

Antagonistic bacteria for biospace control of roselle spot (*Corynespora cassiicola*) of *Hibiscus sabdariffa*

Bacterias antagónicas para control en bioespacio del manchado de jamaica (*Corynespora cassiicola*) en *Hibiscus sabdariffa*

Alberto Patricio-Hernández, ¹Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental, ²Laboratorio de Patometabolismo Microbiano, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, México; **Santo Ángel Ortega-Acosta**, ³Departamento de Agronomía, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Universidad Autónoma de Guerrero, Iguala de la Independencia, Guerrero; ²**Arturo Ramírez-Peralta**; **Alejandro Ayala-Sánchez**, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Zacatepec de Hidalgo, Morelos, México; ³**Francisco Palemón-Alberto**, ¹**Erubiel Toledo-Hernández**, ¹**Yanet Romero-Ramírez**, ¹**Jeiry Toribio-Jiménez***.

*Autor para correspondencia: jeiryjimenez2014@gmail.com

Recibido: 05 de Junio, 2020.

Aceptado: 02 de Agosto, 2020.

Patricio-Hernández A, Ortega-Acosta SA, Ramírez-Peralta A, Ayala-Sánchez A, Palemón-Alberto F, Toledo-Hernández E, Romero-Ramírez Y and Toribio-Jiménez J. 2020. Antagonistic bacteria for biospace control of roselle spot (*Corynespora cassiicola*) of *Hibiscus sabdariffa*. Mexican Journal of Phytopathology 38(3): 450-462.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2006-1

Primera publicación DOI: 25 de Agosto, 2020.

First DOI publication: August 25, 2020.

Resumen. En años recientes, el manchado de la jamaica inducido por *Corynespora cassiicola* amenaza la producción de cálices. El objetivo fue determinar si algunas cepas bacterianas inhiben el desarrollo de *C. cassiicola in vitro* y bajo condiciones de bioespacio. La inhibición del desarrollo fue por confrontación dual de las bacterias: alimentos

Abstract. In recent years, *Corynespora cassiicola* induced spotted of roselle threatens calyx production. The objective was to determine if some bacterial strains inhibit the development of *C. cassiicola in vitro* and under biospace conditions. The inhibition of development was due to the dual confrontation of the bacteria: food (20), amphibian skin (41), tailings (22), air (seven) and rhizosphere (10) against the fungus. Plants of jamaican “Creole” variety were sown and artificially inoculated with *C. cassiicola*. From the beginning of symptoms of the disease, the selected bacterial strains with the highest percentage of inhibition were inoculated. AUDPC was evaluated. Only seven strains inhibited the development of the fungus in vitro from 62.7 to 100%: *Klebsiella pneumoniae* (M10-1 and M10-10), *Acinetobacter lwoffii* (A5), *Sphingomonas paucimobilis* (NF21), *Serratia marcescens* (M13ACD), *S. liquefaciens*

(20), piel de anfibios (41), jales mineros (22), aire (siete) y rizosfera (10) contra el hongo. Se sembraron plantas de jamaica variedad “criolla” y se inocularon artificialmente con *C. cassiicola*, a partir del inicio de síntomas de la enfermedad se inocularon las cepas bacterianas seleccionadas con mayor porcentaje de inhibición. Se evaluó la ABCPE. Solo siete cepas inhibieron del 62.7 al 100% el desarrollo del hongo *in vitro*: *Klebsiella pneumoniae* (M10-1 y M10-10), *Acinetobacter lwoffii* (A5), *Sphingomonas paucimobilis* (NF21), *Serratia marcescens* (M13ACD), *S. liquefaciens* (M8ACD) y *Acinetobacter* sp. (5H2). En relación a la severidad en hojas las cepas M10-1 y M10-10 redujeron el ABCPE en un 9.5 y 12.6%, respectivamente, seguido de NF21 (14.5 de ABCPE), el control registró los mayores niveles (45.7 de ABCPE). Para la severidad en cálices, los análisis del ABCPE de todas las cepas ejercieron control al reducir niveles de severidad (17.1-8.6 ABCPE).

Palabras clave: control biológico, bacterias, hongo fitopatógeno, *in vitro*

En México, la jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), es un cultivo de importancia económica, se cultiva para fines de consumo nacional y exportación; el estado de Guerrero es el principal productor con 14,294 hectáreas cultivadas que representan aproximadamente el 70% de la superficie nacional (SIAP, 2019).

En años recientes la enfermedad conocida como manchado de la jamaica causada por el hongo *Corynespora cassiicola*, es capaz de alcanzar una incidencia del 100% y pérdidas totales del cultivo (Ortega-Acosta *et al.*, 2015; Ortega-Acosta *et al.*, 2019), con valores de severidad en hojas y cálices superiores al 50%, con estos niveles de severidad el producto comercial (cálices) generalmente son

(M8ACD) and *Acinetobacter* sp. (5H2). Regarding leaf severity, the M10-1 and M10-10 strains reduced AUDPC by 9.5 and 12.6%, respectively, followed by NF21 (AUDPC 14.5), the control registered the highest levels (AUDPC 45.7). For the severity in calyces, the AUDPC analyzes of all the strains exercised control by reducing severity levels (17.1-8.6 AUDPC).

Key words: biological control, bacterial, phytopathogenic fungus, *in vitro*

In Mexico, roselle (*Hibiscus sabdariffa*) is an economically important crop; it is cultivated for domestic consumption and for export. The state of Guerrero is the major roselle producer with 14,294 hectares cultivated, which represent approximately 70% of the national area (SIAP, 2019).

In recent years, the disease known as spotted of roselle, induced by the fungus *Corynespora cassiicola*, has reached 100% incidence and caused the total loss of the crop (Ortega-Acosta *et al.*, 2015; Ortega-Acosta *et al.*, 2019) with severity values higher than 50% for leaves and calyces; at this level of severity, the commercial product (calyces) is usually discarded thus causing economic losses to the producers (Ortega-Acosta *et al.*, 2019; Ortega-Acosta *et al.*, 2020a). In addition to roselle, *C. cassiicola* causes severe diseases in diverse crops such as cotton (*Gossypium hirsutum*), soybean (*Glycine max*), rubber tree (*Hevea brasiliensis*), among others, and, worldwide, it has been isolated from more than 530 plant species (Nghia *et al.*, 2008; Dixon *et al.*, 2009; Fortunato *et al.*, 2015).

