

# Diagrammatic scale to evaluate the severity of gray mold (*Botrytis cinerea*) in pomegranate

## Escala diagramática para evaluar la severidad del moho gris (*Botrytis cinerea*) en el cultivo de granada

Alberto Patricio-Hernández, Yuridia Mercado-Flores\*, Alejandro Téllez-Jurado, María del Rocío Ramírez-Vargas, Universidad Politécnica de Pachuca, Carretera Pachuca-Cd. Sahagún, Km 20, Rancho Luna, Ex Hacienda de Santa Bárbara, C.P. 43830. Zempoala, Hidalgo, México; Andrés Quezada-Salinas, Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Carretera Federal México-Pachuca, Km 37.5, Avenida Centenario de la Educación, Colonia Santa Ana, C.P. 55740, Tecámac, Estado de México, México.

\*Corresponding author: yuridiamercado@upp.edu.mx

Received: February 26, 2023.

Accepted: August 25, 2023.

Patricio-Hernández A, Mercado-Flores Y, Téllez-Jurado A, Ramírez-Vargas MdelR and Quezada-Salinas A. 2023. Diagrammatic scale to evaluate the severity of gray mold (*Botrytis cinerea*) in pomegranate. Mexican Journal of Phytopathology 41(3): 524-536.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2302-9>

First DOI publication: August 31, 2023.

Primera publicación DOI: 31 de Agosto, 2023.

**Abstract.** The aim of this study was to design and validate a diagrammatic scale to estimate the severity of gray mold induced by *Botrytis cinerea* in pomegranate cultivation. A total of 120 healthy and diseased fruits with varying degrees of affliction were collected from orchards with active production located in the municipalities of Chilcuahutla and Taxquillo in the state of Hidalgo, Mexico (20° 18' 11" N, 99° 14' 23" W, 20° 32' 01" N, 99° 20' 03" W, respectively). From these, 60 were selected to

**Resumen.** El objetivo del presente trabajo fue diseñar y validar una escala diagramática para estimar la severidad del moho gris inducida por *Botrytis cinerea* en el cultivo de granada. Se colectaron 120 frutos sanos y enfermos con diferentes grados de afectación de huertos con producción activa localizados en los municipios de Chilcuahutla y Taxquillo en el estado de Hidalgo, México (20° 18' 11" N, 99° 14' 23" O, 20° 32' 01" N, 99° 20' 03" O, respectivamente), de los cuales, se seleccionaron 60 para determinar el porcentaje de severidad, de acuerdo a una escala de 6 clases (Clase 0 = 0%, Clase 1 = >0% - 5% - 10%, Clase 2 = >10% - 25% - 50%, Clase 3 = >50% - 75% - 85%, Clase 4 = >85% - 90% - 95% y Clase 5 = >95% - 100%) mediante el software 2LOG. Con los datos obtenidos se seleccionaron imágenes representativas para construir la escala diagramática mediante Adobe Photoshop. Se verificó la exactitud ( $r^2$ ), la precisión ( $\beta_0$ ) y la reproducibilidad ( $\beta_1$ ) mediante regresión lineal simple aplicada a los datos obtenidos por 12

determine the severity percentage, according to a 6-class scale (Class 0 = 0%, Class 1 = >0% - 5% - 10%, Class 2 = >10% - 25% - 50%, Class 3 = >50% - 75% - 85%, Class 4 = >85% - 90% - 95%, and Class 5 = >95% - 100%), using the 2LOG software. With the obtained data, representative images were selected to build the diagrammatic scale using Adobe Photoshop. The accuracy ( $r^2$ ), precision ( $\beta_0$ ), and reproducibility ( $\beta_1$ ) were verified by simple linear regression applied to the data obtained by 12 evaluators with and without experience in the observation of plant diseases. As a result, values of  $r^2$  of 0.42 and 0.85 were obtained, without and with the use of the scale, respectively, which confirmed that this tool is suitable to evaluate the severity of the disease accurately and reproducibly.

**Keywords:** Phytosanitary, *Punica granatum*, *Botrytis cinerea*, disease measurement.

Pomegranate is the fruit of the pomegranate tree (*Punica granatum*), which is consumed worldwide and is currently cultivated in Iran, Spain, Italy, Afghanistan, the United States, India, China, Russia, Uzbekistan, Morocco, Greece and Mexico (Koba and Yanagita, 2011). Its production has gained importance due to the functional properties it possesses, which is why various food products such as juices and liquors are produced, in addition to its importance in the cosmetic industry (Ge *et al.*, 2021). In Mexico in 2021, 1,251 ha were cultivated and 8,636 t were produced. The states with the highest harvest volumes were Morelos, Hidalgo and Oaxaca with 1,622, 1,467 and 1,327 t, respectively (SIAP, 2021), destined for both domestic consumption and export. Pomegranate orchards are affected by diseases induced by various microorganisms such as *Alternaria* spp. and *Aspergillus* spp., with the greatest impact

evaluadores con y sin experiencia en la observación de enfermedades en plantas. Como resultado se obtuvieron valores de  $r^2$  de 0.44 sin el uso de la escala, y con el uso de esta herramienta de 0.81 y 0.90 para la primera y segunda evaluación respectivamente, lo cual confirmó que esta herramienta es adecuada para evaluar la severidad de la enfermedad de manera precisa y reproducible.

