

Diagrammatic logarithmic scales for assess the severity of spotted leaves and calyces of roselle

Escalas logarítmicas diagramáticas para evaluar la severidad del manchado de hojas y cálices de jamaica

Santo Ángel Ortega-Acosta¹, Ciro Velasco-Cruz², Javier Hernández-Morales^{1*}, Daniel Leobardo Ochoa-Martínez¹ and Javier Hernández-Ruiz³. ¹ Fitosanidad- Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, México. ² Estadística, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, México. ³ Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala, México. *Corresponding author: hjavier@colpos.mx

Recibido: 20 de Junio, 2016

Aceptado: 01 de septiembre, 2016

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. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34: 270-285.
DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1606-6
Primera publicación DOI: 02 de septiembre, 2016
First DOI published: September 2nd, 2016

ABSTRACT

Spotted leaves and calyces of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) induced by *Corynespora cassiicola*, is currently considered the main disease for this crop in Mexico. Given its importance, it is necessary to have a standardized method to quantify the disease severity. Therefore, the objective of this study was to develop and validate two diagrammatic logarithmic scales to quantify the severity of this disease. Naturally infected roselle leaves and calyces were collected in Guerrero state commercial plantations, and the actual severity of each of these organs was assessed. The proposed scales, designed from 2LOG program, comprised six classes in

RESUMEN

El manchado de hojas y cálices en jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), inducido por *Corynespora cassiicola*, actualmente es considerada la principal enfermedad de este cultivo en México. Dada su importancia, es necesario contar con un método estandarizado para cuantificar la severidad de la enfermedad. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio consistió en desarrollar y validar dos escalas logarítmicas diagramáticas para cuantificar ésta enfermedad. Para ello, se colectaron hojas y cálices de jamaica infectados de manera natural en plantaciones comerciales del estado de Guerrero, y se calculó la severidad real de cada uno de éstos órganos. Las escalas propuestas, diseñadas con el programa 2LOG, comprenden seis clases, en hojas: 0=0, 1=(>0-2-4), 2=(>4-7-12), 3=(>12-19-29), 4=(>29-42-57) y 5=(>57-70-≤100); en cálices: 0=0, 1=(>0-3-5), 2=(>5-10-18), 3=(>18-30-46), 4=(>46-63-77) y 5=(>77-87-≤100). Asimismo, se verificó la exactitud, precisión y reproducibilidad de las estimaciones. Se hizo una evaluación en hojas y cálices sin utilizar las escalas, y otras dos

leaves: 0=0, 1=(>0-2-4), 2=(>4-7-12), 3=(>12-19-29), 4=(>29-42-57) and 5=(>57-70-≤100); in calyces: 0=0, 1=(>0-3-5), 2=(>5-10-18), 3=(>18-30-46), 4=(>46-63-77) and 5=(>77-87-≤100). The accuracy, precision and reproducibility of the estimates were verified. For leaves and calyces, one evaluation was carried without scale, and two others evaluations were done with scale, each seven days apart. Evaluators showed better levels of accuracy, precision and reproducibility with the scales. The results suggest that the proposed scales are appropriate to estimate the severity of spotted leaves and calyces of roselle.

Additional key words: *Corynespora cassiicola*, *Hibiscus sabdariffa*, measuring disease.

Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) is an important crop for Mexico, as annually around 19,000 hectares are used for its cultivation. Guerrero is the main state producer nationwide where Ayutla and Tecoaapa municipalities provide more than 50 % of the state production (SIAP, 2014). Spotted leaves and calyces induced by *Corynespora cassiicola*, is currently considered the main limiting factor for the production of this crop, as there have been incidence in the order of 100 % (Ortega-Acosta *et al.*, 2015). The symptoms in leaves consist of circular to irregular spots with straw-colored center, black borders and purple rings, which coalesce into large necrotic lesions. In calyces, initially stage occur sunken spots necrotic of circular or irregular shape, and in advanced stages of infection originated blight (Ortega-Acosta *et al.*, 2015). Despite the importance of this disease, currently there is not a standardized method to assess its severity, which is a fundamental parameter in epidemiological studies and evaluation of management practices, among others. These studies require simple and

evaluaciones utilizando las escalas, a intervalos de siete días. Los evaluadores mostraron mejores grados de exactitud, precisión y reproducibilidad con el uso de las escalas. Los resultados sugieren que las escalas propuestas son apropiadas para estimar la severidad del manchado de hojas y cálices en jamaica.

Palabras clave adicionales: *Corynespora cassiicola*, *Hibiscus sabdariffa*, medición de enfermedad.

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es un cultivo importante para México, anualmente se destinan alrededor de 19,000 hectáreas para su cultivo. A nivel nacional, Guerrero es el principal productor, en dónde los municipios de Ayutla y Tecoaapa aportan más del 50 % de la producción nacional (SIAP, 2014). El manchado de hojas y cálices inducido por *Corynespora cassiicola*, actualmente es considerado el principal factor limitante para la producción de jamaica, ya que se han registrado incidencias del orden del 100 % (Ortega-Acosta *et al.*, 2015). Los síntomas en hojas consisten de manchas circulares a irregulares con centro color pajizo, bordes negros y anillos púrpuras, que al coalescer forman grandes lesiones necróticas. En los cálices, en etapas iniciales se observan manchas necróticas hundidas de forma circulares a irregular, y en etapas avanzadas de infección se genera un tizón (Ortega-Acosta *et al.*, 2015). A pesar de la importancia de ésta enfermedad, actualmente no se cuenta con un método estandarizado que permita evaluar su severidad, el cual constituye un parámetro fundamental en estudios epidemiológicos y evaluaciones de prácticas de manejo, entre otros. Estos estudios requieren métodos simples y rápidos, con los mismos estándares y que puedan utilizarse en diferentes condiciones. Por lo tanto, dichos métodos tienen que

fast methods with the same standards that can be used under different conditions; thus, they must be accurate, precise, and reproducible. Diagrammatic scales reduce subjectivity and measure accurately and reliably the estimates of the severity of disease (Tovar-Soto *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2004; Belan *et al.*, 2014). These scales must consider representative symptoms of the disease, as well as the maximum and minimum values in field (Tovar-Soto *et al.*, 2002). Furthermore, according to Capucho *et al.* (2011), the diagrammatic scales must be subject to validation before their practical use in order to improve the accuracy and precision of the severity assessments. Current trend is the use of robust evaluation systems, in them is evaluated the accuracy, precision, reproducibility and other attributes. These are important due to the participation of group of evaluators in field, essential epidemiological surveillance systems (Mora-Aguilera *et al.*, 2014). Based on the above, the objective of this study was to develop and validate two diagrammatic logarithmic scales in order to assess the severity of spotted leaves and calyces of roselle.

