



UNIVERSITAT
POLITÀCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL
MEDIO NATURAL



GENERALITAT
VALENCIANA

ivia
Instituto Valenciano
de Investigaciones Agrarias

Epidemiología de la mancha marrón de las mandarinas causada por *Alternaria alternata*. Desarrollo de estrategias de control eficientes

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Dissolunquele Daniel Manuel Bassimba

Director:

Dr. Antonio Vicent Civera

Tutora:

M^a. Isabel Font San Ambrosio

Valencia, 2015

D. Antonio Vicent Civera, Doctor Ingeniero Agrónomo, Investigador Científico Adjunto del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias y Dña. M^a. Isabel Font San Ambrosio, Doctor Ingeniero Agrónomo, Profesora contratada de la Universidad Politécnica de Valencia

CERTIFICAN:

Que D. Dissoluquele Daniel Manuel Bassimba ha realizado bajo su dirección en la Unidad de Micología del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, el trabajo que con el título “Epidemiología de la mancha marrón de las mandarinas causada por *Alternaria alternata*. Desarrollo de estrategias de control eficientes”, presenta para optar al grado de Doctor Ingeniero Agrónomo.

Para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en

Valencia, a 19 de Junio de 2015.

Dr. Antonio Vicent Civera

Dra. M^a. Isabel Font San Ambrosio

A mi madre

Agradecimientos

Deseo comenzar expresando mi profundo agradecimiento al Dr. Antonio Vicent, director de esta tesis doctoral, por haber confiado en mí desde del principio, por el apoyo brindado para el desarrollo de la misma, por todas las horas y el esfuerzo dedicado. Quiero también destacar su enorme capacidad de planificación, su forma ordenada de trabajo y su coherente capacidad científica. Además, su paciencia, razonamiento crítico, aprendizaje continuo y superación me han servido como motivación y han contribuido a enriquecer mi formación profesional y personal.

Quisiera también expresar mi agradecimiento a la Dra. Concha Jordá y a la Dra. María Isabel Font, por aceptarme en su laboratorio en los primeros momentos y por el apoyo en mis actividades durante el periodo inicial de formación. Con ellas comencé mi aprendizaje en el mundo de la Fitopatología, gracias por el cariño y afecto.

Quiero extender también mi gratitud a los compañeros y amigos del grupo de virus de la UPV que durante la etapa de formación en el laboratorio supieron transmitir su experiencia en los primeros momentos. Ana Alfaro, por su infinita paciencia y por la atención prestada cuando lo requería. José Manuel por su amistad y los momentos que hemos compartido. Maica me quedaría corto todo lo que podría expresar, por su apoyo, sus consejos, por ayudarme siempre y mas que una amiga una hermana para mí y por ese corazón tan grande. Mari por su apoyo en todas las etapas, por los consejos, por el cariño y escucharme, por su amable e incondicional apoyo en todas las etapas. A todos ellos les estaré eternamente agradecido.

Agradecer a todas las personas del grupo de hongos de la UPV, especialmente al Dr. José García Jiménez, al Dr. Josep Armengol y la Dra. Paloma Abad, por el apoyo durante estos años y por haber transmitido sus conocimientos en la etapa de formación. Con ellos he asentado los fundamentos básicos de la Patología Vegetal. Hago extensivos también mis agradecimientos a los profesores del programa del Máster en Producción Vegetal de la UPV, por

básicos de la Patología Vegetal. Hago extensivos también mis agradecimientos a los profesores del programa del Máster en Producción Vegetal de la UPV, por sus ideas, consejos y sugerencias que han sido esenciales tanto en mi formación investigadora como humana. A los compañeros de la Unidad de Micología del IVIA, José Luis Mira y Concha Hinarejos, mi gratitud por los momentos compartidos. A Carmelo Llácer, y Alexadra Rouzier por haber colaborado en alguno de los capítulos de esta Tesis con la realización de sus Trabajos Final de Carrera.

A mis compañeros becarios del IVIA, Bego, Silvia, Neus, Gabi, Marta, Josep, Pablo, Vidal y los no becarios Edson, Belén y otros muchos que han pasado por ahí, gracias por vuestra amistad, por ayudarme a superar muchos momentos de angustia. Con su apoyo he podido superar muchas barreras a lo largo de esta etapa. Agradecerles a todos el compartir tantos buenos momentos por su compañía y la amistad. Quisiera también agradecer a los nuevos becarios, especialmente a Joaquín y Elena por sus sugerencias y ayuda con el programa R.

A mis amigos, Arianna, Isa, Inma, Vero, Lirios, Ángel y Clara, por su amistad en mis comienzos. Su sinceridad y ayuda fueron clave para ir metiéndome en el modo de vida de los españoles.

A lo largo de todos estos años he ido conociendo mucha gente que me ha ayudado y acogido, que han sido y serán una gran familia para mí. Vicente, gracias por abrirme la puerta de su casa y hacerme sentir como en la mía, por su apoyo y cariño. Pili, por su entusiasmo y los mimitos, por tratarme como un Marques. Jose, por su amistad y hacerme reír en muchos momentos. Mari, por su cariño y empuje, por animarme en cada momento, por sus sugerencias, ayuda en los retoques estéticos y maquetación de esta memoria. A esta gran familia, gracias por hacerme sentir en casa.

Me gustaría también expresar mi agradecimiento a las personas y entidades que hicieron posible la ejecución de este trabajo. Deseo agradecer al Dr. Bernardo Pascual España por el apoyo brindado a lo largo de todos estos años, al Instituto de Investigação Agronômica (IIA), por el apoyo brindado desde del principio, a la Dra. Eugenia Viera y al Dr. Mpanzo Domingos por su ayuda y apoyo en todas las etapas, al Gobierno de España por la beca concedida a través de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID), al Gobierno de Angola y en especial al Instituto Nacional e Gestão de

Agradecer también a la gente que me han apoyado desde Angola, Jack, Tino, Luther y Geraldo, que me han apoyado en todos los sentidos y especialmente en la última etapa.

Por último, agradecer a mi familia, por confiar en mí y apoyarme en cada uno de mis pasos en este viaje. Por la paciencia y espera de que llegara este día, especialmente a ti papá, gracias. A todos los que no he mencionado y que de alguna forma han aportado su granito de arena en el presente trabajo mi más sincera gratitud.

Quisiera por último recordar a mi madre, estoy convencido que estará orgullosa de mí. Ahí donde estés seguro que estas siempre a mi lado. *¡GRACIAS POR QUERERME!*

Finalmente, agradecer a los miembros del tribunal y los revisores por aceptar la evaluación de esta memoria.

RESUMEN

La mancha marrón causada por un patotipo del hongo *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. es un factor limitante para algunas variedades de mandarina como 'Fortune', 'Nova' y otros híbridos. La información existente sobre la epidemiología de la enfermedad procede de las regiones húmedas de Florida (EE.UU.), y no puede extrapolarse directamente a las zonas citrícolas semi-áridas de la cuenca del Mediterráneo. Por ello se inició un estudio para caracterizar la epidemiología de la mancha marrón en las condiciones de España durante dos años consecutivos. Se determinó la presencia de inóculo en las hojas, brotes y frutos de los árboles afectados, en la hojarasca del suelo y las malas hierbas. Para ello se siguió la dinámica de las conidias de *Alternaria* en el aire con un capturador y se realizaron exposiciones de placas con medio semi-selectivo ARSA para diferenciar los aislados patógenos. Se estudió también el efecto de diversos factores ambientales en la incidencia de la enfermedad a través de exposición de plantas trampa.

Las hojas y brotes afectados constituyeron la principal fuente de inóculo, con 15-76% de aislados patógenos. Se detectaron también aislados patógenos en la hojarasca y en malas hierbas del género *Sonchus*, pero en muy baja proporción. El patógeno sobrevivió en hojas inmaduras caídas al suelo hasta los 76 días, coincidiendo con la descomposición total de la hojarasca. Se detectaron conidias de *Alternaria* en el aire de forma continua durante todo el período de estudio. Se identificaron colonias patógenas en todas las exposiciones de medio semi-selectivo, pero sin una correlación significativa con el total capturado. Las infecciones de las plantas trampa se observaron principalmente en primavera y otoño, coincidiendo en semanas con precipitaciones ≥ 2.5 mm y temperatura media $\geq 12.5^{\circ}\text{C}$. La pluviometría, el número de días de lluvia y la duración total de humectación foliar se relacionaron significativamente con la incidencia de la enfermedad, pero únicamente en los cuantiles superiores.

Se estudió la eficiencia infectiva del patógeno mediante la inoculación de plantas de 'Fortune' y 'Nova' bajo diferentes combinaciones de temperatura (8-35°C) y duraciones de humectación foliar (8-48 horas). Los datos de infección

obtenidos en la eficiencia infectiva se ajustaron mediante modelos aditivos generalizados (GAM) y un modelo genérico de infección (GIM) Se estudió el efecto de los períodos interrumpidos de humectación foliar sobre la infección y también la influencia de la temperatura en la duración del período de incubación. La incidencia de la enfermedad se incrementó notablemente con humectaciones foliares superiores a 16 horas. La incidencia de la mancha marrón descendió de forma notable con temperaturas inferiores a 12°C, independientemente de la duración de la humectación foliar. La incidencia descendió con temperaturas superiores a 27°C y apenas se detectaron infecciones a 35°C. Bajo las mismas condiciones de temperatura y dosis de inóculo, la incidencia de la mancha marrón se detuvo con un período seco de una hora en 'Fortune' y dos horas en 'Nova'. La temperatura tuvo un efecto significativo en la duración del periodo de incubación, aunque la máxima expresión de los síntomas se observó con tan sólo 30 horas en 'Fortune' y unas 60 horas en 'Nova'. Cuando los datos de eficiencia infectiva se analizaron mediante GAMs, la incidencia de la enfermedad a temperaturas bajas fue mayor en 'Fortune' que en 'Nova'.

Los modelos de infección obtenidos, el modelo Alter-Rater desarrollado en Florida y un modelo empírico simple (SRS) basado en temperatura y pluviometría se evaluaron con datos independientes obtenidos en exposiciones semanales (n = 266) de plantas trampa realizadas en tres parcelas durante los años 2011 a 2013. La evaluación de los modelos se realizó mediante análisis de curvas ROC. Teniendo en cuenta que la alta sensibilidad de los modelos es crítica para el control de la mancha marrón, se optó por utilizar el área parcial bajo la curva ROC (pAUC) en el rango de máxima sensibilidad (0,9-1). Ninguno de los modelos evaluados se consideró adecuado para predecir las infecciones en el cultivar 'Fortune', debido principalmente a la elevada proporción de falsos positivos. En el caso de 'Nova', menos susceptible a la enfermedad, el modelo SRS permitió predecir los periodos semanales de infección con una sensibilidad de 0,93 y una especificidad de 0,84. Este modelo se ha implementado en la web 'gipcitricos' del IVIA para la gestión integrada de la mancha marrón en cítricos.

Algunos estudios indican que el riego por inundación podría incrementar la duración de la humectación foliar y el riesgo de infección en las parcelas, pero no existe ninguna referencia específica en cítricos. Esta información permitiría determinar el sistema de riego más adecuado para los programas de gestión integrada de la mancha marrón. Se realizó un estudio durante los años 2012 y

2013 en tres parcelas de mandarina con riego por inundación y otras tres con riego localizado. En cada parcela se registraron los valores del contenido de humedad del suelo, duración de humectación foliar, humedad relativa, temperatura y pluviometría. El promedio de la duración de la humectación foliar diaria fue de 4-8 horas y la máxima de 20-23 horas. Se optó por analizar la dinámica de la duración de la humectación foliar en las parcelas mediante un modelo de series temporales univariante auto-regresivo de media móvil no estacional ARIMA (1,1,1). El MAE de los modelos fue de 3,17-3,91 horas. En los análisis gráficos de los residuos y los tests de intervenciones no se detectó ninguna asociación entre los riegos por inundación y la duración de humectación foliar. Los aumentos en la duración de la humectación foliar se relacionaron únicamente con algunos eventos de lluvia. El posible efecto del riego por inundación sobre la duración humectación foliar quedaría soslayado por los altos niveles de humedad relativa habituales en la zona, que favorecen la formación de rocíos prolongados.

RESUM

La taca marró causada per un patotip del fong *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. es un factor limitant per a algunes varietats de mandarina com 'Fortune', 'Nova' i altres híbrids. La informació existent sobre l'epidemiologia de la malaltia procedix de les regions humides de Florida (EE.UU.), i no pot extrapolar-se directament a les zones cítriques semi-àridas de la conca del Mediterrani. Per això es va iniciar un estudi per a caracteritzar l'epidemiologia de la taca marró en les condicions d'Espanya durant dos anys consecutius. Es va determinar la presència d'inòcul en les fulles, brots i fruits dels arbres afectats, en la fullaraca del sòl i les males herbes. Es va seguir la dinàmica de les conidies d'*Alternaria* en l'aire amb un captador i es van realitzar exposicions de plaques amb medi semi-selectiu ARSA per a diferenciar els aïllats patògens. Es va estudiar també l'efecte de diversos factors ambientals en la incidència de la malaltia mitjançant l'exposició de plantes trampa.

Les fulles i brots afectats van constituir la principal font d'inòcul, amb el 15-76% d'aïllats patògens. Es van detectar també aïllats patògens en la fullaraca i en males herbes del gènere *Sonchus*, però en molt baixa proporció. El patogen va sobreviure en fulles immadures caigudes a terra fins als 76 dies, coincidint amb la descomposició total de la fullaraca. Es van detectar conidies d'*Alternaria* en l'aire de forma contínua durant tot el període d'estudi. Es van identificar colònies patògenes en totes les exposicions de medi semi-selectiu, però sense una correlació significativa amb el total capturat. Les infeccions de les plantes trampa es van observar principalment a la primavera i tardor, coincidint en setmanes amb precipitacions ≥ 2.5 mm i temperatura mitjana $\geq 12.5^{\circ}\text{C}$. La pluviometria, el nombre de dies de pluja i la duració total d'humectació foliar es van relacionar significativament amb la incidència de la malaltia, però únicament en els quantils superiors.

Es va estudiar l'eficiència infectiva del patogen mitjançant la inoculació de plantes de 'Fortune' i 'Nova' amb diferents combinacions de temperatura ($8-35^{\circ}\text{C}$) i duracions d'humectació foliar (8-48 hores). Les dades d'infecció obtingudes en

l'estudi d'eficiència infectiva es van ajustar amb models additius generalitzats (GAM) i un model genèric d'infecció (GIM). Es va estudiar l'efecte dels períodes interromputs d'humectació foliar sobre la infecció i també la influència de la temperatura en la duració del període d'incubació. La incidència de la malaltia es va incrementar notablement amb humectacions foliars superiors a 16 hores. La incidència de la taca marró va descendir de forma notable amb temperatures inferiors a 12°C, independentment de la duració de la humectació foliar. La incidència va descendir amb temperatures superiors a 27°C i a penes es van detectar infeccions a 35°C. Davall les mateixes condicions de temperatura i dosi d'inòcul, la incidència de la taca marró es va detindre amb un període sec d'una hora en 'Fortune' i dos hores en 'Nova'. La temperatura va tindre un efecte significatiu en la duració del període d'incubació, encara que la màxima expressió dels símptomes es va observar amb tan sols 30 hores en 'Fortune' i unes 60 hores en 'Nova'. Quan les dades d'eficiència infectiva es van analitzar per mitjà dels models GAMs, la incidència de la malaltia a temperatures baixes va ser major en 'Fortune' que en 'Nova'.

Els models d'infecció obtinguts, el model Alter-Rater desenrotllat a Florida i un model empíric simple (SRS) basat en temperatura i pluviometria es van avaluar amb dades independents obtinguts en exposicions setmanals ($n = 266$) de plantes trampa realitzades en tres parcel·les durant els anys 2011 al 2013. L'avaluació dels models es va realitzar amb anàlisi de corbes ROC. Tenint en compte que l'alta sensibilitat dels models és crítica per al control de la taca marró, es va optar per utilitzar l'àrea parcial davall la corba ROC (pAUC) en el rang de màxima sensibilitat (0,9-1). Cap dels models avaluats es va considerar adequat per a predir les infeccions en el cultivar 'Fortune', degut principalment a l'elevada proporció de falsos positius. En el cas de 'Nova', menys sensible a la malaltia, el model SRS va permetre predir els períodes setmanals d'infecció amb una sensibilitat de 0,93 i una especificitat de 0,84. Este model s'ha implementat en la web 'gipcitricos' de l'IVIA per a la gestió integrada de la taca marró en cítrics

Alguns estudis indiquen que el reg per inundació podria incrementar la duració de la humectació foliar i el risc d'infecció en les parcel·les, però no hi ha cap referència específica en cítrics. Esta informació permetria determinar el sistema de reg més adequat per als programes de gestió integrada de la taca marró. Es va realitzar un estudi durant els anys 2012 i 2013 en tres parcel·les de

mandarina amb reg per inundació i altres tres amb reg localitzat. En cada parcel·la es van registrar els valors del contingut d'humitat del sòl, duració d'humectació foliar, humitat relativa, temperatura i pluviometria. La mitjana de la duració de la humectació foliar diària va ser de 4-8 hores i la màxima de 20-23 hores. Es va optar per analitzar la dinàmica de la duració de la humectació foliar en les parcel·les per mitjà d'un model de sèries temporals univariant autoregressiu de mitjana mòbil no estacional ARIMA (1,1,1). El MAE dels models va ser de 3,17-3,91 hores. En les anàlisis gràfics dels residus i els tests d'intervencions no es va detectar cap associació entre els regs per inundació i la duració d'humectació foliar. Els augments en la duració de la humectació foliar es van relacionar únicament amb alguns esdeveniments de pluja. El possible efecte del reg per inundació sobre la duració humectació foliar quedaria esquivat pels alts nivells d'humitat relativa habituals en la zona, que afavorixen la formació de rosades prolongades.

ABSTRACT

Alternaria brown spot (ABS), caused by the 'tangerine' pathotype of *Alternaria alternata*, (Fr.) Keissl. is a serious disease in several mandarin cultivars such as 'Fortune', 'Nova' and other hybrids. Although the disease is widespread in the Mediterranean Basin, the epidemiology of the disease in semi-arid conditions is unknown. Epidemiological studies were conducted during two consecutive years in Spain. The presence of inoculum was studied on leaves, twigs and fruit on affected trees, as well as weeds and leaf litter was determined. The dynamics of airborne conidia of *Alternaria* were studied with a spore trap and by exposing plates of the semi-selective medium ARSA. The effect of environmental factors in the incidence of ABS was studied through exposure of trap plants.

Conidia of *Alternaria* were continuously detected throughout the period of study and pathogenic isolates were obtained in all sampling dates. However, the number of pathogenic isolates was not correlated with the total captured. Affected leaves and shoots were considered the main source of inoculum, with 15-76% of pathogenic isolates. Pathogenic isolates were also found in leaf litter and weeds of the genus *Sonchus*, but in very low proportion. The pathogen survived in fallen immature leaves for up to 76 days, coinciding with complete leaf litter decomposition. In contrast to humid areas, infections occurred mainly in spring and autumn, on weeks with rainfall ≥ 2.5 mm and average temperature $\geq 12.5^{\circ}\text{C}$. Based on quantile regression, the amount of rainfall, number of rain days, and total wetness duration were considered important factors increasing ABS incidence during infection periods.

The infection efficiency of the pathogen was studied by inoculating plants of 'Fortune' and 'Nova' under different combinations of temperature (8-35°C) and wetness durations (8-48 hours). Data obtained from the infection efficiency study were fitted to generalised additive models (GAMs) and a generic infection model. Disease incidence significantly increased with leaf wetness duration over 16 hours. Disease incidence decreased with temperatures below 12°C or above 27°C. No infections were observed at 35°C. The incidence of ABS did not

increase after a dry period of one hour in 'Fortune' and two hours in 'Nova'. Post-infection temperature had a significant effect in the incubation period of the ABS pathogen, but maximum symptom expression was observed after no more than 30 hours in 'Fortune' and about 60 hours in 'Nova'. With GAMs models, disease incidence at low temperature was higher in 'Fortune' than in 'Nova'.

The two infection models obtained, the Alter-Rater model developed in Florida and a simple rule system (SRS) based on temperature and rainfall were evaluated using independent infection data obtained from trap plants of 'Fortune' and 'Nova' exposed weekly in three orchards during 2011 to 2013 (n = 266). Model evaluation was performed using ROC curve analysis. Considering that the high sensitivity of the models is critical for the control of ABS, the partial area under the ROC curve (pAUC) in the high sensitivity range (0.9-1) was used to evaluate model accuracy. None of the models evaluated was appropriate to predict infections in 'Fortune' due to the high proportion of false positives. In the case of 'Nova', less susceptible to ABS, the SRS model had a sensitivity of 0.93 and a specificity of 0.84. This model is currently implemented in the online platform 'gipcitricos' for the integrated management of ABS in Spain.

Some studies indicate that flood irrigation could increase leaf wetness duration and the subsequent risk of infection, but there are no specific studies in citrus. This information would help to choose the most appropriate irrigation system for the integrated management of ABS. Values of soil moisture content, leaf wetness duration, relative humidity, temperature and rainfall were recorded in three mandarin plots with flood irrigation and three plots with drip irrigation during 2012 and 2013. The average daily leaf wetness duration was 4-8 hours with a maximum of 20-23 hours. The dynamics of leaf wetness duration in the plots was analyzed by non-seasonal autoregressive moving average time series univariate ARIMA model (1,1,1). The MAE of the models was 3.17 to 3.91 hours. The increase of leaf wetness duration was not associated with flood irrigations neither in graphical analysis of the residuals and tests or interventions. The increase in leaf wetness duration was associated only with some rain events. The possible effect of flood irrigation on leaf wetness duration would be hidden by the high levels of relative humidity common of the study area, which induced the formation of long periods of dew.

Índice general

| | Página |
|---|---------------|
| Índice de figuras | v |
| Índice de tablas..... | xiii |
| Abreviaturas..... | xv |
| | |
| Capítulo 1 INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| 1.1 Importancia de los cítricos en España..... | 3 |
| 1.2 El género <i>Alternaria</i> | 4 |
| 1.3 Enfermedades de los cítricos causadas por <i>Alternaria</i> . | 6 |
| 1.4 La mancha marrón de las mandarinas..... | 7 |
| | |
| Capítulo 2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS..... | 19 |
| | |
| Capítulo 3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LA MANCHA MARRÓN DE LAS MANDARINAS EN CONDICIONES DE CLIMA SEMI-ÁRIDO EN ESPAÑA..... | 25 |
| 3.1 Antecedentes..... | 25 |
| 3.2 Materiales y métodos..... | 27 |
| 3.2.1 Fuentes de inóculo..... | 27 |

| | Página |
|-------------------|---|
| 3.2.2 | Seguimiento de la dinámica del inóculo..... 31 |
| 3.2.3 | Períodos de infección..... 33 |
| 3.3 | Resultados..... 36 |
| 3.3.1 | Fuentes de inóculo..... 36 |
| 3.3.2 | Seguimiento de la dinámica del inóculo..... 41 |
| 3.3.3 | Períodos de infección..... 43 |
| 3.4 | Discusión..... 53 |
| | |
| Capítulo 4 | DESARROLLO DE MODELOS DE PREDICCIÓN Y EVALUACIÓN MEDIANTE CURVAS ROC..... 65 |
| 4.1 | Antecedentes..... 65 |
| 4.2 | Materiales y métodos..... 72 |
| 4.2.1 | Eficiencia infectiva bajo condiciones controladas de temperatura y humectación..... 72 |
| 4.2.2 | Efecto de la interrupción de la humectación en la eficiencia infectiva del patógeno..... 73 |
| 4.2.3 | Efecto de la temperatura en el periodo de incubación... 74 |
| 4.2.4 | Infecciones en condiciones de campo..... 75 |
| 4.2.5 | Desarrollo de los modelos y evaluación mediante curvas ROC..... 76 |
| 4.3 | Resultados..... 81 |
| 4.3.1 | Eficiencia infectiva bajo condiciones controladas de temperatura y humectación..... 81 |
| 4.3.2 | Efecto de la interrupción de la humectación en la |

| | Página |
|--|---------------|
| eficiencia infectiva del patógeno..... | 84 |
| 4.3.3 Efecto de la temperatura en el periodo de incubación... | 85 |
| 4.3.4 Infecciones en condiciones de campo..... | 87 |
| 4.3.5 Desarrollo de los modelos y evaluación mediante curvas ROC..... | 89 |
| 4.4 Discusión | 104 |
| Capítulo 5 | |
| DURACIÓN DE LA HUMECTACIÓN FOLIAR EN CÍTRICOS | 115 |
| 5.1 Antecedentes | 115 |
| 5.2 Materiales y métodos | 118 |
| 5.2.1 Observaciones visuales de humectación foliar..... | 118 |
| 5.2.2 Sensores de humectación foliar..... | 120 |
| 5.2.3 Evaluación de los sensores de humectación foliar y los modelos CART/SLD y HR mediante análisis de curvas ROC..... | 121 |
| 5.2.4 Estimación de la humectación foliar en parcelas comerciales de cítricos | 123 |
| 5.2.5 Dinámica de la duración de la humectación foliar en parcelas de cítricos con riego a goteo y con riego a manta..... | 125 |
| 5.3 Resultados | 127 |
| 5.3.1 Observaciones visuales de humectación foliar..... | 127 |
| 5.3.2 Sensores de humectación foliar..... | 128 |

| | Página |
|-------------------|--|
| 5.3.3 | Evaluación de los sensores de humectación foliar y los modelos CART/SLD y HR mediante análisis de curvas ROC..... 130 |
| 5.3.4 | Estimación de la humectación foliar en parcelas comerciales de cítricos..... 133 |
| 5.3.5 | Dinámica de la humectación foliar en parcelas de cítricos con riego a goteo y a manta..... 136 |
| 5.4 | Discusión 143 |
| Capítulo 6 | CONCLUSIONES 155 |
| Capítulo 7 | BIBLIOGRAFÍA 161 |

Índice de Figuras

| | Página |
|--|--------|
| Figura 1.1: Síntomas de la mancha marrón de las mandarinas: A) Necrosis en brotaciones de mandarino ‘Fortune’; B) Defoliación intensa en un árbol de ‘Fortune’; C) Frutos inmaduros de mandarina ‘Fortune’ con lesiones necróticas y costras suberosas; D) Fruto maduro de mandarina ‘Fortune’ con lesiones necróticas..... | 9 |
| Figura 3.1: Fuentes potenciales de inóculo: A) hojas afectadas en la copa del árbol; B) brotes afectados; C) Frutos afectados; D) supervivencia del hongo en hojas del suelo; E) <i>Conyza</i> sp. y F) <i>Bromus</i> sp..... | 28 |
| Figura 3.2: Pruebas de patogenicidad de <i>Alternaria</i> en hojas jóvenes de mandarina ‘Fortune’: A) Prueba negativa en hojas inoculadas con un aislado de <i>Alternaria</i> obtenido del material muestreado; y B) Síntomas de mancha marrón en hojas inoculadas con el control positivo de <i>Alternaria alternata</i> IVIA-A051..... | 30 |
| Figura 3.3: Métodos empleados para el seguimiento de la dinámica del inóculo: A) Soporte para la colocación de portaobjetos; y B) Soporte para la exposición de placas del medio semi-selectivo ARSA..... | 32 |
| Figura 3.4: A) Plantas trampa de mandarina ‘Fortune’ y ‘Nova’ en la parcela experimental; y B) Estación meteorológica y sistemas de captura de conidias... | 34 |
| Figura 3.5: Proporción de colonias patógenas de <i>Alternaria alternata</i> aisladas de hojas jóvenes de mandarina afectadas por la mancha marrón caídas al suelo. Diagrama de cajas para cada fecha de muestreo (n = 50) en tres experimentos llevados a cabo en 2011 y 2012..... | 40 |
| Figura 3.6: Número de colonias de <i>Alternaria</i> patógenas y no patógenas capturadas en la parcela experimental con la exposición del medio semi-selectivo ARSA durante los dos años de estudio (2011-2012)..... | 41 |
| Figura 3.7: Valores semanales de incidencia de la mancha marrón en hojas de plantas trampa de mandarina ‘Fortune’ y ‘Nova’, lluvia, temperatura media, duración de la humectación y número de conidios de <i>Alternaria</i> capturados en los portaobjetos..... | 44 |
| Figura 3.8: Diagramas de cajas para la incidencia de la mancha marrón en los períodos de exposición semanal donde se detectaron infecciones durante los años 2011 y 2012 en hojas de plantas trampa de ‘Fortune’ (n = 22) y ‘Nova’ (n = 17)..... | 45 |

| | Página |
|--|--------|
| Figura 3.9: Representación de grafica de las correlaciones entre las variables meteorológicas y la incidencia de la mancha marrón en hojas de plantas trampa de mandarina ‘Fortune’ y ‘Nova’ con las variables meteorológicas. De 104 períodos semanales desde de enero de 2011 a diciembre de 2012. Lluvia: pluviometría (mm), dlluvia: días de lluvia (>0,2 mm), hlluvia: horas de lluvia (>0,2 mm), temp: temperatura media (°C), hr: humedad relativa media (%), viento: velocidad media del viento (m/s), httotal: horas totales de humectación (h), hmedia: duración media diaria de la humectación (h), nph: número de períodos de humectación (>1 h), hmax: duración máxima de la humectación (h), tempph: temperatura media durante los periodos de humectación (°C), fne: incidencia en ‘Fortune’, y nva: incidencia en ‘Nova’..... | 47 |
| Figura 3.10: Árboles de clasificación iniciales y gráficos de reducción de la ‘deviance’ entre la presencia de la enfermedad en hojas de las plantas trampa de mandarina ‘Fortune’ y ‘Nova’ y las variables meteorológicas: lluvia: pluviometría (mm); hr: humedad relativa media (%); viento: velocidad media del aire (m/s) y temp: temperatura media (°C)..... | 48 |
| Figura 3.11 Árboles de clasificación seleccionados (arriba) y gráficos de particiones (abajo) para la presencia de la mancha marrón en las exposiciones semanales de plantas trampa de ‘Fortune’ y ‘Nova’, la lluvia total y la temperatura media. En los árboles de clasificación se indica el criterio de agrupación y la ‘deviance’ de cada nodo. Puntos de color negro en los gráficos de particiones indican períodos semanales con infecciones y puntos blancos períodos sin infecciones..... | 49 |
| Figura 3.12: Gráficos de regresión por cuantiles de la incidencia de la mancha marrón en las exposiciones semanales de plantas trampas de ‘Fortune’ respecto a la lluvia, días de lluvia (>0,02) y la duración de la humectación..... | 51 |
| Figura 3.13: Estimaciones de la pendiente ($\hat{\beta}_i$) para la regresión por cuantiles de la incidencia de la mancha marrón en las exposiciones de plantas trampa de ‘Fortune’ y ‘Nova’ respecto a los valores semanales de lluvia (mm), número de días de lluvia (> 0,02 mm) y la duración total de la humectación (horas) durante los periodos de exposición. La línea discontinua representa el valor del estimador con incrementos del 0,005 y el área sombreada los intervalos de confianza del 95%..... | 52 |
| Figura 4.1: Incidencia de la mancha marrón en hojas obtenida con inoculaciones en condiciones controladas de temperatura y humectación: A) plantas de ‘Fortune’ y B) plantas de ‘Nova’. Predicciones del modelo GAM con una función de suavizado de la temperatura y la duración de la humectación: C) ‘Fortune’ y D) | |

| | Página |
|---|--------|
| ‘Nova’. Bondad de ajuste del modelo genérico de infección (línea) y los datos experimentales (puntos) para: E ‘Fortune’ y F ‘Nova’. En todos los casos, datos combinados de dos experimentos..... | 83 |
| Figura 4.2: Incidencia de la mancha marrón con períodos de humectación continuos de 12 y 20 horas y periodos de 12 + 8 horas interrumpidos durante 1, 2 o 6 horas en hojas de: A ‘Fortune’ y B ‘Nova’. Datos combinados de dos experimentos. ‘Dry’: seco; ‘wet’: mojado..... | 85 |
| Figura 4.3: Funciones de suavizado para la mancha marrón estimadas con el modelo GAM para el período de incubación posterior a la infección: A y B , Temperatura; C y D , Duración; A y C) Plantas de ‘Fortune’; y B y D) Plantas de ‘Nova’. Las marcas superiores del eje x indican la posición de los datos experimentales. Datos combinados de dos experimentos..... | 87 |
| Figura 4.4: Curvas ROC obtenidas en la parcela de Alzira (n = 64) con exposiciones semanales de plantas trampa de ‘Fortune’ para los modelos de mancha marrón evaluados: A) Alter-Rater; B) Modelo empírico simple (SRS); C) Modelo aditivo generalizado (GAM); D) Modelo aditivo generalizado modificado (GAM _{lluvia}); E) Modelo genérico de infección (GIM); F) modelo genérico de infección modificado (GIM _{lluvia}). Clasificación binaria: presencia/ausencia de síntomas. En las gráficas, mediana e intervalo de confianza 95% del área total bajo la curva (AUC) y el área parcial (pAUC) en la región de sensibilidad 0,9-1 (área sombreada). Umbral de corte óptimo con valores asociados de sensibilidad y especificidad. Línea diagonal no discriminante..... | 94 |
| Figura.4.5: Curvas ROC obtenidas en la parcela de Alzira (n = 64) con exposiciones semanales de plantas trampa de ‘Nova’ para los modelos de mancha marrón evaluados: A) Alter-Rater; B) Modelo empírico simple (SRS); C) Modelo aditivo generalizado (GAM); D) Modelo aditivo generalizado modificado (GAM _{lluvia}); E , Modelo genérico de infección (GIM); F) Modelo genérico de infección modificado (GIM _{lluvia}). Clasificación binaria: presencia/ausencia de síntomas. En las gráficas, mediana e intervalo de confianza 95% del área total bajo la curva (AUC) y el área parcial (pAUC) en la región de sensibilidad 0,9-1 (área sombreada). Umbral de corte óptimo con valores asociados de sensibilidad y especificidad. Línea diagonal no discriminante..... | 95 |
| Figura 4.6: Curvas ROC obtenidas en la parcela de Chiva (n = 60) con exposiciones semanales de plantas trampa de ‘Fortune’ para los modelos de mancha marrón evaluados: A) Alter-Rater; B) Modelo empírico simple (SRS); C) Modelo aditivo generalizado (GAM); D) Modelo aditivo generalizado modificado (GAM _{lluvia}); E) Modelo genérico de infección (GIM); F) Modelo genérico de infección modificado (GIM _{lluvia}). Clasificación binaria: presencia/ausencia de | |

síntomas. En las gráficas, mediana e intervalo de confianza 95% del área total bajo la curva (AUC) y el área parcial (pAUC) en la región de sensibilidad 0,9-1 (área sombreada). Umbral de corte óptimo con valores asociados de sensibilidad y especificidad. Línea diagonal no discriminante.....

96

Figura 4.7: Curvas ROC obtenidas en la parcela de Chiva (n = 60) con exposiciones semanales de plantas trampa de ‘Nova’ para los modelos de mancha marrón evaluados: **A)** Alter-Rater; **B)** modelo empírico simple (SRS); **C)** modelo aditivo generalizado (GAM); **D)** modelo aditivo generalizado modificado (GAM_{lluvia}); **E)** modelo genérico de infección (GIM); **F)** modelo genérico de infección modificado (GIM_{lluvia}). Clasificación binaria: presencia/ausencia de síntomas. En las gráficas, mediana e intervalo de confianza 95% del área total bajo la curva (AUC) y el área parcial (pAUC) en la región de sensibilidad 0,9-1 (área sombreada). Umbral de corte óptimo con valores asociados de sensibilidad y especificidad. Línea diagonal no discriminante.....

97

Figura 4.8: Curvas ROC obtenidas en la parcela de Moncada (n = 142) con exposiciones semanales de plantas trampa de ‘Nova’ para los modelos de mancha marrón evaluados: **A)** Alter-Rater; **B)** modelo empírico simple (SRS); **C)** modelo aditivo generalizado (GAM); **D)** modelo aditivo generalizado modificado (GAM_{lluvia}); **E)** modelo genérico de infección (GIM); **F)** modelo genérico de infección modificado (GIM_{lluvia}). Clasificación binaria: presencia/ausencia de síntomas. En las gráficas, mediana e intervalo de confianza 95% del área total bajo la curva (AUC) y el área parcial (pAUC) en la región de sensibilidad 0,9-1 (área sombreada). Umbral de corte óptimo con valores asociados de sensibilidad y especificidad. Línea diagonal no discriminante.....

98

Figura 4.9: Curvas ROC obtenidas en la parcela de Moncada (n = 142) con exposiciones semanales de plantas trampa de ‘Nova’ para los modelos de mancha marrón evaluados: **A)** Alter-Rater; **B)** modelo empírico simple (SRS); **C)** modelo aditivo generalizado (GAM); **D)** modelo aditivo generalizado modificado (GAM_{lluvia}); **E)** modelo genérico de infección (GIM); **F)** modelo genérico de infección modificado (GIM_{lluvia}). Clasificación binaria: presencia/ausencia de síntomas. En las gráficas, mediana e intervalo de confianza 95% del área total bajo la curva (AUC) y el área parcial (pAUC) en la región de sensibilidad 0,9-1 (área sombreada). Umbral de corte óptimo con valores asociados de sensibilidad y especificidad. Línea diagonal no discriminante.....

99

- Figura 4.10:** Curvas ROC obtenidas con los valores conjunto de las tres parcelas de Alzira, Chiva y Moncada ($n = 266$) con exposiciones semanales de plantas trampa de ‘Fortune’ para los modelos de mancha marrón evaluados: **A)** Alter-Rater; **B)** modelo empírico simple (SRS); **C)** modelo aditivo generalizado (GAM); **D)** modelo aditivo generalizado modificado (GAM_{lluvia}); **E)** modelo genérico de infección (GIM); **F)** modelo genérico de infección modificado (GIM_{lluvia}). Clasificación binaria: presencia/ausencia de síntomas. En las gráficas, mediana e intervalo de confianza 95% del área total bajo la curva (AUC) y el área parcial (pAUC) en la región de sensibilidad 0,9-1 (área sombreada). Umbral de corte óptimo con valores asociados de sensibilidad y especificidad. Línea diagonal no discriminante..... 100
- Figura 4.11:** Curvas ROC obtenidas con los valores conjunto de las tres parcelas de Alzira, Chiva y Moncada ($n = 266$) con exposiciones semanales de plantas trampa de ‘Nova’ para los modelos de mancha marrón evaluados: **A)** Alter-Rater; **B)** modelo empírico simple (SRS); **C)** modelo aditivo generalizado (GAM); **D)** modelo aditivo generalizado modificado (GAM_{lluvia}); **E)** modelo genérico de infección (GIM); **F)** modelo genérico de infección modificado (GIM_{lluvia}). Clasificación binaria: presencia/ausencia de síntomas. En las gráficas, mediana e intervalo de confianza 95% del área total bajo la curva (AUC) y el área parcial (pAUC) en la región de sensibilidad 0,9-1 (área sombreada). Umbral de corte óptimo con valores asociados de sensibilidad y especificidad. Línea diagonal no discriminante..... 101
- Figura 4.12:** Curvas ROC obtenidas con los valores conjunto de las tres parcelas de Alzira, Chiva y Moncada ($n = 266$) con exposiciones semanales de plantas trampa de ‘Fortune’ para los modelos de mancha marrón evaluados: **A)** Alter-Rater; **B)** modelo empírico simple (SRS); **C)** modelo aditivo generalizado (GAM); **D)** modelo aditivo generalizado modificado (GAM_{lluvia}); **E)** modelo genérico de infección (GIM); **F)** modelo genérico de infección modificado (GIM_{lluvia}). Clasificación binaria: >5% de hojas sintomáticas. En las gráficas, mediana e intervalo de confianza 95% del área total bajo la curva (AUC) y el área parcial (pAUC) en la región de sensibilidad 0,9-1 (área sombreada). Umbral de corte óptimo con valores asociados de sensibilidad y especificidad. Línea diagonal no discriminante..... 102
- Figura 4.13:** Curvas ROC obtenidas con los valores conjunto de las tres parcelas de Alzira, Chiva y Moncada ($n = 266$) con exposiciones semanales de plantas trampa de ‘Nova’ para los modelos de mancha marrón evaluados: **A)** Alter-Rater; **B)** modelo empírico simple (SRS); **C)** modelo aditivo generalizado (GAM); **D)** modelo aditivo generalizado modificado (GAM_{lluvia}); **E)** modelo genérico de infección (GIM); **F)** modelo genérico de infección modificado

| | Página |
|---|--------|
| (GIM _{lluvia}). Clasificación binaria: >5% de hojas sintomáticas. En las gráficas, mediana e intervalo de confianza 95% del área total bajo la curva (AUC) y el área parcial (pAUC) en la región de sensibilidad 0,9-1 (área sombreada). Umbral de corte óptimo con valores asociados de sensibilidad y especificidad. Línea diagonal no discriminante..... | 103 |
| Figura 5.1: Diferentes grados de humectación foliar como consecuencia de del rocío en hojas de cítricos: A) 25%, B) 50%, C) 75% y D) 100%..... | 119 |
| Figura 5.2: Posición de los sensores de humectación foliar Spectrum y Hobo, sensores de temperatura y HR y el anemómetro a 3 m de altura en los lados este y oeste en la copa de un árbol de cítrico..... | 121 |
| Figura 5.3: Árbol de clasificación para la presencia de humectación foliar con el modelo CART/SLD en función de la depresión del punto de rocío (DPD), velocidad del viento (W) y humedad relativa (HR) (Kim <i>et al.</i> , 2002)..... | 122 |
| Figura 5.4: Duración de humectación foliar observada visualmente durante nueve días. Diagramas de cajas para cada una de las dos orientaciones (oeste, este), tres alturas (1, 1,5 y 2 m) y dos caras de la hoja (haz, envés)..... | 138 |
| Figura 5.5: Duración de humectación foliar registrada con sensores Spectrum en días con y sin lluvia durante el período de estudio. Diagramas de cajas para cada una de las dos orientaciones (oeste, este) y tres alturas (1, 1,5 y 2 m)..... | 129 |
| Figura 5.6: Área bajo la curva ROC para los sensores de humectación Spectrum y Hobo y los modelos HR y CART/SLD como estimadores de las observaciones visuales de humectación foliar en cítricos. En cada gráfico se representa el AUC con su intervalo de confianza del 95% y el punto de corte óptimo seleccionado junto al coeficiente kappa de Cohen (<i>k</i>). Análisis conjunto de todas las posiciones de copa para cada sensor..... | 132 |
| Figura 5.7: Diagramas de cajas para la duración de la humectación foliar registrada con sensores Spectrum en parcelas comerciales de cítricos..... | 134 |
| Figura 5.8: Duración diaria de la humectación foliar en las parcelas de cítricos con riego por goteo y riego a manta durante el período de estudio en el año 2012..... | 139 |
| Figura 5.9: Duración diaria de la humectación foliar en las parcelas de cítricos con riego por goteo y riego a manta durante los períodos de estudio en el año 2013..... | 140 |
| Figura 5.10: Residuos de los modelos ARIMA (1,1,1) de la duración de la humectación foliar en tres parcelas de cítricos con riego por goteo y tres con riego a manta durante el período de estudio en el año 2012. Las líneas | |

| | Página |
|---|---------------|
| discontinuas representan la desviación estándar de los residuos (rojo 2x y azul 3x). Los puntos azules son eventos de lluvia (> 0,2 mm) y los puntos rojos son riegos a manta..... | 141 |
| Figura 5.11: Residuos de los modelos ARIMA (1,1,1) de la duración de la humectación foliar en tres parcelas de cítricos con riego por goteo y tres con riego a manta durante los períodos de estudio en el año 2013. Las líneas discontinuas representan la desviación estándar de los residuos (rojo 2x y azul 3x). Los puntos azules son eventos de lluvia (> 0,2 mm) y los puntos rojos son riegos a manta..... | 142 |

Índice de Tablas

| | Página |
|--|--------|
| Tabla 3.1: Aislamiento y patogenicidad de colonias de <i>Alternaria</i> obtenidas de árboles afectados y malas hierbas..... | 37 |
| Tabla 3.2 Aislamiento y patogenicidad de colonias de <i>Alternaria</i> obtenidas de las hojas jóvenes afectadas caídas al suelo..... | 39 |
| Tabla 3.3: Coeficientes de correlación de Spearman entre la incidencia de la mancha marrón en hojas de plantas trampa de mandarina ‘Fortune’ y ‘Nova’ con las variables meteorológicas..... | 46 |
| Tabla 4.1: Conceptos empleados en el análisis mediante curvas ROC (Receiver Operating Characteristic)..... | 70 |
| Tabla 4.2: Valores asignados por el modelo Alter-Rater en función de los umbrales de lluvia, duración de la humectación foliar y temperatura..... | 78 |
| Tabla 4.3: Periodos de exposición evaluados con plantas trampas de ‘Fortune’ y ‘Nova’ en las parcelas de Moncada, Alzira y Chiva, durante los años 2011, 2012 y 2013..... | 88 |
| Tabla 4.4: Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente kappa de Cohen (<i>k</i>) obtenidos con el punto de corte óptimo seleccionado según el estadístico <i>J</i> de Youden para los modelos de la mancha marrón evaluados en plantas trampa de ‘Fortune’ y ‘Nova’. Análisis individual de las tres parcelas de estudio. Clasificación binaria: presencia/ausencia de síntomas..... | 92 |
| Tabla 4.5 Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente kappa de Cohen (<i>k</i>) obtenidos con el punto de corte óptimo seleccionado con el estadístico <i>J</i> de Youden para los modelos de la mancha marrón evaluados en plantas trampa de ‘Fortune’ y ‘Nova’. Análisis combinado de las tres parcela de estudio..... | 93 |
| Tabla 4.6: Algunos modelos de enfermedades de plantas evaluados mediante análisis de curvas ROC..... | 112 |
| Tabla 5.1: Características de las parcelas comerciales de cítricos incluidas en el estudio de la estimación de la humectación foliar..... | 124 |
| Tabla 5.2: Área bajo la curva ROC, puntos de corte óptimos seleccionados y coeficiente kappa de Cohen (<i>k</i>) para los sensores de humectación Spectrum y Hobo y los modelos de humedad relativa y CART/SLD como estimadores de las observaciones visuales de humectación foliar en seis posiciones de la copa | |

| | Página |
|---|---------------|
| y las dos caras de las hojas de cítricos..... | 131 |
| Tabla 5.3: Área bajo la curva ROC, puntos de corte óptimos y coeficiente kappa de Cohen (k) para la humedad relativa como estimador de la humectación foliar registrada con sensores Spectrum en parcelas comerciales de cítricos en España..... | 135 |
| Tabla 5.4: Estimadores de los parámetros del modelo ARIMA (1,1,1) de la duración de la humectación foliar en las parcelas de cítricos con riego por goteo y a manta durante los períodos de estudio en los años 2012 y 2013 | 138 |
| Tabla 5.5: Descripción de algunos modelos de estimación de la humectación foliar..... | 150 |
| Tabla 5.6: Parámetros meteorológicos utilizados en algunos modelos de estimación la humectación foliar..... | 151 |

Abreviaturas

ABS: Alternaria brown spot
ACT: *Alternaria citri* toxin
AEMET: Agencia Estatal de Meteorología
AIC: Akaike information criterion
AL: Alicante
ALEX: Atmosphere land exchange
APS: American Phytopathological Society
ARIMA: Autoregressive integrated moving average
ARSA: *Alternaria radicina* selective agar
AUC: Área under the curve
CART: Classification and regression tree
CSI: Critical success index
CS: Castellón
CV: Coeficiente de variación
DPD: Depresión del punto de rocío
EB: Energy balance
EE.UU.: Estados Unidos de América
ExT: Extended threshold
FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FT: Fixed threshold
Fuzzy: Fuzzy control system
GAM: Generalized additive model
MCMC: Cadena de Markov de Monte Carlo
GIM: Generic infection model
GLM: Generalized linear model
HF: Humectación foliar
HST: Host-specific toxin
HR: Humedad relativa
HU: Huelva

IC: Intervalo de confianza
ITS: Internal transcribed spacer
IVIA: Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias
LWD: Leaf wetness duration
MAE: Mean absolute error
MAGRAMA: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio ambiente
Mb: Millones de bases
ME: Mean error
mtLSU: Mitochondrial larger subunit
MU: Murcia
MW: Microweather model
OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development
pAUC: Partial área under the curve
PDA: Patata dextrosa agar
PDAs: Patata dextrosa agar con estreptomycin
PDAsb: Patata dextrosa agar con estreptomycin y benomilo
RMSE: Root mean square error
ROC: Receiver operating characteristic
ROS: Reactive oxygen species
SE: Sevilla
SLD: Stepwise linear discriminant
SRS: Simple rule system
SWEB: Surface wetness energy balance
TA: Tarragona
USA: United States of América
USDA: United States Department of Agriculture
VA: Valencia
apdo.: apartado
°C: Grados centígrados
cv: cultivar
DNA: Ácido desoxirribonucleico
e.g.: por ejemplo

E-O: Este-Oeste

Fig.: Figura

g: gramo

ha: hectárea

i.e.: es decir

L: litro

LM: Light microscopy

m: metro

mm: milímetro

N-S: Norte-Sur

NE-SO: Noreste-Suroeste

NO-SE: Noroeste-Sureste

Nº: número

P: probabilidad

Pag.: Pagina

s: segundo

sp.: especie

spp.: especies

SW: suroeste

vs.: *versus*

Capítulo 1

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia de los cítricos en España

Los cítricos son la fruta más consumida en todo el mundo, su producción se destina principalmente al mercado en fresco, obtención de zumos y aceites esenciales. Los seis principales países productores que agrupan casi el 60% de la producción mundial son China, Brasil, Estados Unidos (EE.UU.), India, México y España, que se sitúa en el sexto lugar (FAO, 2012). Alrededor de un tercio de la producción mundial de cítricos se destina a la producción de zumo de naranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). En lo que respecta a las mandarinas (*C. reticulata* Blanco), la superficie cultivada a nivel mundial alcanzó los 2,2 millones de hectáreas en el año 2011 con una producción de 26 millones de toneladas y un crecimiento medio anual de alrededor de 5% en los últimos cinco años. China representa el 65,5% de la superficie mundial cultivada de mandarinos, seguida de España (5,4%), Brasil (2,4%), Paquistán (2,3%), Marruecos (2,2%) y Japón (2,0%) (FAO, 2012). Más del 90% de la producción mundial de mandarinas se destina a consumo en fresco (USDA, 2013).

España es el primer productor europeo y destina un 48% de la producción a los mercados internacionales, siendo el mayor exportador de cítricos del mundo para consumo en fresco con el 40% del volumen global. La Comunitat Valenciana es la primera productora de cítricos a nivel nacional, con 3,5 millones de toneladas y una superficie cultivada de más de 170.000 hectáreas, lo que representa el 56% del total de la producción de cítricos españoles (MAGRAMA, 2013).

Las variedades de mandarina suponen cerca del 40% del total de la superficie dedicada al cultivo de los cítricos en España (MAGRAMA, 2013). Los híbridos de mandarina se introdujeron en la citricultura española para alargar el calendario de exportación de variedades tipo ‘easy peeling’, muy demandadas por los mercados internacionales. Durante las últimas dos décadas se ha incrementado notablemente el cultivo de estas variedades híbridas, destacando entre ellas los cultivares ‘Nova’ y ‘Fortune’ (Navarro *et al.*, 2005).

1.2. El género *Alternaria*

El género fúngico *Alternaria* está constituido por especies que se encuentran distribuidas por todo el mundo en asociación con una amplia variedad de sustratos y ecosistemas. El género engloba tanto especies saprofitas como patógenas (Rotem, 1994). Como patógeno de plantas es un género con un amplio rango de hospedantes y ocupa el décimo lugar en términos del número total de especies vegetales sobre las que se ha citado (Farr *et al.*, 1989). Las enfermedades causadas por *Alternaria* afectan a una gran variedad de cultivos como los cereales, hortícolas y frutales causando graves daños e importantes pérdidas económicas. Además, existen especies que actúan también como patógenos de poscosecha. Algunas especies de *Alternaria* son capaces de causar enfermedades únicamente en plantas senescentes o debilitadas. Sin embargo, otras poseen una mayor capacidad patogénica y dependen menos de los factores de predisposición del hospedante. Su patogenicidad se ha relacionado en muchos casos con la producción de toxinas, que pueden ser de tipo inespecífico o afectar únicamente a unos hospedantes concretos (Rotem, 1994; Thomma, 2003; Agrios, 2005). Las toxinas no específicas suelen actuar como factor

adicional en el mecanismo de penetración y la aparición de los síntomas, pero por lo general no son necesarias para el establecimiento del patógeno en la planta. En cambio, las toxinas específicas al hospedante (HST) son indispensables para que el hongo desarrolle toda su actividad patogénica. Las HST son factores determinantes de las interacciones planta-patógeno y proporcionan la especificidad de estas asociaciones. Generalmente actúan mediante la interrupción de los procesos bioquímicos y resultan en la muerte celular (Cantone y Dunkle, 1990). Esto ha permitido que especies de tipo saprófito puedan convertirse en patógenos de plantas (Jonathan *et al.*, 2001).

La mayoría de las especies causan daños principalmente sobre el tejido foliar, provocando una reducción de la capacidad fotosintética de las plantas. Algunas de las enfermedades causadas por especies de *Alternaria* afectan también a frutos y tubérculos, causando daños tanto en la calidad como en la producción. En general, están consideradas como uno de los grupos de enfermedades fúngicas que mayores pérdidas económicas causa a nivel mundial (Rotem, 1994; Agrios, 2005).

No se conoce la fase sexual del género *Alternaria* y la mayoría de especies se reproducen mediante esporas asexuales (conidias), por lo que su clasificación sistemática se ha basado principalmente en las características morfológicas de las conidias y sus patrones de esporulación (Simmons, 1992; 2007). En general la taxonomía de los aislados de *Alternaria* de esporas de pequeño tamaño basada en aspectos genéticos se ha demostrado compleja. Esto se debe principalmente a la falta de variabilidad en los marcadores empleados habitualmente en la sistemática de hongos, principalmente la región ITS que es muy conservada y en la mayoría de los casos no es suficientemente resolutive a nivel intraespecífico (Roberts *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2002).

Peever *et al.* (2004) llevaron a cabo estudios filogenéticos con una colección de aislados de *Alternaria* de cítricos y otros hospedantes mediante el análisis del ADN mitocondrial (mtLSU) y el gen de la β -tubulina. Sobre la base de los resultados obtenidos, estos autores separaron los aislados en dos grupos, los de conidias grandes con una longitud superior a 100 μm (Simmons, 1990), y las de conidias de pequeño tamaño con una longitud de 30-50 μm . A partir de los resultados, Peever *et al.* (2004) propusieron agrupar todos los aislados de

Alternaria de cítricos con esporas pequeñas dentro de la especie *A. alternata* (Fr.:Fr.) Keissler. No obstante, el planteamiento de Peever *et al.* (2004) no ha sido adoptado de forma unánime por parte de todos los taxónomos del género *Alternaria*, y la clasificación de especies de *Alternaria* con esporas pequeñas ha sido objeto de controversia (Andersen *et al.*, 2005).

Los resultados de Peever *et al.* (2004) conectan con el planteamiento de Nishimura y Kohmoto (1983), que ya propusieron en su día la designación de patotipos dentro de la especie *A. alternata* en función de la producción de HST en algunas plantas de interés agrícola como el manzano, pera japonesa ('nashy'), fresón, tabaco y tomate. En total se han descrito doce patotipos de *A. alternata* en función de la producción de HST (Nishimura y Kohmoto, 1983). Estudios filogenéticos realizados con colecciones de aislados pertenecientes a varios de estos patotipos parecen confirmar la validez de este sistema de clasificación (Kusaba y Tsuge, 1995; Weir *et al.*, 1998). En cualquier caso, la sistemática del género *Alternaria* se encuentra actualmente en pleno proceso de revisión (Woudenberg *et al.*, 2013), por lo que son previsibles cambios en la denominación de muchas especies.

1.3. Enfermedades de los cítricos causadas por *Alternaria*

Se han descrito cuatro enfermedades diferentes causadas por *Alternaria* en cítricos: (i) la mancha marrón de las mandarinas causada por un patotipo de *A. alternata* que afecta selectivamente a un grupo de variedades, (ii) la mancha foliar del limón rugoso (*C. jambhiri* Lush) y la lima Rangpur (*C. limonia* Osbeck) causada por otro patotipo de *A. alternata*, (iii) la mancha foliar de la lima mejicana (*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.) causada por la especie *A. limicola* Simmons & Palm. (Simmons, 1990) y (iv) la podredumbre negra de los frutos cítricos causada por *A. alternata* (Bliss y Fawcett, 1944; Simmons, 1990; Timmer *et al.*, 2003; Peever *et al.*, 2004).

La mancha marrón de las mandarinas se caracteriza por la aparición de lesiones necróticas en brotes, hojas y frutos inmaduros, necrosando los tejidos y provocando la abscisión prematura tanto de hojas como de los frutos afectados. La mancha foliar del limón rugoso y la lima Rangpur causa también necrosis

foliares y pequeñas lesiones en frutos. Estas dos especies de cítricos se emplean generalmente como portainjertos, por lo que los daños de esta enfermedad quedan limitados generalmente a los viveros (Timmer *et al.*, 2003). La mancha foliar de la lima mejicana se ha detectado únicamente en algunas zonas de producción de lima en México. Puede infectar también en otras especies de cítricos en condiciones de infección artificial, pero al parecer no causa daños de importancia en condiciones de campo (Palm y Civerolo, 1994). Los síntomas en los árboles afectados consisten en pequeñas lesiones foliares de color marrón rodeadas por un halo clorótico, la seca apical de los brotes y pequeñas pústulas en los frutos.

Aunque las infecciones suelen iniciarse en campo, la podredumbre negra de los frutos es una enfermedad principalmente de poscosecha. La enfermedad se caracteriza por desarrollar una podredumbre de color oscuro en el eje central del fruto cuando se inicia el proceso de maduración. A diferencia de otros patógenos fúngicos de poscosecha, *A. alternata* no se desarrolla habitualmente sobre la corteza de los frutos y sus daños quedan por lo general restringidos a las partes internas del fruto. Su patogenicidad está determinada principalmente por la producción de la enzima poligalacturonasa, que le permite avanzar a través del eje central del fruto. Una vez en los lóculos, la actividad de esta enzima desaparece debido a la abundante disponibilidad de azúcares (Isshiki *et al.*, 2001; 2003; Ohtani *et al.*, 2003).