**Palabras clave:** Fitosanidad, *Punica granatum*, *Botrytis cinerea*, medición de enfermedad.

La granada es el fruto del árbol de granado (*Punica granatum*), la cual es consumida en todo el mundo y actualmente se cultiva en Irán, España, Italia, Afganistán, Estados Unidos, India, China, Rusia, Uzbekistán, Marruecos, Grecia y México (Koba y Yanagita, 2011). Su producción ha cobrado importancia por las propiedades funcionales que posee, por lo que se elaboran diversos productos alimenticios como jugos, zumos y licores, además de que posee importancia en la industria cosmética (Ge *et al.*, 2021). En México, en el año 2021, se cultivaron 1,251 ha en donde se produjeron 8,636 t. Los estados con mayor volumen de cosecha fueron Morelos, Hidalgo y Oaxaca con 1,622, 1,467 y 1,327 t, respectivamente (SIAP, 2021), destinadas tanto para consumo nacional como para la exportación. Por otro lado, los huertos de granado son afectados por enfermedades inducidas por diversos microorganismos tales como *Alternaria* spp y *Aspergillus* spp, siendo las de mayor impacto las que afectan directamente al fruto desde precosecha (Behzad *et al.*, 2020), tal es el caso del moho gris inducido por *Botrytis cinerea*, enfermedad que ha sido reportada principalmente en huertos de granado en Grecia y Pakistán (Bardas *et al.*, 2009; Alam *et al.*, 2018), la cual se presenta posterior a la floración en los comienzos de la formación del fruto, y

being those that directly affect the fruit pre-harvest (Behzad *et al.*, 2020). One such disease is gray mold induced by *Botrytis cinerea*, which has been reported mainly in pomegranate orchards in Greece and Pakistan (Bardas *et al.*, 2009; Alam *et al.*, 2018). It occurs after flowering at the beginning of fruit formation and is characterized by the presence of spots that increase in size, with light to dark brown expanded lesions of soft consistency, followed by the appearance of gray mycelium on infected surfaces. Fruit may remain mummified on the tree. Recently, this phytosanitary problem has been reported in the State of Mexico, Mexico (Patricio-Hernández *et al.*, 2023). Diagrammatic scales could be a useful tool to estimate the severity of gray mold in pomegranate fruits pre- and post-harvest. These tools allow correct interpretation of disease advancement and progress in crops, defined as sets of illustrations of plants or plant organs, with signs and symptoms that show the percentages of area affected by the disease. This is based on the Weber-Fechner principle, which establishes classes in a logarithmic system that eliminates arbitrary designation of severity levels (French and Hebert, 1980). The scales should be quick and simple when used under field and post-harvest conditions, as well as accurate, precise and reproducible (Richard *et al.*, 2021; Vereschuk *et al.*, 2022). To date, no scales for assessing the severity of gray mold on pomegranate fruits have been reported. The objective of the present study was to develop and validate a diagrammatic scale to help growers and technicians assess disease severity.

During the months of July to September 2022, 120 pomegranate fruits with and without symptoms of gray mold (*Botrytis cinerea*) were collected in active production plots located in the municipalities of Chilcuahutla and Taxquillo, Hidalgo, Mexico (20° 18' 11" N, 99° 14' 23" W, 20° 32' 01" N, 99° 20' 03" W, respectively). Subsequently, 60 fruits

que se caracteriza por la presencia de manchas que aumentan de tamaño, con lesiones expandidas de color marrón claro a oscuro de consistencia blanda, seguido de la aparición de micelio gris sobre las superficies infectadas. Los frutos pueden permanecer momificados en el árbol. Recientemente este problema fitosanitario ha sido reportado en el Estado de México, México (Patricio-Hernández *et al.*, 2023), por lo que se requiere de la utilización de escalas diagramáticas para estimar la severidad del moho gris en frutos de granada en pre y postcosecha, las cuales son herramientas que permiten una correcta interpretación del avance y progreso de enfermedades en los cultivos, definiéndose como conjuntos de ilustraciones de plantas u órganos vegetales, con signos y síntomas que muestran los porcentajes del área afectada por la enfermedad con base en el principio de Weber-Fechner, que permite establecer clases en un sistema logarítmico que elimina la designación arbitraria de los niveles de severidad (French y Hebert, 1980), las cuales, deben ser rápidas y simples al usarse bajo condiciones de campo y postcosecha, así como, exactas, precisas y reproducibles (Richard *et al.*, 2021; Vereschuk *et al.*, 2022). Hasta la fecha, no se han reportado escalas para evaluar la severidad del moho gris sobre frutos de granada. El objetivo del presente estudio fue desarrollar y validar una escala diagramática, la cual servirá a los productores y técnicos para evaluar la severidad de la enfermedad.

Durante los meses de julio a septiembre del año 2022 se colectaron 120 frutos de granada con y sin síntomas de moho gris (*Botrytis cinerea*) en parcelas con producción activa ubicadas en los municipios de Chilcuahutla y Taxquillo, Hidalgo, México (20° 18' 11" N, 99° 14' 23" O, 20° 32' 01" N, 99° 20' 03" O, respectivamente). Posteriormente se seleccionaron 60 frutos representativos de los diferentes grados de afectación. Para obtener la severidad real, cada fruto fue dividido a la mitad

representative of the different degrees of damage were selected. To obtain the actual severity, each fruit was divided in half in order to photograph the total surface of each one using a Canon T7 camera (Verechuk *et al.*, 2022).

To eliminate the background, the images were processed with GIMP® v.2.10.12 software. Quantification of the total and affected area was performed using Image Tool v1.8.0. With the obtained data, the actual severity percentage was calculated using the following formula:  $\text{severity} = (\text{diseased area} / \text{total image area}) * 100$  (Nutter Jr *et al.*, 2006; Ortega-Acosta *et al.*, 2016). The data were used to define the minimum and maximum values of actual severity, which were then used to generate a logarithmic scale with six classes, using the 2LOG v.1 software (Mora-Aguilera and Acevedo-Sánchez, 2018). This follows the Weber-Fechner visual acuity law (Horsfall and Cowling, 1978). The obtained data were used to construct the diagrammatic scale with Adobe Photoshop software (Fantin *et al.*, 2018).

To validate the diagrammatic scale, 60 digital images representative of different degrees of severity were randomly inserted into individual slides to be visualized in Microsoft 365® PowerPoint and presented to 18 evaluators with and without experience in observing plant diseases. They carried out independent evaluations with approximately 20 s per image for visualization. Data from this first evaluation were expressed as percentage of severity (Fragoso-Benhumea *et al.*, 2022). For the first and second evaluations using the scale, 12 evaluators were selected based on the number of correct scores in the evaluation without the scale and their willingness for subsequent participation (Belan *et al.*, 2014). Each evaluation was carried out with an interval of 7 days between them.