MATERIALS AND METHODS

Development of scales

In the municipalities of Ayutla and Tecoaapa, Guerrero, in based to climatic station (12012) situated at 365 m.a.s.l, these characterized by presented average annual temperature and precipitation of 27 °C and 1519 mm respectively (SMN, 2016). From August to December 2013, in commercial plantations of roselle cv. “Criollo” naturally infected by *Corynespora cassiicola*, 200 leaves and 200 calyces were collected with different levels of severity of spotted (Tovar-Soto

ser exactos, precisos y reproducibles. Las escalas diagramáticas reducen la subjetividad y miden de manera precisa y confiable las estimaciones de la severidad de la enfermedad (Tovar-Soto *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2004; Belan *et al.*, 2014). Estas escalas deben considerar los síntomas representativos de la enfermedad, así como los valores máximo y mínimo presentes en campo (Tovar-Soto *et al.*, 2002). Además, de acuerdo a Capucho *et al.* (2011), antes de utilizarlas en la práctica, las escalas diagramáticas tienen que ser sometidas a validación a fin de mejorar la exactitud y precisión de las evaluaciones de severidad. La tendencia actual, es su utilización en sistemas de evaluaciones robustos, en los cuales se evalúa la exactitud, precisión, reproducibilidad y otros atributos. Estos sistemas son importantes debido a la participación de grupos de evaluadores en condiciones de campo, los cuales resultan esenciales en sistemas de vigilancia epidemiológica (Mora-Aguilera *et al.*, 2014). Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue desarrollar y validar dos escalas logarítmicas diagramáticas para evaluar la severidad del manchado de hojas y cálices de jamaica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Desarrollo de las escalas

Con base en la estación meteorológica más cercana (12012) situada a 365 m.s.n.m.; los municipios de Ayutla y Tecoaapa, Guerrero se caracterizan por presentar una temperatura y precipitación promedio anual de 27 °C y 1,519 mm, respectivamente (SMN, 2016). Durante agosto a diciembre de 2013, se colectaron 200 hojas y 200 cálices en plantaciones comerciales de jamaica del cultivar “Criollo” infectados de manera natural por *Corynespora cassiicola*, con diferentes grados de severidad del

et al., 2002; Capucho *et al.*, 2011). Afterwards, 50 leaves and 50 calyces representative of different ranges of severity were visually selected (Belan *et al.*, 2014). The selected leaves and calyces were digitally photographed and with the use of the GIMP® ver. 2.0 software, the background of each image was removed in order to facilitate the quantification of affected area. With the use of the Image Tool 3.0 (UTHSCSA, 2002) software, the total area of each leaf or calyx was quantified, as well as the damaged area (necrotic tissue), then, the percentage of actual severity of the disease was obtained by using the formula: $\text{severity} = (\text{diseased area} / \text{total image area}) * 100$ (Nutter Jr. *et al.*, 2006). After obtaining the real levels of severity for leaves and calyces, six classes were defined, then the maximum level of severity obtained from leaves and calyces was introduced into the 2LOG program (Osada-Velázquez and Mora-Aguilera, 1997) in order to obtain severity ranges and the midpoint (Tovar-Soto *et al.*, 2002).

Validation of the scales

In order to validate the scales, 50 leaves and 50 calyces of roselle representative of the different levels of spotted severity were used (Belan *et al.*, 2014). The images were inserted randomly into individual slides to be viewed in Microsoft® PowerPoint® 2010, and they were presented to eight evaluators without experience in the quantification of plant diseases (Celoto and Papa, 2010), and whom conducted three evaluations for leaves and calyces. The first evaluation was made without scales and the two remaining were conducted with scales 7 and 14 days after the first evaluation by the same evaluators (Belan *et al.*, 2014).

In order to quantify the accuracy of the evaluators in the severity assessments, these were compared with the actual severity values obtained

manchado (Tovar-Soto *et al.*, 2002; Capucho *et al.*, 2011). Posteriormente, se seleccionaron de manera visual 50 hojas y 50 cálices representativos de los diferentes grados de severidad (Belan *et al.*, 2014). Las hojas y cálices seleccionados fueron fotografiados digitalmente y con el programa GIMP® ver. 2.0 se eliminó el fondo de cada imagen para facilitar la cuantificación del área afectada. Con el uso del programa Image Tool 3.0 (UTHSCSA, 2002) se cuantificó el área total de cada una de las hojas y cálices, así como el área afectada (tejido necrótico); con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de severidad real de la enfermedad, aplicando la fórmula: $\text{severidad} = (\text{área enferma} / \text{área total de la imagen}) * 100$ (Nutter Jr. *et al.*, 2006). Después de obtener los niveles reales de severidad en hojas y cálices, se definieron seis clases; el siguiente paso consistió en capturar el nivel máximo de severidad en hojas y cálices en el programa 2LOG (Osada-Velázquez y Mora-Aguilera, 1997) para obtener los rangos de severidad y el punto medio (Tovar-Soto *et al.*, 2002).

Validación de las escalas

Para validar las escalas se utilizaron 50 hojas y 50 cálices de jamaica representativos de los diferentes grados de severidad (Belan *et al.*, 2014). Las imágenes se insertaron aleatoriamente en diapositivas individuales para ser visualizadas en Microsoft® PowerPoint® 2010 y se mostraron a ocho evaluadores sin experiencia en la cuantificación de enfermedades de las plantas (Celoto y Papa, 2010), quienes realizaron tres evaluaciones para hojas y tres para cálices, en forma independiente. En la primera evaluación no se utilizaron las escalas; y las dos restantes se realizaron con escalas a los 7 y 14 días después de la primera evaluación por los mismos evaluadores (Belan *et al.*, 2014).

electronically, by a simple linear regression, to verify the following set of hypotheses: for intercept $H_0: b_0=0$ versus $H_1: b_0 \neq 0$ and for the slope $H_0: b_1=1$ versus $H_1: b_1 \neq 1$. The evaluation of both sets of hypotheses was performed with a significance level of 5 %. The estimated values of the slope that are significantly different from 1, indicate overestimation (>1) or underestimation (<1) at all levels of disease severity. While if the intercept estimated values are significantly different from 0, they indicate overestimation (>0) or underestimation (<0) of the actual severity of the disease, at low severity values (Nutter Jr. and Schultz, 1995).

In addition, the accuracy of the estimates was determined by the coefficient of determination (r^2) of the linear regression, and the absolute errors which are defined as the difference between the estimated severity by evaluators and the actual severity obtained electronically, both in leaves and calyces were graphed. The reproducibility of the scales was assessed by using the coefficient of determination (r^2) of the linear regression among the severities estimated by the evaluators, combined in pairs (Nutter Jr. and Schultz, 1995).

Data were tabulated in Microsoft® Excel 2010® software, and the statistical analyzes were performed with SAS® program ver. 9.0 (SAS Institute, 2002).

RESULTS

Development of scales

Roselle calyces and leaves under natural conditions of infection collected in field, showed leaves and healthy calyces asymptomatic (0 %), and as values of minimum severity of 0.2 and 2.8 in leaves and calyces respectively, and maximum value of 69.9 % in leaves and over 85 % in calyces.

