCS disease displayed a high correlation with the fluctuations in populations of *Coniella* and *Corynespora*

un índice de 3.55 en noviembre, la concentración de esporas de *Coniella* y de *Corynespora* fueron de 0.6 y 12.4 esporas/semana respectivamente, en la tercera semana de noviembre (Figura 2b); de la tercera semana de octubre a la primera semana de noviembre se presentaron precipitaciones acumuladas de 261.7 mm.

Las variaciones de severidad de la enfermedad MCJ mostraron alta correlación con las fluctuaciones de población de esporas de *Coniella* y *Corynespora* y en el total de esporas (Cuadro 5). La correlación entre la severidad de la enfermedad en las hojas del estrato base de la planta (evaluadas en septiembre) y el número acumulado de esporas de *Coniella* y *Corynespora* y el total de esporas fue positiva y significativa para ambos años. En el estrato medio y superior de la planta se evaluó la severidad de la enfermedad en cálices y se correlacionó positivamente con las poblaciones de esporas de *Corynespora* y con el total de esporas en el aire.

DISCUSIÓN

El estudio sobre dinámica de las esporas presentes en el aire es importante para comprender el patrón de distribución espacial y temporal del inóculo de los patógenos, para proponer estrategias de manejo integrado de las enfermedades.

Identificación de hongos. En este trabajo, el género *Coniella* (= *Pilidiella*) fue el más frecuente en el cultivo y abundante en el aire, mientras que *Corynespora* tuvo una menor frecuencia en el cultivo y en el muestreo del aire. *Lasiodiplodia* con mucha menor frecuencia y abundancia sobre el cultivo. En cambio, las esporas de *Curvularia* y *Alternaria* fueron abundantes en el aire, en el caso de *Curvularia* ha sido asociada al MCJ (Trujillo-Tapia y Ramírez-Fuentes, 2015). No obstante, el estudio

Cuadro 5. Correlación de Spearman entre severidad del manchado del cáliz de jamaica y la concentración de esporas acumuladas semanalmente. Pozolapa, Mpio. de Ayutla de los Libre, Guerrero, México.

Table 5. Spearman correlation between the severity of the roselle calyx spotting and the concentration of spores accumulated weekly. Pozolapa, Mpio. area of Ayutla de los Libre, Guerrero, Mexico.

Hongo	Estratos de la planta ^x		
	Base	Medio	Superior
<i>Coniella</i>	0.56423^y	0.51853	0.50442
	0.0228[*]	0.0841	0.0945
	16^z	12	12
<i>Corynespora</i>	0.76691	0.70424	0.66199
	0.0005	0.0106	0.019
	16	12	12
Total de esporas	0.68794	0.61269	0.58452
	0.0032	0.0342	0.0459
	16	12	12

^x Base=evaluación de severidad en hojas en septiembre; Medio y Superior=evaluación severidad en cálices en noviembre / Base=evaluation of severity on leaves in September; Mean and higher =evaluation of severity on calyces in November.

^y Coeficiente de correlación; ^{*} Nivel de significancia y ^z Número de observaciones / Correlation coefficient; ^{*} Level of significance and ^z Number of observations.

spores, as well as in the total of spores (Table 5). The correlation between the severity of the disease on the leaves of the lower section of the plant (evaluated in September) and the accumulated number of *Coniella* and *Corynespora* spores and the total of spores was positive and significant for both years. In the middle and top sections of the plant, the severity of the disease was evaluated in calyces and correlated positively with the populations of *Corynespora* spores and with the total of spores in the air.

DISCUSSION

The study on the dynamics of spores present in the air is important to understand the spatial and

se centró en los géneros *Coniella* y *Corynespora*, debido a que han sido reportados consistentemente como agentes patógenos en jamaica con las especies *P.* (= *Coniella*) *diplodiella*, como causante de mancha acuosa en hojas y defoliación de la planta (Correa *et al.*, 2011), *C. javanica* causante del tizón de las hojas, cálices y un marchitamiento general de la planta (Barrón-Coronado *et al.*, 2019) y *Corynespora cassiicola* reportado como agente causal del manchado de cáliz con puntos circulares a irregulares hundidos necróticos, causando un tizón del ápice a la base del cáliz y en hojas manchas circulares a irregulares con centros de color pajizo, bordes negros y anillos púrpuras que al unirse forman áreas necróticas (Ortega-Acosta *et al.*, 2015). Las pruebas de patogenicidad realizadas con *C. diplodiella* y *C. cassiicola* confirmaron sintomatología muy similar entre ambos hongos.