To quantify the accuracy of the severity evaluations made by the evaluators, a simple

para poder tomar fotografías de la superficie total de cada uno con una cámara fotográfica profesional Canon T7 (Verechuk *et al.*, 2022).

Para eliminar el fondo, las imágenes fueron procesadas con el software GIMP® v.2.10.12. La cuantificación del área total y afectada se realizó con Image Tool v1.8.0. Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de severidad real mediante la siguiente fórmula:  $\text{severidad} = (\text{área enferma} / \text{área total de la imagen}) * 100$  (Nutter Jr *et al.*, 2006; Ortega-Acosta *et al.*, 2016). Los datos se utilizaron para definir los valores mínimos y máximos de severidad real, los cuales se utilizaron para generar una escala logarítmica con seis clases, con el software 2LOG v.1 (Mora-Aguilera y Acevedo-Sánchez, 2018), el cual sigue la ley de agudeza visual de Weber-Fechner (Horsfall y Cowling, 1978). Los datos obtenidos se utilizaron para construir la escala diagramática con el software Adobe Photoshop (Fantin *et al.*, 2018).

Para validar la escala diagramática, 60 imágenes digitales representativas de los diferentes grados de severidad se insertaron aleatoriamente en diapositivas individuales para ser visualizadas en Microsoft 365® Power Point y presentadas a 18 evaluadores con y sin experiencia en la observación de enfermedades en plantas, quienes realizaron evaluaciones en forma independiente en un tiempo aproximado de 20 s/imagen para su visualización. Los datos de esta primera evaluación se expresaron como porcentaje de severidad (Fragoso-Benhumea *et al.*, 2022). Para la primera y segunda evaluación con la escala se seleccionaron 12 evaluadores tomando como criterio la cantidad de aciertos en la evaluación sin la escala y su disposición para su participación subsecuente (Belan *et al.*, 2014). Cada evaluación se realizó con un intervalo de 7 días entre cada una.

Para cuantificar la exactitud de las evaluaciones de severidad que hicieron los evaluadores, se realizó una regresión lineal simple para verificar

linear regression was performed to verify the following hypotheses: for the intercept ( $\beta_0$ ) the null hypothesis  $H_0: \beta_0=0$  versus  $H_1: \beta_0 \neq 0$  and for the slope coefficient ( $\beta_1$ )  $H_0: \beta_1=1$  versus  $H_1: \beta_1 \neq 1$ , with a significance level of 5%, using a t-test. The actual values obtained were used as the independent variable and the estimated values per evaluator were used as the dependent variable (Da Silva *et al.*, 2019). This took into account that if the estimated values of the slope differ from 0, they indicate overestimation of the real severity when  $\beta_0 > 0$  and underestimation if  $\beta_0 < 0$ . Similarly, if the slope data differ from 1, they indicate overestimation of disease ( $>1$ ) or underestimation ( $<1$ ) at all disease severity levels (Nutter Jr. and Schultz, *et al.*, 1995; Nutter *et al.*, 2006; Ortega-Acosta *et al.*, 2016).

Additionally, the precision of the estimation was determined by the coefficient of determination ( $r^2$ ) of the linear regression and the absolute error was plotted. Furthermore, a paired data analysis per evaluator was performed. Statistical analyses were conducted using the Rstudio program (<http://www.rstudio.com/>).

From field collections in the municipalities of Chilcuautla and Taxquillo, Hidalgo, 120 fruits were obtained, of which 60 were selected based on their actual degree of severity. Those with 0% severity were considered healthy, while those showing signs and symptoms of gray mold were characterized by the presence of brown lesions originating at the base of the calyx and advancing towards the peduncle, causing rotting of the infected area with values ranging from 5 to 100%.

Based on the percentages of damaged area of the 60 selected fruits, the 2LOG program allowed the definition of six severity classes. The ranges and midpoints of each class (0, 1, 2, 3, 4 and 5) were expressed as percentage of affected area: Class 0= 0%, Class 1 = ( $>1 - 5 - 10$ )%, Class 2 = ( $>11 - 25 - 50$ )%, Class 3 = ( $>51 - 75 - 85$ )%, Class 4 = ( $>86 - 90 - 95$ )% and Class 5 = ( $>96 - 100$ )% (Figure 1).

las siguientes hipótesis: para el intercepto ( $\beta_0$ ) la hipótesis nula  $H_0: \beta_0=0$  versus  $H_1: \beta_0 \neq 0$  y para el coeficiente de la pendiente ( $\beta_1$ )  $H_0: \beta_1=1$  versus  $H_1: \beta_1 \neq 1$ , con un nivel de significancia del 5%, utilizando una prueba t, teniendo como variable independiente los valores reales obtenidos y como variable dependiente los valores estimados por evaluador (Da Silva *et al.*, 2019), tomando en cuenta que si los valores estimados de la pendiente son diferentes de 0, indican una sobreestimación de la severidad real cuando  $\beta_0 > 0$  y una subestimación si  $\beta_0 < 0$ . De igual manera si los datos de la pendiente son diferentes de 1, indican sobreestimación de la enfermedad ( $>1$ ) o una subestimación ( $<1$ ) en todos los niveles de severidad de la enfermedad (Nutter Jr. y Schultz, *et al.*, 1995; Nutter *et al.*, 2006; Ortega-Acosta *et al.*, 2016).

También, la precisión de la estimación fue determinada por el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de la regresión lineal y se graficó el error absoluto, además se realizó un análisis de datos pareados por evaluador. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Rstudio (<http://www.rstudio.com/>).