Para cuantificar la exactitud de las evaluaciones de severidad que hicieron los evaluadores, éstas fueron comparadas con los valores reales de severidad generados de manera electrónica, mediante una regresión lineal simple, para verificar las siguientes hipótesis: para el intercepto $H_0: b_0=0$ versus $H_1: b_0 \neq 0$ y para la pendiente $H_0: b_1=1$ versus $H_1: b_1 \neq 1$. La evaluación de ambos juegos de hipótesis se llevó a cabo con un nivel de significancia del 5 %. Los valores estimados de la pendiente que fueron significativamente diferentes de 1, indican sobreestimación (>1) o subestimación (<1) en todos los niveles de severidad de la enfermedad. Si los valores estimados del intercepto fueron significativamente diferentes de 0, esto indica una sobreestimación (>0) o una subestimación (<0) de la severidad real de la enfermedad, en niveles bajos de severidad (Nutter Jr. y Schultz, 1995).

Adicionalmente, la precisión de las estimaciones fue determinada por el coeficiente de determinación (r^2) de la regresión lineal, y se graficaron los errores absolutos, los cuales se definen como la diferencia entre la severidad estimada por los evaluadores y la severidad real obtenida por medios electrónicos, tanto en hojas como en cálices. La reproducibilidad de las escalas se evaluó utilizando el coeficiente de determinación (r^2) de la regresión lineal entre las severidades estimadas por los evaluadores, combinadas en pares (Nutter Jr. y Schultz, 1995).

Los datos se tabularon en Microsoft® Excel 2010® y los análisis estadísticos se realizaron en SAS® ver. 9.0 (SAS Institute, 2002).

RESULTADOS

Desarrollo de las escalas

Las colectas en campo de cálices y hojas de Jamaica en condiciones naturales de infección, mostraron

Based on the percentages of the damaged area of the 50 leaves and 50 calyces selected, six classes of severity were defined; the range and midpoints of each class (0, 1, 2, 3, 4 and 5) were expressed in percentage of the affected area as follows: for leaves: 0=0, 1=(>0-2-4), 2=(>4-7-12), 3=(>12-19-29), 4 (>29-42-57) and 5=(>57-70-100); in calyces: 0=0, 1=(>0-3-5), 2=(>5-10-18), 3=(>18-30-46), 4=(>46-63-77) and 5=(>77-87-100) (Figures 1A and 1B).

Validation of the scales

In general, the accuracy of evaluations of spotted leaves and calyces was high with or without the use of scales (Tables 1 and 2). Without the use of scales, r^2 values ranged from 0.55 to 0.92 with a 0.79 mean and 0.63 to 0.89 with a 0.80 mean for spotted leaves and calyces, respectively.

With the use of scales, r^2 values ranged from 0.86 to 0.95 with a 0.90 mean and 0.89 to 0.93 with a 0.91 mean for the first and second evaluations of spotted leaves, respectively. For calyces, r^2 values were 0.85 to 0.92 with a 0.90 mean and 0.86 to 0.92 with a 0.89 mean for the first and second evaluations, respectively (Tables 1 and 2). These results show that the estimates were accurate when diagrammatic scales were used.

According to the results of the linear regression, without the use of the scales, the values of the intercept for leaves were significantly different from 0 in two evaluators (25 %), whereas for the slope were statistically different from 1 in three evaluators (37.5 %). In calyces, the intercept values were significantly different from 0 in four evaluators (50 %), whereas for the slope they were statistically different from 1 in two evaluators (25 %). In absolute terms for the intercept, in leaves, five evaluators overestimated (e2, e3, e4, e6 and e7) and three of them underestimated (e1, e5 and e8).

hojas y cálices sanos (0 %), así como valores mínimos de severidad de 0.2 y 2.8 en hojas y cálices, respectivamente, y valores máximos de 69.9 % en las hojas y más de 85 % en cálices.

Con base en los porcentajes de área dañada de las 50 hojas y 50 cálices seleccionados, se definieron seis clases de severidad. Los rangos y los puntos medios de cada clase (0, 1, 2, 3, 4 y 5) se expresaron como porcentaje de la superficie afectada. Así, para hojas: 0=0, 1=(>0-2-4), 2=(>4-7-12), 3=(>12-19-29), 4=(>29-42-57) y 5=(>57-70-100); y para cálices: 0=0, 1=(>0-3-5), 2=(>5-10-18), 3=(>18-30-46), 4=(>46-63-77) y 5=(>77-87-100) (Figuras 1A y 1B).

Validación de las escalas

En general, la exactitud de las evaluaciones del manchado de hojas y cálices fue alta, con y sin el uso de escalas (Cuadros 1 y 2). Sin el uso de escalas, los valores de r^2 variaron de 0.55 a 0.92, con una media de 0.79, y de 0.63 a 0.89 con una media de 0.80, para el manchado de hojas y cálices, respectivamente.

Cuando se utilizaron las escalas, los valores de r^2 variaron de 0.86 a 0.95 con una media de 0.90, y de 0.89 a 0.93 con una media de 0.91, en la primera y segunda evaluaciones del manchado de hojas, respectivamente. Para los cálices, los valores de r^2 fueron de 0.85 a 0.92, con una media de 0.90, y de 0.86 a 0.92 con una media de 0.89, en la primera y segunda evaluaciones, respectivamente (Cuadros 1 y 2). Estos resultados muestran que las estimaciones fueron precisas cuando se utilizaron las escalas diagramáticas.

De acuerdo con los resultados de la regresión lineal, cuando no se utilizaron las escalas, los valores del intercepto para hojas fueron significativamente diferentes de 0 en dos evaluadores (25 %), en tanto que los valores de la pendiente fueron