Clima y patógenos. Las esporas de *Coniella* y *Corynespora* fueron atrapadas sobre el cultivo durante todo el ciclo productivo, desde los primeros 10 días después de la siembra. Las primeras lluvias provocaron la germinación de semilla que quedó en el terreno del ciclo anterior, lo que permite una buena disponibilidad del tejido hospedante; por otro lado, Hernández-Morales *et al.* (2018) menciona que *Corynespora cassiicola* tiene otros hospedantes alternos como malezas y plantas cultivadas del área de producción, lo cual puede explicar los niveles de inóculo desde el inicio del cultivo. No obstante, las mayores poblaciones de esporas se presentaron durante el desarrollo de las yemas florales a cosecha, en los meses de octubre y noviembre. El inicio de emergencia de las flores se presenta a finales de septiembre, y coincide con días cortos de menos de 12 horas de exposición a la luz, lo cual ha sido bien documentado por Muslihatinn y Daesusi (2014). La concentración de esporas en el aire sobre el cultivo estuvo estrechamente relacionada

temporary distribution pattern of the pathogen's inoculant, in order to propose integrated disease management strategies.

Identification of fungi. In this investigation, the genus *Coniella* (= *Pilidiella*) was the most frequently found in the plantation and the most abundant in the air, whereas *Corynespora* was less frequent in the plantation and in the samples taken in the air. *Lasiodiplodia* was even less frequent and abundant on the crop. In turn, the *Curvularia* and *Alternaria* spores were abundant in the air, and *Curvularia* has been associated with RCS (Trujillo-Tapia and Ramírez-Fuentes, 2015). However, the study was centered on the genera *Coniella* and *Corynespora*, since they have been reported as pathogenic agents in roselle with the species *P.* (= *Coniella*) *diplodiella* as the cause of aqueous spots on leaves and defoliation of plants (Correa *et al.*, 2011), *C. javanica* as the cause of leaf and calyx blight and overall wilting of the plant (Barrón-Coronado *et al.*, 2019), and *Corynespora cassiicola*, reported as the causal agent of circular to irregularly-shaped, sunken necrotic spots on the calyx, and on leaves, circular to irregularly-shaped spots with light brown centers, black edges and purple rings that form necrotic areas when they join (Ortega-Acosta *et al.*, 2015). The pathogenicity tests performed with *C. diplodiella* and *C. cassiicola* confirmed a very similar symptomatology between both fungi.

Weather and pathogens. The *Coniella* and *Corynespora* spores were caught over the plantation during the entire production cycle, starting on day 10 after planting. The first rainfalls caused the germination of seeds left on the soil during the previous cycle, which allows for a good availability of host tissue. On the other hand, Hernández-Morales *et al.* (2018) mention that *Corynespora cassiicola* has other, alternate hosts such as weeds

con la precipitación, temperatura, velocidad del viento y radiación global ambientales previas a su captura. Sin embargo, se encontraron correlaciones negativas entre la lluvia y la concentración de esporas de *Corynespora*, al parecer cuando ocurrieron lluvias torrenciales ≥ 138 mm en el mes de septiembre 2017, la densidad de esporas en el aire se redujo. Este comportamiento se ha reportado para otros hongos, como *Botrytis cinerea*, quienes indican que las gotas de lluvia reducen las esporas en el aire (Blanco *et al.*, 2006). Una situación similar reporta Pakpour *et al.* (2015) en un estudio urbano, donde indican que las concentraciones de esporas en el aire eran mayores cuando llovía poco y con altas temperaturas; las esporas de hongos persisten en el aire durante los períodos secos y la lluvia pueden disminuir la cantidad de esporas presentes en el aire. En contraste Ganthaler y Mayr (2015) indican que las condiciones húmedas del suelo y las hojas que persisten después de un evento de lluvia contribuyen a un aumento en la densidad de esporas de hongos en el aire.