A partir de colectas en campo en los municipios de Chilcuautla y Taxquillo, Hgo., se obtuvieron 120 frutos de los cuales se seleccionaron 60 con base a su grado de severidad real. Aquellos con 0% de severidad fueron considerados sanos y los que presentaron signos y síntomas de moho gris, se caracterizaron por la presencia de lesiones marrones que se originaron en la base del cáliz y avanzaron hacia el pedúnculo lo que ocasiona pudrición del área infectada con valores desde 5 a 100% de afectación.

Con base en los porcentajes de área dañada de los 60 frutos seleccionados, el programa 2LOG permitió definir 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: Clase 0= 0, Clase 1 = ( $>1 - 5 - 10$ ), Clase



Figure 1. Diagrammatic scale for evaluation of gray mold (*Botrytis cinerea*) severity on pomegranate (*Punica granatum*) fruit. Severity intervals for each class are shown in parentheses.

Figura 1. Escala diagramática para evaluar severidad del moho gris (*Botrytis cinerea*) sobre frutos de granada (*Punica granatum*). Entre paréntesis se muestran los intervalos de severidad para cada clase.

The accuracy of the evaluations showed significant differences with and without the use of the designed scale. When the scale was not used, the  $r^2$  values ranged from 0.06 to 0.87 with a mean of 0.44. However, with the use of the scale, the results were from 0.71 to 0.93 for the first evaluation and from 0.70 to 0.97 for the second evaluation, with mean values of 0.81 and 0.90, respectively. Therefore, the estimations were accurate (Table 1).

2 = (>11 - 25 - 50), Clase 3 = (>51 - 75 - 85), Clase 4 = (>86 - 90 - 95) y Clase 5 = (>96 - 100) (Figura 1).

La exactitud de las evaluaciones mostró diferencias significativas con y sin el uso de la escala diseñada. Cuando ésta no fue utilizada, los valores de  $r^2$  variaron de 0.06 a 0.87 con una media de 0.44, sin embargo, con el uso de la escala los resultados fueron de 0.71 a 0.93, para la primera evaluación

**Table 1. Intercept ( $\beta_0$ ), slope ( $\beta_1$ ) and coefficient of determination ( $r^2$ ) of the linear regression equation of visual estimates of gray mold severity in *Punica granatum* fruits, performed with and without diagrammatic scaling.**

**Cuadro 1. Intercepto ( $\beta_0$ ), pendiente ( $\beta_1$ ) y coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de la ecuación de regresión lineal de las estimaciones visuales de la severidad del moho gris en frutos de *Punica granatum*, realizadas con y sin escala diagramáticas.**

	Coeficientes														
	Sin Escala					Con escala									
						Primera Evaluación					Segunda Evaluación				
	$\beta_0$		$\beta_1$		$r^2$	$\beta_0$		$\beta_1$		$r^2$	$\beta_0$		$\beta_1$		$r^2$
EV1	11.96	ns	0.97	ns	0.68	0.05	ns	1.00	ns	0.93	0.25	*	0.93	ns	0.82
EV2	6.47	*	0.43	ns	0.37	0.10	ns	0.82	ns	0.72	0.09	ns	0.99	ns	0.91
EV3	20.85	ns	0.67	ns	0.32	0.25	*	0.89	ns	0.84	0.03	ns	1.04	ns	0.94
EV4	18.81	ns	0.69	ns	0.28	0.24	ns	1.83	ns	0.72	-0.03	ns	1.01	ns	0.94
EV5	4.06	ns	0.88	ns	0.61	0.11	ns	1.02	ns	0.86	0.00	ns	1.10	ns	0.86
EV6	13.04	ns	0.59	ns	0.36	0.11	ns	1.05	ns	0.78	0.03	ns	1.01	ns	0.96
EV7	12.27	ns	0.81	ns	0.68	0.09	ns	0.91	ns	0.77	0.27	*	0.88	ns	0.85
EV8	9.92	*	0.77	ns	0.54	0.14	ns	0.96	ns	0.85	-0.04	ns	1.03	ns	0.96
EV9	16.15	ns	0.38	ns	0.20	0.07	ns	0.96	ns	0.89	0.76	ns	0.96	ns	0.88
EV10	54.63	ns	0.29	*	0.06	0.09	ns	1.01	ns	0.75	0.04	ns	0.99	ns	0.97
EV11	-1.65	ns	0.95	ns	0.87	0.15	ns	0.94	ns	0.71	0.16	ns	0.94	ns	0.70
EV12	14.13	ns	0.56	ns	0.33	-0.05	ns	1.00	ns	0.86	0.03	ns	1.01	ns	0.96
					0.44					0.81					0.90

\* Means that the null hypotheses for the intercept ( $H_0: \beta_0=0$ ) and slope ( $H_0: \beta_1=1$ ) were rejected by t-test ( $P=0.05$ ). ns= Not significant. EV= Evaluator. / \*Significa que las hipótesis nulas para el intercepto ( $H_0: \beta_0=0$ ) y pendiente ( $H_0: \beta_1=1$ ) fueron rechazadas por la prueba t ( $P=0.05$ ). ns= No significativo. EV= Evaluador

Regarding the linear regression results, in the evaluation where the scale was not used, the intercept values were greater than one, indicating overestimation of severity by most evaluators. In the case of the slope values, for evaluator 10 (EV10) it was significantly different from 1, however, there

y de 0.70 a 0.97 para la segunda evaluación, con valores de media de 0.81 y 0.90, respectivamente, por lo tanto, las estimaciones fueron precisas (Cuadro 1).

Respecto a los resultados de la regresión lineal, en la evaluación donde no se utilizó la escala, los

was a tendency toward underestimation, with the exception of EV1 and EV11 that showed values closer to 1 (Table 1).

In the initial evaluation employing the scale, the intercept values showed a tendency to overstate disease severity. Specifically, EV3's intercept significantly deviated from 0. As for the slope values, EV4, EV5, EV6 and EV10 showed overestimation compared to the other evaluators. In the second evaluation, EV4 and EV5 demonstrated an underestimation of severity, as reflected by values exceeding 1. Meanwhile, EV1 and EV7 yielded statistically distinct values from 0. Concerning the slope, none of the data exhibited significant differences, although their values closely approximated 1 (Table 1).

