

# Morphological and genetic characterization of *Corynespora cassiicola* isolates obtained from roselle and associated weeds

## Caracterización morfológica y genética de aislados de *Corynespora cassiicola* obtenidos de jamaica y malezas asociadas

**Santo Ángel Ortega-Acosta**, <sup>1</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Universidad Autónoma de Guerrero, Periférico Poniente s/n. CP 40020. Iguala de la Independencia, Guerrero, México; **Daniel Leobardo Ochoa-Martínez\***, **Javier Hernández-Morales** Posgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Carretera México-Texcoco Km 36.5, Montecillo, CP 56230, Texcoco, Estado de México, México; <sup>1</sup>**Francisco Palemón-Alberto**. \*Autor para correspondencia: ldaniel@colpos.mx

**Recibido:** 27 de Septiembre, 2019.

**Aceptado:** 04 de Diciembre, 2019.

Ortega-Acosta SA, Ochoa-Martínez DL, Hernández-Morales J and Palemón-Alberto F. 2020. Morphological and genetic characterization of *Corynespora cassiicola* isolates obtained from roselle and associated weeds. Mexican Journal of Phytopathology 38(1).  
**DOI:** 10.18781/R.MEX.FIT.1909-2

Primera publicación DOI: 10 de Diciembre, 2019.  
First DOI publication: December 10, 2019.

**Resumen.** Se analizaron morfológica y filogenéticamente diferentes aislados de *Corynespora cassiicola* obtenidos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y nueve malezas asociadas al cultivo. Los aislados fúngicos se dividieron en dos grupos: el grupo uno incluyó 37 aislados obtenidos de *H. sabdariffa* y ocho obtenidos de otros hospedantes como *Solanum lycopersicum*, *Chromolaena odorata*, *Senna alata*, *Eugenia oerstediana*, *Passiflora viridiflora*, *Momordica charantia*, *Ricinus communis* y

**Abstract.** Several *Corynespora cassiicola* isolates obtained from roselle (*Hibiscus sabdariffa*) and nine associated weeds to this crop were morphological and phylogenetically analyzed. The fungal isolates were divided into two groups: group one included 37 isolates obtained from *H. sabdariffa* and eight obtained from other host plants including *Solanum lycopersicum*, *Chromolaena odorata*, *Senna alata*, *Eugenia oerstediana*, *Passiflora viridiflora*, *Momordica charantia*, *Ricinus communis* and *Gossypium hirsutum*; in this case, the predominant colonies were gray, dense texture and polygonal in shape. Group two included two isolates obtained from *H. sabdariffa* and one from *Hyptis suaveolens*; in this group the colonies were mainly cream and pale brown, dense and round. Comparative analysis with isolates of *C. cassiicola* from other countries showed that group one isolates were mainly associated with those isolated from the Solanaceae family, while those from group two were related to those of the

*Gossypium hirsutum*; en este caso, las colonias predominantes fueron de color gris, textura densa y forma poligonal. El grupo dos, incluyó a dos aislados obtenidos de *H. sabdariffa* y uno de *Hyptis suaveolens*; en este grupo, las colonias fueron principalmente de color crema y café pálido, densas y redondeadas. El análisis comparativo con aislados de *C. cassiicola* de otros países mostró que los aislados del grupo uno referidos anteriormente se asociaron principalmente con aquellos aislados de la familia Solanaceae, mientras que los del grupo dos se relacionaron con los de la familia Cucurbitaceae. Para nuestro conocimiento este es el primer estudio sobre la caracterización morfológica y genética de *C. cassiicola* en México.

**Palabras clave:** *Hibiscus sabdariffa*, mancha foliar, análisis filogenético.

*Corynespora cassiicola* es un hongo fitopatógeno que causa manchas foliares en cultivos de importancia económica como calabacita (*Cucurbita pepo*), pepino (*Cucumis sativus*), soya (*Glycine max*), árbol del hule (*Hevea brasiliensis*), papaya (*Carica papaya*) y tomate (*Solanum lycopersicum*), entre otros (Silva *et al.*, 2003; Dixon *et al.*, 2009; Qi *et al.* 2011; Paz *et al.*, 2018). Además de hojas, este patógeno puede infectar otros órganos como tallos, raíces, flores y frutos (Deon *et al.*, 2014); se encuentra distribuido ampliamente en zonas tropicales y sub-tropicales de diversos países (Dixon *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009).

En México, el cultivo de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) es de gran valor económico con una superficie anual cultivada de 20,061 ha localizadas principalmente en el estado de Guerrero donde se produce más del 70% de cálices deshidratados (SIAP, 2016). En esta entidad, el manchado de hojas y cálices de la jamaica causado por *C. cassiicola*,

Cucurbitaceae family. To our knowledge, this is the first study on the morphological and genetic characterization of *C. cassiicola* in Mexico.

**Key words:** *Hibiscus sabdariffa*, leaf spot, phylogenetic analysis.

*Corynespora cassiicola* is a plant pathogenic fungus that causes foliar spots in economically important crops such as squash (*Cucurbita pepo*), cucumber (*Cucumis sativus*), soybean (*Glycine max*), rubber tree (*Hevea brasiliensis*), papaya (*Carica papaya*) and tomato (*Solanum lycopersicum*), among others (Silva *et al.*, 2003; Dixon *et al.*, 2009; Qi *et al.* 2011; Paz *et al.*, 2018). In addition to leaves, the pathogen infects other plant organs, including stems, roots, flowers and fruits (Deon *et al.*, 2014); it is widely distributed in tropical and subtropical regions of many countries (Dixon *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009).

In Mexico, roselle (*Hibiscus sabdariffa*) is a crop of great economic value with an annual area sown of 20,061 ha, mainly in the state of Guerrero, where over than 70% of dehydrated calyxes are produced (SIAP, 2016). In this state, roselle leaf and calix spots caused by *C. cassiicola* have become the most important crop disease in the last years (Ortega *et al.*, 2015; Hernández *et al.*, 2018).

The genetic characterization of *C. cassiicola* has been evaluated using different techniques, including RAPD, ISSR, AFLP, iPBS and phylogeny (Silva *et al.*, 2003; Dixon *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2011; Deon *et al.*, 2014; Oktavia *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2019). In the case of phylogeny, partial regions of the  $\beta$ -tubulin gene, 1- $\alpha$  elongation factor (EF-1 $\alpha$ ), calmodulin and actin have been amplified, as well as internal transcribed spacers (Shimomoto *et al.*, 2011; Oktavia *et al.*, 2017). The analysis of variability of the fungus has been used in ecological

se ha convertido en la enfermedad más importante del cultivo durante los últimos años (Ortega *et al.*, 2015; Hernández *et al.*, 2018).

La caracterización genética de *C. cassiicola* se ha estudiado con técnicas como RAPDs, ISSR, AFLP, iPBS y filogenia (Silva *et al.*, 2003; Dixon *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2011; Deon *et al.*, 2014; Oktavia *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2019). En este último caso, se han amplificado regiones parciales de los genes  $\beta$ -tubulina, factor de elongación 1- $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), calmodulina y actina, además de los espaciadores transcritos internos (Shimomoto *et al.*, 2011; Oktavia *et al.*, 2017). El análisis de la variabilidad de este hongo se ha utilizado en estudios ecológicos, epidemiológicos, así como para el desarrollo de estrategias de manejo (Qi *et al.*, 2011; Oktavia *et al.*, 2017; Sumabat *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018). En México no hay trabajos relacionados con la caracterización de este hongo, por lo que la presente investigación tuvo como objetivo caracterizar morfológica y genéticamente aislados de *C. cassiicola* obtenidos de hojas y cálices de jamaica y malezas asociadas al cultivo en el estado de Guerrero.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Aislamiento de hongos.** Durante el período de 2013 a 2015, se recolectaron cálices y hojas de jamaica así como hojas de malezas asociadas al cultivo con síntomas de lesiones necróticas en diferentes localidades del estado de Guerrero. En laboratorio se sembraron secciones de tejido foliar de la zona de avance de las lesiones (previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1%) en cajas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA). Las colonias obtenidas se purificaron mediante la técnica de cultivo monospórico.

and epidemiological studies and for developing management strategies (Qi *et al.*, 2011; Oktavia *et al.*, 2017; Sumabat *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018). Since there are no studies about the characterization of this fungus in Mexico, the objective of this study was to characterize morphological and genetically several *C. cassiicola* isolates obtained from roselle leaves and calyxes, as well as weeds associated with the crop in the state of Guerrero.

## MATERIALS AND METHODS

**Fungi isolation.** From 2013 to 2015, roselle leaves and calyxes, as well as leaves of weeds associated with the crop showing necrotic lesions, were collected in different sites of the state of Guerrero. Foliar tissue sections were taken from the area in which the lesion was growing, disinfested with 1% sodium hypochlorite and cultured on Petri dishes containing a potato-dextrose-agar (PDA) medium. The obtained colonies were purified using the monosporic culture technique.