La temperatura máxima y temperatura media diaria correlacionaron positivamente con la concentración de esporas de *Coniella*, en este estudio, el período con mayores capturas de esporas correspondió con períodos de temperatura entre 30-33.6 °C. Lo cual no corresponde a lo reportado para otros hongos como *Botrytis cinerea* por Sosa-Alvarez *et al.* (1995), quienes informaron que se produce una gran cantidad de esporas a una temperatura cercana a los 15-22 °C después de 7 días de humedad continua. No obstante, la producción y dispersión de las esporas son dos eventos diferentes y es probable que estas temperaturas máximas facilitaron la dispersión en el aire y por ello la mayor captura, puesto que las temperaturas mínimas diurnas de estos mismos días fueron de 19.4-20.4 °C (Cuadro 3 y Figura 1). Esta situación es posible que pueda ser explicada por los resultados encontrados con

and plants sown in the production area, which may explain the levels of inoculants from the beginning of planting. However, the largest spore populations appeared during the development of flower buds and until harvesting in October and November. Flowers began emerging in late September and coincided with days with less than 12 hours of sunlight, which has been documented by Muslihatinn and Daesusi (2014). The concentration of spores in the air over the crop was widely related to the rainfall, temperature, wind speed and global radiation in the environment before their capture. However. Negative correlations were found between the rains and the concentration of *Corynespora* spores, seemingly during heavy rainfalls ≥ 138 mm in September 2017, when the density of spores in the air diminished. This behavior has been reported for other fungi, such as *Botrytis cinerea*, indicating that raindrops reduce the number of spores in the air (Blanco *et al.*, 2006). A similar situation was reported by Pakpour *et al.* (2015) in an urban study that indicated that the concentrations of spores in the air were higher when rainfall was less and temperatures were higher; fungal spores persist in the air during the dry seasons and rain can reduce the number of spores present in the air. In contrast, Ganthaler and Mayr (2015) indicate that the humid soil conditions and the leaves that remain after a rainfall contribute to an increase in the density of fungal spores in the air.

The maximum and average daily temperature presented a positive correlation with the concentration of *Coniella* spores. In this study, the period with the highest number of spores corresponded with periods of temperatures between 30-33.6°C, which does not coincide with reports for other fungi such as *Botrytis cinerea* by Sosa-Alvarez *et al.* (1995), who stated that a large number of spores are produced at a temperature near 15-22 °C after 7 days of continuous humidity.

Botrytis cinerea donde se distinguen dos fases: la primera, hay una liberación de esporas del conidióforo mediada por un mecanismo higroscópico que controla la turgencia del conidióforo y, en segundo lugar, se presenta un episodio de transporte conidial mediado por agentes físicos (viento y las gotas de lluvia), situación que a menudo ocurre temprano en la mañana cuando la humedad relativa cambia y a medida que aumenta la temperatura (Blanco *et al.*, 2006). Al contrario, las poblaciones de *Corynespora* en este estudio mostraron una correlación significativamente negativa con la temperatura mínima, las mayores poblaciones se presentaron a temperaturas entre 17.2 a 20.7°C, lo cual difiere a lo reportado por Kamei *et al.* (2018), quienes indican que *C. cassiicola* provoca el progreso del manchado foliar en tomate a una temperatura óptima entre 24 y 25°C, junto con el 80-85% de humedad relativa. En cambio, Sharma (2017) reportan un rango más amplio de temperaturas de 16-32 °C, donde el alargamiento de la duración de la humedad de la hoja aumenta el número de lesiones de mancha foliar en algodón causado por *C. cassiicola* a todas las temperaturas probadas de 16, 20, 24, 28 y 32 °C, las mayores lesiones fueron a 28 °C con 48 horas de humedad de la hoja. Los patrones de distribución de esporas dentro del dosel de jamaica rara vez se han estudiado, se necesitan más datos y estudios para comprender completamente la epidemiología del complejo de enfermedades de la jamaica.

La presencia de vientos con velocidades máximas ≥ 4.4 km hr⁻¹ y el tiempo con luz solar diario ≤ 12 hrs estuvieron correlacionados negativamente con las bajas densidad de poblaciones de esporas de *Corynespora* en el aire. Mientras que la radiación global solar promedio diaria fue de ≥ 249 (W/m²) lo que favoreció el incremento de inóculo de *Cornicola* en el aire y el total de esporas. El efecto de la luz solar sobre la esporulación de los hongos ha sido documentado y estudiado experimentalmente para

