



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



GENERALITAT  
VALENCIANA

ivia  
Instituto Valenciano  
de Investigaciones Agrarias



ESCUELA TÉCNICA  
SUPERIOR DE INGENIERÍA  
AGRONÓMICA Y DEL  
MEDIO NATURAL



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN  
AGROPECUARIA DE PANAMA

# Enfermedades fúngicas de los cítricos en Panamá. Estudio particular de la mancha grasienta causada por *Mycosphaerellaceae*

TESIS DOCTORAL

**Presentada por:**

**Vidal Antonio Aguilera Cogley**

**Director:**

**Dr. Antonio Vicent Civera**

**Tutor:**

**Dr. Josep Armengol Fortí**

**Valencia, enero de 2016**



Dr. Antonio Vicent Civera, Colaborador Científico Adjunto del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias y el Dr. Josep Armengol Fortí, Catedrático del Departamento de Ecosistemas Agroforestales de la Universidad Politécnica de Valencia.

CERTIFICAN:

Que Vidal Antonio Aguilera Cogley 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 “Enfermedades fúngicas de los cítricos en Panamá. Estudio particular de la mancha grasienta causada por *Mycosphaerellaceae*”, presentada para optar al grado de Doctor Ingeniero Agrónomo.

Para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, a 15 de enero de 2016.

Dr. Antonio Vicent Civera

Dr. Josep Armengol Fortí



# Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Antonio Vicent, director de esta Tesis Doctoral, por la oportunidad de realizar este trabajo. También deseo agradecerle por su apoyo constante y por todo lo aprendido con sus enseñanzas durante estos años.

Quisiera agradecer al Dr. Josep Armengol por haber aceptado ser mi tutor en la Universidad Politécnica de Valencia (UPV). También deseo agradecerle junto con la Dra. Mónica Berbegal por la orientación y ayuda en los estudios morfológicos y moleculares desarrollados en esta tesis. Al Dr. Josep Xavier Barber de la Universidad Miguel Hernández de Elche por su ayuda en el desarrollo de los modelos jerárquicos bayesianos.

Al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, España) y al Programa de Formación del Sistema de los INIA Iberoamérica por la concesión de la beca de doctorado durante el período 2010-2015 y al proyecto RTA2010-00105-00-00-FEDER.

Al Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), por la oportunidad de realizar parte de mi tesis doctoral en los laboratorios de la Unidad de Micología.

Al Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP) por concederme el tiempo y el financiamiento de las actividades de investigación realizadas en Panamá. Al Dr. Axel Villalobos, Director General de IDIAP por todo el apoyo recibido en la etapa final de mi doctorado.

Al Centro Internacional de la Papa (CIP) en Perú por la ayuda recibida para que pudiera hacer posible la realización de mis estancias de estudio en España.

Quiero también agradecer a mis compañeros de IDIAP, el Tec. Armando Gonzales por su ayuda en todas las actividades de campo y laboratorio realizadas en Panamá, al Ing. Melvin Jaén por su orientación y ayuda en las actividades de muestreo realizadas durante la prospección en Panamá. A la Ing. Carmen Bieberach, MV. Marcelino Jaén, Dr. Pedro Him y Dr. José Villareal por su colaboración.

A mis compañeros de la Unidad de Micología del IVIA, a Daniel, Félix y José Luis por su amistad y colaboración. También deseo agradecer a Joaquín y Elena por sus aportes en los análisis estadísticos y ayuda con el programa R. A mis compañeros becarios del IVIA, Josep, Silvia, Begoña, Marta, Neus, Gabi y Pablo, gracias por su amistad.

A los ingenieros Alex Domingo, José Bellanero, Pablo Rodríguez y Amed Arcia de la Dirección Nacional de Sanidad Vegetal del Ministerio de Desarrollo Agropecuario de Panamá (DNSV-MIDA) por su colaboración. A los técnicos de las agencias de Extensión del MIDA de las provincias de Coclé y Veraguas por su colaboración en los muestreos en las parcelas de cítricos. Al Ing. Ángel Carril de la Dirección Nacional de Agricultura del MIDA por facilitarme información de los datos de producción de cítricos en Panamá.

A los productores German Chazin, Camilo Arauz y al Ing. Álvaro Sevilla de la finca de cítricos Gabriela por la posibilidad de disponer de parcelas de cítricos para realizar los experimentos de campo.

Gracias a mis padres, Vidal y Gladys por sus consejos y apoyo incondicional que me han ayudado a culminar este nuevo logro.

A Rina, mi esposa y a mi hija Allison quiero agradecerles por acompañarme en todo momento dándome ánimos para seguir adelante en este gran reto, gracias.

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

## RESUMEN

En las plantaciones de cítricos en Panamá se observan con frecuencia problemas de enfermedades, sin embargo en la mayoría de los casos se desconoce su etiología. Por tal motivo, durante los años 2010 a 2013 se prospectaron un total de 85 parcelas de diversas especies de cítricos en las principales zonas productoras del país. Se diagnosticó la presencia de la mancha grasienta, causada por *Zasmidium citri-griseum*, como la enfermedad fúngica más prevalente en los cítricos de Panamá. Se identificaron por primera vez en Panamá también otros patógenos fúngicos causantes de enfermedades foliares y de frutos como *Diaporthe citri* agente causal de la melanosis, *Elsinoë fawcettii* agente causal de la roña de los cítricos, *Colletotrichum acutatum* agente causal de la caída prematura de frutos y antracnosis.

Se caracterizó una colección de 42 aislados de *Mycosphaerellaceae* procedentes de diferentes regiones productoras de cítricos en España, Marruecos, Ghana y Panamá. Los aislados se identificaron a nivel de especie a partir de sus características morfológicas, culturales, fisiológicas (temperaturas), moleculares (región ITS) y patogénicas. Se identificó la especie *Amycosphaerella africana* asociada a la mancha grasienta de los cítricos en España y Marruecos y *Z. citri-griseum* como agente causal de la mancha grasienta en Panamá, estando asociada también a la enfermedad en Ghana.

Los resultados del estudio epidemiológico de la mancha grasienta en Panamá indicaron que la mayor defoliación de los árboles de naranja ‘Valencia’ afectados por la enfermedad se daba en la época seca, entre los meses de diciembre a abril. En el estudio de la dinámica de la producción de inóculo en la hojarasca, la descomposición de las hojas se relacionó con las variables climáticas precipitación pluvial acumulada por semana (mm), días con precipitación pluvial >1 mm por semana (nº) y humedad relativa promedio por semana (%). En relación al número de ascosporas liberadas de la hojarasca, el modelo resultante lo relacionó con las variables climáticas días hasta la descomposición total de las hojas, días con precipitación pluvial >1 mm por semana (nº), precipitación pluvial acumulada por semana (mm) y la temperatura promedio (°C). El experimento de seguimiento del inóculo en el aire, mostró que la mayor

disponibilidad de inóculo de *Z. citri-griseum* se da durante los meses de abril y mayo, cuando se inicia la estación de lluvias. De igual manera, la mayor incidencia de la mancha grasienta en las plantas trampa coincidió con los meses de mayor disponibilidad de inóculo. No obstante, se registraron infecciones también durante otras épocas del año.

En los ensayos de control se confirmó la eficacia del fungicida fenbuconazol, que redujo significativamente la severidad de la mancha grasienta en pomelo y naranja en Panamá. Sin embargo, no se detectó un efecto significativo de los tratamientos sobre el peso de la cosecha de frutos.

## RESUM

En les plantacions de cítrics en Panamà s'observen ben sovint problemes de malalties, no obstant això en la majoria dels casos es desconeix la seua etiologia. Per tal motiu, durant els anys 2010 al 2013 es visitaren un total de 85 parcel·les de diverses espècies de cítrics en les principals zones productores del país. Es diagnosticà la taca greixosa, causada per *Zasmidium citri-griseum*, com la malaltia més àmpliament distribuïda en els cítrics de Panamà. Es van identificar també per primera vegada en Panamà altres patògens fúngics causants de malalties foliars i de fruits com *Diaporthe citri* agent causal de la melanosi, *Elsinoë fawcettii* agent causal de la ronya dels cítrics, *Colletotrichum acutatum* agent causal de la caiguda prematura de fruits i antracnosi.

Es va caracteritzar una col·lecció de 42 aïllats de *Mycosphaerellaceae* procedents de diferents regions productores de cítrics a Espanya, Marroc, Ghana i Panamà. Els aïllats es van identificar a nivell d'espècie a partir de les seues característiques morfològiques, culturals, fisiològiques (temperatures), moleculars (regió ITS) i patogèniques. Es va identificar l'espècie *Amycosphaerella africana* associada al la taca greixosa dels cítrics a Espanya i Marroc i *Z. citri-griseum* com a agent causal de la taca greixosa en Panamà, estant associada també a la malaltia a Ghana.

El estudi epidemiològic de la taca greixosa en Panamà, va mostrar que la major defoliació dels arbres de taronja 'València' afectats per la malaltia va ocórrer en l'època seca, entre els mesos de desembre a abril. En el estudi de la dinàmica de la producció d'inòcul en la fullaraca, el model resultant per als dies fins a la descomposició total del les fulles es relacionà amb les variables climàtiques precipitació pluvial acumulada per setmana (mm), dies amb precipitació pluvial >1 mm per setmana (nº) i humitat relativa mitjana per setmana (%). En relació a les ascospores alliberades a partir de la fullaraca, el model resultant relacionà les variables climàtiques dies fins a la descomposició total de les fulles, dies amb precipitació pluvial >1 mm per setmana (nº), precipitació pluvial acumulada per setmana (mm) i la temperatura mitjana (°C). D'altra banda, l'experiment de seguiment de l'inòcul en el aire, va mostrar que la major disponibilitat d'inòcul de *Z. citri-griseum* ocorregué durant els mesos d'abril i maig quan s'inicia l'estació

de pluges. De la mateixa manera, la major incidència de la taca greixosa en les plantes trampa va coincidir amb els mesos de major disponibilitat d'inòcul. No obstant això, se van registrar infeccions també durant altres èpoques de l'any.

En els assajos de control es va confirmar l'eficàcia del fungicida fenbuconazol, que va reduir significativament la severitat de la taca greixosa en pomelo i taronja en Panamà. No obstant això, no es va detectar un efecte significatiu dels tractaments sobre el pes de la collita de fruits.

## ABSTRACT

Disease problems were frequently observed in citrus orchards in Panama, but in most cases their aetiology is unknown. Between 2010 and 2013 a total of 85 plots cultivated with different citrus species of citrus were surveyed in the main production areas in Panamá. Greasy spot, caused by the fungus *Zasmidium citri-griseum*, was identified as the most prevalent citrus disease in the country. Other fungal pathogens causing foliar and fruit diseases were also identified by the first time in Panamá: melanose caused by *Diaporthe citri*, postbloom fruit drop and anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*, and scab caused by *Elsinoë fawcettii*.