**Morphology and growth rate of colonies.** Using 5-day-old monosporic cultures, fragments of 0.5 cm in diameter were taken from the edge of the colonies (Qi *et al.*, 2011), placed at the center of new Petri dishes with PDA and incubated at 28 °C (three replications per isolate) (Onesirosan *et al.*, 1974). The diameter of the colonies was measured every 24 h for five days considering the average length of two right-angle diameters (Qi *et al.*, 2011). Based on these data, the growth rate was calculated using the following formula: Growth rate =  $(D_f - D_i) / (T_f - T_i)$ , where:  $D_f$  = Final diameter of growth;  $D_i$  = Initial diameter of growth;  $T_f$  = Final time;  $T_i$  = Initial time.

**Morfología y tasa de crecimiento de la colonia.** A partir de cultivos monospóricos de 5 días de edad, se obtuvieron fragmentos del margen de las colonias de aproximadamente 0.5 cm de diámetro (Qi *et al.*, 2011), los cuales se sembraron en el centro de nuevas cajas Petri con PDA y se incubaron a 28 °C (tres repeticiones por aislado) (Onesirosan *et al.*, 1974). El diámetro de las colonias se midió cada 24 h durante cinco días considerando la longitud media de dos diámetros en ángulo recto (Qi *et al.*, 2011). Con estos datos se calculó la tasa de crecimiento con la siguiente fórmula: Velocidad de crecimiento =  $(Df-Di)/(Tf-Ti)$ , donde: Df= Diámetro final de crecimiento, Di= Diámetro inicial de crecimiento, Tf=Tiempo final y Ti= Tiempo inicial.

**Morfología de conidios.** Con una cámara AmScope® MU 1000 fijada a un microscopio óptico Eclipse Ci (Nikon®, Japón), se obtuvieron imágenes digitales de los conidios obtenidos de cada aislado monospórico de cinco días de edad. Se midieron 50 conidios (largo x ancho) y se registraron sus formas. Las mediciones se hicieron con una reglilla micrométrica con la cual se calibró el analizador de imágenes ImageTool® v3.0. (Hernández *et al.*, 2005). Los datos de tasa de crecimiento, tamaño y morfología de conidios se tabularon y sometieron a un análisis de varianza y separación de medias (Duncan,  $\alpha=0.01$ ) en el programa SAS ver. 9.4.

**Extracción de DNA, amplificación por PCR y secuenciación.** Se realizó con el protocolo descrito por Sambrook y Rusell (2001) a partir del micelio de colonias monospóricas de 12 días de edad mantenidas a 28 °C en cajas Petri con PDA. Se amplificó un segmento del gen EF-1 $\alpha$  con los iniciadores EF1-728F/EF1-986R (Carbone y Kohn, 1999). La mezcla de reacción de PCR consistió en 2  $\mu$ L de buffer de PCR 1X, 0.6  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 2.0  $\mu$ M, 0.2  $\mu$ L de dNTP's 0.2 mM, 0.6  $\mu$ L de cada uno de los ini-

**Morphology of conidia.** Digital images of conidia obtained from each 5-day-old monosporic isolate were taken using an AmScope® MU 1000 camera attached to an Eclipse Ci optical microscope (Nikon®, Japan). The length and width of 50 conidia were measured, and their forms registered. Measurements were taken using a micrometric ruler with which the ImageTool® v3.0 image analyzer was calibrated. (Hernández *et al.*, 2005). Data on conidia growth rate, size and morphology were tabulated and subjected to an analysis of variance and mean separation (Duncan,  $\alpha=0.01$ ) using SAS 9.4 version software.

**DNA extraction, PCR amplification and sequencing.** For this purpose, the protocol described by Sambrook and Rusell (2001) was followed, using mycelium from 12-day-old monosporic colonies that were kept at 28 °C on Petri dishes with PDA. A segment of the EF-1 $\alpha$  gene was amplified with EF1-728F/EF1-986R primers (Carbone and Kohn, 1999). The PCR reaction mixture was prepared with 2  $\mu$ L of IX PCR buffer, 0.6  $\mu$ L of MgCl<sub>2</sub> 2.0  $\mu$ M, 0.2  $\mu$ L of dNTP's 0.2 mM, 0.6  $\mu$ L of each primer (10  $\mu$ M), 0.1  $\mu$ L of Taq DNA polymerase 0.5 U (Promega®, USA) and 10 ng of DNA extracted from the fungus. The final mixture was adjusted by adding sterile ultra-pure water at a 10  $\mu$ L final volume and amplified in a thermocycler (Techne-TC-512®, USA), according to the program described by Shimomoto *et al.* (2011). The obtained amplicons were purified with Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®, USA) and sequenced in both directions in Macrogen Inc®.

**Phylogenetic analysis.** The sequences obtained from each isolate were edited and aligned using the SeqMan Pro module of the DNASTAR LaserGene® program to generate a consensus sequence.

ciadores (10 µM), 0.1 µL de Taq DNA polimerasa 0.5 U (Promega®, EE.UU.) y 10 ng del DNA extraído del hongo. La mezcla final se ajustó con agua ultra-pura estéril a un volumen final de 10 µL, y se amplificó en un termociclador (Techne-TC-512®, EE.UU.) con el programa descrito por Shimomoto *et al.* (2011). Los amplicones obtenidos se purificaron con Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®, EE.UU.) y se secuenciaron en ambas direcciones en Macrogen Inc®.

**Análisis filogenético.** Las secuencias obtenidas de cada aislado se editaron y alinearon para obtener una secuencia consenso con el módulo SeqMan Pro del programa DNASTAR LaserGene®. El árbol filogenético se realizó con el método Neighbour-joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987) usando las distancias genéticas calculadas con el modelo de dos parámetros (Kimura, 1980) con el programa MEGA versión 7.0. Para la reconstrucción del árbol filogenético, se utilizó como organismo fuera de grupo la secuencia parcial disponible en el GenBank del gen EF-1α de *Corynespora smithii* (No. de acceso AB539437). Las secuencias obtenidas de los aislados de *C. cassiicola* en estudio se depositaron en el GenBank con los números de acceso MF000841-MF000888 y se compararon con otras secuencias disponibles para esta especie (AB539285, AB539271, AB539291, AB539301, AB539235, AB539260, KY082897, KY290565, KP735616, KP834309, KP834310, AB539270, AB539283 y AB539269).

## RESULTADOS

En total se obtuvieron 48 aislados de *C. cassiicola*, 39 de plantas de jamaica y nueve de malezas asociadas a este cultivo, distribuidas en cuatro municipios y 15 localidades del estado de Guerrero (Cuadro 1).

The phylogenetic tree was built following the Neighbour-joining (NJ) method (Saitou and Nei, 1987), using the genetic distances that were calculated according to the two-parameter model (Kimura, 1980) with the MEGA version 7.0 program. To re-construct the phylogenetic tree, the partial sequence of the EF-1α gene of *Corynespora smithii* available in the GenBank (Access number AB539437) was used as an organism external to the group. The sequences obtained from *C. cassiicola* isolates in this study were deposited in the GenBank with access numbers MF000841-MF000888, and compared to other sequences available for this species (AB539285, AB539271, AB539291, AB539301, AB539235, AB539260, KY082897, KY290565, KP735616, KP834309, KP834310, AB539270, AB539283 and AB539269).

## RESULTS

A total of 48 *C. cassiicola* isolates were obtained, 39 of roselle plants and 9 of weeds associated with the crop distributed in 4 municipalities and 15 sites across the state of Guerrero (Table 1).

### **Morphology and growth rate of the colonies.**

The colonies grown in PDA had uniform growth, developed an abundant aerial mycelium, and their morphology showed variation among isolates (Figure 1). The front side of the colonies was white, gray or green in color, while the center was white, brown, light brown, gray or dark gray. The texture in the front side varied from thin to thick, and the growth form from round to polygonal (Table 2). The average grown rates and size of the colonies showed significant differences among isolates (Table 3). The CC33GRO isolate had the highest growth rate with 0.67 centimeter/day (cm/d), and the greatest average diameter (5.07 cm) compared to those of CC07GRO and CC36GRO isolates,



**Cuadro 1.** Aislados de *Corynespora cassiicola* obtenidos de plantas de jamaica y malezas asociadas al cultivo en el estado de Guerrero, México.

**Table 1.** *Corynespora cassiicola* isolates obtained from roselle plants and weeds associated with the crop in the state of Guerrero, Mexico.