Despite this, the production and dispersal of spores are two different events, and it is possible that these maximum temperatures contributed to dispersion in the air, thus the greater capture, given that the minimum temperatures in the daytime of the aforementioned days were 19.4-20.4 °C (Table 3 and Figure 1). This situation may be explained by the results found with *Botrytis cinerea*, in which two phases were discerned: in the first, spores are released by the conidiophore with an intervention of a hygroscopic mechanism that controls the turgidity of the conidiophore, and secondly, there is an episode of conidial transport with the intervention of physical agents (wind and raindrops), which commonly takes place in the early hours of the morning, when the relative humidity changes and as temperatures rise (Blanco *et al.*, 2006). On the other hand, the *Corynespora* populations in this study displayed a significantly negative correlation with the minimum temperature. The largest populations appeared in temperatures between 17.2 and 20.7 °C, which differs from reports by Kamei *et al.* (2018), who indicate that *C. cassiicola* causes foliar spots to progress in tomato at an optimum temperature of 24 to 25 °C, along with a relative humidity of 80-85%. In turn, Sharma (2017) report a wider range of temperatures of 16-32 °C; longer-lasting humidity increases the number of lesions caused by foliar spots in cotton plants caused by *C. cassiicola* in all temperatures tested, of 16, 20, 24, 28 and 32 °C, and the largest lesions were displayed at 28 °C with leaf exposed to humidity for 48 hours. The spore distribution patterns in roselle canopies have rarely been studied. Further data and studies are required to fully understand the epidemiology of the roselle disease complex.

The presence of winds with maximum speeds of ≥ 4.4 km hr⁻¹ and the time with sunlight every day ≤ 12 hrs were negatively correlated with the low *Corynespora* spore population densities in the air. At

algunos hongos, el principal efecto fotomorfogénico es a través de la inducción de la esporulación (Ensminger 1993). Sin embargo, las longitudes de onda que inducen la esporulación a cantidades bajas pueden inhibir la esporulación en cantidades más altas (Paul 2000) y estas mismas longitudes de onda tienen efectos estimulantes o inhibidores sobre el desarrollo del conidio y afectan la fotomorfogénesis fúngica (Maddison y Manners 1973).

La variación anual del clima, principalmente en la temperatura y en menor grado las precipitaciones pueden determinar las concentraciones de esporas en el aire. Al parecer en el año con menos precipitación resultó con mayores concentraciones de esporas lo que puede tener implicaciones para el control de la enfermedad y de cambio climático.

Correlación entre severidad de MCJ y esporas de *Coniella* y *Corynespora*. Los resultados del presente trabajo mostraron que la interacción entre el hospedante, clima e inóculo, que prevalecieron durante las etapas fenológicas del cultivo de la jamaica, favoreció el desarrollo de la enfermedad.

En el presente estudio hubo correlaciones significativas positivas entre la severidad de MCJ y la concentración de esporas de *Coniella* y *Corynespora* y el total de esporas. Los niveles de inóculo de *Coniella* tuvo una mayor relación con la severidad en hojas y por el contrario *Corynespora* sus incrementos de inóculo sobre el cultivo se relacionó con la severidad de la enfermedad en el desarrollo de flores. Ambos géneros de hongos han sido reportados como agentes causales de enfermedades en jamaica: Correa *et al.* (2011) reportó a *Pilidiella* (= *Coniella*) *diplodiella* con síntomas del manchado acuoso de hojas, Barrón-Coronado *et al.* (2019) a *Coniella javanica* patógeno del tizón de hojas y cálices, Ortega-Acosta *et al.* (2015) reportaron a *Corynespora cassiicola* como patógeno del manchado de hojas y cálices.

the same time, average daily global solar radiation was ≥ 249 (W/m²), which favored the increase of *Coniella* inoculant in the air and the total of spores. The effect of sunlight on fungal sporulation has been documented and studied experimentally for some fungi; the main photomorphogenetic effect is through the induction of sporulation (Ensminger 1993). However, the wavelengths that induce sporulation in low amounts may inhibit sporulation in higher amounts (Paul 2000) and these same wavelengths have stimulating or inhibiting effects on the development of the conidia and affect fungal photomorphogenesis (Maddison and Manners 1973).

The annual weather variation, mainly regarding temperature and, to a lower extent, rainfall, may determine the concentrations of spores in the air. The year with the lowest rainfall levels seems to have resulted in higher spore concentrations, which may have implications on the control of the disease and of climate change.

Correlation between the severity of RCS and *Coniella* and *Corynespora* spores. The results of the present investigation showed that the interaction between the host, climate and inoculant that prevailed during the phenological stages of the roselle crop favored the development of the disease.