1.4. La mancha marrón de las mandarinas

Síntomas y daños

Los síntomas de la mancha marrón de las mandarinas se describieron por primera vez en 1903 sobre mandarina ‘Emperor’ en Australia (Pegg, 1966). Actualmente la enfermedad está presente en las principales áreas cítricas del mundo. Su distribución geográfica abarca zonas de clima subtropical húmedo como Florida (EE.UU.), Cuba, Colombia, Brasil, Argentina, Perú y China. (Whiteside, 1976; Herrera-Isla, 1992; Castro *et al.*, 1995, De Goes *et al.*, 2001; Peres *et al.*, 2003; Marín *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010) y regiones de clima

árido y semi-árido como Israel, Sudáfrica, Turquía, España, Italia, Grecia e Irán (Solel, 1991; Schutte y Beeton, 1994; Canihos *et al.*, 1997; Vicent *et al.*, 2000; Bella *et al.*, 2001; Elena, 2006; Golmohammadi *et al.*, 2006).

Los síntomas de la mancha marrón se caracterizan por la presencia de necrosis en hojas, brotes y la corteza de los frutos. Las lesiones necróticas en las hojas afectadas se expanden siguiendo las nervaduras de las hojas (Fig. 1A) y los brotes afectados sufren defoliaciones muy intensas (Fig.1B), que en algunos casos se defolían por completo. La abscisión prematura de las hojas en los árboles afectados reduce su capacidad fotosintética y consecuentemente su productividad. Las hojas son susceptibles a la infección sólo durante sus primeras fases de crecimiento y se hacen resistentes a medida que alcanzan su tamaño definitivo.

En los frutos afectados aparecen excrecencias suberosas y necrosis deprimidas de tamaño y forma variable (Figs. 1C y 1D). Aunque las lesiones afectan únicamente a la parte externa del fruto, sin penetrar el interior de los lóculos, la presencia de costras y necrosis deprecia por completo la fruta para su comercialización en fresco. Las infecciones inducen también la caída prematura en los frutos jóvenes, lo que se traduce en pérdidas de cosecha muy importantes (Timmer *et al.*, 2003; Vicent *et al.*, 2008).

La mancha marrón afecta específicamente a un grupo de variedades de mandarina y sus híbridos. La mandarina ‘Dancy’ y sus híbridos ‘Minneola’, ‘Page’, ‘Fortune’, ‘Orlando’, ‘Nova’, ‘Lee’ y ‘Sunburst’ son susceptibles a la enfermedad (Dalkilic *et al.*, 2005). La enfermedad afecta también a otras variedades no derivadas directamente de ‘Dancy’, como son ‘Emperor’, ‘Ponkan’ y ‘Murcott’. Se ha citado también en pomelos aunque no se considera un problema en condiciones de campo (Schutte, 1996; Timmer y Peever, 1997; Peever *et al.*, 2000; Timmer *et al.*, 2003).

En España la mancha marrón se identificó por primera vez en 1998 en la provincia de Valencia (Vicent *et al.*, 2000). En la actualidad la mancha marrón está presente en todas las zonas cítricas españolas donde se cultivan variedades susceptibles como ‘Fortune’ y ‘Nova’ (Cuenca *et al.*, 2013). Los daños causados por la enfermedad y sus dificultades de control han hecho que muchos

productores de 'Fortune' hayan optado por la reconversión varietal de las parcelas afectadas (Vicent *et al.*, 2008).



Figura 1.1: Síntomas de la mancha marrón de las mandarinas: **A)** Necrosis en brotaciones de mandarino 'Fortune'; **B)** Defoliación intensa en un árbol de 'Fortune'; **C)** Frutos inmaduros de mandarina 'Fortune' con lesiones necróticas y costras suberosas; **D)** Fruto maduro de mandarina 'Fortune' con lesiones necróticas.

Agente causal

La nomenclatura del agente causal de la mancha marrón de las mandarinas ha sufrido varios cambios a lo largo de los años. Basándose en los datos publicados previamente por Doigde (1929), Kiely (1964) lo describió por primera vez como *A. citri* Pierce. En un análisis más detallado de las características morfológicas de las conidias, Pegg (1966) mantuvo la designación de *A. citri*, pero apoyándose en la descripción de Bliss y Fawcett (1944). Al comprobar experimentalmente que algunos aislados eran capaces de producir la

toxina y otros no, este autor consideró al agente causal de la mancha marrón como una forma especializada de *A. citri*.

Debido a las similitudes en las características morfológicas, el agente causal de la mancha foliar del limón rugoso había sido también asignado anteriormente a la especie *A. citri* (Ruehle, 1937). Hasta principios de los años ochenta se mantuvo la designación de *A. citri* para los agentes causales de la mancha marrón de las mandarinas y la mancha foliar del limón rugoso. Sobre la base de su descripción morfológica y el tamaño de conidias, Nishimura y Kohmoto (1983) propusieron asignarlos a la especie *A. alternata*, diferenciando entre el patotipo mandarina ('tangerine') y el patotipo limón rugoso. Posteriormente, Solel (1991) los renombró al patotipo mandarina como *A. alternata* pv. *citri* para diferenciarlo de los aislados saprofitos y de los causantes de la mancha foliar del limón rugoso.

A partir de estudios morfológicos con una colección de 135 aislados, Simmons (1999a) concluyó que ninguno de ellos podía asignarse a las especies *A. citri* o *A. alternata*. El mismo autor propuso suprimir el sistema de patotipos dentro de *A. alternata*, sustituyéndolo por la nomenclatura *A. limoniasperae* Simmons y *A. citrimacularis* Simmons para los aislados patógenos a limón rugoso, y *A. tangelonis* Simmons, *A. citriarbusti* Simmons, *A. tukisafria* Simmons, *A. toxicogenica* Simmons, *A. colombiana* Simmons, *A. perangusta* Simmons, *A. interrupta* Simmons y *A. dumosa* Simmons para los aislados patógenos a mandarina. De la misma forma, propuso la desaparición del resto de patotipos de *A. alternata* y su reasignación a diferentes especies (Simmons, 1999b).

En la presente Tesis Doctoral se ha seguido el criterio de considerar el agente causal de la mancha marrón de las mandarinas como un patotipo de la especie *A. alternata*, aunque en muchas partes del texto se hará referencia de forma genérica. Este patógeno posee un grupo de genes situados en un cromosoma de pequeño tamaño (<2.0 Mb) que le confiere la capacidad de producir la toxina ACT, que afecta de forma selectiva a un grupo de variedades (Ajiro *et al.*, 2010). Este cromosoma no es esencial para el crecimiento y reproducción del patógeno, por lo que se considera como condicionalmente prescindible (Akamatsu *et al.*, 1999; Masunaka *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2001;

Hatta *et al.*, 2002; 2006). En otros hongos se ha descrito que estos cromosomas condicionalmente dispensables pueden ser transmitirse horizontalmente entre aislados mediante contacto de hifas y anastomosis (Masel *et al.*, 1996; Rosewich y Kistler, 2000; Walton, 2000). En las lesiones de mancha marrón suelen coexistir aislados patógenos y saprofitos de *Alternaria*, por lo que es concebible que el cromosoma necesario para la producción de la toxina ACT se transmita horizontalmente entre ellos. De hecho, en estudios llevados a cabo en Florida se ha identificado un aislado de *A. alternata* doblemente patógeno de mandarina y limón rugoso. El análisis genético demostró poseer los cromosomas necesarios para la producción de la toxina específica en cada una de estas especies de cítricos (Masunaka *et al.*, 2005).

La toxina ACT entra en contacto con la planta durante la germinación de las conidias, afectando rápidamente a la integridad de la membrana plasmática de las células susceptibles (Kohmoto *et al.*, 1993). La toxina actúa rápidamente, lo que hace que el período de incubación sea muy corto y las lesiones sean visibles a las pocas horas de iniciarse la infección. Existen también evidencias indirectas que sugieren la presencia de receptores de la toxina en los genotipos de cítricos susceptibles (Tsuge *et al.*, 2012). Estudios recientes indican que las especies reactivas del oxígeno (ROS) producidas por las plantas susceptibles son también importantes en el proceso de patogénesis (Yang y Chung, 2012).

Epidemiología

El agente causal de la mancha marrón sobrevive principalmente en los tejidos afectados. Se reproduce mediante esporas asexuales (conidias) que forma sobre las lesiones. Estudios realizados en Florida indican que la esporulación es mayor entre 10 y 40 días después de la infección, sobre todo en variedades muy susceptibles (Reis *et al.*, 2006). En la hojarasca la esporulación cesa a los 8-12 días, ya que en las condiciones climáticas de Florida las hojas se descomponen rápidamente (Mondal y Timmer, 2002).

Las conidias se liberan por bajadas bruscas de humedad relativa (HR) y por la acción de la lluvia. Las conidias se dispersan principalmente mediante corrientes de aire y salpicaduras de lluvia, depositándose sobre la superficie de

hojas y frutos. En general, todas las especies de *Alternaria* necesitan humedad en forma de agua libre (humectación) para la germinación y la infección (Rotem, 1994). Bajo condiciones ambientales favorables, las conidias del agente causal de la mancha marrón germinan infectando los tejidos de hojas y frutos susceptibles (Timmer *et al.*, 1998; Reis *et al.*, 2006). Estudios realizados en Florida señalan que la mayor concentración de conidias en el aire se registra después de los períodos de infección (Timmer *et al.*, 1998; 2000; Vicent *et al.*, 2002b).

Estudios realizados en condiciones controladas indican que las infecciones se producen principalmente con temperaturas de 17-32°C junto con la presencia de humectación sobre la planta por lluvias o rocío durante 3-36 horas. Debido a la acción de la toxina ACT, el período de incubación es muy corto y las lesiones son visibles en tan sólo 16-36 horas (Canihos *et al.*, 1999; Timmer *et al.*, 2000). Las hojas sólo son susceptibles a la infección durante sus primeras fases de crecimiento, pero en condiciones de clima Mediterráneo los frutos de 'Fortune' pueden infectarse en cualquier momento durante todo su ciclo de desarrollo (Vicent *et al.*, 2004). En estudios llevados a cabo en condiciones de clima subtropical húmedo en Florida indican que las conidias aerovagantes de *A. alternata* están presentes en las parcelas afectadas durante todo el ciclo de cultivo. Los períodos de infección están determinados principalmente por la presencia de condiciones climáticas favorables y tejido vegetal susceptible (Timmer *et al.*, 1998; 2000; Vicent *et al.*, 2002a).

Los datos de Florida indican que las infecciones del patógeno están relacionadas con la frecuencia de las lluvias pero no tanto con su duración (Timmer *et al.*, 2000; Bhatia *et al.*, 2003). No obstante, esta relación no sería extrapolable a las zonas de clima semi-árido, donde la frecuencia de lluvias es menor y el rocío representa una importante fuente para el suministro de agua sobre la copa de los árboles (Bashi y Rotem, 1974; Rotem, 1994).

Control de la enfermedad

Para un control eficiente de la mancha marrón en variedades susceptibles es necesario adoptar una estrategia integrada de prácticas agronómicas y

aplicaciones fungicidas. Las medidas agronómicas para reducir los daños causados por la mancha marrón van enfocadas principalmente a mejorar la aireación de las parcelas. Se recomienda evitar las plantaciones de variedades susceptibles en zonas húmedas, utilizar marcos de plantación amplios, orientar las filas siguiendo la dirección de los vientos dominantes y evitar las cubiertas de malla. Una poda adecuada de los árboles permite mejorar también la ventilación de la parcela. Se deben evitar los riegos por aspersión que mojan directamente la copa del árbol y que pueden inducir una mayor duración de la humectación. Este tipo de riego no se utiliza en España, pero es muy frecuente en otros países. La presencia de cubiertas vegetales, restos de poda triturados y los riegos por inundación podrían incrementar también la humedad ambiental en las parcelas, aunque no existen estudios específicos en cítricos a este respecto (Timmer *et al.*, 2003; Vicent *et al.*, 2007; 2009).

Al igual que en otros países, en España el control económico de la enfermedad requiere de la aplicación de fungicidas (Vicent *et al.* 2007; 2008, 2009). Debido al corto período de incubación, la aparición de síntomas es muy rápida y la acción curativa de los fungicidas no es efectiva. La actividad de los fungicidas frente a la mancha marrón es estrictamente preventiva, por lo que las aplicaciones deben realizarse antes del inicio de los períodos de infección para proteger las hojas y frutos susceptibles (Vicent *et al.*, 2007; 2009). Los momentos óptimos de aplicación y el número total de aplicaciones fungicidas dependen de las condiciones meteorológicas propias de cada región y cada año. En Florida se ha desarrollado el sistema de estación de avisos Alter-Rater, que permite programar las aplicaciones fungicidas en función del riesgo de infección (Bhatia *et al.*, 2003; Peres y Timmer, 2006).

Los compuestos cúpricos se utilizan de forma habitual para el control de la mancha marrón en la mayoría de las zonas cítricas afectadas por la enfermedad como Florida, Israel, Sudáfrica y Australia (Timmer y Zitko, 1997; Solel *et al.*, 1997; Swart *et al.*, 1998; Bhatia *et al.*, 2003; Miles *et al.*, 2005). No obstante, estos compuestos pueden inducir problemas de fitotoxicidad cuando se aplican de forma repetida o en condiciones secas y calurosas (Albrigo *et al.*, 1997; Schutte *et al.*, 1997). Los fungicidas ditiocarbamatos se han utilizado también con éxito en países como Cuba, Sudáfrica e Israel en mandarina ‘Dancy’ y

tangelo ‘Minneola’ (Otero *et al.*, 1994; Schutte y Beeton, 1994; Solel *et al.*, 1997; Swart *et al.*, 1998). Los fungicidas del grupo de las dicarboximidias, principalmente iprodiona y procimidona, se han mostrado también muy eficaces en el control de la mancha marrón (Solel *et al.*, 1997; Swart *et al.*, 1998; Miles *et al.*, 2005), pero su uso continuado ha generado problemas de resistencias en Australia, Israel y Turquía (Hutton, 1989; Solel *et al.*, 1996; Erkilic *et al.*, 1999). Algunos fungicidas del grupo de los triazoles, como difenoconazol, han mostrado una buena eficacia en ensayos realizados en Sudáfrica (Schutte y Beeton, 1994). Actualmente, los fungicidas del grupo de las estrobilurinas (QoI) como azoxistrobin, trifloxistrobin y piraclostrobin son la base del control de la mancha marrón en la mayoría de países afectados por la enfermedad (Timmer y Zitko, 1997; Miles *et al.*, 2005). Estos productos son muy propensos a generar problemas de resistencia y de hecho ya se han detectado recientemente algunos casos en Florida (Vega y Dewdney, 2014).

En España, las aplicaciones fungicidas para el control de la mancha marrón deben basarse exclusivamente en el uso de cobre y mancozeb, ya que son los únicos fungicidas autorizados (Liñan, 2014). El uso continuado de compuestos cúpricos provoca acumulaciones de cobre en el suelo que causan un impacto ambiental negativo (Timmer *et al.*, 2003). El reglamento europeo EC/473/2002 establece un límite anual de 6 Kg/ha de cobre en agricultura ecológica. Para soslayar este problema se han realizado estudios donde se demostró que es posible mantener una protección adecuada de los frutos de mandarina ‘Fortune’ con dosis reducidas de cobre (Vicent *et al.*, 2009).

Se han realizado numerosos estudios genéticos y de selección para obtener variedades con las mismas características agronómicas que las mandarinas susceptibles a la mancha marrón, pero resistentes a la enfermedad (Hutton y Mayers, 1988; Dalkilic *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2007; De Souza *et al.*, 2009). Se ha localizado una región genómica ligada a la resistencia de mancha marrón, que está controlada mediante un alelo dominante que transmite la sensibilidad (*S*) y otro recesivo que transmite la resistencia (*r*). De este modo se obtienen variedades susceptibles (*SS*) que transmiten la susceptibilidad a toda su descendencia, variedades resistentes (*rr*) que transmiten la resistencia a toda su descendencia y otras de tipo *Sr* que permiten obtener en su descendencia tanto

variedades resistentes como susceptibles. Dentro de las variedades del tipo *Sr* pueden presentarse niveles de afección en campo muy distintos como ocurre con 'Fortune', muy susceptible, y 'Nova' moderadamente susceptible (Cuenca *et al.*, 2013).

Capítulo 2

Capítulo 2

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La mancha marrón es un factor limitante para el cultivo de variedades muy susceptibles como la mandarina ‘Fortune’ y afecta seriamente a otras de susceptibilidad moderada como ‘Nova’. La enfermedad está ampliamente distribuida tanto en zonas de clima húmedo como semi-árido, pero su epidemiología se ha estudiado únicamente en zonas húmedas subtropicales de Florida. Actualmente no existen criterios técnicos de intervención para la aplicación de fungicidas en el control de la mancha marrón en condiciones mediterráneas, por lo que las estrategias de tratamientos fungicidas son en general poco eficientes. Como paso previo al desarrollo de modelos de predicción para optimizar el control de la mancha marrón en España, es necesario determinar primero las características epidemiológicas de la enfermedad bajo las condiciones agroclimáticas específicas del Mediterráneo.

La producción de mandarinas en España se destina principalmente a consumo en fresco en mercados de exportación. Debido a los exigentes criterios de calidad, los frutos deben estar prácticamente exentos de lesiones por lo que los modelos de predicción para la mancha marrón deben garantizar una alta sensibilidad para evitar falsos negativos. Por otra parte, la mayoría de los modelos de predicción de enfermedades necesitan datos de humectación, que no suelen estar disponibles en las estaciones agrometeorológicas convencionales. En

este sentido es interesante desarrollar y evaluar modelos para estimar la humectación foliar a partir de otras variables meteorológicas más accesibles.

Por todo ello, en la presente tesis doctoral se plantean los siguientes objetivos:

Capítulo 3. Aspectos epidemiológicos de la enfermedad

- 1) Determinar las diferentes fuentes de inóculo del patógeno.
- 2) Estudiar la supervivencia del patógeno en las hojas del suelo.
- 3) Seguir la dinámica estacional del inóculo del patógeno en el aire.
- 4) Determinar la distribución de los períodos de infección en dos variedades con diferentes grados de susceptibilidad y relacionarla con las variables meteorológicas.

Capítulo 4. Modelos de predicción

- 5) Cuantificar la eficiencia infectiva del patógeno bajo condiciones controladas de temperatura y humectación foliar en dos variedades con diferentes grados de susceptibilidad.
- 6) Estudiar el efecto de la interrupción de la humectación foliar en la eficiencia infectiva del patógeno.
- 7) Determinar el efecto de la temperatura en la duración del período de incubación posterior a la infección del patógeno.
- 8) Desarrollar modelos de predicción para la mancha marrón de las mandarinas y evaluarlos en condiciones semi-áridas mediante análisis de curvas ROC.

Capítulo 5. Duración de la humectación foliar

- 9) Estudiar la distribución espacial de la duración de la humectación foliar en la copa de los árboles cítricos.

- 10) Evaluar los sensores Spectrum y Hobo y los modelos CART/SLD y HR como estimadores de la humectación foliar mediante análisis de curvas ROC.
- 11) Estimar la duración de la humectación foliar en parcelas comerciales de cítricos en diferentes provincias españolas a partir de registros de humedad relativa.
- 12) Comparar la dinámica de la duración de humectación foliar en parcelas de cítricos con riego localizado y con riego a manta.

Capítulo 3

Capítulo 3

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LA MANCHA MARRÓN DE LAS MANDARINAS EN CONDICIONES DE CLIMA SEMI-ÁRIDO EN ESPAÑA

3.1. ANTECEDENTES

En la supervivencia de los patógenos fúngicos influyen las condiciones meteorológicas que interactúan con otros factores como la capacidad de colonización de los propios hospedantes y otros sustratos como el suelo, restos vegetales, malas hierbas, etc. (Rotem, 1994). La colonización de los restos vegetales se ha indicado en muchos casos como una de las principales formas de supervivencia de muchas especies de *Alternaria* (Herr y Lipps, 1982; Jeffrey *et al.*, 1984). En algunos estudios se ha citado la presencia de *Alternaria* en plantas arvenses, que podría ser una importante fuente de inóculo de estos patógenos (Netzer y Kenneth, 1969, Soteris, 1979; Jeffrey *et al.*, 1984). En estudios previos se ha demostrado que el agente causal de la mancha marrón sobrevive principalmente en los órganos de plantas afectadas (Reis *et al.*, 2006), pero su supervivencia en plantas arvenses no ha sido todavía estudiada.

La longevidad del patógeno en los restos vegetales está condicionada principalmente por el tiempo que tardan estos en descomponerse. En general, la integridad de los restos vegetales en la superficie del suelo se ve mermada por la acción de los procesos que descomponen la materia orgánica condicionados por el nivel de humedad, el oxígeno y la consiguiente actividad de los microorganismos (Rotem, 1994). En estudios realizados en zonas de veranos lluviosos como Florida, la descomposición de la hojarasca de los cítricos es muy rápida (Mondal y Timmer, 2002). En cambio, en las zonas mediterráneas las hojas podrían tardar

más tiempo en descomponerse. Estudios realizados en Florida demostraron que el agente causal de la mancha marrón puede reproducirse sobre las lesiones en los frutos, hojas y brotes (Reis *et al.*, 2006). El transporte por el aire es el principal mecanismo de diseminación de las conidias del patógeno, aunque se ha citado también el efecto de las salpicaduras de lluvia. En general, en las enfermedades causadas por *Alternaria* el patrón estacional en la presencia de inóculo de *Alternaria* en el aire va asociado al incremento de la intensidad de la enfermedad (Rotem, 1994). No obstante, esta relación no parece cumplirse de forma recurrente en el caso de la mancha marrón (Timmer *et al.*, 1998; 2000).

En general, las enfermedades de *Alternaria* se caracterizan por una gran flexibilidad ambiental y tolerancia de una amplia gama de condiciones climáticas (Rotem, 1994). De hecho, la distribución geográfica de la mancha marrón comprende regiones cítricas de clima húmedo con veranos lluviosos (~1.500 mm/año) así como regiones semi-áridas con veranos secos (~500 mm/año) (Timmer *et al.*, 2003). Sin embargo, los factores meteorológicos asociados con las enfermedades causadas por *Alternaria* y su importancia epidemiológica pueden diferir mucho dependiendo de la región climática.

Estudios preliminares indican que en las regiones mediterráneas, las condiciones climáticas para el desarrollo de la mancha marrón sólo serían favorables durante unos períodos muy concretos (Vicent *et al.*, 2002b). No obstante, los únicos estudios concluyentes sobre la epidemiología y los factores climáticos asociados a la mancha marrón de las mandarinas se han realizado en zonas de clima húmedo subtropical en Florida (Timmer *et al.*, 1998; 2000; Reis *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta las diferencias entre las zonas cítricas húmedas de Florida y los climas semi-áridos de la cuenca del Mediterráneo, los conocimientos actuales sobre la epidemiología de la enfermedad no pueden extrapolarse directamente a España u otras regiones mediterráneas. Por lo tanto, como paso previo al desarrollo de un sistema de ayuda en la toma de decisiones para el control de la mancha marrón, es necesario determinar primero las características básicas de la epidemiología de la enfermedad bajo las condiciones climáticas específicas del Mediterráneo.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Fuentes de inóculo

Parcela experimental

El estudio se llevó a cabo en una parcela experimental del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), situada en Moncada (Valencia), con una superficie de 0,75 hectáreas. La parcela se plantó en 1998 con híbridos de mandarina 'Fortune' y 'Murcott'. Los árboles se injertaron sobre citrange Carrizo [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *C. sinensis*], con un marco de plantación de 2 x 3 m y las filas orientadas de este a oeste. La parcela estaba fuertemente afectada por la macha marrón y no se había realizado ningún tratamiento fungicida desde su plantación. Se realizó el manejo agronómico habitual en las parcelas experimentales del IVIA. Todos los estudios indicados en este capítulo se realizaron en esta parcela.

Las variables meteorológicas en la parcela experimental se registraron cada hora con una estación meteorológica automática (Hobo U30, Onset Computer corp., EE.UU.), con sensores para la temperatura del aire y HR (Hobo S-THB), con una precisión ($\pm 0,2^{\circ}\text{C}$, $\pm 2,5\%$), lluvia (7852, Davis Instruments Corp., EE.UU.) con una resolución de 0,2 mm, duración de la humectación (Hobo S-LWA), con una resolución de 0,59% y velocidad del viento (Hobo S-WSA), con una resolución $\pm 1,1$ m/s. El sensor de humectación se colocó con una orientación al norte de la parcela a 1,5 m del suelo a una distancia de 50 cm desde la parte superior del árbol y se fijó en un ángulo de inclinación 30° de la horizontal.

Presencia del patógeno en árboles afectados y malas hierbas

Se determinó la presencia del patógeno en tejidos de árboles afectados, hojarasca y plantas arvenses, recolectando muestras en estado fresco y seco. El material vegetal analizado consistió en hojas, tallos, frutos y hojarasca de árboles fuertemente afectados por la mancha marrón así como diferentes malas hierbas habituales en parcelas de cítricos (Fig. 3.1). Se analizaron plantas de: *Araujia sericifera* (Brot.), *Bromus diandrus* (Roth), *Chrysanthemum* spp., *Convolvulus arvensis* L., *Conyza* spp., *Cyperus rotundus* L., *Diploaxis eruroides* (L.) DC., *Oxalis pes-caprae* L., *Senecio vulgaris* L. y *Sonchus* spp..



Figura 3.1: Fuentes potenciales de inóculo: **A)** Hojas afectadas en la copa del árbol; **B)** Brotes afectados; **C)** Frutos afectados; **D)** Supervivencia del hongo en hojas del suelo; **E)** *Conyza* sp. y **F)** *Bromus* sp.

Todas las muestras analizadas se recogieron durante los años 2011 y 2012 de forma arbitraria. De cada tipo de material se tomaron 10 muestras de al menos 20 g cada una. Las muestras del material vegetal se llevaron al laboratorio donde se lavaron con agua corriente y se desinfectaron superficialmente con una solución de

hipoclorito sódico al 1,5% durante dos minutos. Seguidamente, se lavó tres veces con agua destilada estéril para eliminar los restos del cloro. Se realizaron aislamientos mediante siembra de pequeños fragmentos de los tejidos afectados en placas Petri con medio de cultivo Patata Dextrosa Agar (PDA) al cual se le añadió 0,5 g/l de sulfato de estreptomycin (PDAS). Para cada muestra se sembraron seis placas con siete puntos de aislamiento cada una (Dhingra y Sinclair, 1995).

Las placas se incubaron a 23°C en la oscuridad durante 48 horas. Las colonias crecidas se repicaron individualmente a medio de cultivo PDA. Estas placas se incubaron durante 7-10 días en las mismas condiciones descritas anteriormente. Las colonias fúngicas se identificaron mediante la observación de sus estructuras morfológicas con un microscopio óptico a 400X. Los aislados identificados como pertenecientes al género *Alternaria* se sometieron a pruebas de patogenicidad mediante la técnica descrita por Kohmoto *et al.* (1991). Esta técnica consistía en inocular una suspensión de conidias sobre hojas susceptibles recién cortadas con aproximadamente 50% de su tamaño final. Para ello se colocaron tres hojas jóvenes de mandarina 'Fortune' en placas Petri con papel de filtro humedecido sobre una malla plástica para evitar el contacto directo con el agua.

Se prepararon suspensiones de conidias de los aislados de *Alternaria* obtenidos raspando las colonias con agua destilada estéril y 0,1% de Tween 20. Las suspensiones se filtraron a través de dos gasas estériles y la concentración se ajustó a 10^5 conidias/mL con un hemacitómetro. Las suspensiones con menos 90% de poder germinativo fueron descartadas (Vicent *et al.*, 2007). En cada placa se pulverizaron sobre las hojas de 'Fortune' aproximadamente 2 mL de la suspensión de conidias de aislado a evaluar. Se empleó como control positivo el aislado de referencia IVIA-A051, de patogenicidad comprobada y que se obtuvo a partir de hojas sintomáticas de mandarina 'Fortune'. El aislado se conservó a -80°C en crioviales de 1,5 mL con una solución de glicerol al 15%. Para su uso, los crioviales se descongelaron a 34°C durante 30 min y el aislado fue transferido en placas Petri de PDA que se incubaron en oscuridad a 25°C durante 7 días. Posteriormente se preparó una suspensión stock de conidias y micelio añadiendo agua estéril sobre la colonia que se raspó cuidadosamente con una varilla de vidrio estéril. Esta suspensión stock se conservó en botes de vidrio estériles a 4°C y periódicamente se sembraron alícuotas de 1 mL en PDA que se incubaron cuatro días a 25°C y fotoperiodo de 12 horas noche y día (PhilipsTLD18W/33),

obteniendo suspensiones de conidias según el proceso arriba indicado, Como control negativo se utilizó agua destilada estéril. Las placas se sellaron con Parafilm y se incubaron en oscuridad a 23°C en cámara húmeda (~ 100% HR) (Vicent *et al.*, 2004). La presencia de síntomas en las hojas inoculadas se evaluó a las 72 horas (Fig. 3.2).

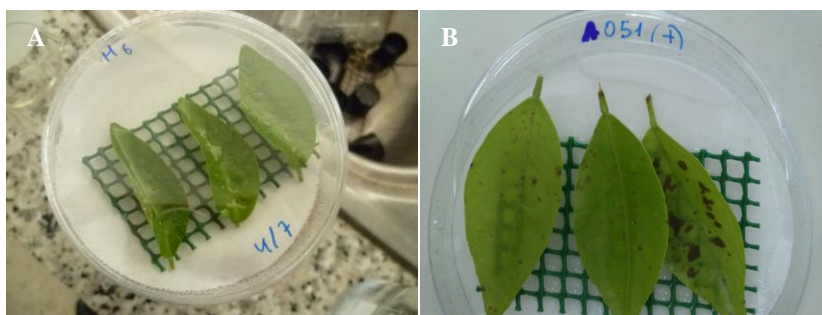


Figura 3.2: Pruebas de patogenicidad de *Alternaria* en hojas jóvenes de mandarina ‘Fortune’: **A)** Prueba negativa en hojas inoculadas con un aislado de *Alternaria* obtenido del material muestreado; y **B)** Síntomas de mancha marrón en hojas inoculadas con el control positivo de *Alternaria alternata* IVIA-A051.

Supervivencia del patógeno en las hojas del suelo

La supervivencia del patógeno en las hojas caídas al suelo se evaluó en tres experimentos que se realizaron en los años 2011 y 2012. Los períodos de estudio fueron del 10 de mayo al 27 de julio de 2011, del 9 de mayo al 11 de julio de 2012 y del 10 de octubre al 18 de diciembre de 2012. En cada uno de los períodos se recogieron hojas jóvenes infectadas recién caídas al suelo después de las infecciones naturales en primavera u otoño. Las hojas se colocaron en el centro de la parcela experimental y se cubrieron con una malla plástica de (2 x 2 m, 5 x 5 mm), sujeta con cuatro piquetas de acero inoxidable. La densidad de hojas en cada uno de los experimentos se ajustó a ~150 g/m² (Fig. 3.1D).

Se tomaron cuatro muestras de 10 g de hojas cada una bajo las mallas en intervalos quincenales. Las hojas se llevaron al laboratorio donde se realizaron aislamientos siguiendo el protocolo descrito anteriormente (apdo. 3.2.1). Se tomaron discos foliares de 5 mm de diámetro con un sacabocados y se sembraron en medio PDAS con 0,5 g/l de benomilo (PDASb). En cada una de las fechas de

muestreo se sembraron 10 placas con cinco discos foliares cada una y se incubaron durante 48 horas en oscuridad a 23°C. Finalmente se cuantificó el número de colonias de *Alternaria* aisladas en cada fecha de muestreo y se repicaron a PDA. Estas colonias se sometieron a pruebas de patogenicidad del mismo modo descrito anteriormente (apdo. 3.2.1) para determinar la proporción perteneciente al patotipo de *A. alternata* causante de la mancha marrón.

3.2.2. Seguimiento de la dinámica del inóculo

Captura de conidias con medio semi-selectivo

Se realizaron exposiciones de placas Petri con medio semi-selectivo ‘*Alternaria radicina* Selective Agar’ (ARSA) desarrollado inicialmente por Pryor *et al.* (1994) y modificado posteriormente por Timmer *et al.* (2000). El medio ARSA consistía de dos partes: una primera con 16 g de agar, 1 g de KH_2PO_4 , 1 g de KNO_3 , 0,5 g, de KCl, 0,5 g de MgSO_4 y 500 mL de H_2O ; y otra de 5 g de polipectato de sodio y 500 mL de H_2O . Las dos partes se autoclavaron por separado (120°C, 20 min) y se enfriaron hasta los 50°C antes de mezclarlas. A continuación se añadieron 0,5 g de clorotetraciclina, 0,5 g de sulfato de estreptomycin, 220 μl de dicloran, 0,2 g de benomilo y 116 μl de tiabendazol, 5 g de peptona y 0,5 g de oxitetraciclina. Este medio semi-selectivo permite aislar con bastante facilidad las colonias de *Alternaria*.

Se realizaron exposiciones de ocho placas con medio semi-selectivo ARSA inclinadas 45° sobre un soporte piramidal de cartón coincidiendo con los cuatro puntos cardinales (Campbell y Madden, 1990) (Fig. 3.3 B). La exposición de las placas se inició el 3 de enero de 2011 y finalizó el 23 de diciembre de 2012. Las placas se expusieron con una frecuencia de una a dos exposiciones/mes cada 25 días aproximadamente para un total de 31 exposiciones en los dos años. El soporte con las placas se colocó cerca de la estación meteorológica y del captador de conidias indicado en el epígrafe siguiente. Pevio al inicio del estudio se realizaron varias exposiciones de prueba para ajustar la técnica y determinar los momentos y duración de las exposiciones. Finalmente se optó por exposiciones mensuales y una hora de duración, entre las 13:00 y las 14:00 horas cuando se alcanza generalmente la máxima concentración de conidias de *Alternaria* en el aire (Rotem, 1994). Las placas se llevaron al laboratorio donde se incubaron a 23°C

durante 48 horas. Tras la incubación se contaron todas las colonias de *Alternaria* y se repicaron a PDA.

A los 7-10 días las colonias repicadas en PDA e incubadas a 23°C en oscuridad se sometieron a pruebas de patogenicidad descritas anteriormente (apdo. 3.2.1) para determinar cuáles de ellas pertenecían al patotipo de *A. alternata* causante de la mancha marrón.

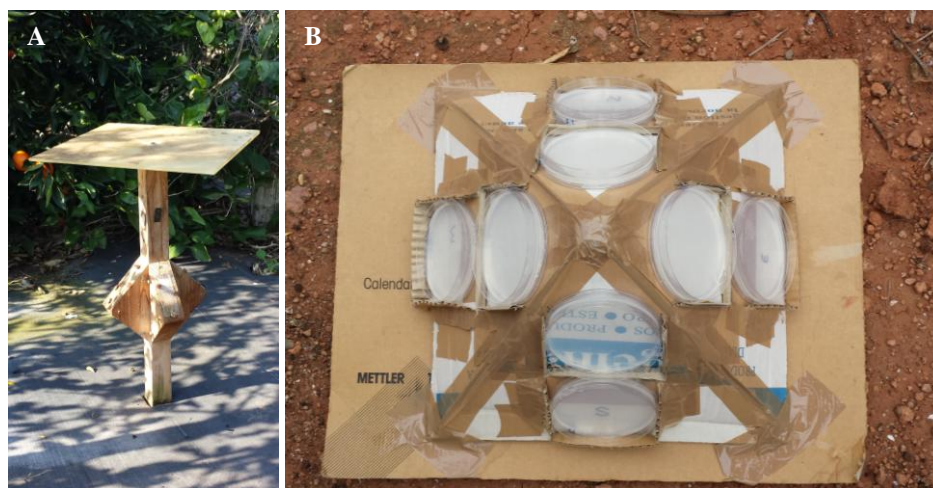


Figura 3.3: Métodos empleados para el seguimiento de la dinámica del inóculo: **A)** Soporte para colocación de portaobjetos; y **B)** Soporte para la exposición de placas del medio semi-selectivo ARSA.

Captura de conidias con portaobjetos

Desde enero de 2011 hasta enero de 2013 se siguió la dinámica de las conidias de *Alternaria* en el aire de la parcela experimental. Se empleó un sistema de captura pasiva colocando cuatro portaobjetos de vidrio (26 x 76 mm) impregnados con aceite de silicona (Merck GmbH, Alemania). Los portaobjetos se colocaron en el centro de la parcela experimental sobre un soporte de madera con un protector plástico cenital (0,3 x 0,3 m) para evitar el impacto directo de la lluvia. Los portaobjetos se situaron en los cuatro puntos cardinales a 0,25 m de la superficie del suelo y con una inclinación de 45° sobre la horizontal (Fig. 3.3A) (Campbell y Madden, 1990). Los portaobjetos se cambiaron con una frecuencia

semanal y se trasladaron al laboratorio donde se tiñeron con azul de lactofenol y se fijó un cubreobjetos de 32 x 22 mm. Se cuantificó el número de conidias de *Alternaria* realizando cuatro barridos longitudinales con un microscopio óptico a 400X basándose en el protocolo de la Red Española de Aerobiología (Galán-Soldevilla *et al.*, 2012). Finalmente se obtuvo el promedio de conidias/cm² capturadas por semana.

Todos los análisis de datos se realizaron con el software R v 2.15.1 (R Development Core Team, 2013). Los datos de las fuentes de inóculo y la dinámica de conidias se analizaron de forma descriptiva. Se estudió también la posible relación entre número de colonias patógenas y el total capturado en el medio semi-selectivo ARSA mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

3.2.3. Períodos de infección

La presencia de infecciones en la parcela experimental se determinó semanalmente mediante plantas trampa consistentes en plántones de mandarina de dos años de edad de los cultivares ‘Fortune’, muy susceptible a la mancha marrón, y ‘Nova’, de susceptibilidad moderada. Las plantas estaban injertadas sobre citrange Carrizo en macetas de plástico de 25 cm de diámetro y 20 cm de profundidad con sustrato mezcla de 75% turba y 25% de arena en volumen.

Las plantas se mantuvieron en un invernadero con temperatura entre $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad relativa de alrededor del 90%. Las plantas se abonaron semanalmente por fertirrigación con una solución al 0,1% de 14-10-14 (N-P-K) y corrector de carencias múltiples con microelementos quelatados y magnesio (Ferty[®] 10 S), dos veces al año a razón de 12,5 g/l. Para el control de plagas se realizaron tratamientos con abamectina 0,5 g/l para el control de ácaros y minador, pimetrozina 0,4 g/l para pulgones una aplicación cada 15 días en primavera. Las plantas se podaron por completo para forzar el crecimiento de nuevos brotes y se llevaron a campo cuando tenían al menos 100 hojas susceptibles (~50% tamaño final) y con una altura aproximada de 1,50 m. (Fig. 3.4A). Las podas se realizaron de forma escalonada para disponer de plantas en todos los períodos de exposición semanales.

Tras el período de exposición semanal, las plantas se trasladaron al invernadero (~25°C) y pasados 5 días se evaluó la severidad de la mancha marrón

en hojas con una escala ordinal: 0 = sin lesiones, 1 = 1 a 2 lesiones, 2 = 3 a 5 lesiones, 3 = 6 a 10 lesiones, 4 = 11 a 15 lesiones y 5 = >15 lesiones (Mondal *et al.*, 2007). Debido a que las lesiones causadas por la mancha marrón se expanden por las nervaduras de las hojas ocupando rápidamente todo el limbo foliar, los análisis estadísticos se realizaron únicamente sobre la incidencia de la enfermedad, calculada como la proporción de hojas sintomáticas.



Figura 3.4: A) Plantas trampa de mandarina ‘Fortune’ y ‘Nova’ en la parcela experimental; B) Estación meteorológica y sistemas de captura de esporas.

A partir de los datos registrados por la estación meteorológica (Fig. 3.4B), se calcularon para cada período semanal las siguientes variables meteorológicas: lluvia total (mm), número de días de lluvias (>0,2 mm), número de horas de lluvia (>0,2 mm), número de períodos de humectación (>1 hora), duración total de la humectación (horas), promedio de duración de los períodos de humectación (horas), duración máxima de los períodos de humectación (horas), temperatura media (°C), temperatura media de los períodos de humectación (°C), promedio de la HR (%) y velocidad media del aire (m/s).

Se aplicó el test t de Student para detectar posibles diferencias estadísticas en la incidencia de la enfermedad entre las plantas trampa de ‘Fortune’ y ‘Nova’. Se compararon los datos correspondientes a los períodos de infección en primavera, verano, otoño e invierno de cada año y en su conjunto todo el período de estudio de dos años. Se estudiaron también las correlaciones entre la incidencia en las plantas trampa y las variables meteorológicas indicadas anteriormente mediante el coeficiente de Spearman.

Se aplicó un análisis de árboles de clasificación binaria para la presencia de la enfermedad en plantas trampa de ‘Fortune’ y ‘Nova’ empleando para ello el paquete de ‘tree’ para R (Ripley, 2012). Este tipo de análisis tiene como objetivo dividir los datos en subgrupos (nodos) homogéneos, donde la variable respuesta tiene valores similares. Este proceso se lleva a cabo en tres fases: crecimiento del árbol, parada y poda (Franklin, 2009). Para cada período semanal de exposición se definió presencia o ausencia de la enfermedad en cada cultivar, ‘Fortune’ o ‘Nova’, a partir de los datos de incidencia de la enfermedad. Se construyó un árbol inicial utilizando las 11 variables meteorológicas descritas anteriormente, considerando todas las posibles variables dicotómicas (mayor vs. menor que un umbral determinado). Se aplicaron los criterios determinados por defecto en el paquete ‘tree’: tamaño mínimo de los nodos de 10 y partición únicamente en los nodos con una ‘deviance’ superior al 0,01 respecto al nodo raíz. El árbol inicial se podó al número óptimo de nodos para reducir al mínimo la ‘deviance’, pero manteniendo únicamente aquellos con más del 10% de la ‘deviance’ total del modelo.

Se aplicaron modelos lineales generalizados (GLM) para analizar las posibles relaciones entre la incidencia de la enfermedad en plantas trampa y las variables meteorológicas. Sin embargo, debido a la gran proporción de valores nulos en la variable respuesta, se detectaron graves problemas de sobredispersión que no fue posible resolver con ninguna de las distribuciones de probabilidad habituales (e.g. Poisson, binomial negativa, etc.) ni tampoco empleando distribuciones específicas (‘zero-inflated’) para este tipo de datos (Martin *et al.*, 2005).

Los GLMs, estiman sus funciones en la parte central de las distribuciones de probabilidad. En cambio, con la regresión por cuantiles es posible obtener un rango de estimaciones considerando las diferentes zonas de la distribución de probabilidad (cuantiles). El τ -ésimo cuantil ($0 \leq \tau \leq 1$) de una variable aleatoria Y

es la función de distribución acumulada inversa, F^{-1} (τ -ésimo), que se define como el valor real y más pequeño de tal manera que la probabilidad de obtener valores más pequeños de Y es mayor a τ -ésimo. Esta definición se extiende al modelo de regresión lineal de la siguiente forma:

$$y = X\beta + v(X)e$$
$$Q_Y(\tau|X) = X\beta(\tau)$$
$$\beta(\tau) = \beta + v(\cdot)F_e^{-1}(\tau)$$

donde y es un vector ($n \times 1$) de la variable respuesta, β es el vector de los parámetros del modelo de regresión ($p \times 1$) que en este caso son la constante (β_0) y la pendiente (β_1). X es la matriz ($n \times p$) de los predictores, $v(\cdot) > 0$ es una función desconocida y por último e es un vector ($n \times 1$) de los errores (Koenker y Basset, 1978; Cade *et al.*, 1999).

En este estudio se empleó la regresión por cuantiles para estimar las relaciones entre la incidencia de la enfermedad en las plantas trampa y las variables ambientales con el paquete ‘quantreg’ para R (Koenker, 2013). Se analizaron los cuantiles de incidencia de la enfermedad en ‘Fortune’ y ‘Nova’ por separado, desde $\tau = 0,10$ a $\tau = 0,90$ con incrementos de 0,005. Las 11 variables ambientales descritas anteriormente se analizaron individualmente. Se utilizó el método por defecto en el paquete ‘quantreg’ para calcular el ajuste con el algoritmo de Barrodale-Roberts modificado y los intervalos de confianza con la inversión de una prueba de rangos (Koenker, 2013).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Fuentes de inóculo

Presencia del patógeno en árboles afectados y malas hierbas

Los resultados del aislamiento de *Alternaria* en los diferentes materiales vegetales analizados se indican en la (Tabla 3.1). Se detectó la presencia de

aislados de *Alternaria* en todos los órganos de árboles de mandarina muestreados con porcentajes que oscilaron entre el 35,7% en las lesiones de los frutos y el 100% en las lesiones de hojas verdes y ramas. La proporción de aislados patógenos en los órganos de árboles afectados varió de 10 a 66,7% en brotes secos y fue de 10% en brotes frescos, en frutos la proporción de aislados patógenos fue de 76,9%, y varió de 6,3 a 20% en la hojarasca.

Se detectó también la presencia de *Alternaria* en todas las malas hierbas recolectadas, con porcentajes de aislamiento que oscilaron entre el 4,8% en hojas frescas de *C. rotundus* y *Sonchus* sp. al 100% en hojas secas de esta misma especie. En las malas hierbas sólo se detectaron aislados patógenos de *Alternaria* en material de *Sonchus* sp. en proporciones de 2,3% y 9,5%.

Tabla 3.1: Aislamiento y patogenicidad de las colonias de *Alternaria* obtenidas de los árboles afectados y las malas hierbas.

| Órganos de plantas | Fecha | Aislamiento de <i>Alternaria</i> (%) ^a | | |
|----------------------|----------------|---|-----------|------|
| | | Total | Patógenas | |
| <i>C. reticulata</i> | brotes secos | 13-dic-11 | 95,2 | 10,0 |
| | | 14-feb-12 | 81,0 | 0,0 |
| | | 13-mar-12 | 59,5 | 0,0 |
| | | 8-may-12 | 83,3 | 23,1 |
| | | 12-jun-12 | 83,3 | 66,7 |
| | | 15-abr-11 | 73,8 | 10,0 |
| | frutos | 13-mar-12 | 35,7 | 76,9 |
| | brotes frescos | 15-abr-11 | 100,0 | 0,0 |
| | | 15-abr-11 | 100,0 | 10,0 |
| | hojarasca | 2-jun-11 | 88,1 | 0,0 |
| | | 13-dic-11 | 73,8 | 20,0 |
| | | 14-feb-12 | 40,5 | 11,8 |
| | | 13-mar-12 | 78,6 | 14,3 |
| | | 12-jun-12 | 92,9 | 6,3 |
| | | 15-abr-11 | 78,6 | 10,0 |

Tabla 3.1: (continuación)

| Malas hierbas | Fecha | Aislamiento de <i>Alternaria</i> (%) ^a | | |
|-----------------------------|--------|---|-----------|-----|
| | | Total | Patógenas | |
| <i>Araujia sericifera</i> | fresco | 25-jul-11 | 7,1 | 0,0 |
| | | 3-jul-12 | 50,0 | - |
| | | 8-may-12 | 40,5 | 0,0 |
| | | 3-jul-12 | 92,9 | - |
| | | 8-may-12 | 14,3 | 0,0 |
| | | 3-jul-12 | 69,0 | - |
| <i>Conyza</i> sp. | seco | 25-jul-11 | 16,7 | 0,0 |
| | | 8-may-12 | 100,0 | 0,0 |
| <i>Conyza</i> sp. | fresco | 6-may-11 | 19,0 | 0,0 |
| | | 2-jun-11 | 7,1 | 0,0 |
| | | 3-jul-12 | 92,9 | - |
| <i>Cyperus rotundus</i> | fresco | 2-jun-11 | 4,8 | 0,0 |
| <i>Diplotaxis erucoides</i> | seco | 6-may-11 | 76,2 | 0,0 |
| <i>Euphorbia hamaesyce</i> | fresco | 25-jul-11 | 4,8 | 0,0 |
| | | 12-jun-12 | 28,6 | 0,0 |
| <i>Oxalis pes-caprae</i> | fresco | 13-dic-11 | 19,0 | 0,0 |
| <i>Senecio vulgaris</i> | fresco | 13-dic-11 | 85,7 | 0,0 |
| <i>Sonchus</i> sp. | seco | 6-may-11 | 26,2 | 2,3 |
| <i>Sonchus</i> sp. | fresco | 13-dic-11 | 50,0 | 0,0 |
| | | 14-feb-12 | 59,5 | 0,0 |
| | | 13-mar-12 | 4,8 | - |
| | | 15-abr-11 | 4,8 | 9,5 |

^a Diez muestras con un total de 42 puntos de aislamientos en cada material vegetal

Supervivencia del patógeno en las hojas del suelo

En los tres experimentos se observó un elevado porcentaje de aislamiento de colonias de *Alternaria*, llegando incluso al 100% en algunos casos (Tabla. 3.2). Se detectaron aislados de *Alternaria* patógenos en hojas jóvenes afectadas caídas al suelo en los tres experimentos y todas las fechas de muestreo. La proporción de cepas patógenas varió del 26 al 80% en experimento de mayo de 2011, del 4 al

44% en mayo de 2012 y del 6 al 46% en octubre de 2012 (Fig. 3.5). La descomposición de las hojas fue completa tras 76 días en mayo de 2011, 63 días en mayo 2012 y 69 días en octubre de 2012.

Tabla 3.2: Aislamiento y patogenicidad de colonias de *Alternaria* obtenidas de las hojas jóvenes afectadas caídas al suelo.

| Inicio del experimento | Fecha de Muestreo | Días | Promedio de aislamiento (%) ^a | Promedio de colonias Patógenas (%) |
|------------------------|-------------------|------|--|------------------------------------|
| 10/05/2011 | 14/06/2011 | 35 | 46 | 75,0 |
| | 24/06/2011 | 45 | 100 | 66,7 |
| | 04/07/2011 | 55 | 96 | 48,1 |
| | 25/07/2011 | 76 | 88 | 50,0 |
| 09/05/2012 | 22/05/2012 | 13 | 88 | 16,7 |
| | 12/06/2012 | 34 | 30 | 27,3 |
| | 03/07/2012 | 55 | 18 | 33,3 |
| | 11/07/2012 | 63 | 80 | 37,5 |
| 10/10/2012 | 22/10/2012 | 13 | 62 | 20,0 |
| | 02/11/2012 | 23 | 56 | 43,8 |
| | 04/12/2012 | 55 | 76 | 30,0 |
| | 18/12/2012 | 69 | 86 | 17,9 |

^a De un total de 50 puntos de aislamiento.

En el primer experimento en mayo 2011 la proporción de colonias patógenas en hojas del suelo hasta los 35 días fue relativamente baja, con un aumento aparente a partir de los 45 días (Fig. 3.5). En mayo de 2012 no se observaron diferencias notables en las fechas evaluadas, aunque quizás un ligero aumento en el último muestreo a los 63 días. En octubre de 2012 la proporción de colonias patógenas se mantuvo relativamente constante a lo largo del estudio.

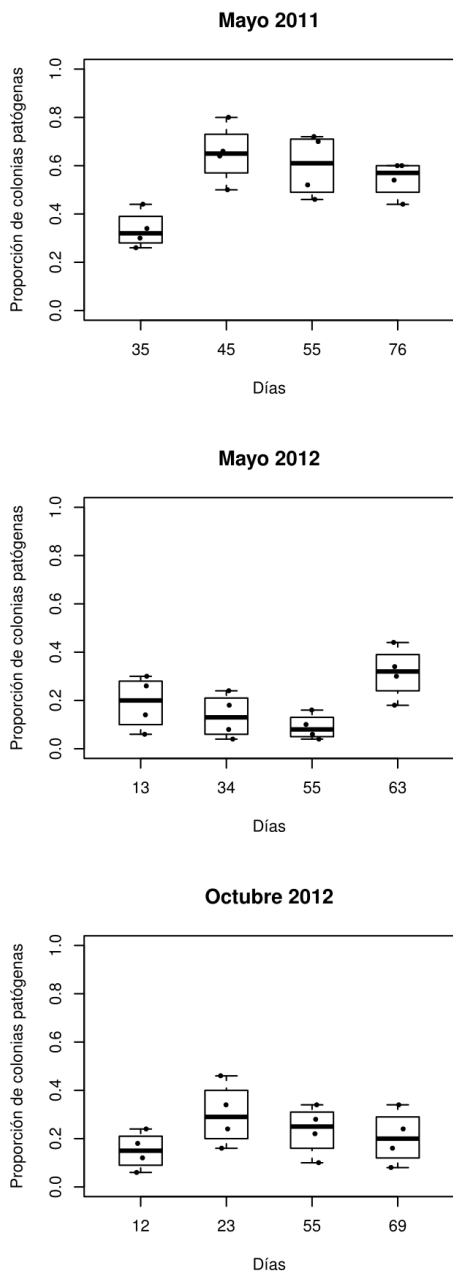


Figura 3.5: Proporción de colonias patógenas de *Alternaria alternata* aisladas de hojas jóvenes de mandarina afectadas por la mancha marrón caídas al suelo. Diagrama de cajas para cada fecha de muestreo (n = 50) en tres experimentos llevados a cabo en 2011 y 2012.

3.3.2. Seguimiento de la dinámica del inóculo

Captura de conidias con medio semi-selectivo

Se capturaron un total de 1049 colonias de *Alternaria* en la parcela experimental con la exposición de placas de medio semi-selectivo ARSA en un total de 31 días durante 2011 y 2012 (Fig. 3.6). Del total de colonias capturadas, 240 resultaron patógenas cuando se inocularon sobre hojas susceptibles de mandarina 'Fortune'. El número de colonias patógenas por fecha de muestreo varió entre 1 a 23 con un promedio de 7,74 y el número de colonias no patógenas entre 1 y 58 con un promedio de 26,1. La proporción media de colonias patógenas fue del 27,3%, oscilando desde el 1,8% al 87,5%. No se encontró correlación significativa entre el número de colonias patógenas y el total capturadas ($P = 0.4581$).

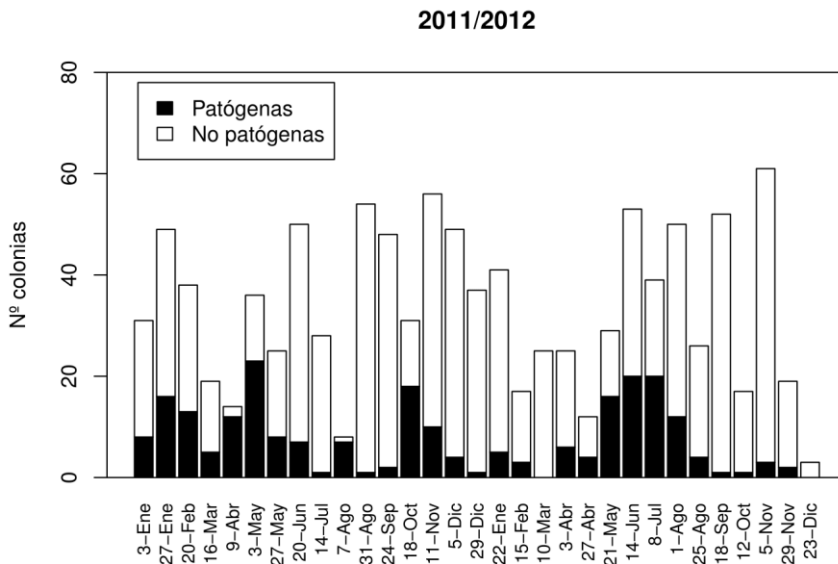


Figura 3.6: Número de colonias de *Alternaria* patógenas y no patógenas capturadas en la parcela experimental con la exposición del medio semi-selectivo ARSA durante los dos años de estudio (2011-2012).

En el año 2011 los mayores niveles de colonias de *Alternaria* en el aire se detectaron en los meses de agosto y noviembre con un total de 54 y 56 colonias respectivamente. En 2012 el valor máximo se registró en el mes de noviembre con un total de 61 colonias. Durante todo el período de estudio se detectó un mayor número de colonias de *Alternaria* no patógenas mediante la exposición de medio semi-selectivo. A pesar de eso se detectaron colonias patógenas en todas las fechas de la exposición. De hecho, en ocasiones la proporción de colonias patógenas fue incluso mayor que las no patógenas. Curiosamente, en la mayoría de las semanas en que se capturó un mayor número de conidias de *Alternaria* fue cuando se detectó una menor proporción de colonias patógenas, de ahí que no se encontrara una relación significativa entre la proporción de colonias patógenas y el total capturado.

Captura de conidias con portaobjetos

Se detectaron conidias de *Alternaria* de forma continua en los portaobjetos durante 2011 y 2012 (Fig. 3.7). En el primer año los valores oscilaron entre 0,8 a 30,5 conidias/cm² con un promedio de 10,62 conidias/cm² en 2011; y 0,8 a 34,4, con un promedio de 5,8 en 2012. Las semanas con promedios máximos de capturas fueron del 06/06/11 al 13/06/11 con 39,1 conidias/cm² en 2011 y del 25/11/12 al 02/12/12 con 68,5 conidias/cm² en 2012.

En el segundo año de estudio 2012 los valores oscilaron entre 0,8 y 34,4 conidias/cm² con un promedio de 5,8. Los niveles más bajos de conidias capturados se registraron durante la primavera y verano. Los máximos niveles de captura se observaron en otoño en las semanas del 18/09/12 a 25/09/12, del 25/09/12 a 02/10/12 y del 23/10/12 a 30/10/12 el número máximo de conidias capturados durante este período fue de 48,8 conidias/cm². En los dos años de estudio no se observó una relación aparente entre el número de conidias con las infecciones en campo, tampoco con las plantas trampa. Sin embargo aparentemente el número de conidias capturados fue mayor en días después de lluvias y períodos de infecciones.