Municipio	Aislado	Hospedante	Familia	Tejido
Tecoanapa	CC1GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Hoja
Tecoanapa	CC3GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Hoja
Tecoanapa	CC4GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Hoja
Tecoanapa	CC5GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Hoja
Tecoanapa	CC6GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Cáliz
Tecoanapa	CC7GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Cáliz
Tecoanapa	CC9GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Cáliz
Tecoanapa	CC10GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Hoja
Tecoanapa	CC11GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Hoja
Tecoanapa	CC12GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Hoja
Tecoanapa	CC13GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Hoja
Tecoanapa	CC14GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Hoja
Tecoanapa	CC15GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Hoja
Tecoanapa	CC16GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Hoja
Tecoanapa	CC17GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Hoja
Tecoanapa	CC18GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Hoja
Tecoanapa	CC19GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Hoja
Ayutla	CC21GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Hoja
Tecoanapa	CC22GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Cáliz
Ayutla	CC26GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Hoja
Ayutla	CC27GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Hoja
Ayutla	CC29GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Cáliz
Ayutla	CC30GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Hoja
Ayutla	CC32GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Cáliz
Ayutla	CC33GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Hoja
Ayutla	CC34GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Hoja
Ayutla	CC36GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Hoja
Ayutla	CC38GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Hoja
Ayutla	CC40GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Cáliz
San Marcos	CC42GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Cáliz
Xochistlahuaca	CC43GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Cáliz
Tecoanapa	CC44GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Cáliz
Tecoanapa	CC45GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Cáliz
Tecoanapa	CC46GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Cáliz
Tecoanapa	CC47GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Cáliz
Tecoanapa	CC48GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Cáliz
Tecoanapa	CC49GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Cáliz
Ayutla	CC50GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Cáliz
Ayutla	CC51GRO	<i>H. sabdariffa</i>	Malvaceae	Hoja
Ayutla	JIT	<i>Solanum lycopersicum</i>	Solanaceae	Hoja
Tecoanapa	M26	<i>Chromolaena odorata</i>	Asteraceae	Hoja
Tecoanapa	GUG	<i>Senna alata</i>	Fabaceae	Hoja
Ayutla	CHI	<i>Hyptis suaveolens</i>	Lamiaceae	Hoja
Tecoanapa	CAP	<i>Eugenia oerstediana</i>	Myrtaceae	Hoja
Ayutla	PAS	<i>Passiflora viridiflora</i>	Passifloraceae	Hoja
Tecoanapa	MAT	<i>Momordica charantia</i>	Cucurbitaceae	Hoja
Tecoanapa	HGA	<i>Ricinus communis</i>	Euphorbeaceae	Hoja
Ayutla	ALG	<i>Gossypium hirsutum</i>	Malvaceae	Hoja

**Morfología y tasa de crecimiento de la colonia.** Las colonias desarrolladas en PDA tuvieron crecimiento uniforme, abundante micelio aéreo y su morfología mostró variación entre los aislados (Figura 1). La coloración de la parte frontal de las colonias fue blanca, gris o verde y el centro de las mismas fue blanca, café, café claro, café oscuro, gris o gris oscuro. La textura observada desde la parte frontal fue de ligera a gruesa y la forma de crecimiento de las colonias fue de redonda a poligonal (Cuadro 2). Las tasas de crecimiento promedio y el tamaño de las colonias mostraron diferencias significativas entre los aislados (Cuadro 3). En el aislado CC33GRO se registró la mayor tasa de crecimiento con 0.67 centímetro/día (cm/d), así como el mayor diámetro promedio (5.07 cm) con respecto de los aislados CC07GRO y CC36GRO que tuvieron la menor tasa de crecimiento y diámetro promedio de colonia (Cuadro 3).

**Morfología de conidios.** Se observó un alto grado de diferencia morfológica de conidios entre los diferentes aislados analizados. Las formas de los conidios observados fueron: ovales, obclavadas y cilíndricas con contornos rectos o curvos (Cuadro 3, Figuras 2, 4 y 5). El tamaño promedio máximo y mínimo varió de 8.4-305.4  $\mu\text{m}$  x 2.9-23.0  $\mu\text{m}$  (largo x ancho, respectivamente); el número de pseudoseptos fue de 0 a 15. Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre aislados (Cuadro 3). Predominaron las formas de conidios cilíndricas (73%) seguidas de las obclavadas (24.75%) y ovales (2.25%) (Figura 5). El aislado CC9GRO presentó el mayor tamaño promedio de conidio (111.68  $\mu\text{m}$ ), mientras que el promedio más ancho correspondió al aislado CC17 (8.38  $\mu\text{m}$ ). La menor longitud promedio se observó en los aislados CC21GRO y CC50GRO (28.31  $\mu\text{m}$  y 28.39  $\mu\text{m}$ , respectivamente) y los conidios menos anchos en promedio fueron los del aislado JIT (5.12  $\mu\text{m}$ ). El

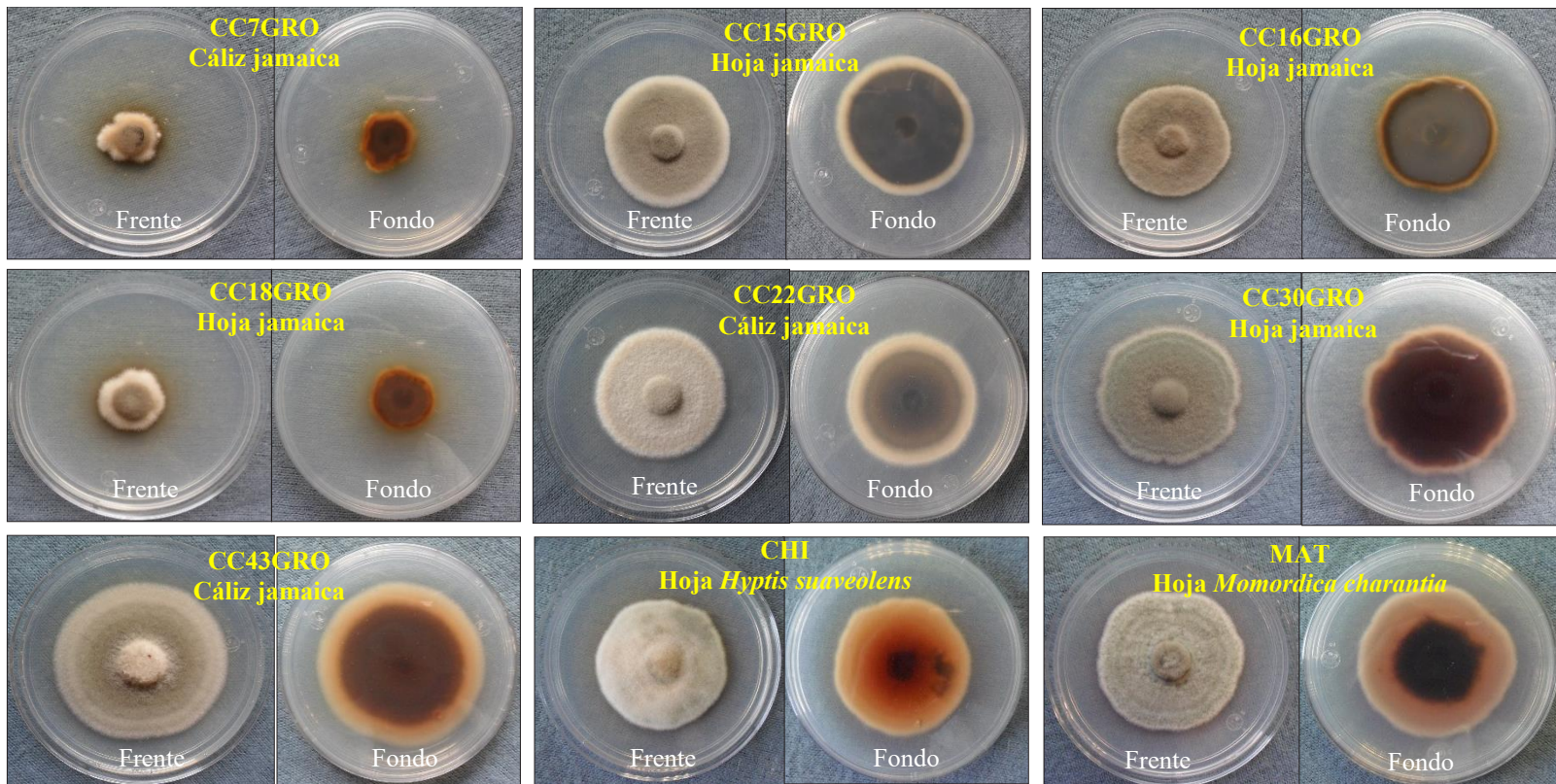
which had the lowest growth rate and lowest average diameter of colony (Table 3).

**Morphology of conidia.** A significant level of morphological difference was observed in conidia of the different isolates that were analyzed. The observed forms of conidia were oval, obclavate and cylindrical with straight or curve contours (Table 3, Figures 2, 4 and 5). The maximum and minimum average size ranged from 8.4-305.4  $\mu\text{m}$  x 2.9-23.0  $\mu\text{m}$  (length x width, respectively); the number of pseudosepta was 0 to 15. Significant statistical differences among isolates (Table 3) were found. Conidia with cylindrical form prevailed (73%) followed by obclavate (24.75%) and oval conidia (2.25%) (Figure 5). The CC9GRO isolate had the greatest mean conidial size (111.68  $\mu\text{m}$ ), while the CC17 (8.38  $\mu\text{m}$ ) had the highest average width. The smallest average length was observed in CC21GRO and CC50GRO isolates (28.31  $\mu\text{m}$  and 28.39  $\mu\text{m}$ , respectively) and the JIT isolate had the conidia with the lowest average width (5.12  $\mu\text{m}$ ). The CAP isolate had the greatest average number of pseudosepta (5 pseudosepta), and PAS had the lowest average number of pseudosepta (0.62) (Table 3).