A collection of 42 isolates of *Mycosphaerellaceae* from different citrus-growing regions in Spain, Morocco, Ghana and Panama were characterized. Strain were identified based on morphological characteristics, growth at different temperatures, ITS sequencing and pathogenicity on citrus plants. The species *Amycosphaerella africana* was associated with greasy spot of citrus in Spain and Morocco and *Z. citri-griseum* was identified as the causal agent of greasy spot in Panama, being also associated with the disease in Ghana.

The study of greasy spot epidemiology in Panama showed that the greatest defoliation in 'Valencia' sweet orange trees affected by the disease occurred during the dry season between December and April. In the study of inoculum dynamics in the leaf litter, the days until complete decomposition of the leaves was related in the model with the accumulated rainfall per week (mm), days with precipitation >1 mm per week (n°) and average relative humidity per week (%). Ascospores released from the leaf litter were related with days until complete decomposition of leaves, days with precipitation >1 mm per week (n°), weekly cumulative rainfall (mm) and average temperature (°C). Furthermore, the experiment of airborne inoculum showed that the highest levels of *Z. citri-griseum* inoculum were recorded during April and May, coinciding with the onset of the rainy season. Likewise, the highest values of greasy spot incidence in trap plants were recorded during the months of higher inoculum availability.

## *Abstract*

---

Disease control experiments confirmed the efficacy of the fungicide fenbuconazole to reduce the severity of greasy spot in grapefruit and sweet orange in Panama. However, harvested yield was not significantly affected by the application of fungicide sprays.

# Índice general

	<b>Página</b>
Índice de figuras.....	v
Índice de tablas.....	xv
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>3</b>
1.1. Importancia de los cítricos en Panamá.....	3
1.2. Enfermedades fúngicas foliares de los cítricos más importantes a nivel mundial.....	8
1.2.1. Caída prematura de los frutos.....	9
1.2.2. Mancha marrón.....	9
1.2.3. Roña o sarnas.....	10
1.2.4. Melanosis.....	11
1.2.5. Mancha negra.....	12
1.2.6. Mancha grasienta.....	13
<b>Capítulo 2. Objetivos.....</b>	<b>19</b>
<b>Capítulo 3. Prospección de enfermedades fúngicas en los cítricos de Panamá.....</b>	<b>23</b>
3.1 Antecedentes.....	23

	<b>Página</b>
3.2. Materiales y métodos.....	24
3.2.1. Parcelas muestreadas.....	24
3.2.2. Aislamiento y conservación de los aislados.....	26
3.2.3. Identificación de especies fúngicas.....	27
3.2.4. Ensayos de patogenicidad.....	29
3.3. Resultados.....	32
3.3.1. Parcelas afectadas y síntomas observados.....	32
3.3.2. Identificación de las especies fúngicas.....	33
3.3.3. Ensayos de patogenicidad.....	44
3.4. Discusión.....	46
<b>Capítulo 4. Especies de <i>Mycosphaerellaceae</i> asociadas con la mancha grasienta de los cítricos en diferentes regiones climáticas.....</b>	<b>61</b>
4.1. Antecedentes.....	61
4.2. Materiales y métodos.....	62
4.2.1. Aislados fúngicos.....	62
4.2.2. Caracterización morfológica.....	63
4.2.3. Caracterización molecular.....	64
4.2.4. Efecto de la temperatura en el crecimiento miceliar.....	70
4.2.5. Ensayos de patogenicidad.....	72
4.3. Resultados.....	75
4.3.1. Caracterización morfológica.....	75
4.3.2. Caracterización molecular.....	87

	<b>Página</b>
4.3.3. Efecto de la temperatura en el crecimiento miceliar.....	91
4.3.4. Ensayos de patogenicidad.....	91
4.4. Discusión.....	98
<b>Capítulo 5. Epidemiología y control de la mancha grasienta de los cítricos en Panamá.....</b>	<b>109</b>
5.1. Antecedentes.....	109
5.2. Materiales y métodos.....	111
5.2.1. Epidemiología de la mancha grasienta.....	111
5.2.1.1. Parcela experimental.....	111
5.2.1.2. Dinámica de la defoliación.....	111
5.2.1.3. Dinámica de la producción de inóculo en la hojarasca.....	112
5.2.1.4. Seguimiento del inóculo en el aire y períodos de infección.....	117
5.2.2. Ensayos de control de la mancha grasienta.....	122
5.2.2.1. Parcelas experimentales.....	122
5.2.2.2. Severidad de la enfermedad.....	123
5.2.2.3. Rendimiento de la cosecha.....	124
5.3. Resultados.....	124
5.3.1. Epidemiología de la mancha grasienta.....	124
5.3.1.1. Dinámica de la defoliación.....	124
5.3.1.2. Dinámica de la producción de inóculo en la hojarasca.....	125
5.3.1.3. Seguimiento del inóculo en el aire y períodos de	

	<b>Página</b>
infección.....	140
5.3.2. Ensayos de control de la mancha grasienta.....	150
5.3.2.1. Severidad de la enfermedad.....	150
5.3.2.2. Rendimiento de la cosecha.....	157
5.4. Discusión.....	164
<b>Capítulo 6. Conclusiones.....</b>	<b>177</b>
<b>Capítulo 7. Bibliografía.....</b>	<b>183</b>

# Índice de figuras

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.1:</b> Mapa con la localización geográfica de las principales zonas de producción de cítricos en Panamá.....	3
<b>Figura 1.2:</b> Clasificación taxonómica de los suelos en Panamá.....	4
<b>Figura 1.3:</b> Mapa climático Köppen-Geiger de Panamá.....	5
<b>Figura 1.4:</b> Promedio mensual de las precipitaciones pluviales y temperaturas en Panamá (CCKP, 2015).....	5
<b>Figura 1.5:</b> A) Árboles de naranja criollos de huertos familiares; B) y C) parcelas comerciales de naranja ‘Valencia’; D) frutos de naranja ‘Valencia’; E) frutos de lima Tahití; F) frutos de pomelo ‘Star Ruby’.....	7
<b>Figura 1.6:</b> Síntomas de mancha grasienta de los cítricos causada por <i>Zasmidium citri-griseum</i> A) clorosis en el haz de la hoja de lima Tahití; B) pústulas oscuras en el envés de hoja de pomelo (A. Vicent); C) árbol de naranja con defoliación intensa; D) fruto de pomelo con lesiones en la corteza (A. Vicent).....	14
<b>Figura 3.1:</b> Localización geográfica de las parcelas de cítricos prospectadas en Panamá A) mapa provincial; B) mapa climático Köppen-Geiger.....	25
<b>Figura 3.2:</b> Mapas con la localización geográfica y zonas climáticas Köppen-Geiger de las parcelas de cítricos prospectadas en Panamá afectadas por los distintos síntomas: A) pústulas oscuras en hojas; B) lesiones necróticas en pétalos y caída prematura de frutos; C) pústulas suberosas en hojas; D) costras suberosas en hojas y frutos.....	34
<b>Figura 3.3:</b> Distribución porcentual de provincias afectadas con pustulaciones oscuras en el envés de las hojas de un total de 85 parcelas prospectadas.....	36
<b>Figura 3.4:</b> Distribución porcentual de especies de cítricos afectadas con pustulaciones oscuras en el envés de las hojas de un total de 85 parcelas prospectadas.....	36

<b>Figura 3.5:</b> A) y B) Pústulas oscuras observadas en el envés de las hojas de naranja ‘Valencia’; C) clorosis en el haz de las hojas de naranja ‘Valencia’; D) y E) hojas de pomelo y lima Tahití con pustulaciones oscuras en el envés; F) árbol de pomelo con una defoliación muy intensa; G) hojas caídas al suelo en una parcela de pomelo afectada.....	37
<b>Figura 3.6:</b> A) y B) Lesiones necróticas de color naranja a marrón en los pétalos de las flores afectadas de lima Tahití; C) caída prematura de los frutos de naranja; D) cálices persistentes tras la caída de los frutos de naranja; E) lesiones necróticas en hojas de lima mejicana; F) marchitamiento y seca de los brotes de lima mejicana afectados. ....	38
<b>Figura 3.7:</b> A) Pustulaciones suberosas en una hoja vieja de naranja B) hojas jóvenes de pomelo; C) brote de naranja; D) fruto de naranja, E) fruto de pomelo; F) cirros sobre picnidios en la superficie de un brote afectado.....	39
<b>Figura 3.8:</b> Presencia de costras suberosas A) en brotes jóvenes de lima rangpur; B) y C) en el haz y el envés de una hoja de mandarina; D) en un fruto de lima rangpur; E) en un fruto de mandarina.....	40
<b>Figura 3.9:</b> A) y B) Colonias de <i>Zasmidium citri-griseum</i> en medio de cultivo Patata Dextrosa Agar (PDA); C) pseudotecios observados en hojas secas caídas al suelo; D) ascosporas de <i>Zasmidium citri-griseum</i> .....	43
<b>Figura 3.10:</b> A) Colonia de <i>Colletotrichum acutatum</i> en medio de cultivo Patata Dextrosa Agar (PDA); B) conidias de <i>Colletotrichum acutatum</i> .....	43
<b>Figura 3.11:</b> A) y B) Colonias de <i>Diaporthe citri</i> ; C) picnidios de <i>Diaporthe citri</i> en medio de cultivo Patata Dextrosa Agar (PDA); D) $\alpha$ y $\beta$ conidias de <i>Diaporthe citri</i> . ....	44
<b>Figura 3.12:</b> A) y B) Colonias de <i>Elsinoë fawcettii</i> en medio de cultivo Patata Dextrosa Agar (PDA) .....	45
<b>Figura 3.13:</b> A) Clorosis en el haz de hoja de naranja ‘Valencia’ inoculada con <i>Zasmidium citri-griseum</i> ; B) y C) pústulas oscuras en el envés de hojas de naranja ‘Valencia’ inoculada con <i>Zasmidium citri-griseum</i> ; D) hoja sin síntomas de planta naranja testigo ‘Valencia’.....	47
<b>Figura 3.14:</b> A) y B) Lesiones necróticas en flores de naranja ‘Valencia’ inoculadas con <i>Colletotrichum acutatum</i> ; C) flor de naranja ‘Valencia’ en planta testigo sin síntomas; D) y E) lesiones necróticas en brotes y hojas de lima mejicana inoculadas con <i>Colletotrichum acutatum</i> ; F) hojas de planta testigo de lima mejicana sin síntomas. ....	48
<b>Figura 3.15:</b> A) Pústulas rojizas en el haz; B) envés; C) brote de naranja ‘Valencia’	