Currently, conventional and alternative agrochemicals are used for controlling *C. cassiicola* (Vawdrey *et al.*, 2008; Ortega-Acosta *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2020). However, despite their effectiveness, the frequent use of these

desechados causando así pérdidas económicas a los productores (Ortega-Acosta *et al.*, 2019; Ortega-Acosta *et al.*, 2020a). Además de la jamaica, *C. cassiicola* causa enfermedades severas en diversos cultivos como algodón (*Gossypium hirsutum*), soya (*Glycine max*), árbol del caucho (*Hevea brasiliensis*), entre otros y a nivel mundial se ha aislado en más de 530 especies de plantas (Nghia *et al.*, 2008; Dixon *et al.*, 2009; Fortunato *et al.*, 2015).

Actualmente el control de *C. cassiicola* ha sido con agroquímicos convencionales y alternativos (Vawdrey *et al.*, 2008; Ortega-Acosta *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2020); sin embargo, a pesar de su eficacia, el uso frecuente de estas sustancias puede causar serios problemas ambientales y de salud (Hahn 2014; Ghosal y Hati, 2019; Weber y Hahn, 2019). Es por ello, una de las alternativas para controlar de manera sustentable las enfermedades en plantas es el control biológico con microorganismos antagonistas, con la finalidad de limitar el desarrollo de los patógenos o reducir la severidad de los daños en el cultivo (Blakeman y Fokkema, 1982; Köhl *et al.*, 2019).

En estudios previos de control biológico para disminuir los daños de las enfermedades causadas por *C. cassiicola*, se han evaluado bacterias como *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus* y *B. thuringiensis*, en cultivos de pepino, jitomate y árbol de caucho (Romeiro *et al.*, 2010; Rahman *et al.*, 2010; Manju *et al.*, 2019, Köhl *et al.*, 2019). No se encontraron estudios sobre el control biológico de la enfermedad del manchado de la jamaica causada por el hongo. Por lo que, los objetivos fueron determinar la capacidad de cepas bacterianas para inhibir el desarrollo de *C. cassiicola in vitro* y evaluar su control en hojas y cálices en condiciones de bioespacio.

Se utilizaron 100 cepas bacterianas del biobanco del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental de la Universidad

substances can cause serious environment and health issues (Hahn 2014; Ghosal and Hati, 2019; Weber and Hahn, 2019). For this reason, one of the alternatives for sustainably controlling plant diseases is the biological control with antagonistic microorganisms in order to limit the development of pathogens or reduce the severity of crop damages (Blakeman and Fokkema, 1982; Köhl *et al.*, 2019).

In previous studies about biological control to reduce disease damages caused by *C. cassiicola*, bacteria such as *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus* and *B. thuringiensis* have been evaluated in cucumber, tomato and rubber trees (Romeiro *et al.*, 2010; Rahman *et al.*, 2010; Manju *et al.*, 2019, Köhl *et al.*, 2019). No studies about the use of biological controls for spotted of roselle caused by the fungus were found. Therefore, the objectives of this study were to determine the ability of bacterial strains to inhibit *C. cassiicola* growth *in vitro* and evaluate their control in leaves and calyces under biospace conditions.

For the study, 100 bacterial strains from the biobank of the Molecular Microbiology and Environment Biotechnology Laboratory, Autonomous University of Guerrero, were used; the strains were isolated from diverse environments: food (20), amphibian skin (41), tailings (22), air (7) and rhizosphere (10). For *in vitro* studies, the *C. cassiicola* CCHFR strain (GenBank: KM207768), reported by Ortega-Acosta *et al.* (2015), was used. All the bacterial strains were used in antagonistic *in vitro* tests based on dual confrontations to select only those able to inhibit the growth of the CCHFR strain; the bacteria were identified through micro- and macroscopic morphology using the Vitek2® automated system (Vargas *et al.*, 2005) for their subsequent evaluation in biological control essays of spotted of roselle under biospace conditions.

The essay to determine the inhibition percent of mycelial development *in vitro* consisted of a

Autónoma de Guerrero, aisladas de diversos ambientes; alimentos (20), piel de anfibios (41), jales mineros (22), aire (siete) y rizosfera (10). Para los estudios *in vitro* se usó la cepa *C. cassiicola* CCHFR (GenBank: KM207768) reportada por Ortega-Acosta *et al.* (2015). Todas las cepas bacterianas se emplearon para las pruebas antagónicas *in vitro* basadas en confrontaciones duales con el fin de seleccionar solo aquellas capaces de inhibir el crecimiento de la cepa CCHFR, la identificación bacteriana se hizo por morfología micro y macroscópica, usando el sistema automatizado Vitek2® (Vargas *et al.*, 2005), para su posterior evaluación en ensayos de control biológico del manchado de la jamaica en bioespacio.

El ensayo para determinar el porcentaje de inhibición del desarrollo micelial *in vitro*, consistió de un fragmento micelial de 1 cm² obtenido de un cultivo de siete días de *C. cassiicola* (CCHFR), colocado en el centro de una caja de Petri con agar PDA (Agar Papa Dextrosa, Difco®), enseguida se inocularon las bacterias, impregnando discos de papel filtro estéril de 6 mm con 20 µL de suspensión bacteriana a una densidad de 1×10⁸ UFC mL⁻¹ y se colocaron en cada punto cardinal a una distancia de 2.5 cm del hongo (Petatán-Sagahón *et al.*, 2011), incubadas a 25±2 °C por 21 días, como control negativo se utilizó discos con agua destilada estéril. Los ensayos por triplicado se aplicaron solo a las cepas con una inhibición >50%. Se fotografió cada ensayo y se utilizó el software ImageJ v.1.8.0 para obtener el área total del desarrollo micelial (Cuervo-Parral *et al.*, 2011).