**Phylogenetic analysis.** The 48 *C. cassicola* isolates used in this study were divided into two groups: group 1 formed by 37 isolates obtained from roselle, and 8 isolates from weeds associated with the crop; group 2 formed by 2 isolates obtained from roselle and 1 from weed associated with the crop (Figure 3).

## DISCUSSION

Among the different *C. cassicola* isolates that were analyzed, a significant level of differences



**Figura 1.** Diversidad morfológica de aislados de *Corynespora cassiicola* obtenidos de plantas de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y malezas asociadas al cultivo.  
**Figure 1.** Morphological diversity of *Corynespora cassiicola* isolates obtained from roselle plants (*Hibiscus sabdariffa*) and weeds associated with the crop.



**Cuadro 2.** Color, textura, forma, tasa de crecimiento y tamaño de colonias de *Corynespora cassiicola* aislados de jamaica y malezas asociadas al cultivo después de cinco días de incubación.

**Tabla 2.** Color, texture, form, growth rate and size of colonies of *Corynespora cassiicola* isolated from roselle and weeds associated with the crop five days after incubation.

Aislado	Color				Tasa de crecimiento (cm/d) <sup>†</sup>	Tamaño (cm) <sup>†</sup>
	Parte Superior	Fondo	Textura	Forma	Promedio±SE	Promedio±SE
CC1GRO	Gris	Negro	Densa	Polígono	0.40 <sup>hijk</sup> ±0.03	3.45 <sup>hijkl</sup> ±0.15
CC3GRO	Café pálido	Gris claro	Densa	Redonda	0.45 <sup>cdefghij</sup> ±0.06	3.93 <sup>defghi</sup> ±0.37
CC4GRO	Gris	Café pálido	Ligera	Polígono	0.34 <sup>klm</sup> ±0.01	3.38 <sup>hijkl</sup> ±0.03
CC5GRO	Café pálido	Blanca	Densa	Redonda	0.58 <sup>abdef</sup> ±0.03	4.68 <sup>abcd</sup> ±0.11
CC6GRO	Gris	Gris oscuro	Ligera	Polígono	0.43 <sup>fghijk</sup> ±0.03	3.60 <sup>fghijk</sup> ±0.13
CC7GRO	Café claro	Café oscuro	Ligera	Polígono	0.10 <sup>o</sup> ±0.02	1.88 <sup>op</sup> ±0.09
CC9GRO	Gris	Café pálido	Densa	Polígono	0.31 <sup>iklm</sup> ±0.02	2.90 <sup>klm</sup> ±0.06
CC10GRO	Verde	Gris	Densa	Polígono	0.31 <sup>iklm</sup> ±0.03	3.18 <sup>ijkl</sup> ±0.11
CC11GRO	Gris	Gris	Ligera	Polígono	0.34 <sup>klm</sup> ±0.01	3.10 <sup>ijklm</sup> ±0.05
CC12GRO	Crema	Gris	Densa	Redonda	0.52 <sup>abdefgh</sup> ±0.06	3.92 <sup>fghi</sup> ±0.26
CC13GRO	Naranja ligero	Café pálido	Densa	Polígono	0.22 <sup>lmno</sup> ±0.00	2.57 <sup>mno</sup> ±0.03
CC14GRO	Gris	Gris	Ligera	Polígono	0.29 <sup>klmn</sup> ±0.06	2.83 <sup>lmn</sup> ±0.19
CC15GRO	Gris	Oscuro	Ligera	Redonda	0.62 <sup>ab</sup> ±0.02	4.28 <sup>bdefg</sup> ±0.07
CC16GRO	Crema	Gris	Ligera	Polígono	0.44 <sup>defghijk</sup> ±0.02	3.70 <sup>fghij</sup> ±0.10
CC17GRO	Gris	Gris	Ligera	Polígono	0.29 <sup>klmn</sup> ±0.01	2.55 <sup>mno</sup> ±0.03
CC18GRO	Gris	Café pálido	Ligera	Polígono	0.19 <sup>mno</sup> ±0.01	2.15 <sup>nop</sup> ±0.05
CC19GRO	Gris claro	Gris	Ligera	Redonda	0.44 <sup>defghijk</sup> ±0.01	3.67 <sup>fghij</sup> ±0.04
CC21GRO	Gris	Gris	Ligera	Redonda	0.59 <sup>abced</sup> ±0.02	4.43 <sup>abced</sup> ±0.02
CC22GRO	Crema	Gris	Densa	Redonda	0.55 <sup>abdefgh</sup> ±0.01	4.43 <sup>abced</sup> ±0.01
CC26GRO	Gris	Oscuro	Densa	Polígono	0.23 <sup>lmno</sup> ±0.01	2.53 <sup>mno</sup> ±0.07
CC27GRO	Gris	Café oscuro	Densa	Polígono	0.22 <sup>lmno</sup> ±0.03	2.48 <sup>mno</sup> ±0.20
CC29GRO	Verde	Negro	Densa	Polígono	0.42 <sup>fghijk</sup> ±0.01	3.97 <sup>defgh</sup> ±0.02
CC30GRO	Verde	Café oscuro	Densa	Polígono	0.53 <sup>abdefgh</sup> ±0.02	4.33 <sup>abdefg</sup> ±0.09
CC32GRO	Gris claro	Gris	Densa	Redonda	0.57 <sup>abdefg</sup> ±0.04	4.43 <sup>abced</sup> ±0.15
CC33GRO	Gris	Negro	Densa	Redonda	0.67 <sup>a</sup> ±0.02	5.07 <sup>a</sup> ±0.04
CC34GRO	Gris	Gris oscuro	Densa	Redonda	0.54 <sup>abdefgh</sup> ±0.03	4.25 <sup>bdefg</sup> ±0.15
CC36GRO	Gris	Café oscuro	Densa	Polígono	0.13 <sup>o</sup> ±0.01	1.73 <sup>p</sup> ±0.06
CC38GRO	Gris	Gris	Ligera	Polígono	0.36 <sup>ijkl</sup> ±0.03	3.17 <sup>ijklm</sup> ±0.09
CC40GRO	Naranja ligero	Café pálido	Densa	Polígono	0.40 <sup>hijk</sup> ±0.05	3.57 <sup>ghijkl</sup> ±0.22
CC42GRO	Gris	Gris	Ligera	Redonda	0.59 <sup>abcd</sup> ±0.02	4.35 <sup>abcedf</sup> ±0.12
CC43GRO	Crema	Naranja ligero	Densa	Redonda	0.62 <sup>ab</sup> ±0.05	4.97 <sup>ab</sup> ±0.24
CC44GRO	Crema	Café oscuro	Ligera	Polígono	0.24 <sup>lmn</sup> ±0.01	2.88 <sup>klm</sup> ±0.03
CC45GRO	Café pálido	Café claro	Ligera	Polígono	0.15 <sup>no</sup> ±0.00	1.87 <sup>op</sup> ±0.02
CC46GRO	Gris	Gris	Ligera	Redonda	0.53 <sup>abdefgh</sup> ±0.04	3.95 <sup>defgh</sup> ±0.28
CC47GRO	Crema	Gris Claro	Densa	Polígono	0.50 <sup>bdefghi</sup> ±0.05	3.98 <sup>defgh</sup> ±0.22
CC48GRO	Crema	Gris	Densa	Redondo	0.42 <sup>ghijk</sup> ±0.05	3.78 <sup>efghij</sup> ±0.26
CC49GRO	Gris	Crema	Densa	Redonda	0.45 <sup>cdefghij</sup> ±0.07	3.85 <sup>efghij</sup> ±0.33
CC50GRO	Crema	Crema	Densa	Redonda	0.45 <sup>defghijk</sup> ±0.02	3.93 <sup>defghi</sup> ±0.10
CC51GRO	Gris	Negro	Densa	Redonda	0.46 <sup>cdefghij</sup> ±0.05	3.83 <sup>efghij</sup> ±0.22
JIT	Gris	Crema	Ligera	Polígono	0.42 <sup>ghijk</sup> ±0.02	3.57 <sup>ghijkl</sup> ±0.07
M26	Gris	Café pálido	Ligera	Polígono	0.41 <sup>ghijk</sup> ±0.02	3.37 <sup>hijkl</sup> ±0.11
GUG	Gris	Café pálido	Densa	Redonda	0.65 <sup>ab</sup> ±0.01	4.83 <sup>abc</sup> ±0.17
CHI	Gris	Café pálido	Densa	Redonda	0.61 <sup>ab</sup> ±0.10	4.75 <sup>abc</sup> ±0.51
CAP	Gris claro	Gris	Ligera	Redonda	0.53 <sup>abdefgh</sup> ±0.05	4.10 <sup>defgh</sup> ±0.20
PAS	Verde	Café pálido	Densa	Redonda	0.53 <sup>abdefgh</sup> ±0.00	4.35 <sup>abdefg</sup> ±0.03
MAT	Gris	Café pálido	Densa	Polígono	0.55 <sup>abdefgh</sup> ±0.05	4.25 <sup>bdefg</sup> ±0.28
HGA	Naranja ligero	Café pálido	Densa	Polígono	0.32 <sup>iklm</sup> ±0.02	3.10 <sup>ijklm</sup> ±0.10
ALG	Gris	Café claro	Densa	Polígono	0.43 <sup>efghijk</sup> ±0.03	3.82 <sup>efghij</sup> ±0.11