3.3.3. Períodos de infección

Se observaron un total de 22 períodos semanales de infección en 'Fortune' y 17 en 'Nova' del total de 104 evaluados (Fig. 3.7). En primavera de 2011 se observaron cinco períodos semanales de infección en plantas trampa de 'Fortune' y cuatro en 'Nova'. La incidencia promedio de la enfermedad fue de 0,35 (0,09-0,63) en 'Fortune' y 0,25 (0,06-0,42) en 'Nova'. En primavera de 2012 se observó un único período de infección en ambos cultivares. Sólo se observaron infecciones en verano en el año 2011. Se detectaron tres períodos semanales de infección en otoño en el año 2011 con una incidencia promedio de 0,18 (0,02 a 0,28) en 'Fortune' y 0,30 (0,13-0,41) en 'Nova'. En el otoño de 2012 se detectaron ocho períodos en 'Fortune', con una incidencia promedio del 0,27 (0,07-0,69), y seis períodos de infecciones en 'Nova' con una incidencia promedio de 0,16 (0,02-0,40) (Fig. 3.7). No se detectaron diferencias significativas en la incidencia de la enfermedad entre la variedad 'Fortune' y 'Nova' durante los períodos de infección en la primavera de 2011 ($P = 0,4716$), verano de 2011 ($P = 0,6460$), otoño 2011 ($P = 0,3894$), otoño 2012 ($P = 0,2980$), y todo el período de estudio ($P = 0,4289$), (Fig. 3.8).

Se registraron un total de 335 mm de lluvia y 100 días de lluvia ($> 0,2$ mm) en 2011 y 264 mm y 86 días de lluvia en el año 2012. Las precipitaciones en primavera y otoño representaron 78,1% del total en 2011 y el 85,4% en 2012 (Fig. 3.7). Las temperaturas medias en 2011 y 2012 fueron $8,4 \pm 1,8$ °C y $9,1 \pm 2,1$ °C en invierno, $18,1 \pm 3,1$ °C y $18,5 \pm 4,4$ °C en primavera, $24,9 \pm 0,8$ °C y $25,1 \pm 1,4$ °C en verano, $15,6 \pm 3,8$ °C y $14,5 \pm 3,8$ °C en otoño. La duración total de la humectación por semana varió de $36,6 \pm 24,1$ horas en el verano de 2012 a $78,3 \pm 30,1$ horas en el otoño de 2011. La humedad relativa del aire osciló entre $66,6 \pm 7,4\%$ en primavera de 2012 a $81,1 \pm 8,3\%$ en el otoño de 2011. La velocidad del viento varió de $0,23 \pm 0,05$ m/s en el verano de 2011 a $0,69 \pm 0,53$ m/s en el invierno de 2012.

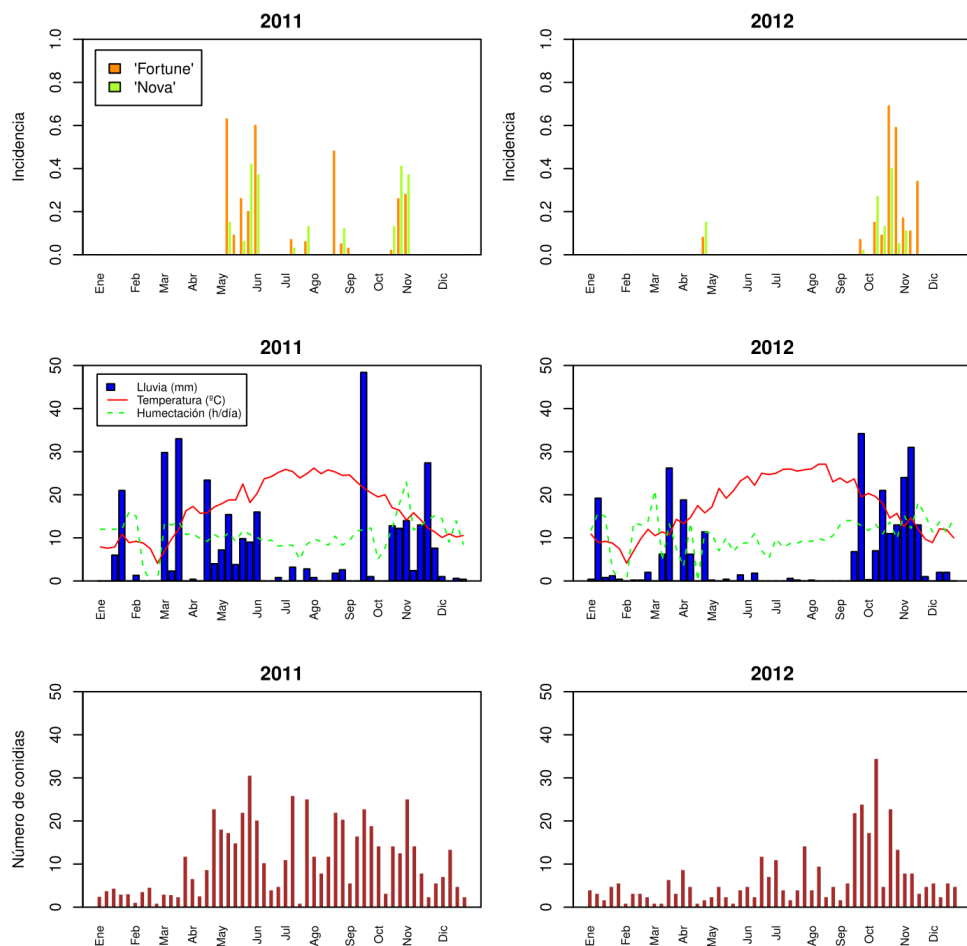


Figura 3.7: Valores semanales de incidencia de la mancha marrón en hojas de plantas trampa de mandarina ‘Fortune’ y ‘Nova’, lluvia, temperatura media, duración de la humectación y número de conidias de *Alternaria* capturados en los portaobjetos.

Se detectó una correlación positiva ($P < 0,01$) entre la incidencia de la mancha marrón en plantas trampa en ambos cultivares con la cantidad de lluvia, el número de días de lluvia y horas de lluvia (Tabla 3.3, Fig. 3.9). La incidencia de la enfermedad se correlacionó positivamente ($P < 0,01$) en ‘Fortune’ y ($P < 0,05$) en ‘Nova’ con la duración total de la humectación, la duración máxima de la humectación y la humedad relativa media ($P < 0,01$) en ambos cultivares.

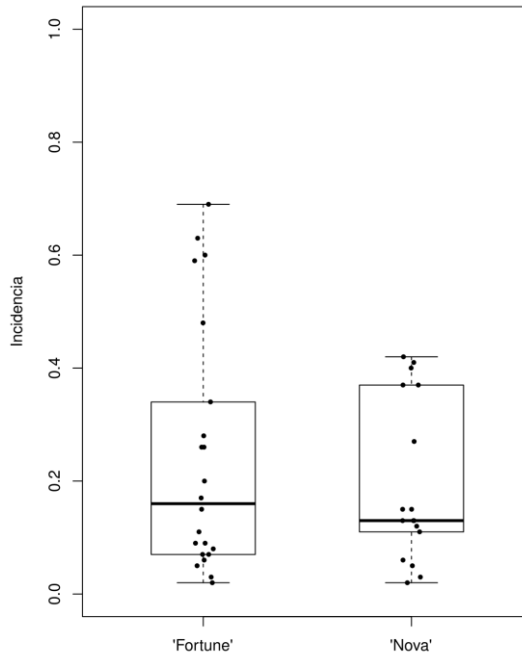


Figura 3.8: Diagramas de cajas para la incidencia de la mancha marrón en los períodos de exposición semanal donde se detectaron infecciones durante los años 2011 y 2012 en hojas de plantas trampa de 'Fortune' (n = 22) y 'Nova' (n = 17).

La temperatura media de los períodos de humectación se correlacionó positivamente ($P < 0,05$) con la incidencia de la enfermedad únicamente en la variedad 'Fortune'. La velocidad media del viento se correlacionó negativamente ($P < 0,01$) con la incidencia de la enfermedad en ambos cultivares. No se detectaron correlaciones entre la incidencia de la enfermedad y la temperatura media, duración de los períodos humectación y número de períodos de humectación (Fig. 3.9).

Las cuatro variables de la humectación estudiadas se correlacionaron positivamente con la lluvia total, el número de días de lluvia, el número de horas de lluvia y humedad relativa media. Las tres variables de precipitación se correlacionaron positivamente entre sí. Las cuatro variables de humectación también se correlacionaron significativamente entre ellas, excepto la duración media de los períodos de humectación con el número de períodos de humectación.

Tabla 3.3: Coeficientes de correlación de Spearman entre la incidencia de la mancha marrón en hojas de plantas trampa de ‘Fortune’ y ‘Nova’ con las variables meteorológicas.

| Variables meteorológicas ^a | Incidencia ^b | | tempfh | hmax | nph | hmedia | htotal | viento | hr | temp | hlluvia | dlluvia |
|---------------------------------------|-------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|---------|--------|---------|---------|
| | ‘Fortune’ | ‘Nova’ | | | | | | | | | | |
| lluvia | 0,55 ** | 0,52 ** | 0,03 | 0,64 ** | 0,41 ** | 0,41 ** | 0,58 ** | -0,11 | 0,58 ** | -0,15 | 0,97 ** | 0,91 ** |
| dlluvia | 0,42 ** | 0,36 ** | 0,1 | 0,66 ** | 0,49 ** | 0,46 ** | 0,67 ** | -0,08 | 0,64 ** | -0,23* | 0,96 ** | |
| hlluvia | 0,52 ** | 0,48 ** | 0,03 | 0,64 ** | 0,43 ** | 0,40 ** | 0,61 ** | -0,10 | 0,59 ** | -0,18 | | |
| temp | 0,13 | 0,11 | 0,84 ** | -0,41 ** | 0,06 | -0,36 ** | -0,14 | -0,38 ** | 0,07 | | | |
| hr | 0,31 ** | 0,26 ** | 0,45 ** | 0,60 ** | 0,80 ** | 0,41 ** | 0,86 ** | -0,34 ** | | | | |
| viento | -0,32 ** | -0,27 ** | -0,53 ** | -0,02 | -0,31 ** | -0,08 | -0,26 ** | | | | | |
| htotal | 0,26 ** | 0,23 * | 0,26 ** | 0,71 ** | 0,81 ** | 0,59 ** | | | | | | |
| hmedia | 0,17 | 0,15 | -0,15 | 0,61 ** | 0,15 | | | | | | | |
| nph | 0,12 | 0,10 | 0,39 ** | 0,49 ** | | | | | | | | |
| hmax | 0,25 * | 0,24* | -0,18 | | | | | | | | | |
| tempfh | 0,22 * | 0,18 | | | | | | | | | | |

^a De 104 períodos semanales desde enero de 2011 a diciembre de 2012. Lluvia: pluviometría (mm), dlluvia: días de lluvia (>0,2 mm), hlluvia: horas de lluvia (>0,2 mm), temp: temperatura media (°C), hr: humedad relativa media (%), viento: velocidad media del viento (m/s), htotal: horas total de humectación (horas), hmedia: duración media diaria de la humectación (horas), nph: número de períodos de humectación (>1 hora); hmax: duración máxima de la humectación (horas), tempfh: temperatura media durante los períodos de humectación (°C). **Significativo a $P < 0,01$; *significativo a $P < 0,05$.

^b Proporción de hojas afectadas por la mancha marrón.

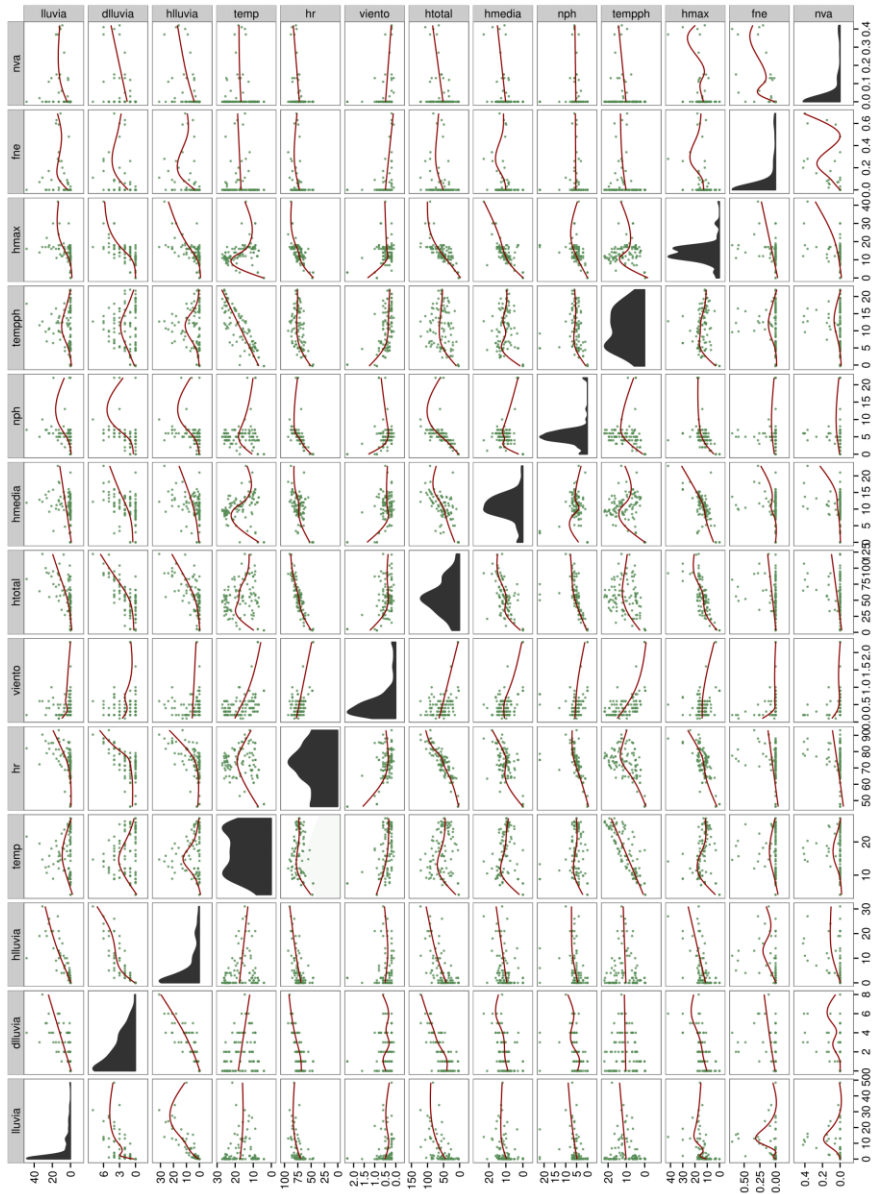


Figura 3.9: Representación gráfica de las correlaciones entre la incidencia de la mancha marrón en hojas de plantas trampa de 'Fortune' y 'Nova' con las variables meteorológicas. De 104 períodos semanales desde enero de 2011 a diciembre de 2012. Lluvia: pluviometría (mm), diluvia: días de lluvia (>0.2 mm), hlluvia: horas de lluvia (>0.2 mm), temp: temperatura media (°C), hr: humedad relativa media (%), viento: velocidad media del viento (m/s), htotal: horas total de humectación (horas), hmedia: duración media diaria de la humectación (horas), nph: número de períodos de humectación (>1 hora), tempfh: temperatura media durante los períodos de humectación (°C), fine: incidencia en 'Fortune', y nva: incidencia en 'Nova'.

Los dos árboles de clasificación obtenidos entre la presencia de la enfermedad en plantas trampa de ‘Fortune’ y ‘Nova’ y las variables ambientales con 104 períodos semanales se muestran en las (Figs. 3.10 y 3.11).

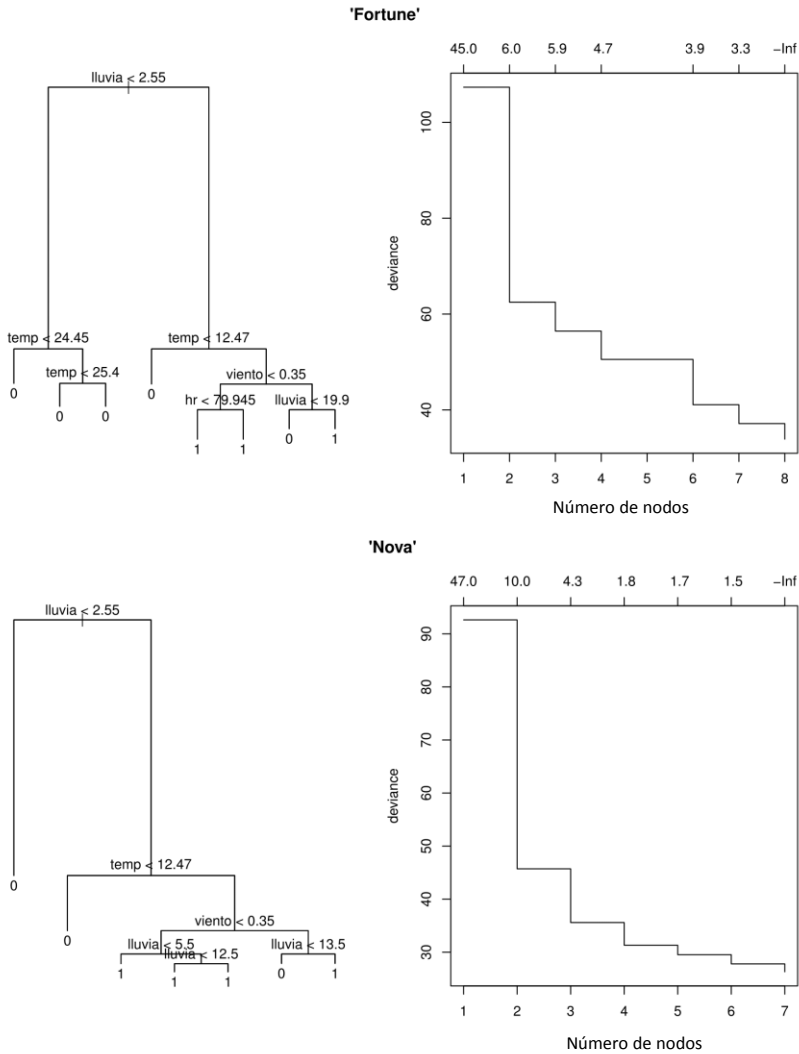


Figura 3.10: Árboles de clasificación iniciales y gráficos de reducción de la ‘deviance’ entre la presencia de la enfermedad en las exposiciones semanales de plantas trampa de mandarina ‘Fortune’ y ‘Nova’ y las variables meteorológicas: lluvia: pluviometría (mm); hr: humedad relativa media (%); viento: velocidad media del aire (m/s) y temp: temperatura media (°C).

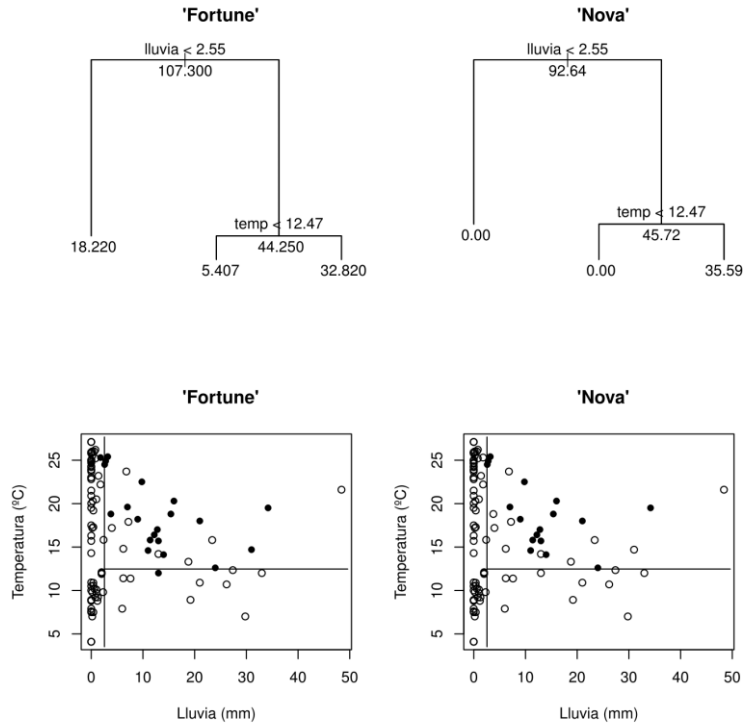


Fig. 3.11: Árboles de clasificación seleccionados (arriba) y gráficos de particiones (abajo) para la presencia de la mancha marrón en las exposiciones semanales de plantas trampa de 'Fortune' y 'Nova', la lluvia total y la temperatura media. En los árboles de clasificación se indica el criterio de agrupación y la 'deviance' de cada nodo, Puntos de color negro en los gráficos de particiones indican períodos semanales con infecciones y puntos blancos períodos sin infecciones.

Los árboles iniciales se obtuvieron incluyendo en el nodo raíz los umbrales de las variables explicativas (variables meteorológicas) a partir de las cuales se realizaron secuencias de clasificación para ajustar el número máximo de nodos. En los árboles iniciales de clasificación obtenidos se observaron valores altos de 'deviance' del primer al tercer nodo, superiores al 40% en ambos cultivares. La reducción de la 'deviance' fue mínima a partir del sexto nodo en 'Fortune' y del cuarto nodo en 'Nova'. Entre todas las variables meteorológicas estudiadas, la lluvia fue la que tuvo un mayor peso en la clasificación de los períodos de infección y en consecuencia también en la reducción de la 'deviance', seguida por la temperatura.

En ambos cultivares, la lluvia total y la temperatura media fueron las variables finalmente seleccionadas resultando en un árbol de tres nodos. La lluvia total fue la variable con el mayor poder de discriminación en los dos casos. Los criterios de agrupación (umbrales) fueron 2,55 mm de lluvia y 12,47°C de temperatura media. La ‘deviance’ residual fue 0,5588 (56,44/101) en ‘Fortune’ y 0,3524 (35,59/101) en ‘Nova’. La tasa de error de clasificación fue de 0,1058 (11/104) en ‘Fortune’ y 0,0961 (10/104) en ‘Nova’. La sensibilidad (períodos semanales de infección clasificados correctamente) fue del 86,36% en ‘Fortune’ y 100% en ‘Nova’. La especificidad (períodos semanales sin infección clasificados correctamente) fue del 90,24% en ‘Fortune’ y 88,5% en ‘Nova’. En el caso de ‘Fortune’, el nodo final incluía 19 períodos de infección y 8 períodos sin infección. Tres períodos de infección quedaron fuera de este nodo, que correspondían a los siguientes valores de lluvia y temperatura: 1,8 mm y 25,3 °C, 0 mm y 24,6 °C, y 13 mm y 12 °C. En el caso de ‘Nova’, el nodo terminal incluyó 17 períodos de infección y 10 períodos sin infección. Todos los períodos de infección quedaron incluidos en este nodo. La lluvia total, el número de días de lluvia y la duración total de la humectación fueron las únicas variables meteorológicas que mostraron una relación significativa ($P < 0,05$) con la incidencia de la mancha marrón en plantas trampa de ‘Fortune’ y ($P < 0,05$, $P < 0,01$) en ‘Nova’. Debido a la gran cantidad de períodos sin infecciones (incidencia = 0), esta relación significativa se detectó únicamente en los cuantiles superiores de incidencia de la enfermedad: la lluvia ($0,80 \leq \tau \leq 0,90$), días de lluvia ($0,80 \leq \tau \leq 0,90$) y la humectación total ($0,85 \leq \tau \leq 0,90$) (Figs. 3.12 y 3.13).

Los valores de los estimadores y los intervalos de confianza del 95% para la pendiente ($\hat{\beta}_1$) de la lluvia total oscilaron entre 0,0214 (0,0070-0,0360) a 0,0375 (0,0215-0,0547) en ‘Fortune’, y desde 0,0097 (0,0052-0,0271) a 0,0264 (0,0108-0,0464) en ‘Nova’. En el caso de los días de lluvia, $\hat{\beta}_1$ varió desde 0,0433 (0,0235-0,0582) a 0,0680 (0,0419-0,1691) en ‘Fortune’ y de 0,0325 (0,0184-0,0612) a 0,0683 (0,0621-0,0994) en ‘Nova’. Los valores $\hat{\beta}_1$ de la humectación variaron de 0,0022 (0,0015-0,0026) a 0,0031 (0,0025-0,0034) en ‘Fortune’ y de 0,0015 (0,0011-0,0032) a 0,0029 (0,0018 a 0,0039) en ‘Nova’.

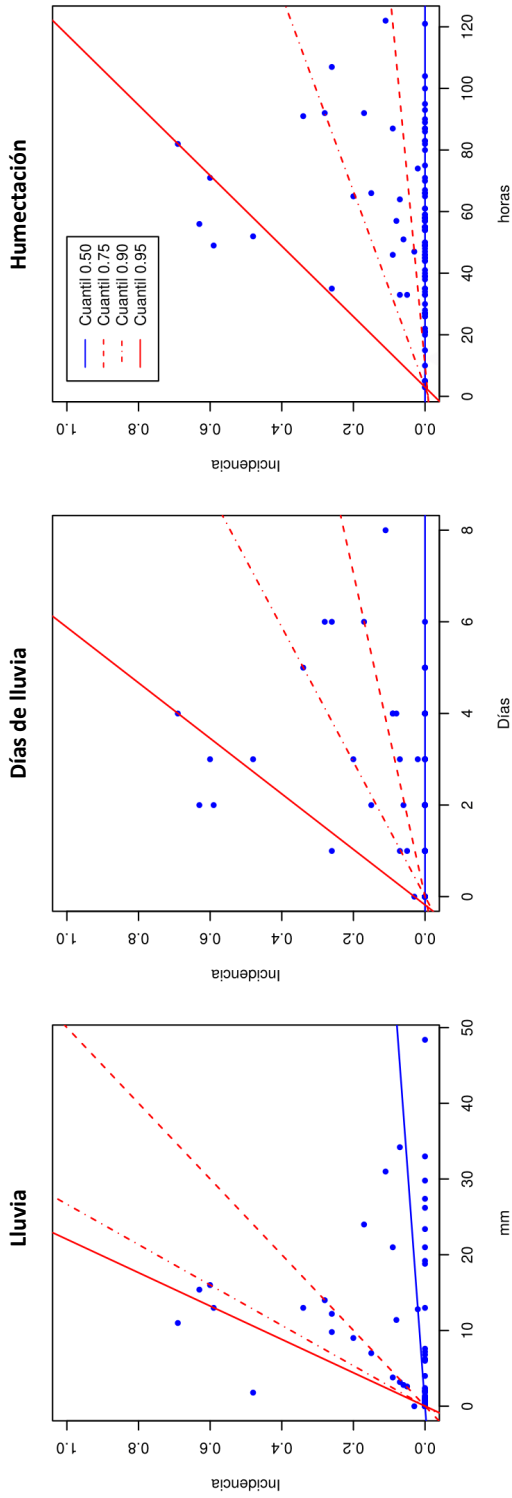


Fig. 3.12: Gráficos de regresión por cuantiles de la incidencia de la mancha marrón en las exposiciones semanales de plantas trampa de 'Fortune' respecto a la lluvia, días de lluvia ($>0,2$ mm) y la duración de la humectación.

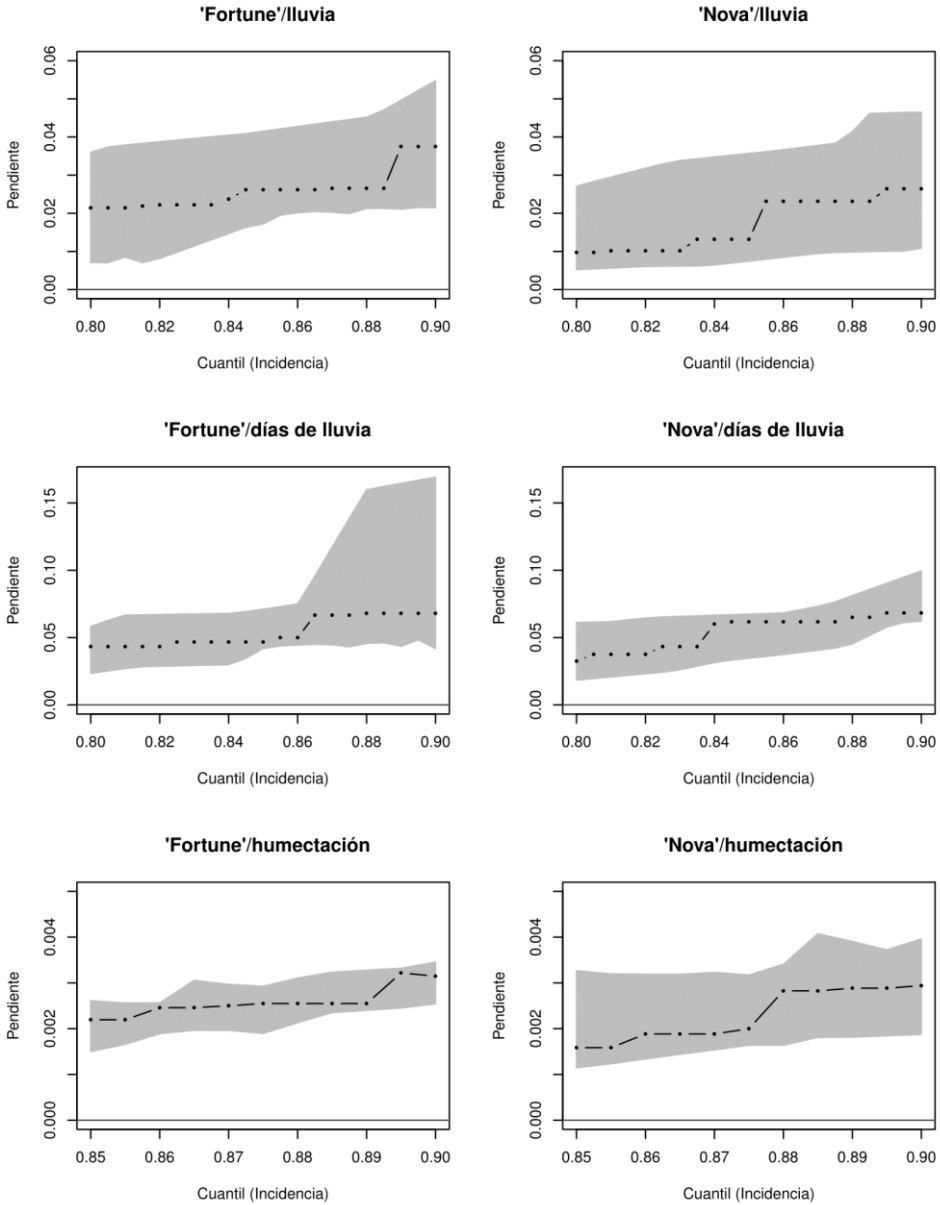


Figura 3.13: Estimaciones de la pendiente ($\hat{\beta}_1$) para la regresión por cuantiles de la incidencia de la mancha marrón en las exposiciones de plantas trampa de 'Fortune' y 'Nova' respecto a los valores semanales de lluvia (mm), número de días de lluvia (>0,2 mm) y la duración total de la humectación (horas) durante los períodos de exposición. La línea discontinua representa el valor del estimador con incrementos del 0,005 y el área sombreada los intervalos de confianza del 95%.

3.4. DISCUSIÓN

Se encontraron aislados patógenos de *A. alternata* en todos los órganos analizados en la copa de los árboles afectados al igual que en las hojas del suelo. Se detectaron también aislados patógenos en hojas frescas y secas de plantas pertenecientes al género *Sonchus*, aunque en muy baja proporción. La mayoría de las especies de *Alternaria* están consideradas como polívoros necrótrofos que pueden colonizar y reproducirse en tejidos de plantas senescentes o restos vegetales (Rotem, 1994). Aunque se aislaron algunas cepas patógenas en las malas hierbas, estas plantas podrían considerarse como sustratos alternativos. La supervivencia de especies de *Alternaria* en otras plantas se ha citado también en algunos estudios. Por ejemplo, *A. helianthi* (Hansf.) Tubaki & Nishih. en girasol (Jeffrey *et al.*, 1984), *A. dauci* (J.G. Kühn) J.W. Groves & Skolko en plantas silvestres de la familia *Apiaceae* (Netzer y Kenneth, 1969) y *A. radicina* Meier, Drechsler & E.D. Eddy en *Fumaria muralis* W.D.J.Koch (Soteros, 1979). En estudios realizados en Italia sobre hojas de tres cultivares de pera, y especies de plantas herbáceas, se demostró que *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) E.G. Simmons, agente causal de la mancha marrón de la pera, mantenía su viabilidad y capacidad patogénica sobre diferentes especies de gramíneas arvenses inoculadas (Rossi *et al.*, 2005). En el caso del agente causal de la mancha marrón, no existen referencias previas de su presencia en plantas arvenses.

La supervivencia del patógeno sobre las hojas jóvenes afectadas caídas al suelo se prolongó hasta los 63-76 días, coincidiendo con la descomposición total de las hojas. La proporción de aislados patógenos en hojas del suelo se comportó de modo similar en el primer y último experimento con niveles altos al inicio que decrecieron al final. En el segundo experimento la proporción final de aislados patógenos aparentemente fue algo más alta. Se considera que la combinación de determinados factores climáticos condiciona la supervivencia de las especies de *Alternaria* sobre restos vegetales y las hojas (Rotem, 1968, 1990). En Florida, la esporulación del hongo en las hojas adultas de tangelo 'Minneola' caídas al suelo fue prácticamente nula a los 12 días (Reis *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta que la tasa de descomposición de las hojas aumenta con la temperatura y la precipitación (Zhang *et al.*, 2008), las zonas de veranos lluviosos como Florida favorecerían una descomposición más rápida de las hojas (Mondal y Timmer, 2002). En España, la pluviometría y la duración de la época de lluvias es menor que en las regiones de

clima húmedo como Florida (Vicent *et al.*, 2002a). En Florida se utilizaron hojas maduras para estudiar la supervivencia del patógeno en hojas del suelo, mientras que el presente estudio se ha realizado con hojas inmaduras. Teniendo en cuenta que las hojas maduras tardan más tiempo en descomponerse, es posible que la supervivencia del patógeno en las hojas maduras afectadas en condiciones semi-áridas sea todavía mayor.

Como se ha demostrado en este estudio, las hojas tardarían más tiempo en descomponerse en las zonas de clima semi-árido, por lo que el período de esporulación del patógeno sobre ellas podría ser mayor y se podría pensar que es una importante fuente de inóculo. Sin embargo, se aislaron colonias patógenas de *Alternaria* de todos los órganos analizados de los árboles afectados e incluso de algunas malas hierbas. Los resultados de este estudio coinciden con estudios anteriores realizados en otras zonas, que indican que el inóculo está ampliamente distribuido en las parcelas afectadas y consideran que la esporulación del patógeno se produce en todos los órganos de la planta (Reis *et al.*, 2006). La amplia distribución del inóculo en la copa de los árboles afectados, la hojarasca y las malas hierbas hace que las actuaciones sanitarias mediante podas o eliminación de la hojarasca sean poco efectivas desde el punto de vista del control de la enfermedad. Además, estas medidas son poco prácticas y muy costosas económicamente por lo que no suelen implementarse en la práctica.

De las 1049 colonias de *Alternaria* aisladas en las exposiciones de placas de medio semi-selectivo ARSA, sólo un 22,8% en promedio fueron patógenos e identificados como pertenecientes al patotipo causante de la mancha marrón. Este resultado contrasta con el 99,6% de colonias patógenas indicado en los estudios llevados a cabo en Florida con la misma metodología (Timmer *et al.*, 1998). Aunque la exposición de medio ARSA permite cuantificar las cantidades de conidias de *Alternaria* patógenas en el aire, es un método muy costoso y difícil de aplicar en la práctica.

La concentración de conidias en el aire en una zona determinada se emplea para predecir la intensidad de las enfermedades causadas por algunos hongos fitopatógenos. Por ejemplo, en Pennsylvania (EE.UU.) la cantidad de conidias de *A. solani* (Ellis & G. Martin) L.R. Jones & Grout en el aire se utilizó para predecir la intensidad del tizón temprano en el tomate (Madden *et al.*, 1978). En el caso del agente causal de la mancha marrón, a pesar de las variaciones observadas en las

diferentes épocas, se capturaron conidias de *Alternaria* en los portaobjetos de forma continua durante los dos años de estudio. El problema es que esta técnica no permite diferenciar las conidias de los aislados patógenos de los saprofitos. A diferencia de los estudios realizados en Florida, en nuestro caso no se detectó una correlación significativa entre las colonias patógenas detectadas en el medio ARSA respecto al total capturadas. Por lo tanto, en las condiciones de nuestro estudio, la captura pasiva mediante portaobjetos no sería una técnica aeobiológica adecuada para el seguimiento del inóculo del patógeno en el aire. Los datos obtenidos en clima semi-árido (España) y húmedo subtropical (Florida) indican que en ambos casos que el inóculo del agente causal de la mancha marrón puede encontrarse en cualquier momento del año. En este estudio se confirmaron los resultados obtenidos en trabajos anteriores, que indican que las infecciones dependen principalmente de la presencia de condiciones climáticas favorables y tejido vegetal susceptible (Timmer *et al.*, 1998; 2000; Vicent *et al.*, 2002a).

Por otro lado, en estos estudios previos se ha indicado también el aumento de número de conidias capturados en los días posteriores a las infecciones, cuando aumenta el número de lesiones y la esporulación del patógeno sobre ellas. En este estudio se ha observado una tendencia similar. Estudios realizados en otros cultivos y zonas geográficas han demostrado que los cambios estacionales en la cantidad de conidias de *Alternaria* en el aire se han relacionado con la incidencia de la enfermedad. Por ejemplo, en la India se observó un incremento de número de conidias de *A. macrospora* (Sacc.) Mussat en parcelas de algodón con el aumento de la incidencia y luego una bajada al reducirse el número de hojas afectadas (Raghuram y Mallaiiah, 1989). En California (EE.UU.) se obtuvieron mayores capturas de conidias de *A. alternata* en parcelas de tomate afectadas por el moho negro al aumentar la intensidad de la enfermedad (Pearson y Hall, 1975).

Aunque existen algunos sistemas más eficientes de captura de conidias que el empleado en este estudio, se basan también en los análisis morfológicos de las esporas, que no permite distinguir entre las cepas patógenas de las saprofitas. Actualmente existen capturadores de esporas que implementan métodos basados en el ADN, necesarios en muchos casos para la identificación a nivel intra-específico (Jackson y Bayliss, 2011). En el caso de *A. alternata* se han caracterizado los genes de biosíntesis de la toxina ACT (Tsuge *et al.*, 2012), pero no existe ningún método molecular validado para detectar específicamente las

cepas patógenas productoras de esta toxina. Por lo tanto, las pruebas de patogenicidad siguen siendo necesarias para la identificación de cepas patógenas. Las dificultades indicadas anteriormente al respecto de la identificación del patógeno en las capturas con portaobjetos limitan la realización de un análisis estadístico global de la dinámica de inóculo y sus posibles relaciones con variables meteorológicas y las infecciones en plantas trampa.

Los genes que codifican para la producción de toxinas HST se localizan en cromosomas considerados como condicionalmente prescindibles. En el caso del agente causal de la mancha marrón, estos cromosomas son necesarios para la producción de la toxina ACT, pero no para el resto de actividades metabólicas de patógeno (Akamatsu *et al.*, 1999; Masunaka *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2001; Hatta *et al.*, 2002). En otros patotipos se ha demostrado que estos cromosomas pueden transmitirse horizontalmente entre aislados por contacto y anastomosis de las hifas (Masel *et al.*, 1996; Rosewich y Kistler, 2000; Walton, 2000). Los resultados de los estudios realizados sobre las fuentes de inóculo y su dinámica en la parcela afectada demuestran claramente que las cepas saprofitas de *Alternaria* cohabitan con las cepas patógenas. Esto hace pensar en la posibilidad de transferencia de los determinantes de patogenicidad que regulan la producción de la toxina ACT entre aislados patógenos y saprofitos (Masunaka *et al.*, 2005).

En las especies de *Alternaria* que se desarrollan en zonas semi-áridas, la liberación de conidias sigue una periodicidad circadiana. Las mayores concentraciones en el aire se registran por lo general durante las horas centrales del día. Tras la salida del sol, con el aumento de la temperatura y la velocidad del viento, la bajada de la HR provoca la evaporación del rocío nocturno y la liberación de las conidias al ambiente (Rotem, 1994). Varios estudios indican que los patrones estacionales de liberación de los conidias de *Alternaria* son variables dependiendo de la especie, cultivo y condiciones climáticas de cada zona. En experimentos realizados en condiciones controladas se ha demostrado que las conidias del agente causal de la mancha marrón se liberan por los cambios bruscos de HR o eventos de lluvia (Timmer *et al.*, 1998). En Inglaterra, las mayores capturas de *A. brassicicola* (Schwein.) Wiltshire en crucíferas se registraron después de lluvias y períodos de humectación de más de 13 horas en hojas, con una temperatura media por encima de 13°C (Humpherson-Jones y Maude, 1982). La dispersión de *A. porri* (Ellis) Cif. en cebolla en Nebraska (EE.UU.), *A.*

carthami S. Chowdhury y *A. alternata* en cártamo en la India y Montana (EE.UU.) también se relacionó con las lluvias previas (Meredith, 1966; Khare y Nema, 1981; Mortensen y Bergman., 1983). Otros estudios sobre la dispersión del inóculo de conidias de *A. brassicae* (Berk.) Sacc. en parcelas de colza afectadas por este patógeno indicaron que las fluctuaciones durante la época de cultivo estuvieron determinadas principalmente por el clima (Marchegay *et al.*, 1990). Nuestros resultados demuestran claramente la presencia de conidias de *Alternaria* y de colonias patógenas durante los períodos con lluvia y sin lluvia, lo que indicaría que ambos mecanismos podrían tener un papel importante en la liberación y diseminación de las conidias en condiciones semi-áridas.

En 2011, las infecciones se distribuyeron principalmente en primavera y otoño, con algunas infecciones también en verano. Sin embargo, en 2012 las infecciones se concentraron casi exclusivamente en otoño, con tan sólo un único período de infección en primavera. Estos resultados contrastan con los datos de Florida, donde las plantas trampa se infectaron durante todo el año y, de hecho, el verano se consideró como el período crítico para la infección (Timmer *et al.*, 1998; 2000). Se han descrito desplazamientos similares en los períodos de infección de otros patógenos asociados a diferentes regiones climáticas. El agente causal de la mancha foliar del caqui, *Mycosphaerella nawae* Hiura & Ikata, estaba presente únicamente en las regiones lluviosas de Corea y Japón, con un período crítico de infección en verano. Sin embargo, este patógeno se ha adaptado recientemente para desarrollar epidemias en zonas semi-áridas desplazando su período de infección a la primavera (Vicent *et al.*, 2012).

Las hojas de las variedades sensibles son susceptibles a la mancha marrón hasta que se expanden y endurecen por completo (Timmer *et al.*, 2003, Vicent *et al.*, 2007). En condiciones mediterráneas, los cítricos producen aproximadamente el 80% de brotes nuevos en primavera (García-Marí *et al.*, 2002). Por lo tanto, las infecciones de abril a junio causan graves lesiones en las hojas, defoliación y caída de frutos jóvenes. En otoño, en las condiciones mediterráneas el fruto es todavía susceptible (Vicent *et al.*, 2004) y las lesiones causadas por infecciones de septiembre a noviembre reducen notablemente la calidad de la fruta para su comercialización en fresco.

Los árboles de clasificación y regresión (CART) se utilizan de forma habitual en diferentes campos de la investigación (Hastie *et al.*, 2009) y existen también

algunas aplicaciones en epidemiología en patología vegetal (Baker *et al.*, 1993; Paul y Munkvold, 2004; Guyot *et al.*, 2010). Estos modelos tienen la ventaja de que no asumen hipótesis sobre la distribución de los datos y son capaces de detectar algunas interacciones entre las variables, que por lo general pasarían desapercibidas en otros métodos de análisis estadístico. Sin embargo, estos modelos están muy condicionados por los datos y son poco robustos, por lo que diferentes conjuntos de datos pueden originar diferentes selecciones de las variables y umbrales (Franklin, 2009). Tras evaluar todas las variables meteorológicas incluidas en el estudio, los árboles de clasificación obtenidos indican que prácticamente todas las infecciones se produjeron en las semanas con las lluvias $\geq 2,5$ mm y la temperatura media $\geq 12,5^{\circ}\text{C}$. La lluvia explica un porcentaje mucho mayor de 'deviance' que la temperatura. De hecho, sólo se observó un período de infección en ausencia de lluvia que resultó en una incidencia de tan sólo el 3% de las hojas afectadas. Curiosamente, este umbral de lluvia coincide con el definido en el modelo Alter-Rater para la mancha marrón en Florida (Timmer *et al.*, 2000), el modelo FAST para *A. solani* en tomate (Madden *et al.*, 1978), así como otros sistemas de predicción desarrollados para *Cercospora arachidicola* Hori en Alabama, *Plasmopara viticola* (Burk. & Curt.) Berl. & de Toni en Nueva York y *Fusicladium effusum* G. Winter en Oklahoma (EE.UU.) (Davis *et al.*, 1993; Kennelly *et al.*, 2007; Payne y Smith, 2012).

Los estudios de eficiencia infectiva en laboratorio indican una temperatura óptima para la infección de aproximadamente entre 22-25°C en Israel y 27°C en Florida (Solel y Kimchi 1998; Canihos *et al.*, 1999). En general, las especies de *Alternaria* tienen un óptimo para la infección por encima de 25°C, pero son también muy eficientes a temperaturas subóptimas (Rotem, 1994). Este parece ser el caso en nuestro estudio, ya que la gran mayoría de las infecciones se produjeron en semanas con temperaturas medias entre 15 y 25°C, con incidencias superiores en algunos casos al 60% de las hojas afectadas.

Debido a la gran proporción de valores nulos (períodos sin infecciones) no fue posible analizar los datos de incidencia en plantas trampa mediante GLMs. Las relaciones entre la incidencia de la enfermedad en plantas trampa y las variables ambientales se estudiaron mediante regresión por cuantiles. La regresión por cuantiles se desarrolló inicialmente en econometría (Koenker y Bassett, 1978) y actualmente es de uso muy habitual en diferentes áreas de la ecología (Cade *et al.*,

1999; Cade y Noon, 2003). A pesar de su gran potencial, no se ha encontrado ninguna referencia de su aplicación en epidemiología de enfermedades de plantas. A diferencia de los otros métodos más convencionales, la regresión por cuantiles permite explorar las relaciones entre las variables explicativas y las diferentes zonas de la distribución de la variable respuesta (cuantiles). Los modelos de regresión cuantiles son muy flexibles y pueden adaptarse a una amplia gama de distribuciones de datos y hacer frente también a bancos de datos que tienen una gran proporción de valores nulos (Vaz *et al.*, 2008).

En nuestro caso se encontró una relación significativa y positiva entre la incidencia de la enfermedad en las plantas trampa con la pluviometría, los días de lluvia y la duración de la humectación, pero únicamente en los cuantiles superiores (0,8-0,9) donde se situaron la mayoría de los datos de incidencia no nulos. Los cambios en los cuantiles en los extremos de la distribución de probabilidad de la variable respuesta se asocian habitualmente con la presencia de factores limitantes (Cade *et al.*, 1999; Cade y Noon 2003), como podrían ser en nuestro caso los umbrales de precipitación y temperatura indicados anteriormente. Una posible interpretación de estos resultados es que la cantidad de lluvia, el número de días de lluvia y la duración de la humectación serían factores importantes que incrementarían la incidencia de la mancha marrón, pero sólo cuando las infecciones ya se han iniciado por acción de la lluvia y temperaturas adecuadas.

En Florida, donde las plantas trampa se infectaron casi durante todo el año, la severidad de la enfermedad se relacionó positivamente con la humectación, precipitación y temperatura (Timmer *et al.*, 2000). En nuestro estudio, la temperatura no se relacionó de forma significativa con la incidencia de la enfermedad en ninguno de los análisis por cuantiles. Esto podría tener relación con el hecho de que las temperaturas por encima de 12,5°C no fueron limitantes para la infección. El efecto de la lluvia sobre la incidencia de la mancha marrón era esperable, ya que favorece el desarrollo epidémico de la enfermedad mediante el suministro de agua libre para la germinación de las conidias sobre hojas y frutos. Por otra parte, la lluvia disminuye la cantidad de radiación solar dañina que reciben las conidias y facilita también su dispersión por salpicaduras (Rotem, 1994; Timmer *et al.*, 2000). Las especies de *Alternaria* son muy eficientes desaprovechando el rocío para la infección gracias a su capacidad para tolerar períodos de humectación interrumpidos (Rotem, 1994). Se ha señalado que el

rocío podría ser un factor esencial para el desarrollo de la mancha marrón en zonas semi-áridas (Canihos *et al.*, 1999; Timmer *et al.*, 2000; 2003). Sin embargo, nuestros resultados indican que prácticamente no se produjeron infecciones en ausencia de lluvias y que con tan solo 2,5 mm de lluvia se detectaron infecciones en algunas semanas. Por lo tanto, el rocío podría considerarse como un factor que incrementaría la incidencia de la enfermedad, pero una vez iniciada previamente por los eventos de lluvia.

No obstante, alrededor de una tercera parte de los períodos con pluviometría $\geq 2,5$ mm y temperatura $\geq 12,5^{\circ}\text{C}$ no resultaron en infecciones en las plantas trampa. Esto indica que otros factores meteorológicos, como podrían ser los rocíos frecuentes y prolongados contribuirían a la aparición de infecciones en algunas situaciones. Este aspecto se podría determinar estadísticamente estudiando la interacción entre la humectación y la precipitación mediante regresión múltiple. Sin embargo, los problemas de multicolinealidad detectados entre estas dos variables limitan enormemente la correcta aplicación de este análisis estadístico. Las pluviometrías más altas se asociaron por lo general con períodos más prolongados de humectación, por lo que el efecto de ambas variables no puede separarse fácilmente. En cualquier caso, observaciones empíricas realizadas en distintas zonas citrícolas españolas indican que, bajo un mismo régimen de lluvias, las parcelas bien ventiladas suelen tener una menor incidencia de la enfermedad. De hecho, dentro de los programas de gestión integrada de la mancha marrón se recomiendan algunas prácticas agronómicas, como los marcos de plantación amplios, orientación de las filas a los vientos dominantes y podas adecuadas, para mejorar la circulación del aire y reducir la humedad en las parcelas (Vicent *et al.*, 2008).

En algunas ocasiones se observaron infecciones en plantas trampa de ‘Fortune’ y no así en ‘Nova’. Esto podría indicar un efecto del grado de susceptibilidad en la humectación necesaria para la infección. Por ejemplo, *A. dianthi* F. Stevens & J.G. Hall infecta a los cultivares susceptibles de clavel ‘Tony’ y ‘Grazia’ con 6 horas de humectación, pero necesita de 10 a 12 horas para infectar el cultivar más resistente ‘Arthur’ (Garibaldi, 1979). Este aspecto podría extrapolarse también a los distintos órganos dentro de una misma variedad. Se ha señalado que *A. mali* Roberts infecta las hojas de manzano con tan sólo tres horas de humectación pero necesita 48 horas para infectar los frutos (Sawamura, 1972).

La especie *A. macrospora* infecta los cotiledones susceptibles de las plantas de algodón con cuatro horas de humectación pero fueron necesarias al menos seis horas para la infección de las hojas adultas más resistentes (Bashi *et al.*, 1983). Por otro lado, según la especie de *Alternaria* que se trate pueden ser necesarios diferentes períodos de humectación para la infectar a un mismo hospedante. Por ejemplo, *A. triticina* Prasada & Prabhu infecta al trigo con períodos de humectación de 48 horas pero *A. alternata* requiere de 72-96 horas (Ram y Joshi, 1978).

A pesar del prolongado período de susceptibilidad del hospedante (Vicent *et al.*, 2004) y la continua disponibilidad de inóculo, las condiciones meteorológicas no siempre fueron favorables para la mancha marrón de las mandarinas. Los períodos de infección fueron relativamente cortos y concentrados, sobre todo cuando se comparan con los descritos en otras zonas afectadas como Florida. Los factores meteorológicos, principalmente lluvia y temperatura, jugaron un papel determinante en el inicio de la infecciones. Este último aspecto nos hace ser relativamente optimistas en lo que respecta al desarrollo de un sistema de ayuda en la toma de decisiones para el control de la mancha marrón de las mandarinas en condiciones mediterráneas. Este sistema permitiría optimizar las actuales estrategias de control, sincronizando las aplicaciones fungicidas con los períodos de infección. La disponibilidad de previsiones fiables de lluvia será un elemento clave en la implementación práctica de este sistema, ya que es necesario un margen de tiempo suficiente para la aplicación de fungicidas en las parcelas.

Capítulo 4

Capítulo 4

DESARROLLO DE MODELOS DE PREDICCIÓN Y EVALUACIÓN MEDIANTE CURVAS ROC

4.1. ANTECEDENTES

Los programas de gestión integrada de enfermedades tienen como objetivo reducir las pérdidas de cosecha para maximizar el beneficio económico, pero, procurando que los efectos sobre el medio ambiente sean lo menos perjudiciales posibles (Kogan, 1998; Jones *et al.*, 2010). Los modelos de predicción o modelos de riesgos de enfermedades se basan principalmente en cuantificar las interacciones entre el patógeno, el hospedante y el ambiente, para estimar la evolución de la enfermedad y poder tomar así las decisiones más adecuadas para su control (Campbell y Madden, 1990). Estos modelos se usan principalmente como ayuda para programar los tratamientos fungicidas y conseguir un control más eficiente de la enfermedad. La mayoría de los modelos estiman el desarrollo de la enfermedad en el pasado (backcasting) y en las condiciones actuales, y algunos también en el futuro (forecasting) (Madden y Ellis, 1988).

Krause y Massie (1975) diferencian dos tipos de modelos empleados en el desarrollo de sistemas de alerta de enfermedades de plantas: los modelos de procesos y los modelos empíricos. En los modelos de procesos se describen una o varias fases del ciclo de la enfermedad (supervivencia, reproducción, diseminación e infección) así como la influencia que tienen las variables ambientales sobre ellas (Teng, 1985; De Wolf e Isard, 2007). Los modelos de procesos se desarrollan principalmente a partir de experimentos realizados en condiciones controladas,

donde es posible evaluar por separado cada una de las fases de la enfermedad. Por su parte, los modelos empíricos se basan en establecer relaciones entre las observaciones de la enfermedad en campo y determinadas variables ambientales. Por lo general, los modelos empíricos se desarrollan mediante análisis de regresión. En ambos casos, la fiabilidad de las predicciones de los modelos depende en gran medida de la cantidad y representatividad de los datos utilizados en su desarrollo (Krause y Massie, 1975).

La mayoría de los modelos de procesos se centran en la fase de infección, por ser una de las más determinantes en el ciclo de los patógenos y en los daños causados por las enfermedades (Duthie, 1997; De Wolf e Isard, 2007). Habitualmente, los datos de eficiencia infectiva bajo diferentes condiciones de temperatura y humectación se ajustan a polinomios mediante regresión lineal (Madden y Ellis, 1988; Canihos *et al.*, 1999). Aunque este tipo de modelos se han mostrado muy útiles, tienen la limitación de que sus parámetros carecen de significado biológico. Magarey *et al.* (2005a) desarrollaron un modelo genérico de tipo no lineal que permite determinar la duración de los períodos de infección en función de la temperatura óptima, máxima y mínima para la infección, la humectación máxima y mínima, y la tolerancia a los períodos de humectación interrumpidos. La ecuación trabaja con datos horarios y es necesario definir un umbral de severidad a partir del cual el modelo considera la posibilidad de infecciones.

Los resultados de los estudios epidemiológicos de la mancha marrón realizados en condiciones mediterráneas (Capítulo 3) indican que la enfermedad se caracteriza por una disponibilidad prácticamente continua de inóculo y tejido vegetal susceptible. Sin embargo, las condiciones ambientales solo son favorables durante unos períodos concretos, ligados principalmente a las condiciones de lluvia. Este escenario es propicio para la implementación práctica de sistemas de ayuda basados en modelos de predicción que permitan ajustar las aplicaciones fungicidas a los períodos de infección, reduciendo al mínimo el número de tratamientos y mejorando la eficiencia de las estrategias de control (De Wolf e Isard, 2007; Gent *et al.*, 2013).

El modelo Alter-Rater para la mancha marrón de las mandarinas se ha desarrollado bajo condiciones de clima subtropical húmedo en Florida (Timmer *et al.*, 1998; Canihos *et al.*, 1999; Timmer *et al.*, 2000) y ha sido evaluado

comercialmente tanto en Florida como en zonas citrícolas de Brasil (Bhatia *et al.*, 2003; Peres y Timmer, 2006). Debido a las diferencias climáticas entre estas regiones húmedas y las zonas semi-áridas del Mediterráneo, el modelo Alter-Rater podría no ser adecuado para estimar el riesgo de la enfermedad en España (Timmer *et al.*, 2003). Sistemas propuestos anteriormente para mandarina 'Fortune' en las zonas citrícolas españolas llegaron a pronosticar hasta 16 tratamientos anuales (Badal *et al.*, 2004; 2006; Chapa, 2006; Zornoza, 2006), lo que supone incluso más aplicaciones que las de un programa fijo a calendario. Además, estos estudios se realizaron en mandarina 'Fortune', muy susceptible a la enfermedad, por lo que los criterios de intervención no serían extrapolables directamente a variedades menos susceptibles como 'Nova'.

La temperatura y la duración de la humectación foliar (HF) son variables micro-meteorológicas frecuentemente asociadas con la incidencia y severidad de enfermedades causadas por diferentes especies del género *Alternaria* (Bashi y Rotem, 1974; Alderman y Beute, 1986; Evans *et al.*, 1992). Estas dos variables son muy habituales en estudios como base para su aplicación en modelos de predicción de enfermedades de la parte aérea de las plantas (Madden y Ellis, 1988; De Wolf e Isard, 2007). Estudios realizados en condiciones controladas indican que las infecciones por mancha marrón en la variedad tangelo 'Minneola' se producen principalmente con temperaturas de 17-32°C (Canihos *et al.*, 1999). Los estudios realizados en Florida, indican que las condiciones óptimas para la infección son temperaturas de 23-27°C junto con 8-12 horas de humectación continua en hoja (Canihos *et al.*, 1999; Timmer *et al.*, 2000). Estudios en condiciones controladas realizados en Israel sitúan el óptimo de temperatura entre 22 y 25°C (Solel y Kimchi, 1998). En general, las especies de *Alternaria* tienen un óptimo para la infección de 25°C o incluso superior, pero estos patógenos son también muy eficientes a temperaturas subóptimas (Rotem, 1994).