In the present study, there were positive significant correlations between the severity of RCS and the concentration of *Coniella* and *Corynespora* spores and the total spores. The levels of *Coniella* inoculant had a higher relation with the severity in leaves, and on the other hand, the increase of *Corynespora* inoculant on the crop was related with the severity of the disease in the development of flowers. Both fungus genera have been reported as causal agents in roselle diseases: Correa *et al.* (2011) reported *Pilidiella* (= *Coniella*) *diplodiella* with symptoms of aqueous spotting of leaves;

Durante la etapa de crecimiento vegetativo, desde la germinación de la semilla a inicio de yemas florales, la presencia de poblaciones de esporas de *Coniella*, y de una continua presencia de tejido susceptible (hojas jóvenes y maduras), de julio a principios de septiembre, no es limitante en cuanto a disponibilidad de tejido hospedante. No obstante, en septiembre, previo al inicio de la emergencia floral se observó una defoliación importante de hojas afectadas por manchas foliares, aunado a la poca concentración de inóculo en el aire, debido a la disminución de esporas presentes en el aire por las lluvias torrenciales en este mes, el SMN (2019) reporta una precipitación normal en septiembre de ≥ 434.8 mm. Cuando se presenta la floración de la jamaica (octubre y noviembre), coincide con la fase de crecimiento acelerado de la enfermedad presente en el follaje joven, con niveles altos de inóculo (*Coniella* y *Corynespora* con ≥ 100 y 8 esporas/semana respectivamente sobre el cultivo) y con las condiciones atmosféricas idóneas para la epidemia (temperatura media por día 25.3-26.6 °C, radiación promedio de 235.9-317.1, con humedades relativas $\geq 84\%$ y con 12-11.2 hrs de radiación solar por día).

Estos resultados pueden tener implicaciones para el control de la enfermedad, donde se han reportado hasta siete aplicaciones de fungicidas (mancozeb, clorotalonil y benomilo alternando con oxiclóruo de cobre), programados en prefloración, floración y fructificación, las cuales detiene las infecciones por *Corynespora cassiicola*, y por consiguiente una menor severidad de la enfermedad y mayor peso fresco y seco de cálices (Ortega-Acosta *et al.*, 2019). Sin embargo, es importante intentar reducir las aplicaciones de fungicidas inoportunas y potencialmente innecesarias, a través de información de muestreo de inóculo transportado por el aire, en tiempo cercano al real, que permita estimar el riesgo de acumulación potencial de esporas y su germinación, lo que ayudaría a ajustar los intervalos de aplicación de fungicidas.

Barrón-Coronado *et al.* (2019) reported *Coniella javanica*, pathogen of leaf and calyx blight; Ortega-Acosta *et al.* (2015) reported *Corynespora cassiicola* as a pathogen of leaf and calyx spotting.

During the stage of vegetative growth, from seed germination to early flower budding, the presence of *Coniella* spore populations, and a continuous presence of susceptible tissues (young and mature leaves) from July to September are not a limitation in terms of availability of host tissue. However, in September, before flower emergence, an important defoliation was observed of leaves affected by foliar spots, along with a low concentration of inoculants in the air, due to the reduction of spores in the air due to heavy rainfalls in said month, although the SMN (2019) reports a normal rainfall in September of ≥ 434.8 mm. When the roselle plant flowers (October and November), it coincides with the accelerated growth phase of the disease in the young foliage with high inoculant levels (*Coniella* and *Corynespora* with ≥ 100 and 8 spores/week respectively over the crop) and with ideal weather conditions for the epidemic (average daily temperature 25.3-26.6 °C, average radiation of 235.9-317.1, with a relative humidity $\geq 84\%$ and with 12-11.2 hrs of sunlight per day).

These results may have implications for the control of the disease, where up to seven applications of fungicides (mancozeb, chlorothalonil and benomyl alternating with copper oxychloride) have been reported, all programmed in pre-flowering, flowering and fruition, which curtail infections by *Corynespora cassiicola*, and therefore a lower severity of the disease and a higher fresh and dry weights of the calyces (Ortega-Acosta *et al.*, 2019). However, it is important to make an effort to reduce the applications of untimely and potentially unnecessary fungicides, with information on the sampling of airborne inoculants, as near as possible to real time, which helps estimate the potential risk of accumulation of spores and their germination,

CONCLUSIONES

Las esporas de *Coniella* y *Corynespora* fueron los géneros comunes presentes en el aire sobre el cultivo de jamaica. Las variaciones del clima, temperatura y precipitación principalmente, determinan las concentraciones de esporas sobre el cultivo. La severidad del manchado del cáliz estuvo correlacionada positiva y significativamente con el número de esporas de *Coniella* y *Corynespora* acumulados semanalmente.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero y la Coordinación para el proyecto 13462934089 del Instituto Nacional de Investigaciones, Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Iguala.