In general, concentrating on the evaluations conducted with the scale and considering the null hypotheses ( $H_0: \beta_0=0$  and  $H_0: \beta_1=1$ ), it is observable that  $\beta_0$  maintained proximity to 0 across all evaluators. Likewise,  $\beta_1$  uniformly hovered around 1. This confirms that using the diagrammatic scale of gray mold severity allows obtaining values of precision and accuracy close to those of real severity, even when there are slight tendencies of underestimation and overestimation. This statement is reinforced when comparing the absolute error values of the evaluations, where a decrease in absolute error is observed when using the designed scale (Figure 2).

The combinations of the  $r^2$  values of the evaluations showed that the scales are reproducible. Where the diagrammatic scale was not used, an interval of 0.13 to 0.77, with a mean of 0.44, was obtained. With the scale, the  $r^2$  intervals were 0.72 to 0.91, and 0.76 to 0.97, in the first and second evaluations, respectively, with an overall mean value of 0.85 (Table 2).

The use of diagrammatic scales is efficient in evaluating disease severity in plants (Fantin *et al.*,

valores del intercepto fueron mayores a uno, indicando sobreestimación de la severidad por la mayoría de los evaluadores. En el caso de los valores de la pendiente, para el evaluador 10 (EV10) fue significativamente diferente de 1, sin embargo, hubo tendencia a la subestimación, a excepción de EV1 y EV11 que mostraron valores más cercanos a 1 (Cuadro 1).

Para la primera evaluación donde se utilizó la escala, los valores del intercepto mostraron una tendencia a la sobreestimación de la severidad de la enfermedad, donde para el EV3 fue significativamente diferente de 0. En cuanto a los valores de la pendiente, el EV4, EV5, EV6 y EV10 mostraron sobrestimación con respecto al resto de los evaluadores. En la segunda evaluación, el EV4 y EV5 subestimaron la severidad al obtener valores mayores a 1, por otro lado, para el EV1 y EV7 los valores fueron estadísticamente diferentes de 0. Para el caso de la pendiente, ninguno de los datos mostró diferencia significativa, sin embargo, sus valores fueron cercanos a 1 (Cuadro 1).

En general, tomando énfasis en las evaluaciones donde se utilizó la escala y con base en las hipótesis nulas ( $H_0: \beta_0=0$  y  $H_0: \beta_1=1$ ),  $\beta_0$  presentó valores cercanos a 0 para todos los evaluadores, mientras que para  $\beta_1$  todos estuvieron alrededor de 1, esto confirma que el uso de la escala diagramática de severidad del moho gris permite obtener valores de precisión y de exactitud cercanos a los de severidad real, aun cuando existen ligeras tendencias de subestimación y sobreestimación de los mismos. Esta afirmación se ve reforzada al comparar los valores de error absoluto de las evaluaciones, donde se observa una disminución del mismo al utilizar la escala diseñada en este trabajo (Figura 2).

Las combinaciones de los valores de  $r^2$  de las evaluaciones mostraron que las escalas son reproducibles. En donde no se utilizó la escala diagramática se obtuvo un intervalo de 0.13 a 0.77, con una



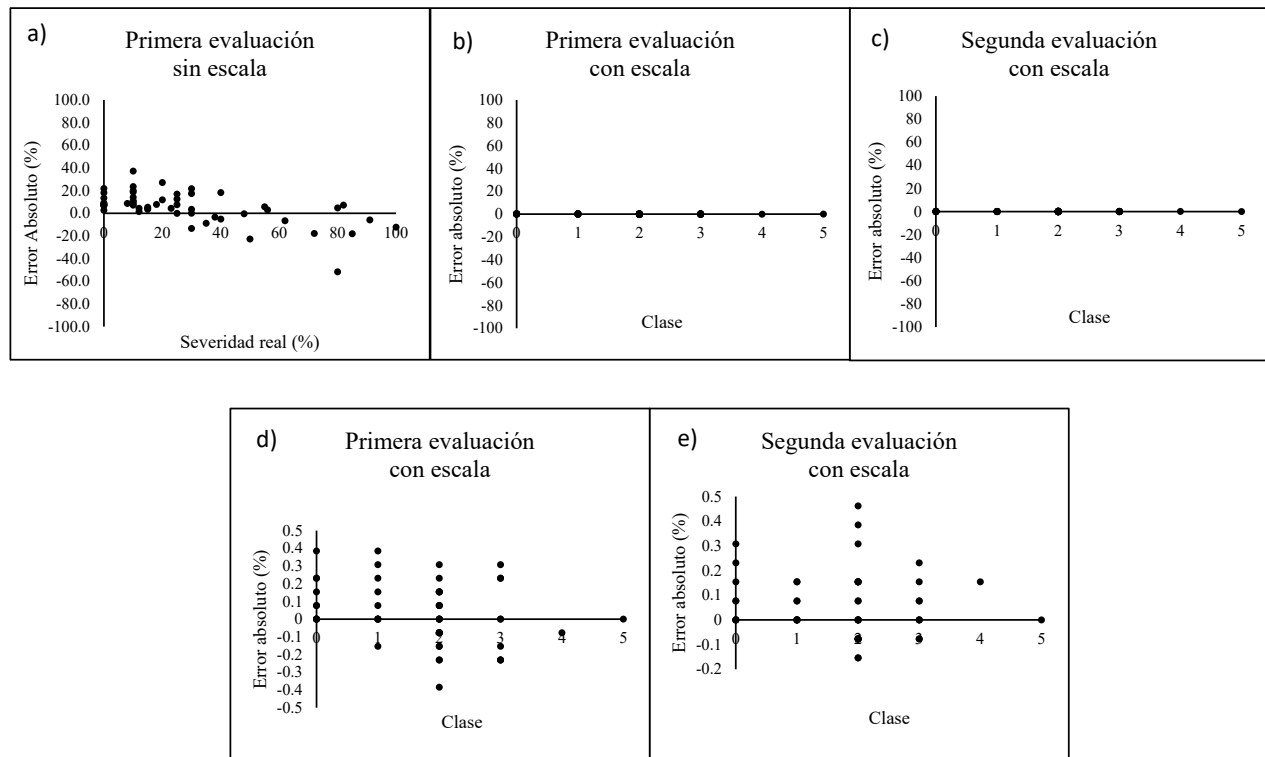


Figure 2. Graphical representation of the absolute error of the estimates of gray mold severity in pomegranate fruits. a) Evaluation carried out without support of the diagrammatic scale, b) and c) Evaluations carried out with support of the diagrammatic scale, d) and e) Representation of b) and c) at a smaller scale of absolute error.