	Página
inoculada con <i>Diaporthe citri</i> ; D) hoja de una planta testigo de naranja ‘Valencia’ sin síntomas.....	49
<b>Figura 4.1:</b> Mapa con origen geográfico y zona climática Köppen-Geiger de los aislados de <i>Mycosphaerellaceae</i> de cítricos de España.....	65
<b>Figura 4.2:</b> Mapa con origen geográfico y zona climática Köppen-Geiger de los aislados de <i>Mycosphaerellaceae</i> de cítricos de Marruecos.....	65
<b>Figura 4.3:</b> Mapa con origen geográfico y zona climática Köppen-Geiger de los aislados de <i>Mycosphaerellaceae</i> de cítricos de Panamá.....	66
<b>Figura 4.4:</b> Mapa con origen geográfico y zona climática Köppen-Geiger de los aislados de <i>Mycosphaerellaceae</i> de cítricos de Ghana.....	66
<b>Figura 4.5:</b> Escala de severidad de la mancha grasienta en categorías de 0 a 3. A) 0 = no hay presencia de pústulas oscuras en el envés de la hoja; B) 1 = 1-10 pústulas oscuras en el envés de la hoja; C) 2 = 11-20 pústulas oscuras en el envés de la hoja; D) 3 = < 20 pústulas oscuras en el envés de la hoja.....	74
<b>Figura 4.6:</b> Aspecto del anverso de las colonias del grupo 1: <i>Mycosphaerellaceae</i> procedentes de Panamá y Ghana crecidas en medio de cultivo Patata Dextrosa Agar (PDA) tras 30 días de incubación a 25 °C. Aislados A) MC76; B) MC69; C) 4NTV1; D) 9NCV4; E) 43NCCh2; F) 38NCC2.....	76
<b>Figura 4.7:</b> Aspecto del anverso de las colonias del grupo 1: <i>Mycosphaerellaceae</i> procedentes de Panamá y Ghana crecidas en medio de cultivo Agar Avena (OA) tras 30 días de incubación a 25 °C. Aislados A) MC76; B) MC69; C) 4NTV1; D) 9NCV4; E) 43NCCh2; F) 38NCC2. ....	77
<b>Figura 4.8:</b> Aspecto del anverso de las colonias del grupo 1: <i>Mycosphaerellaceae</i> procedentes de Panamá y Ghana crecidas en medio de cultivo Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) tras 30 días de incubación a 25 °C. Aislados A) MC76; B) MC69; C) 4NTV1; D) 9NCV4; E) 43NCCh2; F) 38NCC2.....	78
<b>Figura 4.9:</b> Aspecto del anverso de las colonias del grupo 1: <i>Mycosphaerellaceae</i> procedentes de Panamá y Ghana crecidas en medio de cultivo Agar Extracto de Malta (MEA) tras 30 días de incubación a 25 °C. Aislados A) MC76; B) MC69; C) 4NTV1; D) 9NCV4; E) 43NCCh2; F) 38NCC2. ....	79
<b>Figura 4.10:</b> <i>Mycosphaerellaceae</i> pertenecientes al grupo 1 que produjeron pigmento amarillo en medio de cultivo Patata Dextrosa Agar (PDA) tras 30 días de incubación a 25 °C. Aislados A) 34NCC4; B) Myc-14. ....	82
<b>Figura 4.11:</b> Aspecto del anverso de las colonias del grupo 2: <i>Mycosphaerellaceae</i> procedentes de España y Marruecos crecidas en medio de cultivo Patata Dextrosa Agar (PDA) tras 30 días de incubación a 25 °C. Aislados A) MC-140; B) MC-	

	Página
141; C) MC-116; D) MC-03; E) MC-01; F) MC-102.....	83
<b>Figura 4.12:</b> Aspecto del anverso de las colonias del grupo 2: <i>Mycosphaerellaceae</i> procedentes de España y Marruecos crecidas en medio de cultivo Agar Avena (OA) tras 30 días de incubación a 25 °C. Aislados A) MC-140; B) MC-141; C) MC-116; D) MC-03; E) MC-01; F) MC-102.....	84
<b>Figura 4.13:</b> Aspecto del anverso de las colonias del grupo 2: <i>Mycosphaerellaceae</i> procedentes de España y Marruecos crecidas en medio de cultivo Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) tras 30 días de incubación a 25 °C. Aislados A) MC-140; B) MC-141; C) MC-116; D) MC-03; E) MC-01; F) MC-102.....	85
<b>Figura 4.14:</b> Aspecto del anverso de las colonias del grupo 2: <i>Mycosphaerellaceae</i> procedentes de España y Marruecos crecidas en medio de cultivo Agar Extracto de Malta (MEA) tras 30 días de incubación a 25 °C. Aislados A) MC-140; B) MC-141; C) MC-116; D) MC-03; E) MC-01; F) MC-102.....	86
<b>Figura 4.15:</b> <i>Mycosphaerellaceae</i> pertenecientes al grupo 2 que produjeron pigmento rojizo en medio de cultivo Patata Dextrosa Agar (PDA) tras 30 días de incubación a 25 °C. Aislados A) MC-17; B) MC-21.....	87
<b>Figura 4.16:</b> Aspecto del anverso de las colonias de los aislados de referencia crecidos en los diferentes medios de cultivo tras 30 días de incubación a 25 °C. <i>Zasmidium citri</i> CBS 122455 A) Patata Dextrosa Agar (PDA); B) Agar Avena (OA); C) Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA); D) Agar Extracto de Malta (MEA); <i>Amycosphaerella africana</i> CBS 680.95 (ant. <i>Mycosphaerella africana</i> ) E) PDA; F) OA; G) SNA; H) MEA; CBS 110500 (ant. <i>Mycosphaerella aurantia</i> ) I) PDA; J) OA; K) SNA; L) MEA; CBS 110843 (ant. <i>Mycosphaerella ellipsoidea</i> ) M) PDA; N) OA; O) SNA; P) MEA.....	88
<b>Figura 4.17:</b> Resultados del análisis filogenético de los aislados de <i>Mycosphaerellaceae</i> de cítricos mediante el método Neighbor-Joining basado en las distancias genéticas de las secuencias de la región ITS, calculadas con el modelo Kimura 2-parameter. Los números en los nodos corresponden a la frecuencia con que aparecen los grupos en el análisis 'bootstrap' de 1.000 repeticiones. ....	90
<b>Figura 4.18:</b> Ratio de crecimiento diario (mm día <sup>-1</sup> ) de los aislados de <i>Zasmidium citri-griseum</i> de Panamá y Ghana a diferentes temperaturas.....	92
<b>Figura 4.19:</b> Ratio de crecimiento diario (mm día <sup>-1</sup> ) de los aislados de <i>Amycosphaerella africana</i> de España y Marruecos a diferentes temperaturas.....	93
<b>Figura 4.20:</b> Ratio de crecimiento diario (mm día <sup>-1</sup> ) de los aislados de referencia: A) <i>Zasmidium citri-griseum</i> CBS 122455; B) <i>Amycosphaerella africana</i> CBS 680.95 (ant. <i>M. africana</i> ); C) CBS 110500 (ant. <i>M. aurantia</i> ) y D) CBS 110843 (ant. <i>M. ellipsoidea</i> ).....	94

	Página
<b>Figura 4.21:</b> Función no lineal de respuesta a la temperatura (Magarey <i>et al.</i> , 2005) ajustada para los aislados de <i>Zasmidium citri-griseum</i> (n=25) y <i>Amycosphaerella africana</i> (n=21).....	95
<b>Figura 4.22:</b> A) y B) Lesiones cloróticas en el haz de las hojas de un plantón de naranja ‘Valencia’ inoculado con <i>Zasmidium citri-griseum</i> , aislado Myc-21; C) – E) pústulas oscuras en el envés de las hojas; F) plantón de naranja ‘Valencia’ inoculado con <i>Z. citri-griseum</i> aislado (Myc-21) con defoliación de hojas; G) plantón testigo inoculado con agua destilada estéril sin síntomas; H) y I) haz y envés de hoja de planta testigo sin lesiones.....	96
<b>Figura 5.1:</b> Grupos de dos árboles de naranja ‘Valencia’ cubiertos con mallas plásticas donde se realizó el seguimiento de la dinámica de la defoliación en Churuquita, Panamá.....	112
<b>Figura 5.2:</b> Malla plástica con hojas secas caídas al suelo recolectadas mensualmente para medir la producción de inóculo en la hojarasca.....	113
<b>Figura 5.3:</b> Escala de descomposición de la hojarasca en categorías A) 0 = no descompuesta, todavía firme; B) 1 = parcialmente descompuesta, flexible todavía intacta; C) 2 = moderadamente descompuesta, pérdida de algunas laminas; D) 3 = altamente descompuesta, hoja esqueletizada.....	114
<b>Figura 5.4:</b> A) Túnel de viento utilizado para la extracción de ascosporas de <i>Zasmidium citri-griseum</i> de la hojarasca; B) portaobjeto recubierto con silicona para la captura de ascosporas.....	115
<b>Figura 5.5:</b> Sistema empleado para el seguimiento de la dinámica del inóculo: A) soporte de madera para colocación de los portaobjetos de vidrio; B) portaobjeto con una inclinación de 45° sobre la horizontal.....	118
<b>Figura 5.6:</b> Planta trampa de naranja ‘Valencia’ de dos años de edad empleada en el seguimiento de los períodos de infección de <i>Zasmidium citri-griseum</i> .....	118
<b>Figura 5.7:</b> Dinámica de la defoliación en árboles de naranja ‘Valencia’ afectados por mancha grasienta desde abril de 2012 a marzo de 2013 .....	125
<b>Figura 5.8:</b> Índice promedio de descomposición de las hojas (IPD) y número de ascosporas de <i>Zasmidium citri-griseum</i> liberadas en las muestras de hojarasca recogidas en 2011.....	126
<b>Figura 5.9:</b> Índice promedio de descomposición de las hojas (IPD) y número de ascosporas de <i>Zasmidium citri-griseum</i> liberadas en las muestras de hojarasca recogidas en 2012.....	127
<b>Figura 5.10:</b> Índice promedio de descomposición de las hojas (IPD) y número de ascosporas de <i>Zasmidium citri-griseum</i> liberadas en las muestras de hojarasca	

	Página
recogidas en 2013.....	128
<b>Figura 5.11:</b> Precipitación pluvial y humedad relativa registradas durante el seguimiento de la dinámica de producción de inóculo de <i>Zasmidium citri-griseum</i> en la hojarasca recogida en 2011.....	129
<b>Figura 5.12:</b> Precipitación pluvial y humedad relativa registradas durante el seguimiento de la dinámica de producción de inóculo de <i>Zasmidium citri-griseum</i> en la hojarasca recogida en 2012.....	130
<b>Figura 5.13:</b> Precipitación pluvial y humedad relativa registradas durante el seguimiento de la dinámica de producción de inóculo de <i>Zasmidium citri-griseum</i> en la hojarasca recogida en 2013.....	131
<b>Figura 5.14:</b> Temperatura registrada durante el seguimiento de la dinámica de producción de inóculo de <i>Zasmidium citri-griseum</i> en la hojarasca recogida en 2011.....	132
<b>Figura 5.15:</b> Temperatura registrada durante el seguimiento de la dinámica de producción de inóculo de <i>Zasmidium citri-griseum</i> en la hojarasca recogida en 2012.....	133
<b>Figura 5.16:</b> Temperatura registrada durante el seguimiento de la dinámica de producción de inóculo de <i>Zasmidium citri-griseum</i> en la hojarasca recogida en 2013.....	134
<b>Figura 5.17:</b> Representación gráfica y valores del coeficiente de correlación lineal de Pearson entre las variables del estudio sobre la dinámica de la producción de inóculo de <i>Zasmidium citri-griseum</i> en la hojarasca. ASCH: ascosporas liberadas por muestra mensual de hojas hasta su descomposición total, DDH: días hasta la descomposición total, PPA: precipitación pluvial acumulada (mm), DPP: días con precipitación pluvial (>1 mm), TP: temperatura promedio (°C); HRP: humedad relativa promedio (%)......	137
<b>Figura 5.18:</b> Gráfico de los residuos ‘deviance’ del modelo lineal generalizado (GLM) seleccionado para la variable respuesta número de días hasta la descomposición total de las hojas (DDH).....	138
<b>Figura 5.19:</b> Gráfico de los residuos ‘deviance’ del modelo lineal generalizado (GLM) seleccionado para la variable respuesta número de ascosporas liberadas por muestra mensual de hojas hasta la descomposición total (ASCH).....	140
<b>Figura 5.20:</b> Dinámica del número de ascosporas de <i>Zasmidium-citri griseum</i> capturadas por semana (ASC) durante las 104 semanas de estudio desde marzo de 2011 a marzo de 2013.....	141
<b>Figura 5.21:</b> Dinámica de la incidencia de la mancha grasienta (INC) en las plantas	