Los períodos cortos de humectación son muy habituales en las zonas de clima semi-árido (Bashi y Rotem, 1974). Bajo estas condiciones, el éxito de la infección requiere de una rápida germinación de las esporas y penetración en el hospedante, o de su capacidad para sobrevivir durante los períodos secos y reiniciar posteriormente la infección en presencia de humectación (Schwabe, 1980; Arauz y Sutton, 1990; Becker y Burr, 1994; Vloutoglou *et al.*, 1996; Llorente y Montesinos, 2002; Magarey *et al.*, 2005a). Por otro lado, las variables

meteorológicas empleadas en los modelos de procesos son generalmente de tipo horario, por lo que es necesario determinar a partir de cuantas horas de interrupción de la humectación (período seco) se aborta el proceso de infección. El modelo genérico de infección de Magarey *et al.* (2005a) establece el parámetro D_{50} , que considera una reducción del 50% en la severidad o incidencia de la enfermedad comparada con un período de humectación continua. En el caso de la mancha marrón de las mandarinas, se desconoce el efecto de los períodos de humectación interrumpidos en el desarrollo de la enfermedad.

La utilidad de los modelos, ya sean basados en procesos o de tipo empírico, depende de su correcta evaluación (i.e. validación) (Gent *et al.*, 2013). En el caso de los modelos de procesos la evaluación es si cabe todavía más importante, ya que las relaciones entre la enfermedad y las variables ambientales establecidas bajo condiciones controladas de laboratorio pueden ser sensiblemente diferentes en condiciones de campo. Magarey y Sutton (2007) diferencian entre la evaluación biológica y la evaluación comercial de los modelos. En la evaluación biológica se valora si el modelo estima correctamente la progresión de la enfermedad en condiciones de campo. En cambio, en la validación comercial debe comprobarse también qué el modelo permite tomar decisiones adecuadas sobre la aplicación de las medidas de control (Fabre *et al.*, 2007; McRoberts *et al.*, 2011; Gent *et al.*, 2013).

Existen cuatro técnicas principales para la evaluación de los modelos empleados en patología vegetal: exposiciones de plantas trampa, comparación de series históricas de datos, comparaciones entre diferentes programas de tratamientos y la evaluación basada en la opinión de expertos (Magarey y Sutton, 2007). El método más habitual para la evaluación biológica de los modelos es la exposición en condiciones de campo de plantas trampa en macetas y en algunos casos órganos concretos como frutos y brotes (Aldwinckle *et al.*, 1980; Eisensmith y Jones, 1981; Arauz y Sutton, 1989; MacHardy y Gadoury, 1989; Grove *et al.*, 1991; Wilson *et al.*, 1999). La comparación entre los programas de tratamientos dirigidos según el modelo y otros basados en un calendario prefijado es la técnica más habitual para evaluación comercial de los modelos. Las evaluaciones mediante series históricas de datos y las basadas en opinión de expertos son menos habituales. De hecho, esta última se considera poco rigurosa (Spotts, 1977, Spotts y Cervantes, 1991; Jones, 1992; Fidanza *et al.*, 1996; Grünwald *et al.*, 2000).

Para la selección de los modelos más apropiados, en estadística frecuentista se aplican diferentes criterios de bondad de ajuste entre las estimaciones del modelo y los datos observados. La diferencia entre los valores estimados por el modelo y los observados (residuos) puede analizarse por métodos estadísticos y gráficos, que visualizan por ejemplo la dispersión de los residuos respecto a la línea diagonal de ajuste perfecto (Coakley *et al.*, 1981; Moschini *et al.*, 2001). Una vez seleccionados los modelos más adecuados en función de la bondad de ajuste, se procede a su evaluación con datos no empleados en su desarrollo (Coakley *et al.*, 1985; Johnson *et al.*, 1996; Eversmeyer y Kramer, 1998; Turechek y Steveson, 1998; Moschini *et al.*, 2002 y De Wolf *et al.*, 2003).

La metodología de análisis mediante curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) se desarrolló durante la Segunda Guerra Mundial como herramienta para medir la eficacia de las señales de radar (Lusted *et al.*, 1971). Posteriormente, el análisis ROC ha tenido una gran difusión en aplicaciones médicas como la radiología (Hanley y McNeil, 1982) y las pruebas diagnósticas (Metz, 1978). En los últimos años, el análisis mediante curvas ROC se ha incorporado también como uno de los métodos de selección y evaluación de modelos en fitopatología (Fabre *et al.*, 2003; Makowski *et al.*, 2005; Turechek y Wilcox, 2005; Dewdney *et al.*, 2007; Duttweiler *et al.*, 2008; Gent y Ocamb, 2009). Una de las ventajas del análisis de curvas ROC es que emplea conceptos fácilmente interpretables como la sensibilidad (proporción de verdaderos positivos) y la especificidad (proporción de verdaderos negativos). Permite conocer la capacidad de los modelos para discriminar entre dos niveles de la variable respuesta (e.g. sano *vs.* enfermo) y seleccionar así los modelos óptimos y descartar aquellos de menor capacidad de discriminación. Este método de análisis estadístico se basa en representar los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos en todo el rango de la variable respuesta (Tabla 4.1).

Dado que la proporción de verdaderos positivos es equivalente a sensibilidad y la proporción de falsos positivos es igual a 1-especificidad, es habitual representar el gráfico ROC como la sensibilidad frente a 1-especificidad. Cada resultado de predicción representa un punto en el espacio ROC. En este tipo de gráfico, la clasificación perfecta se situaría en un punto en la esquina superior izquierda (coordenadas 0,1) del espacio ROC, representando un 100% de sensibilidad (ningún falso negativo) y un 100% también de especificidad (ningún

falso positivo). Por el contrario, una clasificación aleatoria debida al azar daría puntos a lo largo de la línea diagonal que va desde el extremo inferior izquierdo hasta la esquina superior derecha, y que se conoce también como línea de no discriminación. Los puntos por encima de la diagonal representan resultados de clasificación mejores que los debidos únicamente al azar. El área bajo la curva ROC (AUC) se considera como un índice del comportamiento general del modelo. El valor de AUC de un modelo perfecto sería de 1 y el de un modelo sin ninguna capacidad de discriminación sería de 0,5.

Tabla 4.1: Conceptos empleados en el análisis mediante curvas ROC (Receiver Operating Characteristic).

| Valores estimados | Valores observados | | Totales |
|-------------------|-------------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| | Positivos (presencia enfermedad) | Negativos (ausencia enfermedad) | |
| Positivos | Verdaderos positivos (a) | Falsos negativos (b) | Positivos (a+c) |
| Negativos | Falsos positivos (c) | Verdaderos negativos (d) | Negativos (b+d) |
| Total | Enfermos (a+b) | Sanos (c+d) | N |

Sensibilidad = $\frac{\text{verdaderos positivos}}{\text{total de casos positivos}} = \frac{a}{a+c} = \frac{VP}{VP+FN} \times 100\%$

donde:

- a= verdaderos positivos
- a+c= total de casos positivos (enfermos)
- VP/FN= verdaderos positivos/falsos negativos

Especificidad = $\frac{\text{verdaderos negativos}}{\text{total de casos negativos}} = \frac{b}{b+d} = \frac{VN}{VN+FP} \times 100\%$

donde:

- a= verdaderos negativos
- a+c= total de casos negativos (sanos)
- VN/FP= verdaderos negativos/falsos positivos

El análisis de curvas ROC permite también incorporar consideraciones económicas en la selección de los puntos de corte (i.e. los valores de incidencia y

severidad a partir de los cuales consideramos la presencia de la enfermedad) (Turechek y Wilcox, 2005). Debido a los exigentes criterios de calidad de los mercados de exportación, los frutos de mandarina deben estar prácticamente exentos de lesiones. La norma internacional de calidad para cítricos establece cuatro categorías principales para la clasificación de los frutos afectados por la mancha marrón: en los frutos de clase extra se admite una única lesión de tamaño muy pequeño, en los frutos clase I se admiten 2-3 lesiones, en los de clase II se admiten de 4-6 lesiones y los que presentan más de 6 lesiones se consideran no comerciales (OECD, 2010). En este contexto, un falso positivo del modelo de predicción (baja sensibilidad) daría lugar a tratamientos fungicidas innecesarios, pero un falso negativo (baja especificidad) supondría la pérdida total de la cosecha. Mediante el análisis de curvas ROC, es posible integrar los diferentes impactos económicos de estas predicciones incorrectas y determinar un umbral de decisión que las minimice. Esta metodología supone una ventaja respecto a la selección empírica de umbrales, basada principalmente en la experiencia del investigador (Madden y Ellis, 1988).

Uno de los inconvenientes del AUC como criterio para seleccionar entre modelos es que su valor se calcula a partir de toda la curva ROC, incluidas las regiones que no son relevantes para las aplicaciones prácticas del modelo (Dodd y Pepe, 2003; Walter, 2005; Ma *et al.*, 2013). Debido a los exigentes criterios de calidad indicados anteriormente, en el caso de la mancha marrón las regiones de la curva ROC con bajos niveles de sensibilidad serían inaceptables. En estas circunstancias, sólo interesan aquellos puntos de la curva ROC que aseguren altos valores de sensibilidad, y a partir de ahí optar por aquellos que determinen una mayor sensibilidad y/o especificidad, según sea el objetivo en cada caso. En general, se seleccionan puntos de la curva ROC que maximicen la sensibilidad cuando la enfermedad causa daños muy graves y no existen medidas de control que permitan frenar su progresión. Por otra parte, se seleccionan puntos de la curva ROC que maximicen la especificidad cuando los daños de la enfermedad no son graves y es posible aplicar medidas de control efectivas.

El área parcial bajo la curva ROC (pAUC) es una solución que permite seleccionar modelos en situaciones donde hay que garantizar una elevada sensibilidad y/o especificidad. En lugar de toda la curva ROC, este método estadístico se centra en la región concreta de la curva ROC relevante para la

aplicación práctica del modelo (McClish, 1989; Thompson y Zucchini, 1989; Jiang *et al.*, 1996). Como ya se ha indicado, los criterios de calidad para la comercialización de las mandarinas son extremadamente exigentes, por lo que los modelos de predicción para el control de la mancha marrón de las mandarinas deben garantizar altos niveles de sensibilidad (baja proporción de falsos negativos). Las infecciones no detectadas darían lugar a la omisión errónea de tratamientos, lo que se traduciría en pérdidas económicas muy significativas. Por esta razón, en el presente estudio se ha optado por el análisis del pAUC.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Eficiencia infectiva bajo condiciones controladas de temperatura y humectación

Previo a las inoculaciones se ensayaron tres concentraciones de inóculo: 10^3 , 10^4 , y 10^5 conidias/mL sobre plantones de 'Fortune' y 'Nova'. La concentración de 10^4 permitió una mejor cuantificación de la incidencia de los síntomas. Para evaluar el efecto de la temperatura y la duración de humectación foliar (HF) en la incidencia de la mancha marrón se realizaron experimentos en condiciones controladas con los cultivares 'Fortune' y 'Nova'. Se ensayaron las siguientes temperaturas: 10, 15, 20, 25, 30, y 35°C con duraciones de HF de 10, 24, y 48 horas; 15, 20, 25 y 30°C con duraciones de HF de 8, 16 y 38 horas; y 8, 12, 17, 22, 27, y 32°C con duraciones de HF de 8, 16 y 38 horas. En todos los casos se incluyó también un testigo negativo inoculado con agua destilada estéril.

Para las inoculaciones se utilizó una suspensión de 10^4 conidias/mL del aislado IVIA-A051 (apdo. 3.2.1) que se pulverizó directamente sobre las plantas empleando aproximadamente 10 mL de suspensión por planta. Tras la inoculación, las plantas se cubrieron con bolsas plásticas para mantener la humedad. Las plantas se mantuvieron en incubadoras (Binder Kb400, Alemania) durante los períodos indicados anteriormente. Una vez transcurrido el tiempo marcado, se retiraron las bolsas plásticas y las plantas se secaron con un ventilador. Las plantas se mantuvieron en una cámara durante 48 horas a 21-25°C, 60% de HR y fotoperiodo de 12/12 horas. Finalmente se evaluó la incidencia de los síntomas de la enfermedad con la misma metodología descrita en el (apdo. 3.2.3). Se realizaron

dos experimentos con tres repeticiones de tres plantas para cada combinación cultivar x temperatura x duración de HF. La homogeneidad de las varianzas se confirmó mediante la prueba de Bartlett y los datos de ambos experimentos se combinaron para su posterior análisis estadístico. Los modelos desarrollados a partir de estos datos se describen posteriormente en el (apdo. 4.3.3). En todos los casos las plantas inoculadas se prepararon de misma forma indicada en el (apdo. 3.2.3).

4.2.2. Efecto de la interrupción de la humectación en la eficiencia infectiva del patógeno

Para determinar el efecto de la interrupción de la humectación en la eficiencia infectiva del patógeno se compararon diferentes períodos de humectación interrumpidos y de humectación continua en plantas de ‘Fortune’ y ‘Nova’ inoculadas de la misma forma descrita anteriormente (apdo. 4.2.1). Se evaluaron períodos de humectación inicial de 12 horas, seguidos de un período seco de 1, 2 o 6 horas y un período de humectación final de 8 horas. Se incluyeron también períodos continuos de humectación de 12 y 20 horas y un testigo negativo inoculado con agua destilada estéril. En todos los casos la temperatura fue de 20°C. Tras la inoculación las plantas se cubrieron con bolsas plásticas de la misma forma descrita en el (apdo. 4.2.1). Para provocar los períodos secos, se retiraron las bolsas y las plantas se secaron con un ventilador y se mantuvieron luego a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y 65% HR durante 1, 2 o 6 horas. Seguidamente se pulverizaron con agua destilada estéril y se cubrieron de nuevo con bolsas plásticas hasta completar el período de humectación final de 8 horas. Finalmente, todas las plantas inoculadas se secaron, incubaron y evaluaron de la misma forma descrita anteriormente en el (apdo. 3.2.3). Se realizaron dos experimentos con tres repeticiones de tres plantas para cada uno de los tratamientos evaluados. Los datos se combinaron tras confirmar la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Bartlett.

4.2.3. Efecto de la temperatura en el período de incubación

Se determinó el efecto de la temperatura en el período de incubación (inoculación-aparición de síntomas) posterior a la infección en los cultivares ‘Fortune’ y ‘Nova’. Las plantas se inocularon con una suspensión de 10^4 conidias/mL de la misma forma descrita en el (apdo. 4.2.1). Todas las plantas inoculadas se incubaron durante 12 horas a 20°C. Luego se retiraron las bolsas y se secaron con un ventilador. Las plantas se colocaron en incubadoras a 15, 20, 25 o 30°C, con cuatro repeticiones de cuatro plantas para cada una de las temperaturas evaluadas. Se incluyó también un testigo negativo inoculado con agua destilada estéril. La incidencia de la enfermedad en las plantas inoculadas se evaluó secuencialmente a las 15, 17, 22, 40 y 50 horas con la misma escala descrita anteriormente. Se realizaron dos experimentos con cuatro repeticiones de cuatro plantas. Los datos se combinaron tras confirmar la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Bartlett.

Los datos se analizaron usando el modelo aditivo generalizado (GAM) (Wood, 2006). Los GAM son extensiones semi-paramétricas de los GLM que incorporan una función ‘link’ para relacionar la media de la variable respuesta y una función de suavizado de las covariables. Los GAM son especialmente adecuados cuando la relación entre la variable respuesta y las covariables no es lineal ni monotónica. Los modelos empleados en este análisis incorporan un error de tipo binomial con una función ‘link’ de tipo ‘log’ para estimar las curvas respuesta incorporando la temperatura y duración de la incubación como covariables:

$$\log(E[D_i]) = f_1(T_i) + f_2(I_i), \quad D_i \sim \text{Binomial}$$

donde D = incidencia, T = temperatura (°C), I = tiempo de incubación (horas) y f las funciones de suavizado. Se emplearon ‘splines’ de regresión de tipo ‘thin plate’ de dimensión $k = 4$ para obtener suavizados de las dos covariables, temperatura y duración de incubación. Se calculó la proporción de ‘deviance’ explicada por el modelo y la raíz del error cuadrático medio (RMSE). Para el análisis se usó el paquete de mgcv para R (Wood, 2006).

4.2.4. Infecciones en condiciones de campo

El estudio se llevó a cabo en tres parcelas afectadas por la mancha marrón: dos parcelas comerciales en Alzira y Chiva y la parcela experimental 47 del IVIA en Moncada, todas ellas en la provincia de Valencia. La parcela de Alzira tenía una superficie total de 0,17 ha con un marco de plantación de 5 x 4 m y las filas con orientación norte-sur. La parcela de Chiva tenía una superficie de 2,89 ha y un marco de plantación de 6 x 5 m con orientación norte-sur. La parcela de Moncada tenía 0,72 ha y un marco de plantación de 3 x 2 m con orientación este-oeste. La parcela de Alzira era de la variedad 'Nova', la de Chiva de 'Fortune' y la de Moncada estaba plantada con híbridos de 'Fortune' y 'Minneola'. En las tres parcelas los árboles estaban injertados sobre citrange 'Carrizo' y tenían 15 años de edad al final del estudio en 2013. Todas las parcelas se regaban mediante riego localizado y seguían las recomendaciones habituales de fertilización y control de plagas. En las parcelas comerciales de Alzira y Chiva se seguía el programa de aplicaciones fungicidas recomendado para el control de la mancha marrón a base de oxiclورو de cobre y mancozeb. En total se realizaron cuatro aplicaciones fungicidas anuales en la parcela de 'Nova' en Alzira y ocho aplicaciones anuales en la parcela de 'Fortune' en Chiva. En la parcela de Moncada no se realizó ninguna aplicación fungicida.

Se registraron las variables meteorológicas en cada parcela a intervalos de una hora con estaciones meteorológicas las automáticas descritas en el (apdo. 3.2.1). Para los sensores de HF Hobo se seleccionó un umbral de corte de 75,88 a partir de los resultados obtenidos en el (apdo. 5.3.3). Se realizaron exposiciones semanales de plantas trampa de 'Nova' y 'Fortune' de la misma forma descrita en el (apdo. 3.2.3). Los períodos de infección semanal se determinaron desde septiembre de 2012 a diciembre de 2013 en la parcela de Alzira (n = 64), desde octubre de 2012 a diciembre de 2013 en la parcela de Chiva (n = 60), y desde de marzo de 2011 a diciembre de 2013 en la parcela de Moncada (n = 142). En las dos parcelas comerciales, Alzira y Chiva, las plantas trampa se protegieron con láminas plásticas durante la aplicación de fungicidas. Tras la exposición en campo, las plantas trampa se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y una HR de alrededor del 90% durante cinco días y se evaluó la incidencia de la enfermedad con la misma escala descrita en el (apdo. 3.2.3).

4.2.5. Desarrollo de los modelos y evaluación mediante curvas ROC

Modelos evaluados

Los datos de incidencia obtenidos en los experimentos de eficiencia infectiva en los cultivares ‘Fortune’ y ‘Nova’ se analizaron aplicando modelos GAM con un error binomial y una función ‘link’ de tipo ‘log’ (Wood., 2006) con la temperatura y la duración de HF como covariables:

$$\log(E[D_i]) = f(T_i, W_i), \quad D_i \sim \text{Binomial}$$

donde D = incidencia, T = temperatura (°C), W = duración de la HF (horas) y f la función de suavizado. Se empleó una dimensión $k = 4$ para obtener suavizados bidimensionales de las dos covariables, temperatura y duración de HF. Se calculó la proporción de ‘deviance’ explicada por el modelo y su RMSE.

Sobre estos mismos datos se aplicó también el modelo genérico de infección (GIM) descrito por Magarey *et al.* (2005a). Este modelo estima la duración de HF necesaria para alcanzar un determinado umbral de incidencia/severidad de la enfermedad a una temperatura dada. En el caso de la mancha marrón, debido a los exigentes criterios de la norma internacional de calidad para la comercialización de mandarinas (OECD, 2010), el umbral elegido fue simplemente la presencia de la enfermedad en las plantas trampa (>0% de hojas sintomáticas). La duración de HF necesaria en horas ($W_{(T)}$) para este umbral de incidencia a temperatura T se estimó a partir de la función $f_{(T)}$:

$$W_{(T)} = W_{\min}/f_{(T)} \leq W_{\max}$$

$$f_{(T)} = \left(\frac{T_{\max} - T}{T_{\max} - T_{opt}} \right) \left(\frac{T - T_{\min}}{T_{opt} - T_{\min}} \right)^{(T_{opt} - T_{\min}) / (T_{\max} - T_{opt})}$$

donde T = temperatura media (°C) durante el período de humectación, T_{\min} = temperatura mínima para la infección, T_{\max} = temperatura máxima para la infección, y T_{opt} = temperatura óptima para la infección, siendo $T_{\min} \leq T \leq T_{\max}$ y 0 en caso contrario, W_{\min} = valor mínimo de duración de HF en horas necesarias para

alcanzar el umbral específico de incidencia a una temperatura dada y siendo W_{\max} el límite superior de $W_{(T)}$.

Los parámetros del modelo GIM se estimaron mediante inferencia Bayesiana. Las distribuciones previas de los parámetros se definieron considerando la información existente antes de iniciar el estudio. Las distribuciones posteriores se calcularon incorporando las distribuciones previas y los datos obtenidos en los experimentos de eficiencia infectiva. Las distribuciones previas de los cinco parámetros del modelo se definieron como de tipo uniforme con valores mínimos y máximos obtenidos a partir de los datos publicados para la mancha marrón y otras enfermedades causadas por especies de *Alternaria* (Magarey *et al.*, 2005a): $T_{\min} \sim \text{unif}(4, 10)$, $T_{\max} \sim \text{unif}(32, 38)$, $T_{\text{opt}} \sim \text{unif}(23, 26)$, $W_{\min} \sim \text{unif}(5, 8)$ y $W_{\max} \sim \text{unif}(14, 29)$. Los bancos de datos consistieron de 12 combinaciones de temperatura y sus correspondientes duraciones de HF necesarias para alcanzar el umbral de la incidencia (i.e. presencia de la enfermedad) en cada cultivar. Las distribuciones posteriores de los parámetros se calcularon con el programa WinBUGS (Lunn *et al.*, 2000) mediante simulación de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC). Fueron necesarias 5.000 iteraciones para la convergencia del algoritmo, y luego se realizaron un total de 50.000 interacciones adicionales a partir de las cuales se obtuvo la mediana y los intervalos de credibilidad del 95% para cada parámetro. Se calculó también el RMSE del modelo. Magarey *et al.* (2005a) condicionaron la continuidad entre dos períodos de humectación al valor del parámetro D_{50} , definido como la duración del período seco a $HR < 95\%$ que resulta en una reducción del 50% en la incidencia o severidad comparado con un período equivalente de HF continua. Para cada cultivar, se comparó la incidencia de la enfermedad obtenida en cada uno de los períodos de HF interrumpida con el 50% de la incidencia obtenida en el período continuo de 20 horas de HF mediante una prueba t de Student de una cola. Basándose en los resultados del (apdo. 4.3.2), se fijó un valor de $D_{50} = 0$ horas para el cultivar ‘Fortune’ y $D_{50} = 1$ hora para ‘Nova’.

En la evaluación se incluyó también el modelo Alter-Rater, desarrollado en Florida para el control de la mancha marrón. Este modelo asigna valores diarios de 0 a 11 en función de tres variables meteorológicas: (i) lluvia $> 2,5$ mm, (ii) HF > 10 horas, y (iii) temperatura media diaria $< 20^{\circ}\text{C}$, $\leq 20^{\circ}\text{C} \leq 28^{\circ}\text{C}$, o $> 28^{\circ}\text{C}$ (Tabla 4.2). Los valores diarios se van acumulando hasta que alcanzan un valor prefijado

en función de la susceptibilidad del cultivar y el nivel de inóculo en la parcela. Se recomienda la aplicación de fungicidas cuando se rebasan dichos umbrales (Timmer *et al.*, 2000; Bhatia *et al.*, 2003).

En una línea similar al Alter-Rater, se evaluó también un modelo empírico simple (SRS) basado en la información obtenida sobre la epidemiología de la mancha marrón en condiciones semi-áridas (apdo. 3.3.3). Este sistema considera como requisitos mínimos para la infección la concurrencia de una temperatura media semanal (T_{week}) > 12°C y una lluvia acumulada semanal (R_{week}) > 2 mm. Cuando se rebasan ambos umbrales, se calcula el valor resultante de $T_{week} + R_{week}$, siendo nulo en caso contrario.

Tabla 4.2: Valores asignados por el modelo Alter-Rater en función de los umbrales de lluvia, duración de la humectación foliar y temperatura.

| Lluvia > 2,5 mm | HF diaria ^a > 10 horas | Temperatura ^b (°C) | Valor Alter-Rater |
|--------------------|--------------------------------------|----------------------------------|----------------------|
| + | + | 20 - 28 | 11 |
| + | + | > 28 | 8 |
| + | + | < 20 | 6 |
| + | - | 20 - 28 | 6 |
| + | - | > 28 | 4 |
| + | - | < 20 | 3 |
| - | + | 20 - 28 | 6 |
| - | + | > 28 | 6 |
| - | + | < 20 | 4 |
| - | - | 20 - 28 | 3 |
| - | - | > 28 | 0 |
| - | - | < 20 | 0 |

^a Duración diaria de la humectación foliar

^b Temperatura media diaria

Evaluación mediante curvas ROC

Para la evaluación de los modelos se utilizaron los datos de incidencia de mancha marrón en las plantas trampa y las variables meteorológicas obtenidas en las tres parcelas y período de estudio descritos en el (apdo. 4.2.4). En cada parcela,

los períodos de exposición semanal se clasificaron como presencia (1) o ausencia (0) de enfermedad basados en la observación de síntomas de mancha marrón en las plantas trampa (>0% de hojas sintomáticas) analizando los dos cultivares, ‘Fortune’ y ‘Nova’, por separado.

En cada una de las exposiciones semanales realizadas se identificaron todos los períodos de humectación y se calculó su duración y temperatura media. Sobre estos datos horarios se aplicaron los modelos GAM y GIM y los valores resultantes obtenidos se acumularon para cada una de las exposiciones semanales. Para tener en cuenta un posible efecto diferencial sobre la enfermedad de los períodos de humectación inducidos por lluvias respecto a los rocíos, las salidas de los valores GAM y GIM se multiplicaron por dos en las semanas con $R_{week} > 2$ mm. Estas modificaciones de los modelos se codificaron como GAM_{week} y GIM_{week} . Los valores del modelo Alter-Rater se asignaron en función de los valores diarios de lluvia, duración de HF y temperatura media (Tabla 4.2) y se acumularon para cada una de las exposiciones semanales. Los valores del modelo SRS se calcularon en función de los valores de temperatura media (T_{week}) y lluvia acumulada (R_{week}) semanales.

La evaluación de los modelos se realizó aplicando el análisis de curvas ROC. Como ya se ha indicado anteriormente, este método estadístico está especialmente indicado para estudios donde se estima una variable respuesta de clasificación binaria (i.e. presencia/ausencia de la enfermedad) a partir de una variable continua (i.e. salidas de los modelos). Se calcularon curvas ROC a partir de los valores semanales de presencia/ausencia de enfermedad en plantas trampa de ‘Fortune’ y ‘Nova’ (variable de clasificación binaria) y los valores semanales acumulados de los modelos GAM, GAM_{lluvia} , GIM, GIM_{lluvia} , Alter-Rater y SRS (variables continuas) con el paquete pROC para R (Robin *et al.*, 2011). De acuerdo con la terminología ROC, las semanas con presencia enfermedad en plantas trampa se denominaron ‘casos’ y los períodos sin enfermedad ‘controles’. El área total bajo la curva ROC (AUC) se calculó mediante integración trapezoidal (Robin *et al.*, 2011). Inicialmente, los datos de cada parcela se analizaron por separado y luego se realizó un análisis conjunto de las tres parcelas. En todos los casos los cultivares ‘Fortune’ y ‘Nova’ se estudiaron por separado.

Teniendo en cuenta que la sensibilidad de los modelos es crítica para el control económico de la mancha marrón de las mandarinas, además de el AUC se calculó también el área parcial de la curva ROC entre el 0,9-1 de sensibilidad ($pAUC_{0,9-1se}$) (Jiang *et al.*, 1996; Robin *et al.*, 2011). La selección del punto de corte óptimo para cada modelo y cada cultivar se eligió entre todos los valores de la variable continua a lo largo de la curva ROC dentro de la región de sensibilidad de 0,9 a 1, empleando para ello el estadístico J de Youden:

$$J = \frac{ad - bc}{(a + b)(c + d)}$$

donde a son verdaderos positivos, b falsos negativos, c falsos positivos y d verdaderos negativos (Tabla 4.1). Este índice estadístico maximiza la distancia entre la curva ROC y la línea diagonal no discriminante. Toma valor nulo cuando el estimador registra la misma proporción de falsos y verdaderos positivos y un valor de la unidad cuando no hay ni falsos positivos ni falsos negativos (Youden, 1950). Los intervalos de confianza de las AUC y $pAUC_{0,9-1se}$ se calcularon con el método de DeLong (DeLong *et al.*, 1988) y mediante bootstrap estratificado en el caso la sensibilidad y especificidad asociada al punto de corte óptimo (Fawcett, 2006).

Se seleccionó el modelo con el máximo valor de AUC y $pAUC_{0,9-1se}$ para cada uno de los dos cultivares estudiados y se contrastó con los del resto de modelos evaluados mediante la prueba apareada de DeLong (DeLong *et al.*, 1988; Robin *et al.*, 2011). En el análisis individual de las tres parcelas de estudio se aplicó únicamente el umbral de presencia de la enfermedad (>0% de hojas sintomáticas). En el análisis conjunto de los datos de las tres parcelas se aplicó también un umbral menos exigente (>5% de hojas sintomáticas). Por último, se utilizó el coeficiente kappa de Cohen (k) (Cohen, 1968; Landis y Koch, 1977) para cuantificar el grado de concordancia entre la presencia observada de enfermedad (>0% de hojas sintomáticas y >5% de hojas sintomáticas) y la estimada por los modelos operando con su punto de corte óptimo seleccionado.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Eficiencia infectiva bajo condiciones controladas de temperatura y humectación

No se observaron síntomas de la enfermedad en plantas de 'Fortune' inoculadas a 8°C durante 8 horas, 10°C durante 10 y 24 horas, 20°C durante 10 horas, 30°C durante 8 y 10 horas y 35°C durante 10 horas (Fig. 4.1A). La incidencia fue mínima con las temperaturas más bajas y las duraciones de HF más cortas evaluadas. La incidencia de la mancha marrón fue mayor con temperaturas de 17-27°C con una duración de HF de 38 horas, alcanzando un máximo de 0,99 en promedio. No se observaron síntomas en plantas de 'Nova' inoculadas a 8°C durante 8 horas, 10°C durante 10 horas, 15°C durante 10 horas, 22°C durante 8 horas y 30°C durante 8 y 16 horas (Fig. 4.1B). La incidencia de la enfermedad mostró una tendencia similar a la obtenida en 'Fortune', pero con valores máximos a 17°C durante 38 horas y 20°C durante 48 horas de duración de HF con un máximo de 0,95 en promedio. No se observaron síntomas de la enfermedad en los testigos inoculados con agua destilada estéril.

Cuando los datos de incidencia de la enfermedad obtenidos en el estudio de eficiencia infectiva se analizaron con los modelos GAM, los términos de suavizado para la temperatura y la duración de HF fueron significativos ($P < 0,0001$) en ambos cultivares. La proporción de 'deviance' explicada por los modelos fue de 0,77 en 'Fortune' y 0,82 en 'Nova'. El RMSE fue de 0,15 en 'Fortune' y 0,11 en 'Nova'. El modelo GAM predijo una incidencia de mancha marrón superior al 0,1 en 'Fortune' con 9°C y una duración de HF de 26 horas (Fig. 4.1C). El modelo predijo incidencias de 0,3 con una temperatura de 30°C y una duración de HF de 25 horas y superiores a 0,8 con temperaturas entre 16°C y 27°C y duraciones de HF de 25 horas. El modelo GAM predijo incidencias de mancha marrón superiores a 0,1 en 'Nova' con 10°C y una duración de HF de 40 horas e incidencias por debajo de 0,1 con 30°C y una duración de HF de 25 horas (Fig.4.1D). Las predicciones de incidencia fueron superiores a 0,8 con temperaturas entre 15-27°C y duraciones de HF de 38 y 48 horas en ambos cultivares.

La duración mínima de HF capaz de inducir síntomas de mancha marrón en plantas de 'Fortune' y 'Nova' varió entre 8 horas con 12-27°C y 24 horas con 12°C

(Figs. 4.1E y 4.1F). Los valores de la mediana y el intervalo de credibilidad al 95% para los estimadores de los parámetros del modelo GIM fueron: $\hat{T}_{\min} = 4,33$ (4,01-5,36), $\hat{T}_{\text{opt}} = 23,23$ (23,01-24,03), $\hat{T}_{\max} = 37,24$ (36,22-37,96), $\hat{W}_{\min} = 5,93$ (5,05-7,54) y $\hat{W}_{\max} = 27,44$ (22,15-35,96) para ‘Fortune’; y $\hat{T}_{\min} = 4,35$ (4,01-5,37), $\hat{T}_{\text{opt}} = 23,33$ (23,01-24,22), $\hat{T}_{\max} = 37,66$ (33,25-37,99), $\hat{W}_{\min} = 5,45$ (5,01-6,78) y $\hat{W}_{\max} = 25,68$ (20,67-50,94) para ‘Nova’. El RMSE fue de 4,92 en ‘Fortune’ y 4,32 en ‘Nova’.

La incidencia de la enfermedad se incrementó con duraciones de HF superiores a 16 horas en todas las temperaturas evaluadas, y descendió con temperaturas inferiores a 12°C, independientemente de la duración de HF. La incidencia se redujo con temperaturas superiores a 27°C y apenas se detectaron infecciones a 35°C.

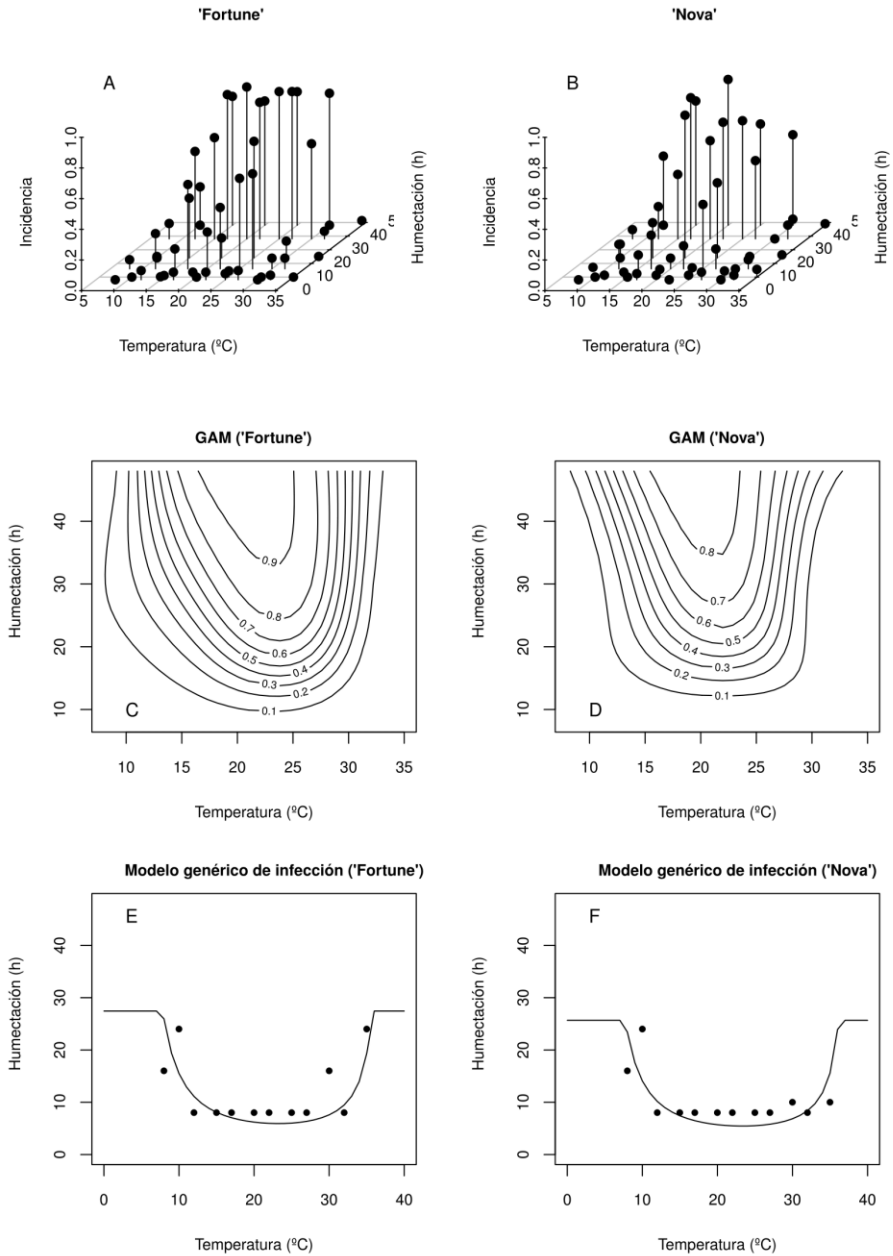


Figura. 4.1: Incidencia de la mancha marrón en hojas obtenida con inoculaciones en condiciones controladas de temperatura y humectación: **A)** Plantas de 'Fortune' y **B)** Plantas de 'Nova'. Predicciones del modelo GAM con una función de suavizado de la temperatura y la duración de la humectación: **C)** 'Fortune' y **D)** 'Nova'. Bondad de ajuste del modelo genérico de infección (línea) y los datos experimentales (puntos) para: **E)** 'Fortune' y **F)** 'Nova'. En todos los casos, datos combinados de dos experimentos.

4.3.2. Efecto de la interrupción de la humectación en la eficiencia infectiva del patógeno

La incidencia promedio de la mancha marrón obtenida en los períodos de humectación continua de 20 horas fue de 0,17 para ‘Fortune’ (Fig. 4.2A) y 0,23 para ‘Nova’ (Fig. 4.2B), siendo de 0,04 para el período continuo de 12 horas en ambos cultivares. La incidencia promedio en los períodos de humectación interrumpidos durante 2 y 6 horas variaron de 0,04 a 0,06 en ‘Fortune’ y de 0,03 a 0,08 en ‘Nova’. Con el período interrumpido de 1 hora, la incidencia promedio de la enfermedad fue de 0,18 para ‘Fortune’ y 0,06 para ‘Nova’. Cuando la incidencia obtenida en los períodos de humectación interrumpidos se comparó con el 50% de la incidencia de los períodos continuos de 20 horas de humectación, la hipótesis alternativa de una diferencia entre medias mayor que cero se aceptó ($P > 0,05$) únicamente para el período de interrupción de 1 hora en ‘Fortune’. No se observaron síntomas de la enfermedad en los testigos inoculados con agua destilada estéril.

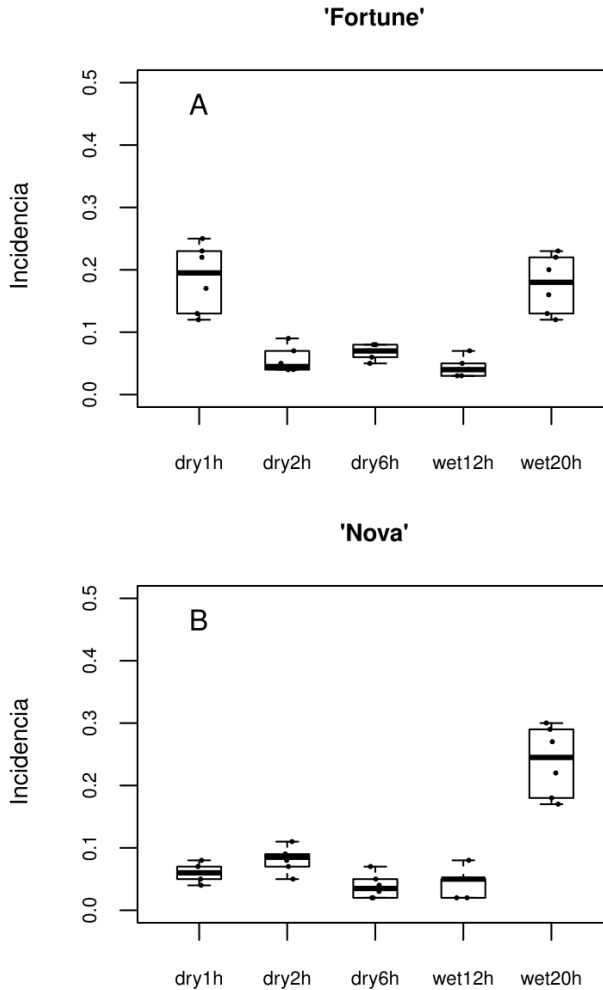


Figura. 4.2: Incidencia de la macha marrón con períodos de humectación continuos de 12 y 20 horas y períodos de 12 + 8 horas interrumpidos durante 1, 2 o 6 horas en hojas de: **A)** 'Fortune' y **B)** 'Nova'. Datos combinados de dos experimentos. 'Dry': seco; 'wet': mojado.

4.3.3. Efecto de la temperatura en el período de incubación

El término de suavizado para la temperatura y la duración de la incubación posterior a la infección en el modelo GAM fue significativo ($P < 0,0001$) en ambos cultivares. La proporción de 'deviance' explicada por el modelo fue de 0,73 para 'Fortune' y 0,77 para 'Nova'. El RMSE fue de 0,13 en 'Fortune' y 0,12 en

‘Nova’. La respuesta a la temperatura fue simétrica alrededor de 20-25°C (Fig. 4.3A). La incidencia máxima de la enfermedad bajo este rango de temperatura osciló entre 0,88-0,93 en ‘Fortune’ y 0,77-0,90 en ‘Nova’. La respuesta se incrementó con el tiempo de incubación posterior a la infección alcanzando una asíntota aproximadamente a las 30 horas en ‘Fortune’ y alrededor de 60 horas en ‘Nova’ (Fig. 4.3B).

En ‘Fortune’, los primeros síntomas se observaron a las 16 horas después de la infección. El tiempo de incubación posterior a la infección necesario para la máxima expresión de síntomas fue menor con temperaturas de 20-25°C. El período de incubación posterior a la infección fue de 17 horas con temperaturas de 15-30°C. En ‘Nova’, el desarrollo de los síntomas se observó tras 24 horas de incubación posterior a la infección. La duración mínima del período de HF posterior a la infección capaz de inducir síntomas de la enfermedad en plantas de ‘Fortune’ y ‘Nova’ inoculadas varió desde 8 horas a 27°C y 24 horas a 12°C. No se observaron síntomas de la enfermedad en los testigos inoculados con agua destilada estéril.

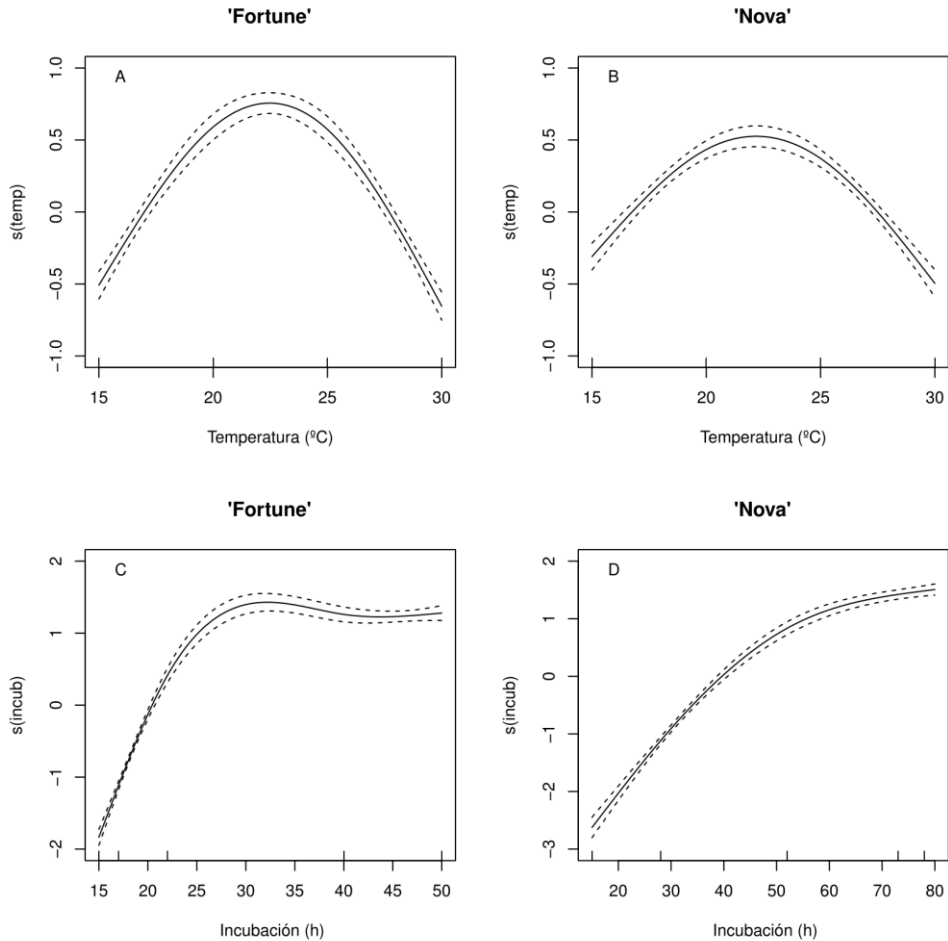


Figura. 4.3: Funciones de suavizado para la mancha marrón estimadas con el modelo GAM para el período de incubación posterior a la infección: **A y B**) Temperatura; **C y D**) Duración; **A y C**) Plantas de 'Fortune'; y **B y D**) Plantas de 'Nova'. Las marcas superiores del eje x indican la posición de los datos experimentales. Datos combinados de dos experimentos.

4.3.4. Infecciones en condiciones de campo

El ratio de casos/controles en las exposiciones semanales de plantas trampa fue de 12/52 en Alzira, 16/44 en Chiva y 37/105 en Moncada (Tabla 4.2). La incidencia de la enfermedad en las plantas de 'Fortune' osciló entre 0,01-0,10 en Alzira, 0,01-0,41 en Chiva y 0,02-0,92 en Moncada. En 'Nova' la incidencia varió entre 0,03-0,17 en Alzira, 0,01-0,50 en Chiva y 0,02-0,65 en Moncada.

Tabla 4.3: Períodos de exposición evaluados con plantas trampas de 'Fortune' y 'Nova' en las parcelas de Moncada, Alzira y Chiva, durante los años 2011, 2012 y 2013.

| | Moncada | | | | Alzira | | | | Chiva | | | |
|--------------|-----------------|--------|--------------------------|--------|-----------------|--------|--------------------------|--------|-----------------|--------|--------------------------|--------|
| | Nº exposiciones | | Nº periodos de infección | | Nº exposiciones | | Nº periodos de infección | | Nº exposiciones | | Nº periodos de infección | |
| | 'Fortune' | 'Nova' | 'Fortune' | 'Nova' | 'Fortune' | 'Nova' | 'Fortune' | 'Nova' | 'Fortune' | 'Nova' | 'Fortune' | 'Nova' |
| 2011 | | | | | | | | | | | | |
| Primavera | 13 | 5 | 4 | 4 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Verano | 13 | 5 | 3 | 3 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Otoño | 13 | 3 | 3 | 3 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Invierno | 13 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2012 | | | | | | | | | | | | |
| Primavera | 13 | 1 | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Verano | 13 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Otoño | 13 | 8 | 6 | 6 | 13 | 5 | 6 | 6 | 9 | 5 | 3 | 3 |
| Invierno | 12 | 0 | 0 | 0 | 12 | 0 | 0 | 0 | 12 | 0 | 0 | 0 |
| 2013 | | | | | | | | | | | | |
| Primavera | 13 | 8 | 6 | 6 | 13 | 4 | 4 | 4 | 13 | 6 | 6 | 6 |
| Verano | 13 | 7 | 2 | 2 | 13 | 3 | 0 | 0 | 13 | 5 | 2 | 2 |
| Otoño | 13 | 0 | 0 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 |
| Total | 142 | 37 | 25 | 25 | 64 | 12 | 10 | 10 | 60 | 16 | 11 | 11 |

4.3.5. Desarrollo de los modelos y evaluación mediante curvas ROC

En la parcela de Alzira, la máxima AUC en ‘Fortune’ se obtuvo con el modelo SRS, con un valor de 0,83 (0,70-0,97), pero sin diferencias significativas respecto al resto de modelos evaluados. En ‘Nova’ la máxima AUC se obtuvo también con el modelo SRS, con un valor de 0,86 (0,73-0,99), pero que tampoco presentó diferencias significativas respecto al resto de modelos evaluados. La máxima $pAUC_{0,9-1se}$ en ‘Fortune’ se obtuvo con el modelo GAM_{lluvia} , con un valor de 0,73 (0,67-0,83), con diferencias significativas respecto al modelo GIM_{lluvia} . En ‘Nova’ la máxima $pAUC_{0,9-1se}$ se obtuvo con el modelo GIM_{lluvia} , con un valor de 0,74 (0,67-0,93), con diferencias significativas respecto a los modelos GAM y GAM_{lluvia} (Figs. 4.4 y 4.5).

El modelo SRS presentó la máxima AUC en la parcela de Chiva, con 0,84 (0,72-0,96) en ‘Fortune’ y 0,86 (0,74-0,98) en ‘Nova’, pero sin diferencias significativas respecto al resto de modelos evaluados. El modelo GAM_{lluvia} presentó la máxima $pAUC_{0,9-1se}$, con 0,72 (0,65-0,86) en ‘Fortune’ y 0,69 (0,63-0,85) en ‘Nova’ y diferencias significativas respecto a todos los modelos evaluados excepto el GAM (Figs. 4.6 y 4.7).

En la parcela de Moncada el modelo GAM_{lluvia} presentó la máxima AUC en ‘Fortune’, con 0,84 (0,77-0,91) y diferencias significativas respecto a los modelos Alter-Rater y GIM. El modelo SRS presentó la máxima AUC en ‘Nova’, con 0,94 (0,90-0,98) y diferencias significativas respecto a todos los modelos evaluados. La máxima $pAUC_{0,9-1se}$ en ‘Fortune’ se obtuvo con el modelo GAM_{lluvia} , con 0,72 (0,60-0,83) y diferencias significativas respecto a los modelos Alter-Rater, SRS y GIM. La máxima $pAUC_{0,9-1se}$ en ‘Nova’ se obtuvo con el modelo SRS, con 0,94 (0,91-0,97) y diferencias significativas respecto a los modelos GIM y GIM_{lluvia} (Fig. 4.8 y 5.9).

Cuando se analizaron los datos de las tres parcelas en conjunto con el umbral de presencia de la enfermedad ($>0\%$ de hojas sintomáticas), el modelo SRS presentó la máxima AUC, con 0,83 (0,77-0,89) en ‘Fortune’ y 0,90 (0,85-0,95) en ‘Nova’. Se detectaron diferencias significativas respecto a los modelos GIM y GAM en ambos cultivares. El modelo GAM_{lluvia} presentó la máxima $pAUC_{0,9-1se}$ en ‘Fortune’, con 0,71 (0,65-0,78) y diferencias significativas respecto a los modelos Alter-Rater, SRS y GIM. En ‘Nova’ la máxima $pAUC_{0,9-1se}$ se obtuvo con el

modelo SRS, con 0,77 (0,62-0,93) pero sin diferencias significativas con el resto de modelos evaluados. El modelo GIM presentó los valores más altos de sensibilidad con los puntos de corte óptimos en ‘Fortune’, con 0,96 (0,92-1,00). Por su parte, con el modelo GAM_{lluvia} se obtuvieron los valores más altos de especificidad, con 0,59 (0,52-0,66). Los valores más altos en ‘Nova’ se obtuvieron con el modelo Alter-Rater, SRS, GAM y GIM_{lluvia} con 0,93 (0,85-1,00) de sensibilidad y los de especificidad con el modelo SRS, con 0,84 (0,79-0,89) (Tabla 4.4, Figs. 4.10 y 4.11).

En el análisis conjunto de las tres parcelas con el umbral menos exigente (>5% de hojas sintomáticas), la máxima AUC en ‘Fortune’ se obtuvo con el modelo GAM_{lluvia} , con 0,86 (0,80-0,91) y diferencias significativas respecto a los modelos Alter-Rater, GIM y GAM. La máxima AUC en ‘Nova’ se obtuvo con el modelo SRS, con 0,91 (0,86-0,95) y significativamente mayor que los modelos GIM y GAM. La máxima $pAUC_{0,9-1se}$ en ‘Fortune’ se obtuvo con el modelo GAM_{lluvia} , con 0,75 (0,68-0,85) y diferencias significativas respecto a los modelos Alter-Rater, SRS, GIM y GIM_{lluvia} . En ‘Nova’ la máxima $pAUC_{0,9-1se}$ se obtuvo con el modelo SRS, con 0,84 (0,68-0,93) pero sin diferencias significativas con el resto de modelos evaluados. El modelo GAM presentó los valores más altos de sensibilidad con el punto de corte óptimo en ‘Fortune’, con 0,95 (0,89-1,00), y el GAM_{lluvia} los de especificidad, con 0,63 (0,56-0,69). En ‘Nova’ los valores más altos de sensibilidad se obtuvieron con los modelos SRS y GIM, con 0,96 (0,90-1,00), y con el SRS los de especificidad con 0,81 (0,76-0,86) (Tabla 4.4, Figs. 4.12 y 4.13).

A excepción del modelo SRS en ‘Fortune’, (Fig. 4.10B) fue posible calcular un punto de corte óptimo dentro de la región de máxima sensibilidad (0,9-1) de la curva ROC con el estadístico J de Youden en todos los modelos. En ‘Fortune’, la sensibilidad de los modelos operando con sus puntos de corte óptimos osciló entre 0,90 con el modelo GAM_{lluvia} a 0,96 con el GIM (Figs. 4.10D y 4.10E) Por su parte, en ‘Nova’ osciló entre 0,91 con el modelo GIM a 0,94 con el modelo SRS (Figs. 4.11E y 4.11B). En ‘Fortune’ la especificidad osciló entre 0,25 con el modelo Alter-Rater y 0,59 con el modelo GAM_{lluvia} (Figs. 4.10A y 4.10D). En ‘Nova’ la especificidad osciló entre 0,24 con el modelo Alter-Rater y 0,84 con el modelo SRS (Figs. 5.11A y 4.11B).

En la parcela de Alzira el grado de concordancia entre la presencia observada de la enfermedad en ‘Fortune’ (umbral de $>0\%$ de hojas sintomáticas) y las estimaciones de los modelos operando con los puntos de corte óptimos osciló entre 0,15 con el modelo Alter-Rater y 0,20 con el GAM_{lluvia} . No se obtuvo concordancia con los modelos GIM y GIM_{lluvia} . En ‘Nova’ el grado de concordancia osciló entre 0,12 con el modelo Alter-Rater y 0,47 con el SRS. No se obtuvo concordancia con los modelos GIM y GIM_{lluvia} (Tabla 4.3).

En la parcela de Chiva el grado de concordancia en ‘Fortune’ varió de 0,35 con el modelo GAM a 0,40 con el GAM_{lluvia} . No se obtuvo concordancia con los modelos GIM y GIM_{lluvia} . En ‘Nova’ el grado de concordancia fue de 0,18 con los modelos GAM y GAM_{lluvia} y no se obtuvo concordancia con el resto de modelos evaluados. (Tabla 4.3). En Moncada, el grado de concordancia en ‘Fortune’ osciló entre 0,08 con el Alter-Rater y 0,25 con el GAM_{lluvia} . No se obtuvo concordancia con los modelos GIM y GIM_{lluvia} . En ‘Nova’ la concordancia osciló entre 0,12 con los modelos Alter-Rater, GAM y GAM_{lluvia} y 0,71 con el SRS, sin concordancia con los modelos GIM y GIM_{lluvia} . (Tabla 4.3).

En el análisis conjunto de las tres parcelas, el grado de concordancia entre la presencia de la enfermedad en ‘Fortune’ (umbral de $>0\%$ de hojas sintomáticas) y las estimaciones de los modelos operando con los puntos de corte óptimos osciló entre 0,10 con el Alter-Rater y 0,27 con el GAM_{lluvia} , sin concordancia con los modelos GIM y GIM_{lluvia} . En ‘Nova’ la concordancia osciló entre 0,08 con el modelo Alter-Rater y 0,63 con el modelo SRS. No se obtuvo concordancia con los modelos GIM y GIM_{lluvia} (Tabla 4.4). En el análisis conjunto de las tres parcelas con el umbral menos restrictivo ($>5\%$ de hojas sintomáticas), el grado de concordancia en ‘Fortune’ osciló entre 0,15 con los modelos Alter-Rater y GAM a 0,20 con el GAM_{lluvia} . No se obtuvo concordancia con los modelos GIM y GIM_{lluvia} . El grado de concordancia en ‘Nova’ varió de 0,10 con los modelos Alter-Rater, GAM y GAM_{lluvia} a 0,50 con el modelo SRS. No se obtuvo concordancia con los modelos GIM y GIM_{lluvia} (Tabla 4.4).