El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición de crecimiento (\%)} = \left(\frac{D_c - D_t}{D_c} \right) \times 100$$

mycelial fragment 1 cm² in size obtained from a seven-day culture of *C. cassiicola* (CCHFR), which was placed in the middle of a Petri dish containing agar PDA culture medium (Potato- Dextrose-Agar Difco®); then, the bacteria were inoculated using 6 mm sterile filter paper disks impregnated with 20 µL of a bacterial suspension at a density of 1×10⁸ UFC mL⁻¹, placed at each cardinal point at a distance of 2.5 cm from the fungus (Petatán-Sagahón *et al.*, 2011) and incubated at 25±2 °C for 21 days; disks with sterile distilled water were used as the negative control. The essays in triplicate were applied only to strains with >50% inhibition. Photographs of each essay were taken, and the total area of the mycelial development was obtained using the ImageJ v.1.8.0 software (Cuervo-Parral *et al.*, 2011).

The percent inhibition of the mycelial growth was calculated using the following formula:

$$\text{Growth inhibition (\%)} = \left(\frac{D_c - D_t}{D_c} \right) \times 100$$

Where *D_c*: Mycelial growth of the control plates, and *D_t*: Mycelial growth in the Petri dishes treated (Durairaj *et al.*, 2018).

Since in a preliminary essay under biospace conditions, the CCHFR strain had a low level of pathogenicity (data not shown), a sampling in the field was conducted at El Pericón, municipality of Tecoaapa, Guerrero, where roselle leaves with spotted of roselle symptoms were collected in September 2019, following the methodology described by Ortega-Acosta *et al.* (2015); a pathogenically active *C. cassiicola* strain called CCPER4 was isolated and identified.

The vegetal material used consisted of three-month-old roselle plants of a “Creole” variety, which

Donde *Dc*: Crecimiento micelial de las placas control y *Dt*: Crecimiento micelial de las cajas de Petri tratadas (Durairaj *et al.*, 2018).

En un ensayo preliminar en bioespacio la cepa CCHFR presentó bajo nivel de patogenicidad (datos no mostrados), por lo anterior se realizó un muestreo en campo en el Pericón, Municipio de Tecoaapa, Guerrero, para lo cual se recolectaron hojas de jamaica con síntomas del manchado durante septiembre de 2019, siguiendo la metodología descrita por Ortega-Acosta *et al.* (2015); se aisló e identificó una cepa de *C. cassiicola* patógenicamente activa denominada CCPER4.

El material vegetal utilizado consistió en plantas de jamaica de la variedad “criolla” con tres meses de desarrollo, la siembra se hizo en macetas de polietileno (15×25 cm), como sustrato se usó una mezcla de suelo y composta (1:1). Para la fertilización se utilizó la fórmula 45-30-20 de NPK, con dos aplicaciones (Alejo, 2017). No se realizaron aplicaciones de productos químicos para el control de plagas y enfermedades. Para evaluar el control biológico de *C. cassiicola* (CCPER4) se utilizaron únicamente las siete bacterias con inhibición del desarrollo micelial $\geq 50\%$, cada cepa fue considerada como un tratamiento con seis repeticiones, cada repetición consistió de cuatro macetas con plantas de jamaica (2 plantas/maceta), alojadas bajo un diseño completamente al azar, la unidad experimental fueron las dos macetas centrales/repetición, para esto se preparó e inoculó por aspersión una suspensión bacteriana de 1×10^8 UFC mL⁻¹ sobre planta de tres meses de edad con un atomizador manual a punto de goteo. Después de 24 h se preparó e inoculó una suspensión de 2×10^5 conidios mL⁻¹ de *C. cassiicola* (CCPER4) con un atomizador manual, todas las plantas fueron cubiertas con bolsas de polietileno transparente durante 72 h. Para el testigo positivo se asperjaron plantas de jamaica únicamente con conidios de *C. cassiicola* (CCPER4).

were sown in polyethylene pots (15×25 cm) using a mixture of soil and compost (1:1) as substrate. The plants were fertilized twice using a 45-30-20 of NPK formulation (Alejo, 2017). No chemical products were applied for controlling pests and diseases. To evaluate the biological control of *C. cassiicola* (CCPER4), only the seven bacteria which inhibited $\geq 50\%$ mycelial development were used; each strain was considered as a treatment with six replications; each replication consisted of four pots with roselle plants (2 plants/pot) arranged in a completely randomized design, and the experiment unit consisted of two central/replication pots. For inoculation, a bacterial suspension of 1×10^8 UFC mL⁻¹ was prepared and sprayed on three-month-old plants using a manual sprayer on the point of dripping. After 24 h, a suspension of 2×10^5 conidia mL⁻¹ of *C. cassiicola* (CCPER4) was prepared and inoculated using a manual sprayer; all the plants were covered with transparent polyethylene bags for 72 h. For the positive control, roselle plants were sprayed only with *C. cassiicola* (CCPER4) conidia.

To estimate the severity of the disease induced by *C. cassiicola* (CCPER4) in each treatment, the plants were stratified in three levels (low, intermediate and high) (Villanueva-Couoh *et al.*, 2005), and then four leaves or calyces per stratum were evaluated. To estimate the extent of disease severity, two diagrammatic scales were used for leaves: 0=0, 1=(>0-2 to 4), 2=(>4-7 to 12), 3=(>12-19 to 29), 4=(>29-42 to 57) and 5=(>57-70 to ≤ 100), and for calyces: 0=0, 1=(>0-3 to 5), 2=(>5-10 to 18), 3=(>18-30 to 46), 4=(>46-63 to 77) and 5=(>77-87 to ≤ 100) (Ortega-Acosta *et al.*, 2016). The estimation of the severity was evaluated from October to November, for leaves, and from November to December for calyces. Four evaluations were made to leaves and calyces at six-day intervals, according to the phenological stage. The temperature and relative humidity within the

Las estimaciones de severidad de la enfermedad inducida por *C. cassiicola* (CCPER4) sobre cada tratamiento se realizaron mediante la estratificación de las plantas en tres niveles (bajo, medio y alto) (Villanueva-Couoh *et al.*, 2005), de donde se evaluaron cuatro hojas o cálices por cada estrato. Las estimaciones de la severidad se realizaron con dos escalas diagramáticas que fueron para hojas: 0=0, 1=(>0-2 a 4), 2=(>4-7 a 12), 3=(>12-19 a 29), 4=(>29-42 a 57) y 5=(>57-70 a ≤100) y para cálices: 0=0, 1=(>0-3 a 5), 2=(>5-10 a 18), 3=(>18-30 a 46), 4=(>46-63 a 77) y 5=(>77-87 a ≤100) (Ortega-Acosta *et al.*, 2016). La estimación de la severidad fue evaluada durante octubre a noviembre para hojas y de noviembre a diciembre para cálices. En hojas y cálices se registraron cuatro evaluaciones a intervalos de seis días, según la etapa fenológica. La temperatura y humedad relativa dentro del bioespacio fue estimada con un higrotermógrafo digital Extech® RHT10.