	Página
trampa durante las 104 semanas de estudio desde marzo de 2011 a marzo de 2013.....	141
<b>Figura 5.22:</b> Dinámica de los datos de las variables explicativas A) número de días con precipitación pluvial >1 mm por semana; B) precipitación pluvial acumulada por semana (PPA); C) temperatura promedio por semana (TP), durante las 104 semanas de estudio desde marzo de 2011 a marzo de 2013.....	142
<b>Figura 5.23:</b> Dinámica de los datos de las variables explicativas A) humedad relativa promedio por semana (HRP); B) horas con humectación por semana (HH); C) períodos de humectación >1 h por semana (PH), durante las 104 semanas de estudio desde marzo de 2011 a marzo de 2013.....	143
<b>Figura 5.24:</b> Dinámica de los datos de la variable explicativa promedio de la duración de los períodos de humectación >1 h por semana (PPH) durante las 104 semanas de estudio desde marzo de 2011 a marzo de 2013 en el área experimental de la parcela en estudio.....	144
<b>Figura 5.25:</b> Diagrama de cajas para las variables del estudio del inóculo en el aire y períodos de infección de <i>Zasmidium citri-griseum</i> A) ASC: ascosporas capturadas por semana (n°), PPA: precipitación pluvial acumulada por semana (mm), HRP: humedad relativa promedio por semana (%), HH: horas con humectación por semana (h); B) DPP: días con precipitación pluvial >1 mm por semana (n°), PH: períodos de humectación >1 h por semana (n°), PPH: promedio de la duración de los períodos de humectación >1 h por semana (h), TP: temperatura promedio por semana (°C).....	145
<b>Figura 5.26:</b> Representación gráfica y valores del coeficiente de correlación de Pearson entre las variables del estudio del inóculo en el aire y períodos de infección de <i>Zasmidium citri-griseum</i> . INC: incidencia de la mancha grasienta en las plantas trampa, ASC: ascosporas capturadas por semana (n°), PPA: precipitación pluvial acumulada por semana (mm), DPP: días con precipitación pluvial >1 mm por semana (n°), TP: temperatura promedio por semana (°C), HRP: humedad relativa promedio por semana (%), HH: humectación por semana (h), PH: períodos de humectación >1 h por semana (n°), PPH: promedio de la duración de los períodos de humectación >1 h por semana (h). Total de 104 períodos semanales desde marzo de 2011 a marzo de 2013.....	146
<b>Figura 5.27:</b> Representación gráfica de los intervalos de credibilidad al 95% del riesgo relativo para las variables meteorológicas PPA: precipitación pluvial acumulada por semana (mm) y DPP: días con precipitación pluvial >1 mm por semana (n°) en el modelo 1.e para la variable respuesta número de ascosporas capturadas por semana (ASC) que incorpora también una componente temporal de orden 1 como variable explicativa.....	148

	Página
<b>Figura 5.28:</b> Representación gráfica de los intervalos de credibilidad al 95% del riesgo relativo para las variables meteorológicas HH: humectación por semana (h) y PH: períodos de humectación >1 h por semana (n°) en el modelo 2.g para la variable respuesta incidencia de la enfermedad (INC) que incorpora también una componente temporal de orden 1 como variable explicativa.....	149
<b>Figura 5.29:</b> Diagrama de cajas de los porcentajes de hojas en cada una de las categorías de la escala de severidad (0-3) de mancha grasienta en los árboles tratados y no tratados con el fungicida fenbuconazol en el experimento de finca Gabriela en 2011.....	152
<b>Figura 5.30:</b> Diagrama de cajas de los porcentajes de hojas en cada una de las categorías de la escala de severidad (0-3) de mancha grasienta en los árboles tratados y no tratados con el fungicida fenbuconazol en el experimento de finca Gabriela en 2012.....	153
<b>Figura 5.31:</b> Diagrama de cajas de los porcentajes de hojas en cada una de las categorías de la escala de severidad (0-3) de mancha grasienta en los árboles tratados y no tratados con el fungicida fenbuconazol en el experimento de finca Gabriela en 2013.....	153
<b>Figura 5.32:</b> Diagrama de cajas de los porcentajes hojas en cada una de las categorías de la escala de severidad (0-3) de mancha grasienta en los árboles tratados y no tratados con el fungicida fenbuconazol en el experimento de finca Bella Vista en 2011.....	154
<b>Figura 5.33:</b> Diagrama de cajas de los porcentajes de hojas en cada una de las categorías de la escala de severidad (0-3) de mancha grasienta en los árboles tratados y no tratados con el fungicida fenbuconazol en el experimento de finca Bella Vista en 2012.....	154
<b>Figura 5.34:</b> Diagrama de cajas de la cosecha (kg árbol <sup>-1</sup> ) en los árboles tratados y no tratados con el fungicida fenbuconazol en la finca Gabriela en los años de estudio A) 2011; B) 2012; C) 2013.....	158
<b>Figura 5.35:</b> Diagrama de cajas de la cosecha (kg árbol <sup>-1</sup> ) en los árboles tratados y no tratados con el fungicida fenbuconazol en la finca Bella Vista en los años de estudio A) 2011; B) 2012.....	159
<b>Figura 5.36:</b> Representación gráfica de la cosecha de frutos (kg árbol <sup>-1</sup> ) obtenida en la finca Gabriela A) 2011; B) 2012; C) 2013.....	160
<b>Figura 5.37:</b> Representación gráfica de la cosecha de frutos (kg árbol <sup>-1</sup> ) obtenida en la finca Bella Vista A) 2011; B) 2012.....	161
<b>Figura 5.38:</b> Gráfico de los residuos del modelo ANOVA ajustado para los datos de	

	<b>Página</b>
cosecha obtenidos en la finca Gabriela A) 2011; B) 2012; C) 2013.....	163
<b>Figura 5.39:</b> Gráfico de los residuos del modelo ANOVA ajustado para los datos de cosecha obtenidos en la finca Bella Vista A) 2011; B) 2012.....	164



# Índice de tablas

	Página
<b>Tabla 3.1:</b> Aislados fúngicos seleccionados para la identificación molecular y ensayos de patogenicidad.....	29
<b>Tabla 3.2:</b> Parcelas prospectadas y tipificación de los síntomas observados en los árboles de cítricos. ....	35
<b>Tabla 3.3:</b> Especies fúngicas detectadas en la prospección agrupadas por provincia, distrito y especies de cítricos. ....	42
<b>Tabla 3.4:</b> Descripción morfológica de las esporas de las especies fúngicas detectadas en la prospección en parcelas de cítricos en Panamá y datos bibliográficos.....	51
<b>Tabla 4.1:</b> Aislados de <i>Mycosphaerellaceae</i> incluidos en el estudio de caracterización morfológica, molecular, temperaturas y patogenicidad.....	67
<b>Tabla 4.2:</b> Información sobre las secuencias de referencia de <i>Mycosphaerellaceae</i> y ‘outgroup’ utilizadas en el análisis filogenético.....	71
<b>Tabla 4.3:</b> Características de los dos grupos de <i>Mycosphaerellaceae</i> obtenidos y de los aislados de referencia estudiados. ....	80
<b>Tabla 4.4:</b> Dimensiones de las ascosporas de las especies de <i>Mycosphaerellaceae</i> de Panamá y España obtenidas en este estudio y medidas de referencia publicadas por otros autores. ....	89
<b>Tabla 4.5:</b> Parámetros estimados de la función no lineal de respuesta de la temperatura de los aislados de <i>Mycosphaerellaceae</i> evaluados. ....	94
<b>Tabla 4.6:</b> Patogenicidad sobre plantones de naranja ‘Valencia’ de los aislados de <i>Zasmidium citri-griseum</i> obtenidos de plantaciones de cítricos de Panamá afectadas por la mancha grasienta. ....	97
<b>Tabla 5.1:</b> Tratamiento fungicida evaluado para el control de la mancha grasienta en Panamá.....	123
<b>Tabla 5.2:</b> Fechas de las aplicaciones fungicidas en los experimentos de control de la mancha grasienta en Panamá.....	123

	Página
<b>Tabla 5.3:</b> Datos mensuales de las variables respuesta y explicativas estudiadas el experimento de producción de inóculo de <i>Zasmidium citri-griseum</i> en la hojarasca.....	135
<b>Tabla 5.4:</b> Análisis descriptivo de las variables respuesta y explicativas estudiadas el experimento de producción de inóculo de <i>Zasmidium citri-griseum</i> en la hojarasca.....	136
<b>Tabla 5.5:</b> Valores de los estimadores de los parámetros del modelo lineal generalizado (GLM) para la variable respuesta número de días hasta la descomposición total de las hojas (DDH) .....	138
<b>Tabla 5.6:</b> Valores de los estimadores de los parámetros del modelo lineal generalizado (GLM) para la variable respuesta número de ascosporas liberadas por muestra mensual de hojas hasta la descomposición total (ASCH) .....	139
<b>Tabla 5.7:</b> Modelos lineales generalizados (GLM) para la variable respuesta número de ascosporas capturadas por semana (ASC) incluyendo únicamente variables meteorológicas explicativas.....	145
<b>Tabla 5.8:</b> Modelos lineales generalizados (GLM) para la variable respuesta número de ascosporas capturadas por semana (ASC) con las variables meteorológicas explicativas y la componente temporal de orden 1.....	147
<b>Tabla 5.9:</b> Modelos lineales generalizados (GLM) para la variable respuesta incidencia de la mancha grasienta en las plantas trampa (INC) incluyendo únicamente variables meteorológicas explicativas.....	149
<b>Tabla 5.10:</b> Modelos lineales generalizados (GLM) para la variable respuesta incidencia de la mancha grasienta en las plantas trampa (INC) incluyendo variables meteorológicas explicativas y una componente temporal de orden 1.....	150
<b>Tabla 5.11:</b> Resultados del modelo de regresión logística ordinal sobre los valores de severidad en los experimentos de control de la mancha grasienta en la finca Gabriela 2011-2013.....	155
<b>Tabla 5.12:</b> Resultados del modelo de regresión logística ordinal sobre los valores de severidad en los experimentos de control en finca Bella Vista 2011-2012.....	156
<b>Tabla 5.13:</b> Probabilidades obtenidas con el modelo de regresión logística ordinal para las categorías de severidad de la mancha grasienta en los experimentos de Gabriela en 2011, 2012 y 2013.....	157
<b>Tabla 5.14:</b> Probabilidades obtenidas con el modelo de regresión logística ordinal para las categorías de severidad de la mancha grasienta en los experimentos de Bella Vista en 2011 y 2012.....	157