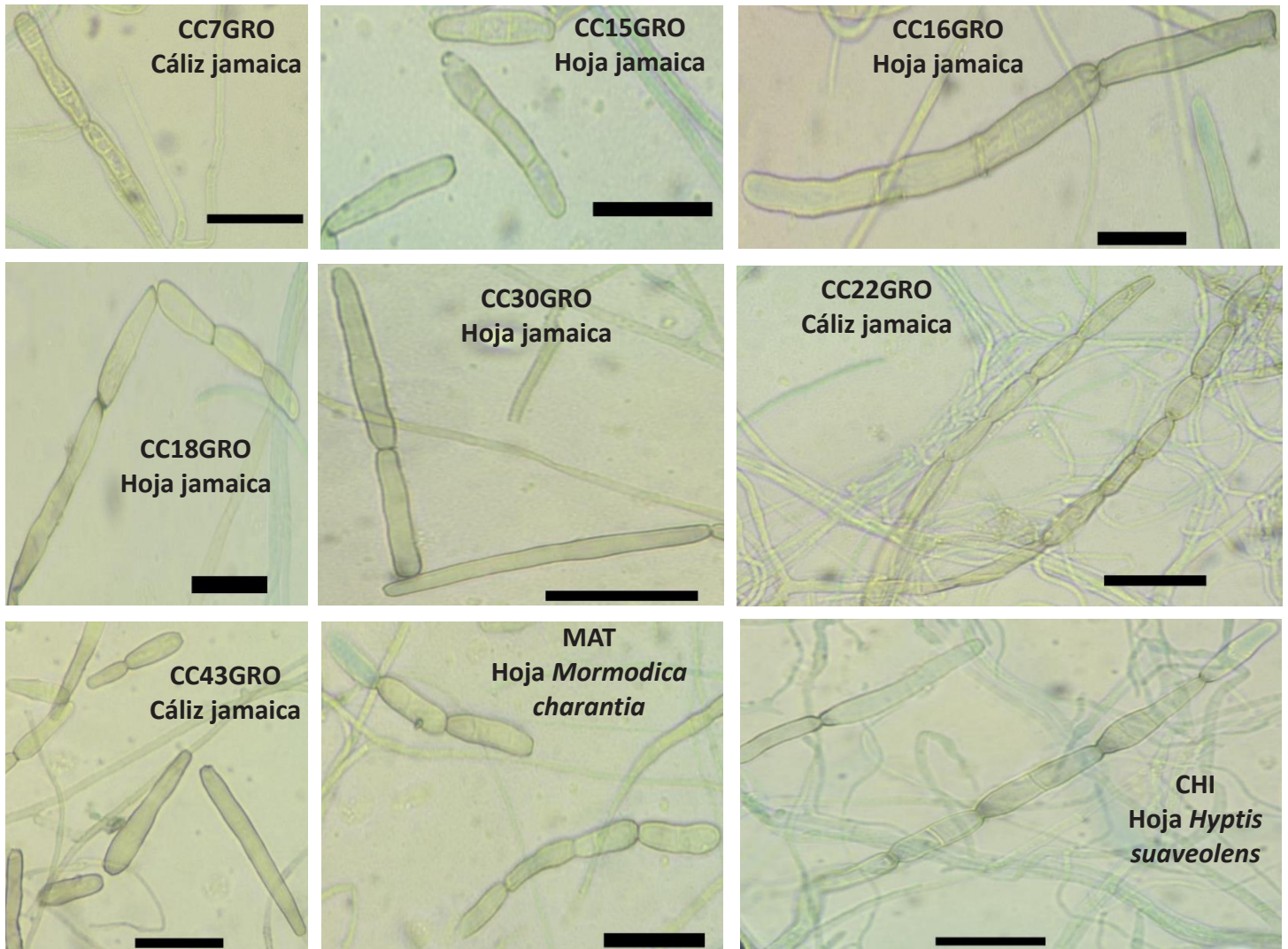
<sup>†</sup>Los datos son el promedio de tres repeticiones. Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes (P=0.01) basados en test de rango múltiple de Duncan / <sup>†</sup>Data are the average of three replications. Means with the same letter in the same column are not significantly different (P=0.01) based on Duncan's multiple range test.

**Cuadro 3.** Tamaño de conidios y número de pseudoseptos de *Corynespora cassiicola* aislados de jamaica y malezas asociadas al cultivo (promedio de 50 conidios/aislado).

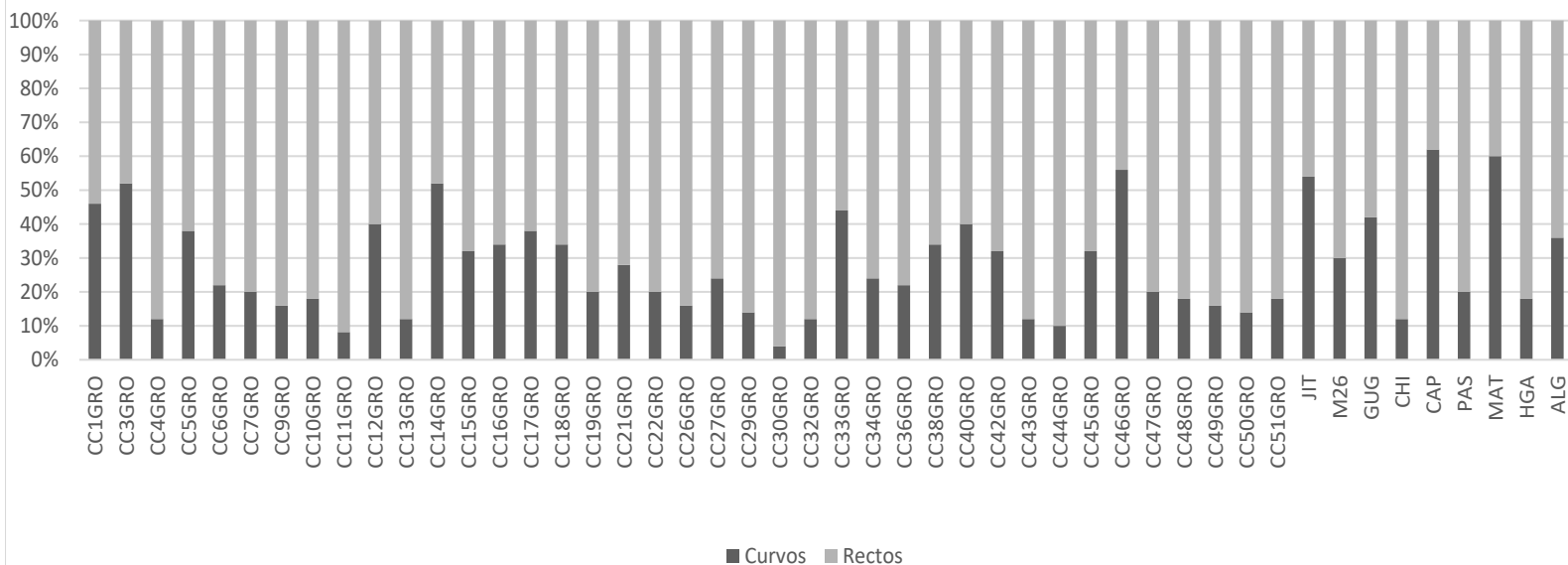
**Table 3.** Conidia size and number of pseudosepta of *Corynespora cassiicola* isolates from roselle and weeds associated with the crop (average of 50 conidia/isolate).