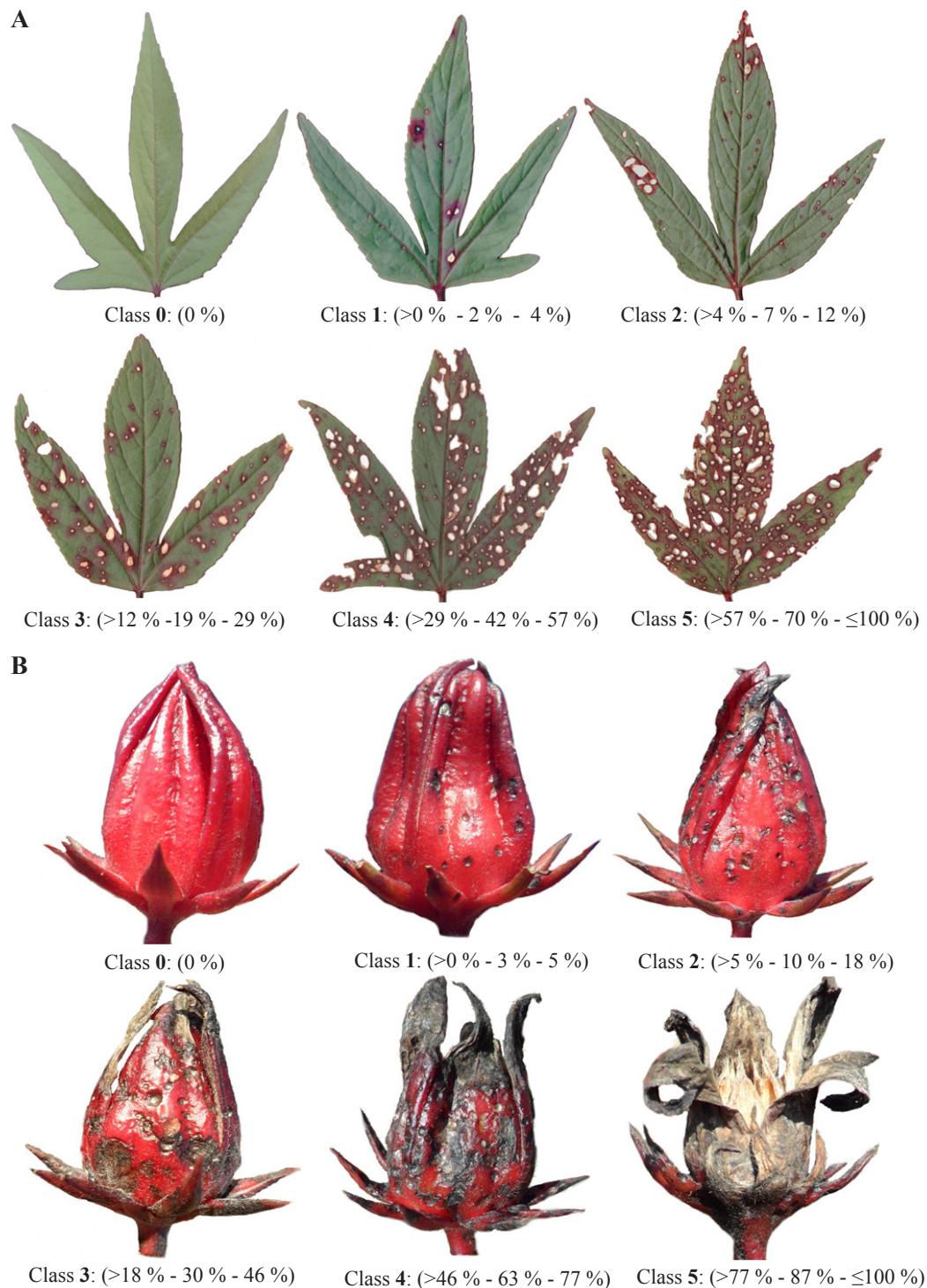


Figure 1. Diagrammatic logarithmic scales to assess the spotted severity of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) induced by *Corynespora cassiicola*. A) Scale to assess the severity in leaves. B) Scale to assess the severity in calyces.

Figura 1. Escalas logarítmicas diagramáticas para evaluar la severidad del manchado en jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) inducida por *Corynespora cassiicola*. A) Escala para evaluar la severidad en hojas. B) Escala para evaluar la severidad en cálices.

Table 1. Intercept (b_0), slope of the line (b_1) and coefficient of determination (r^2) of the equation of the linear regression of the visual estimates of spotted leaves severity of roselle (*Hibiscus sabdariffa*), carried out with and without diagrammatic scale, compared to the actual percentages of affected area.**Cuadro 1.** Intercepto (b_0), pendiente de la línea (b_1) y coeficiente de determinación (r^2) de la ecuación de la regresión lineal de las estimaciones visuales de la severidad del manchado de hojas en jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), realizadas con y sin escalas diagramáticas, comparadas con los porcentajes reales de área afectada.

Evaluator	Coefficients								
	Without scale			With scale					
	b_0	b_1	r^2	First evaluation			Second evaluation		
	b_0	b_1	r^2	b_0	b_1	r^2	b_0	b_1	r^2
e1	0.60ns	1.08ns	0.84	1.98ns	1.03ns	0.89	-0.03ns	1.07ns	0.93
e2	2.24ns	1.11*	0.92	0.14ns	1.01ns	0.88	-0.28ns	1.09ns	0.89
e3	1.58ns	0.83*	0.80	1.20ns	1.12*	0.95	2.29ns	0.99ns	0.91
e4	10.57*	1.14ns	0.76	1.73ns	1.11ns	0.89	2.22ns	1.09ns	0.91
e5	-0.63ns	0.95ns	0.88	-0.23ns	1.00ns	0.86	1.65ns	0.98ns	0.89
e6	2.93ns	0.97ns	0.76	0.18ns	1.06ns	0.93	0.88ns	1.01ns	0.92
e7	5.42*	0.65*	0.55	1.63ns	1.01ns	0.87	1.47ns	1.01ns	0.90
e8	0.59ns	0.96ns	0.83	1.10ns	1.09*	0.95	0.70ns	1.05ns	0.92
Average			0.79			0.90			0.91

ns= Not significant / ns= No significativo.

* Situation where the null hypothesis ($b_0=0$ or $b_1=1$) was rejected by the t -test ($P=0.05$) / * Situación en dónde la hipótesis nula ($b_0=0$ o $b_1=1$) fue rechazada por la prueba t ($P=0.05$).**Table 2.** Intercept (b_0), slope of the line (b_1) and coefficient of determination (r^2) of the equation of linear regression of the visual estimates of spotted calyces severity of roselle (*Hibiscus sabdariffa*), carried out with and without diagrammatic scale, compared to the actual percentages of affected area.**Cuadro 2.** Intercepto (b_0), pendiente de la línea (b_1) y coeficiente de determinación (r^2) de la ecuación de la regresión lineal de las estimaciones visuales de la severidad del manchado de cálices en jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), realizadas con y sin escalas diagramáticas, comparadas con los porcentajes reales de área afectada.

Evaluator	Coefficients								
	Without scale			With scale					
	b_0	b_1	r^2	First evaluation			Second evaluation		
	b_0	b_1	r^2	b_0	b_1	r^2	b_0	b_1	r^2
e1	2.34ns	0.80*	0.74	-0.78ns	1.16*	0.91	0.92ns	1.06ns	0.90
e2	2.93ns	1.06ns	0.82	-1.72ns	1.08ns	0.89	-1.24ns	1.06ns	0.90
e3	5.91*	1.04ns	0.86	0.08ns	1.02ns	0.91	0.77ns	1.10ns	0.91
e4	10.05*	1.04ns	0.83	1.16ns	1.10ns	0.90	1.48ns	1.08ns	0.86
e5	4.46*	1.09ns	0.89	-1.81ns	1.09ns	0.85	-1.09ns	1.09ns	0.89
e6	10.15*	0.90ns	0.63	-0.35ns	1.06ns	0.92	-1.24ns	1.06ns	0.92
e7	1.66ns	0.82*	0.79	0.61ns	1.08ns	0.89	1.38ns	1.10ns	0.88
e8	1.64ns	1.08ns	0.86	1.68ns	1.07ns	0.89	-0.19ns	0.99ns	0.87
Average			0.80			0.90			0.89

ns= Not significant / ns= No significativo.

* Situation where the null hypothesis ($b_0=0$ or $b_1=1$) was rejected by the t -test ($P=0.05$) / * Situación en dónde la hipótesis nula ($b_0=0$ o $b_1=1$) fue rechazada por la prueba t ($P=0.05$).

In calyces, all evaluators showed tendencies to overestimation. For the slope in absolute terms, in leaves, three evaluators overestimated (e1, e2 and e4) and five underestimated (e3, e5, e6, e7 and e8). While in calyces five evaluators overestimated (e2, e3, e4, e5 and e8) and three underestimated (e1, e6 and e7) (Tables 1 and 2).