	<b>Página</b>
<b>Tabla 5.15:</b> Análisis de la varianza (ANOVA) realizado sobre la cosecha de frutos (kg arbol <sup>-1</sup> ) en la finca Gabriela en los años 2011, 2012 y 2013.....	162
<b>Tabla 5.16:</b> Análisis de la varianza (ANOVA) realizado sobre la cosecha de frutos (kg arbol <sup>-1</sup> ) en la finca Bella Vista en los años 2011 y 2012.....	162



# Capítulo 1

---



# Capítulo 1

## INTRODUCCIÓN

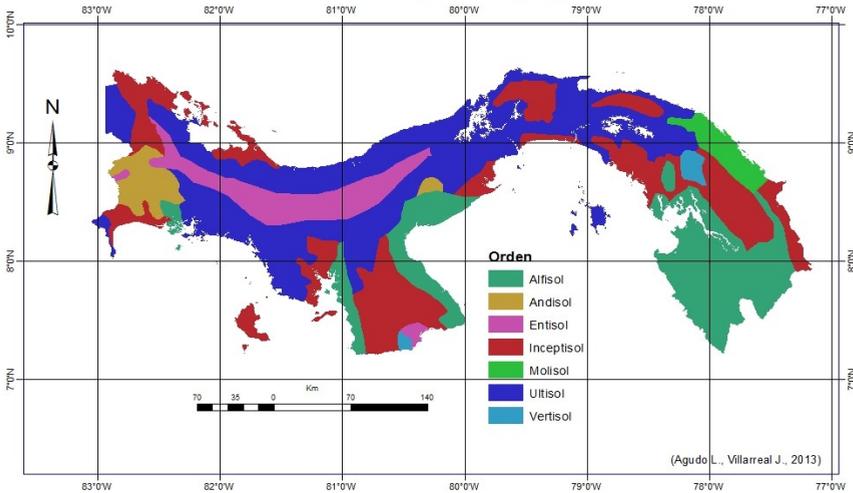
### 1.1. Importancia de los cítricos en Panamá

La producción de cítricos en Panamá ha adquirido una gran importancia en los últimos años. En 2012 se reportaron 5.500 ha de cítricos con una producción de 55.000 toneladas (FAO, 2012). Las principales zonas de producción de cítricos se encuentran en las provincias de Chiriquí, Veraguas, Coclé y Panamá Oeste. Según el Ministerio de Desarrollo Agropecuario de Panamá (MIDA), del total de las plantaciones existentes, el 77,3% se localiza en las provincias de Coclé, Chiriquí y Veraguas donde se genera más del 80% de la producción nacional (MIDA, 2015) (Fig. 1.1).



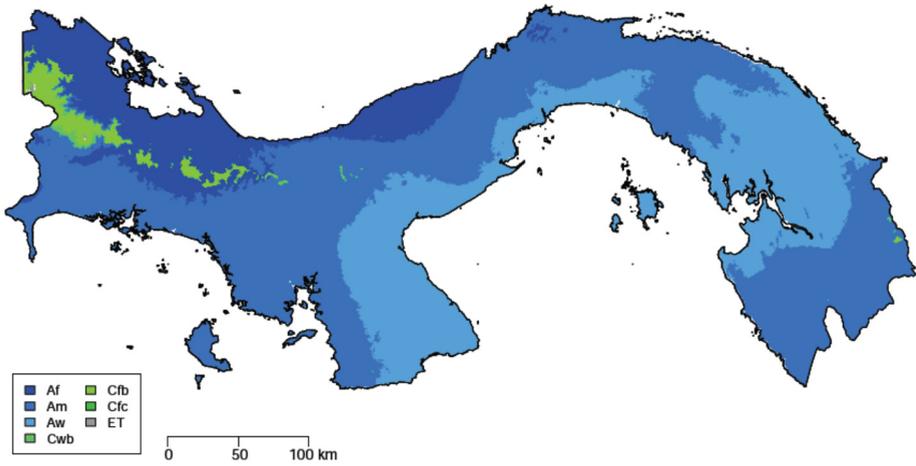
**Figura 1.1:** Mapa con la localización geográfica de las principales zonas de producción de cítricos en Panamá.

En Panamá la producción de cítricos se desarrolla en suelos con topografía variada que van desde parcelas relativamente planas a parcelas quebradas. Las altitudes en que se cultivan cítricos oscilan entre los 100 y 1.000 m. En la Fig. 1.2 se presenta la clasificación taxonómica de los suelos en Panamá. Las principales zonas de producción de cítricos se sitúan dentro de los órdenes de suelo ultisol, entisol, andisol y alfisol (IDIAP, 2015).

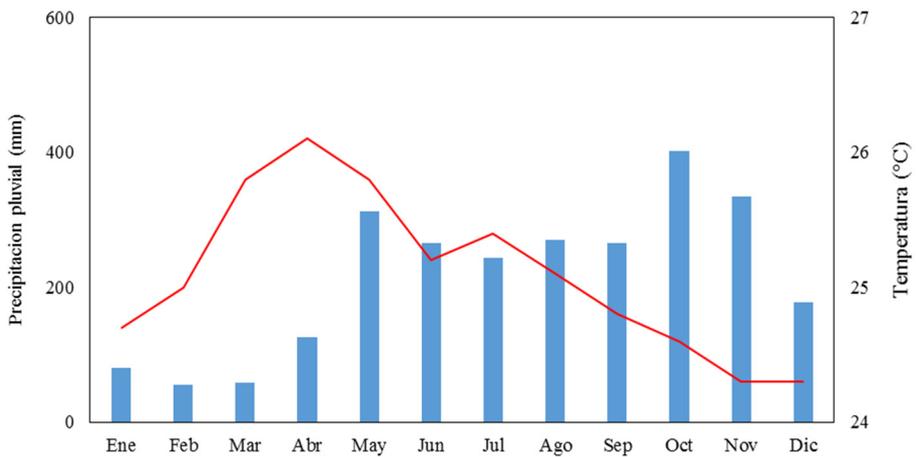


**Figura 1.2:** Clasificación taxonómica de los suelos en Panamá.

Según la clasificación climática de Koppén-Geiger el clima de Panamá es de tipo tropical, predominando en la gran mayoría de las regiones productoras de cítricos el clima tropical monzónico húmedo (Am) (Fig. 1.3). Este clima se caracteriza por una temperatura media mensual de todo el año igual o superior a 18 °C, con una estación seca corta seguida de una húmeda acompañada por fuertes lluvias en torno a los 2.500 mm (Peel *et al.*, 2007). En Panamá, la época de menor pluviometría se inicia a mediados del mes de diciembre y se extiende hasta el mes de abril con precipitaciones pluviales máximas de 100 mm mensuales, mientras que la época lluviosa se inicia en mayo hasta el mes de noviembre con precipitaciones pluviales promedio superiores a los 200 mm mensuales. Por otro lado, las temperaturas presentan pocas fluctuaciones durante todo del año oscilando entre los 24-27 °C (Fig. 1.4).



**Figura 1.3:** Mapa climático Köppen-Geiger de Panamá.



**Figura 1.4:** Promedio mensual de las precipitaciones pluviales y temperaturas en Panamá (CCKP, 2015).

En Panamá la actividad cítrica se desarrolla mediante dos sistemas de cultivo: el sistema tradicional y el sistema de producción comercial. El sistema tradicional es el de pequeños huertos familiares, localizados en las provincias de Veraguas (distrito de Santa Fé), Coclé (distritos de La Pintada, Penonomé y Antón), Herrera (Las Minas) Chiriquí y Panamá Oeste. Estos huertos son los que normalmente han abastecido el mercado nacional (IICA, 2009) y se distinguen por estar compuestos de árboles propagados a partir de semilla y actualmente son de edad avanzada en su mayoría (Fig. 1.5 A). En general, a estos árboles no se les brinda ningún manejo fitosanitario durante su etapa juvenil, ni tampoco en la etapa de producción, por lo que hay una elevada incidencia de enfermedades aparentemente de origen fúngico. El segundo sistema es el de producción comercial, que se desarrolla principalmente en las provincias de Chiriquí y Coclé y recientemente también en Veraguas donde se han establecido nuevas parcelas comerciales. Este sistema de producción se caracteriza por una planificación previa del cultivo, con especial énfasis en el manejo agronómico y fitosanitario de las plantaciones durante el ciclo juvenil y productivo para mejorar el rendimiento y calidad de las cosechas (Fig. 1.5 B y C).

Las especies de cítricos más importantes en Panamá son la naranja (*Citrus sinensis* Osbeck) (Fig. 1.5 D), lima Tahití (*C. latifolia* Yu. Tanaka) (Fig. 1.5 E) y los pomelos (*C. paradisi* Macf.) (Fig. 1.5 F) que se cultivan tanto a nivel de parcelas comerciales como en huertos familiares. Algunas especies de cítricos de menor importancia en Panamá son la mandarina (*C. reticulata* Blanco), lima ranpur (*C. limonia* Osbeck) y limón (*C. limón* (L.) Burm f.) que se cultivan únicamente a nivel de huertos familiares. En conjunto, la especie de cítricos con mayor área de cultivo en Panamá es la naranja con un 69% del total de la superficie en producción (INEC, 2015).

Dentro de las naranjas, el cultivar ‘Valencia’ es el de mayor aceptación por parte de los productores y consumidores. También se cultivan, aunque en menor medida, otros cultivares de naranja como: ‘Washington Navel’, ‘Pineapple’ y ‘Hamlin’ (IICA, 2009). Con respecto a los portainjertos los más utilizados son citrumelo Swingle (*C. paradisi* x *Poncirus trifoliata* L. Raf.), *C. volkameriana* Ten. & Pasq. y *P. trifoliata*.



**Figura 1.5:** A) Árboles de naranja criollos de huertos familiares; B) y C) parcelas comerciales de naranja ‘Valencia’; D) frutos de naranja ‘Valencia’; E) frutos de lima Tahití; F) frutos de pomelo ‘Star Ruby’.

La producción de cítricos en Panamá se comercializa principalmente en el mercado local para consumo en fresco, que se abastece principalmente de la producción de huertos familiares y de las parcelas comerciales. Por otro lado, existe también una cierta demanda para la producción de zumo y concentrados, que se procesa en dos plantas ubicadas en las zonas cítricas de Chiriquí y Coclé para el mercado local.