Figura 2. Representación gráfica del error absoluto de las estimaciones de la severidad del moho gris en frutos de granada. a) evaluación realizada sin apoyo de la escala diagramática, b) y c) evaluaciones realizadas con apoyo de la escala diagramática. d) y e) representación de los incisos b) y c) a menor escala del error absoluto.

2018). Recently, the presence of gray mold caused by *B. cinerea* on pomegranate fruits in Mexico was reported (Patricio-Hernández *et al.*, 2023), and to our knowledge, a diagrammatic scale for evaluating the severity of this disease has not been officially reported. The scale developed in the present investigation allows reliable evaluation of the severity of this disease with greater precision and accuracy. When the scale was not used, the average  $r^2$  value was 0.44, while in the first and second evaluations with the scale, averages of 0.81 and 0.90 were obtained, respectively. This represents a significant increase, agreeing with

media de 0.44. Con las escalas, los intervalos de  $r^2$  fueron de 0.72 a 0.91, y de 0.76 a 0.97, en la primera y segunda evaluación, respectivamente, con un valor medio global de 0.85 (Cuadro 2).

El uso de escalas diagramáticas es eficiente en la evaluación de la severidad de las enfermedades en plantas (Fantin *et al.*, 2018). Recientemente se reportó la presencia de moho gris causado por *B. cinerea* en frutos de granada en México (Patricio-Hernández *et al.*, 2023), y hasta donde se sabe no se ha reportado oficialmente una escala diagramática para evaluar la severidad de dicha enfermedad. La escala desarrollada en la presente investigación,

**Table 2. Coefficient of determination ( $r^2$ ) of linear regression equations relating paired evaluator estimates of gray mold severity caused by *B. cinerea* on pomegranate fruit. Comparisons are made between evaluations done without use of the scale, versus the first and second evaluations where the scale was used.**

**Cuadro 2. Coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de las ecuaciones de regresión lineal que relacionan entre evaluadores pareados las estimaciones de la severidad del moho gris causada por *B. cinerea* en frutos de granada sin el uso de la escala, en contraste con la primera y segunda evaluación en donde si se usó el mismo.**

Evaluación sin escala	EV2	EV3	EV4	EV5	EV6	EV7	EV8	EV9	EV10	EV11	EV12
EV1	0.52	0.50	0.48	0.64	0.52	0.68	0.61	0.44	0.37	0.77	0.50
EV2		0.34	0.32	0.49	0.36	0.52	0.45	0.28	0.21	0.62	0.35
EV3			0.30	0.46	0.34	0.50	0.43	0.26	0.19	0.59	0.32
EV4				0.45	0.32	0.48	0.41	0.24	0.17	0.57	0.30
EV5					0.49	0.64	0.57	0.40	0.33	0.74	0.47
EV6						0.52	0.45	0.28	0.21	0.62	0.35
EV7							0.61	0.44	0.37	0.77	0.50
EV8								0.37	0.30	0.70	0.43
EV9									0.13	0.53	0.26
EV10										0.46	0.19
EV11											0.60
Primera evaluación con escala											
EV1	0.83	0.89	0.83	0.90	0.86	0.85	0.89	0.91	0.84	0.82	0.90
EV2		0.78	0.72	0.79	0.75	0.75	0.78	0.80	0.74	0.72	0.79
EV3			0.78	0.85	0.81	0.81	0.84	0.87	0.80	0.78	0.85
EV4				0.79	0.75	0.75	0.78	0.80	0.74	0.72	0.79
EV5					0.82	0.82	0.85	0.87	0.81	0.79	0.86
EV6						0.78	0.81	0.83	0.77	0.75	0.82
EV7							0.81	0.83	0.76	0.74	0.82
EV8								0.87	0.80	0.78	0.85
EV9									0.82	0.80	0.87
EV10										0.73	0.81
EV11											0.79
Segunda evaluación con escala											
EV1	0.87	0.88	0.88	0.84	0.89	0.84	0.89	0.85	0.90	0.76	0.89
EV2		0.93	0.93	0.89	0.94	0.88	0.94	0.90	0.94	0.81	0.94
EV3			0.94	0.90	0.95	0.90	0.95	0.91	0.96	0.82	0.95
EV4				0.90	0.95	0.90	0.95	0.91	0.96	0.82	0.95
EV5					0.91	0.86	0.91	0.87	0.92	0.78	0.91
EV6						0.91	0.96	0.92	0.97	0.83	0.96
EV7							0.91	0.87	0.91	0.78	0.91
EV8								0.92	0.97	0.83	0.96
EV9									0.93	0.79	0.92
EV10										0.84	0.97
EV11											0.83

EV= Evaluator. / EV= Evaluador.

what was observed by Belan *et al.* (2014), who obtained  $r^2$  values of 0.89 and 0.87 in the first and second evaluations, respectively, when using their designed scale for coffee tree leaf spot.