Los datos obtenidos a partir de las pruebas de antagonismo *in vitro* fueron sometidos a un análisis de varianza y separación de medias (Tukey, $p=0.01$). Con los datos estimados de severidad de hojas y cálices de jamaica, se estimó el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) por cada tratamiento, con base en el método descrito por Campbell y Madden (1990), posteriormente se realizó un análisis de varianza y separación de medias (Tukey, $p=0.01$). Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SAS v 9.4.

De todas las 100 cepas evaluadas, siete se seleccionaron por obtener $\geq 50\%$ de inhibición de *C. cassiicola* (CCHFR). De éstas, la cepa *Serratia marcescens* (M13ACD) mostró un 100% de inhibición (Figura 1, Cuadro 1), y las cepas de *Acinetobacter lwoffii* (A5), *Klebsiella pneumoniae* (M10-1 y M10-10), *Sphingomonas paucimobilis* (NF21), *Serratia liquefaciens* (M8ACD) y *Acinetobacter* sp. (5H2), mostraron diferencias estadísticas

bioespacio were estimated using an Extech® RHT10 digital hygromograph.

The data obtained from the antagonism *in vitro* tests were subjected to an analysis of variance (ANOVA) and a separation of means (Tukey, $p=0.01$). Using the estimated data of severity in roselle leaves and calyces, the Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC) per treatment was estimated based on the method described by Campbell and Madden (1990), followed by an analysis of variance and a separation of means (Tukey, $p=0.01$). Statistical analyses were performed using SAS v 9.4 statistical software.

Of the 100 strains evaluated, seven that inhibited $\geq 50\%$ of *C. cassiicola* (CCHFR) were selected. Of these, the strain *Serratia marcescens* (M13ACD) showed 100% inhibition (Figure 1, Table 1), and the strains of *Acinetobacter lwoffii* (A5), *Klebsiella pneumoniae* (M10-1 y M10-10), *Sphingomonas paucimobilis* (NF21), *Serratia liquefaciens* (M8ACD) and *Acinetobacter* sp. (5H2) had statistical differences compared to the control; these strains were selected for control essays under biospace conditions (Table 1).

The CCPER4 strain produced dense, compact and black-greyish mycelium, and straight-to-curve conidia with short light-brown pseudosepta that measured 57.0-308.2 x 10-20 μm (length x width, respectively), which are distinctive characteristics of *C. cassiicola* (Qi *et al.*, 2011; Ortega-Acosta *et al.*, 2020b).

The artificial inoculation of *C. cassiicola* (CCPER4) induced the spotted of roselle disease under biospace conditions. The estimated severity values of AUDPC for spots on roselle leaves and calyces allowed to determine an effect on disease reduction in all the bacterial treatments compared to the control treatment.

However, the effect was differential on leaves depending on the inoculated bacteria ($p=0.01$),

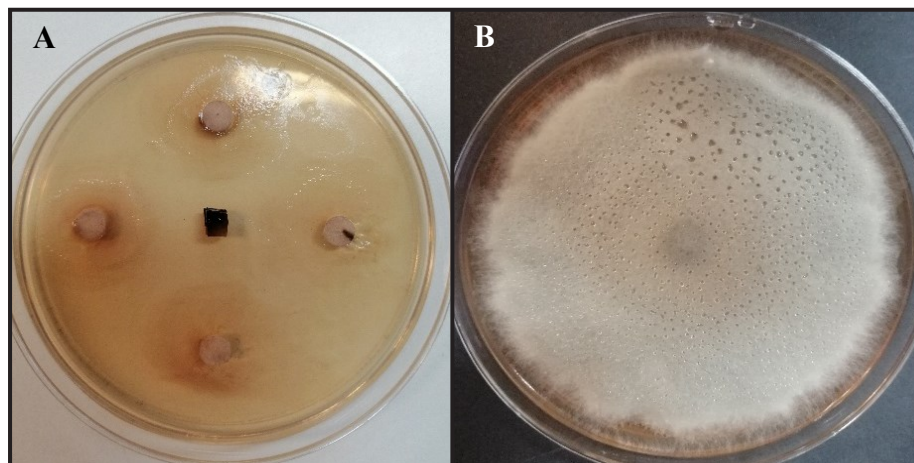


Figura 1. Actividad antagonista en medio PDA después de 21 días de cultivo a 27 ± 2 °C. A= cepa *Serratia marcescens* (M13A-CD) sobre *C. cassiicola*. B= Tratamiento control (*C. cassiicola*- CCHFR).

Figure 1. Antagonistic activity in PDA culture medium after 21 days in a culture medium at 27 ± 2 °C. A= *Serratia marcescens* strain (M13ACD) in *C. cassiicola*. B= Control treatment (*C. cassiicola*- CCHFR).

Cuadro 1. Origen e identificación de cepas con capacidad antagonista $\geq 50\%$ de inhibición *in vitro* contra *C. cassiicola* y su efecto en la reducción de la severidad del manchado de hojas y cálices de jamaica en condiciones de bioespacio en Iguala, Guerrero, México.

Table 1. Origin and identification of strains with $\geq 50\%$ antagonistic capacity of inhibition *in vitro* against *C. cassiicola* and their effect on severity reduction of spots on roselle leaves and calyces under biospace conditions in Iguala, Guerrero, Mexico.