On the other hand, with the use of scales a tendency to improve the accuracy of severity estimates, in leaves and calyces, was observed, the values of the intercept of all evaluators were not significantly different from 0 in the first and second evaluations in both cases (Tables 1 and 2). Additionally, in the case of leaves, the values of the slope of the linear regression were statistically different from 1 in two evaluators (25 %), whereas in the second evaluation, values statistically equal to 1 were obtained in all evaluators. In calyces, the slope of the line was statistically different from 1 in one evaluator (12.5 %), while in the second evaluation values non-statistically different from 1 were obtained in all the evaluators. These results show that there is a good precision with the use of the proposed scales to assess the severity of spotted leaves and calyces of roselle.

Moreover, in all cases, highest absolute errors were obtained without the use of scales. In leaves without scale, a range of 43.81 to -39.48 was obtained as maximum and minimum values respectively, whereas with the scales, an average range of 32.28 to -27.95 was obtained in both assessments. In calyces, without the scale a range of 47.13 to -63.45 was obtained, and when scales were used, the average range of the two evaluations was 31.46 to -27.88 (Figure 2). In the evaluations of leaves, without scale, 30.5% of the absolute errors were outside of -10 and +10, while in calyces values were 34.25 %. With the use of scales, these values were 21.75 % and 19.5%, and 23.75 % and 23.0 % for the first and second assessments of leaves and calyces, respectively.

estadísticamente diferentes de 1 en tres evaluadores (37.5 %). En cálices, los valores del intercepto fueron significativamente diferentes de 0 en cuatro evaluadores (50 %), en tanto que para la pendiente, los valores fueron estadísticamente diferentes de 1 en dos evaluadores (25 %). En términos absolutos para el intercepto, en hojas, cinco evaluadores sobreestimaron (e2, e3, e4, e6 y e7) y tres subestimaron (e1, e5 y e8). En cálices, todos los evaluadores tendieron a la sobreestimación. Para la pendiente, en términos absolutos, en hojas, tres evaluadores sobreestimaron (e1, e2 y e4) y cinco subestimaron (e3, e5, e6, e7 y e8). En cálices, cinco evaluadores sobreestimaron (e2, e3, e4, e5 y e8) y tres subestimaron (e1, e6 y e7) (Cuadros 1 y 2).

Por otra parte, cuando se utilizaron las escalas, se observó una tendencia a mejorar la exactitud de las estimaciones de la severidad tanto en hojas como en cálices; en ambos casos, los valores del intercepto en todos los evaluadores no fueron significativamente diferentes de 0 en la primera y la segunda evaluaciones (Cuadros 1 y 2). Además, en el caso de las hojas, los valores de la pendiente de la regresión lineal fueron estadísticamente diferentes de 1 en dos evaluadores (25 %), en tanto que, en la segunda evaluación, los valores que se obtuvieron fueron estadísticamente iguales a 1 para todos los evaluadores. En los cálices, la pendiente de la línea fue estadísticamente diferente de 1 en un evaluador (12.5 %), en tanto que en la segunda evaluación, se obtuvieron valores los cuales no fueron estadísticamente diferentes de 1 en todos los evaluadores. Estos resultados muestran que la precisión es buena cuando se utilizan las escalas propuestas para evaluar la severidad del manchado de hojas y cálices de jamaica.

Por otra parte, en todos los casos, los mayores errores absolutos se obtuvieron sin el uso de las escalas. En hojas, sin escala, se obtuvo un rango de 43.81 a -39.48 como valores máximos y mínimos respectivamente, mientras que con las escalas

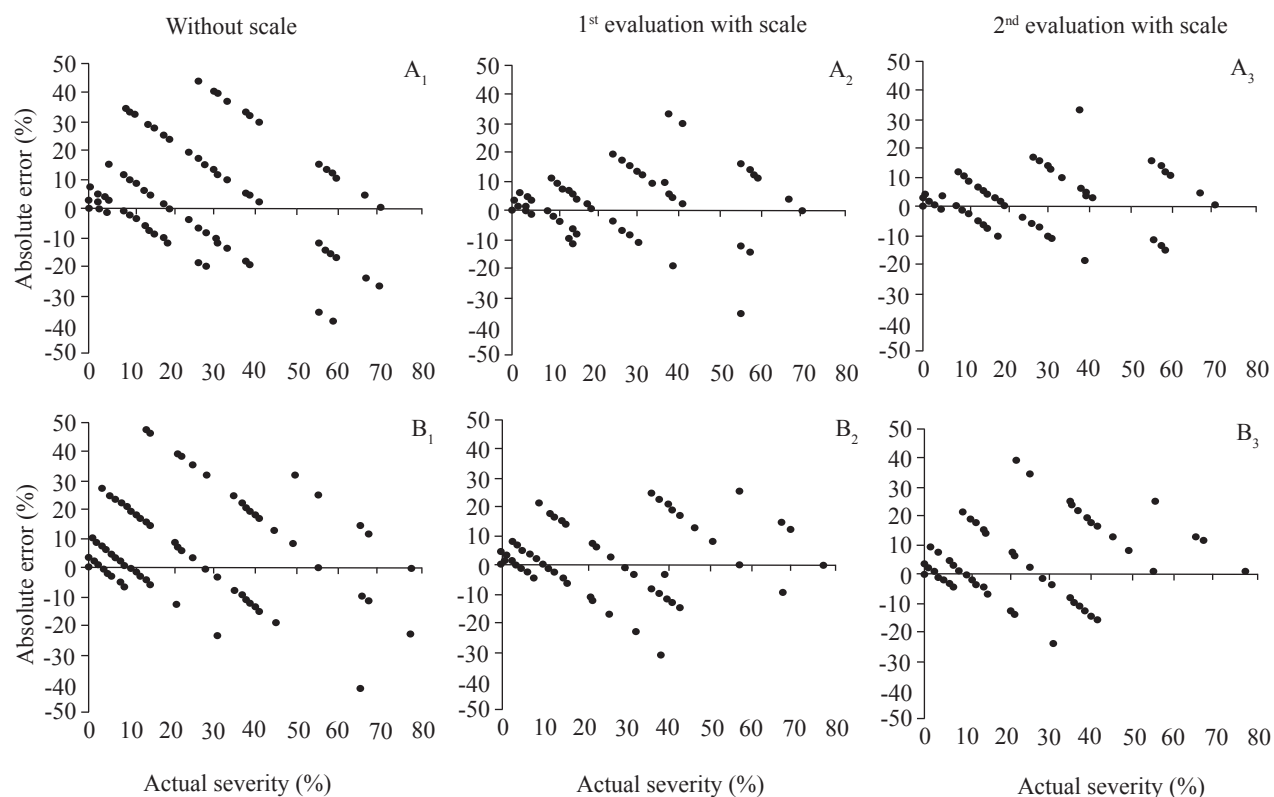


Figure 2. Distribution of residuals (estimated severity – actual severity) of the severity evaluations of spotted leaves and calyces of roselle. (A) Leaves: A1; without scale. A2; first evaluation with scale. A3; second evaluation with scale. (B) Calyces: B1; without scale. B2; first evaluation with scale. B3; second evaluation with scale.