Aislado	Largo (um)			Ancho (um)			No. de pseudoseptos		
	Min	Max	Media <sup>¶</sup> ±ES	Min	Max	Media <sup>¶</sup> ±ES	Min	Max	Media <sup>¶</sup> ±ES
CC1GRO	12.96	139.71	47.89 hijklmnop±0.3	2.97	9.62	6.40 hijklm ±0.2	0	5	1.92 fghijklmn±0.2
CC3GRO	19.71	151.91	75.74 cd±4.58	4.05	9.69	6.58 fghij ±0.17	0	7	2.74 cdefgh±0.25
CC4GRO	16.76	124.75	54.78 efghijklm±3.09	5.06	12.02	7.91 ab ±0.21	0	8	2.7 cdefghi±0.27
CC5GRO	17.59	142.27	53.28 fghijklm±3.79	4.05	9.08	6.4 hijklmn± 0.16	1	7	2.54 cdefghi±0.21
CC6GRO	11.65	126.39	40.19 lmnopq±3.41	4.11	9.1	5.70 mnop ±0.15	0	5	1.78 ghijklmn±0.19
CC7GRO	20.1	117.21	48.22 hijklmnop±3.24	4.52	8.86	6.34 hijklmn ±0.15	0	7	2.68 cdefghi±0.27
CC9GRO	23.27	283.74	111.68 a±9.84	5.11	11.13	7.72 ab±0.22	0	6	2.84 cdefg±0.25
CC10GRO	12.28	178.22	48.04 hijklmnop±5.0	4.57	9.33	6.23 hijklmnop±0.17	0	9	1.98 efghijklm±0.31
CC11GRO	15.11	99.77	44.91 ijklmnopq±3.73	4.33	8.79	7.21 bcdefg±0.17	0	8	2.63 cdefghi±0.29
CC12GRO	17.78	110.43	41.62 klmnopq±2.33	4.35	9.1	6.56 fghijk±0.19	0	8	1.38 jklmno±0.21
CC13GRO	14.92	112.78	39.77 lmnopq±2.57	4.39	7.38	5.93 jklmno±0.08	0	6	1.6 ijklmno±0.21
CC14GRO	24.53	177.77	82.81 bc±5.22	5.07	9.24	7.35 bcde±0.15	0	7	2.9 cdefg±0.27
CC15GRO	9.41	61.66	33.30 opq±1.45	4.23	9.05	6.19 hijklmnop±0.15	0	4	1.18 klmno±0.16
CC16GRO	9.83	263.4	66.64 cdefg±6.48	4.25	10.22	6.62 efghij±0.24	0	7	2.22 cdefghijk±0.23
CC17GRO	18.56	114.76	55.37 efghijkl±3.65	5.5	23.06	8.38 a±0.37	0	4	0.92 mno±0.15
CC18GRO	13.9	124.45	51.01 ghijklmnop±3.89	4.09	9.57	6.87 cdefgh±0.18	0	6	1.66 hijklmnop±0.21
CC19GRO	11.46	107.31	42.73 klmnopq±3.15	4.35	7.75	6.03 ijklmno±0.11	0	10	2.08 efghijk±0.28
CC21GRO	12.6	59.93	28.31 q ±1.44	4.27	8.34	6.03 ijklmno±0.13	0	4	0.88 no±0.14
CC22GRO	16.23	114.32	36.62 mnopq ±2.77	4.69	9.46	6.20 hijklmnop±0.14	0	4	1.16 klmno±0.17
CC26GRO	17.37	102.84	41.84 klmnopq±2.51	4.25	9.36	6.53 ghijk±0.15	0	7	1.98 efghijklm±0.21
CC27GRO	25.56	149.53	71.23 cde ±4.39	4.11	10.22	6.90 cdefgh±0.16	0	10	2.94 cdef±0.26
CC29GRO	14.38	76.14	34.56 nopq ±2.13	4.01	7.48	5.6 op±0.12	0	7	2.1 defghijk±0.21
CC30GRO	12.58	97.57	46.87 hijklmnop±3.09	4.12	8.75	5.91 jklmno±0.14	0	4	1.3 jklmno±0.17
CC32GRO	19.11	155.79	62.82 defghi ±4.67	4.5	9.95	6.6 fghij±0.17	0	6	3.08 cde±0.19
CC33GRO	27.42	99.99	61.32 defghij ±3.03	4.91	10.66	7.53 bc±0.17	0	9	4.44 a±0.33
CC34GRO	8.42	52.64	32.67 pq ±1.41	4.05	8.28	5.71 lmnop±0.11	0	4	1.58 ijklmno±0.12
CC36GRO	16.76	184.16	49.74 ghijklmnop ±4.66	4.05	9.33	6.55 fghijk±0.15	0	6	2.22 cdefghijk±0.23
CC38GRO	16.68	219.21	70.42 cdef ±6.11	5.34	9.85	7.45 bed±0.17	0	11	4.26 a±0.42
CC40GRO	19.74	135.73	59.57 defghijk ±3.43	4.93	10.22	7.19 bcdefg±0.18	0	7	2.7 cdefghi±0.26
CC42GRO	14.31	169.96	54.92 efghijklm ±4.45	5.17	9.77	7.43 bcd±0.15	0	8	2.66 cdefghi±0.27
CC43GRO	16.07	89.89	41.52 klmnopq ±2.29	4.63	8.94	6.51 ghijk±0.15	1	6	3.22 bcd±0.19
CC44GRO	16.16	125.75	63.05 defgh ±3.97	4.7	8.72	6.32 hijklmnop±0.13	1	13	4.12 ab±0.30
CC45GRO	18.57	149.9	48.94 ghijklmnop ± 3.75	5.5	8.1	6.79 cdefghi±0.1	1	9	3 cdef±0.23
CC46GRO	20.62	305.46	74.77 cd± 8.97	4.36	9.84	6.6 fghij±0.18	0	10	3.3 bc±0.29
CC47GRO	11.34	89.37	40.93 lmnopq± 2.3	4.53	8.79	6.45 ghijkl±0.17	0	6	2.3 cdefghij±0.13
CC48GRO	9.78	102.82	38.04 lmnopq ± 2.42	4.52	9.14	6.28 hijklmnop±0.14	0	8	2.04 efghijk±0.19
CC49GRO	24.32	105.06	51.26 ghijklmno ± 2.69	4.59	8.74	6.50 ghijk±0.14	0	6	2.02 efghijk±0.18
CC50GRO	11.35	60.92	28.38 q ±1.59	3.85	8.34	5.62 nop±0.14	0	3	1.06 lmno±0.12
CC51GRO	13.47	73.35	38.20 lmnopq ±2.17	4.3	10.03	6.91 cdefgh±0.17	0	4	1.92 fghijklmn±0.16
JIT	14.35	77.69	36.94 lmnopq ±2.16	4.04	6.46	5.12 p±0.09	0	8	2.1 defghijk±0.26
M26	16.81	112.44	45.89 hijklmnopq ±2.57	4.66	8.02	6.52 ghijk±0.11	0	6	2.38 cdefghij±0.23
GUG	15.46	210.2	52.59 ghijklmn ±4.56	4.11	9.41	6.91 cdefgh±0.18	0	8	2.86 cdefg±0.27
CHI	21.53	60.38	38.25 lmnopq ±1.45	4.85	10.52	7.3.0 bcdef±0.18	0	5	2.2 cdefghijk±0.16
CAP	14.64	284.62	93.346 b ± 8.98	4.49	9.69	7.40 bcd±0.17	0	15	5 a±0.57
PAS	11.17	126.13	51.52 ghijklmno ±3.75	4.44	8.57	6.34 hijklmn±0.15	0	3	0.62 o±0.12
MAT	19.22	97.07	43.61 jklmnopq ±2.60	4.41	9.09	6.74 defghi±0.16	0	5	2.36 cdefghij±0.18
HGA	11.74	122.29	42.85 klmnopq± 2.85	4.34	9.95	6.44 ghijkl±0.14	0	9	2.1 defghijk±0.25
ALG	17.06	93.07	52.78 ghijklmn ±2.79	4	8.39	5.81 klmnop±0.17	0	8	2.58 cdefghi±0.27

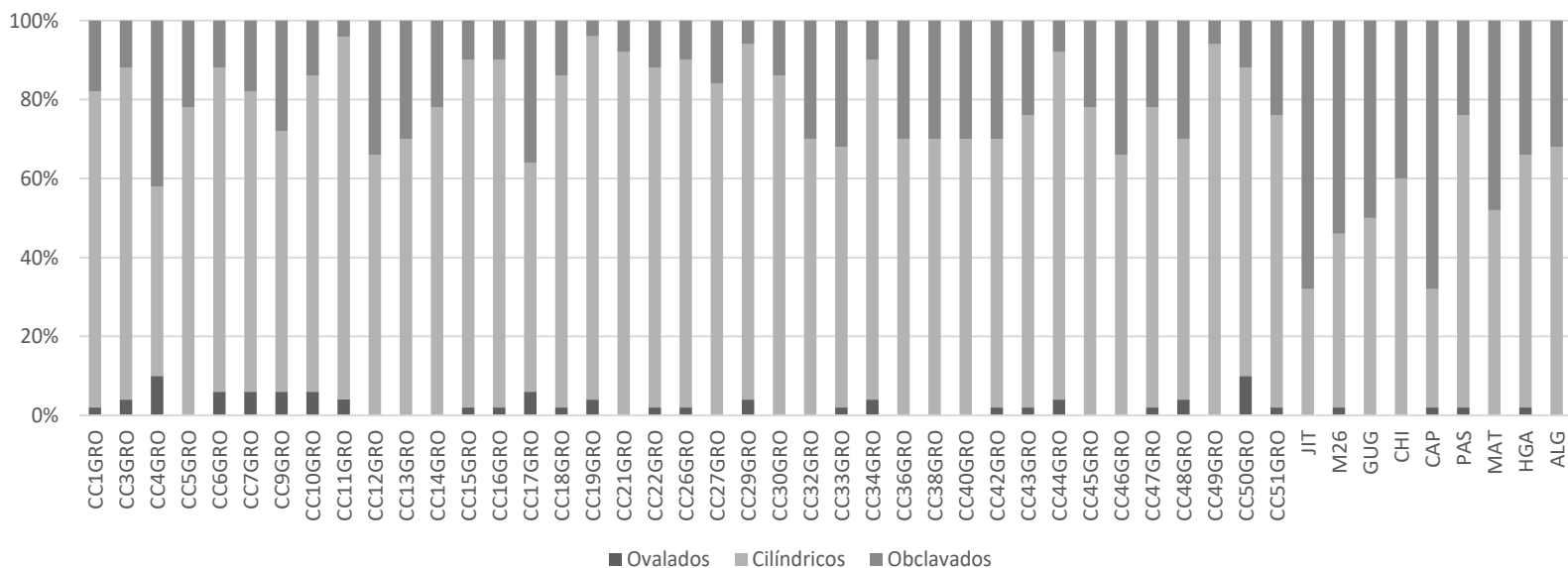
<sup>¶</sup>Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes (P=0.01) basados en test de rango múltiple de Duncan. / <sup>¶</sup>Means with the same letter in the same column are not significantly different (P=0.01) based on Duncan's multiple range test.