Cepa	Origen	Identificación ^w	Inhibición (%) <i>in vitro</i>	Severidad en hojas (ABCPE ^z)	Severidad en cálices (ABCPE)
5H2	Aire	<i>Acinetobacter</i> sp.	69.4d ^y	26.9bc	13.6b
A5	Aire	<i>A. lwoffii</i>	62.7e	18.8bcd	9.1b
M10-1	Jales mineros	<i>K. pneumoniae</i>	66.6ed	9.5d	15.0b
M10-10	Jales mineros	<i>K. pneumoniae</i>	75.2c	12.6d	13.7b
NF21	Jales mineros	<i>S. paucimobilis</i>	80.9b	14.5cd	13.1b
M13ACD	Piel de anfibios	<i>S. marcescens</i>	100a	30.7b	17.1b
M8ACD	Piel de anfibios	<i>S. liquefaciens</i>	68.0d	30.9b	8.6b
Control ^x	---	---	---	45.7a	42.1a

^w Género y especie identificado. / Genus and species identified.

^x Tratamiento control positivo en ensayos en condiciones de bioespacio. / Positive control treatment in trials under biospace conditions.

^y Medias en la misma columna seguidas de la misma letra, no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey (*= $P > 0.01$). / Means in the same column followed by the same letter are not significantly different according to Tukey's test (*= $P > 0.01$).

^z Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad. / Area Under the Disease Progress Curve.

respecto al control; estas cepas fueron seleccionadas para realizar los ensayos de control en condiciones de bioespacio (Cuadro 1).

La cepa CCPER4 mostró micelio denso y compacto, de color negro grisáceo, con conidios rectos a curvos, con pseudoseptos, cortos, de coloración marrón claro, con dimensiones de 57.0-308.2 x 10-20 µm (largo x ancho, respectivamente), características distintivas de *C. cassiicola* (Qi *et al.*, 2011; Ortega-Acosta *et al.*, 2020b).

Con la inoculación artificial de *C. cassiicola* (CCPER4) se logró inducir la enfermedad del manchado de la jamaica en condiciones de bioespacio. Los valores de severidad estimados del ABCPE del manchado en hojas y cálices de jamaica, permitieron determinar un efecto en la disminución de la enfermedad en todos los tratamientos bacterianos evaluados con respecto al tratamiento control.

Sin embargo, el efecto fue diferencial en hojas según la especie de bacteria inoculada ($p=0.01$), en cambio en cálices, todas mostraron el mismo efecto en la reducción de la severidad comparado con el tratamiento control ($p=0.01$). Así, por ejemplo, en hojas, los tratamientos inoculados con las cepas M10-1 y M10-10 (*K. pneumoniae*) mostraron los menores valores de severidad con 9.5 y 12.6 de ABCPE; mientras que las cepas de NF21 (*S. paucimobilis*), A5 (*A. lwoffii*), 5H2 (*Acinetobacter* sp.), M13ACD (*S. marcescens*) y M8ACD (*S. liquefaciens*), mostraron una disminución de la severidad de ABCPE con valores de 14.5 a 30.9 y, el tratamiento control registró la mayor severidad con 42.1 de ABCPE (Cuadro 1).

Por otra parte, en cálices, todas las cepas bacterianas mostraron una disminución significativa de la severidad con valores entre 8.6 a 17.1 de ABCPE y fueron estadísticamente similares, pero diferentes con respecto al control con 42.1 de ABCPE (Cuadro 1). Las condiciones de Temperatura y humedad relativa durante las evaluaciones fueron de 28 °C y 67% de humedad respectivamente.

while in calyces, all showed the same effect on the decrease of severity compared to the control treatment ($p=0.01$). For example, in leaves, the treatments inoculated with the strains M10-1 and M10-10 (*K. pneumoniae*) had the lowest severity values with 9.5 and 12.6 of AUDPC, while the strains NF21 (*S. paucimobilis*), A5 (*A. lwoffii*), 5H2 (*Acinetobacter* sp.), M13ACD (*S. marcescens*) and M8ACD (*S. liquefaciens*) reduced the severity of AUDPC with values of 14.5 to 30.9, and the control treatment had the greatest severity with 42.1 of AUDPC (Table 1).

On the other hand, in calyces, there was a significant decrease in severity in all the bacterial strains with AUDPC values between 8.6 and 17.1 and were statistically similar but different compared to the control with 42.1 of AUDPC (Table 1). The temperature and relative humidity conditions during the evaluations were 28 °C and 67%, respectively.

Based on the evaluation of the 100 bacterial strains, seven had an effect on inhibiting the development of *C. cassiicola* (CCHFR) *in vitro*, and significantly reduced the severity of spotted of roselle under biospace conditions. The results indicate that the studied bacteria have the potential to be evaluated in further studies as biological control agents of spotted of roselle under field conditions and inoculum natural pressure.

Under *in vitro* conditions, *S. liquefaciens* (M8ACD) inhibited 68% of *C. cassiicola* (CCHFR) and 100% of *S. marcescens* (M13ACD), and was the best under *in vitro* conditions (Table 1); inhibition can be possibly due to the surfactants (serrawatina type) produced by the strains (Shekhar *et al.*, 2015).

Regarding severity on leaves, *S. marcescens* (M13ACD) and *S. liquefaciens* (M8ACD) had 30.7 and 30.9 of ABCPE, respectively. These results suggest that the *Serratia* spp. strains had a better effect *in vitro* and that this result is similar to that

A partir de la evaluación de las 100 cepas bacterianas, siete ejercieron un efecto en inhibir *in vitro* el desarrollo de *C. cassiicola* (CCHFR), las mismas que lograron reducir significativamente la severidad del manchado de la jamaica en condiciones de bioespacio. Los resultados indican que las bacterias estudiadas presentan potencial para ser evaluadas en trabajos posteriores como agentes de control biológico de la enfermedad del manchado de la jamaica bajo condiciones de campo y presión natural de inóculo.

En condiciones *in vitro*, *S. liquefaciens* (M8ACD) inhibió a *C. cassiicola* (CCHFR) en un 68%, *S. marcescens* (M13ACD) con un 100%, siendo la mejor en condiciones *in vitro* (Cuadro 1), la inhibición posiblemente puede ser causada por la producción de biosurfactantes (tipo serrawatina) que las cepas puedan producir (Shekhar *et al.*, 2015).