Tabla 4.4: Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente kappa de Cohen (k) obtenidos con el punto de corte óptimo seleccionado con el estadístico J de Youden para los modelos de la mancha marrón evaluados en plantas trampa de ‘Fortune’ y ‘Nova’. Análisis individual de las tres parcelas de estudio. Clasificación binaria: presencia/ausencia de síntomas.

| Parcela | Modelos ^a | Punto de corte | Sensibilidad | Especificidad ^b | k |
|---------|-----------------------|----------------|-------------------------------|----------------------------|------|
| Alzira | Fortune | | | | |
| | Alter-Rater | 5,00 | 0,91 (0,75-1,00) ^b | 0,38 (0,25-0,51) | 0,15 |
| | SRS | - | - | - | - |
| | GAM | 0,15 | 1,00 (1,00-1,00) | 0,48 (0,34-0,61) | 0,19 |
| | GAM _{lluvia} | 0,21 | 1,00 (1,00-1,00) | 0,48 (0,34-0,61) | 0,20 |
| | GIM | 10,50 | 1,00 (1,00-1,00) | 0,42 (0,28-0,55) | 0,00 |
| | GIM _{lluvia} | 27,00 | 0,91 (0,75-1,00) | 0,51 (0,38-0,65) | 0,00 |
| | Nova | | | | |
| | Alter-Rater | 5,00 | 0,90 (0,70-1,00) | 0,37 (0,24-0,50) | 0,12 |
| | SRS | 17,75 | 0,90 (0,70-1,00) | 0,77 (0,66-0,88) | 0,47 |
| | GAM | 0,08 | 1,00 (1,00-1,00) | 0,44 (0,31-0,57) | 0,15 |
| | GAM _{lluvia} | 0,12 | 1,00 (1,00-1,00) | 0,46 (0,33-0,59) | 0,15 |
| | GIM | 15,50 | 1,00 (1,00-1,00) | 0,42 (0,29-0,55) | 0,00 |
| | GIM _{lluvia} | 30,00 | 1,00 (1,00-1,00) | 0,50 (0,37-0,62) | 0,00 |
| Chiva | Fortune | | | | |
| | Alter-Rater | - | - | - | - |
| | SRS | - | - | - | - |
| | GAM | 0,13 | 0,93 (0,81-1,00) | 0,47 (0,38-0,57) | 0,35 |
| | GAM _{lluvia} | 0,18 | 1,00 (1,00-1,00) | 0,62 (0,53-0,72) | 0,40 |
| | GIM | 9,50 | 0,93 (0,81-1,00) | 0,51 (0,41-0,60) | 0,00 |
| | GIM _{lluvia} | 9,50 | 0,93 (0,81-1,00) | 0,49 (0,40-0,59) | 0,00 |
| | Nova | | | | |
| | Alter-Rater | - | - | - | - |
| | SRS | - | - | - | - |
| | GAM | 0,07 | 0,91 (0,75-1,00) | 0,45 (0,31-0,60) | 0,18 |
| | GAM _{lluvia} | 0,07 | 1,00 (1,00-1,00) | 0,39 (0,27-0,54) | 0,18 |
| | GIM | 10,00 | 0,91 (0,75-1,00) | 0,47 (0,33-0,62) | 0,00 |
| | GIM _{lluvia} | 10,00 | 0,91 (0,75-1,00) | 0,47 (0,33-0,62) | 0,00 |
| Moncada | Fortune | | | | |
| | Alter-Rater | 1,58 | 0,94 (0,86-1,00) | 0,20 (0,12-0,27) | 0,08 |
| | SRS | - | - | - | - |
| | GAM | 0,23 | 0,94 (0,86-1,00) | 0,47 (0,38-0,57) | 0,16 |
| | GAM _{lluvia} | 0,36 | 0,91 (0,81-1,00) | 0,62 (0,53-0,72) | 0,25 |
| | GIM | 20,50 | 0,91 (0,83-1,00) | 0,51 (0,41-0,60) | 0,00 |
| | GIM _{lluvia} | 21,50 | 0,97 (0,91-1,00) | 0,49 (0,40-0,59) | 0,00 |
| | Nova | | | | |
| | Alter-Rater | 5,00 | 0,92 (0,80-1,00) | 0,33 (0,24-0,41) | 0,12 |
| | SRS | 18,66 | 1,00 (1,00-1,00) | 0,87 (0,81-0,93) | 0,71 |
| | GAM | 0,15 | 0,92 (0,80-1,00) | 0,56 (0,47-0,64) | 0,12 |
| | GAM _{lluvia} | 0,25 | 0,96 (0,88-1,00) | 0,71 (0,63-0,79) | 0,12 |
| | GIM | 27,50 | 0,92 (0,80-1,00) | 0,54 (0,45-0,63) | 0,00 |
| | GIM _{lluvia} | 47,50 | 0,96 (0,88-1,00) | 0,72 (0,64-0,80) | 0,00 |

^a SRS, modelo empírico simple; GAM modelo aditivo generalizado; GAM_{lluvia}, modelo aditivo generalizado modificado; GIM, modelo genérico de infección; GIM_{lluvia}, modelo genérico de infección modificado.

^b Mediana e intervalo de confianza 95%.

Tabla 4.5: Valores de sensibilidad, especificidad y coeficiente kappa de Cohen (k) obtenidos con el punto de corte óptimo seleccionado con el estadístico J de Youden para los modelos de la mancha marrón evaluados en plantas trampa de 'Fortune' y 'Nova'. Análisis combinado de las tres parcelas de estudio.

| Modelos ^a | Clasificación binaria: presencia/ausencia de síntomas | | | | Clasificación binaria: >5% hojas sintomáticas | | | |
|-----------------------|---|-------------------------------|------------------|------|---|------------------|------------------|------|
| | Punto de corte | Sensibilidad | Especificidad | k | Punto de corte | Sensibilidad | Especificidad | k |
| Fortune | | | | | | | | |
| Alter-Rater | 1,50 | 0,92 (0,84-0,98) ^b | 0,25 (0,19-0,31) | 0,10 | 5,00 | 0,93 (0,85-1,00) | 0,37 (0,31-0,43) | 0,15 |
| SRS | - | - | - | - | - | - | - | - |
| GAM | 0,17 | 0,95 (0,89-1,00) | 0,42 (0,35-0,49) | 0,21 | 0,23 | 0,95 (0,89-1,00) | 0,50 (0,43-0,56) | 0,15 |
| GAM _{lluvia} | 0,31 | 0,90 (0,83-0,96) | 0,59 (0,52-0,66) | 0,27 | 0,36 | 0,93 (0,85-1,00) | 0,63 (0,56-0,69) | 0,20 |
| GIM | 10,50 | 0,96 (0,92-1,00) | 0,40 (0,34-0,47) | 0,00 | 20,50 | 0,91 (0,82-0,97) | 0,53 (0,46-0,60) | 0,00 |
| GIM _{lluvia} | 31,50 | 0,93 (0,87-0,98) | 0,51 (0,44-0,58) | 0,00 | 27,00 | 0,91 (0,82-0,97) | 0,54 (0,47-0,61) | 0,00 |
| Nova | | | | | | | | |
| Alter-Rater | 1,50 | 0,93 (0,85-1,00) | 0,24 (0,18-0,30) | 0,08 | 5,00 | 0,93 (0,84-1,00) | 0,35 (0,29-0,41) | 0,10 |
| SRS | 18,51 | 0,93 (0,85-1,00) | 0,84 (0,79-0,89) | 0,63 | 18,82 | 0,96 (0,90-1,00) | 0,81 (0,76-0,86) | 0,50 |
| GAM | 0,10 | 0,93 (0,85-1,00) | 0,43 (0,37-0,50) | 0,14 | 0,12 | 0,93 (0,84-1,00) | 0,50 (0,44-0,56) | 0,10 |
| GAM _{lluvia} | 0,18 | 0,91 (0,82-0,97) | 0,60 (0,53-0,66) | 0,14 | 0,25 | 0,90 (0,81-1,00) | 0,69 (0,63-0,75) | 0,10 |
| GIM | 19,50 | 0,91 (0,82-0,97) | 0,47 (0,40-0,53) | 0,00 | 19,50 | 0,96 (0,90-1,00) | 0,45 (0,38-0,51) | 0,00 |
| GIM _{lluvia} | 31,50 | 0,93 (0,85-1,00) | 0,55 (0,48-0,61) | 0,00 | 39,00 | 0,93 (0,84-1,00) | 0,61 (0,54-0,67) | 0,00 |

^a SRS, modelo empírico simple; GAM modelo aditivo generalizado; GAM_{lluvia} modelo aditivo generalizado modificado; GIM, modelo genérico de infección; GIM_{lluvia} modelo genérico de infección modificado.

^b Mediana e intervalo de confianza 95%.

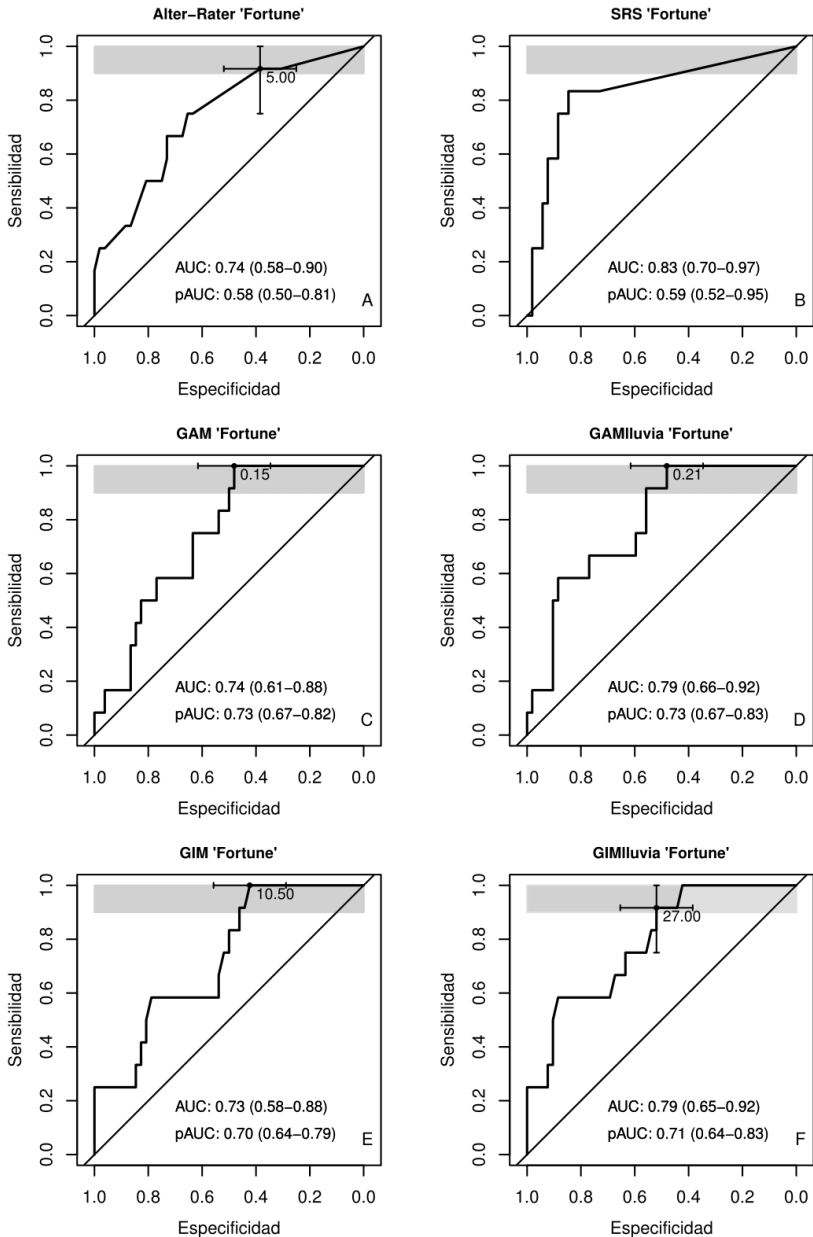


Figura 4.4: Curvas ROC obtenidas en la parcela de Alzira ($n = 64$) con exposiciones semanales de plantas trampa de 'Fortune' para los modelos de mancha marrón evaluados: **A)** Alter-Rater; **B)** Modelo empírico simple (SRS); **C)** Modelo aditivo generalizado (GAM); **D)** Modelo aditivo generalizado modificado (GAM_{lluvia}); **E)** Modelo genérico de infección (GIM); **F)** Modelo genérico de infección modificado (GIM_{lluvia}). Clasificación binaria: presencia/ausencia de síntomas. En las gráficas, mediana e intervalo de confianza 95% del área total bajo la curva (AUC) y el área parcial (pAUC) en la región de sensibilidad 0,9-1 (área sombreada). Umbral de corte óptimo con valores asociados de sensibilidad y especificidad. Línea diagonal no discriminante.

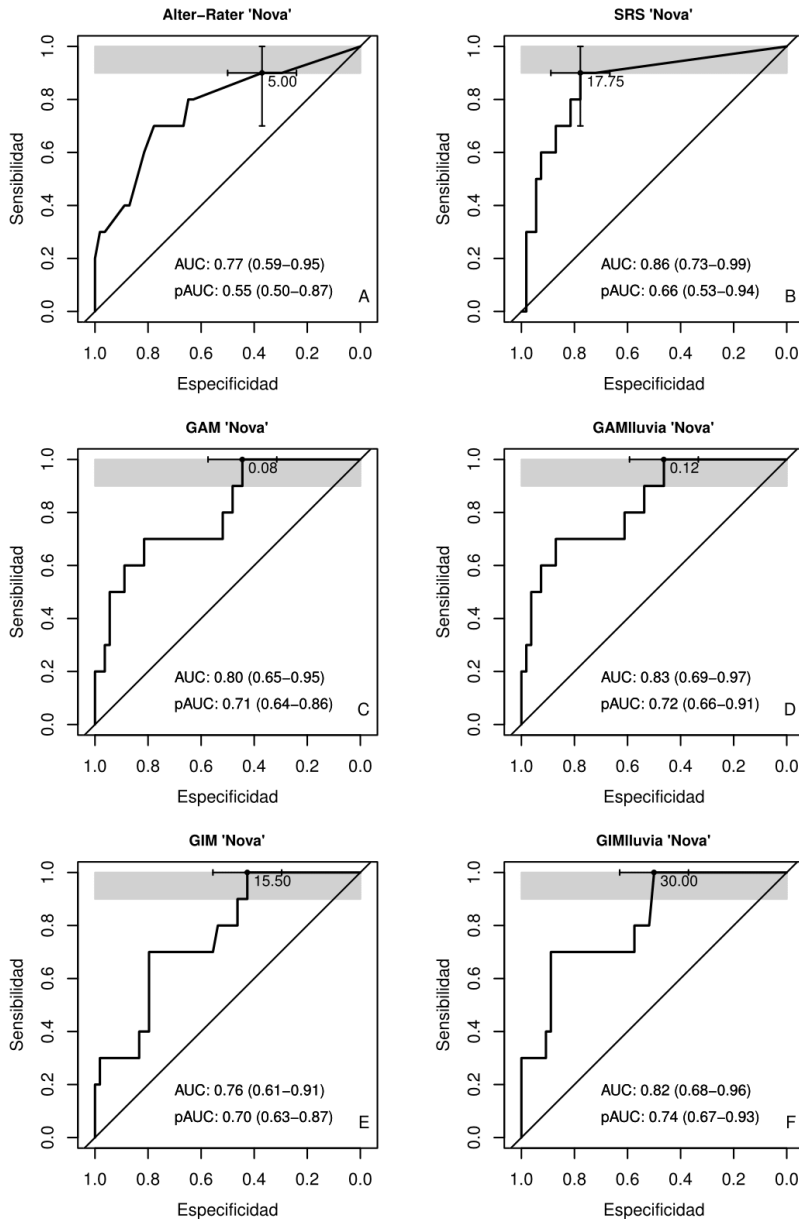


Figura 4.5: Curvas ROC obtenidas en la parcela de Alzira ($n = 64$) con exposiciones semanales de plantas trampa de 'Nova' para los modelos de mancha marrón evaluados: **A)** Alter-Rater; **B)** Modelo empírico simple (SRS); **C)** Modelo aditivo generalizado (GAM); **D)** Modelo aditivo generalizado modificado (GAM_{Iluvia}); **E)** Modelo genérico de infección (GIM); **F)** Modelo genérico de infección modificado (GIM_{Iluvia}). Clasificación binaria: presencia/ausencia de síntomas. En las gráficas, mediana e intervalo de confianza 95% del área total bajo la curva (AUC) y el área parcial (pAUC) en la región de sensibilidad 0,9-1 (área sombreada). Umbral de corte óptimo con valores asociados de sensibilidad y especificidad. Línea diagonal no discriminante

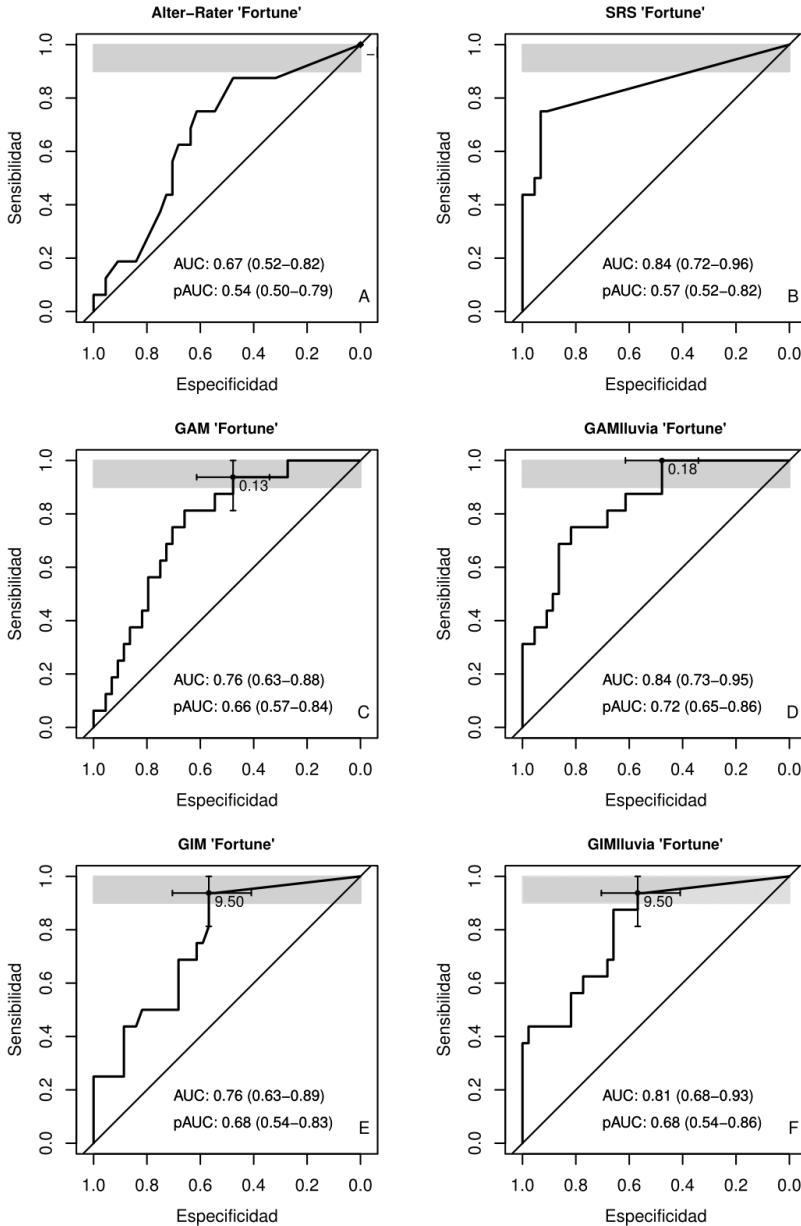


Figura 4.6: Curvas ROC obtenidas en la parcela de Chiva ($n = 60$) con exposiciones semanales de plantas trampa de 'Fortune' para los modelos de mancha marrón evaluados: **A)** Alter-Rater; **B)** Modelo empírico simple (SRS); **C)** Modelo aditivo generalizado (GAM); **D)** Modelo aditivo generalizado modificado (GAM_{lluvia}); **E)** Modelo genérico de infección (GIM); **F)** Modelo genérico de infección modificado (GIM_{lluvia}). Clasificación binaria: presencia/ausencia de síntomas. En las gráficas, mediana e intervalo de confianza 95% del área total bajo la curva (AUC) y el área parcial (pAUC) en la región de sensibilidad 0,9-1 (área sombreada). Umbral de corte óptimo con valores asociados de sensibilidad y especificidad. Línea diagonal no discriminante.

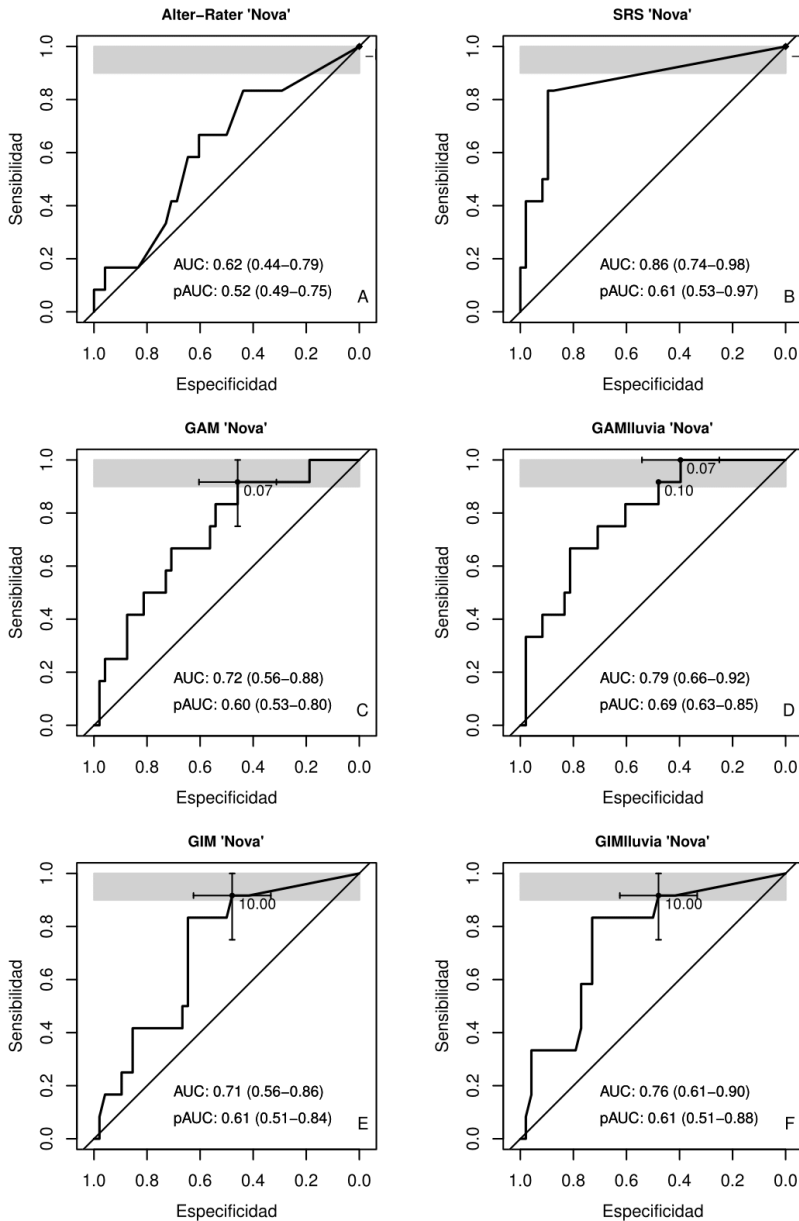


Figura 4.7: Curvas ROC obtenidas en la parcela de Chiva (n = 60) con exposiciones semanales de plantas trampa de 'Nova' para los modelos de mancha marrón evaluados: **A)** Alter-Rater; **B)** Modelo empírico simple (SRS); **C)** Modelo aditivo generalizado (GAM); **D)** Modelo aditivo generalizado modificado (GAM_{lluvia}); **E)** Modelo genérico de infección (GIM); **F)** Modelo genérico de infección modificado (GIM_{lluvia}). Clasificación binaria: presencia/ausencia de síntomas. En las gráficas, mediana e intervalo de confianza 95% del área total bajo la curva (AUC) y el área parcial (pAUC) en la región de sensibilidad 0,9-1 (área sombreada). Umbral de corte óptimo con valores asociados de sensibilidad y especificidad. Línea diagonal no discriminante.

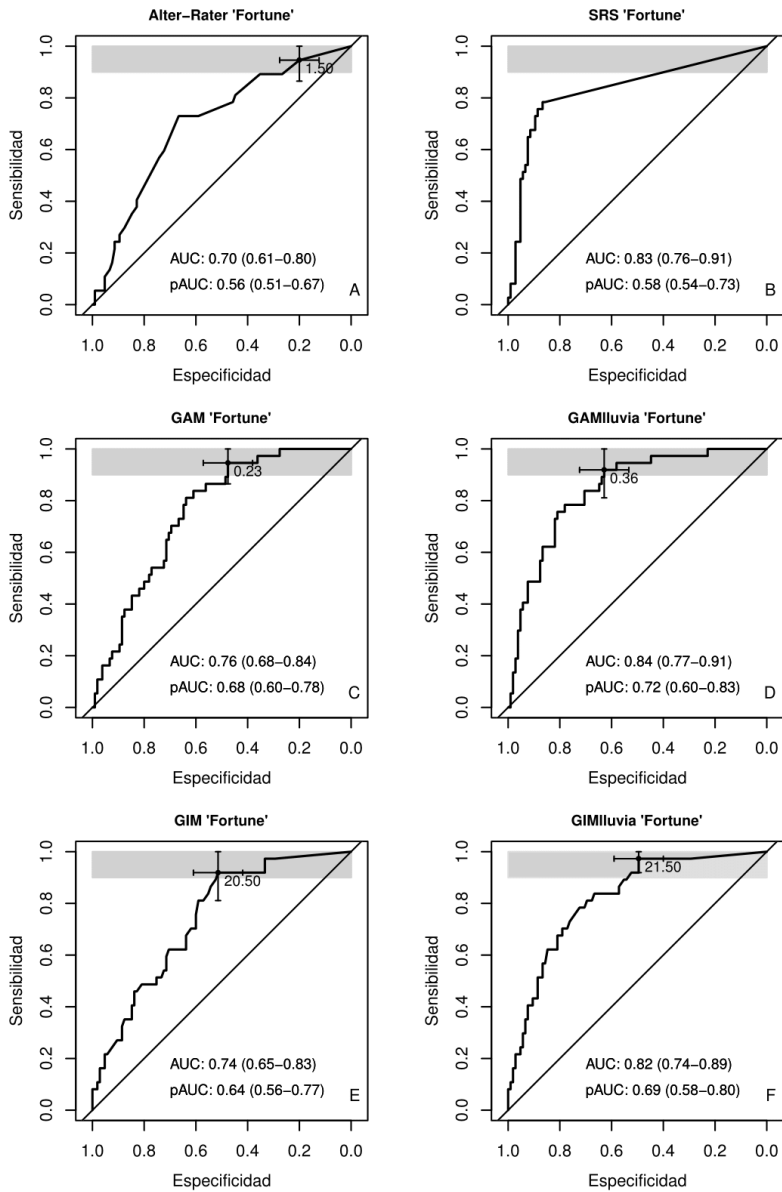


Figura 4.8: Curvas ROC obtenidas en la parcela de Moncada ($n = 142$) con exposiciones semanales de plantas trampa de 'Fortune' para los modelos de mancha marrón evaluados: **A)** Alter-Rater; **B)** Modelo empírico simple (SRS); **C)** Modelo aditivo generalizado (GAM); **D)** Modelo aditivo generalizado modificado (GAM_{lluvia}); **E)** Modelo genérico de infección (GIM); **F)** Modelo genérico de infección modificado (GIM_{lluvia}). Clasificación binaria: presencia/ausencia de síntomas. En las gráficas, mediana e intervalo de confianza 95% del área total bajo la curva (AUC) y el área parcial (pAUC) en la región de sensibilidad 0,9-1 (área sombreada). Umbral de corte óptimo con valores asociados de sensibilidad y especificidad. Línea diagonal no discriminante.

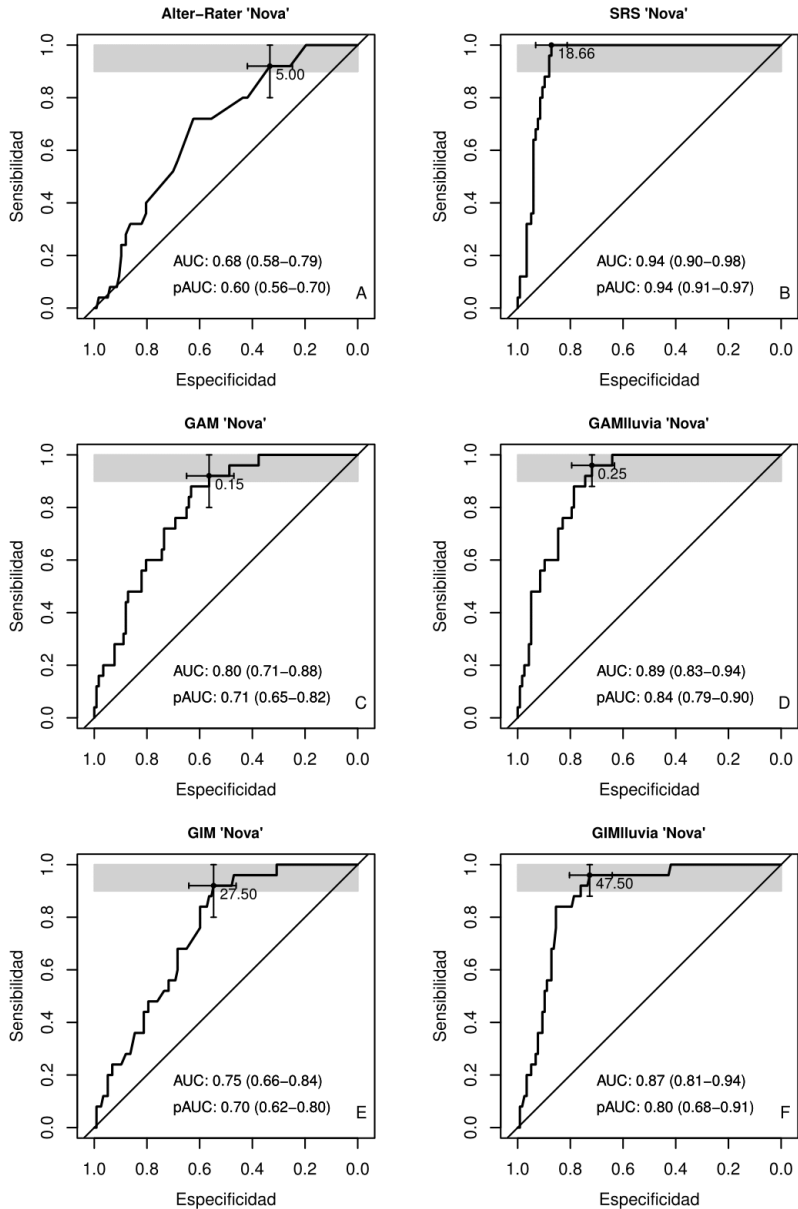


Figura 4.9: Curvas ROC obtenidas en la parcela de Moncada ($n = 142$) con exposiciones semanales de plantas trampa de ‘Nova’ para los modelos de mancha marrón evaluados: **A)** Alter-Rater; **B)** Modelo empírico simple (SRS); **C)** Modelo aditivo generalizado (GAM); **D)** Modelo aditivo generalizado modificado (GAM_{luvia}); **E)** Modelo genérico de infección (GIM); **F)** Modelo genérico de infección modificado (GIM_{luvia}). Clasificación binaria: presencia/ausencia de síntomas. En las gráficas, mediana e intervalo de confianza 95% del área total bajo la curva (AUC) y el área parcial (pAUC) en la región de sensibilidad 0,9-1 (área sombreada). Umbral de corte óptimo con valores asociados de sensibilidad y especificidad. Línea diagonal no discriminante.

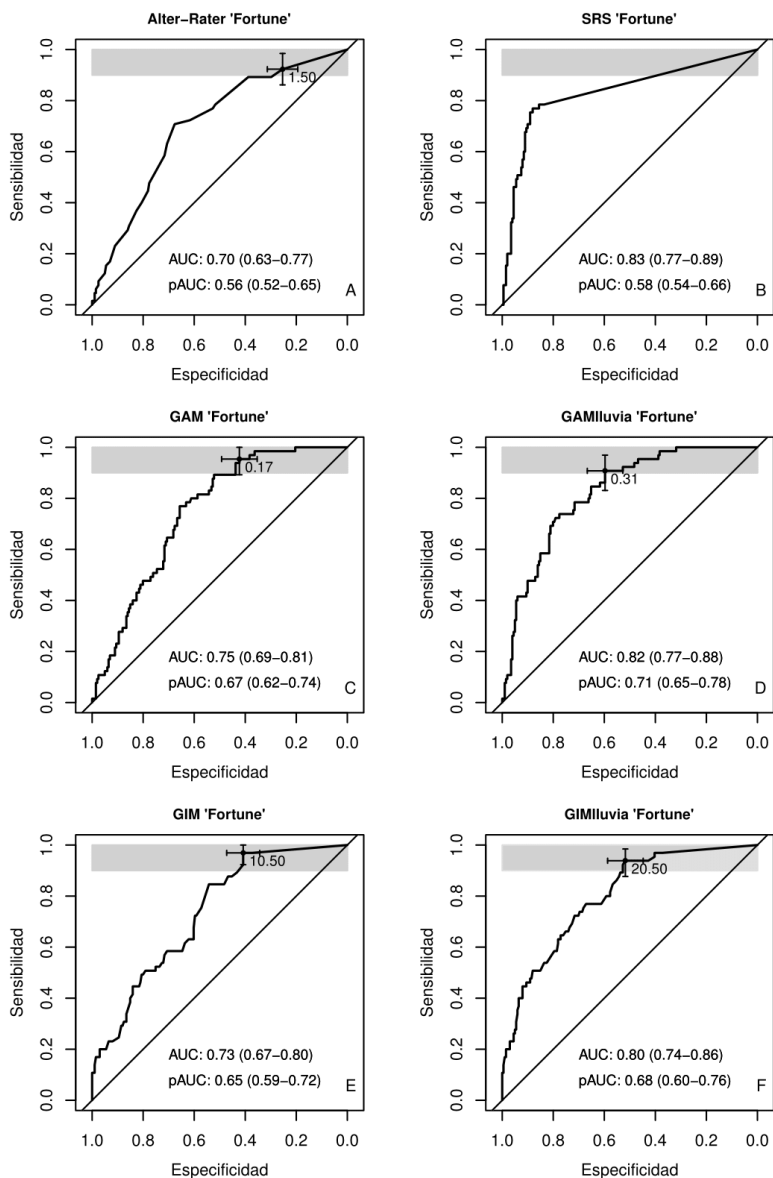


Figura 4.10: Curvas ROC obtenidas con los resultados conjuntos de las tres parcelas de estudio ($n = 266$) con exposiciones semanales de plantas trampa de 'Fortune' para los modelos de mancha marrón evaluados: **A)** Alter-Rater; **B)** Modelo empírico simple (SRS); **C)** Modelo aditivo generalizado (GAM); **D)** Modelo aditivo generalizado modificado (GAM_{lluvia}); **E)** Modelo genérico de infección (GIM); **F)** Modelo genérico de infección modificado (GIM_{lluvia}). Clasificación binaria: presencia/ausencia de síntomas. En las gráficas, mediana e intervalo de confianza 95% del área total bajo la curva (AUC) y el área parcial (pAUC) en la región de sensibilidad 0,9-1 (área sombreada). Umbral de corte óptimo con valores asociados de sensibilidad y especificidad. Línea diagonal no discriminante.

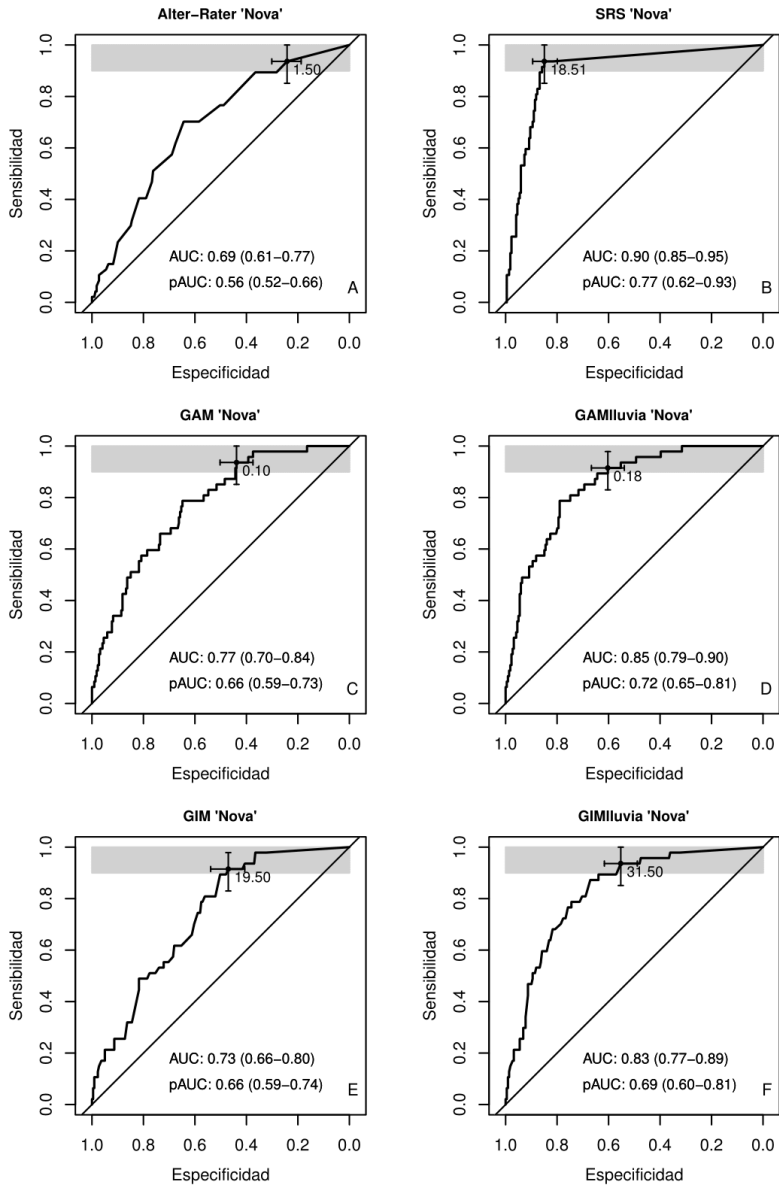


Figura 4.11: Curvas ROC obtenidas con los resultados conjuntos de las tres parcelas de estudio ($n = 266$) con exposiciones semanales de plantas trampa de 'Nova' para los modelos de mancha marrón evaluados: **A)** Alter-Rater; **B)** Modelo empírico simple (SRS); **C)** Modelo aditivo generalizado (GAM); **D)** Modelo aditivo generalizado modificado (GAM_{lluvia}); **E)** Modelo genérico de infección (GIM); **F)** Modelo genérico de infección modificado (GIM_{lluvia}). Clasificación binaria: presencia/ausencia de síntomas. En las gráficas, mediana e intervalo de confianza 95% del área total bajo la curva (AUC) y el área parcial (pAUC) en la región de sensibilidad 0,9-1 (área sombreada). Umbral de corte óptimo con valores asociados de sensibilidad y especificidad. Línea diagonal no discriminante.

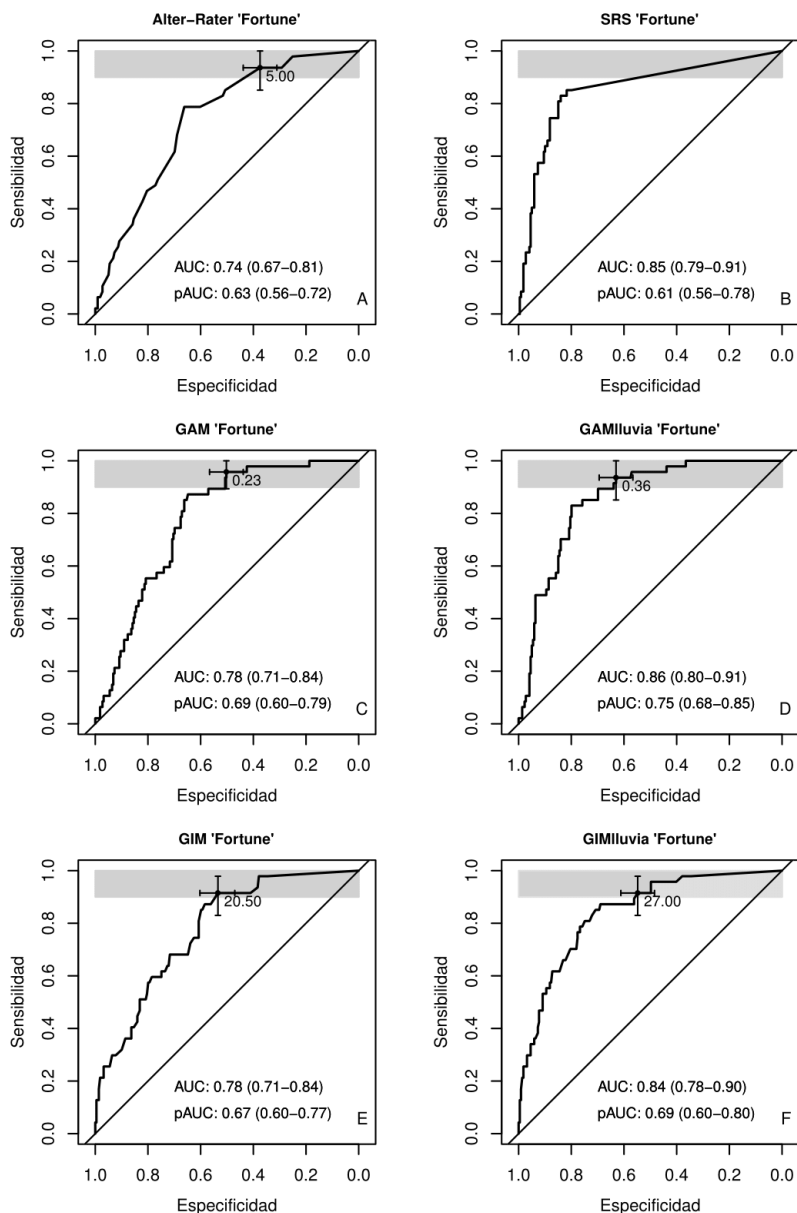


Figura 4.12: Curvas ROC obtenidas con los resultados conjuntos de las tres parcelas de estudio ($n = 266$) con exposiciones semanales de plantas trampa de 'Fortune' para los modelos de mancha marrón evaluados: **A)** Alter-Rater; **B)** Modelo empírico simple (SRS); **C)** Modelo aditivo generalizado (GAM); **D)** Modelo aditivo generalizado modificado (GAM_{lluvia}); **E)** Modelo genérico de infección (GIM); **F)** Modelo genérico de infección modificado (GIM_{lluvia}). Clasificación binaria: $>5\%$ de hojas sintomáticas. En las gráficas, mediana e intervalo de confianza 95% del área total bajo la curva (AUC) y el área parcial (pAUC) en la región de sensibilidad 0,9-1 (área sombreada). Umbral de corte óptimo con valores asociados de sensibilidad y especificidad. Línea diagonal no discriminante.

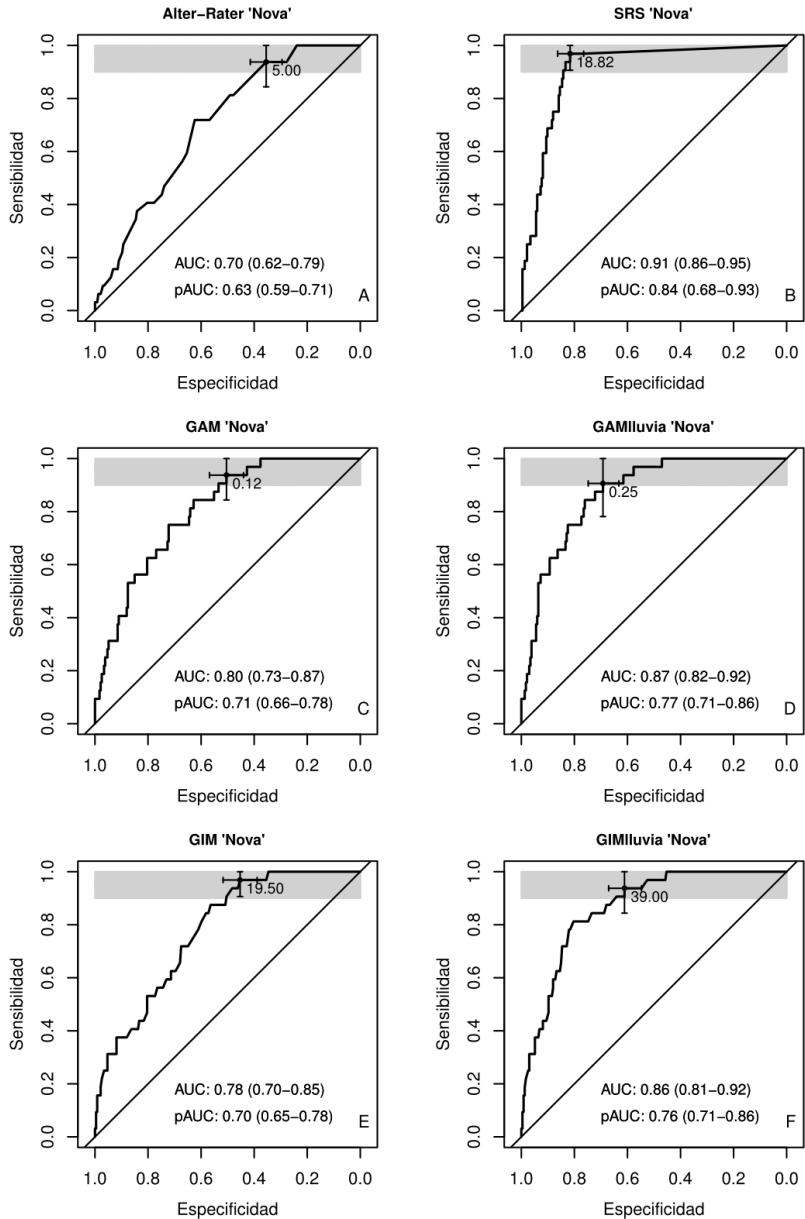


Figura 4.13: Curvas ROC obtenidas con los resultados conjuntos de las tres parcelas de estudio ($n = 266$) con exposiciones semanales de plantas trampa de 'Nova' para los modelos de mancha marrón evaluados: **A)** Alter-Rater; **B)** Modelo empírico simple (SRS); **C)** Modelo aditivo generalizado (GAM); **D)** Modelo aditivo generalizado modificado (GAM_{lluvia}); **E)** Modelo genérico de infección (GIM); **F)** Modelo genérico de infección modificado (GIM_{lluvia}). Clasificación binaria: >5% de hojas sintomáticas. En las gráficas, mediana e intervalo de confianza 95% del área total bajo la curva (AUC) y el área parcial (pAUC) en la región de sensibilidad 0,9-1 (área sombreada). Umbral de corte óptimo con valores asociados de sensibilidad y especificidad. Línea diagonal no discriminante.

4.4. DISCUSIÓN

Los efectos de la temperatura y la duración de HF sobre las infecciones causadas por los hongos fitopatógenos han sido ampliamente estudiados por numerosos autores. La mayoría de especies de *Alternaria* son capaces de germinar e infectar bajo un amplio rango de temperaturas, con un mínimo, máximo y óptimo variable (Rotem, 1994). En este estudio se ha demostrado que la temperatura y la duración de HF afectan de forma notable a la eficiencia infectiva del agente causal de la mancha marrón de las mandarinas. Los resultados experimentales en condiciones controladas muestran un amplio rango de temperaturas y duraciones de HF en las que el patógeno puede infectar las hojas de 'Fortune' y 'Nova'. Con temperaturas por debajo de 12°C fueron necesarias 38-48 horas de humectación para que se diera un desarrollo significativo de la enfermedad. Con temperaturas superiores a 27°C la eficiencia infectiva se redujo de forma progresiva y a partir de 32°C la incidencia de la enfermedad fue muy baja y a 35°C se detuvo por completo. Las temperaturas óptimas para la infección variaron de 20 y 25°C. Los mayores niveles de incidencia para los dos cultivares evaluados se observaron con duraciones de HF de 38 y 48 horas en todas las temperaturas ensayadas.

No se conocen datos de eficiencia infectiva en 'Fortune' y 'Nova', pero los resultados obtenidos son similares a los de otros estudios realizados en tangelo 'Minneola'. En Florida, Canihos *et al.* (1999) indicaron un rango de temperaturas óptimas para la infección de 23-27°C. Estos mismos autores encontraron bajos niveles de infección con duraciones de HF de 4 y 8 horas, que aumentaron exponencialmente al incrementar la duración de HF hasta 36 horas. En Israel, Solel y Kimchi (1998) señalaron un óptimo de infección de 22-25°C.

En nuestros estudios en condiciones de campo (apdo.3.2.3) la gran mayoría de las infecciones en plantas trampa se observaron en semanas con temperaturas medias entre 15 y 20°C. En cambio, los resultados de eficiencia infectiva indicados anteriormente sitúan el óptimo de infección por encima de las temperaturas a las que el patógeno infecta habitualmente en campo. Esta capacidad para desarrollarse bajo condiciones subóptimas de temperatura está relacionada con la flexibilidad característica de las especies de *Alternaria*, que pueden tolerar condiciones desfavorables y compensarlas con otros factores ambientales (Rotem, 1978; Aust *et al.*, 1980). El fenómeno de la compensación se ha citado en numerosos estudios

realizados con otras especies de *Alternaria*. La especie *A. solani*, fue capaz de causar infecciones en plantas de tomate y patata en el desierto de Negev (Israel) con temperaturas relativamente bajas. El desarrollo del patógeno se vio favorecido por la compensación de otros factores, como la mayor superficie de cultivo durante esa época del año junto con períodos prolongados de rocío nocturno de más de 12 horas (Rotem, 1965).

En condiciones de infección natural los períodos de humectación son, por lo general, más cortos que los que indican los estudios de infección controlada en laboratorio. La capacidad de aprovechar períodos de humectación interrumpidos es un mecanismo que poseen algunos hongos fitopatógenos que les permite desarrollarse epidémicamente en hábitats a priori poco favorables. Para una infección exitosa en estas situaciones es necesaria una germinación muy rápida o la concatenación de varios períodos de humectación interrumpidos. Algunas especies de *Alternaria* pueden superar estas condiciones aparentemente adversas encadenando varios períodos cortos de HF. La germinación de los conidios se iniciaría durante el primer período de HF y se detendría durante el subsecuente período seco. Los conidios mantendrían su viabilidad y reanudarían el proceso de infección durante el siguiente período de HF (Bashi y Rotem, 1974).

No todos los hongos fitopatógenos tienen la capacidad de sobrevivir a estas interrupciones de HF, pero muchas de las especies de *Alternaria* toleran estos períodos interrumpidos de HF (Prabhu y Prakash, 1973; Allen *et al.*, 1983; Strandberg, 1987). No obstante, algunas especies como *A. brassicae* y *A. brassicicola*, aunque sus conidios consiguen sobrevivir a los períodos interrumpidos de HF, la incidencia de la enfermedad es menor que en los correspondientes períodos de HF (Humpherson-Jones *et al.*, 1982).

La interrupción del período de humectación tuvo también un fuerte efecto sobre el patógeno de la mancha marrón. En el presente estudio la incidencia de la enfermedad no aumento después del período de humectación inicial de 12 horas. Bajo las mismas condiciones de temperatura y dosis de inóculo, la presencia de un período seco de una hora redujo la eficiencia infectiva del patógeno en ‘Nova’ y dos horas en ‘Fortune’. Este hecho tendría relación con la mayor susceptibilidad de ‘Fortune’, que favorecería la acción del patógeno durante el período seco. La influencia del grado de susceptibilidad de la variedad e incluso los diferentes órganos de la planta en la duración de HF necesaria para la infección se ha descrito

también en otras especies de *Alternaria* (Sawamura, 1972; Bashi *et al.*, 1983; Rotem, 1994).

La interrupción de 4-24 h tuvo poco efecto sobre la gravedad de la mancha púrpura de la hoja de cebolla provocado por *A. porri* (Suheri y Price, 2000). Por otro lado, el período interrumpido de 12 horas redujo la incidencia y la severidad por damping-off en los cotiledones de lino causadas por *A. linicola* JW Groves y Skolko (Vloutoglou *et al.*, 1999). En el caso de *A. brassicae* los períodos interrumpidos de 3-12 horas también redujeron la severidad de la enfermedad en las vainas de colza oleaginosa (Mridha y Wheeler, 1993). Según la clasificación de Magarey *et al.* (2005a), el patógeno de la mancha marrón puede ser considerado sensible a los períodos de humectación interrumpidos mientras que las tres especies de *Alternarias* indicadas anteriormente encaja en el grupo de sensibilidad moderado. Además de las diferencias en la tolerancia entre especies, algunas cuestiones metodológicas clave deben ser consideradas en la interpretación de estos resultados. En los estudios realizados con otras especies de *Alternaria* no se indica los valores de HR durante los períodos secos (Mridha y Wheeler, 1993; Suheri y Price, 2000; Vicent *et al.*, 2004). En nuestro caso la HR se fijó a 65%, un nivel relativo bajo similar a los valores encontrados en condiciones de campo (apdo. 3.3.3). En el caso de *S. vesicarium*, un patógeno similar al de la mancha marrón el proceso de infección en las plantas de pera fue detenido de forma irreversible durante los períodos secos con 60% de HR, pero continuó a 96% de HR (Llorente y Montesinos, 2002). Incidencias superiores a 0,9 se han reportado en otros estudios con *Alternaria* spp. (Mridha y Wheeler, 1993; Suheri y Price, 2000; Vicent *et al.*, 2004), mientras que en nuestro estudio la incidencia máxima de la enfermedad fue de 0,2, similar al promedio registrado en las plantas trampa expuestas en las parcelas afectadas (Bassimba *et al.*, 2014).

La temperatura posteriores a infección tuvo también un efecto significativo en el periodo de incubación del patógeno en ambos cultivares evaluados. Sin embargo, la máxima expresión de los síntomas se observó antes de 30 horas en ‘Fortuna’ y alrededor de 60 horas en ‘Nova’. El período de incubación más corto hasta la primera aparición de síntomas se observó en ‘Fortune’ a las 17 horas y en ‘Nova’ a las 28 horas. Estos resultados eran en cierta forma previsibles, ya que la variedad ‘Fortune’ es mucho más susceptible a la mancha marrón. Coinciden también con estudios anteriores que señalan como una de las principales

características de la enfermedad su corto período de incubación, con la aparición de las necrosis en los tejidos a las 16-36 horas de la infección (Pegg, 1966; Canihos *et al.*, 1999). Al contrario de lo que ocurre con otros hongos fitopatógenos de penetración más lenta, las especies de *Alternaria* suelen penetrar de forma muy rápida en los tejidos de sus hospedantes. En el caso del agente causal de la mancha marrón, la penetración es todavía más rápida debido a la acción de la toxina que emite durante el proceso de infección. Este corto período de incubación es una característica conocida del agente causal de la mancha marrón y otras especies de *A. alternata* productoras de toxina específicas al huésped. El daño a las células huésped causadas por estas toxinas es extremadamente rápido y el tiempo requerido para la muerte celular es muy corto (Timmer *et al.*, 2003). En general, los conidios de *Alternaria* inician la germinación en tan solo 1-3 horas, aunque la penetración mediante sus tubos germinativos puede llevar algo más de tiempo. Por ejemplo, *A. solani* penetra en el tejido de patata en 4-6 horas aunque sin manifestar síntomas visibles en las células infectadas (Rotem, 1994).

El efecto de la temperatura en la duración del período de incubación ha sido demostrado en otros hongos fitopatógenos. Chongo y Bernier (2000) observaron períodos de incubación más largos en cultivares de lenteja afectados por *Colletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus & W. D. Moore con temperaturas de 16°C respecto a 20-24°C. De igual modo, Copes y Thomson (2008) obtuvieron períodos de incubación entre 60-76 días a 5°C y de 15-25 días a 15-25°C en plantas de camelia afectadas por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. Por su parte, Rossi *et al.* (2006) obtuvieron períodos de incubación de 20-30 días a 8-14°C y de 12-19 días a 16-20°C en brotes de melocotonero afectados por *Taphrina deformans* (Berk.) Tul. Trapero-Casas y Kaiser (1992) redujeron el tiempo de incubación de la rabia de garbanzo causada por *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr., unos 5-7 días al pasar de 5-15°C a 20-30°C.

El período de incubación es una de las etapas biológicas consideradas por los modelos de riesgos de enfermedades y, a menudo se modela como una función de la temperatura (De Wolf y Isard, 2007). Sin embargo, en nuestro caso, la máxima expresión de síntomas en ambos cultivares con cualquiera de las temperaturas ensayadas fue inferior a tres días, lo que supone un período de tiempo notablemente inferior a los intervalos semanales empleados en la exposición de plantas trampa para la evaluación de los modelos. Debido a su corta duración,

podemos considerar que la fase de incubación posterior a la infección no tendría un papel clave en el desarrollo de los modelos de predicción de la mancha marrón. Algunos modelos de predicción consideran también otros factores del desarrollo de la enfermedad como la cantidad y disponibilidad de inóculo, la reproducción, diseminación y supervivencia (De Wolf *et al.*, 2007). Como se ha indicado en el capítulo 3, en el caso de la mancha marrón de las mandarinas la presencia del inóculo es prácticamente continua durante todo el ciclo de cultivo. Por lo tanto, los modelos de predicción evaluados en este estudio se han centrado en la fase de infección.