En relación a las enfermedades que afectan a los cítricos en Panamá, es poca la información disponible que describa cuales son los patógenos que están presentes. En el caso de las enfermedades virales se han descrito el *Citrus tristeza virus* (CTV) y el *Citrus leprosis virus* (CiLV) como los principales virus que afectan los cítricos en el país (MIDA, 2013). En relación a las enfermedades fúngicas no hay información previa disponible que describa con exactitud cuáles son las que están presentes en el país. Se han descrito síntomas asociados a enfermedades como la mancha grasienta de los cítricos, gomosis, antracnosis y la enfermedad rosa (Jaen, 2010), sin embargo los agentes causales de estos síntomas no han sido confirmados.

En la actualidad, Panamá cuenta con una norma de certificación sanitaria de cítricos implementada a través del MIDA que define las directrices, procedimientos y requisitos fitosanitarios para la introducción, producción, certificación y distribución de plantas de cítricos en viveros, en todo el territorio nacional (MIDA, 2013).

### **1.2. Enfermedades fúngicas foliares de los cítricos más importantes a nivel mundial**

Son muchas las enfermedades fúngicas que afectan a los frutos, hojas y brotes de los cítricos a nivel mundial. Algunas causan pérdidas considerables en el rendimiento, mientras que otras afectan principalmente a la calidad externa de los frutos, limitando su comercialización para el consumo en fresco. En este apartado se describen brevemente las enfermedades foliares más importantes de los cítricos a nivel mundial a modo de preámbulo de la prospección realizada en Panamá (Cap. 3).

### 1.2.1. Caída prematura de los frutos

La caída prematura de los frutos o ‘postbloom fruit drop’ (PFD) está causada por el hongo *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds y se caracteriza por provocar una disminución sustancial de los rendimientos en las especies de cítricos susceptibles. La enfermedad ha sido reportada en países de Sudamérica como Brasil y Argentina; en América Central en Costa Rica y Belice; en algunas islas del Caribe como República Dominicana y también en la península de Florida (EE.UU.) (Timmer *et al.*, 1994; Timmer, 2000b; Peres *et al.*, 2005). El PFD no ha sido citado todavía afectando a cítricos fuera del continente americano (Timmer *et al.*, 2004).

Los primeros síntomas de PFD se observan en los pétalos a modo de lesiones acuosas de color rosa a pardo, que posteriormente se vuelven de color naranja. Los pétalos afectados se secan totalmente manteniéndose adheridos a la inflorescencia (Timmer, 2000b). Los frutos jóvenes afectados por PFD caen de forma prematura, dejando el disco floral, cáliz y pedúnculo unidos al brote (Timmer *et al.*, 2004).

La principal fuente de inóculo de *C. acutatum* son las flores infectadas, donde el hongo se reproduce en forma de conidias que se diseminan mediante salpicaduras de lluvia durante los períodos de floración (Timmer, 2000b). Las infecciones se ven favorecidas por las condiciones óptimas de temperatura de entre 25-28 °C, con períodos de humectación de entre 10-12 h (Timmer, 1999). El período desde la infección hasta la manifestación de los síntomas es de tan solo 5-6 días (Timmer *et al.*, 2004).

### 1.2.2. Mancha marrón

La mancha marrón de las mandarinas o ‘*Alternaria brown spot*’ (ABS) es una enfermedad causada por un patotipo de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl (Bassimba *et al.*, 2014). Los daños de mancha marrón afectan principalmente a la calidad externa de la fruta, aunque la caída de los frutos puede reducir también el rendimiento de los árboles (Timmer *et al.*, 2003b; Vicent *et al.*, 2008). Los síntomas de ABS se describieron por primera vez en 1903 sobre mandarina ‘Emperor’ en Australia (Pegg, 1966). Actualmente la enfermedad está

ampliamente distribuida en las principales áreas cítricas del mundo. Su distribución geográfica abarca zonas de clima subtropical húmedo como Florida, Colombia, Brasil, Argentina y regiones de clima árido y semi-árido como Israel, Sudáfrica, Turquía, España (Timmer *et al.*, 2004).

Los síntomas de ABS se caracterizan por la presencia de necrosis en hojas, brotes y la corteza de los frutos. Las hojas jóvenes son muy susceptibles a la enfermedad y es frecuente la aparición sobre ellas de áreas necróticas de gran tamaño. En muchos casos, estas lesiones avanzan rápidamente siguiendo las nervaduras de las hojas. Las lesiones suelen presentar un halo clorótico a su alrededor y muchas de las hojas afectadas caen prematuramente. En casos de infecciones muy graves, los brotes pueden incluso llegar a necrosarse por completo (Vicent *et al.*, 2008). En los frutos afectados aparecen excrescencias suberosas y necrosis deprimidas de tamaño y forma variable. 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 (Vicent *et al.*, 2008).

La principal fuente de inóculo de este hongo son las hojas viejas sobre las que se reproduce mediante conidias (Reis *et al.*, 2006). La diseminación de las conidias se da principalmente mediante corrientes de aire y también por salpicaduras de lluvia (Timmer *et al.*, 1998). Las temperaturas óptimas para la infección oscilan entre los 23-27 °C acompañadas de períodos de humectación entre 12-36 h de duración (Vicent *et al.*, 2008). El tiempo de incubación hasta la manifestación de los síntomas es extremadamente corto, de 1-2 días (Timmer, 1999).

### 1.2.3. Roñas o sarnas

Las roñas o sarnas de los cítricos son un conjunto de enfermedades causadas por diferentes especies del género *Elsinoë*. Se han descrito al menos dos tipos de roñas que afectan a los cítricos: La roña de los cítricos causada por *E. fawcettii* Bitancourt & Jenk., que se encuentra ampliamente distribuida en las zonas cítricas húmedas a nivel mundial, y la roña de la naranja causada por *E. australis* Bitancourt & Jenk. que afecta principalmente los frutos de naranja y mandarinas y se ha citado principalmente en Sudamérica (Timmer, 2002b;

Chung, 2011). Las roñas de los cítricos no afectan al rendimiento de la cosecha pero reducen notablemente el valor comercial de los frutos en los mercados de consumo en fresco. Por otra parte, las especies de *Elsinoë* están consideradas como patógenos de cuarentena en los países de la Unión Europea (Vicent *et al.*, 2004).

Los síntomas causados por las roñas de los cítricos se caracterizan por la formación de pústulas suberosas en las hojas y frutos. Las lesiones jóvenes son ligeramente protuberantes y varían de un color rosa a marrón claro, que posteriormente se oscurecen con la edad (Timmer *et al.*, 2004). La roña de la naranja solo causa lesiones sobre frutos y los síntomas son muy similares a los causados por *E. fawcettii*, pero con pústulas menos prominentes, redondeadas y con márgenes más regulares (Timmer, 2002b).

El principal inóculo de *Elsinoë* spp. son las conidias de la forma asexual que se forman en acérvulos sobre las pústulas suberosas en los frutos y hojas afectadas. La liberación y diseminación de las conidias de *Elsinoë* spp. se produce principalmente por salpicaduras de lluvia (Vicent *et al.*, 2004). Las temperaturas óptimas para la infección se sitúan entre los 23-27 °C junto con períodos de humectación de entre 4-24 h (Agostini *et al.*, 2003). El período de incubación hasta la aparición de los síntomas puede durar unos 4-6 días (Timmer, 1999).

#### **1.2.4. Melanosis**

La melanosis es una enfermedad causada por *Diaporthe citri* (H.S. Fawc.) F.A. Wolf. y se encuentra presente en la mayoría de las regiones cítricas del mundo. La melanosis solo se considera una enfermedad importante cuando la fruta se cultiva para el mercado fresco (Whiteside, 2000). La enfermedad reviste mayor gravedad en regiones húmedas y subtropicales, menos en los trópicos húmedos, y sin importancia en zonas áridas (Mondal *et al.*, 2007). El síntoma típico de la melanosis es la formación de pústulas suberosas de color marrón sobre las hojas jóvenes, ramas y frutos (Timmer *et al.*, 2004; Vicent, 2006). En el caso de los frutos, los daños se limitan a la corteza y no afectan a la pulpa de los frutos (Vicent, 2006).

La principal fuente de inóculo de *D. citri* son las ramitas secas que quedan en la copa de los árboles afectados y sobre las que se forman abundantes picnidios de la forma asexual de *D. citri*. Aunque este patógeno induce síntomas en hojas y frutos, estos no sirven como fuente de inóculo (Timmer, 1999). Las conidias se diseminan por salpicaduras de lluvia alcanzando los frutos, hojas y ramas. Las condiciones óptimas de temperatura para que se den las infecciones oscilan entre 24-28 °C y se necesitan periodos de humectación entre 10-12 h (Timmer *et al.*, 2004). El periodo de incubación hasta la aparición de los síntomas puede durar una semana (Whiteside, 2000).

### 1.2.5. Mancha negra

La mancha negra causada por *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Van der Aa y está presente en las principales áreas cítricas del mundo como Argentina, Brasil, China, Sudáfrica, Australia y recientemente también en Florida (Kotzé, 2000; Schubert *et al.*, 2014). Al igual que la roña de los cítricos, esta enfermedad está considerada como cuarentenaria en la Unión Europea (Vicent *et al.*, 2004). Todas las especies y variedades de cítricos cultivadas son susceptibles a la enfermedad, siendo los limones y las naranjas tardías especialmente sensibles.

Los síntomas de mancha negra consisten en manchas oscuras deprimidas en la corteza de los frutos, aunque pueden aparecer también otro tipo de lesiones menos específicas conocidas como ‘freckle spot’, ‘virulent spot’ o ‘false melanose’ (Vicent *et al.*, 2004). La mancha negra es una enfermedad que afecta principalmente a la calidad de los frutos, aunque en algunos casos provoca también la caída prematura de los frutos reduciendo la cosecha.

Aunque los síntomas en hojas son poco frecuentes (Kotzé, 2000), *P. citricarpa* infecta a las hojas que luego en el suelo como hojarasca se convierten en la principal fuente de inóculo. Las ascosporas formadas en pseudotecios en la hojarasca se diseminan por el viento y el rango óptimo de temperatura para que se den las infecciones está entre 21-32 °C junto con periodos de humectación de 1-2 días (Timmer, 1999). En las lesiones de los frutos y brotes *P. citricarpa* se reproduce en forma de conidias que se diseminan mediante salpicaduras de lluvia.