En cuanto a la severidad en hojas *S. marcescens* (M13ACD) y *S. liquefaciens* (M8ACD) tuvieron un 30.7 y 30.9 de ABCPE, respectivamente, estos resultados sugieren que las cepas de *Serratia* spp., muestran un mejor efecto *in vitro* similar a lo reportado por Sabu *et al.* (2017) quienes describen al género mencionado capaz de controlar *in vitro* a *Pythium myriotylum* y otros patógenos en el cultivo de jengibre (*Zingiber officinale*); sin embargo, el efecto ejercido en condiciones de invernadero fue significativamente menor en comparación con el resto de cepas utilizadas (Mustafa *et al.*, 2019).

En cuanto a las cepas de *K. pneumoniae* (M10-1 y M10-10) fueron las especies con mayor capacidad para reducir la severidad en hojas (Cuadro 1); sin embargo, en cálices el efecto fue similar al resto de los aislamientos bacterianos. Al respecto, Dey *et al.* (2019) evaluaron el efecto de una cepa de *Klebsiella* sp. para el control *in vitro* e *in vivo* de la enfermedad de pudrición de raíz en cultivos de frijol negro (*Vigna mungo*), ellos determinaron un buen control de la enfermedad, por lo que recomiendan su uso como agente de biocontrol.

reported by Sabu *et al.* (2017), who stated that the mentioned genus is able to control *Pythium myriotylum in vitro*, as well as other pathogens in ginger crops (*Zingiber officinale*). However, the effect exerted under greenhouse conditions was significantly lower compared to the other strains used (Mustafa *et al.*, 2019).

Regarding *K. pneumoniae* strains (M10-1 and M10-10), these were the species with the greatest ability to reduce severity on leaves (Table 1), but in calyces the effect was similar to that of the other bacterial isolates. In this regard, Dey *et al.* (2019) evaluated the effect of a *Klebsiella* sp. strain on *in vitro* and *in vivo* control of root rot in black bean crops (*Vigna mungo*), and determined a good control of the disease, and for this reason, the authors recommend its use as a biocontrol agent.

On the other hand, *A. lwoffii* (A5) inhibited 62.7% of *C. cassiicola* growth *in vitro*, which had an effect similar to that exerted by *K. pneumoniae* strains. However, *A. lwoffii* reduced the disease severity in leaves with 18.8 of AUDPC, which was statistically similar to the effect exerted by strains of *K. pneumoniae* (M10-1 and M10-10), *S. marcescens* (M13ACD) and *S. liquefaciens* (M8ACD). In calyces, the severity caused by *A. lwoffii* showed 9.1 of AUDPC, which was similar to the other bacterial treatments (Table 1). In this regard, Trotel-Aziz *et al.* (2008) mentioned that this bacterial genus is able to induce resistance in grapevine plants (*Vitis vinifera*) and that this is a way to prevent *Botrytis cinerea* colonization and, consequently, reduces damage. Under *in vitro* conditions, *S. paucimobilis* (NF21) showed 80.9% inhibition. Regarding severity in leaves and calyces, the ABCPE values were 14.5 and 13.1, respectively. Medina-De la Rosa *et al.* (2016) mentioned that this species had an antagonistic effect on *Fusarium* sp.

The *Acinetobacter* sp. (5H2) strain inhibited 69.4% of *C. cassiicola* and the AUDPC value for

Por otra parte, *A. lwoffii* (A5) inhibió el 62.7% del crecimiento de *C. cassiicola* *in vitro*, el cual resultó en un efecto similar al ejercido por las cepas de *K. pneumoniae*. Sin embargo, *A. lwoffii* ejerció una reducción sobre la severidad de la enfermedad en hojas al registrar una ABCPE de 18.8, siendo estadísticamente similar al efecto ejercido por las cepas de *K. pneumoniae* (M10-1 y M10-10), *S. marcescens* (M13ACD) y *S. liquefaciens* (M8ACD). En cálices *A. lwoffii* mostró una severidad de 9.1 de ABCPE, similar al resto de tratamientos bacterianos (Cuadro 1). En este sentido, Trotel-Aziz *et al.* (2008), mencionan que este género bacteriano es capaz de inducir resistencia en plantas de vid (*Vitis vinifera*), de esta manera evita la colonización de *Botrytis cinerea* y por consiguiente la disminución del daño. *S. paucimobilis* (NF21) mostró en condiciones *in vitro* una inhibición de 80.9%. En cuanto a la severidad en hojas y cálices fue de 14.5 y 13.1 de ABCPE, respectivamente. Medina-De la Rosa *et al.* (2016) describieron esta especie con efecto antagónico sobre *Fusarium* sp.

La cepa *Acinetobacter* sp. (5H2) logró una inhibición de *C. cassiicola* en un 69.4% y registró una severidad en hojas de 26.9 de ABCPE la cual fue similar a *S. liquefaciens* (M8ACD), y una severidad en cálices de 13.6 de ABCPE, estadísticamente similar al resto de tratamientos bacterianos. Estos resultados coinciden con lo reportado por otros autores, quienes mencionan que el uso de bacterias ejerce control de enfermedades causadas por *C. cassiicola* (Romeiro *et al.* 2010; Manju *et al.*, 2019).

No se encontraron reportes de las especies bacterianas evaluadas como agentes de control biológico de *C. cassiicola*, por lo que la presente investigación presenta las primeras evidencias de control biológico de *C. cassiicola* causante del manchado de la jamaica en Guerrero, mediante el uso y aplicación de especies bacterianas como *K. pneumoniae*,

severity in leaves was 26.9, which was similar to that of *S. liquefaciens* (M8ACD); the AUDPC value for severity in calyces was 13.6, which was statistically similar to the other bacterial treatments. These results are in agreement with those reported by other authors, who mention that the use of bacteria exerts control on diseases caused by *C. cassiicola* (Romeiro *et al.* 2010; Manju *et al.*, 2019).