A diferencia de otros métodos estadísticos, una de las ventajas del análisis de curvas ROC es que permite valorar el comportamiento del modelo en todos sus posibles puntos de corte. La posibilidad de analizar simultáneamente la respuesta del modelo con diferentes umbrales operativos proporciona información muy útil sobre los dos tipos de errores, falsos positivos y falsos negativos. A nivel práctico, en los modelos de predicción de enfermedades de plantas suelen establecerse clasificaciones binarias basadas en diferentes umbrales de incidencia o severidad (Twengström *et al.*, 1998; Fabre *et al.*, 2003; Makowski *et al.*, 2005; Turechek y Wilcox, 2005; Duttweiler y Gleason, 2008; Nita *et al.*, 2008; Gent y Ocamb, 2009; Bondalapati *et al.*, 2012), (Tabla 4.5). Debido a los exigentes criterios de calidad de los mercados de exportación, los frutos de mandarina deben estar prácticamente exentos de lesiones de mancha marrón (OECD, 2010). Por esta razón se consideró más apropiado utilizar una clasificación binaria de tipo presencia/ausencia de síntomas. No obstante, cuando se consideró un umbral menos restrictivo, del 5% de hojas afectadas, el comportamiento de los modelos no mejoró sustancialmente (Tabla 4.4)

La importancia de la selección de umbrales de incidencia o severidad aceptables tiene relación directa con las bases de la gestión integrada de enfermedades y el concepto de umbral económico (Zadoks, 1985). Este aspecto ya fue planteado formalmente en contexto del análisis de modelos de enfermedades mediante curvas ROC (Hughes *et al.*, 1999; Yuen y Hughes 2002; Yuen, 2003; Madden, 2006). No obstante, en algunas enfermedades es muy difícil determinar cuáles son los umbrales económicos y los niveles ‘aceptables’ de pérdidas económicas. En su artículo de revisión sobre los modelos de predicción de enfermedades, Shtienberg (2013) enfatizó la influencia crítica de otros factores

relacionados con la tipología del sistema de producción y las características del patosistema, que en muchos casos no son fácilmente cuantificables y dependen de aspectos socioeconómicos a nivel regional.

En las parcelas de Alzira y Chiva el comportamiento de los modelos fue muy similar, obteniéndose los valores más altos de AUC con el modelo SRS y los de $pAUC_{1-0,9se}$ con el modelo GAM_{lluvia} . En la parcela de Moncada el AUC fue mayor con el modelo GAM_{lluvia} en 'Fortune' y con SRS en 'Nova'. Estas diferencias podrían estar relacionadas con el hecho de que las parcelas de Alzira y Chiva son de producción comercial, y el nivel de inóculo sería menor debido a la aplicación de tratamientos fungicidas. También podría influir el hecho de que en la parcela de Moncada se ha analizado una serie de datos más larga. No obstante, en el análisis conjunto de las tres parcelas con la clasificación binaria presencia/ausencia de síntomas se obtuvo el AUC más alto con el modelo SRS, alcanzando valores de 0,89 en 'Fortune' y 0,95 en 'Nova'. En cambio, los valores más altos de $pAUC$ fueron de 0,78 en 'Fortune' con el modelo GAM_{lluvia} y 0,93 con el SRS en 'Nova'. Estos valores son similares a los obtenidos con otros modelos de predicción de enfermedades evaluados en varios cultivos (Tabla 4.5).

A pesar de que 'Fortune' presentó un AUC relativamente alto, el modelo SRS no se ha considerado adecuado para este cultivar ya que todos sus puntos de corte estaban por debajo del nivel de sensibilidad prefijado de 0,9. En este tipo de situaciones se considera más adecuada una selección de modelos basada en el $pAUC_{1-0,9se}$, que considera únicamente la región de máxima sensibilidad de la curva ROC. La evaluación y comparación de modelos mediante $pAUC$ se ha utilizado en diferentes áreas de ciencias de la salud y biotecnología (Baker y Pinsky, 2001; Beam *et al.*, 2003; Wolski *et al.*, 2005). En la mayoría de estos estudios el $pAUC$ se calculó a partir de valores de especificidad de 0,9-1 (ratio de falsos positivos $< 0,1$), ya que eran situaciones clínicas donde el tratamiento a aplicar era muy agresivo y con un alto riesgo para el paciente, por lo que los falsos positivos no eran admisibles. En nuestro caso es justo lo contrario, ya que un falso positivo implica la realización de un tratamiento innecesario, pero una infección no detectada debida a un falso negativo puede suponer la pérdida completa de la cosecha. Por lo tanto, se consideró más adecuado centrar la selección de los modelos en el área de máxima sensibilidad.

El análisis del pAUC ha permitido seleccionar el SRS como el modelo más adecuado para el cultivar ‘Nova’, al presentar los valores más altos de pAUC en la región de alta sensibilidad de interés (0,9-1). La sensibilidad del modelo SRS con el punto de corte óptimo en ‘Nova’ fue de 0,93, con una especificidad de 0,84. Estos valores son en general superiores a los indicados para varios modelos de predicción de enfermedades de plantas (Tabla 4.5). En el caso de ‘Fortune’, debido a su elevada susceptibilidad a la enfermedad, ninguno de los modelos evaluados fue adecuado. Aunque algunos modelos presentaron valores de sensibilidad superiores a 0,9 su especificidad fue muy baja. Dewdney *et al.* (2007) obtuvieron resultados similares cuando evaluaron varios modelos para el fuego bacteriano causada por *Erwinia amylovora* (Burr.) en manzano y peral, ya que su comportamiento fue también peor en los cultivares más susceptibles.

Cuando se evaluó el grado de concordancia del modelo SRS operando con su punto de corte óptimo respecto a las observaciones de la enfermedad (>0% de hojas sintomáticas) se obtuvo un índice kappa de 0,63 en ‘Nova’, lo que indica una buena concordancia. Con el umbral de incidencia menos restrictivo (>5% de hojas sintomáticas), se obtuvo un grado de concordancia moderado con un valor del índice kappa de 0,50 (Cohen, 1968; Landis y Koch, 1977) (Tabla 4.4). Los modelos Alter-Rater, GAM y GAM_{lluvia} mostraron un grado de concordancia bajo en los dos cultivares evaluados, mientras que los modelos GIM y GIM_{lluvia} no mostraron concordancia en ninguno de los casos.

Los modelos basados únicamente en temperatura y HF presentaron por lo general una baja capacidad de predicción, que mejoró al incorporar el efecto de la lluvia. Estos resultados coinciden con los de otros autores que indican la importancia de la lluvia en la incidencia de la mancha marrón. Timmer *et al.* (1998) demostraron en estudios realizados en condiciones controladas que la lluvia permite una mayor liberación de conidios. En estudios de campo, Timmer *et al.* (2000) asociaron una mayor severidad de la mancha marrón a eventos de lluvia. La lluvia prolonga la duración de los períodos de HF y favorece la liberación y dispersión de los conidios de *Alternaria*, lo que se traduciría en una mayor eficiencia infectiva del patógeno respecto a las condiciones de rocío.

El modelo Alter-Rater fue desarrollado en Florida y validado en ese estado y también en Brasil (Bhatia *et al.*, 2003; Peres y Timmer, 2006). En nuestro estudio este modelo no ha presentado una buena capacidad predictiva, debido

probablemente a las diferencias climáticas existentes entre Florida y las zonas semi-áridas del Mediterráneo. En las condiciones de nuestro estudio, la mayor parte de las infecciones se dieron con temperaturas de 15-20°C y >2,5 mm de lluvia. Estas condiciones tienen una puntuación muy baja en el modelo Alter-Rater, lo que afecta negativamente a su capacidad de predicción en las regiones Mediterráneas. El Alter-Rater podría mejorarse para su uso en condiciones semi-áridas ajustando las puntuaciones asignadas a los diferentes umbrales de lluvias y temperaturas.

Las plantaciones de 'Fortune' en las zonas citrícolas españolas han sido reemplazadas casi en su totalidad debido a su alta susceptibilidad a la mancha marrón. Como ya se ha comentado, ninguno de los modelos evaluados fue adecuado para predecir las infecciones en este cultivar, debido principalmente a la elevada proporción de falsos positivos. En cualquier caso, consideramos que el uso de modelos este tipo de variedades tan susceptibles no tiene mucho interés. La experiencia de estos años ha demostrado la enorme dificultad para controlar la enfermedad, incluso con calendarios de tratamientos fungicidas intensivos. En el caso de mandarina 'Nova', menos susceptible a la enfermedad y todavía ampliamente cultivada en España, el modelo SRS permitió predecir los períodos semanales de infección con tan solo un 7% de falsos negativos y 16% de falsos positivos. En las plantaciones de mandarina 'Nova' se realizan de forma habitual varias aplicaciones fungicidas al año. La eficacia de estos tratamientos es muy variable, ya que en algunos casos se realizan coincidiendo con los períodos de infección pero en otros no. El modelo SRS permitirá optimizar la eficiencia de las actuales estrategias de control de la mancha marrón en 'Nova', ajustando las aplicaciones para cubrir los momentos de infección y evitando los tratamientos innecesarios. Este modelo se ha integrado como un sistema de estación de avisos en la web del IVIA <http://gipcitricos.ivia.es/avisos-alternaria>, que incluye también una aplicación app para móviles. El sistema permite obtener de forma gratuita predicciones en tiempo real de riesgo de infección para toda la red de estaciones agroclimáticas de la Comunitat Valenciana.

Tabla 4.6: Algunos modelos de enfermedades de plantas evaluados mediante análisis de curvas ROC.

| Cultivo | Enfermedad (patógeno) | Umbral de enfermedad | Modelos | AUC ¹ | Sensibilidad | Especificidad | Referencias |
|-----------------|---|---|---|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------------------|
| Cebada | BYDV (<i>Barley yellow dwarf virus</i>) | Dinámica del pulgón (<i>Rhopalosiphum padi</i>) | Regresión logística | 0,91 | 0,99 | 0,96 | Fabre <i>et al.</i> (2003) |
| Cebada | Fusariosis de la espiga (<i>Gibberella zeae</i>) | Niveles de deoxynivalenol en las espigas | Regresión logística | 0,88 0,89 | 0,82 100 | 0,75 0,33 | Bondalapati <i>et al.</i> (2012) |
| Colza | Podrición del tallo (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>) | ≤0,25 (incidencia) >0,25 (incidencia) | Regresión logística | - | 0,75 | 0,16 | Twengström <i>et al.</i> (1998) |
| Colza | Podrición del tallo (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>) | 0,20 (incidencia) | Indicadores de riesgo | 0,85 | 0,92 | 0,7 | Makowski <i>et al.</i> (2005) |
| Lúpulo | Mildiu (<i>Pseudoperonospora humuli</i>) | 0,49 (incidencia) 0,39 (incidencia) | 24-h 48-h | 0,88 0,86 | 0,83 0,88 | 0,89 0,84 | Gent y Ocamb (2009) |
| Manzano | Moteado (<i>Venturia inaequalis</i>) | 0,7 (incidencia) | Regresión logística | 0,95 | 0,75 | 0,03 | Turechek y Wilcox (2005) |
| Manzano y Peral | Fuego bacteriano (<i>Erwinia amylovora</i>) | Presencia/ ausencia (incidencia) | Maryblyt Cougablight Cougablight-rain | 0,67 0,69 0,66 | 0,73 0,61 0,51 | 0,40 0,34 0,18 | Dewdney <i>et al.</i> (2007) |
| Manzano | 'Sooty blotch / Flyspeck' (<i>Gloeodes pomigena</i> y <i>Leptothyrium pomi</i>) | Presencia/ ausencia (incidencia) | HR ≥ 97% LWD | 0,92 0,93 | 0,82 0,81 | 0,18 0,24 | Dutweiler y Gleason (2008) |
| Vid | Excortiosis (<i>Plasmopsis viticola</i>) | 0,20 (incidencia) 0,40 (incidencia) | Regresión logística | 0,91 0,85 | 0,97 0,91 | 0,88 0,65 | Nita <i>et al.</i> (2008) |

¹ Área bajo la curva ROC obtenida con los modelos evaluados en cada estudio.

Capítulo 5

Capítulo 5

DURACIÓN DE LA HUMECTACIÓN FOLIAR EN CÍTRICOS

5.1. ANTECEDENTES

La duración de la humectación foliar (HF) es una de las variables más habituales en los modelos de enfermedades de plantas causadas por patógenos fúngicos (Huber y Gillespie, 1992; Gleason *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2002). La duración de HF es el período de tiempo durante el cual el agua libre está presente en la superficie exterior de las hojas (Klemm *et al.*, 2002), y puede estar causada por el rocío, la lluvia, la niebla o el riego. La HF y la temperatura del aire son dos de las variables micro-meteorológicas más importantes que influyen en la interacción de los patógenos fúngicos con las plantas (Agrios, 2005; Gillespie y Sentelhas, 2008). La importancia de la HF como variable predictora en las epidemias de enfermedades de las plantas causadas por hongos está directamente relacionada con su influencia sobre los procesos de infección, reproducción y diseminación de estos patógenos (Bregaglio *et al.*, 2011). La duración de HF es un parámetro micro-meteorológico que determina en gran medida la incidencia y severidad de la mancha marrón de las mandarinas (Canihos *et al.*, 1999; Timmer *et al.*, 2000).

La mayoría de modelos de predicción de enfermedades causadas por hongos de la parte aérea necesitan datos de duración de HF (Madden y Ellis, 1988; Huber y Gillespie, 1992; De Wolf e Isard, 2007). A pesar de su importancia y los numerosos estudios realizados para estimar su duración sobre diferentes cultivos, la HF se considera todavía un parámetro micro-meteorológico no estandarizado y no existe ningún sistema armonizado a nivel internacional para su medición (Magarey, 1999). Existen algunos datos sobre la duración y la distribución de la HF en cítricos en Florida (Santillán *et al.*, 2010), pero debido a las diferencias climáticas y agronómicas entre esta zona de clima húmedo subtropical y las

regiones semi-áridas del Mediterráneo, la información aportada por estos estudios no puede extrapolarse directamente a las zonas cítricas españolas.

Las observaciones visuales de HF se realizan habitualmente por la noche y requieren de una elevada dedicación de personal, por lo que no suelen utilizarse en la práctica. En el mercado existen diferentes tipos de sensores de HF, pero su precisión es muy variable y requieren de calibraciones frecuentes (Sutton *et al.*, 1984; Huber y Gillespie, 1992; Lau *et al.*, 2000). En el caso concreto de los sensores más habituales de tipo resistencia eléctrica, su precisión y vida útil se ven reducidas notablemente por la aplicación de determinados productos fitosanitarios, lo que obliga a sustituirlos periódicamente. Los sensores de HF suelen utilizarse en trabajos de investigación, pero son poco habituales en estaciones agrometeorológicas convencionales.

Los modelos de simulación suponen una alternativa a las mediciones directas de HF (Huber y Gillespie, 1992; Kabela *et al.*, 2009). Los dos métodos más habituales para estimar la HF son los modelos basados en procesos físicos (Pedro y Gillespie, 1982; Bass *et al.*, 1991; Anderson *et al.*, 2000; Luo y Goudriaan, 1999, 2000; Madeira *et al.*, 2002; Magarey *et al.*, 2006a; Sentelhas *et al.*, 2006) y los de tipo empírico (Gleason *et al.*, 1994; Rao *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2002). Los modelos basados en procesos físicos utilizan ecuaciones de balance de energía. En general son bastante precisos y pueden extrapolarse a diferentes zonas climáticas, pero requieren de datos como la radiación solar, poco habituales en las estaciones agrometeorológicas (Magarey *et al.*, 2006a; Sentelhas *et al.*, 2006). Los modelos de tipo empírico calculan la duración de HF en función de otras variables meteorológicas como la HR. Gracias a su sencillez, estos modelos pueden aplicarse con los parámetros agrometeorológicos habituales, pero necesitan de una calibración y evaluación previa a escala regional (Huber y Gillespie, 1992; Kim *et al.*, 2005; Duttweiler *et al.*, 2008; Sentelhas *et al.*, 2008). Debido a la influencia de la arquitectura de la planta y las propiedades termodinámicas propias de cada tipo de hoja, los dos tipos de modelos tienen que calibrarse específicamente para cada cultivo (Gleason *et al.*, 1994; Luo y Goudriaan, 2000; Kim *et al.*, 2002).

Muchos estudios inciden en la importancia del rocío en los ecosistemas áridos y semiáridos (Jacobs *et al.*, 1990; Penrose y Nicol, 1996; Agam y Berliner, 2006). En las zonas semi-áridas con precipitaciones poco frecuentes, la proporción de períodos de HF asociados a las lluvias es menor que los asociados con el rocío,

por lo que se asume que la frecuencia y duración de los rocíos es de gran importancia en el desarrollo de los patógenos en estas áreas. De hecho, el rocío está considerado como el principal factor de HF en muchas zonas de cultivo (Luo y Goudriaan, 2000). La HF asociada al rocío se forma normalmente durante la noche, cuando la superficie de las hojas y los frutos se enfría y provoca la condensación de la humedad ambiental circundante (Monteith, 1957).

Palti y Rotem (1973) señalaron que el rocío, el riego y la densidad foliar son los principales factores que determinan la severidad de la mayoría de las enfermedades fúngicas de las plantas cultivadas en clima semiárido. Respecto al riego, se ha señalado que algunos sistemas de riego pueden favorecer las enfermedades producidas por algunos patógenos foliares (Menzies, 1967; Lomas, 1991; Michailides y Morgan, 1992; Scherm y Bruggen, 1995; Vloutoglou y Kalogerakis, 2000; Kamel *et al.*, 2008; Olanya *et al.*, 2009). Algunos de estos estudios indican que determinados tipos de riego pueden aumentar el riesgo de infección y favorecer también la esporulación y diseminación del inóculo. El riego por aspersion sobre la copa de árboles puede prolongar la duración de los períodos de humectación en las parcelas. De hecho, para el control de la mancha marrón se recomienda la eliminación de esta práctica (Timmer *et al.*, 1998; Canihos *et al.*, 1999; Timmer *et al.*, 2000, 2003).

En general, el sistema de riego puede influir en la modificación de las condiciones micro-climáticas en la parte aérea de los cultivos, debido a que puede aumentar la HR y contribuye a una mayor duración de HF (Rotem y Palti, 1969; Lomas, 1991). El efecto del riego sobre la humedad ambiental de la parcela depende de su frecuencia, pero también de la proporción de suelo mojado. El riego a manta, especialmente cuando se emplea en suelos pesados con mal drenaje, puede dar lugar a una HR más elevada en los días siguientes al riego, incrementando la duración de HF y la severidad de algunas enfermedades fúngicas (Goldhamer *et al.*, 2002). En las parcelas de cítricos en España se aplican riegos en grandes volúmenes y baja frecuencia (riego a manta) o pequeños volúmenes y alta frecuencia (riego localizado). Debido a que con el sistema de riego a manta el agua se distribuye superficialmente sobre el terreno inundándolo total o parcialmente, podría dar lugar a una alta HR y mayor duración de HF en las parcelas de cítricos, aunque este aspecto no ha sido confirmado experimentalmente.

La gestión integrada de la mancha marrón de las mandarinas en España podría optimizarse con un mayor conocimiento sobre la distribución de la HF en la copa de los árboles, su duración bajo diferentes sistemas de riego y el desarrollo y evaluación de modelos para su estimación sin necesidad de sensores de humectación.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Observaciones visuales de humectación foliar

El estudio se realizó en la parcela experimental 41 del IVIA, en Moncada (Valencia) de tanger 'Ortanique' (*C. reticulata* x *C. sinensis*) injertado sobre citrange Carrizo. Los árboles se plantaron en el año 2005 con un marco de 5 x 3 m y las filas con orientación norte-sur. La copa de los árboles tenía un perímetro aproximado de 6,5 m, con una altura de copa de 0,5 m sobre la superficie del suelo en su parte inferior y 2,5 m en su parte superior. La parcela se regaba mediante riego localizado con cuatro goteros por árbol de 1 L/hora cada uno. El área de suelo mojado por los goteros se fotografió con una cámara digital a 300 ppi (Coolpix 4500, Nikon Corporation, Japón) junto a una escala métrica y se cuantificó con el software APS Assess (The American Phytopathological Society, USA), obteniendo un promedio del 11% de área de suelo mojado. En la parcela no se realizaba laboreo y se mantenía el suelo desnudo con la aplicación de herbicidas para el control de malas hierbas (roundup y paraquat 2 L/ha)

Las observaciones visuales de la HF se llevaron a cabo durante un total de nueve días: 22/12/11, 25/01/12, 14/04/12, 03/10/12, 12/12/12, 17/04/13, 18/04/13, 22/04/13 y 27/05/13. Los días para las observaciones de humectación en hojas debida al rocío se seleccionaron en función de los siguientes criterios: días sin nubes, viento en calma, con HR por encima del 75% y oscilación térmica de al menos 6-9°C (AEMET, 2013).

La presencia de HF se cuantificó con una escala porcentual: 0%, 25%, 50%, 75% y 100% del area foliar mojada (Fig. 5.1). Las observaciones las efectuó siempre el mismo observador, que realizó un entrenamiento previo con ayuda de tiras de papel hidrosensible (Syngenta AG, Basilea, Suiza). Para las observaciones

nocturnas se utilizó una linterna frontal (Geonaute, On Night 50, Francia). Se evaluó la presencia de HF en las dos caras de la hoja, haz y envés. Las observaciones se realizaron en los dos lados de la copa del árbol en las entrefila (este y oeste) y en tres alturas de copa (1 m, 1,5 m y 2 m). En cada punto de observación se evaluaron, 10 hojas elegidas al azar entre las más próximas a los sensores de HF (apdo. 5.2.2). Se realizó una observación cuidadosa cogiendo la hoja por el peciolo y cuantificando el porcentaje de HF con la escala descrita anteriormente. Las observaciones visuales de HF se realizaron cada 15 minutos (Magarey *et al.*, 2005b) a partir de las 17:00 horas hasta la deposición completa del rocío durante la noche, y antes el amanecer del día siguiente hasta el secado completo de rocío.

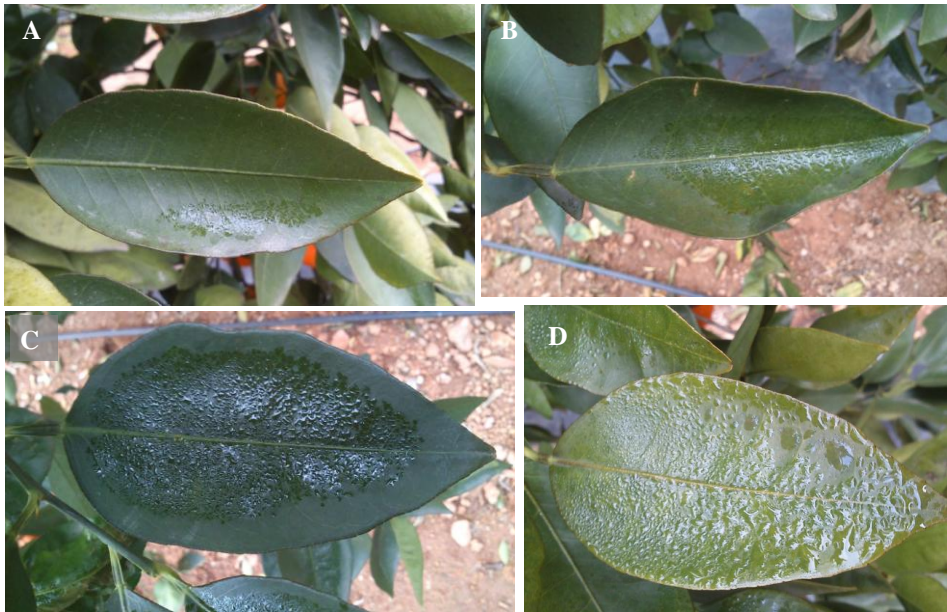


Figura 5.1: Diferentes grados de humectación foliar como consecuencia del rocío sobre hojas de cítricos: A) 25%, B) 50%, C) 75% y D) 100%.

Se calculó el promedio de la superficie de la hoja mojada para cada período de observación de 15 min en cada una de las seis posiciones de la copa y ambas caras de la hoja. Los porcentajes promedio del área mojada se convirtieron en valores binarios (0 = hoja seca, 1 = hoja mojada) considerando un umbral de \geq

10% del promedio de la superficie de hoja mojada para cada punto y período de observación según el criterio de Dalla-Marta y Orlandini (2010). Se calculó la duración de HF desde las 12:00 horas hasta las 12:00 horas del día siguiente. Los datos de duración de HF se analizaron descriptivamente y se aplicó la prueba *t* de Student para detectar diferencias estadísticas entre posiciones de la copa y lados de la hoja con el programa v.3.0.2 R (R-Core-Team, 2013).

5.2.2. Sensores de humectación foliar

Los sensores de HF se fijaron sobre un mástil formando un ángulo de 30° sobre la horizontal en las mismas posiciones de la copa donde se realizaron las observaciones visuales. Los sensores Spectrum 3666 (Spectrum Technologies, Inc. EE.UU.) con un rango de registro de 0-15 se colocaron en las seis posiciones de la copa indicadas anteriormente. Estos sensores se conectaron a un registrador de datos WatchDog 450 (Spectrum Technologies, Inc. EE.UU.). Los sensores de HF Hobo S-LWA con un rango de registro de 0-100 y una resolución de 0,59% se colocaron en ambos lados del árbol pero únicamente a 1,5 m de altura y se conectaron a un registrador Hobo U30 (Onset Computer Corp. EE.UU.). En esas mismas posiciones de copa se instalaron sensores de temperatura y HR Hobo S-THB (precisión $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$, $\pm 2,5\%$). Por último, se dispuso también un anemómetro S-WDA-M003 (Onset Computer Corp. EE.UU.) y una veleta de dirección del viento S-WDA-M003 (Onset Computer Corp. EE.UU.) a 3 m de altura (Fig. 5.2).

Antes de iniciar el estudio, los sensores de humectación Spectrum y Hobo se calibraron en condiciones de campo, instalándolos horizontalmente en un mástil a 1,50 m de altura con una separación entre ellos de 5 cm. Los sensores se mantuvieron en funcionamiento durante 30 días. Se obtuvo un coeficiente de variación (CV) promedio durante este período de 10,18% para los sensores Spectrum y 11,18% para los sensores Hobo (Sentelhas *et al.*, 2004). Siguiendo las indicaciones de los fabricantes, no se aplicó ningún tipo de imprimación ni recubrimiento sobre los sensores. Todas las variables meteorológicas se registraron a intervalos de 15 minutos, desde del 25/08/11 al 29/05/13, cubriendo los nueve días de observaciones visuales indicados anteriormente. Los valores de la duración de HF diaria (12:00h – 12:00h) estimada por los sensores Spectrum en cada posición de la copa se analizaron descriptivamente. El punto de corte óptimo

(i.e. seco vs. mojado) de los sensores se estableció sobre la base de los resultados de la evaluación de los sensores (apdo. 5.2.3). Los días con lluvia ($\geq 0,2$ mm) y días sin lluvia se analizaron por separado. Se utilizó la prueba t de Student para detectar diferencias estadísticas entre las distintas posiciones de copa y entre los días con lluvia y sin lluvia.



Figura 5.2: Posición de los sensores de humectación foliar Spectrum y Hobo, sensores de temperatura y HR y el anemómetro a 3 m de altura en los lados este y oeste en la copa de un árbol de cítrico.

5.2.3. Evaluación de los sensores de humectación foliar y los modelos CART/SLD y HR mediante análisis de curvas ROC

Los sensores de HF Spectrum y Hobo así como los modelos CART/SLD y HR que se describen a continuación se evaluaron como estimadores de la HF observada visualmente en hojas de cítricos. El modelo de HR considera presencia de HF cuando la HR es mayor o igual a un umbral determinado (Sentelhas *et al.*, 2008). El modelo CART/SLD utiliza como variables la velocidad del viento (W), la HR y la depresión del punto de rocío (DPD) definida como la diferencia entre la temperatura del aire y la temperatura del punto de rocío (Gleason *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2002) (Fig. 5.3). El modelo considera cuatro categorías diferentes en función de los siguientes umbrales: $3,7^{\circ}\text{C}$ para el DPD, $2,5$ m/s para la W , y el $87,8\%$ para HR. Las unidades de tiempo se clasifican como secas si $\text{DPD} \geq 3,7^{\circ}\text{C}$

(categoría 1) o $W \geq 2,5$ m/s y $RH < 87,8\%$ (categoría 4). Para la categoría 2 (DPD $< 3,7^\circ\text{C}$ y $W < 2,5$ m/s) las unidades de tiempo se clasifican con presencia de humectación si se cumple la siguiente desigualdad:

$$(1,6064\sqrt{T} + 0,0036T^2 + 0,1531 HR - 0,4599W \cdot DPD - 0,0035T \cdot HR) > 14,4674.$$

para la categoría 3 (DPD $< 3,7^\circ\text{C}$, $W \geq 2,5$ m/s y $HR \geq 87,8\%$) las unidades de tiempo se clasifican como húmedas si se cumple la siguiente desigualdad:

$$(0,7921\sqrt{T} + 0,0046HR - 2,3889W - 0,0390T \cdot W + 1,0613W \cdot DPD) > 37,0$$

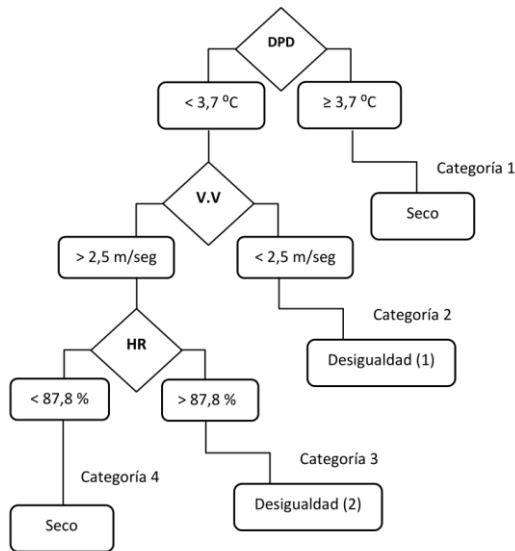


Figura. 5.3: Árbol de clasificación para la presencia de humectación foliar con el modelo CART/SLD en función de la depresión del punto de rocío (DPD), velocidad del viento (W) y humedad relativa (HR) (Kim *et al.*, 2002).

Los sensores y modelos de HF se evaluaron mediante análisis de curvas ROC (apdo. 4.4.1) con el paquete pROC para R (Robin *et al.*, 2011). La presencia o ausencia de HF observada visualmente a intervalos de 15 minutos se consideró como variable de clasificación binaria. Los registros de los sensores de HF Spectrum y Hobo, HR y el modelo CART/SLD se evaluaron como estimadores

continuos de la variable de clasificación binaria. Las curvas ROC se calcularon a partir de la especificidad como proporción de observaciones negativas clasificadas correctamente y la sensibilidad como proporción de observaciones positivas clasificadas correctamente, a medida que la variable continua se movía a lo largo de su rango de valores. En cada caso se seleccionó el punto de corte óptimo para el estimador evaluado a partir del estadístico J de Youden (Youden, 1950).

Se calcularon las curvas ROC para los sensores y modelos de HF en cada una de las posiciones de la copa y cara de la hoja. Se realizó también un análisis conjunto de todas las posiciones de copa para los distintos sensores y modelos de HF evaluados, pero diferenciando entre haz y envés. De acuerdo con la terminología ROC, los períodos de 15 minutos donde se observó visualmente HF se consideraron como ‘casos’ y los períodos sin HF como ‘controles’. El área total bajo la curva ROC (AUC) se calculó mediante integración trapezoidal (Robin *et al.*, 2011). Los intervalos de confianza (IC) para la sensibilidad y la especificidad de los puntos de corte óptimos seleccionados se calcularon mediante bootstrap (Fawcett, 2006) y con el método de DeLong para el AUC (DeLong *et al.*, 1988). Los valores de AUC obtenidos con los diferentes estimadores a 1,5 m de altura se compararon por separado para el haz y el envés mediante la prueba apareada de DeLong (DeLong *et al.*, 1988; Robin *et al.*, 2011). El grado de concordancia entre la HF observada visualmente respecto a los sensores y modelos de HF con sus puntos de corte óptimos se calculó mediante el coeficiente kappa de Cohen (k) (Cohen, 1968; Landis y Koch, 1977).

5.2.4. Estimación de la humectación en parcelas comerciales de cítricos

Se obtuvieron registros horarios con sensores Spectrum de HF, temperatura y HR (apdo. 5.2.2) y lluvia WatchDog 1120 (Spectrum Technologies, Inc., EE.UU.), (precisión $\pm 2\%$), en 14 parcelas comerciales de cítricos situadas en siete provincias cítrícolas más importantes de España: Tarragona (TA), Castellò (CS), Valencia (VA), Alicante (AL), Murcia (MU), Sevilla (SE) y Huelva (HU). Las características de las parcelas y los períodos estudiados se detallan en la (Tabla 5.1).

Tabla 5.1: Características de las parcelas comerciales de cítricos incluidas en el estudio de la estimación de la humectación foliar.

| Localidad ¹ | Coordenadas UTM | | Cultivar | Portainjerto | Edad (Años) | Distancia Árbol (m) | Orientación de las filas | Sistema de riego | Período estudiado |
|------------------------|-----------------|--------|--------------|--------------|-------------|---------------------|--------------------------|------------------|-------------------|
| | Y | X | | | | | | | |
| Gandía (VA) | 4316187 | 740196 | Clemenules | Carrizo | >15 | 5 x 4 | N-S | Goteo | 2008-2009 |
| Alzira (VA) | 4334760 | 722126 | Nova | Carrizo | >15 | 4 x 4 | NE-SO | Manta | 2008-2011 |
| Chiva (VA) | 4371650 | 706371 | Fortune | Carrizo | >15 | 5 x 4 | N-S | Goteo | 2003-2005 |
| Monserrat (VA) | 4360256 | 711620 | Nova | Carrizo | 16 | 4,5 x 2 | E-O | Goteo | 2008-2009 |
| Aznalcazar (SE) | 4128347 | 212005 | Valencia | Carrizo | 14 | 6 x 3 | N-S | Goteo | 2008-2009 |
| Tivenys (TA) | 4530356 | 289017 | Navelate | Cleopatra | >15 | 5 x 5 | NE-SO | Goteo | 2008-2009 |
| Ampostá (TA) | 4510397 | 304833 | Navelate | Carrizo | >15 | 7 x 5 | N-S | Goteo | 2008-2009 |
| Aljaraque (HU) | 4131536 | 678534 | Lane-Late | Carrizo | >10 | 8 x 4 | N-S | Goteo | 2008 |
| Isla Cristina (HU) | 4129782 | 116275 | Fortune | Carrizo | >20 | 8 x 4 | NO-SE | Goteo | 2008-2009 |
| Almonte (HU) | 4114272 | 184666 | Clemenules | Carrizo | >10 | 8 x 2,5 | E-O | Goteo | 2008-2010 |
| Chilches (CS) | 4405558 | 742602 | Clemenules | Carrizo | >15 | 5 x 3 m | NO-SE | Goteo | 2008-2009 |
| Burriana (CS) | 4421788 | 754635 | Okitsu | Carrizo | <10 | 5 x 3 m | NO-SE | Goteo | 2008 |
| Javea (AL) | 4295957 | 254855 | Lane-Late | Carrizo | >10 | 5 x 4 | N-S | Manta | 2008-2010 |
| Palma (MU) | 4170088 | 677739 | Navel-Powell | Cleopatra | >20 | 5 x 3 | E-O | Goteo | 2008-2012 |

¹ VA, Valencia; SE, Sevilla; TA, Tarragona; HU, Huelva; CS, Castelló; AL, Alicante; MU, Murcia.

En las parcelas se siguieron las recomendaciones agronómicas habituales en cada zona. Los árboles se podaron anualmente, por lo que el tamaño de la copa se mantuvo prácticamente constante durante el período de estudio. Los sensores de HF se instalaron a una altura de 1,5 m sobre la superficie del suelo en el espacio entre dos árboles (Magarey *et al.*, 2006b). Los sensores de HF se colocaron orientados al norte y con una inclinación de 30° sobre la horizontal. Se seleccionó un punto de corte (seco *vs.* mojado) de 2,85 para el sensor de HF (apdo. 5.3.3). En cada parcela se calculó el número y duración de los períodos de HF. Se evaluó el modelo HR como estimador de la HF registrada por los sensores mediante análisis de curvas ROC. La presencia/ausencia de HF en los sensores Spectrum a intervalos horarios se consideró como la variable de clasificación binaria y la HR como variable continua. Se seleccionó el punto de corte óptimo con el estadístico *J* de Youden del mismo modo descrito en el (apdo. 5.2.3). Se calculó también el valor del coeficiente kappa de Cohen (*k*) para evaluar la concordancia entre la HF registrada por los sensores Spectrum y la estimada con el punto de corte óptimo de HR en las diferentes parcelas comerciales de cítricos.

5.2.5. Dinámica de la duración de humectación foliar en parcelas de cítricos con riego a goteo y con riego a manta

Se evaluó la dinámica de la duración de HF en seis parcelas comerciales de cítricos de Clementina 'Orogrande' (*C. reticulata*) injertados sobre citrange Carrizo en Carlet, Valencia, (latitud 39° norte, longitud 0° oeste). Los árboles se plantaron entre 2003 y 2005 con un marco de plantación de 5 x 3 m y una orientación nortesur. Tres de las parcelas tenían riego localizado (parcela 1-goteo, parcela 2-goteo y la parcela 3-goteo) y otras tres con riego a manta (parcela 1-manta, parcela 2-manta y parcela 3-manta). El contenido de agua del suelo en las parcela se determinó gravimétricamente a una profundidad de 0-0,3 m mediante la extracción de muestras de suelo inalteradas. Durante el período de estudio en los años 2012 y 2013 se realizaron dos tomas de seis muestras de suelo en cada muestreo. Esto se hizo así para asegurar que los valores del contenido de agua registrado por los sensores de humedad del suelo eran representativos del contenido medio en el suelo para cada parcela.

El riego localizado se aplicó mediante goteros autocompensantes (PC, Netafim) con un caudal de 4 L/hora. La superficie de suelo mojada por los goteros en cada parcela se calculó con el procedimiento descrito anteriormente (apdo. 5.2.1), obteniéndose los siguientes valores: 10,7% para la parcela 1-goteo, 14,3% para la parcela 2-goteo y 19,1% para la parcela 3-goteo. El riego a manta consistía en mojar por completo toda la superficie de suelo de la parcela con un volumen de agua aproximado de 70 mm, aplicado durante aproximadamente una hora. Para determinar los momentos de riego se instalaron sensores de reflectometría de humedad del suelo de frecuencia EC-5 (Decagon Devices, Inc., EE.UU.), con una precisión $\pm 3\%$ en las seis parcelas a una profundidad de 0,25 m. Se consideraron como riegos los aumentos en el contenido de humedad del suelo de al menos un 10% en ausencia de lluvias.

En cada una de las parcelas se instalaron sensores de temperatura y HR Hobo S-THB, HF (Hobo S-LWA) (apdo. 5.2.2) y lluvia (pluviómetro 7852, Davis Instruments Corp., EE.UU.) con una precisión $\pm 4\%$ y una resolución de 0,2 mm en la fila en el espacio entre árboles a 1,5 m de altura. Los sensores de HF se colocaron orientados al norte y se fijaron a un ángulo de 30° de la horizontal. Se seleccionó un punto de corte (seco vs. mojado) de 75,88 (apdo. 5.3.3). Los datos se registraron a intervalos horarios durante la época de riego en cada año: desde 19/06/12 hasta 30/10/12 y del 04/04/13 a 14/11/13. Debido a fallos en los sensores, en la parcela 2-goteo se siguieron únicamente desde el 27/06/12 al 05/11/12 y en la parcela 2-manta desde el 14/05/13 al 14/11/13.

Para describir la dinámica de la duración de HF diaria en las seis parcelas se aplicó un análisis de series temporales univariante con un modelo de media móvil autoregresivo no estacional (ARIMA) (p, d, q) , donde p es el número de términos autorregresivos, d es el número de diferenciaciones no estacionales y q es el número de términos de media móvil. Se identificó el modelo ARIMA más adecuado para cada parcela y año con el paquete ‘forecast’ para R (Trapletti y Hornik, 2013; Hyndman *et al.*, 2014). Para la selección inicial de los modelos se utilizó la función ‘auto.arima’ del paquete ‘forecast’ y los gráficos de la función de autocorrelación y autocorrelación parcial (Markridakis *et al.*, 1998). Se utilizó también el criterio de información Akaike (AIC) para la selección de modelos.

Los valores de los parámetros se estimaron por máxima verosimilitud y su significación estadística se analizó mediante la prueba de Wald con el paquete

‘aod’ para R (Lesnoff y Lancelot, 2012). Los residuos de cada uno de los modelos se evaluaron como ruido blanco (i.e. media cero, incorrelado, homocedástico y normal). Se utilizó la prueba estadística de Ljung-Box para contrastar las hipótesis de incorrelación y homocedasticidad de los residuos y la prueba de Shapiro-Wilk para evaluar si se distribuían normalmente (Cromwell *et al.*, 1994). La presencia de valores atípicos e intervenciones se evaluó representando los residuos del modelo a lo largo de todo el período experimental (Alwan y Roberts, 1988) y mediante el procedimiento iterativo descrito por Chang *et al.* (1988) con el paquete ‘TSA’ para R (Sik y Ripley, 2012).

5.3. RESULTADOS

5.3.1 Observaciones visuales de humectación foliar

La duración de HF mínima observada en el haz de las hojas osciló entre 11,25 horas en el lado oeste del árbol y 12,25 horas a 1 m de altura en el lado este (Fig. 5.4). Los valores promedios de duración de HF oscilaron entre 13,25 horas a 2 m de altura en el lado oeste y 14 horas a 1 m de altura en la misma orientación. La duración de HF máxima observada varió entre 16,25 horas a 1 y 1,5 m de altura en el lado oeste y 16,75 horas a 1,5 m de altura en el lado este.

La duración de HF mínima observada en el envés de la hoja osciló entre 11,25 horas en el lado oeste a 11,75 horas a 1,5 y 2 m de altura en el lado este. Los valores medios de la duración de HF oscilaron entre 13,25 horas a 2 m de altura en el lado oeste y 14 horas a 1 y 1,5 m de altura en el lado este. La duración de HF máxima observada varió entre 16,25 horas a 1 y 1,5 m de altura en el lado oeste a 16,75 horas a 1,5 m de altura en el lado este. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la duración de HF observada entre las diferentes posiciones de la copa y entre las caras de la hoja ($P > 0,05$).

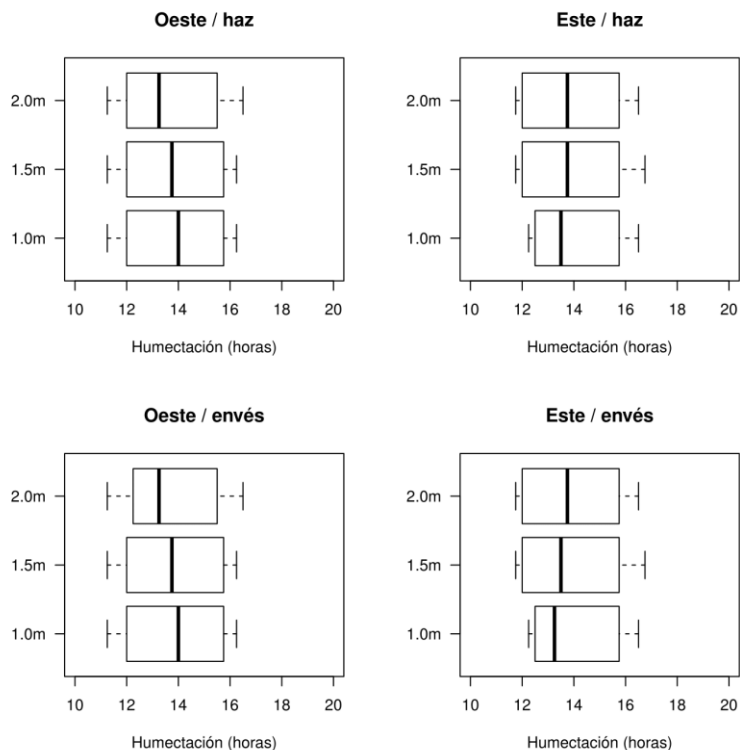


Figura 5.4: Duración de humectación foliar observada visualmente durante nueve días. Diagramas de cajas para cada una de las dos orientaciones (oeste, este), tres alturas (1, 1,5 y 2 m) y dos caras de la hoja (haz, envés).

5.3.2. Sensores de humectación foliar

Cuando se consideraron únicamente los días sin lluvia, los sensores Spectrum registraron una duración de HF mínima de 1 hora en las seis posiciones de la copa (Fig. 5.5). Los valores medios de la duración de HF oscilaron entre 6 horas a 1 y 2 m de altura en el lado oeste a 9 horas en todas las posiciones en el lado este. La duración de HF máxima varió de 16 horas a 1 m de altura en el lado oeste a 21 horas a 1,5 m de altura en el lado este. En los días con lluvia, los sensores Spectrum registraron una duración de HF mínima de 1 hora a 2 m de altura en el lado oeste y 3 horas a 1 y 2 m de altura en el lado este. Los valores medios de duración de HF fueron de 12 horas en todas las posiciones de la copa del árbol, excepto 13 horas a 1,5 m de altura en el lado oeste. Se detectaron seis valores

atípicos en el lado oeste con una duración de HF máxima de 32 horas, y nueve valores atípicos en el lado este, con una duración máxima de HF de 46 horas. En días sin lluvia se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la duración de HF a 1 y 2 m de altura en el lado oeste en comparación con 1 y 2 m de altura del lado este ($P < 0,05$). En días con lluvia no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la duración de HF en todas las posiciones de la copa del árbol ($P > 0,05$). En las seis posiciones de la copa la duración de HF más largo se registró durante los días con lluvia que en días sin lluvia ($P < 0,05$).

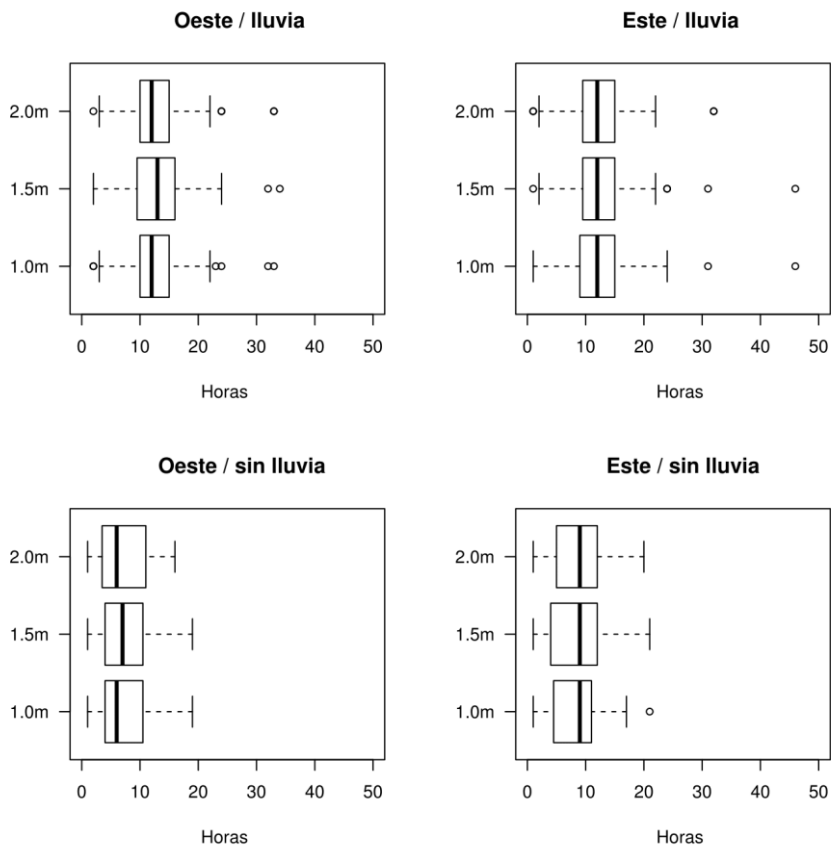


Figura 5.5: Duración de humectación foliar registrada con sensores Spectrum en días con y sin lluvia durante el período de estudio. Diagramas de cajas para cada una de las dos orientaciones (oeste, este) y tres alturas (1, 1,5 y 2 m).

5.3.3. Evaluación de los sensores de humectación foliar y los modelos CART/SLD y HR mediante análisis de curvas ROC

El número total de casos/controles para los sensores de HF Spectrum fue de 1741/3164 en el haz de las hojas y 1764/3141 en el envés. El número de casos/controles fue de 577/1058 en el haz de las hojas y 585/1050 en el envés para los sensores de HF Hobo y el modelo de HR. el número de casos/controles fue de 383/989 en el haz de las hojas y 384/988 en el envés para el modelo CART/SLD. El punto de corte óptimo (i.e. seco vs. mojado) seleccionado en función del estadístico J de Youden para los sensores Spectrum varió de 0,95 en el lado este a 4,05 en el lado oeste, en ambos casos, a una altura de 2 m (Tabla 5.2). Para los sensores de HF Hobo el punto de corte óptimo seleccionado fue 77,94 en el lado este y 95,59 en el lado oeste. Para el modelo de HR, el punto de corte óptimo seleccionado fue 87,35% en el lado este y 91,25% en el lado oeste. La velocidad del viento fue siempre inferior a 2,5 m/s durante las observaciones visuales de HF, por lo que sólo se evaluó la desigualdad 1 del modelo CART/SLD (Fig. 5.3). El punto de corte óptimo para esta desigualdad fue de 15,97 para el lado oeste y 16,25 para el lado este. El valor más bajo del CI del 95% del AUC fue 0,86 en el caso del sensor Spectrum a 1,5 m en el lado este. El valor más alto fue de 0,95 obtenido en la misma posición de la copa, pero para el modelo de HR.

Cuando se evaluó la estimación de la HF combinando todas las posiciones de la copa estudiadas, los valores de AUC oscilaron de 0,89 a 0,93 (Fig. 5.6). Estos valores corresponden al CI más bajo y el más alto a 95% obtenido para los sensores de HF Spectrum y el modelo HR. El punto de corte óptimo seleccionado fue 2,85 para los sensores de HF Spectrum, 75,88 para los sensores de HF Hobo, 87,45% para el modelo de HR, y 15,99 para el modelo CART/SLD. La especificidad asociada a los puntos de corte óptimos seleccionados varió de 0,81 con los sensores de HF Spectrum a 0,87 con el modelo CART/SLD. La sensibilidad varió de 0,83 con el modelo CART/SLD a 0,95 con los sensores de HF Hobo. Con el modelo de HR se obtuvo un valor de AUC significativamente mayor ($P < 0,01$) que los otros estimadores de HF evaluados tanto para el envés como el haz de la hoja. No se detectaron diferencias significativas en el AUC entre los sensores de HF Spectrum y el modelo CART/SLD, excepto en el envés de las hojas, donde el AUC del modelo CART/SLD fue mayor ($P < 0,01$) que los sensores de HF Spectrum.

Tabla 5.2: Área bajo la curva ROC, puntos de corte óptimos seleccionados y coeficiente kappa de Cohen (k) para los sensores de humectación Spectrum y Hobo y los modelos de humedad relativa y CART/SLD como estimadores de las observaciones visuales de humectación foliar en seis posiciones de la copa y las dos caras de las hojas de cítricos.

| Posición en la copa | | Cara de la hoja | | | | | | |
|---------------------|--------|-----------------|-------------------------------|-----------------------------|------|-----------------------|----------------|------|
| Lado | Altura | Estimador | Haz | | | Envés | | |
| | | | Área bajo curva (ROC) | Punto de corte ¹ | k | Área bajo curva (ROC) | Punto de corte | k |
| Oeste | 2 m | Spectrum | 0,91 (0,89-0,94) ² | 4,05 | 0,79 | 0,91 (0,89-0,93) | 4,05 | 0,79 |
| | 1.5 m | Spectrum | 0,90 (0,87-0,92) | 3,90 | 0,75 | 0,89 (0,87-0,92) | 4,45 | 0,74 |
| | | Hobo | 0,89 (0,86-0,91) | 95,59 | 0,73 | 0,89 (0,86-0,91) | 95,59 | 0,74 |
| Este | | HR | 0,92 (0,90-0,94) | 91,25 | 0,62 | 0,92 (0,90-0,94) | 91,25 | 0,63 |
| | | CART/SLD | 0,90 (0,88-0,93) | 15,97 ³ | 0,65 | 0,91 (0,88-0,94) | 15,97 | 0,66 |
| | 1 m | Spectrum | 0,92 (0,90-0,94) | 3,15 | 0,78 | 0,92 (0,89-0,94) | 3,15 | 0,77 |
| | 2 m | Spectrum | 0,88 (0,85-0,90) | 0,95 | 0,79 | 0,88 (0,85-0,91) | 0,95 | 0,79 |
| | 1.5 m | Spectrum | 0,89 (0,86-0,91) | 2,55 | 0,81 | 0,88 (0,86-0,91) | 2,55 | 0,80 |
| | | Hobo | 0,90 (0,87-0,92) | 77,94 | 0,83 | 0,89 (0,86-0,91) | 77,94 | 0,83 |
| 1 m | | HR | 0,93 (0,92-0,95) | 87,35 | 0,74 | 0,94 (0,92-0,95) | 88,05 | 0,74 |
| | | CART/SLD | 0,92 (0,90-0,95) | 16,25 | 0,64 | 0,93 (0,90-0,95) | 16,25 | 0,64 |
| | | Spectrum | 0,89 (0,86-0,91) | 2,85 | 0,74 | 0,89 (0,86-0,91) | 2,85 | 0,74 |

¹ Punto de corte óptimo seleccionado para cada estimador de humectación en función del estadístico de Youden (Youden, 1950).

² Mediana e intervalo de confianza del 95% calculado con el método de DeLong (DeLong *et al.*, 1988).

³ Desigualdad I del modelo CART (Gleason *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2002).

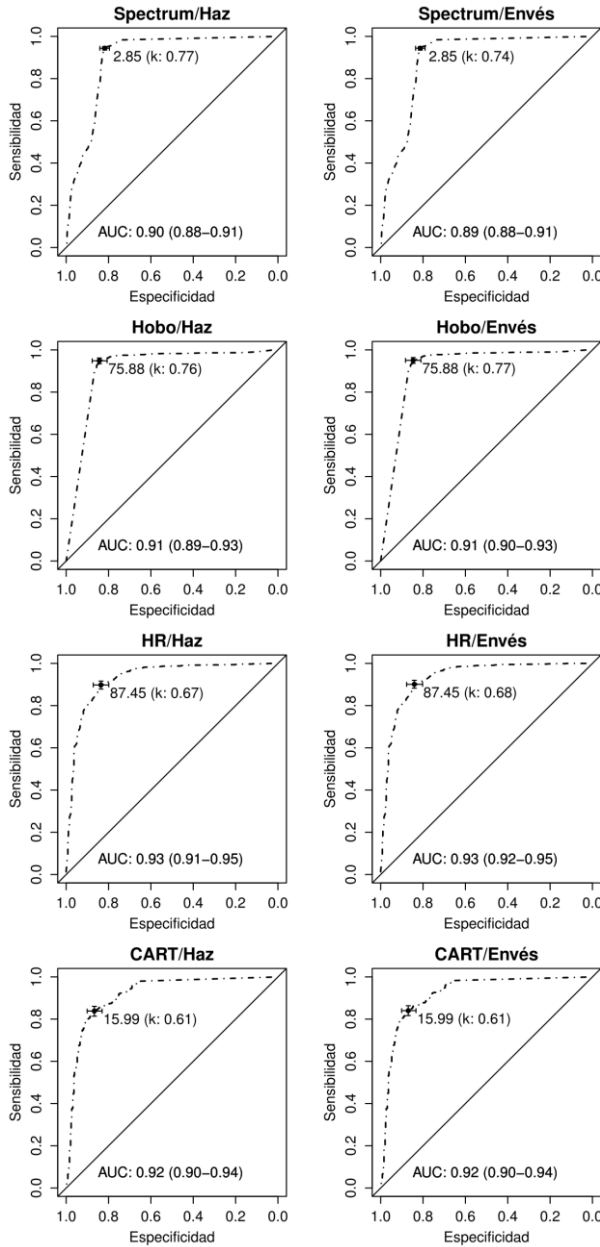


Figura 5.6: Área bajo la curva ROC para los sensores de humectación Spectrum y Hobo y los modelos HR y CART/SLD como estimadores de las observaciones visuales de humectación foliar en cítricos. En cada gráfico se representa el AUC con su intervalo de confianza del 95% y el punto de corte óptimo seleccionado junto al coeficiente kappa de Cohen (k). Análisis conjunto de todas las posiciones de copa para cada sensor.

Los valores del coeficiente kappa de Cohen k en el haz de las hojas variaron de 0,62 con el modelo de HR a 0,79 con el sensor Spectrum a 2 m de altura. En el envés los valores de k variaron de 0,63 con el modelo de HR a 0,79 con el sensor Spectrum a 2 m de altura (Tabla 5.2). Los valores de k para los sensores de HF Spectrum variaron de 0,75 a 1,5 m a 0,79 a 2 m de altura en el haz de las hojas y de 0,74 a 1,5 m a 0,79 a 2 m de altura en el envés en el lado oeste del árbol. En el lado este los valores de k variaron de 0,64 con el modelo CART/SLD a 0,83 con el sensor Hobo en ambas caras de las hojas. Los valores de k con los sensores Spectrum variaron 0,74 a 1 m a 0,81 a 1,5 m de altura en el lado este del árbol. Los valores de k entre el lado oeste y este de los sensores de HF Hobo variaron de 0,73 a 0,83 en el haz y envés de las hojas, de 0,62 a 0,74 para el modelo de HR en el haz y de 0,63 a 0,74 en el envés. Para el modelo CART/SLD los valores de k variaron de 0,64 a 0,65 en el haz y de 0,64 a 0,66 en el envés de las hojas (Tabla 5.2). Cuando los datos de las diferentes posiciones de copa se analizaron en conjunto, los valores del coeficiente k variaron de 0,61 con el modelo CART a 0,77 con los sensores de HF Spectrum y Hobo en el haz y envés de las hojas (Fig. 5.6).

5.3.4. Estimación de humectación en parcelas comerciales de cítricos

La duración mínima de los períodos de HF registrados en las parcelas comerciales de cítricos fue de 1 hora en todos los casos (Fig. 5.7). El valor del primer cuantil fue de 3 horas en Tivenys, Aljaraque y Javea y 5 horas en Quema. La mediana de la duración de HF más baja fue de 5 horas registradas en Aljaraque y la más alta fue de 10 horas registrada en Gandia y Monserrat. La media de la duración de HF varió de 6,73 horas en Aljaraque a 12,75 horas en Gandía. En valor del tercer cuantil fue de 9 horas en Aljaraque y 15 horas en Gandía. La duración máxima de HF varió de 25 horas en Amposta a 94 horas en Gandía. Se detectaron valores atípicos en todas las parcelas, excepto en Amposta. La proporción media de los valores atípicos fue 0,021 y la proporción máxima fue de 0,05 registrados en Gandía. La proporción media de días con HF y lluvia fue 0,26, con un mínimo de 0,15 en Monserrat y un máximo de 0,53 en Isla Cristina.