LITERATURA CITADA

- Alejo JA. 2017. Jamaica (monocultivo). Pp: 23-29. In: Moczuma LG, González HA, Romero SME, Pérez MR, Castillo MCR. (Eds.). Agenda Técnica Agrícola de Guerrero. INIFAP. 116 p. www.inifap.gob.mx/SitePages/inifap2015/Inicio/Agendas_Tec.aspx
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389 – 3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Barnett HL and Hunter BB. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth Edition. APS Presss, The American Phytopathological Society, St Paul, Minn, USA. 218 pp.
- Barrón-Coronado AK, Ayala-Escobar V, Leyva-Mir SG, Nava-Díaz C, Aranda-Ocampo S and Hernández-Morales J. 2019. First report of *Coniella javanica* causing blight on roselle leaves and calyx in Guerrero, Mexico. *Plant disease*. <https://doi.org/10.1094/pdis-09-18-1609-pdn>
- Blanco C, De los Santos B and Romero F. 2006. Relationship between concentrations of *Botrytis cinerea* conidia in air, environmental conditions, and the incidence of grey mould in strawberry flowers and fruits. *European Journal of Plant Pathology* 114:415–425. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-0007-3>
- Cesavegro (Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guerrero). 2018. Manejo fitosanitario de la jamaica. <https://cesavegro.org.mx/manejo-fitosanitario-de-la-jamaica/>. (Consulta, diciembre de 2018).

which would help adjust the intervals of application of fungicides.

CONCLUSIONS

Coniella and *Corynespora* spores were the common genera present in the air over the roselle plantation. The weather variations, mainly temperature and rainfall, determine the concentrations of spores over the plantation. The severity of the calyx spotting was positively and significantly correlated with the number of *Coniella* and *Corynespora* spores accumulated every week.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the financial support and the coordination for project 13462934089 of the National Forestry, Agricultural and Livestock Research Institute (INIFAP), Iguala Experimental Field.

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

- Correa SE, Ortiz GCF, Torres CM, Bautista MCC, Rivera CMC, Lagunes ELC y Hernández SJH. 2011. Etiología de la mancha acuosa de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) en Tabasco, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 29(2): 165-167. <https://scholar.google.com/scholar?oi=gsb95&q=correa%202011%20jamaica&lookup=0&hl=es>
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. 1983. A plant DNA mini preparation: version II, *Plant Molecular Biology Reporter*, 1:19-21. <https://doi.org/10.1007/bf02712670>
- Ensminger PA. 1993. Control of development in plants and fungi by far-UV radiation. *Physiology Plant*. 88: 501-508. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb01365.x>
- Gadoury DM and MacHardy WE. 1983. A 7-day recording volumetric spore trap. *Phytopathology* 73:1526-1531. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/-backissues/Documents/1983Articles/Phyto73n11\\_1526.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/-backissues/Documents/1983Articles/Phyto73n11_1526.PDF)
- Ganthaler A, Mayr S. 2015. Temporal variation in airborne spore concentration of *Chrysomyxa rhododendri*: correlation with weather conditions and consequences for Norway spruce infection. *Forest Pathology*. 45 (6): 443–449. <https://doi.org/10.1111/efp.12190>