**Figura 2.** Diversidad morfológica de conidios de aislados de *C. cassicola* obtenidos de jamaica y malezas asociadas al cultivo. Barra=30  $\mu$ m.  
**Figure 2.** Morphological diversity of conidia of *C. cassicola* isolates obtained from roselle and weeds associated with the crop. Bars=30  $\mu$ m.



**Figura 4.** Distribución en porcentaje de contornos de conidios de aislados de *C. cassiicola* obtenidos de jamaica y malezas asociadas al cultivo.  
**Figure 4.** Distribution in percentage of contours of conidia of *C. cassiicola* isolates obtained from roselle and weeds associated with the crop.



**Figura 5.** Distribución en porcentaje de formas de conidios de aislados de *C. cassiicola* obtenidos de jamaica y malezas asociadas al cultivo.  
**Figure 5.** Distribution in percentage of the form of conidia of *C. cassiicola* isolates obtained from roselle and weeds associated with the crop.



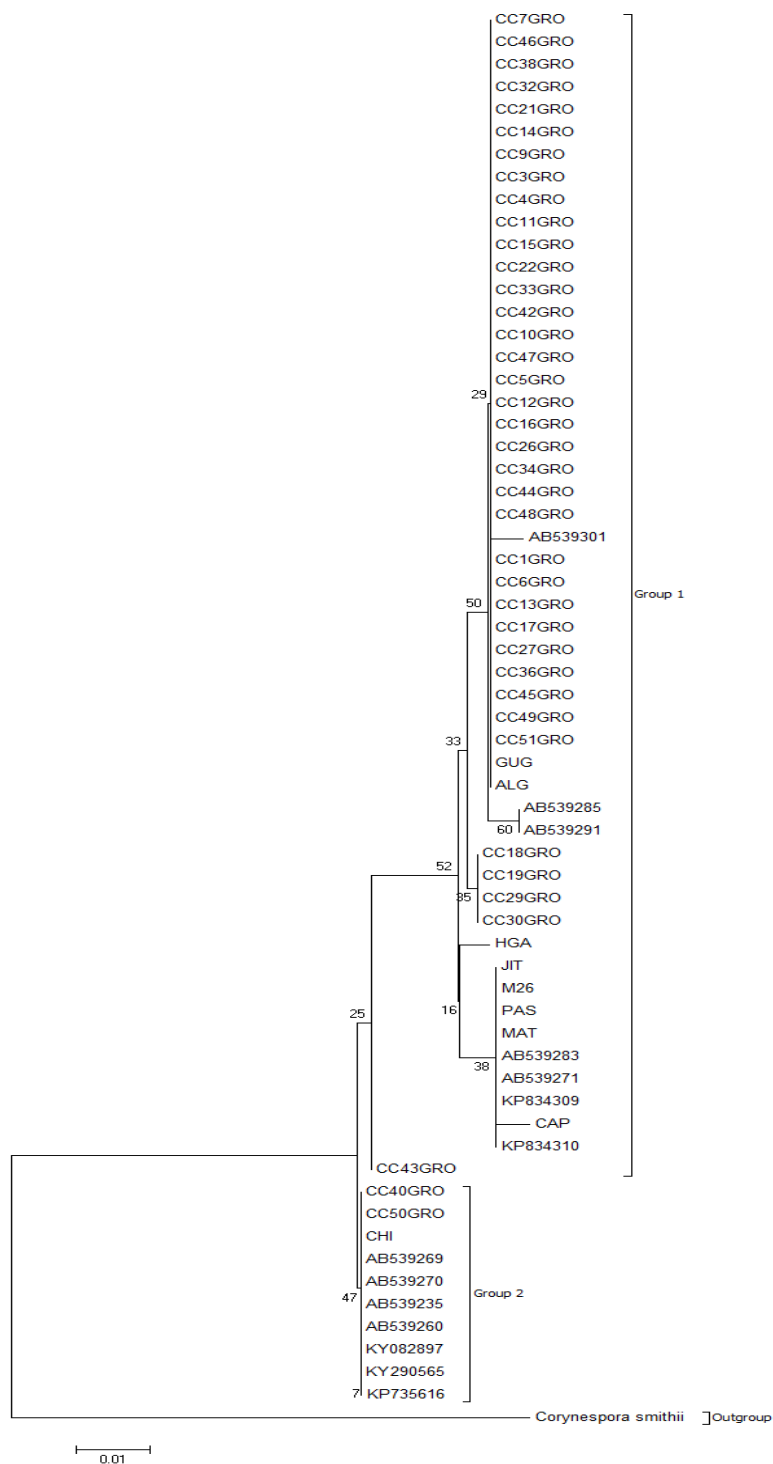
mayor número promedio de pseudoseptos se tuvo en el aislado CAP (cinco pseudoseptos) y el menor promedio en PAS (0.62 pseudoseptos) (Cuadro 3).

**Análisis filogenético.** Los 48 aislados de *C. cassiicola* del presente estudio se dividieron en dos grupos: grupo uno, integrado por 37 aislados obtenidos de jamaica y ocho aislados de malezas asociadas al cultivo; grupo dos, formado por dos aislados obtenidos de jamaica y uno obtenido de una maleza asociada al cultivo (Figura 3).

## DISCUSIÓN

Entre los diferentes aislados analizados de *C. cassiicola*, se registró un alto grado de diferencias en color, textura, forma y tamaño de las colonias, así como en forma, tamaño, contorno y número de pseudoseptos de los conidios (Cuadros 2 y 3, Figuras 2, 4 y 5); lo que coincide con reportes realizados por otros autores (Onesirosan *et al.*, 1974; Nghia *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2011). Asimismo, se observaron diferencias genéticas considerando el análisis de un segmento del gen EF-1a, misma que se reportó en Japón por Shimomoto *et al.* (2011) en aislados de *C. cassiicola* obtenidos de *Cucumis sativus*, *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum*, entre otras especies vegetales. El análisis comparativo entre las secuencias de los aislados del presente estudio con otras disponibles en el GenBank mostró que los aislados del grupo uno se asociaron con aquellos obtenidos de especies de las familias Apocynaceae (14%), Ericaceae (29%) y Solanaceae (57%), provenientes de Japón, EE.UU. e India; mientras que los del grupo dos, se relacionaron con los obtenidos de especies de las familias Ericaceae (14%), Lamiaceae (14%), Asteraceae (29%) y Cucurbitaceae (43%) provenientes de China, Japón, EE.UU. y Países Bajos. Los resultados anteriores indican

was observed in colony color, texture, form and size, as well as in the form, size, contour and number of conidia pseudosepta (Tables 2 and 3, Figures 2, 4 and 5), which coincides with reports published by other authors (Onesirosan *et al.*, 1974; Nghia *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2011). Genetic differences were also observed considering the analysis of a segment of the EF-1a gene, which was reported in Japan by Shimomoto *et al.* (2011) in *C. cassiicola* isolates obtained from *Cucumis sativus*, *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum*, among other plant species. The comparative analysis of the isolate sequences obtained in the present study, along with other that were available in the GenBank, showed that the isolates from group 1 were associated with those obtained from species of the Apocynaceae (14%), Ericaceae (29%) and Solanaceae (57%) families from Japan, USA and India, while the isolates of group 2 were associated with those obtained from species of the Ericaceae (14%), Lamiaceae (14%), Asteraceae (29%) and Cucurbitaceae (43%) families from China, Japan, USA and the Netherlands. These results indicate that the Mexican *C. cassiicola* isolates belonging to group 1 are more related to those obtained from plants of the Solanaceae family, while the isolates of group 2 are more associated with species of the Cucurbitaceae family. On the other hand, within group 1, there was a tendency to form a subgroup of isolates collected from weeds associated with the roselle crop in Mexico (Hernández *et al.*, 2018): JIT (*Solanum lycopersicum* (in wild form)), M26 (*Chromolaena odorata*), PAS (*Pasiflora viridiflora*), MAT (*Momordica charantia*) and CAP (*Eugenia oerstediana*). The isolates of group 1 were collected in the municipalities of Ayutla, Tecoaapa, Xochistlahuaca and San Marcos, and those of group 2 were collected in the municipality of Ayutla (Figure 3; Table 1). In this regard, it was observed that this group had a certain relationship



**Figura 3.** Árbol filogenético de aislados de *Corynespora cassiicola* obtenidos de jamaica y malezas asociadas al cultivo, basado en datos de secuencias parciales del gen EF-1a.-*Corynespora smithii* fue utilizado como organismo fuera de grupo.