Cuando se evaluó la HR como estimador de la HF registrada por los sensores Spectrum en las parcelas comerciales de cítricos, los valores del AUC oscilaron entre 0,83 en Gandía y 0,96 en Monserrat (Tabla 5.3). El punto de corte más bajo de HR óptima seleccionados en base al estadístico *J* de Youden fue 72,5% en Gandía y la más alta fue del 89,5% en Chiva. Los valores medios de la especificidad variaron de 0,73 en Aljaraque y 0,91 en Monserrat. El valor medio más bajo de sensibilidad fue de 0,43 obtenido en Isla Cristina y la más alta fue de 0,93 en Almonte. Los valores de *k* en las parcelas comerciales variaron entre 0,32 en Isla Cristina y 0,83 en Monserrat.

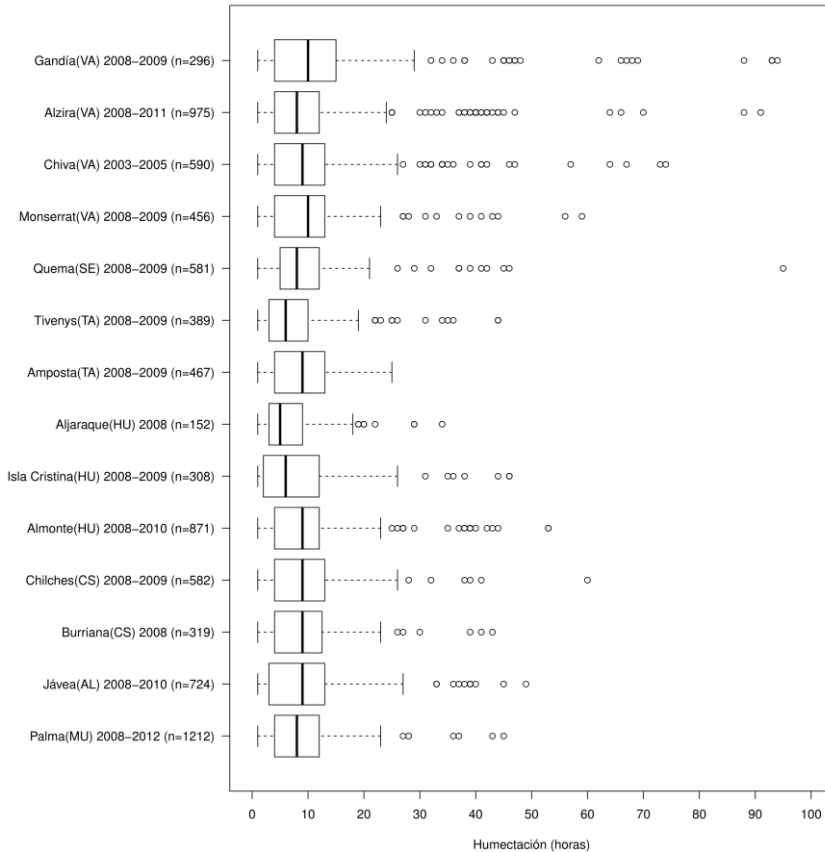


Figura 5.7: Diagramas de cajas para la duración de la humectación foliar registrada con sensores Spectrum en parcelas comerciales de cítricos.

Tabla 5.3: Área bajo la curva ROC, puntos de corte óptimos y coeficiente kappa de Cohen (k) para la humedad relativa como estimador de la humectación foliar registrada con sensores Spectrum en parcelas comerciales de cítricos en España.

| Parcelas ¹ | Área bajo la curva ROC | Punto de corte HR ³ | k | Especificidad | Sensibilidad |
|-----------------------|-------------------------------|--------------------------------|------|-------------------------------|------------------|
| Gandía (VA) | 0,83 (0,82-0,83) ² | 72,5 | 0,54 | 0,83 (0,82-0,84) ⁴ | 0,69 (0,68-0,71) |
| Alzira (VA) | 0,87 (0,86-0,87) | 84,5 | 0,68 | 0,85 (0,85-0,86) | 0,83 (0,82-0,84) |
| Chiva (VA) | 0,92 (0,91-0,92) | 89,5 | 0,66 | 0,82 (0,82-0,83) | 0,89 (0,88-0,89) |
| Monserrat (VA) | 0,96 (0,96-0,97) | 83,5 | 0,83 | 0,91 (0,90-0,91) | 0,92 (0,91-0,92) |
| Quema (SE) | 0,93 (0,92-0,93) | 82,5 | 0,74 | 0,83 (0,82-0,84) | 0,91 (0,91-0,92) |
| Tivenys (TA) | 0,94 (0,94-0,94) | 84,5 | 0,69 | 0,85 (0,84-0,86) | 0,92 (0,91-0,93) |
| Amposta (TA) | 0,96 (0,96-0,97) | 85,5 | 0,80 | 0,87 (0,87-0,88) | 0,93 (0,92-0,94) |
| Aljaraque (HU) | 0,90 (0,89-0,91) | 87,5 | 0,41 | 0,73 (0,72-0,74) | 0,92 (0,91-0,94) |
| Isla Cristina (HU) | 0,65 (0,63-0,66) | 87,5 | 0,32 | 0,88 (0,87-0,88) | 0,43 (0,41-0,44) |
| Almonte (HU) | 0,91 (0,90-0,91) | 81,5 | 0,67 | 0,77 (0,76-0,77) | 0,93 (0,93-0,94) |
| Chilches (CS) | 0,93 (0,93-0,93) | 83,5 | 0,73 | 0,84 (0,83-0,84) | 0,90 (0,89-0,91) |
| Burriana (CS) | 0,95 (0,95-0,96) | 85,5 | 0,75 | 0,87 (0,86-0,88) | 0,89 (0,88-0,90) |
| Javea (AL) | 0,96 (0,96-0,96) | 87,5 | 0,80 | 0,89 (0,89-0,90) | 0,90 (0,89-0,91) |
| Palma (MU) | 0,90 (0,90-0,90) | 82,5 | 0,71 | 0,90 (0,90-0,90) | 0,79 (0,78-0,80) |

¹ VA, Valencia; SE, Sevilla; TA, Tarragona; HU, Huelva; CS, Castelló; AL, Alicante; MU, Murcia.

² Intervalo de confianza del 95% calculado con el método de Delong (Delong *et al.*, 1988).

³ Punto de corte de humedad relativa seleccionado en función del estadístico de Youden (Youden, 1950).

⁴ Mediana e intervalos de confianza del 95% calculados con el punto de corte seleccionado.

5.3.5. Dinámica de la humectación foliar en parcelas de cítricos con riego a goteo y a manta

El modelo ARIMA seleccionado en el análisis de series temporales fue un ARIMA (1,1,1):

$$y_t = y_{t-1} + \phi (y_{t-1} - y_{t-2}) - \theta e_{t-1}$$

donde y es la duración de HF diaria en horas, t es el tiempo en días, ϕ es el parámetro autorregresivo, θ es el error.

La duración del período de tiempo evaluado en 2012 fue de 133 días en todas las parcelas. El número de días con HF osciló entre 110 en la parcela 1-goteo a 124 en la parcela 3-goteo y la parcela 1-manta. La duración media diaria de la duración de HF varió de 8 horas/día en la parcela 1-goteo a 9,3 horas/día en la parcela 3-goteo (Fig. 5.8). La duración mínima diaria de la duración de HF fue nula en todos los casos y la duración máxima diaria de la duración de HF fue de 22 horas/día, excepto 20 horas/día en la parcela 2-goteo. El rango intercuartílico en la duración de HF diaria varió de 10-12 horas/día en parcela 1-manta de 8-12 horas/día en la parcela 1-goteo y parcela 2-goteo. Se registraron un total de 15 días con lluvia medible ($> 0,2$ mm), con un mínimo de 0,4 mm/día y un máximo de 106 mm/día y un promedio de 14,5 mm/día. En las parcelas de riego por goteo, el contenido medio de agua en el suelo en las zonas húmedas del suelo mojado por los goteros varió del 25% al 32%. Teniendo en cuenta que con el riego a goteo sólo se humedece una pequeña parte del suelo de la parcela, estos porcentajes corresponderían a un contenido total de agua en el suelo del 12-14%. En las parcelas con riego a manta se registraron un total de tres riegos y el contenido medio de agua del suelo inmediatamente después del riego fue del 11-34%.

En 2013, los períodos de tiempo evaluados oscilaron entre 131 días en la parcela 2-goteo y un máximo de 224 días en la parcela 3-goteo. El número de días con HF osciló entre 113 en la parcela 2-goteo y 175 en la parcela 1-manta. La duración mínima de la HF diaria fue nula en todas las parcelas y la máxima osciló entre 20 horas/día en la parcela 2-goteo y parcela 2-manta y 23 horas/día en la parcela 1-manta (Fig. 5.9). La duración media diaria de la HF osciló entre 4,3

horas/día en la parcela 1-goteo a 7,9 horas/día en la parcela 2-goteo. En el rango intercuartílico de la duración de HF fue de 5-11 horas/día en la parcela 2-goteo y 1-10 horas/día en la parcela 3-manta. Se registraron un total de 13 días con lluvia ($> 0,2$ mm) en la parcela 2-goteo, 23 días en la parcela 2-manta, y 30 días en el resto de las parcelas. Las lluvias variaron de 0,2 mm/día a 53,4 mm/día, con un promedio de 7,0 mm/día. Se registraron un total de ocho riegos en la parcela 1-manta, siete en la parcela 2-manta, y seis en la parcela 3-manta.

Cuando los datos de las series temporales se ajustaron al modelo ARIMA (1,1,1), el estimador del parámetro autorregresivo ($\hat{\phi}$) osciló entre $0,10 \pm 0,09$ en la parcela 3-goteo en 2013 a $0,35 \pm 0,08$ en la misma parcela en 2012 (Figs. 5.10 y 5.11). El parámetro de media móvil ($\hat{\theta}$) varió de $-0,98 \pm 0,04$ en la parcela 2-goteo a $-0,82 \pm 0,05$ en la parcela 3-goteo en el 2013 (Tabla 5.4). El menor valor de AIC fue de 754,29 en la parcela 1-manta en 2012 y el más alto fue de 1.325,64 en la parcela 3-manta en 2013. El error absoluto medio (MAE) más bajo fue 3,17 horas en la parcela 1-manta en 2012 y el más alto fue de 3,91 horas en la parcela 2-manta en 2013. Se confirmó que los residuos de los modelos de las series temporales eran ruido blanco en todos los casos, con una media inferior a 0,9, incorrelados (test de Ljung-Box, $P > 0,05$), homocedasticos (test de Ljung-Box, $P > 0,05$) y normales (test de Shapiro-Wilk, $P > 0,05$).

Cuando los residuos del modelo se representaron a lo largo de los períodos de tiempo evaluados en cada parcela, en 2012 se detectaron dos días con residuos dos veces superiores a su desviación estándar (Fig. 5.10). En la parcela 2-goteo y la parcela 3-goteo, se detectó también un tercer día adicional con residuos dos veces superiores a su desviación estándar. El valor del residuo fue superior a tres veces su desviación estándar sólo en un día. En 2013, el número de días en los que la desviación estándar de los residuos fue superior a dos veces su desviación estándar osciló entre uno en la parcela 2-goteo a 10 en la parcela 1-goteo (Fig. 5.11). En la parcela 1-goteo y la parcela 3-goteo se registraron dos días con residuos superiores a tres veces su desviación estándar. Todos los días con residuos fuera de rango coincidieron con eventos de lluvia, pero ninguno con riegos a manta. Cuando se aplicó el procedimiento interactivo descrito por Chang *et al.* (1988) para detectar posibles intervenciones, se obtuvo un valor atípico en las seis parcelas en 2012.

Tabla 5.4: Estimadores de los parámetros del modelo ARIMA (1,1,1) de la duración de la humectación foliar en las parcelas de cítricos con riego por goteo y a manta durante los periodos de estudio en los años 2012 y 2013.

| Año/parcela | Parámetro autorregresivo ($\hat{\phi}$) | Parámetro media móvil ($\hat{\theta}$) | AIC ² | MAE ³ |
|-----------------|---|--|------------------|------------------|
| 2012 | | | | |
| Parcela 1-goteo | 0,2298±0,0935 ¹ | -0,9235±0,0345 | 786,85 | 3,7767 |
| Parcela 2-goteo | 0,3369±0,0916 | -0,9286±0,0326 | 770,43 | 3,4090 |
| Parcela 3-goteo | 0,3567±0,0896 | -0,9334±0,0299 | 762,29 | 3,2136 |
| Parcela 1-manta | 0,2439±0,0884 | -0,9543±0,0224 | 754,29 | 3,1725 |
| Parcela 2-manta | 0,2186±0,0889 | -0,9569±0,0238 | 770,93 | 3,5023 |
| Parcela 3-manta | 0,2853±0,0889 | -0,9656±0,0281 | 774,88 | 3,5453 |
| 2013 | | | | |
| Parcela 1-goteo | 0,2398±0,0880 | -0,8863±0,0507 | 1290,25 | 3,4278 |
| Parcela 2-goteo | 0,2422±0,0931 | -0,9801±0,0426 | 772,99 | 3,7194 |
| Parcela 3-goteo | 0,1060±0,0907 | -0,8216±0,0577 | 1298,27 | 3,4358 |
| Parcela 1-manta | 0,2614±0,1145 | -0,8740±0,0788 | 1318,65 | 3,7164 |
| Parcela 2-manta | 0,2966±0,0777 | -0,9683±0,0266 | 1086,17 | 3,9133 |
| Parcela 3-manta | 0,1912±0,0930 | -0,8587±0,0580 | 1325,64 | 3,8495 |

¹ Media y desviación estándar

² Criterio de información Akaike

³ Error absoluto medio

2012

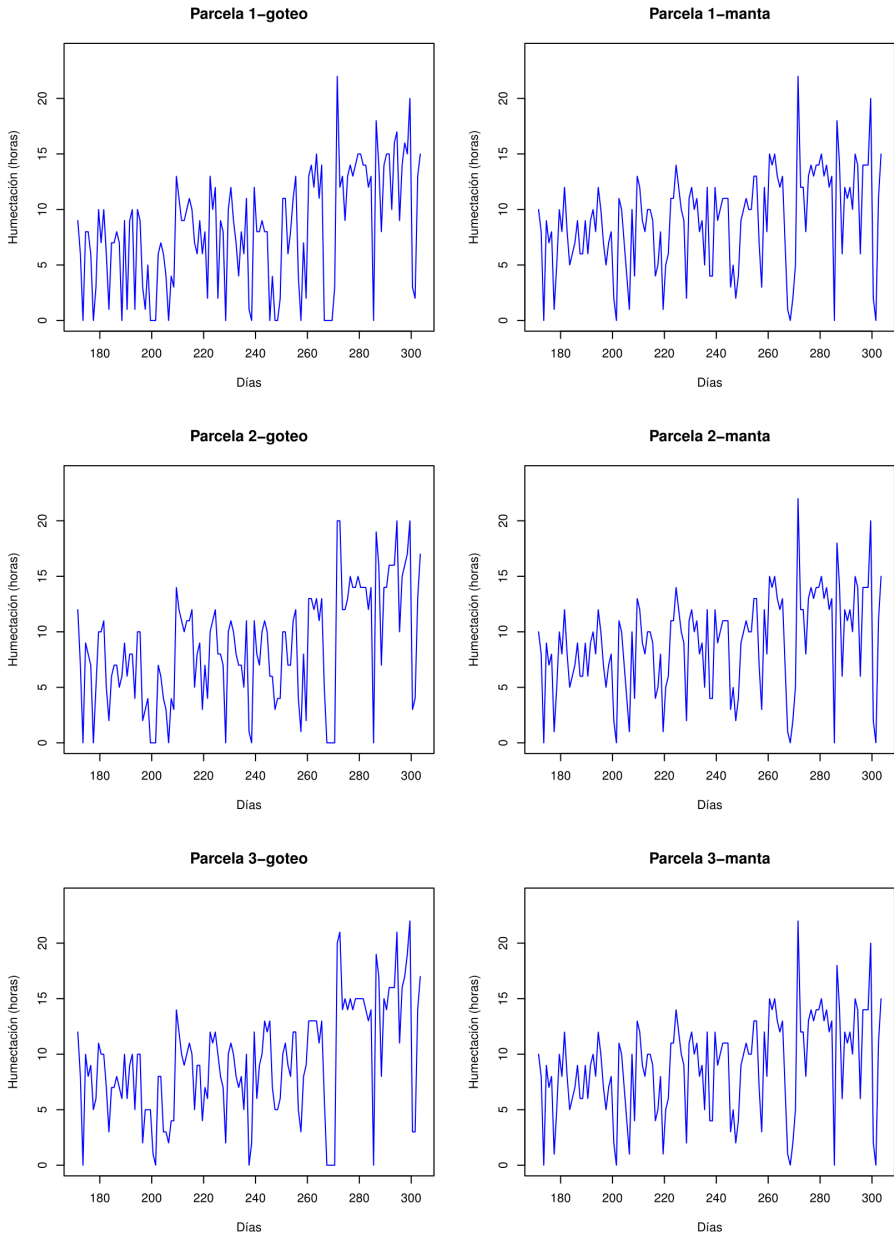


Figura 5.8: Duración de la humectación foliar diaria en tres parcelas de cítricos con riego por goteo y tres parcelas con riego a manta durante el período de estudio en el año 2012.

2013

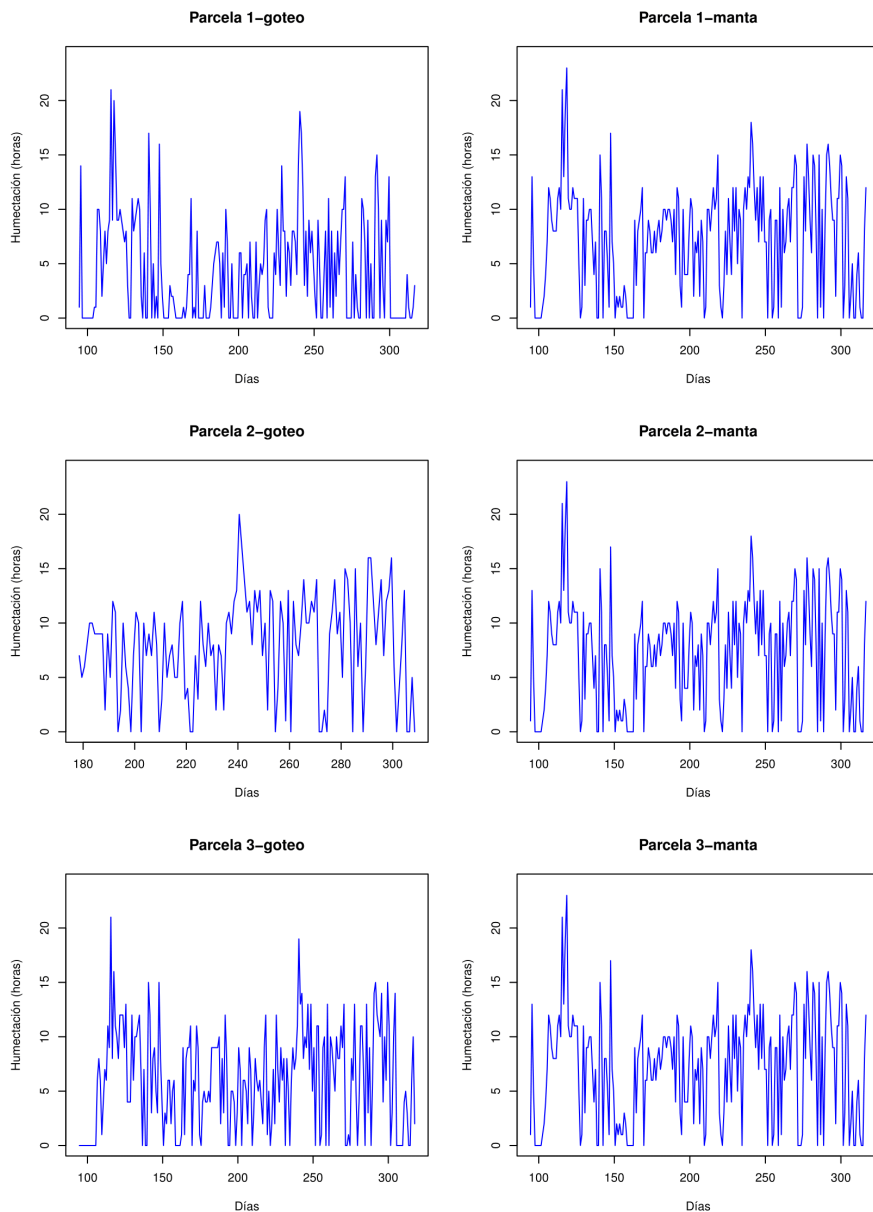


Figura 5.9: Duración de la humectación foliar diaria en tres parcelas de cítricos con riego por goteo y tres parcelas con riego a manta durante el período de estudio en el año 2013.

2012

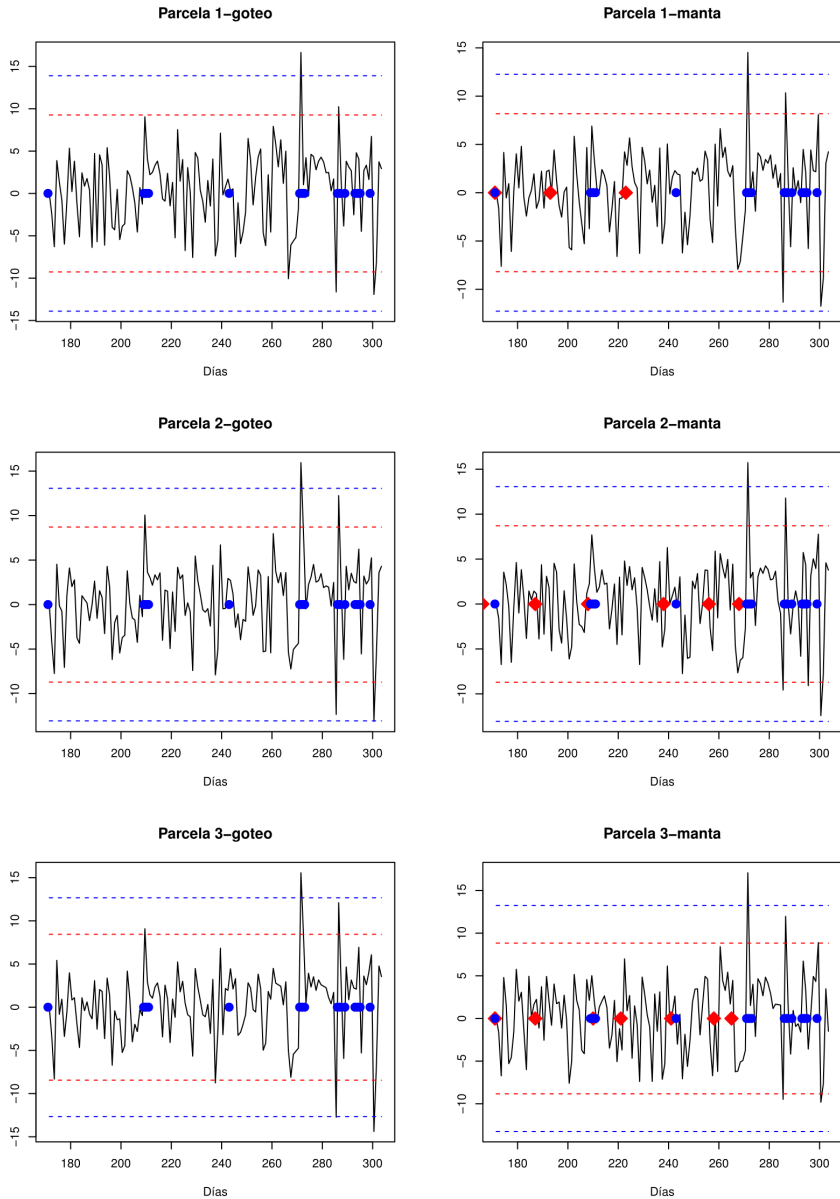


Figura 5.10: Residuos de los modelos ARIMA (1,1,1) de la duración de la humectación foliar en tres parcelas de cítricos con riego por goteo y tres parcelas con riego a manta durante el período de estudio en el año 2012. Las líneas discontinuas representan la desviación estándar de los residuos (rojo 2x y azul 3x). Los puntos azules son eventos de lluvia (> 0,2 mm) y los puntos rojos son riegos a manta.

2013

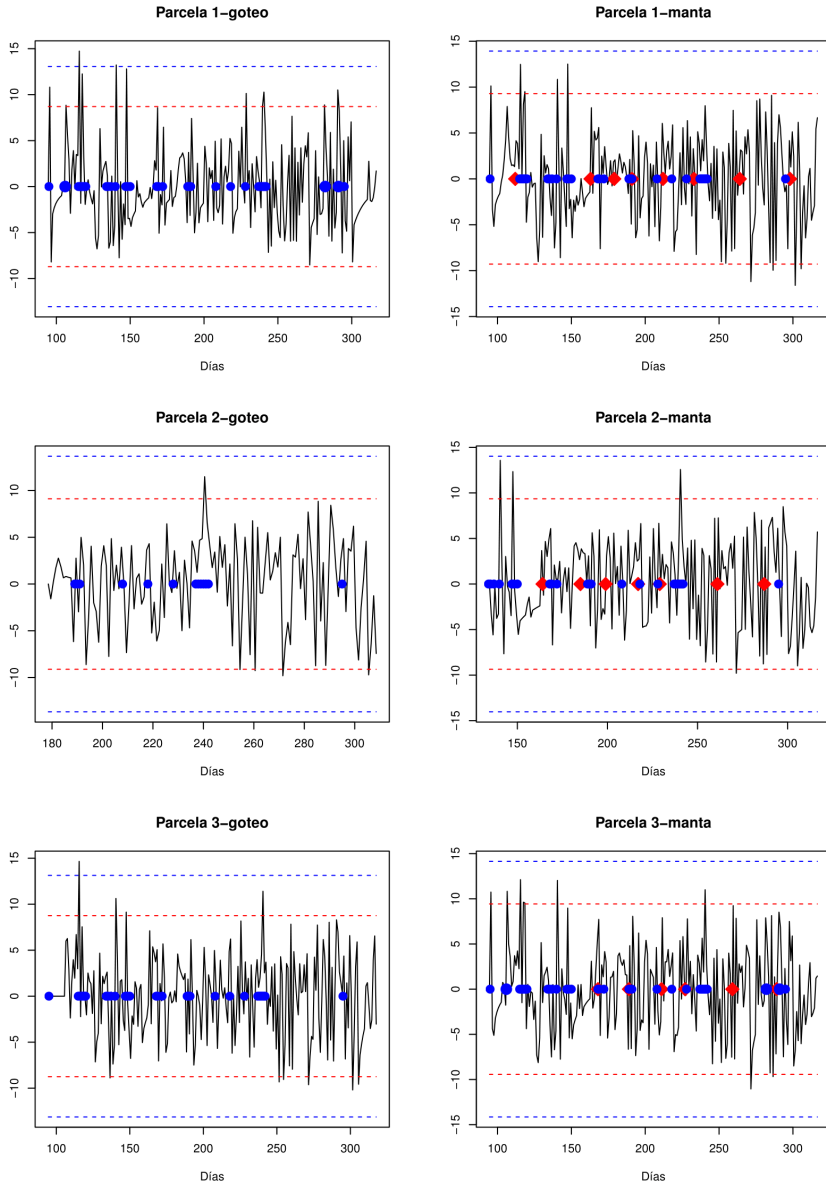


Figura 5.11: Residuos de los modelos ARIMA (1,1,1) de la duración de la humectación foliar en tres parcelas de cítricos con riego por goteo y tres parcelas con riego a manta durante los períodos de estudio en el año 2013. Las líneas discontinuas representan la desviación estándar de los residuos (rojo 2x y azul 3x). Los puntos azules son eventos de lluvia (> 0,2 mm) y los puntos rojos son riegos a manta.

El valor de la prueba del estadístico $\lambda_{2,t}$ (λ) propuesto por Chang *et al.* (1988) osciló entre 3,55 en la parcela 1-goteo y 3,86 en la parcela 3-goteo. Este valor atípico se detectó el 28 de septiembre de 2012, cuando se registró una precipitación de 106 mm.

En 2012 la HR media mensual en parcelas con riego a manta varió de 69,14% en la parcela 3-manta a 82,83% en la parcela 2-manta. En las parcelas regadas por goteo la HR media mensual varió de 67,69% en la parcela 1-goteo a 85,28% en la parcela 3-goteo. En 2013 la HR media mensual varió de 60,72% en la parcela 3-mata a 80,40% en la parcela 2-manta. En las parcelas con riego por goteo la HR media mensual varió de 60,99% en la parcela 2-goteo a 78,34% en la parcela 3-goteo. No se observaron diferencias sustanciales de la HR media mensual entre las parcelas con riego a manta y de riego por goteo.

5.4. DISCUSIÓN

En los períodos de observación visual de HF sólo se consiguió observar HF continua desde el anochecer hasta el amanecer en nueve de los 12 días evaluados. El viento fue el principal factor de distorsión en las observaciones visuales de HF. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las orientaciones y posiciones de la copa, ni tampoco entre el haz y el envés de la hoja. En estudios realizados con prateses y coníferas en EE.UU., Brewer y Smith (1997), concluyeron que las características estructurales de las hojas asociadas a la presencia de HF difieren según las especies vegetales y los hábitats. Estos autores indicaron también que ambas caras de las hojas, haz y envés, acumulan humectación, bien sea por el rocío o los eventos de lluvia. En el caso de los cítricos, hasta la fecha sólo se había estudiado la presencia de HF en el haz de las hojas. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la HF es igual de importante en el haz y en envés, por lo que hay que considerar la posible penetración del patógeno en ambas caras de la hoja. Por lo tanto, la aplicación de fungicidas para el control de la mancha marrón debe ser uniforme, cubriendo ambas caras de la hoja.

No se detectaron diferencias significativas en los nueve días de observaciones visuales de HF en las posiciones de la copa evaluadas. Con un número mayor de días evaluados, los sensores registraron duraciones de HF significativamente menores en el lado oeste respecto al este a 1 y 2 m de altura, pero únicamente en los días sin lluvia. Al igual que en nuestro caso, estudios realizados en cítricos en Florida por Santillán *et al.* (2009) no detectaron diferencias significativas en la duración de HF registrada por los sensores en los días con lluvia. Santos *et al.* (2008) no detectaron diferencias en la duración de HF entre la parte alta y baja de las plantas de algodón. Sin embargo, en plantas de café encontraron que la duración de HF fue mayor en la parte más baja mientras que en plantas de plátano fue mayor en la parte alta. Del mismo modo, Sentelhas *et al.* (2006) encontraron una duración de HF mayor en la parte superior de árboles de manzano y plantas de maíz, mientras que en otros estudios realizados en plantas de café y vid en espaldera la duración promedio de la HF entre la parte superior e inferior no fue significativamente diferente (Pedro, 1980; Lau *et al.*, 2000).

Los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a los citados por otros autores, que en general indican que la formación y distribución de la HF en la parte aérea de los cultivos no es homogénea, y depende de factores relacionados con las condiciones climáticas y otros aspectos del cultivo (Huber y Gillespie, 1992; Jacobs y Nieveen, 1995; Sentelhas *et al.*, 2005; Batzer *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2008; Dalla-Marta *et al.*, 2008; Santillán *et al.*, 2009; Dalla-Marta *et al.*, 2010). En general, los resultados obtenidos en un cultivo concreto no son extrapolables a otros, debido fundamentalmente a las diferencias en la arquitectura de las plantas y a la composición u estructura de la superficie de la cutícula de la hoja (Challen, 1962; Holloway, 1970). En los cultivos de porte bajo las hojas se encuentran muy cerca de la superficie del suelo y los espacios entre plantas son muy reducidos, por lo que hay menos circulación de aire y una mayor HR. En cambio, en el caso de cultivos frutales hay una mayor circulación de aire en la copa. Por lo tanto, los resultados obtenidos en cultivos hortícolas y de porte más bajo no puede extrapolarse directamente a otros cultivos de tipo arbóreo de porte más alto.

Dependiendo de la estación del año, la presencia de HF se detectó después de la puesta del sol y el secado durante el amanecer, aunque en los días que más se tardó el rocío en secarse fue a las 11:45 horas. Durante la noche, cuando todos los sensores detectaron la presencia de HF, se observó que más del 90% de las hojas

estaban mojadas. Aunque apenas es perceptible en los gráficos, la formación de HF se observó primero en la parte alta de la copa del árbol, seguido por la zona media y por último la parte más baja. El secado comenzó en general en la zona superior del lado este, excepto en algunos días en los que se inició en la parte superior del lado oeste antes de la salida del sol debido a acción del viento. Estos datos coinciden con las observaciones de otros estudios que señalaron que la HF comienza por lo general en las partes más altas de los árboles y que también el secado se inicia en la parte superior de la copa debido a la irradiación directa tras la salida del sol (Jacobs *et al.*, 2005; Sentelhas *et al.*, 2005; Santillán *et al.*, 2009). En sus trabajos, Dalla-Marta *et al.* (2008) indicaron que la información sobre la variabilidad espacial de la duración de HF en las diferentes zonas de la copa puede ser interesante de cara a determinar el sistema de formación y técnicas de poda más adecuadas para reducir la presencia de HF y el desarrollo de enfermedades.

En estudios realizados en girasol, Dalla-Marta *et al.* (2010) detectaron diferencias significativas entre las observaciones visuales HF y los registros de los sensores. Estos autores asociaron este resultado a las diferencias en las características físicas (i.e. color, tricomas, rugosidad de la superficie, etc.) de las superficies de los sensores y las hojas, que pueden afectar a la deposición y distribución de la HF. Por otro lado, hay que tener en cuenta que una lámina fina de agua que pasaría desapercibida para el ojo humano, podría ser suficiente para cerrar el circuito electrónico del sensor. Otra posible explicación puede estar relacionada con el hecho de que los sensores están menos influidos por las condiciones ambientales que el observador humano (Dalla-Marta *et al.*, 2010).

Algunos estudios de evaluación de modelos de HF incluyen observaciones visuales, en cambio otros simplemente comparan los modelos y sensores entre sí (Pedro y Gillespie, 1982; Wittich, 1995) (Tabla 5.5). La evaluación de los modelos y sensores de HF se realiza habitualmente con puntos de corte establecidos de antemano (Magarey *et al.*, 2005b). Esta aproximación tiene un gran inconveniente, ya que los puntos de corte prefijados no tienen por qué ser necesariamente los óptimos para los modelos. En las evaluaciones de modelos de HF se utilizan también índices estadísticos que valoran el ajuste y/o predicción global del modelo. Algunos de estos índices, como el *Bias* y los coeficientes de la regresión lineal de los residuos, permiten determinar si el modelo tiene problemas de sobre o infra-estimación, pero considerando únicamente su promedio (Wallach, 2006;

Dalla-Marta *et al.*, 2007; Sentelhas *et al.*, 2008). Otro método bastante utilizado en los modelos de HF es el ‘critical success index’ (CSI), que compara la proporción de horas que se clasifican correctamente con y sin humectación (Wilks, 1995; Dalla-Marta *et al.*, 2005; 2007). Este método arrastra también el problema señalado anteriormente de los umbrales preestablecidos. Nuestro estudio es el primero que utiliza el análisis de curvas ROC para la evaluación de modelos de HF. Este método tiene la ventaja respecto a los índices mencionados anteriormente que no necesita de un punto de corte predefinido. En el análisis de curvas ROC se evalúan todos los posibles puntos de corte del modelo y se escoge el óptimo en función de la proporción de verdaderos positivos y negativos obtenida en cada caso (Metz, 1978).

Los valores del coeficiente kappa de Cohen (k) obtenidos con los puntos de corte óptimos seleccionados indicaron un buen grado de concordancia de todos los sensores y modelos de HF evaluados, por lo que serían adecuados para su uso en condiciones comerciales. En el caso de los sensores Hobo y Spectrum, el grado de concordancia fue muy bueno en el lado este y bueno en el lado oeste. En los modelos HR y CART el grado de concordancia fue bueno en ambos lados de la copa del árbol. En las parcelas comerciales de cítricos se obtuvo también un buen grado de concordancia, incluso en algunos casos muy bueno, aunque en tres parcelas los valores de k se consideraron bajos o moderados.

Varios estudios sugieren umbrales de HR como estimador de la HF (Vincelli y Lorbeer, 1988; Griffieon *et al.*, 1992; Gleason *et al.*, 1994; Vancauwenberghe *et al.*, 1996). En varios estudios se ha encontrado una correlación positiva entre la formación de la HF y la HR promedio (Shaw, 1973; Zangvil, 1996; Sentelhas *et al.*, 2008). Sentelhas *et al.*, (2008) demostraron que el punto de corte óptimo para el modelo HR puede diferir según la localización. En su estudio, Smith (1958) fijó como umbral para la formación de HF una HR del 90%. Este autor indicó también que no es necesaria una HR del 100% para la formación de HF, basta con que la temperatura de la superficie foliar sea más baja que la del aire circundante. Sin embargo, otros estudios indican que hay muy poca correlación entre períodos de alta HR y HF (Wallin, 1963; Lomas y Shashowa, 1970; Francl y Panigrahi, 1997). Por su parte, Jones *et al.* (1980) señalaron que el uso de HR para estimar la humectación puede sobrestimar en algunos casos el riesgo de enfermedades en plantas. La medición de la duración de HF suele ser difícil debido a la complejidad

física de los parámetros micro-meteorológicas involucrados para que se forme (Sentelhas *et al.*, 2004), y la falta de métodos estándar para su medición (Magarey *et al.*, 1999; Dalla-Marta *et al.*, 2005). Además la estimación de la duración de HF se hace con diferentes parámetros micro-meteorológicos y métodos para generación de los modelos de HF (Tabla 5.6).

En nuestro estudio, el modelo basado en HR como estimador de la HF presentó una buena especificidad y sensibilidad. En análisis de curvas ROC se obtuvieron valores relativamente altos de AUC, que oscilaron entre 0,92 y 0,94. Cuando se evaluó la HR como estimador de la HF en los sensores Spectrum instalados en las parcelas comerciales de cítricos, se obtuvieron también valores altos de AUC, que oscilaron entre 0,83 y 0,96. El AUC y los puntos de corte óptimos seleccionados indicaron que la HR es un buen estimador de la duración de HF en parcelas de cítricos en estas condiciones. Teniendo en cuenta que en las parcelas de cítricos en España es relativamente habitual el registro de temperatura y HR, el modelo HR se considera un método práctico para la estimación de HF. Sobre la base de los resultados obtenidos, se recomienda un umbral de 87,45% de HR para la estimación de HF en ambas caras de la hoja. Recientemente, en su artículo de revisión Rowlandson *et al.* (2015) recomiendan también el uso del modelo empírico simple basado únicamente en HR para estimar la duración de HF, y evitar los condicionantes asociados al uso de sensores de HF (e.g. calibración, mantenimiento, etc.). La implementación del modelo HR permitirá obtener estimaciones de HF en la mayoría de la parcelas de cítricos españolas, que serán de gran utilidad para el desarrollo de sistemas de alerta de enfermedades y también para los análisis de riesgos de introducción de nuevas patologías.

Algunos estudios han demostrado que los factores relacionados con el riego incrementan la humectación en las parcelas y la incidencia de algunas enfermedades. Jacobs *et al.* (1990) señalaron que la diferencia en la duración de HF entre los sistemas de riego podría ser más acusada en zonas semi-áridas. En su estudio, Blad *et al.* (1978) relacionaron la severidad de los daños causados por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary en el cultivo de habas con las diferencias en el microclima inducidas por la arquitectura de las plantas y la frecuencia de riego. En ese mismo sentido, otros estudios concluyen también que una copa muy densa junto con una alta frecuencia de riego crea las condiciones de temperatura y humedad favorables para la infección y aumenta la severidad (Rotem y Palti,

1969; Palti y Rotem, 1973; Hipps *et al.*, 1977; Grey *et al.*, 1991). La incidencia y severidad de los daños causados por *A. solani* en patata y tomate se ha relacionado con el sistema de riego y su influencia en el microclima en la parcela (Rotem y Palti, 1969; Olanya *et al.*, 2009). De igual modo, Scherm y van Bruggen (1995) atribuyeron el aumento de la duración de HF en parcelas de lechuga al uso del riego a manta, que incrementa la HR y reduce la temperatura del aire. En experimentos llevados a cabo en invernadero, Kamel *et al.* (2008) encontraron que los ataques de *Botrytis cinerea* Pers. en tomate se iniciaron antes en plantas regadas a manta que las regadas por goteo. Las infecciones en hojas y frutos fueron también mayores en plantas regadas a manta que en las regadas por goteo. Michailides y Morgan (1992), observaron una mayor incidencia de *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not en pistacho con los riegos por aspersión de mayor duración. En su estudio en pistacho en California, Goldhamer *et al.* (2002) encontraron una relación directa entre los daños causados por *Alternaria* spp. y el sistema de riego empleado. En estos estudios se demostró que el riego a manta aumentaba la HR y la duración de HF respecto a las parcelas con riego localizado enterrado.

En nuestro caso no se detectó ninguna asociación entre los riegos a manta y la duración de HF en los análisis gráficos de los residuos y el análisis de intervenciones. Los incrementos de la duración de HF se asociaron únicamente con algunos eventos de lluvia. En el presente estudio, en 2012 la HR media mensual osciló entre 69,14 y 82,83% en parcelas con riego a manta y entre 67,69 y 85,28 % en las parcelas con riego por goteo. En 2013 la HR media mensual varió de 60,72 a 80,40% en parcelas con riego a manta y de 60,99 a 78,34% en parcelas con riego por goteo. En ambos años, sin diferencias notables entre los dos tipos de riego. En el estudio de Goldhamer *et al.* (2002) la HR en las parcelas regadas a manta fue del 40-75% respecto al 38-68% en las parcelas con riego por goteo enterrado. Claramente, los valores de HR obtenidos en nuestro estudio fueron superiores a los obtenidos por Goldhamer *et al.* (2002) en California, debido principalmente a que, como la mayoría de zonas citrícolas en España, las parcelas de estudio estaban situadas en zonas costeras caracterizadas por elevados niveles de HR. Por lo tanto, el posible efecto de riego sobre la HR y la duración de HF quedarían diluidos por los elevados niveles de HR.

Con los modelos de series temporales empleados en nuestro estudio sobre la dinámica de la HF con riego a manta y goteo se obtuvo un MAE de 3,1-3,9 horas. En otros estudios donde se evaluaron diferentes modelos físicos para estimar la duración de HF con el modelo CART, se obtuvieron valores de MAE que oscilaron entre 2,9 y 5,1 horas (Kim *et al.*, 2004). En otros trabajos realizados en EE.UU., Costa Rica, Canadá y Brasil se obtuvieron valores de MAE entre 1,3-6,5 horas (Kim *et al.*, 2010). Por su parte, Sentelhas *et al.* (2008) obtuvieron valores de MAE que oscilaron entre 1,8 a 4,4 horas con diferentes modelos y sensores de HF en diferentes localidades de EE.UU., Canadá, Italia y Brasil. Aunque estos estudios no tienen relación directa con la influencia de los sistemas de riego en la HF, son indicativos del buen nivel de ajuste alcanzado por nuestros modelos de series temporales.

Tabla 5.5: Descripción de algunos modelos para la estimación de la humectación foliar.

| Cultivo | Modelo | Sensores | Método estadístico de comparación | Tipo de comparación | | | Referencias bibliográficas |
|---------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|----------------------------------|
| | | | | M x S ¹ | M x O ² | S x O ³ | |
| Arroz | Microweather | Campbell 237 | - | Si | Si | No | Luo <i>et al.</i> (1999) |
| Arroz | Microweather | Campbell 237 | Regresión | Si | Si | No | Luo <i>et al.</i> (2000) |
| Césped | CART/SLD x HR ≥ 90% | Campbell 237 | CART /SLD | Si | No | No | Gleason <i>et al.</i> (1994) |
| Césped | CART/SLD/Wind model | Campbell 237 | Regresión | Si | No | No | Kim <i>et al.</i> (2002) |
| Césped | Modelo HR, CART Fuzzy logic | Campbell 237, AdconA723 y mbH | Test de Wilcoxon | Si | No | No | Kim <i>et al.</i> (2010) |
| Césped, café, algodón, maíz, soja. | Penman-Monteith | Campbell 237 | Regresión | Si | No | No | Sentelhas <i>et al.</i> (2006) |
| Césped, soja, maíz, tomate | RH threshold, PDP, EXT_RH | Campbell 237S, W, y W.F. Burrage. | Regresión | No | Si | No | Sentelhas <i>et al.</i> (2008) |
| Cítricos | - | LWS-L, Decagon | Regresión | No | No | No | Santillán <i>et al.</i> (2010) |
| Girasol | SWEB | LW (0/1) S.W | Regresión | No | No | Si | Dalla-Marta <i>et al.</i> (2010) |
| Guisante | SWEB | LWS-L, Decagon | Test Kolmogorov-Smirnov | Si | No | No | Richard <i>et al.</i> (2013) |
| Maíz, soja | Alex | Campbell 237 | - | No | Si | No | Kabela <i>et al.</i> (2009) |
| Patata | CUPID | - | - | No | No | No | Wilson <i>et al.</i> (1999) |
| Vid | SWEB | Campbell 237 | Regresión | Si | Si | Si | Magarey <i>et al.</i> (2006b) |
| Vid | - | - | CSI | No | No | Si | Dalla-Marta <i>et al.</i> (2008) |
| - | Fuzzy logic | Campbell 237 | ANOVA | Si | No | No | Kim <i>et al.</i> (2004) |
| - | EB I, EB II | Campbell 237 | CART | Si | No | No | Madeira <i>et al.</i> (2002) |

¹M x O, modelos vs. sensores; M x O, modelos vs. observaciones visuales; S x O, sensores vs. observaciones visuales.

Tabla 5.6: Parámetros meteorológicos utilizados en algunos modelos de estimación de la humectación foliar.

| Parámetros meteorológicos | Modelos de humectación foliar ¹ | | | | | | |
|---------------------------------|--|--------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--|--------------------------|-----------------------------|
| | CART | SWEB | Fuzzy | ExtRH | EB | MW | ALEX |
| Temperatura del aire | - | x | x | - | - | x | - |
| Temperatura del punto de rocío | x | - | - | x | - | - | - |
| Velocidad del viento | x | x | x | x | x | x | x |
| Radiación neta | - | x | x | - | - | - | - |
| Radiación global | - | - | - | - | x | x | - |
| Calor latente de vaporización | - | - | - | x | - | - | - |
| Lluvia | x | x | - | - | x | - | x |
| Cobertura y altura de las nubes | - | - | - | - | x | - | - |
| Humedad relativa | x | x | x | - | x | - | x |
| Contenido de humedad del suelo | - | - | - | - | - | - | x |
| Índice de densidad foliar | - | x | - | - | - | - | - |
| Índice del área foliar | - | x | - | - | - | - | - |
| Referencias bibliográficas | Gleason <i>et al.</i> (1994) Kim <i>et al.</i> (2004; 2010) Madeira <i>et al.</i> (2002) | Margarey <i>et al.</i> (1999; 2006a) | Kim <i>et al.</i> (2004; 2010) | Semelhas <i>et al.</i> (2008) | Anderson <i>et al.</i> (2000); Madeira <i>et al.</i> (2002) | Luo <i>et al.</i> (2000) | Kabela <i>et al.</i> (2009) |

¹ CART, classification and regression tree; SWEB, surface wetness energy balance; ExtRH, extended threshold; EB, energy balance; MW, microweather; ALEX, atmosphere land exchange; SLD, stepwise linear discriminant; Fuzzy, 'fuzzy control system'.

Capítulo 6

Capítulo 6

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en cada uno de los capítulos que constituyen la presente tesis doctoral, podemos extraer las conclusiones generales que se enumeran a continuación.

Capítulo 3. Aspectos epidemiológicos de la enfermedad

- 1) Se encontraron aislados patógenos de *A. alternata* en todos los órganos de la copa de los árboles analizados y en las hojas del suelo. Se detectaron también aislados patógenos en malas hierbas del género *Sonchus*, aunque en muy baja proporción. La amplia distribución del patógeno en la parcela limita notablemente las posibilidades de control de la enfermedad mediante técnicas de reducción de inóculo
- 2) La supervivencia del patógeno en las hojas jóvenes afectadas caídas al suelo se prolongó hasta los 63-76 días, coincidiendo con la descomposición total de la hojarasca. Estos resultados indican una mayor capacidad de supervivencia del patógeno en la hojarasca en condiciones semi-áridas respecto a las regiones de clima húmedo subtropical.
- 3) A diferencia de los estudios realizados en Florida, no se detectó una correlación significativa entre las colonias patógenas de *A. alternata* detectadas en el medio semi-selectivo respecto al total capturadas. Por lo tanto, las técnicas aerobiológicas que no permiten diferenciar los aislados patógenos de los saprofitos no serían adecuadas para el seguimiento del inóculo condiciones semi-áridas. Los datos obtenidos con la exposición de medio semi-selectivo indican que el inóculo del patógeno en el aire de la parcela puede encontrarse en cualquier momento del año.

- 4) En 2011, las infecciones se distribuyeron principalmente en primavera y otoño, con algunas infecciones también en verano. Sin embargo, en 2012 se concentraron casi exclusivamente en otoño, con tan sólo un único período de infección en primavera. Estos resultados contrastan con los datos de Florida, donde las plantas trampa se infectaron durante todo el año y el verano está considerado como el período crítico para la infección.
- 5) Los árboles de clasificación (CART) obtenidos indicaron que prácticamente todas las infecciones se produjeron en semanas con las lluvias $\geq 2,5$ mm y temperatura media $\geq 12,5^{\circ}\text{C}$. Se encontró una relación significativa y positiva entre la incidencia de la enfermedad en las plantas trampa con la pluviometría, los días de lluvia y la duración de la humectación foliar, pero únicamente en los cuantiles superiores. Una vez iniciadas las infecciones, estos factores meteorológicos incrementarían la incidencia de la mancha marrón.

Capítulo 4. Modelos de predicción

- 6) En las infecciones en condiciones controladas en 'Fortune' y 'Nova' fueron necesarias 38-48 horas de humectación foliar para un desarrollo significativo de la enfermedad. Por debajo de 12°C la eficiencia infectiva se redujo de forma progresiva, por encima de 27°C y a partir de 32°C la incidencia de la enfermedad fue muy baja, deteniéndose por completo a 35°C . Las temperaturas óptimas para la infección variaron de 20 y 25°C , por encima de las temperaturas subóptimas a las que el patógeno infecta habitualmente en campo.
- 7) La interrupción del período de humectación foliar afectó negativamente al proceso de infección del patógeno. Bajo las mismas condiciones de temperatura y dosis de inóculo, la presencia de un período seco de una hora detuvo el proceso de infección en 'Nova'. En el caso de 'Fortune', más susceptible a la enfermedad, fue necesaria una interrupción de al menos dos horas.
- 8) La duración del período de incubación fue menor con temperaturas de $20-25^{\circ}\text{C}$. El período de incubación más corto hasta la primera aparición

de síntomas se observó en ‘Fortune’ a las 17 horas y en ‘Nova’ a las 28 horas. La máxima incidencia de la enfermedad se observó 30 horas después de la infección en ‘Fortune’ y 60 horas en ‘Nova’. Debido a su corta duración, consideramos que la fase de incubación posterior a la infección no tendría un papel clave en el desarrollo de los modelos de predicción de la mancha marrón.

- 9) El modelo Alter-Rater desarrollado en Florida no presentó una capacidad predictiva adecuada en condiciones semi-áridas en ninguna de las dos variedades evaluadas, debido probablemente a su falta de adaptación. Los modelos de infección basados únicamente en temperatura y humectación foliar presentaron por lo general una baja capacidad de predicción, que mejoró ligeramente al incorporar el efecto de la lluvia.
- 10) Con el modelo SRS basado en temperatura y lluvia se obtuvo la mayor AUC en ‘Fortune’, pero no se consideró adecuado en esta variedad porque presentó una $pAUC_{0,9-1se}$ muy baja y todos sus puntos de corte estaban por debajo del nivel de sensibilidad deseado de 0,9. En cambio, el modelo SRS presentó los valores más altos de AUC y $pAUC_{0,9-1se}$ en ‘Nova’, con una sensibilidad de 0,93 y una especificidad de 0,84. Este modelo se ha integrado como un sistema de estación de avisos en la web ‘gipcitricos’ del IVIA, que incluye también una aplicación app para móviles.

Capítulo 5. Estimación de la duración de la humectación foliar

- 11) No se detectaron diferencias significativas entre las posiciones de la copa evaluadas en los nueve días de observaciones visuales de humectación foliar. Con un número mayor de días evaluados, los sensores registraron duraciones de humectación foliar significativamente menores en el lado oeste respecto al este a 1 y 2 m de altura, pero únicamente en los días sin lluvia.
- 12) Los valores de AUC y del coeficiente kappa de Cohen obtenidos con los puntos de corte óptimos seleccionados indicaron un buen grado de concordancia de todos los sensores y modelos de humectación foliar

evaluados, por lo que serían adecuados para su uso en condiciones comerciales.

- 13) El modelo basado en humedad relativa se considera el método más práctico para la estimación de humectación foliar en cítricos. Sobre la base de los resultados obtenidos, se recomienda un punto de corte de 87,45% de humedad relativa para la estimar la humectación foliar en ambas caras de la hoja.
- 14) En las parcelas comerciales de cítricos se obtuvo también un buen grado de concordancia entre el modelo basado en humedad relativa y los sensores Spectrum, incluso en algunos casos muy bueno, aunque en tres parcelas los valores se consideraron bajos o moderados.
- 15) No se detectó ninguna asociación entre los riegos a manta y la duración de humectación foliar en los análisis de los residuos y las intervenciones de las series temporales. Los incrementos de la duración de humectación foliar se asociaron únicamente con algunos eventos de lluvia. El posible efecto de riego a manta sobre la duración de la humectación foliar quedaría diluido por los elevados niveles de humedad relativa habituales en la zona de estudio.

Capítulo 7

Capítulo 7

BIBLIOGRAFÍA

- AEMET. Agencia Estatal de Meteorología. 2013. <http://www.aemet.es/es/noticias>.
- Agam, N., and Berliner, P.R. 2006. Dew formation and water vapor adsorption in semi-arid environments—A review. *Journal of Arid Environments*, 65:572-590.
- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*. 5th ed. Elsevier Academic Press, San Diego, USA. 922 p.
- Akamatsu, H., Taga, M., Kodama, M., Johnson, R., Otani, H., and Kohmoto, K. 1999: Molecular karyotypes for *Alternaria* plant pathogens known to produce host-specific toxins. *Current Genetics*, 35:647-656.
- Albrigo, L.G., Timmer, L.W., Townsend, K., and Beck, H.W. 1997. Copper fungicide residue for disease control and potential for spray burn. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 110:67-70.
- Alderman, S.C., and Beute, M.K. 1986. Influence of temperature and moisture on germination and germ tube elongation of *Cercospora arachidicola*. *Phytopathology*, 76:715-719.
- Aldwinckle, H.S., Pearson, R.C., and Seem, R.C. 1980. Infection periods of *Gymnosporangium juniper-virginianae* on apple. *Phytopathology*, 70:1070-1073.
- Alwan, L.C., and Roberts, H.V., 1988. Time series modeling for statistical process control. *Journal of Business and Economic Statistics*, 6:87-95.

- Allen, S.J., Brown, J.F., and Kochman, J.K. 1983. Effect of temperature, dew period, and light on the growth and development of *Alternaria helianti*. *Phytopathology*, 73:893-896.
- Ajiro, N., Miyamoto, Y., Masunaka, A., Tsuge, T., Yamamoto, M., Ohtani, K., Fukumoto, T., Gomi, K., Peever, T.L., Izumi, Y., Tada, Y., Akimitsu, K. 2010. Role of the host-selective ACT-toxin synthesis gene ACTTS2 encoding an enoyl-reductase in pathogenicity of the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *Phytopathology*, 100:120-126.
- Andersen, B., Hansen, M.E., and Smedsgaard, J. 2005: Automated and unbiased image analyses as tools in phenotypic classification of small-spored *Alternaria* spp. *Phytopathology*, 95:1021-1029.
- Anderson, M.C., Norman, J.M., Meyers, T.P., and Diak, G.R. 2000. An analytical model for estimating canopy transpiration and carbon assimilation fluxes based on canopy light-use efficiency. *Agricultural and Forest Meteorology*, 101:265-289.
- Arauz, L.F., and Sutton, T.B. 1989. Temperature and wetness duration requirements for apple infection by *Botryosphaeria obtusa*. *Phytopathology*, 79:440-444.
- Arauz, L.F., and Sutton, T.B. 1990. Effect of interrupted wetness periods on spore germination and apple infection by *Botryosphaeria obtusa*. *Phytopathology*, 80:1218-1220.
- Aust, H.J., Bashi, E., and Rotem, J. 1980. Flexibility of plant pathogens in exploiting ecological and biotic conditions in the development of epidemics. Pages 46-56 in: *Comparative Epidemiology*. J. Palti and J. Kranz, eds. Pudoc, Wageningen, The Netherlands.
- Badal, J., García-Jiménez, J., Vicent, A., Peris, A., Zornoza, C., Armengol, J., Alfaro-Lassala, F., y Cuenca, F. 2004. Conocimientos sobre la epidemiología de *Alternaria alternata* pv. *citri* y su utilización en el diseño de estrategias de control de la mancha marrón de los cítricos. *Phytoma-España*, 164:112-116.
- Badal., J., Zornoza, C., Armengol, J., Cuenca, F., Alfaro-Lassala, F. y García-Jiménez, J., 2006: Evaluación de la capacidad predictiva de un modelo

- epidemiológico (Alteriam1.0) para el control de *Alternaria alternata* pv. *citri*. XIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, Murcia,. 183 p.
- Baker, S.G., and Pinsky, P.F. 2001. A proposed design and analysis for comparing digital and analog mammography: special receiver operating characteristic methods for cancer screening. *Journal of the American Statistical Association*, 96:421-428.
- Baker, F.A., Verbyla, D.L., Hodges, C.S., and Ross, E.W. 1993. Classification and regression tree analysis for assessing hazard of pine mortality caused by *Heterobasidion annosum*. *Plant Disease*, 77:136-139.
- Bashi, E., and Rotem, J., 1974. Adaptation of four pathogens to semi-arid habitats as conditioned by penetration rate and germinating spore survival. *Phytopathology*, 64:1035-1039.
- Bashi, E., Rotem, J., Pinnschmidt, H., and Kranz, J. 1983. Influence of controlled environment and age on development of *Alternaria macrospora* and on shedding of leaves in cotton. *Phytopathology*, 73:1145-1147.
- Bass, B., Savdie, I., and Gillespie, T.J. 1991. Simulation of leaf wetness duration of field corn. *Agricultural and Forest Meteorology*, 57:69:84.
- Batzer, J.C., Gleason, M.L., Taylor, S.E., Koehler, K.J., and Monteiro, J.E.B.A. 2008. Spatial heterogeneity of leaf wetness duration in apple trees and its influence on performance of a warning system for sooty blotch and flyspeck. *Plant Disease*, 92:164-170.
- Beam, C.A., Conant, E.F., Sickles, E.A., and Weinstein, S.P. 2003. Evaluation of proscriptive health care policy implementation in screening mammography. *Radiology*, 229:534-540.
- Becker, C.M., and Burr, T.J. 1994. Discontinuous wetting and survival of conidia of *Venturia inaequalis* on apple scab. *Phytopathology*, 84:372-378.
- Bella, P., Guarino, C., La Rosa, R., and Catara, A. 2001: Severe infections of *Alternaria* spp. on a mandarin hybrid. *Journal of Plant Pathology*, 83:231.