Figura 2. Distribución de residuales (severidad estimada – severidad real) de las evaluaciones de la severidad del manchado de hojas y cálices en jamaica. (A) Hojas: A1; sin escala. A2; primera evaluación con escala. A3; segunda evaluación con escala. (B) Cálices: B1; sin escala. B2; primera evaluación con escala. B3; segunda evaluación con escala.

Diagrammatic scales were reproducible. In the case of leaves, without the use of the scale, the r^2 values were 0.39 to 0.86 with 0.69 average. By using the scale, the r^2 values were from 0.81 to 0.95 and from 0.83 to 0.96 in the first and second evaluations respectively (0.88 average), and they were >0.80 in 100 % of the combinations of evaluators (Table 3). In calyces, without the use of the scale, the r^2 values were from 0.46 to 0.90, and 0.68 average. With scale, the r^2 values were from

el rango promedio fue de 32.28 a -27.95 en ambas evaluaciones. En cálices, sin las escalas, se obtuvo un rango de 47.13 a -63.45, y cuando se utilizaron las escalas, el rango promedio de las dos evaluaciones fue de 31.46 a -27.88 (Figura 2). En evaluaciones de hojas, sin las escalas, 30.5 % de los errores absolutos estuvieron fuera de -10 y +10, mientras que en cálices el valor fue de 34.25 %. Con el uso de las escalas, estos valores fueron de 21.75 % y 19.5 %, y de 23.75 % y 23.0 %, en la primera y la

Table 3. Coefficient of determination (r^2) of the linear regression equation related to the estimations of severity of spotted leaves of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) induced by *Corynespora cassiicola* between evaluators in pairs, with and without diagrammatic scale.

Cuadro 3. Coeficiente de determinación (r^2) de la ecuación de la regresión lineal relacionada con las estimaciones de la severidad del manchado de hojas en jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) inducida por *Corynespora cassiicola* entre evaluadores en pares, con y sin escala diagramática.

Evaluators	e2	e3	e4	e5	e6	e7	e8
Without scale							
e1	0.86	0.72	0.68	0.81	0.75	0.53	0.74
e2		0.75	0.77	0.80	0.71	0.46	0.84
e3			0.71	0.76	0.77	0.39	0.76
e4				0.63	0.69	0.51	0.65
e5					0.79	0.55	0.76
e6						0.46	0.70
e7							0.68
First evaluation with scale.							
e1	0.92	0.84	0.91	0.84	0.85	0.81	0.83
e2		0.83	0.88	0.82	0.85	0.87	0.84
e3			0.84	0.84	0.90	0.88	0.95
e4				0.83	0.88	0.84	0.86
e5					0.91	0.86	0.90
e6						0.83	0.94
e7							0.89
Second evaluation with scale.							
e1	0.89	0.87	0.90	0.86	0.91	0.89	0.90
e2		0.83	0.93	0.85	0.89	0.84	0.87
e3			0.91	0.89	0.88	0.90	0.85
e4				0.89	0.89	0.91	0.91
e5					0.90	0.87	0.86
e6						0.93	0.96
e7							0.96

0.81 to 0.95, and from 0.83 to 0.96 in the first and second evaluations, respectively, (0.84 average) and they were ≥ 0.80 in 82.14 % of the cases (Table 4).

DISCUSSION

The diagrammatic scales improve the accuracy and precision of the evaluation of the severity of different diseases (Tovar-Soto *et al.*, 2002; Barbosa *et al.*, 2006) by allowing a better approach of the actual percentage of affected tissue. With the scales developed in this research, the precision and

segunda evaluaciones de hojas y cálices, respectivamente.

Las escalas diagramáticas fueron reproducibles. En el caso de las hojas, sin las escalas, los valores de r^2 fueron de 0.39 a 0.86 con un promedio de 0.69. Utilizando las escalas, los valores de r^2 fueron de 0.81 a 0.95, y de 0.83 a 0.96, en la primera y la segunda evaluaciones, respectivamente (0.88 en promedio), y fueron > 0.80 en 100 % de las combinaciones de evaluadores (Cuadro 3). En los cálices, sin el uso de las escalas, los valores de r^2 fueron de 0.46 a 0.90 (0.68 en promedio). Con las escalas, los valores de r^2 fueron de 0.81 a 0.95, y de 0.83 a 0.96,

Table 4. Coefficient of determination (r^2) of the linear regression equation related to the estimations of severity of spotted calyces of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) induced by *Corynespora cassiicola* between evaluators in pairs, with and without diagrammatic scale.**Cuadro 4.** Coeficiente de determinación (r^2) de la ecuación de la regresión lineal relacionada con los estimados de la severidad del manchado de cálices en jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) inducida por *Corynespora cassiicola* entre evaluadores en pares, con y sin escala diagramática.

Evaluators	e2	e3	e4	e5	e6	e7	e8
Without scale							
e1	0.63	0.64	0.64	0.63	0.47	0.83	0.63
e2		0.75	0.69	0.73	0.64	0.62	0.68
e3			0.87	0.90	0.60	0.65	0.80
e4				0.82	0.59	0.70	0.76
e5					0.63	0.61	0.82
e6						0.46	0.55
e7							0.76
First evaluation with scale.							
e1	0.79	0.87	0.81	0.92	0.90	0.88	0.91
e2		0.81	0.84	0.74	0.78	0.80	0.73
e3			0.85	0.82	0.93	0.86	0.80
e4				0.78	0.91	0.77	0.77
e5					0.86	0.87	0.86
e6						0.83	0.86
e7							0.87
Second evaluation with scale.							
e1	0.93	0.76	0.85	0.89	0.86	0.82	0.91
e2		0.81	0.91	0.87	0.90	0.88	0.91
e3			0.76	0.79	0.84	0.87	0.80
e4				0.86	0.85	0.82	0.83
e5					0.83	0.83	0.85
e6						0.88	0.81
e7							0.81

accuracy of the severity spotted leaves and calyces of roselle, was improved; this improvement has been observed in the severity assessment of other diseases (Capucho *et al.*, 2011; Mengue *et al.*, 2013). Besides, in the present study the evaluations were made by people inexperienced in this activity.

The r^2 values obtained for the scales developed in leaves and calyces were ≥ 0.85 , therefore, they are considered accurate (Belan *et al.*, 2014). Godoy *et al.* (2006) evaluated the severity of soy rust induced by *Phakopsora pachyrhizi* with and without diagrammatic scale, and they determined that the r^2 values improved when the scale was used. In addition, numerous authors have found that when

en la primera y la segunda evaluaciones, respectivamente (0.84 en promedio), y fueron ≥ 0.80 en 82.14% de los casos (Cuadro 4).