### 1.2.6. Mancha grasienta

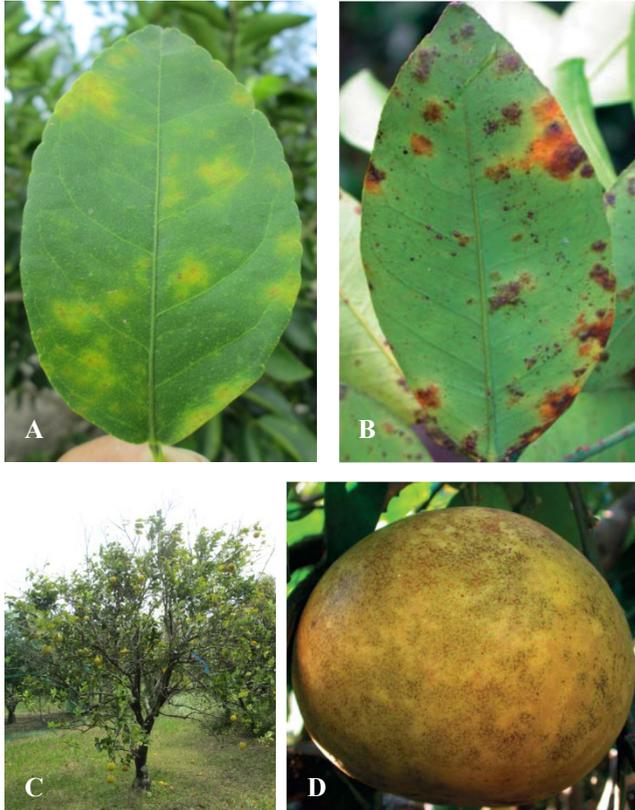
La mancha grasienta de los cítricos está causada por el hongo *Zasmidium citri-griseum* (F.E. Fisher) U. Braun & Crous (Whiteside, 1970; Braun *et al.*, 2014). Los daños foliares de la mancha grasienta provocan una reducción en el rendimiento de la cosecha debido a la defoliación prematura de los árboles. En Florida se han reportado pérdidas de hasta un 45% en pomelo y 25% en naranja (Timmer y Gottwald, 2000). De igual forma, en pomelos se han observado daños directos en frutos con mermas del 5-10% para su comercialización en fresco (Mondal y Timmer, 2006a).

Los síntomas de mancha grasienta se describieron por primera vez en 1915 en Florida. Inicialmente, la sintomatología fue atribuida a deficiencias nutricionales y a daños causados por el ácaro del tostado (*Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead)) (Mondal y Timmer, 2006a). Posteriormente se identificó a *Z. citri-griseum* como su verdadero agente causal (Whiteside, 1970). La enfermedad se detectó posteriormente en varias zonas cítricas del continente Americano y en el Caribe (Mondal y Timmer, 2006a).

Las especies de cítricos más susceptibles a la mancha grasienta son los pomelos, limones y naranjas tempranas, siendo menos sensibles las mandarinas y naranjas tardías (Timmer y Gottwald, 2000). La mancha grasienta afecta principalmente a las hojas, observándose una clorosis perceptible en el haz (Fig. 1.6 A). En el envés es muy característica la formación de pústulas oscuras (Fig. 1.6 B). Los árboles afectados por la enfermedad sufren graves defoliaciones (Fig. 1.6 C). Las lesiones observadas en frutos de pomelo consisten en pequeñas punteaduras necróticas en la corteza rodeadas por áreas de color verdoso (Fig. 1.6 D).

La principal fuente de inóculo de la mancha grasienta son las ascosporas producidas en los pseudotecios presentes en la hojarasca (Timmer y Gottwald, 2000). Las ascosporas se liberan al ambiente cuando la hojarasca se humedece por acción de la lluvia o los riegos. La disponibilidad de inóculo depende, entre otros factores, de la época en la que se produce la caída de las hojas y de la velocidad con la que se forman los pseudotecios. La germinación de las ascosporas necesita de humectación o humedad relativa cercana al 100%. Una vez germinadas las ascosporas, el micelio del hongo crece sobre la superficie de

la hoja sin llegar a penetrarla, lo que se conoce como fase de crecimiento epifítico. El desarrollo del micelio epifítico se ve favorecido por altas humedades y temperaturas entre 25 y 30 °C (Timmer, 2002a). La infección se produce a través de los estomas, que en las hojas de cítricos están situados principalmente en el envés (Timmer *et al.*, 2004).



**Figura 1.6:** Síntomas de mancha grasienta de los cítricos causada por *Zasmidium citri-griseum* **A)** clorosis en el haz de la hoja de lima Tahití; **B)** pústulas oscuras en el envés de hoja de pomelo (A. Vicent); **C)** árbol de naranja con defoliación intensa; **D)** fruto de pomelo con lesiones en la corteza (A. Vicent).

El período de incubación de la enfermedad es muy largo y los primeros síntomas de la mancha grasienta no son visibles hasta los 4-6 meses después de la infección (Timmer *et al.*, 2003a). No obstante, las temperaturas altas habituales en las zonas tropicales pueden acelerar el desarrollo de los síntomas. En cambio, en las zonas de climas más fríos la aparición de los síntomas puede retrasarse (Timmer, 2002a).

El control de la mancha grasienta se realiza principalmente mediante la aplicación foliar de fungicidas. El hongo *Z. citri-griseum* es muy sensible a la acción de los fungicidas durante su fase de crecimiento micelial epifítico. Se han evaluado diferentes fungicidas para el control de la mancha grasienta, siendo los primeros en demostrar su eficacia los productos a base de cobre, aceites minerales y benomilo (Whiteside, 1973b). Actualmente, en Florida se recomienda la utilización de fungicidas del grupo de los triazoles como el fenbuconazol y otros del grupo QoI (estrobilurinas) como piraclostrobin, azoxistrobin y trifloxistrobin (Dewdney, 2014).

Se han evaluado también otros métodos de control como la aplicación de fertilizantes foliares a base de hierro, zinc y manganeso, que proporcionan un control aceptable aplicados a dosis altas (Timmer y Zitko, 1995). El tratamiento de la hojarasca con urea y cal se ha ensayado también como método para reducir el inoculo en las parcelas afectadas (Mondal y Timmer, 2003a).



## Capítulo 2

---



# Capítulo 2

## OBJETIVOS

La presente tesis doctoral se plantea con los siguientes objetivos:

### **Capítulo 1. Prospección de enfermedades fúngicas en los cítricos de Panamá**

1. Determinar la etiología e importancia de las principales enfermedades fúngicas presentes en las regiones cítricas de Panamá.

### **Capítulo 2. Especies de *Mycosphaerellaceae* asociadas con la mancha grasienta de los cítricos en diferentes regiones climáticas**

2. Determinar la etiología de la mancha grasienta en regiones geográficas previamente no estudiadas, de clima tropical en África Occidental y América Central y clima semi-árido en la cuenca del Mediterráneo.

### **Capítulo 3. Epidemiología y control de la mancha grasienta de los cítricos en Panamá**

3. Seguir la dinámica estacional del inóculo en el aire y los períodos de infección en Panamá y relacionarlos con las variables meteorológicas.
4. Evaluar la eficacia de la aplicación de fungicidas para el control de la mancha grasienta en Panamá.



## Capítulo 3

---



# Capítulo 3

## PROSPECCIÓN DE ENFERMEDADES FÚNGICAS EN LOS CÍTRICOS DE PANAMÁ

### 3.1. Antecedentes

Como ya se ha indicado en el apdo. 1.1, el área de producción de cítricos en Panamá se ha incrementado considerablemente en los últimos años. En el 2012 se reportaron 5.500 ha de cítricos con una producción de 55.000 toneladas (FAO, 2012). Las principales áreas de producción se encuentran localizadas en la zona central y oeste del país. La naranja y la lima Tahití son las especies más importantes que se cultivan y la producción se comercializa principalmente en el mercado local para el consumo en fresco o para procesado de zumo.

En las plantaciones de cítricos en Panamá se observan con frecuencia problemas de enfermedades, sin embargo en la mayoría de los casos se desconoce su etiología. Uno de los principales problemas observados en el país es la presencia de pústulas oscuras y clorosis en las hojas que inducen la defoliación prematura de los árboles de cítricos. Estos síntomas se han asociado generalmente con hongos de la familia *Mycosphaerellaceae* en otras zonas del mundo (Mondal y Timmer, 2006a). La mancha grasienta de los cítricos causada por *Z. citri-griseum* es la enfermedad fúngica foliar de los cítricos más importante en el Caribe y Centro América (Whiteside, 1970; Hidalgo *et al.*, 1997; Mondal y Timmer, 2006a), pero hasta la fecha no ha sido descrita en Panamá.

Otro problema observado con frecuencia en Panamá es la abscisión prematura de los frutos jóvenes con los cálices persistentes en algunas parcelas

después de los períodos de floración. Los síntomas suelen ser más severos en flores de naranja y lima Tahití y en menor grado en flores de pomelo. La presencia de pústulas rojizas en hojas y ramas también se viene observando en árboles viejos de cítricos en Panamá. Por lo general, los árboles afectados tienen numerosas ramitas secas y pérdida de hojas. También es frecuente observar sobre las hojas y frutos de lima rangpur (*C. limonia* Osbeck) la presencia de numerosas costras suberosas que restan calidad a la producción de los frutos que se comercializan en fresco para el mercado local.

En cualquier caso, el conocimiento actual de las enfermedades de los cítricos en Panamá es muy limitado, ya que hasta la fecha no existe ningún trabajo de prospección sistemática. Por lo tanto, el principal objetivo de nuestro estudio fue determinar la importancia y la etiología de las principales enfermedades fúngicas presentes en las regiones de productores de cítricos de Panamá.

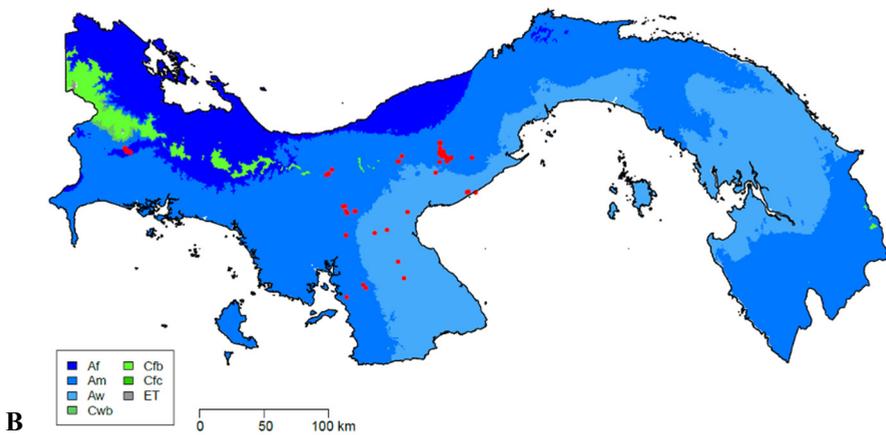
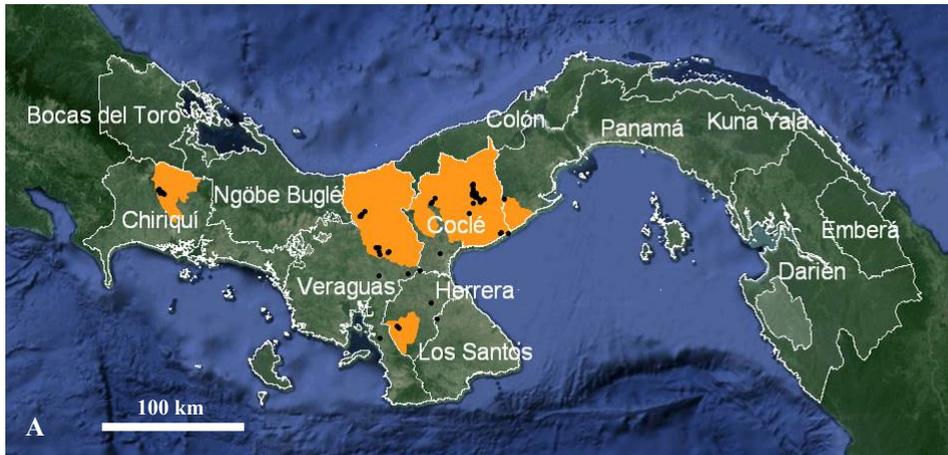
## **3.2. Materiales y métodos**

### **3.2.1. Parcelas muestreadas**

Entre los años 2010 y 2013 se prospectaron un total de 85 parcelas de diversas especies de cítricos en las principales zonas productoras del país (Fig. 3.1 A y B). Todas las muestras se recolectaron directamente en las parcelas afectadas o fueron remitidas por los técnicos de las fincas y/o del MIDA.