- Bhatia, A., Roberts, P.D., and Timmer, L.W. 2003: Evaluation of the Alter-Rater model for timing of fungicide applications for control of *Alternaria* brown spot of citrus. *Plant Disease*, 87:1089-1093.
- Blad, B.L., Steadman, J.R., and Weiss, A. 1978. Canopy structure and irrigation influence white mold disease and microclimate of dry edible beans. *Phytopathology*, 68:1431-1437.
- Bliss, D.E., and Fawcett, H.S. 1944: The morphology and taxonomy of *Alternaria citri*. *Mycologia*, 36:469-502.
- Bondalapati, K.D., Stein, J.M., Neate, S.M., Halley, S.H., Osborne, L.E., and Hollingsworth, C.R. 2012. Development of weather-based predictive models for *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation for spring malting barley. *Plant Disease*, 96:673-680.
- Bregaglio, S., Donatelli, M., Confalonieri, R., Acutis, M., and Orlandini, S. 2011. Multi metric evaluation of leaf wetness models for large-area application of plant disease models. *Agricultural and Forest Meteorology*, 151:1163-1172.
- Brewer, C.A., and Smith, W.K. 1997. Patterns of leaf surface wetness for mountain and subalpine plants. *Plant, Cell and Environment* 20:1-11.
- Cade, B.S., and Noon, B.R. 2003. A gentle introduction to quantile regression for ecologists. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 1:412-420.
- Cade, B.S., Terrell, J.W., and Schroeder, R.L. 1999. Estimating effects of limiting factors with regression quantiles. *Ecology*, 80:311-323.
- Campbell, C. L., and Maddem, L. V. 1990: Introduction to plant disease epidemiology. New York: Wiley, 532 p.
- Canihos, Y., Erkilic, A., and Timmer, L.W. 1997. First report of *Alternaria* brown spot of *Minneola* tangelo in Turkey. *Plant Disease*, 81:1214.
- Canihos, Y., Peever, T.L., and Timmer, L.W. 1999: Temperature, leaf wetness, and isolate effects on infection of *Minneola* tangelo leaves by *Alternaria* spp. *Plant Disease*, 83:429-433.

- Cantone, F.A., Dunke, L.D. 1990. Resistance in susceptible maize to *Heminthosporium carbonum* race 1 induced by prior inoculation with race 2. *Phytopathology*, 80:1221-1224.
- Castro, B.L., Leguizamon, J., and Lopez, A. 1995: Determinacion del agente causal de la mancha foliar de los citricos en la zona cafetera Colombiana. *Fitopatologia Colombiana*, 19:31-35.
- Challen, S.B. 1962. The retention of aqueous suspensions on leaf surfaces. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 14:707-14.
- Chang, I., Tiao, G.C. and Chen, C., 1988. Estimation of Time-Series Parameters in the Presence of Outliers. *Technometrics*, 30:193-204.
- Chapa, L. 2006. Determinación de las condiciones de temperatura y tiempo de humectación para la infección de *Alternaria alternata* pv. *citri* en mandarina Fortune. Trabajo Final de Carrera. ETSMRE, Universidad Politécnica de Valencia.
- Chongo, G., and Bernier, C.C. 2000. Effects of host, inoculum concentration, wetness duration, growth stage, and temperature on anthracnose of lentil. *Plant Disease*, 84:544-548.
- Coakley, S. M., and Line, R. F. 1981. Quantitative relationships between climatic variables and stripe rust epidemics on winter wheat. *Phytopathology*, 71:461-467.
- Coakley, S.M., McDaniel, L.R., and Shaner, G. 1985. Model for prediction of septoria tritici blotch severity on winter wheat. *Phytopathology*, 75:1245-1251.
- Cohen, J. 1968. Weighted kappa: nominal scale agreement with provision for scaled disagreement or partial credit. *Psychological Bulletin*, 70:213-220.
- Copes, W.E., and Thomson, J.L. 2008. Survival analysis to determine the length of the incubation period of Camellia twig blight caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Disease*, 92:1177-1182.
- Cromwell, J.B., Labys, W.C., and Terraza, M. 1994. Univariate tests for time series models. Sage Publications, Inc., Thousand Oaks, CA, 104 p.

- Cuenca, J., Aleza, P., Vicent., A, Brunel, D., Ollitrault, P. 2013. Genetically based location from triploid populations and gene ontology of a 3.3-Mb genome region linked to *Alternaria* brown spot resistance in citrus reveal clusters of resistance genes. *PLoS ONE*, 8:e76755.
- Dalkilic, Z., Timmer, L.W., and Gmitter, F.G. 2005: Linkage of an *Alternaria* disease resistance gene in mandarin hybrids with RAPD fragments. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130:191-195.
- Dalla-Marta, A., Magarey, R.D., Martinelli, L., and Orlandini, S. 2007. Leaf wetness duration in sunflower *Helianthus annuus*. Analysis of observations, measurements and simulations. *European Journal of Agronomy*, 26:310-316.
- Dalla-Marta, A., Magarey, R.D., and Orlandini, S. 2005. Modelling leaf wetness duration and downy mildew simulation on grapevine in Italy. *Agricultural and Forest Meteorology*, 132:84-95.
- Dalla-Marta, A., Martinelli, L., and Orlandini, S. 2008. Leaf wetness spatial variability within grapevine canopy. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59:78-82.
- Dalla-Marta, A., and Orlandini, S. 2010. Analysis of leaf wetness duration dynamics on a sunflower *Heliantus annuus* L. canopy. *Physics and Chemistry of the Earth*, 35:31-34.
- Davis, D.P., Jacobi, J.C., and Backman, P.A. 1993. Twenty-four hour rainfall, a simple environmental variable for predicting peanut leaf spot epidemics. *Plant Disease*, 77:722-725.
- De Goes, A de., Montes de Oca, A.G., and Reis, R.F., 2001: Ocorrência de la mancha de *Alternaria* en mandarina Dancy en el estado de Rio de Janeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 26 (Suppl.):386.
- Delong, E.R., Delong, D.M., and Clarkepearson, D.I., 1988. Comparing the areas under 2 or more correlated receiver operating characteristic curves - a nonparametric approach. *Biometrics*, 44:837-845.
- De Souza MC, Stuchi ES, de Goes A. 2009. Evaluation of tangerine hybrid resistance to *Alternaria alternata*. *Scientia Horticulturae*, 123:1-4.

- De Wolf, E.D., and Isard, S.A. 2007. Disease cycle approach to plant disease prediction. *Annual Review of Phytopathology*, 45:203-220.
- De Wolf, E.D., Madden, L.V., and Lipps, P.E. 2003. Risk assessment models for wheat *Fusarium* head blight epidemics based on withinseason weather data. *Phytopathology*, 93:428-435.
- Dewdney, M.M., Biggs, A.R., and Turechek, W.W. 2007. A statistical comparison of the blossom blight forecasts of MARYBLYT and Cougarblight with receiver operating characteristic curve analysis. *Phytopathology*, 97:1164-1176.
- Dhingra, O.D., and Sinclair, J.B. 1995. *Basic plant pathology methods*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton FL. 434 p.
- Dodd, L.E., and Pepe, M.S. 2003. Partial AUC estimation and regression. *Biometrics*, 59:614-623.
- Doigde, E.M., 1929. A study of some *Alternarias* infecting citrus in South Africa. Union of South Africa Department of Agricultural Sciences Bulletin, 69: 1-29.
- Duthie, J.A. 1997. Models of the response of foliar parasites to the combined effects of temperature and duration of wetness. *Phytopathology*, 87:1088-1095.
- Duttweiler, K.B., Gleason, M.L., Dixon, P M., Sutton, T.B., McManus, P.S., and Monteiro, J.E.B.A. 2008. Adaptation of an apple sooty blotch and flyspeck warning system for the Upper Midwest United States. *Plant Disease*, 92:1215-1222.
- Elena, K., 2006: *Alternaria* brown spot of *Minneola* in Greece; evaluation of citrus species susceptibility. *European Journal of Plant Pathology*, 115:259-262.
- Eisensmith, S.P., and Jones, A.L. 1981. A model for detecting infection periods of *Coccomyces hiemalis* sour cherry. *Phytopathology*, 71:728-731.
- Erkilic, A., Canihos, Y., Bicipi, M., and Kurt, S. 1999. Iprodione resistance of *Alternaria alternata* f.sp. *citri* *Minneola* tangelo isolates in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 23:1051-1056.

- Evans, K.J., Nyquist, W.E., and Latin, R.X. 1992. A model based on temperature and leaf wetness duration for establishment of *Alternaria* leaf blight of muskmelon. *Phytopathology*, 82:890-895.
- Eversmeyer, M.G., and Kramer, C.L. 1998. Models for early spring survival of wheat leaf rust in the central Great Plains. *Plant Disease*, 82:987-991.
- Fabre, F., Dedryver, C.A., Leterrier, J.L., and Plantegenest, M. 2003. Aphid abundance on cereals in autumn predicts yield losses caused by *Barley yellow dwarf virus*. *Phytopathology*, 93:1217-1222.
- Fabre, F., Plantegenest, M., and Yuen, J. 2007. Financial benefit of using crop protection decision rules over systematic spraying strategies. *Phytopathology*, 97:1484-1490.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2012. www.faostat.fao.org.
- Farr, D.F., Bills, G.F., Chamuris, G.P., and Rossman, A.Y. 1989. *Fungi on plants and plant products in the United States*. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, U.S.A. 1252 p.
- Fawcett, T., 2006. An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognition Letters*, 27:861-874.
- Fidanza, M.A., Dernoeden, P.H., and Grybauskas, A.P. 1996. Development and field validation of a brown patch warning model for perennial ryegrass turf. *Phytopathology*, 86:385-390.
- Francl, L.J., and Panigrahi, S. 1997. Artificial neural network models of wheat leaf wetness. *Agricultural and Forest Meteorology*, 88: 57-65.
- Franklin, J. 2009. *Mapping species distributions. Spatial inference and prediction*. Cambridge University Press, New York. 3-118 p.
- Galán-Soldevilla, C., Cariñanos, P., Alcázar-Teno, P., and Domínguez-Vilches, E. 2007. *Spanish aerobiology network (REA): Management and quality manual*. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba, 36 p.
- García-Marí, F., Granda, C., Zaragoza, S., and Agustí, M. 2002. Impact of *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae) on leaf area

- development and yield of mature citrus trees in the Mediterranean area. *Journal of Economic Entomology*, 95:966-974.
- Garibaldi, A. 1979. Studies on epidemiology and control of *Alternaria* blight of Carnation. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Universiteit Gent*, 44:429-437.
- Gent, D.H., Mahaffee, W.F., McRoberts, N., and Pfender, W.F. 2013. The use and role of predictive systems in disease management. *Annual Review of Phytopathology*, 51:267-89.
- Gent, D.H., and Ocamp, C.M. 2009. Predicting infection risk of hop by *Pseudoperonospora humuli*. *Phytopathology*, 99:1190-1198.
- Gleason, M.L., Taylor, S.E., Loughin, T.M., and Koehler, K.J. 1994. Development and validation of an empirical model to estimate the duration of dew periods. *Plant Disease*, 78:1011-1016.
- Gillespie, T.J., and Sentelhas, P.C. 2008. Agrometeorology and plant disease management - a happy marriage. *Scientia Agricola*, 65:71-75.
- Goldhamer, D.A., Michailides, T.J., and Morgan, D.P. 2002. Buried drip irrigation reduces fungal disease in pistachio orchards. *California Agriculture*, 4:133-138.
- Golmohammadi, M., Andrew, M., Peever, T.L., Peres, N.A., and Timmer, L.W. 2006. Brown spot of tangerine hybrid cultivars Minneola, Page and Fortune caused by *Alternaria alternata* in Iran. *Plant Pathology*, 55:578.
- Grey, W.E., Engel, R.E., and Mathre, D.E. 1991. Reaction of spring barley to common root rot under several moisture regimes: Effect on yield components, plant stand, and disease severity. *Canadian Journal of Plant Science*, 71:461-472.
- Griffieon, H., Kornet, J.G., and Schurer, K. 1992. An optical leaf wetness sensor. *Acta Horticulturae*, 304:127-135.
- Grove, G.G., and Boal, R. J. 1991. Influence of temperature and wetness duration on infection of immature apple and pear fruit by *Phytophthora cactorum*. *Phytopathology*, 81:1465-1471.

- Grünwald, N.J., Rubio-Covarrubias, O.A., and Fry, W.E. 2000. Potato late-blight management in the Toluca Valley: forecasts and resistant cultivars. *Plant Disease*, 84:410-416.
- Guyot, J., Condina, V., Doare, F., Cilas, C., and Sache, I. 2010. Segmentation applied to weather-disease relationships in South American leaf blight of the rubber tree. *European Journal of Plant Pathology*, 126:349-362.
- Hanley, J.A., and McNeil, B.J. 1982. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*, 143:29-36.
- Hastie, T., Tibshirani, R., and Friedman, J.H. 2009. *The elements of statistical Learning*. 2nd ed. New York: Springer.
- Hatta, R., Ito, K., Hosaki, Y., Tanaka, T., Tanaka, A., Yamamoto, M., Akimitsu, K., and Tsuge, T. 2002. A conditionally dispensable chromosome controls host-specific pathogenicity in the fungal plant pathogen *Alternaria alternata*. *Genetics*, 161:59-70.
- Hatta, R., Shinjo, A., Ruswandi, S., Kitani, K., Yamamoto, M., Akimitsu, K., and Tsuge, T. 2006. DNA transposon fossils present on the conditionally dispensable chromosome controlling AF-toxin biosynthesis and pathogenicity of *Alternaria alternata*. *Journal of General Plant Pathology*, 72:210-219.
- Herr, L.J., and Lipps, P.E. 1982. *Alternaria helianthi* on sunflower in Ohio. *Plant Disease*, 66:509-512.
- Herrera-Isla, L. 1992. La mancha parda de los cítricos en Cuba. *Levante Agrícola*, 317-318:49-50.
- Hestbjerg, H., Wolffhechel, H., and Dissing, H. 1994. Development of *Ramularia* Leaf-Spot on Sugar-Beet as Influenced by Temperature and the Age of the Host-Plant. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift*, 140:293-300.
- Hipps, L.E., Blad, B.L., Weiss, A., and Steadman, J.R. 1977. Microclimate of dry edible beans as influenced by irrigation. Pages 73-74 in: Preprints, conf. Agric. For. Meteorolog. 13th. American Meteorological society, Boston Mass.

- Holloway, P.J. 1970. Surface factors affecting the wetting of leaves. *Pesticide Science*, 1:156-163.
- Huber, L., and Gillespie, T.J. 1992. Modeling leaf wetness in relation to plant-disease epidemiology. *Annual Review of Phytopathology*, 30:553-577.
- Hughes, G., McRoberts, N., and Burnettc, F.J. 1999. Decision-making and diagnosis in disease management. *Plant Pathology*, 48:147-153.
- Humpherson-Jones, F.M., and Maude, R.B. 1982. Studies on the epidemiology of *Alternaria brassicicola* in *Brassica oleracea* seed production crops. *Annals of Applied Biology*, 100:61-71.
- Hutton, D.G. 1989. The appearance of iprodione resistance in *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of Murcott tanger. *Australasian Plant Pathology*, 18:32-32.
- Hutton, D.G., and Mayers, P.E., 1988: Brown spot of Murcott tanger caused by *Alternaria alternata* in Queensland. *Australasian Plant Pathology*, 17:69-73.
- Hyndman, R.J. 2014. Forecast: Forecasting functions for time series and linear models. R package version 5.2. <http://CRAN.R-project.org/package=forecast>.
- Isshiki, A., Akimitsu, K., Yamamoto, M., and Yamamoto, H. 2001. Endopolygalacturonase is essential for citrus black rot caused by *Alternaria citri* but not brown spot caused by *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14:49-757.
- Jackson, S.L., and Bayliss, K.L. 2011. Spore traps need improvement to fulfil plant biosecurity requirements. *Plant Pathology*, 60:801-810.
- Jacobs, A.F.G., Heusinkveld, B.G., and G.J.T. Kessel. 2005. Simulating of leaf wetness duration within a potato canopy. *Netherlands Journal of Agricultural Sciences*, 53:151-166.
- Jacobs, A.F.G., and Nieveen, J.P. 1995. Formation of dew and the drying process within crop canopies. *Meteorological Applications*, 2:249-256.

- Jacobs, A.F.G., Van Pul, W.A.J., and Van Dijken, A. 1990. Similarity of moisture dew profiles within a corn canopy. *Journal of Applied Meteorology*, 29:1300-1306.
- Jeffrey, K.K., Lipps, P.E., and Herr, L.J. 1984. Effects of isolate virulence, plant age, and crop residues on seedling blight of sunflower caused by *Alternaria helianthi*. *Phytopathology*, 74:1107-1110.
- Jiang, Y.L., Metz, C.E., and Nishikawa, R.M., 1996. A receiver operating: Characteristic partial area index for highly sensitive diagnostic tests. *Radiology*, 201:745-750.
- Johnson, D.A., Alldredge, J.R., and Vakoch, D.L. 1996. Potato late blight forecasting models for the semiarid environment of south-central Washington. *Phytopathology*, 86:480-484.
- Johnson, L.J., and Johnson, R.D., Akamatsu, H., Salamiah, A., Otani, H., Kohmoto, K., and Kodama, M. 2001. Spontaneous loss of a conditionally dispensable chromosome from the *Alternaria alternata* apple pathotype leads to loss of toxin production and pathogenicity. *Current Genetics*, 40:65-72.
- Jonathan, E. M., and Hille, J. 2001. Host-selective toxins as agents of cell death in plant–fungus interactions. *Molecular Plant Pathology*, 4:229-239
- Jones, H.G. 1992. *Plants and microclimate: a quantitative approach to environmental plant physiology*, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, 428 p.
- Jones, V.P., Brunner, J.F., Grove, G.G., Petit, B., Tangren G.V., and Jones, W.E. 2010. A web-based decision support system to enhance IPM programs in Washington tree fruit. *Pest Management Science*, 66:587-595.
- Jones, A.L., Lillevik, S.L., Fisher, P.D., and Stebbins, T.C. 1980. A microcomputer-based instrument to predict primary apple scab infection periods. *Plant Disease*, 64:69-72.
- Kabela, E.D., Hornbuckle, B.K., Cosh, M.H., Anderson, M.C., and Gleason, M.L. 2009. Dew frequency, duration, amount, and distribution in corn

- and soybean during SMEX05. *Agricultural and Forest Meteorology*, 149:11-24.
- Kang, J.C., Crous, P.W., McHau, G.R.A., Serdani, M., and Song, S.M. 2002: Phylogenetic analysis of *Alternaria* spp. associated with apple core rot and citrus black rot in South Africa. *Mycological Research*, 106:1151-1162.
- Kamel, A., Nicot, P.C., Guechi, A., Bardin, M., and Chibane, M. 2008. Grey mould development in greenhouse tomatoes under drip and furrow irrigation. *Agronomy for Sustainable Development*, 28:403-409.
- Kennelly, M.M., Gadoury, D.M., Wilcox, W.F., Magarey, P.A., and Seem, R.C. 2007. Primary infection, lesion productivity, and survival of sporangia in the grapevine downy mildew pathogen, *Plasmopara viticola*. *Phytopathology*, 97:512-522.
- Kiely, T.B., 1964. Brown spot of Emperor mandarin. *Agricultural Gazette of New South Wales*, 75:854-856.
- Khare, U.K., and Nema, K.G. 1981. Studies on purple blotch of onion-sporulation on host and dispersal of conidia. *India Phytopatology*, 34:214-218.
- Kim, K.S., Taylor, S.E., and Gleason M.L. 2004. Development and validation of a leaf wetness duration model using a fuzzy logic system. *Agricultural and Forest Meteorology*, 127:53-64.
- Kim, K.S., Taylor, S.E., Gleason, M.L., and Koehler, K.J. 2002. Model to enhance site-specific estimation of leaf wetness duration. *Plant Disease*, 86:179-185.
- Kim, K.S., Taylor, S.E., Gleason, M.L., Villalobos, R., and Arauz, L.F. 2005. Estimation of leaf wetness duration using empirical models in North-Western Costa Rica. *Agricultural and Forest Meteorology*, 129:53-67.
- Kim, K.S., Taylor, S.E., Gleason, M.L., Nutter F.W., Coop, L.B., Pfender, W.F., Seem, R.C., Sentelhas, P.C., Gillespie, T.J., Dalla-Marta, A., and Orlandini, S. 2010. Spatial portability of numerical models of leaf wetness duration based on empirical approaches. *Agricultural and Forest Meteorology*, 150:871-880.

- Klemm, O., Milford, C., Sutton, M.A., van Putten, E., and Spindler, G. 2002. A climatology of leaf surface wetness. *Theoretical and Applied Climatology*, 71:107-117.
- Koenker, R. 2013. Quantreg: quantile regression. R package version 4.98. <http://CRAN.R-project.org/package=quantreg>.
- Koenker, R., and Bassett, G. 1978. Regression quantiles. *Econometrica*, 46:33-50.
- Kogan, M. 1998. Integrated Pest Management: Historical Perspectives and Contemporary Developments. *Annual Review of Entomology*, 43:243-270.
- Kohmoto, K., Akimitsu, K., and Otani, H. 1991. Correlation of resistance and susceptibility of citrus to *Alternaria alternata* with sensitivity to host-specific toxins. *Phytopathology*, 81:719-722.
- Kohmoto, K., Itoh, Y., Shimomura, N., Kondoh, Y., Otani, H., Kodama, M., Nishimura, S., and Nakatsuka, S. 1993: Isolation and biological activities of two host-specific toxins from the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *Phytopathology*, 83:495-502.
- Krause, R.A., and Massie, L.B. 1975. Predictive systems: modern approaches to disease control. *Annual Review of Phytopathology*, 13:31-47.
- Kusaba, M., and Tsuge, T. 1995. Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce hostspecific toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Current Genetics*, 28:491-498.
- Landis, J.R., and Koch, G.G. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33:159-174.
- Lau, Y.F., Gleason, M.L., Zriba, N., Taylor, S.E., and Hinz, P.N. 2000. Effects of coating, deployment angle, and compass orientation on performance of electronic wetness sensors during dew periods. *Plant Disease*, 84:192-197.
- Lesnoff, M., and Lancelot, R. 2012. aod: Analysis of overdispersed data. R package version 1.3. www.cran.r-project.org.

- Llorente, I., and Montesinos, E. 2002. Effect of relative humidity and interrupted wetness periods on brown spot severity of pear caused by *Stemphylium vesicarium*. *Phytopathology*, 92:99-104.
- Liñan, C. 2014. *Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales*. Ediciones Agrotécnicas, Madrid, 751 p.
- Lunn, D.J., Thomas, A., Best, N., and Spiegelhalter, D. 2000. WinBUGS a Bayesian modelling framework: concepts, structure, and extensibility. *Statistics and Computing*, 10:325-337.
- Lomas, J. 1991. Sprinkler irrigation and plant disease under semi-arid conditions. *EPPO Bulletin*, 21:365-370.
- Lomas, J., and Shashoua, Y. 1970. The performance of three types of leaf wetness recorders. *Agricultural Meteorology*, 7:159-166.
- Luo, W., and Goudriaan, J. 1999. Effects of altering water temperature on leaf wetness in paddy rice crops. *Agricultural and Forest Meteorology*, 97:33-42.
- Luo, W., and Goudriaan, J. 2000. Dew formation on rice under varying durations of nocturnal radiative loss. *Agricultural and Forest Meteorology*, 104:303-313.
- Lusted, L.B. 1971. Signal detectability and medical decision-making. *Science*, 171:1217-1219.
- Ma, H., Bandos, A.I., Rockette, H.E., and Gur, D. 2013. On use of partial area under the ROC curve for evaluation of diagnostic performance. *Statistics in Medicine*, 32:3449-3458.
- MacHardy, W.E., and Gadoury, D.M. 1989. A revision of Mill's criteria for predicting apple scab infection periods. *Phytopathology*, 79:304-310.
- Madden, L.V. 2006. Botanical epidemiology: some key advances and its continuing role in disease management. *European Journal of Plant Pathology*, 115:3-23.
- Madden, L.V., and Ellis, M.A. 1988. How to develop plant disease forecasters. In: J Kranz and J Rotem eds. *Experimental techniques in plant disease epidemiology*. Springer-Verlag, Berlin, 190-208 p.

- Madden, L.V., Pennypacker, S.P., and MacNab, A.A. 1978. FAST, a forecast system for *Alternaria solani* on tomato. *Phytopathology*, 68:1354-1358.
- Madeira, A.C., Kimb, K.S., Taylor, S.E., and Gleason, M.L. 2002. A simple cloud-based energy balance model to estimate dew. *Agricultural and Forest Meteorology*, 111:55-63.
- Magarey, R.D. 1999. A theoretical standard for estimation of surface wetness duration in grape. Ph.D. Thesis. Cornell University.
- Magarey, R.D., Russo, J.M., and Seem, R.C. 2006a. Simulation of surface wetness with a water budget and energy balance approach. *Agricultural and Forest Meteorology*, 139:373-381.
- Magarey, R.D., Russo, J.M., and Seem, R.C. 2006b. Grape canopy surface wetness: Simulation versus visualization and measurement. *Agricultural and Forest Meteorology*, 139:361-372.
- Magarey, R.D., Seem, R.C., Weiss, A., Gillespie, T., and Huber, L. 2005b. Estimating Surface wetness on plants. *Micrometeorology in Agricultural Systems*, Agronomy Monograph no. 47.
- Magarey, R.D., Sutton, T.B., 2007. How to create and deploy infection models for plant pathogens. In: Ciancio, A., Mukerji, K.G. eds. *General Concepts in Integrated Pest and Disease Management*. Springer, The Netherlands, 1:3-25 p.
- Magarey, R.D., Sutton, T.B., and Thayer, C.L. 2005a. A simple generic infection model for foliar fungal plant pathogens. *Phytopathology* 95:92-100.
- MAGRAMA. 2013. Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente. Superficies y producciones anuales de cultivos. www.magrama.gob.es.
- Makowski, D., Bancal, R., and Vicent, A. 2011. Estimation of leaf wetness duration requirements of foliar fungal pathogens with uncertain data—An application to *Mycosphaerella nawae*. *Phytopathology*, 101:1346-1354.

- Makowski, D., Taverne, M., Bolomier, J., and Ducarne, M. 2005. Comparison of risk indicators for sclerotinia control in oilseed rape. *Crop Protection*, 24:527-531.
- Makowski, D., Vicent, A., Pautasso, M., Stancanelli, G., and Rafoss, T. 2014. Comparison of statistical models in a meta-analysis of fungicide treatments for the control of citrus black spot caused by *Phyllosticta citricarpa*. *European Journal of Plant Pathology*, 139:79-94.
- Marchegay, P., Thorin, N., and Schiavon, M. 1990. Effects des facteurs climatiques sur l'émission aérienne des spores d'*Alternaria brassicae* (Berk) Sacc et sur l'épidémiologie de l'altenariose dans une culture de colza. *Agronomie*, 10:831-839.
- Markridakis, S., Weelwright, S.C., and Hyndman, R.J., 1998. *Forecasting: Methods and applications*. third edition. Wiley, New York, 656 p.
- Marín, J.E., Fernández, H.S., Peres, N.A., Andrew, M., Peever, T.L., and Timmer, L.W., 2006: First report of *Alternaria* brown spot of citrus caused by *Alternaria alternata* in Peru. *Plant Disease*, 90:686.
- Martin, T.G., Wintle, B.A., Rhodes, J.R., Kuhnert, P.M., Field, S.A., Low-Choy, S.J., Tyre, A.J., and Possingham, H.P. 2005. Zero tolerance ecology: improving ecological inference by modelling the source of zero observations. *Ecology Letters*, 8:1235-1246.
- Masel, A.M., He, C., Poplawski, A.M., Irwin, J.A.G., and Manners, J.M. 1996. Molecular evidence for chromosome transfer between biotypes of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 9:339-348.
- Masunaka, A., Ohtani, K., Peever, T.L., Timmer, L.W., Tsuge, T., Yamamoto, M., Yamamoto, H., and Akimitsu, K. 2005: An isolate of *Alternaria alternata* that is pathogenic to both tangerines and rough lemon and produces two host-selective toxins, ACT- and ACR-toxins. *Phytopathology*, 95:241-247.
- Masunaka, A., Tanaka, A., Tsuge, T., Peever, T.L., Timmer, L.W., Yamamoto, M., Yamamoto, H. and Akimitsu, K. 2000. Distribution and

- characterization of AKT homologs in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *Phytopathology*, 90:762-768.
- McClish, D.K. 1989. Analyzing a portion of the ROC curve. *Medical Decision Making*, 9:190-195.
- McRoberts, N., Hall, C., Madden, L. V., and Hughes, G. 2011. Perceptions of disease risk: From social construction of subjective judgments to rational decision making. *Phytopathology*, 101:654-665.
- Menzies, J.D. 1967. Plant diseases related to irrigation. Pages 1058-1064 in irrigation of agricultural lands. R. M. Hagan, H.R. Haise, and T.W. Edminster. eds. American society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
- Meredith, D.S. 1966. Spore dispersal in *Alternaria porri* (Ellis) Neerg. on onions in Nebraska. *Annals of Applied Biology*, 57:39-47.
- Metz, C.E. 1978. Basic principles of roc analysis. *Seminars in Nuclear Medicine*, 8:283-298.
- Michailides, T.J., and Morgan, D.P. 1992. Effects of temperature and wetness duration on infection of pistachio by *Botryosphaeria dothidea* and management of disease by reducing duration of irrigation. *Phytopathology*, 82:1399-1406.
- Miles, A.K., Willingham, S.L., and Cooke, A.W. 2005: Field evaluation of a plant activator, captan, chlorothalonil, copper hydroxide, iprodione, mancozeb and strobilurins for the control of citrus brown spot of mandarin. *Australasian Plant Pathology*, 34:63-71.
- Mondal, S.N., and Timmer, L.W. 2002. Environmental factors affecting pseudothecial development and ascospore production of *Mycosphaerella citri*, the cause of citrus greasy spot. *Phytopathology*, 92:1267-1275.
- Mondal, S.N., Vicent, A., Reis, R.F., and Timmer, L.W. 2007. Efficacy of pre- and postinoculation application of fungicides to growing citrus leaves for control of melanose, scab and *Alternaria* brown spot. *Plant Disease*, 91:1600-1606.
- Monteith, J.L., 1957. *Dew*. J. R. Meteorological Society, 83:322-341.

- Moschini, R.C., Escande, A.R., Pereyra, V.R., Pedraza, V., Quiroz, F., Troglia, C. e Iriarte, I. 2002. Predicción de la incidencia de la podredumbre blanda del capítulo de girasol en base a factores ambientales y genéticos. *Revista Argentina de Agrometeorología*, 2:51-57.
- Moschini, R.C., Pioli, R., Carmona, M., and Sacchi, O. 2001. Empirical predictions of wheat head blight in the northern Argentinian Pampas region. *Crop Science*, 41:1541-1545.
- Mortensen, K., and Bergman, J.W. 1983. Importance of *Alternaria carthami* isolates and their virulence on safflower. *Plant Disease*, 67:1191-1194.
- Mridha, M.A.U., and Wheeler, B.E.J. 1993. In-vitro effects of temperature and wet periods on infection of oilseed rape by *Alternaria Brassicae*. *Plant Pathology*, 42:671-675.
- Navarro, L., Juárez, J., Aleza, P., Pina, J., Olivares-Fuster, O., Cuenca, J., Julve, J. 2005. Programa de obtención de híbridos triploides de mandarina en España. *Phytoma*, 170:36-41.
- Netzer, D., and Kenneth, R.G. 1969. Persistence and transmission of *Alternaria dauci* (Kuhn) Groves & Skolko in the semi-arid conditions of Israel. *Ann. Appl. Biol.* 63:289-294.
- Nita, M., Ellis, M.A., and Madden, L.V. 2008. Variation in disease incidence of Phomopsis cane and leaf spot of grape in commercial vineyards in Ohio. *Plant Disease*, 92:1053-1061.
- Nishimura, S., and Kohmoto, K. 1983. Host-specific toxins and chemical structures from *Alternaria* species. *Annual Review of Phytopathology*, 21:87-116.
- OECD. Organisation for Economic Cooperation and Development. International standards for fruit and vegetables: citrus fruits (*Alternaria* damage). Trade and agriculture. 2010. <http://www.oecd.org/tad/fv>.
- Ohtani, K., Isshiki, A., Katoh, H., Yamamoto, H., and Akimitsu, K. 2003. Involvement of carbon catabolite repression on regulation of endopolygalacturonase gene expression in citrus fruits. *Journal of General Plant Pathology*, 69:120-125.

- Olanya, O.M., Honeycutt, C.W., Larkin, R.P., Griffin, T.S., He, Z., and Halloran, J.M. 2009. The effect of cropping systems and irrigation management on development of potato early blight. *Journal of General Plant Pathology*, 75:267-275.
- Otero, O., Guerra, F., Moya, C.B., Paumier, A., Novelo, B., Castro, A., and Pérez, J., 1994: Estudio y control de la mancha parda producida por *Alternaria* en mandarina Dancy. *Levante Agrícola*, 327:136-141.
- Palm, M.E., and Civerolo, E.L., 1994: Isolation, pathogenicity, and partial host range of *Alternaria limicola*, causal agent of “mancha foliar de los citricos” in Mexico. *Plant Disease*, 78:879-883.
- Palti, J., and Rotem, J. 1973. Epidemiological limitations to the forecasting of downy mildews and late blight in Israel. *Phytoparasitica*, 1:119-126.
- Paul, P.A., and Munkvold, G.P. 2004. A model-based approach to preplanting risk assessment for gray leaf spot of maize. *Phytopathology*, 94:1350-1357.
- Payne, A.F., and Smith, D.L. 2012. Development and evaluation of two pecan scab prediction models. *Plant Disease*, 96:1358-1364.
- Pearson, R.C., and Hall, D.H. 1975. Factors affecting the occurrence and severity of black mold of ripe tomato fruit caused by *Alternaria alternata*. *Phytopathology*, 65:1352-1359.
- Peever, T.L., Olsen, L., Ibañez, A., and Timmer, L.W. 2000: Genetic differentiation and host specificity among populations of *Alternaria* spp. causing brown spot of grapefruit and tangerine x grapefruit hybrids in Florida. *Phytopathology*, 90:407- 414.
- Peever, T.L., Su, G., Carpenter-Boggs, L., and Timmer, L.W. 2004: Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. *Mycologia*, 96:119-134.
- Pedro, M.J., 1980. Relation of leaf surface wetness duration to meteorological parameters. Ph.D. Dissertation. University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada.

- Pedro, M.J., Gillespie, T.J. 1982. Estimating dew duration. I. Utilizing micrometeorological data. *Agricultural Meteorology*, 25:283-296.
- Pegg, K.G. 1966. Studies of a strain of *Alternaria citri* Pierce, the causal organism of brown spot of Emperor mandarin. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences*, 23:15-28.
- Penrose, L.J., and Nicol, H.I. 1996. Aspects of microclimate variation within apple tree canopies and between sites in relation to potential *Venturia inaequalis* infection. *N.Z. J. Crop Hort.* 24:259-266.
- Peres, N.A., Agostini, J.P., and Timmer, L.W. 2003: Outbreaks of *Alternaria* brown spot of citrus in Brazil and Argentina. *Plant Disease*, 87:750-750.
- Peres, N.A., and Timmer, L.W. 2006: Evaluation of the Alter-Rater model for spray timing for control of *Alternaria* brown spot on Murcott tangor in Brazil. *Crop Protection*, 25:454-460.
- Prabhu, A.S., and Prakash, V. 1973. The relation of temperature and leaf wetness to the development of leaf blight of wheat. *Plant Disease Reporter*, 57:1000-1004.
- Pryor, B.M., Davis, R.M., and Gilbertson, R.L. 1994. Detection and eradication of *Alternaria radicina* on carrot seed. *Plant Disease*, 78:452-456.
- Raghuram, M., and Mallaiah, K.V. 1989. Aerial dissemination of *Alternaria macrospora* pathogenic to cotton. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*, 19:1-4.
- Ram, B. and Joshi, L.M. 1978. Role of saturated atmosphere and temperature on infection and development of leaf blight of wheat. *Indian Phytopathology*, 31:550-551.
- Rao, P.S., Gillespie, T.J., and Schaafsma, A.W. 1998. Estimation de la durée d'humectation des épis de maïs à partir des observations météorologiques. *Canadian Journal of Soil Science*, 78:149-154.
- R-Core-Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing, Vienna. <http://www.R-project.org>.

- Reis, R.F., De Almeida, T.F, Stuchi, E.S., De Goes, A. 2007. Susceptibility of citrus species to *Alternaria alternata*, the causal agent of the Alternaria Brown Spot. *Scientia Horticulturae*, 113:336-342.
- Reis, R.F., De Goes, A., Mondal, S.N., Shilts, T., Brentu, F.C., and Timmer, L.W. 2006. Effect of lesion age, humidity, and fungicide application on sporulation of *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of tangerine. *Plant Disease*, 90:1051-1054.
- Richard, B., Bussière, F., Langrume, C., Rouault, F., Jumel, S., Faivre, R., and Tivoli, B. 2013. Effect of pea canopy architecture on microclimate and consequences on ascochyta blight infection under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 135:509-524.
- Ripley, B. 2012. tree: classification and regression trees. R package version 1.0-32. <http://CRAN.R-project.org/package=tree>.
- Roberts, R.G., Reymond, S.T., and Andersen, B. 2000. RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups. *Mycological Research*, 104:151-160.
- Robin, X., Turck, N., Hainard, A., Tiberti, N., Lisacek, F., Sanchez, J-C., and Müller, M. 2011. pROC: an open-source package for R and S plus to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*, 12-77.
- Rosewich, U.L., and Kistler, H.C., 2000. Role of horizontal gene transfer in the evolution of fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 38:325-363.
- Rossi, V., Bolognesi, M., Languasco, L., and Giosuè, S. 2006. Influence of environmental conditions on infection of peach shoots by *Taphrina deformans*. *Phytopathology*, 96:155-163.
- Rossi, V., Patteri, E., Giosuè, S., Bugiani, R. 2005. Growth and Sporulation of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear, on herb plants of orchard lawns. *European Journal of Plant Pathology*, 111:361-370.
- Rotem, J. 1965. Sand and dust storms as factors leading to Alternaria blight epidemics on potatoes and tomatoes. *Agricultural Meteorology*, 2:281-288.

- Rotem, J. 1968. Thermoxerophytic properties of *Alternaria porri* f.sp. *solani*. *Phytopathology*, 58:1284-1287.
- Rotem, J. 1990. Overwintering of *Alternaria macrospora* in cotton debris. *Phytoparasitica*, 18:143-152.
- Rotem, J. 1994. The genus *Alternaria*. Biology, epidemiology, and pathogenicity. APS Press, St. Paul, MN, USA, 326 p.
- Rotem, J., and Palti, J. 1969. Irrigation and plant of great northern dry bean varieties *Phaseolus vulgaris* disease. *Annual Review of Phytopathology*, 7:267-288
- Rosewich, U.L., and Kistler, H.C. 2000. Role of horizontal gene transfer in the evolution of fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 38:325-363.
- Rossi, V., Patteri, E., Giosué, S., Bugiani, R. 2005. Growth and Sporulation of *Stemphylium besicarium*, the causal agent of Brown spot of pear, on herb plants of orchard lawns. *European Journal of Plant Pathology*, 111:361-370.
- Rowlandson, T., Gleason, M., Sentelhas, P., Gillespie, T., Thomas, C., and Hornbuckle, B. 2015. Reconsidering leaf wetness duration determination for plant disease management. *Plant Disease*, 99:310-319.
- Ruehle, G.D. 1937: A strain of *Alternaria citri* Ellis & Pierce causing a leaf spot on rough lemon in Florida. *Phytopathology*, 27:863-865.
- Santillán, V.N., Fraisse, C.W., Peres, N.A., Peres, J.C., and Cantrell, A. 2009. Spatial variability of leaf wetness duration in citrus canopies. *Florida State Horticultural Society*, 123:49-55.
- Santos, E.A., Sentelhas, P.C., Macedo, J.E., Angelocci, L.R., and Boffino, J.E. 2008. Spatial variability of leaf wetness duration in cotton, coffee and banana crop canopies. *Scientia Agricola*, 65:18-25.
- Sawamura, K. 1972. Studies on apple *Alternaria* blotch caused by *Alternaria mali* Roberts. *Bull Fac Agric Hirosaki Univ*, 18:152-325.
- Scherm, H., and van Bruggen, A.H.C. 1995. Concurrent spore release and infection of lettuce by *Bremia lactucae* during morning with leaf wetness. *Phytopathology*, 85:552-555.

- Schutte, G.C. 1996. First report of *Alternaria* brown spot on Star Ruby grapefruit in South Africa. *Citrus Journal*, 6:24.
- Schutte, G.C., and Beeton, K.V. 1994. The use of triazoles to control *Alternaria* Brown spot of *Minneola tangelo* in the winter rainfall region of South Africa. *Citrus Journal*, 4:19-20.
- Schutte, G.C., Beeton, K.V., and Kotze, J.M. 1997. Rind stippling on Valencia oranges by copper fungicides used for control of citrus black spot in South Africa. *Plant Disease*, 81:851-854.
- Schwabe, W.F.S. 1980. Wetting and temperature requirements for apple leaf infection by *Venturia inaequalis* in South Africa. *Phytophylactica*, 12:69-80.
- Sentelhas, P.C, Dalla-Marta, A., Orlandini, S., Santos, E.A., Gillespie, T.J., and Gleason, M.L. 2008. Suitability of relative humidity as an estimator of leaf wetness duration. *Agricultural and Forest Meteorology*, 148:392-400.
- Sentelhas, P.C., Gillespie, T.J., Batzer, J.C., Gleason, M.L., Monteiro, J.E.B.A., Pezzopane, J.R.M., and Pedro, M.J. 2005. Spatial variability of leaf wetness duration in different crop canopies. *International Journal of Biometeorology*, 49:363-370.
- Sentelhas, P.C., Gillespie, T.J., Gleason, M.L., Monteiro, J.E.B.A, and Helland, S.T. 2004. Operational exposure of leaf wetness sensors. *Agricultural and Forest Meteorology*, 126:59-72.
- Sentelhas, P.C., Gillespie, T.J., Gleason, M.L., Monteiro, J.E.B.A., Pezzopane, J.R.M., and Pedro, M.J. 2006. Evaluation of a Penman–Monteith approach to provide reference and crop canopy leaf wetness duration estimates. *Agricultural and Forest Meteorology*, 141:105-117.
- Shaw, R. H. 1973. Dew duration in central Iowa. *Iowa State Journal of Research*, 47:219-227.
- Shtienberg, D. 2013. Will decision-support systems be widely used for the management of plant diseases? *Annual Review of Phytopathology*, 51:1-16.

- Sik, K., and Ripley, B. 2012. TSA: Time series analysis. R package version 1.01. <http://www.stat.uiowa.edu/kchan/TSA.htm>.
- Simmons, E.G. 1990. *Alternaria* themes and variations (27-53). *Alternaria* and other phaeodictyoconidial hyphomycete taxa on rutaceae. *Mycotaxon*, 37:79-119.
- Simmons, E.G. 1992. *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge. In: J. Chelkowski and A. Visconti (Eds.), *Alternaria* biology, plant diseases and metabolites. Elsevier, Amsterdam, NL. 1-35 p.
- Simmons, E.G. 1999a. *Alternaria* themes and variations (226-235) - Classification of citrus pathogens. *Mycotaxon*, 70:263-323.
- Simmons, E.G. 1999b. *Alternaria* themes and variations (236-243) - Host-specific toxin producers. *Mycotaxon*, 70:325-369.
- Simmons, E.G. 2007. *Alternaria: An identification manual*. Utrecht, Netherlands: CBS Fungal Biodiversity Centre, 1-775 p.
- Smith, L.P. 1958. The duration of surface wetness. *Proceedings of Horticultural International Congress*, 15:478-484.
- Solel, Z. 1991. *Alternaria* brown spot on *Minneola* tangelos in Israel. *Plant Pathology*, 40:145-147.
- Solel, Z., and Kimchi, M., 1997: Susceptibility and resistance of citrus genotypes to *Alternaria alternata* pv. *citri*. *Journal of Phytopathology*, 145:389-391.
- Solel, Z., and Kimchi, M. 1998. Histopathology of infection of *Minneola* tangelo by *Alternaria alternata* pv. *citri* and the effect of host and environmental factors on lesion development. *Journal of Phytopathology*, 146:557-561.
- Solel, Z., Oren, Y., and Kimchi, M., 1997: Control of *Alternaria* brown spot of *Minneola* tangelo with fungicides. *Crop Protection*, 16:659-664.
- Solel, Z., Timmer, L.W., and Kimchi, M. 1996: Iprodione resistance of *Alternaria alternata* pv *citri* from *Minneola* tangelo in Israel and Florida. *Plant Disease*, 80:291-293.

- Soteros, J.J. 1979. Pathogenicity and control of *Alternaria radicina* and *A. dauci* in carrots. *New Zealand Journal of Agricultural Science*, 23:191-196.
- Spotts, R.A. 1977. Effect of leaf wetness duration and temperature on the infectivity of *Guignardia bidwellii* on grape leaves. *Phytopathology*, 67:1378-1381.
- Spotts, R.A., and Cervantes, L. A. 1991. Effect of temperature and wetness on infection of pear by *Venturia pirina* and the relationship between preharvest inoculation and storage scab. *Plant Disease*, 75:1204-1207.
- Strandberg, J.O. 1987. Isolation, storage, and inoculum production methods for *Alternaria dauci*. *Phytopathology*, 77:1008-1012.
- Suheri, H., and Price, T.V. 2000. Infection of onion leaves by *Alternaria porri* and *Stemphylium vesicarium* and disease development in controlled environments. *Plant Pathology*, 49:375-382.
- Sutton, J.C., Gillespie, T.J., and Hildebrand. P.D. 1984. Monitoring weather factors in relation to plant disease. *Plant Disease*, 68:78-84.
- Swart, S.H., Wingfield, M.J., Swart, W.J., and Schutte, G.C., 1998. Chemical control of *Alternaria* brown spot on *Minneola tangelo* in South Africa. *Annals of Applied Biology*, 133:17-30.
- Teng, P.S. 1985. A comparison of simulation approaches to epidemic modeling. *Annual Review of Phytopathology*, 23:351-379.
- Thomma, B. 2003. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4:225-236.
- Thompson, M.L., and Zucchini, W. 1989. On the statistical analysis of ROC curves. *Statistics in Medicine*, 8:1277-1290.
- Timmer, L.W., Darhower, H.M., Zitko, S.E., Peever, T.L, Ibañez, A.M., and Bushong, P.M. 2000. Environmental factors affecting the severity of *Alternaria* brown spot of citrus and their potential use in timing fungicide applications. *Plant Disease*, 84:638-643.
- Timmer, L.W., and Peever, T.L., 1997. *Alternaria* brown spot found on Sunburst and grapefruit. *Citrus Industry*, 78:46.

- Timmer, L.W., Peever, T.L., Solel, Z., and Akimitsu, K. 2003. *Alternaria* diseases of citrus - novel pathosystems. *Phytopathologia Mediterranea*, 42:3-16.
- Timmer, L.W., Solel, Z., Gottwald, T.R., Ibáñez, A.M., and Zitko, S.E. 1998. Environmental factors affecting production, release, and field populations of conidia of *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of citrus. *Phytopathology*, 88:1218-1223.
- Timmer, L.W. and Zitko, S.E., 1997: Evaluation of fungicides for control of *Alternaria* brown spot and citrus scab. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 110:71-76.
- Trapero-Casas, A., and Kaiser, W.J. 1992. Influence of temperature, wetness period, plant age and inoculum concentration on infection and development of *Ascochyta* blight of Chickpea. *Phytopathology*, 82:589-596.
- Trapletti, A., and Hornik, K., 2013. tseries: Time series analysis and computational finance. R package version 0.10-32. <http://www.jstatsoft.org>.
- Tsuge, T., Harimoto, Y., Akimitsu, K., Ohtani, K., Kodama, M., Akagi, Y., Egusa, M., Yamamoto, M., Otani, H. 2012. Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *FEMS Microbiology Reviews*, 37:44-66.
- Turecek, W.W., and Stevenson, K.L. 1998. Effects of host resistance, temperature, leaf wetness duration, and leaf age on infection and lesion development of pecan scab. *Phytopathology*, 88:1294-1301.
- Turecek, W.W., and Wilcox, W.F. 2005. Evaluating predictors of apple scab with receiver operating characteristic curve analysis. *Phytopathology*, 95:679-691.
- Twengström, E., Sigvald, R., Svensson, C., and Yuen, J. 1998. Forecasting *Sclerotinia* stem rot in spring sown oilseed rape. *Crop Protection*, 17:405-411.
- USDA. 2013. United States Department of Agriculture. Citrus: World Markets and Trade. <http://www.fas.usda.gov>.

- Vancauwenberghe, O., Short, J., Giehler, E., Bildstein, P., Ancey, P., and Gschwind, M. 1996. Microsensor for the preventive detection of water condensation: Operating principle and interface electronics. *Sensor. Actuat. B- Phys*, 53:304-308.
- Vaz, S., Martin, C.S., Eastwood, P.D., Ernande, B., Carpentier, A., Meaden, G.J., and Coppin, F. 2008. Modelling species distributions using regression quantiles. *Journal of Applied Ecology*, 45:204-217.
- Vega, B., and Dewdney, M.M. 2014. Distribution of QoI resistance in populations of tangerine-infecting *Alternaria alternata* in Florida. *Plant Disease*, 98:67-76.
- Vincelli, P.C., and Lorbeer, J.W. 1988. Comparison of predictive systems for timing the initial fungicide application to control Botrytis leaf blight of onion. *Plant Disease*, 73:633-65.
- Vicent, A., Armengol, J., Cuenca, F., Alfaro-Lassala, F., García-Jiménez, J. 2008. Avances en el control de la mancha marrón de las mandarinas causada por *Alternaria alternata*. *Levante Agrícola*, 400:36-42.
- Vicent, A., Armengol, J., and García-Jiménez, J. 2007. Rain-fastness and persistence of fungicides for control of *Alternaria* brown spot of citrus. *Plant Disease*, 91:393-399.
- Vicent, A., Armengol, J., and García-Jiménez, J. 2009. Protectant activity of reduced concentration copper sprays against *Alternaria* brown spot on 'Fortune' mandarin fruit in Spain. *Crop Protection*, 28:1-6.
- Vicent, A., Armengol, J., Sales, R., García-Jiménez, J., and Alfaro-Lassala, F. 2000. First report of *Alternaria* brown spot of citrus in Spain. *Plant Disease*, 84:1044.
- Vicent, A., Badal, J., Asensi, M.J., Sanz, N., Armengol, J., and García-Jiménez, J. 2004. Laboratory evaluation of citrus cultivars susceptibility and influence of fruit size on Fortune mandarin to infection by *Alternaria alternata* pv. *Citri*. *European Journal of Plant Pathology*, 110:245-251.
- Vicent, A., Badal, J., Sanz, N., Armengol, J., and García-Jiménez, J. 2002a. Estudios preliminares sobre la eficacia de los compuestos cúpricos en el

- control de la mancha marrón de los cítricos causada por *Alternaria alternata* pv. *citri*. Phytoma-España, 142:70-76.
- Vicent, A., Bassimba, D.D.M., Hinarejos, C., and Mira, J.L. 2012. Inoculum and disease dynamics of circular leaf spot of persimmon caused by *Mycosphaerella nawae* under semi-arid conditions. European Journal of Plant Pathology, 134:289-299.
- Vicent, A., Sanz, N., García-Rellán, D., Badal, J., Armengol, J., y García-Jiménez, J. 2002b. Evolución de la concentración ambiental de conidios de *Alternaria alternata* pv. *citri* y *Alternaria* spp. en parcelas de mandarino Fortune afectadas por mancha marrón. XI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, Almería, 35 p.
- Vloutoglou, I., Fitt, B.D.L., and Lucas, J.A. 1996. Germination of *Alternaria linicola* conidia on linseed: Effects of temperature, incubation time, leaf wetness and light regime. Plant Pathology, 45:529-539.
- Vloutoglou, I., Fitt, B.D.L., and Lucas, J.A. 1999. Infection of linseed by *Alternaria linicola*; effects of inoculum density, temperature, leaf wetness and light regime. European Journal of Plant Pathology, 105:585-595.
- Vloutoglou, I., and Kalogerakis, S.N. 2000. Effects of inoculum concentration, wetness duration and plant age on development of early blight *Alternaria solani* and on shedding of leaves in tomato plants. Plant Pathology, 49:339-345.
- Wallach, D. 2006. Evaluating crop models. In: D Wallach, D Makowski and JW Jones, (Eds.), Working with dynamic crop models. Elsevier, Amsterdam, 11-53 p.
- Wallin, J.R. 1963. Dew, its significance and measurement in phytopathology. Phytopathology, 53:1210-1216.
- Walter, S.D. 2005. The partial area under the summary ROC curve. Statistics in Medicine, 24:2025-2040
- Walton, J.D. 2000. Horizontal gene transfer and the evolution of secondary metabolite gene clusters in fungi: an hypothesis. Fungal Genetics and Biology, 30:167-171.

- Wang, X.F., Li, Z.A., Tang, K.Z., and Zhou, C.Y. 2010. First report of *Alternaria* brown spot of citrus caused by *Alternaria alternata* in Yunnan province, China. *Plant Disease*, 94:375.
- Weir, T.L., Huff, D.R., Christ, B.J., and Romaine, C.P. 1998. RAPD-PCR analysis of genetic variation among isolates of *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* from potato and tomato. *Mycologia*, 90:813-821.
- Whiteside, J.O., 1976. Newly recorded *Alternaria*-induced brown spot disease on Dancy tangerines in Florida. *Plant Disease Reporter*, 60:326-329.
- Wilks, D.S. 1995. *Statistical methods in the atmospheric sciences*. Academic Press, San Diego.
- Wilson, T.B., Bland, W.L., and Norman, J.M. 1999. Measurement and simulation of dew accumulation and drying in a potato canopy. *Agricultural and Forest Meteorology*, 93:111-119.
- Wittich, K. P. 1995. Some remarks on dew duration on top of an orchard. *Agricultural and Forest Meteorology*, 72:167-180.
- Wolski, W.E., Lalowski, M., Martus, P., Herwig, R., Giavalisco, P., Gobom, J., Sickmann, A., Lehrach, H., and Reinert, K. 2005. Transformation and other factors of the peptide mass spectrometry pairwise peak-list comparison process. *BMC Bioinformatics*, 6:285.
- Wood, S. 2006. *Generalized additive models: An introduction with R*. Chapman and Hall/CRC, Boca Raton, FL, 410 p.
- Woudenberg, J.H.C., Groenewald, J.Z., Binder. M., and Crous, P.W. 2013. *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, 75:171-212.
- Yang, S.L., and Chung, K.R. 2012. The NADPH oxidase-mediated production of (H₂O₂) and resistance to oxidative stress in the necrotrophic pathogen *Alternaria alternata* of citrus. *Molecular Plant Pathology*, 13:900-914.
- Youden, W.J. 1950. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*, 3:32-35.
- Yuen, J. 2003. Bayesian approaches to plant disease forecasting. *Plant Health Progress*, 51:407-12.

- Yuen, J., and Hughes, G. 2002. Bayesian analysis of plant disease prediction. *Plant Pathology*, 51:407-412.
- Zadoks, J.C. 1984. Cost effectiveness of plant protection on a national basis. *EPPO Bulletin*, 14:325-335.
- Zadoks, J. C. 1985. On the Conceptual Basis of Crop Loss Assessment - the Threshold Theory. *Annual Review of Phytopathology*, 23:455-473.
- Zhang, D., Hui, D., Luo, Y., and Zhou, G. 2008. Rates of litter decomposition in terrestrial ecosystems: global patterns and controlling factors. *Journal of Plant Ecology*, 1:85-93.
- Zangvil, A. 1996. Six years of dew observations in the Negev Desert, Israel. *Journal of Arid Environments*, 32:361-371.
- Zornoza, C. 2006. Estudios epidemiológicos de la mancha marrón de los cítricos, causada por *Alternaria alternata* pv. *citri* y su aplicación a estrategias de control químico Trabajo Final de Carrera. ETSIA, Universidad Politécnica de Valencia.