No reports of the bacterial species evaluated as biological control of *C. cassiicola* agents were found, and, therefore, this research shows the first evidences of biological control of *C. cassiicola*, the causal agent of spotted of roselle in Guerrero, by using and applying bacterial species such as *K. pneumoniae*, *A. lwoffii*, *S. paucimobilis*, *S. marcescens* and *S. liquefaciens*, isolated from diverse environments. For this reason, future studies could focus on the evaluation of these bacteria under inoculum natural pressure of the spotted of roselle disease, and also integrate other sustainable control strategies such as the removal of weed reservoirs of *C. cassiicola* (Hernández-Morales *et al.*, 2018), rotation with chemical alternatives (Ortega-Acosta *et al.*, 2019), among others, in order to decrease the impact of the damage caused by the pathogen in roselle cropping.

For the study, seven bacteria were isolated from air, tailings, and amphibian skin with *in vitro* antagonistic potential against *C. cassiicola*, the causal agent of spotted of roselle. The strains of M13ACD (*S. marcescens*) and NF21 (*S. paucimobilis*) were the most effective to inhibit the development of *C. cassiicola* *in vitro* with 100 and 80.9% inhibition, respectively. Under biospace conditions, M10-1 and M10-10 (*K. pneumoniae*), were the most effective in reducing the severity of spotted of roselle with AUDPC values of 9.5 and 12.6, compared to the control treatment (45.7 of AUDPC). In calyces, the seven strains selected

A. lwoffii, *S. paucimobilis*, *S. marcescens* y *S. liquefaciens* aisladas de diversos ambientes. Por lo que trabajos posteriores, podrían enfocarse en la evaluación de dichas bacterias bajo presión natural de inóculo de la enfermedad del manchado, además de integrar otras estrategias sustentables de control como la eliminación de malezas reservorios de *C. cassiicola* (Hernández-Morales *et al.*, 2018), rotación con sustancias químicas alternativas (Ortega-Acosta *et al.*, 2019), entre otras, a fin de disminuir el impacto del daño ocasionado por el patógeno en dicho cultivo.

Se obtuvieron siete bacterias aisladas de aire, jales mineros y piel de anfibio con potencial antagonico *in vitro* frente a *C. cassiicola* causante del manchado de la jamaica. Las cepas M13ACD (*S. marcescens*) y NF21 (*S. paucimobilis*) fueron las más efectivas para inhibir el desarrollo de *C. cassiicola in vitro* con 100 y 80.9% de inhibición, respectivamente. En bioespacio, M10-1 y M10-10 (*K. pneumoniae*), resultaron más efectivas en reducir la severidad del manchado en hojas al registrar valores de 9.5 y 12.6 de ABCPE, comparadas con el tratamiento control (45.7 de ABCPE). En cálices las siete cepas redujeron los niveles de severidad de la enfermedad con valores de 8.6 a 17.1 de ABCPE, el tratamiento control registró los mayores niveles de severidad con 42.1 de ABCPE.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado por medio del número beca 883268 y por el apoyo de Movilidad Nacional, así como también al Dr. Miguel Ángel Catalán y a la Dra. Ma. Elena Moreno Godínez por sus aportaciones en el transcurso del proyecto.

LITERATURA CITADA

Alejo JA. 2017. Jamaica (monocultivo). Pp: 23-29. In: Moczuma LG, González HA, Romero SME, Pérez MR,

decreased the levels of disease severity with AUDPC values of 8.6 to 17.1, while the control treatment had the highest levels of severity with an AUDPC value of 42.1.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the economic support provided through the scholarship number 883268 and National Mobility's support, and to Dr. Miguel Ángel Catalán and Dra. Ma. Elena Moreno Godínez for their assistance during the project.

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

- Castillo MCR. (Eds.). Agenda Técnica Agrícola de Guerrero. INIFAP. 116 p. [https://vun.inifap.gob.mx/VUN\\_MEDIA/BibliotecaWeb/\\_media/\\_agendas/4130\\_4827\\_Agenda\\_T%e3%a9cnica\\_Guerrero\\_2017.pdf](https://vun.inifap.gob.mx/VUN_MEDIA/BibliotecaWeb/_media/_agendas/4130_4827_Agenda_T%e3%a9cnica_Guerrero_2017.pdf)
- Blakeman JP and Fokkema NJ. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. Annual Review of Phytopathology 20:167-92. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.20.090182.001123>
- Campbell CL and Madden LV. 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley & Sons. New York, USA. 532p. <https://doi.org/10.1017/S00074853000>
- Cuervo-Parral JA, Ramírez-Suerol M, Sánchez-López V. and Ramírez-Lepel M. 2011. Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* VSL291 on phytopathogenic fungi isolated from cocoa (*Theobroma cacao* L.) fruits. African Journal of Biotechnology 10(52):10657–10663. <https://doi.org/10.5897/ajb11.1333>
- Dey S, Dutta P and Majumbar S. 2019. Biological control of *Macrosphomina phaseolina* in *Vigna nungo* L. by endophytic *Klebsiella pneumoniae* HR1. Jordan Journal of Biological Sciences 12(2): 210-227. <http://jjbs.hu.edu.jo/files/vol12/n2/Paper%20number%2014.pdf>
- Dixon LJ, Schlub RL, Pernezny K, Datnoff LE. 2009. Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. Phytopathology 99(9): 1015-1027. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-9-1015>
- Durairaj K, Velmurugan P, Park JH, Chang WS, Park YJ, Senthilkumar P, Choi KM, Lee JH and Oh BT. 2018. An investigation of biocontrol activity *Pseudomonas* and *Bacillus* strains against *Panax ginseng* root rot fungal phytopathogens. Biological Control 125:138-146. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.05.021>
- Fortunato AA, Debona D, Bernardeli AMA and Rodrigues FA. 2015. Changes in the antioxidant system in soybean leaves infected by *Corynespora cassiicola*. Phytopathology 105: 1050-1058. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-14-0283-R>