- García E. 2004. Modificaciones al Sistema de Clasificación de Köppen. Serie Libros No. 6. Quinta Edición: corregida y aumentada. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F., México. 98 p. <https://doi.org/10.22201/fi.25940732e.1998.01.004>
- Hernández-Morales J, Ochoa-Martínez DL, Ortega-Acosta SA, Vega-Muñoz R. 2018. Survey on alternative hosts of *Corynespora cassiicola*, the cause of the leaf and calyx spot, in the surroundings of roselle fields in Mexico. *Tropical Plant Pathology* 43 (3): 263-270. <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0206-9>
- Kamei A, Dutta S, Sarker K, Das S, Datta G. and Goldar S. 2018. Target leaf spot of tomato incited by *Corynespora cassiicola*, an emerging disease in tomato production under Gangetic alluvial region of West Bengal, India. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 51:19-20, 1039-1048. <https://doi.org/10.1080/03235408.2018.1545281>
- Maddison AC and Manners JG. 1973. Lethal effects of artificial ultraviolet radiation on cereal rust uredospores. *Transactions of the British Mycological Society* 60: 471-494. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(73\)80032-4](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(73)80032-4)
- Martínez SC. 2010. Etiología e incidencia de hongos asociados al manchado del cáliz de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Instituto de Fitosanidad. 88 p. <https://mx.123dok.com/document/wq2mxpry-etilogia-e-incidencia-de-hongos-asociados-al-manchado-de-calices-de-jamaica-hibiscus-sabdariffa-l-en-guerrero-mexico.html>
- Muslihatinn W and Daesusi R. 2014. Influence of photoperiod on the relative growth rate of *Hibiscus sabdariffa* L. *The Journal for Technology and Science*. 25(1): 18-22 <https://pdfs.semanticscholar.org/8fad/7d2dd729b1363209b2c72d2c749ebf170f0a.pdf>
- Ortega-Acosta SA, Hernández-Morales J, Ochoa-Martínez DL and Ayala-Escobar V. 2015. First report of *Corynespora cassiicola* causing leaf and calyx spot on roselle in Mexico. *Plant disease* 99(7):1041. <https://doi.org/10.1094/pdis-04-14-0438-pdn>
- Ortega-Acosta SA, Ochoa-Martínez DL, Leyva-Mir SG, Velasco-Cruz C, Mora-Aguilera JA, Hernández-Morales J. 2019. Control químico del manchado de hojas y cálices de jamaica en Guerrero, México. *Summa Phytopathologica*, 45 (1): 38-43. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/182006>
- Ortega-Acosta SA, Velasco-Cruz C, Hernández-Morales J, Ochoa-Martínez DL and Hernández Ruiz J. 2016. Diagrammatic logarithmic scales for assess the severity of spotted leaves and calyces of roselle. *Mexican Journal of Phytopathology* 34: 270-285. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1606-6>
- Pakpour S, De-Wei LI, Klironomos J. 2015. Relationships of fungal spore concentrations in the air and meteorological factors. *Fungal Ecology* 13: 130-134. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.09.008>
- Paul ND. 2000. Stratospheric ozone depletion, UV-B radiation and crop disease. *Environmental Pollution* 108: 343-355. [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(99\)00213-4](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(99)00213-4)
- Ruiz-Ramírez R, Hernández-Morales J, Ayala-Escobar V, Soto-Rojas L, Leyva-Mir, SG y Hernández-Ruiz J. 2015. Hongos asociados a Cálices de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) deshidratados y almacenados en Guerrero, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 12-30. [www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092015000100012](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092015000100012)
- SAS Institute, Inc. 2010. SAS user's guide: Statistics. Release 9.3. Ed. SAS Institute Incorporation. Cary, C, SA. 1028 pp.
- Sharma, N. 2017. Epidemiology of target spot of cotton and tomato. M.S. Thesis, Auburn University. 107 p. <https://etd.auburn.edu/handle/10415/6011>
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera de la SAGARPA). 2018. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola 2017 en México. El cultivo de jamaica. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México, D.F. <http://www.siap.gob.mx/>. (Consulta, julio 2019).
- SMN (Servicio Meteorológica Nacional). 2019. Información meteorológica por estado. <https://smn.conagua.gob.mx/es/informacion-climatologica-por-estado?estado=gro>. (Consulta, julio 2019).
- Sosa-Álvarez M, Madden LV and Ellis MA. 1995. Effects of temperature and wetness duration on sporulation of *Botrytis cinerea* on strawberry leaf residues. *Plant Disease*. 79: 609-614. <https://doi.org/10.1094/pd-79-0609>
- Trujillo-Tapia MaN y Ramírez-Fuentes E. 2015. Fitopatógenos asociados al manchado del cáliz de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Revista Iberoamericana de Ciencias* 2(4): 57-62.
- White T.J., T. Bruns S. Lee., and J.W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., and White T. J. Academic Press, Inc., New York. Pp. 315-322. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- Zhang, Z., Schwartz S., Wagner L., and Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7 (1/2):203-214.