The  $r^2$  values of the present investigation were significantly higher in the evaluations where the scale was used. This is similar to those reported by Fragoso-Benhumea *et al.* (2022), who obtained values of 0.90 to 0.97, with a mean of 0.93 when evaluating the severity of rust (*Uromyces viciae-fabae*) in the broad bean crop, with and without the use of diagrammatic scales. They concluded that this value improves with the use of diagrammatic scales. This indicates that the designed scale can be used in the field, since it has precision values ( $r^2$ ) close to 1 in the evaluations.

Several studies have shown a tendency to overestimate (Figueiredo *et al.*, 2022; Pereira *et al.*, 2021) and to a lesser extent underestimate (Braga *et al.*, 2020) when diagrammatic scales are not used. In the present work, overestimates were observed in most of the absolute data when the diagrammatic scale was not used, in contrast to the evaluations where it was used. This behavior may be due to visual stimuli, such as similar colorations in the lesions that are not considered for the evaluation of severity, as reported by Perina *et al.* (2019). They identified factors that can lead to overestimation of the severity of brown spot on leaves of *Citrus reticulata* caused by *Alternaria* sp. due to the presence of different pigments on the leaf surface that do not correspond to the evaluated disease. This can affect both experienced and inexperienced evaluators.

The use of the scale allowed a considerable decrease in the absolute error of the evaluations, compared to when it was not used (without the scale it was from -59 to 39%, with the scale it was from -0.4 to 0.4% and -0.16 to 0.48% in the first and second evaluations, respectively). Similar

permite evaluar la severidad de esta enfermedad de manera confiable con una mayor precisión y exactitud. Cuando no se utilizó la escala, el valor promedio de  $r^2$  fue de 0.44 mientras que en la primera y segunda evaluación con la escala se obtuvo un promedio de 0.81 y 0.90, respectivamente, lo que representa un incremento significativo, esto concuerda con lo observado por Belan *et al.* (2014), quienes obtuvieron valores de  $r^2$  de 0.89 a 0.87 en la primera y segunda evaluación, respectivamente, al utilizar la escala que ellos diseñaron para el manchado foliar del café.

Los valores de  $r^2$  de la presente investigación fueron significativamente mayores en las evaluaciones donde se utilizó la escala, lo cual se asemeja a lo reportado por Fragoso-Benhumea *et al.* (2022), (0.90 a 0.97, con media de 0.93) quienes evaluaron la severidad de la roya (*Uromyces viciae-fabae*) en el cultivo de haba, con y sin la utilización de escalas diagramáticas, concluyendo que dicho valor mejora con el uso de escalas diagramáticas. Esto es un indicativo de que la escala diseñada puede ser utilizada en campo, al poseer valores de precisión ( $r^2$ ) cercanos a 1 en las evaluaciones.

En diversos estudios se ha observado la tendencia a la sobreestimación (Figueiredo *et al.*, 2022; Pereira *et al.*, 2021) y en menor medida a la subestimación (Braga *et al.*, 2020) cuando no se utilizan escalas diagramáticas. En el presente trabajo se observaron sobreestimaciones en la mayoría de los datos absolutos cuando no se hizo uso de la escala diagramática, en contraste, con las evaluaciones donde sí se utilizó. Este comportamiento puede deberse a estímulos visuales, tales como coloraciones similares en las lesiones que no son consideradas para la evaluación de la severidad, tal y como lo reporta Perina *et al.* (2019), quienes identifican los factores que pueden llevar a la sobre estimación de la severidad de la mancha marrón sobre hojas de *Citrus reticulata* ocasionada por *Alternaria* sp., por

results were obtained by Muños-Arias *et al.* (2020) for gray mold on *Rubus glaucus*, where this value decreased with use of the diagrammatic scale (from -30 to 30% without the scale to -20 to 20% with the scale). On the other hand, Ortega-Acosta *et al.* (2016) and Nutter Jr and Schultz (1995) mention that absolute error values less than 5% are considered acceptable. In this work, results of -0.35 to 0.5% were obtained on average for the two evaluations, which supports the accuracy of the evaluations when using the scale. Thus, the present research provides a reliable instrument for evaluating the severity induced by gray mold in pomegranate fruits.

When  $r^2$  values among evaluators were compared, it was evident that the designed scale exhibited precision, evident in its capacity to narrow the variation intervals within comparisons when employing the diagrammatic scale. This particular methodology enabled the accurate, precise, and reproducible estimation of gray mold severity attributed to *B. cinerea* on pomegranate fruits. As a result, the scale holds the potential to serve as an effective tool for disease management, monitoring, and surveillance purposes.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) for the grant awarded to Alberto Patricio Hernández, and the participants who served as evaluators for this work.

#### CITED LITERATURE

- Alam MW, Rehman A, Ahmad S, Sarwar M, Naseem MK, Chattha MB, Malik AU and Ali S. 2018. First report of *Botrytis cinerea* causing postharvest fruit rot on stored pomegranates in Pakistan. Plant Disease 103:374-374. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-18-1114-PDN>
- Bardas GA, Tzelepis GD, Lotos and Karaoglanidis GS. 2009. First report of *Botrytis cinerea* causing gray mold of pomegranate (*Punica granatum*) in Greece. Plant Disease 93:1346-1346. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-12-1346C>

la presencia de pigmentos diferentes en la superficie del órgano que no corresponden a la enfermedad evaluada, esto puede afectar a evaluadores con y sin experiencia.

El uso de la escala, permitió disminuir considerablemente el error absoluto de las evaluaciones, con respecto a donde no se utilizó (sin la escala fue de -59 a 39%, con la escala fue de -0.4 a 0.4% y -0.16 a 0.48% en la primera y segunda evaluación, respectivamente). Resultados similares fueron obtenidos por Muños-Arias *et al.* (2020) para el moho gris en *Rubus glaucus*, donde el valor de este parámetro disminuyó por el uso de la escala diagramática (de -30 a 30% sin la escala a -20 a 20% con la escala). Por otro lado, Ortega-Acosta *et al.* (2016) y Nutter Jr y Schultz (1995), mencionan que valores menores al 5% del error absoluto, son considerados aceptables. En este trabajo se obtuvieron en promedio para las dos evaluaciones resultados de -0.35 a 0.5%, lo cual apoya la exactitud de las evaluaciones al utilizar la escala, por lo que la presente investigación aporta un instrumento confiable para la evaluación de la severidad inducida por el moho gris en frutos de granada.