- Ghosal A and Hati A. 2019. Impact of some new generation insecticides on soil arthropods in rice maize cropping system. *The Journal of Basic and Applied Zoology* 80(6). <https://doi.org/10.1186/s41936-019-0077-3>
- Hahn M. 2014. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal of Chemical Biology* 7(4):133-141. <https://doi.org/10.1007/s12154-014-0113-1>
- Hernández-Morales J, Ochoa-Martínez DL, Ortega-Acosta, SÁ and 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: 263-270. <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0206-9>
- Köhl J, Kolnaar R and Ravensberg WJ. 2019. Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. *Frontiers in Plant Science* 10:845. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>
- Manju MJ, Sadananda M, Santhosh HM, Roopa S, Patil TH, Shankarappa VI, Benagi and Idicula P. 2019. Evaluation of different fungi toxicants against *Corynespora cassiicola* causing *Corynespora* Leaf Fall (CLF) disease of rubber [*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.,] *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 8(2): 1640-1647. <https://doi.org/10.20546/ijemas.2019.802.193>
- Medina-De la Rosa G, López-Reyes L, Carcaño-Montiel MG, López-Olguín JH, Hernández-Espinosa MA and Rivera-Tapia JA. 2016. Rhizosphere bacteria of maize with chitinolytic activity and its potential in the control of phytopathogenic fungi. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 49 (12): 310-321. <https://doi.org/10.1080/03235408.2016.1201345>
- Mustafa S, Kabir S, Shabbir U and Batoool R. 2019. Plant growth promoting rhizobacteria in sustainable agriculture: from theoretical to pragmatic approach. *Symbiosis* 78: 115-123. <https://doi.org/10.1007/s13199-019-00602-w>
- Nghia NA, Kadir J, Sunderasan E, Puad AM, Malik A and Napis S. 2008. Morphological and inter simple sequence repeat (ISSR) markers analyses of *Corynespora cassiicola* isolates from rubber plantations in Malaysia. *Mycopathologia* 166: 189-201. <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9138-8>
- Ortega-Acosta SÁ, Mora-Aguilera JA, Velasco-Cruz C, Ochoa-Martínez DL, Leyva-Mir SG and Hernández-Morales J. 2020a. Temporal progress of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) leaf and calyx spot disease (*Corynespora cassiicola*) in Guerrero, Mexico. *Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00550-1>
- Ortega-Acosta SA, Ochoa-Martínez DL, Hernández-Morales J and Palemón-Alberto F. 2020b. Morphological and genetic characterization of *Corynespora cassiicola* isolates obtained from roselle and associated weeds. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(1): 62-78. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1909-2>
- 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(3): 270-285. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1606-6>
- Ortega-Acosta SA, Ochoa-Martínez DL, Leyva-Mir SG, Velasco-Cruz C, Mora-Aguilera JA y 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, Hernández-Morales L, Ochoa-Martínez D 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>
- Petatán-Sagahón I, Anducho-Reyes MA, Silva-Rojas HV, Arana-Cuenca A, Tellez-Jurado A, Cárdenas-Álvarez IO and Mercado-Flores Y. 2011. Isolation of bacteria with antifungal activity against the phytopathogenic fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. *International Journal of Molecular Sciences* 12(9): 5522-5537. <https://doi.org/10.3390/ijms12095522>
- Qi Y-X, Zhang X, J-J P, Liu X-M, Lu Y, Zhang H, Hui-Qiang Z, YanChao L and Yi-Xian X. 2011. Morphological and molecular analysis of genetic variability within isolates of *Corynespora cassiicola* from different hosts. *European Journal of Plant Pathology* 130:83-95. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9734-6>
- Rahman MZ, Khanam H, Ueno M, Kihara J, Honda Y and Arase S. 2010. Suppression by red light irradiation of *Corynespora* leaf spot of cucumber caused by *Corynespora cassiicola*. *Journal of Phytopathology* 158: 378-381. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01632.x>
- Romeiro RS, Lana R, Macagnan D, Garcia F and Silva H. 2010. Evidence that the biocontrol agent *Bacillus cereus* synthesizes protein that can elicit increased resistance of tomato leaves to *Corynespora cassiicola*. *Tropical Plant Pathology* 35(1): 011-015. <https://doi.org/10.1590/s1982-56762010000100002>
- Sabu R, Aswani R, Jishma P, Jasim B, Mathew J and Radhakrishnan EK. 2017. Plant growth promoting endophytic *Serratia* sp. ZoB14 protecting ginger from fungal pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s40011-017-0936-y>
- Shekhar S, Sundaramanickam A and Balasubramanian T. 2015. Biosurfactant producing microbes and their potential applications: a review. *Critical Review in Environmental Science and Technology* 45:1522-1554. <https://doi.org/10.1080/10643389.2014.955631>
- SIAP. 2018. Estadística de Producción Agrícola. Sistema de Información Agrícola y Pesquera. [http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos\\_a.php](http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos_a.php)
- Trotel-Aziz P, Couderchet M, Biagianti S and Aziz A. 2008. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. Mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environmental and Experimental Botany* 64: 21-32. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.12.009>
- Vargas-Jordá L, Vila A, Lanza A, Bonvehí P, Nazar J, Mikietuk A, Labat R y Smayevsky J. 2005. Utilidad del sistema VITEK en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 39 (1): 19-25.

- Vawdrey LL, Grice KRE and Westerhuis D. 2008. Field and laboratory evaluations of fungicides for the control of brown spot (*Corynespora cassiicola*) and black spot (*Asperisporium caricae*) of papaya in far north Queensland, Australia. *Australasian Plant Pathology* 37: 552-558. <https://doi.org/10.1071/AP08055>
- Villanueva-Couoh E, Sánchez-Briceño MA, Cristóbal-Alejo J, Ruiz-Sánchez E y Tún-Suárez J M. 2005. Diagnóstico y alternativas de manejo químico del tizón foliar (*Alternaria chrysanthemi* Simmons y Crosier) del crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) kitamura en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23(1): 49-56. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61223107.pdf>
- Weber RWS and Hahn M. 2019. Grey mould disease of strawberry in northern Germany: causal agents, fungicide resistance and management strategies. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103(4):1589-1597. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09590-1>
- Zhu J, Zhang L, Li T, Ma D, Gao Y, Mu W and Liu F. 2020. Baseline sensitivity of *Corynespora cassiicola* to metconazole and efficacy of this fungicide. *Crop Protection* 130: 105056. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.105056>