DISCUSIÓN

Las escalas diagramáticas mejoran la exactitud y la precisión en la evaluación de la severidad de diferentes enfermedades (Tovar-Soto *et al.*, 2002; Barbosa *et al.*, 2006), al permitir una mejor estimación del porcentaje real de tejido afectado. Con las escalas desarrolladas en este estudio, se mejoró la precisión y exactitud en las estimaciones de la

scales are used to assess severity, the estimates are more accurate (Michereff *et al.*, 2006).

In studies conducted in agricultural pathosystems, there have been tendencies to overestimation when no scales are used (Capucho *et al.*, 2011; Belan *et al.*, 2014). However, there have also been some cases of underestimation (Gomes *et al.*, 2004). In the present study, when evaluations without scales were carried, there were tendencies to overestimation of 50 % in leaves, i.e. overestimates and underestimates were present in the same proportion. However, in calyces there were tendencies to overestimation in 81.25 % of the evaluators, without scales.

As for the evaluated hypotheses for the intercept (b_0) and the slope (b_1), they had more rejections in leaves and calyces when the scales were not used (Tables 1 and 2), similar results have been obtained by other authors (Michereff *et al.*, 2006; Librelon *et al.*, 2015). In the first evaluation with scale in leaves, two slope values were different from 1. In calyces, only one value was significantly different from 1. Additionally, in the second evaluations for leaves and calyces with scale, in any case, there were no significantly different values from 0 and 1 for the intercept and the slope, respectively. Therefore, the evaluations for leaves and calyces are considered accurate with the use of scales. In Mexico, actually using diagrammatic scales are part of regional system assessment coffee rust (*Hemileia vastatrix*), where 60 trained evaluators located in the coffee producing regions, is assessed weekly severity of the disease in field, through data platform assessments and the accuracy and precision are concentrated. This is part of robust evaluation system diseases, important epidemiological surveillance systems (Mora-Aguilera *et al.*, 2014; DGSV-CNRF, 2016).

According to the criteria used in evaluations of scale, absolute errors values below 5 % are considered excellent, while up to 10 % are

severidad del manchado de hojas y cálices de jamaica. Esta mejora, ha sido observada al evaluar la severidad de otras enfermedades (Capucho *et al.*, 2011; Mengue *et al.*, 2013). Cabe mencionar que las evaluaciones del presente estudio las realizaron personas sin experiencia en esta actividad.

Los valores de r^2 que se obtuvieron con las escalas en hojas y cálices fueron ≥ 0.85 , y por tanto se consideran precisas (Belan *et al.*, 2014). Godoy *et al.* (2006) evaluaron la severidad de la roya en soya inducida por *Phakopsora pachyrhizi*, con y sin escalas diagramáticas, y concluyeron que los valores de r^2 mejoraron cuando se utilizaron las escalas. Además, numerosos autores han comprobado que cuando se utilizan escalas para evaluar la severidad, se obtienen estimaciones más precisas (Michereff *et al.*, 2006).

En estudios realizados en patosistemas agrícolas, se han observado tendencias a la sobreestimación cuando no se utilizan escalas diagramáticas (Capucho *et al.*, 2011; Belan *et al.*, 2014). Sin embargo, también se han registrado algunos casos de subestimación (Gomes *et al.*, 2004). En el presente estudio en evaluaciones sin escalas, en término absolutos hubo una sobreestimación del 50 % en hoja, es decir, las sobreestimaciones y subestimaciones se presentaron en la misma proporción. No obstante, en cálices se observaron tendencias a la sobreestimación en 81.25 % de los evaluadores sin el uso de la escala.

Respecto a las hipótesis evaluadas para el intercepto (b_0) y la pendiente (b_1), se observaron más rechazos en hojas y cálices cuando no se utilizaron las escalas (Cuadros 1 y 2); otros autores han obtenido resultados similares (Michereff *et al.*, 2006; Librelon *et al.*, 2015). En la primera evaluación en hojas con el uso de la escala, dos valores de la pendiente fueron diferentes de 1. En cálices, solo un valor fue significativamente diferente de 1. Mientras que, en la segunda evaluación de las hojas y los

acceptable (Nutter Jr. and Schultz, 1995). In this study, a tendency to decrease the absolute errors was observed, especially in this range when the scales were used. In leaves with the use of the scales, the absolute error between -10 and +10 of the first and second evaluations was 79.38 % in average, and 76.63 % in calyces. While, without scales, were 69.5 % and 65.75 % for leaves and calyces, respectively. Similar results have been obtained by Celoto and Papa (2010) and Belan *et al.* (2014).

The reproducibility of the estimates was determined by the r^2 value of the linear regression between evaluators in pairs with and without scale. Without the use of scales, a 0.69 r^2 value was obtained for leaves, and 0.68 for calyces. The highest r^2 values were obtained when using the scales (the average of the first and second evaluations was 0.88 and 0.84, in leaves and calyces, respectively), besides r^2 values ≥ 0.80 were obtained in 100 % of the combinations between evaluators for leaves; while in evaluations for calyces, in more than 80 % of the cases the r^2 values were ≥ 0.80 . Similar results have been obtained in evaluations of diagrammatic scales for severity in other plant pathosystems (Belan *et al.*, 2014). The above demonstrates that estimations with the scales developed in this research were reproducible.

CONCLUSIONS

The diagrammatic logarithmic scales of six classes proposed to assess severity the spotted leaves and calyces of roselle, induced by *Corynespora cassiicola*, provided good accuracy, precision and reproducibility of the estimates.

cálices, utilizando las escalas, en todos los casos, no se observaron valores significativamente diferentes de 0 y 1 para el intercepto y la pendiente, respectivamente. Por tanto, se considera que las evaluaciones de hojas y cálices fueron exactas cuando se utilizaron las escalas. En México, recientemente las escalas diagramáticas se utilizan como parte de un sistema regional de evaluación de severidad de la roya del café (*Hemileia vastatrix*), en el cual 60 evaluadores debidamente capacitados ubicados en las zonas productoras de café, evalúan semanalmente la severidad de ésta enfermedad en campo, a través de una plataforma en la que se concentran los datos de exactitud y precisión. Lo anterior forma parte de un sistema robusto de evaluación de enfermedades, esenciales en sistemas de vigilancia epidemiológica (Mora-Aguilera *et al.*, 2014; DGSV-CNRF, 2016).

De acuerdo con los criterios aplicados en las evaluaciones de escalas, valores de errores absolutos menores a 5 % se consideran excelentes, y valores de hasta 10 % son aceptables (Nutter Jr. y Schultz, 1995). En este estudio, se observó que los valores absolutos tendieron a reducir, sobre todo en éste rango cuando se utilizaron las escalas. En hojas, cuando se utilizaron las escalas, el error absoluto de entre -10 y +10 en la primera y segunda evaluaciones fue de 79.38 % en promedio, y de 76.63 % en cálices. Sin las escalas, fueron de 69.5 % y 65.75 % para las hojas y los cálices, respectivamente. Celoto y Papa (2010) y Belan *et al.* (2014) obtuvieron resultados similares.