Al comparar los valores de  $r^2$  entre evaluadores, se observó que la escala diseñada es precisa al reducir los intervalos de variación entre comparaciones al utilizar la escala diagramática, la cual permitió estimar la severidad del moho gris ocasionado por *B. cinerea* sobre frutos de granada, de manera exacta, precisa y reproducible, por lo que puede ser empleada como herramienta en el manejo, el seguimiento y el monitoreo de la enfermedad.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por la beca otorgada a Alberto Patricio Hernández, y a los participantes que fungieron como evaluadores en este trabajo.

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

- Behzad N, Seyed-Saeid S and Shahin R. 2020. Quality detection of pomegranate fruit infected with fungal disease. *International Journal of Food Properties* 23:9-21. <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1705851>
- Belan LL, Pozza EA, Freitas MLO, Souza RM, Jesús 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>
- Braga K, Fantin LH, Roy JMT, Canteri MG and Paiva AM. 2020. Development and validation of a diagrammatic scale for the assessment of the severity of bacterial leaf streak of corn. *European Journal of Plant Pathology* 157:367-375. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02008-7>
- Da silva GCBM, Pio R, Pereira RCM, Peche PM and Pozza EA. 2019. Development and validation of a severity scale for assessment of fig rust. *Phytopathologia Mediterranea* 58:597-605. <http://dx.doi.org/10.14601/Phyto-10967>
- Fantin LH, Braga K, Canteri MG and Borges EP. 2018. Development and validation of diagrammatic scale to assess target spot severity in cotton. *Australasian Plant Pathology* 47:491-497. <https://doi.org/10.1007/s13313-018-0576-6>
- Figueiredo Y, Oliveira JM, Almeida KA, Pereira PF, Pedroso LA, Guimaraes MRF, Moreira-Costa M and Ampélio-Pozza E. 2022. Coffee leaf rust assessment: comparison and validation of diagrammatic scales for *Coffea arabica*. *European Journal of Plant Pathology* 164:411-427. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02570-2>
- Fragoso-Benhumea JM, Sánchez-Pale JR, Castañeda-Vildózola A, Franco-Mora O, Gutiérrez-Ibáñez AT, Contreras-Rendón A and García-Velasco R. 2022. Diagrammatic scale for rust severity assessment in broad bean (*Vicia faba*). *Mexican Journal of Phytopathology* 40(3): 474-482. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2206-2>
- French E y Hebert T. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. IICA, San José Costa Rica, p.289.
- Ge S, Dou L, Wang J, Zhula G, Yang J, Li Z and Tu Y. 2021. A unique understanding of traditional medicine of pomegranate, *Punica granatum* L. and its current research status. *Journal of Ethnopharmacology* 271:113877. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113877>.
- Horsfall JG and Cowling EB. 1978. Pathometry: the measurement of plant disease Pp:119-136. *In*: Horsfall JG and Cowling EB (eds.). London UK. How disease develops in populations. Elsevier. London UK. 407p.
- Koba K and Yanagita. 2011. Potential health benefits of pomegranate (*Punica granatum*) seed oil containing conjugated linolenic acid. Pp:919-924. *In*: Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention. Academic Press. United States of America. 2607p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375688-6.10108-2>
- Mora-Aguilera G and Acevedo-Sánchez G. 2018. DOSLOG 2.0v. Laboratorio de análisis de riesgo epidemiológico fitosanitario (CP –LANREF). Montecillo, Texcoco, México
- Muñoz-Arias S, Guerrero-Álvarez GE and González-Patiño PA. 2020. Diagrammatic scale for measuring severity of gray mould in thornless Castilla blackberry (*Rubus glaucus* Benth). *Ciencia Rural* 50:1678-4596. <http://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190859>
- 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>
- Nutter 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.
- Ortega-Acosta SA, Velasco-Cruz C, Hernández-Morales J, Ochoa-Martínez DL and Hernández-Ruiz J. 2016. Diagrammatic logarithmic scales for assess the severity of spotted leaves and calyces of roselle. *Mexican Journal of Phytopathology* 34:270-285. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1606-6>
- Patricio-Hernández A, Moreno-Velázquez M, Quezada-Salinas A and Mercado-Flores Y. 2023. First report of *Botrytis cinerea* causing gray mold of pomegranate (*Punica granatum* L.) in Mexico. *Journal of Plant Diseases and Protection*. <https://doi.org/10.1007/s41348-023-00715-x>
- Pereira RCM, de Oliveira LM, Tassone GAT, Rego GMS and Poza EA. 2021. Diagrammatic scale for *phyllachora* in Australian red cedar. *Australasian Plant Pathology* 50:81–90. <https://doi.org/10.1007/s13313-020-00749-x>
- Perina FJ, Belan LL, Moreira SI, Nery EM, Alves E and Posa EA. 2019. Diagrammatic scale for assessment of *Alternaria* brown spot severity on tangerine leaves. *Journal of Plant Pathology* 101:981–990. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00306-6>
- Richard B, Qi A and Fitt B. 2021. Control of crop diseases through Integrated Crop Management to deliver climate-smart farming systems for low- and high-input crop production. *Plant Pathology* 71:187-206. <https://doi.org/10.1111/ppa.13493>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2021. Estadística de Producción Agrícola. Sistema de Información Agrícola y Pesquera. [http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos\\_a.php](http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos_a.php) (Consulta, septiembre 2021).
- Vereschuk ML, Dominguez FG, Alvarenga AE and Zapata PD. 2022. Diagrammatic scale for quantification of severity of white thread blight disease in yerba mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire). *Crop Science* 94:e20201931. <https://doi.org/10.1590/0001-376520220201931>