**Figure 3.** Phylogenetic tree of *Corynespora cassiicola* isolates obtained from roselle and weeds associated with the crop based on partial sequences of the EF-1a gene.-*Corynespora smithii* was used as an organism external to the group.

que los aislados mexicanos de *C. cassiicola* pertenecientes al grupo uno están más relacionados con aquellos obtenidos de plantas de la familia Solanaceae, mientras que los del grupo dos se encuentran más asociados con especies de la familia Cucurbitaceae. Por otra parte, dentro del grupo uno se observó una tendencia a formar un sub-grupo de aislados recolectados de malezas asociadas al cultivo de jamaica en México (Hernández *et al.*, 2018): JIT (*Solanum lycopersicum* (forma silvestre), M26 (*Chromolaena odorata*), PAS (*Pasiflora viridiflora*), MAT (*Momordica charantia*) y CAP (*Eugenia oerstediana*). Los aislados del grupo uno se recolectaron en los municipios de Ayutla, Tecoaapa, Xochistlahuaca y San Marcos, mientras que los del grupo dos, procedieron del municipio de Ayutla (Figura 3; Cuadro 1). Al respecto, se observó que este agrupamiento tuvo cierta relación con el lugar de origen, lo cual fue reportado por otros autores (Silva *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2009). Dixon *et al.* (2009), analizaron diversos aislados de *C. cassiicola* provenientes de 68 especies vegetales colectadas en Samoa americana, Brasil, Malasia, Micronesia y EE.UU. y determinaron que aquellos geográficamente distintos pero obtenidos de la misma especie vegetal eran muy similares genéticamente, lo cual sugería cierto grado de especialización con el hospedante (Sumabat *et al.*, 2018). La especificidad de aislados de *C. cassiicola* con su hospedante también ha sido sugerida en el caso de papayo, tomate y pepino (Silva *et al.*, 2018).

Sin embargo, hasta la fecha no es posible establecer de manera definitiva una asociación de los grupos filogenéticos de *C. cassiicola* con su origen geográfico u hospedantes (Deon *et al.*, 2014). Además de esto último, trabajos posteriores podrían enfocarse en explorar la variabilidad patogénica de *C. cassiicola* de los grupos formados considerando la amplificación de otras regiones como  $\beta$ -tubulina, calmodulina y actina o el análisis de marcadores

with the place of origin, a fact that was reported by other authors (Silva *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2009). Dixon *et al.* (2009) analyzed diverse *C. cassiicola* isolates from 68 plant species collected in American Samoa, Brazil, Malaysia, Micronesia and USA, and determined that those geographically different but obtained from the same plant species were very similar at the genetic level, which suggested a certain level of specialization with the host (Sumabat *et al.*, 2018). The specificity of *C. cassiicola* isolates with their host has also been suggested in the case of papaya, tomato and cucumber (Silva *et al.*, 2018).

However, so far, it has not been possible to definitely establish an association of *C. cassiicola* phylogenetic groups with their geographical origin or hosts (Deon *et al.*, 2014). In addition to the latter, subsequent studies could be focused on exploring the pathogenic variability of *C. cassiicola* in the formed groups considering the amplification of other regions, such as  $\beta$ -tubulin, calmodulin and actin, or the analysis of iPBS markers in order to determine if there is a relationship between the level of pathogenicity with the groups and subgroups formed in the present study and their host.

## CONCLUSIONS

The results of the morphological and phylogenetic analyses showed significant differences among the *C. cassiicola* isolates collected from roselle plants and weeds associated with the crop, which are related to isolates from other countries that were obtained mainly from plant species of the Solanaceae and Cucurbitaceae families.

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

iPBS, para determinar si existe relación entre el grado de patogenicidad con los grupos y subgrupos formados en el presente estudio así como con su hospedante.

## CONCLUSIONES

Los resultados del análisis morfológico y filogenético mostraron diferencias importantes entre los aislados de *C. cassiicola* recolectados de plantas de jamaica y malezas asociadas al cultivo, los cuales se relacionan con aislados de otros países y que fueron obtenidos de especies de plantas de las familias Solanaceae y Cucurbitaceae, principalmente.

## LITERATURA CITADA

- Carbone I and Kohn LM. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553-6. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051>
- Deon M, Fumanal B, Gimenez S, Bieysse D, Oliveira RR and Shuib SS. 2014. Diversity of the cassiicolin gene in *Corynespora cassiicola* and relation with the pathogenicity in *Hevea brasiliensis*. *Fungal Biology* 118: 32-47. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.10.011>
- Dixon LJ, Schlub RL, Pernezny K and Datnoff LE. 2009. Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology* 99:1015-1027. <https://doi.org/10.1094/phyto-99-9-1015>
- Hernández MJ, Ochoa MDL, Ortega ASÁ and Vega MR. 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>
- Hernández LRA, Llanderal CC, Castillo MLE, Valdez CJ and Nieto HR. 2005. Identification of larval instars of *Comadia redtenbacheri* (Hamm) (Lepidoptera: cossidae). *Agrociencia* 39:539-544. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30239507>
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120. <https://doi.org/10.1007/bf01731581>
- Nghia NA, Kadir J, Sunderasan E, Abdullah PM, 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>
- Oktavia F, Kuswanhadi, Widodo, Dinarti D and Sudarsono. 2017. Pathogenicity and RDNA-ITS sequence analysis of the *Corynespora cassiicola* isolates from rubber plantations in Indonesia. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 29(11): 872-83. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2017.v29.i11.1497>
- Onesirosan PT, Army DC and Durbin RD. 1974. Hostspecificity of Nigerian and North American isolates of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology* 64:1364-1367. <https://doi.org/10.1094/phyto-64-1364>
- Ortega ASÁ, Hernández MJ, Ochoa MDL and Ayala EV. 2015. First report of *Corynespora cassiicola* causing leaf and calyx spot on roselle in Mexico. *Plant Disease* 99:1041. <https://doi.org/10.1094/pdis-04-14-0438-pdn>
- Paz DS, Gusmão JAR, Costa AA, Silva EKC and Diniz NB. 2018. Reaction of papaya genotypes to target spot and activity of plant extracts and *Bacillus* spp. on *Corynespora cassiicola*. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 40(1): (e-098). <https://doi.org/10.1590/0100-29452018927>
- 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>
- Saitou N and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4(4):406-425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sambrook J. and Russel D. 2001. Rapid isolation of yeast DNA. *In: Molecular cloning, a laboratory manual* 3<sup>th</sup> Ed. (Green MR and Sambrook J, eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 3.17-3.32.
- Shimomoto Y, Sato T, Hojo H, Morita Y, Takeuchi S, Mizumoto H, Kiba A and Hikichi Y. 2011. Pathogenic and genetic variation among isolates of *Corynespora cassiicola* in Japan. *Plant Pathology* 60:253-260. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02374.x>
- SIAP. 2016. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (Consulta, febrero 2019).
- Silva WPK, Karunanayake EH, Wijesundera RLC and Priyanka UMS. 2003. Genetic variation in *Corynespora cassiicola*: A possible relationship between host origin and virulence. *Mycological Research* 107:567-571. <https://doi.org/10.1017/s0953756203007755>
- Silva B JL, Galúcio S FM, Gomes L MT, Ferreira V MS, Almeida FV and Rebouças D LC. 2018. Genetic variability of *Corynespora cassiicola* isolates from Amazonas, Brazil. *Arquivos do Instituto Biológico* 85:1-5. DOI: 10.1590/1808-1657000992017
- Smith LJ, Datnoff LE, Pernezny K and Schlub RL. 2009. Phylogenetic and pathogenic characterization of *Corynespora cassiicola* isolates. *Acta Horticulturae* 808: 51-56. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2009.808.6>
- Sumabat L, Robert CK., and Brewer TM. 2018. Phylogenetic diversity and host specialization of *Corynespora cassiicola* responsible for emerging target spot disease of cotton



and other crops in the southeastern United States. *Phytopathology* 108: 892-901. <https://doi.org/10.1094/phyto-12-17-0407-r>

Wu J, Xie X, Shi Y, Chai A, Wang Q and Li B. 2019. Analysis of pathogenic and genetic variability of *Corynespora cassicola* based on iPBS retrotransposons. *Canadian Journal of Plant Pathology* 41(1):76-86. DOI: 10.1080/07060661.2018.1516239.