La reproducibilidad de las estimaciones fue determinada por el valor de r^2 de la regresión lineal entre los evaluadores en pares, con y sin las escalas. Sin utilizar las escalas, el valor de r^2 fue de 0.69 en hojas, y de 0.68 en cálices. Los valores más altos de

Acknowledgements

The first author is grateful to CONACYT by the scholarship assigned to doctoral studies. The project “163972” of Fondo Sectorial SAGARPA-CONACYT by have financed this research. To the technicians of the Consejo Estatal de la Jamaica and Desarrollo Rural de Tecoaapa, Guerrero, by have participated in validations of logarithmic scales.

REFERENCES

- Belan LL, Pozza EA, Freitas MLO, Souza RM, Jesus Junior WC and Oliveira JM. 2014. Diagrammatic scale for assessment of bacterial blight in coffee leaves. *Journal of Phytopathology* 162:801-810. <http://dx.doi.org/10.1111/jph.12272>
- Barbosa MAG, Michereff SJ and Mora-Aguilera G. 2006. Elaboration and validation of diagrammatic key to evaluate white rust severity in chrysanthemum. *Summa Phytopathologica* 32:57-62. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052006000100008>.
- Capucho AS, Zambolim L, Duarte HSS and Vaz GRO. 2011. Development and validation of a standard area diagram set to estimate severity of leaf rust in *Coffea arabica* and *C. canephora*. *Plant Pathology* 60:1144-1150. doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02472.x
- Celoto MIB and Papa MFS. 2010. Design and validation of diagrammatic scale for assessment of target spot in Barbados cherry leaf. *Tropical Plant Pathology* 35:258-262. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762010000400010>
- DGSV-CNRF. Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria de la Roya del Café 2016. <http://royacafe.lanref.org.mx/index.php> (Acceded, July 2016)
- Godoy CV, Koga LJ and Canteri MC. 2006. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitopatologia Brasileira* 31:63-68. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582006000100011>
- Gomes AMA, Michereff SJ and Mariano RLR. 2004. Elaboracao e validacao de escala diagramatica para cercosporiose da alfaca. *Summa Phytopathologica* 30:38-42. Available online: <http://www.anapa.com.br/principal/images/stories/hortalicas/samiescaif.pdf>
- Librelon SS, Souza EA, Pereira R, Pozza EA and Abreu AFB. 2015. Diagrammatic scale to evaluate angular leaf spot severity in primary leaves of common bean. *Australasian Plant Pathology* 44:385-395. doi: 10.1007/s13313-015-0360-9
- Martins MC, Guerzoni RA, Cámara GMdS, Mattiazzi P, Lourenço SA and Amorim L. 2004. Diagrammatic scale for assessment of late season leaf diseases in soybean. *Fitopatologia Brasileira* 29:179-184. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582004000200009>
- Michereff SJ, Noronha MA, Andrade DEGT, Oliveira EP, Filha MS and Moreira PAA. 2006. Development and validation of a diagrammatic key for *Cercospora* leaf spot

r^2 se obtuvieron cuando se utilizaron las escalas (el promedio de la primera y la segunda evaluaciones fue de 0.88 y 0.84, en hojas y cálices, respectivamente); además, se obtuvieron valores de $r^2 \geq 0.80$ en 100% de las combinaciones entre los evaluadores en hojas, mientras que en las evaluaciones en cálices, en más del 80% de los casos los valores de r^2 fueron ≥ 0.80 . Se han obtenido resultados similares en evaluaciones utilizando las escalas diagramáticas para estimar la severidad de enfermedades en otros patosistemas (Belan *et al.*, 2014). Lo anterior demuestra que las estimaciones obtenidas con las escalas desarrolladas en la presente investigación fueron reproducibles.

CONCLUSIONES

Las escalas logarítmicas diagramáticas de seis clases propuestas para evaluar la severidad del manchado de hojas y cálices de jamaica inducido por *Corynespora cassiicola*, proporcionaron buena exactitud, precisión y reproducibilidad en las estimaciones.

Agradecimientos

El primer autor agradece al CONACYT por la beca otorgada para realizar estudios de doctorado. Al proyecto “163972” del Fondo Sectorial SAGARPA-CONACYT por haber financiado la presente investigación. A los técnicos del Consejo Estatal de la jamaica y Desarrollo Rural de Tecoaapa, Guerrero, por su participación en las validaciones de las escalas logarítmicas.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

- of sweet pepper. *Summa Phytopathologica* 32:260-266. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052006000300008>
- Menge D, Makobel M, Shomari S and Tiedemann AV. 2013. Development and validation of a diagrammatic scale for estimation of cashew blight for epidemiological studies. *International Journal of Advanced Research* 1(4):26-38.

- Available online: <http://journaldatabase.info/articles/development-validation-diagrammatic.html>
- Mora-Aguilera G, Acevedo G, Flores J, Dominguez S, Coria J, Hernandez A, Gonzalez R, Lopez A, Sanchez H, Feria J, Trujillo J, Lopez E, Mendez A, Matuz J and Martinez M. 2014. Epidemiological surveillance system for coffee rust disease (*Hemileia vastatrix*) in Mexico: a regional approach. The 25<sup>th</sup> International Conference on Coffee Science. ASIC Colombia 7 p. Available online: <http://www.asic-cafe.org/fr/proceedings/6266/toc/7/conf>
- Nutter Jr. FW and Schultz PM. 1995. Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computer-aided training programs. Canadian Journal of Plant Pathology 17:174-184. <http://dx.doi.org/10.1080/07060669509500709>
- Nutter Jr. FW, Esker PD and Coelho-Netto RA. 2006. Disease assessment concepts and the advancements made in improving the accuracy and precision of plant disease data. European Journal of Plant Pathology 115:95-103. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-005-1230-z>
- Ortega-Acosta SA, Hernández-Morales J, Ochoa-Martínez DL and Ayala-Escobar V. 2015. First report of *Corynespora cassiicola* causing leaf and calyx spot on roselle in Mexico. Plant Disease 99:1041. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-04-14-0438-pdn>
- Osada-Velázquez HK and Mora-Aguilera G. 1997. 2LOG. Programa para desarrollar escalas de severidad por el método de Horsfall y Barratt. Manual del Usuario. Montecillo, estado de México, Colegio de Postgraduados
- SAS Institute. 2002. SAS User's Guide: Statistics, Version 9.0. SAS Institute. Cary, NC.
- SIAP. 2014. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=351](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351). (Accessed, April 2016)
- SMN. 2016. Servicio meteorológico nacional. Comisión Nacional del Agua. Normales climatológicas. Periodo (1981-2010). [http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=182:guerrero&catid=14:normal-es-por-estacion](http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=182:guerrero&catid=14:normal-es-por-estacion) (Accessed, April 2016)
- Tovar-Soto A, Hernández-Martínez M, Cristobal-Alejo J, Romero-Hijo R and Mora-Aguilera G. 2002. Escala logarítmica diagramática de severidad de la mancha negra (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) en Chirimoyo (*Annona cherimola* Mill). Revista Mexicana de Fitopatología 20:103-109. Available online: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61220117>
- UTHSCSA. 2002. Image Tool Version 3.0 Final. S. Brent Dove. [dove@uthscsa.edu](mailto:dove@uthscsa.edu) Dental Diagnostic Science, Last revised: 22 February 2002. Available at: <http://compdent.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>