En cada una de las parcelas prospectadas, al menos cinco árboles de cítricos se examinaron cuidadosamente. En cada árbol, se procedió al estudio de los síntomas a fin de caracterizar los diferentes tipos de afección como: clorosis y pustulaciones oscuras en hojas, muerte de ramas, lesiones necróticas en pétalos florales, pustulaciones y costras suberosas en brotes y frutos. Seguidamente, las muestras se colectaron en base a los síntomas observados y cada una de las muestras se colocaron individualmente en bolsas plásticas, acompañadas con información de campo como: georeferenciación, fecha de colecta, provincia, distrito, tipo de producción (comercial o huerto familiar) especie, variedad. Las muestras colectadas se conservaron en frío dentro de neveras portátiles durante su traslado al laboratorio. En el laboratorio, la información de campo de cada una

de las muestras se procesó con una base de datos Microsoft Excel 2010 y las muestras se almacenaron a 5 °C hasta su procesado.



**Figura 3.1:** Localización geográfica de las parcelas de cítricos prospectadas en Panamá **A)** mapa provincial; **B)** mapa climático Köppen-Geiger.

### 3.2.2. Aislamiento y conservación de los aislados

En el laboratorio, el material vegetal colectado se procesó de acuerdo al tipo de síntoma y órgano afectado. Las hojas con síntomas de clorosis y pústulas oscuras en el envés se lavaron con agua del grifo y se desinfectaron superficialmente con una solución de hipoclorito sódico al 1% durante 5 min. Seguidamente, se lavaron dos veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de hipoclorito. En las hojas con pústulas oscuras se realizaron aislamientos sembrando pequeños fragmentos de mesófilo que se colocaron en placas Petri con medio de cultivo Patata Dextrosa Agar (PDA) (Biokar Diagnostic, Solabia, Francia) con  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de sulfato de estreptomicina (PDAS) (Whiteside, 1970).

Las muestras de pétalos con lesiones necróticas color naranja y las hojas con lesiones necróticas se desinfectaron mediante inmersión en etanol al 70% durante 30 segundos, seguido de 1 min en hipoclorito sódico al 1% y finalmente enjuagadas dos veces con agua destilada estéril. Los aislamientos se realizaron mediante siembra de pequeños fragmentos del material afectado en placas Petri con PDAS (Agostini *et al.*, 1992).

Los aislamientos a partir de ramitas secas se realizaron mediante cámara húmeda incubándolas durante 24 h a temperatura ambiente para promover la exudación de masas de conidias procedentes de picnidios (Timmer *et al.*, 2004). El exudado conidial resultante se sembró en placas Petri con medio PDA suplementado con 0,1% de ácido tartárico (Mondal *et al.*, 2004).

Los frutos con la presencia de costras suberosas sobre la corteza se lavaron con agua de grifo abundante y jabón, seguidamente se dejaron secar a temperatura ambiente durante 2-3 días. Los frutos ya secos se desinfectaron superficialmente mediante inmersión en etanol al 70% y con la ayuda de un bisturí se rasparon fragmentos de las costras que se sembraron en placas Petri con medio selectivo PDA con  $0,4 \text{ g L}^{-1}$  de dodina y  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  de sulfato de estreptomicina y tetraciclina (Whiteside, 1986).

Se sembraron siete puntos de aislamiento por placa Petri totalizando 10 placas por cada muestra. Todas las placas de aislamiento se incubaron en estufa entre 24-26 °C en oscuridad durante 10-12 días. Las colonias fúngicas obtenidas se repicaron en medio de cultivo PDA y se incubaron nuevamente en las mismas

condiciones descritas anteriormente de acuerdo con el método de aislamiento para cada tipo de muestra. Las colonias fúngicas ya repicadas de cada uno de los aislados se utilizaron para obtener cultivos monohifales o monospóricos, según el caso, mediante la técnica de las diluciones sucesivas. Los aislados se conservaron por duplicado a -80 °C en crioviales con una solución de glicerol al 15% y a -20 °C en papel de filtro deshidratado con silica gel (Dhingra y Sinclair, 1995).

### **3.2.3. Identificación de especies fúngicas**

Las colonias fúngicas de los aislados se identificaron preliminarmente mediante el aspecto de la colonia y la observación de sus estructuras morfológicas con un microscopio óptico a 400X.

#### ***Inducción de la esporulación de los aislados***

Para inducir la esporulación de los aislados asignados preliminarmente a la familia *Mycosphaerellaceae* se sembraron en medio de cultivo PDA y en otros medios de cultivos descritos con más detalle en el Capítulo 4. Las placas se incubaron en oscuridad a 25 °C durante 30 días, aunque no se logró obtener esporulación en ninguno de los aislados. Para observar las ascosporas se utilizó la metodología descrita por Whiteside (1970) con algunas modificaciones. Se colectaron hojas caídas al suelo en parcelas fuertemente afectadas por la enfermedad. Las hojas se revisaron con una lupa binocular a 50X para detectar la presencia de pseudotecios de color oscuro dentro del tejido. Seguidamente, se colocaron pequeños fragmentos de hojas con pseudotecios previamente humedecidos en la tapa de placas Petri, mientras que en la base se colocó un portaobjeto con gotas de agua destilada estéril para capturar las ascosporas liberadas de los pseudotecios.

La inducción de la esporulación de los aislados asignados preliminarmente al género *Colletotrichum* se realizó mediante la incubación en medio de cultivo PDA a 25 °C en oscuridad durante siete días. En el caso de *Phomopsis* se indujo la formación de picnidios y producción de conidias mediante la siembra en medio de cultivo PDA con ramitas de pomelo esterilizadas previamente, en fotoperíodo de 12 h a 25 °C durante dos meses (Mondal *et al.*, 2004).

Por último, en los aislados asignados preliminarmente al género *Elsinoë* se indujo la producción de conidias siguiendo la metodología propuesta por Whiteside (1978). Se prepararon pequeños fragmentos de 1 a 3 mm<sup>3</sup> de colonias de dos a tres semanas de edad cultivadas en PDA. Los fragmentos se aplastaron en el fondo de placas Petri con la ayuda de una espátula y se sumergieron en medio líquido Frie's (5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>, 1 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 0,1 g CaCl<sub>2</sub>, 0,1 g NaCl y 20 g de sacarosa en un litro de agua destilada) (Luke y Wheeler, 1955). Las placas se incubaron de uno a dos días a 27 °C en oscuridad. Seguidamente el medio Frie's se decantó cuidadosamente y las microcolonias adheridas en el fondo de la placa Petri se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Finalmente, las microcolonias presentes en las placas Petri se embebieron en agua de estanque esterilizada y se incubaron a 25 °C en oscuridad durante 24 h.

### ***Identificación morfológica y molecular de los aislados***

La caracterización morfológica y cultural de los aislados se realizó en PDA, donde se evaluó el color de la colonia y tipo de margen de crecimiento. En los casos que fue posible, se midió la longitud y anchura de un total de 100 esporas con un microscopio óptico a 400X y se caracterizaron por su color, presencia de septos y/o apéndices.

Se seleccionaron dos aislados representativos de cada tipo de morfología, procedentes de diferentes áreas geográficas y sintomatología asociada, para su identificación molecular (Tabla 3.1). La extracción del DNA se realizó a partir del micelio producido por cada aislado crecido en medio PDA, mediante el 'kit' de extracción EZNA (Omega Bio-tek) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para amplificar por PCR el DNA ribosómico de los aislados se utilizaron los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990). Estos cebadores amplifican una región (5.8S-ITS) del DNA ribosómico que contiene los espaciadores internos ITS1 e ITS2 y el gen que codifica el RNA ribosómico 5.8S. Cada reacción contenía 1x de tampón, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, 200 µM de cada uno de los dNTPs, 0,4 µM de cada uno de los cebadores, 1U de ADN-polimerasa (Need S.L., Valencia, España) y 1µl de la solución del ADN extraído. La mezcla se ajustó con agua (Chromasolv® Plus, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) a un volumen final de 25 µl. La PCR se realizó en un termociclador Peltier Thermal

Cycler-200 (MJ Research Inc., Waltham, MA, EE.UU.) consistiendo en un primer paso de 94 °C durante 4 min, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 1,5 min a 72 °C y finalmente, 72 °C durante 10 min para completar las extensiones.

**Tabla 3.1:** Aislados fúngicos seleccionados para la identificación molecular y ensayos de patogenicidad.

Aislado	Hospedante	Síntoma	Origen geográfico		Año
			Distrito	Provincia	
9NCV4	<i>Citrus sinensis</i>	Pústula en hoja	San Francisco	Veraguas	2010
17NCC5	<i>C. sinensis</i>	Pústula en hoja	Penonomé	Coclé	2010
36NCC3-3	<i>C. sinensis</i>	Lesiones necróticas en pétalos	Penonomé	Coclé	2011
39 LCC3-3	<i>C. aurantifolia</i>	Lesiones necróticas en hojas	Penonomé	Coclé	2011
Ph-25-1	<i>C. sinensis</i>	Ramas secas	Penonomé	Coclé	2012
Ph-18-2	<i>C. sinensis</i>	Ramas secas	Penonomé	Coclé	2012
El-12	<i>C. limonia</i>	Costras en frutos	San Carlos	Panamá	2013
El-31	<i>C. limonia</i>	Costras en frutos	Penonomé	Coclé	2013

Los productos de PCR obtenidos se purificaron y se secuenciaron en el servicio de la UPV-CSIC. Las secuencias fueron primero editadas utilizando los programas Chromas (Versión 2.32 Technelysium Pty Lda, Australia) y se compararon con las secuencias existentes en la base de datos GenBank mediante el programa BLAST del NCBI (National Center of Biotechnology Information, EE.UU.).

### 3.2.4. Ensayos de patogenicidad

Los mismos aislados seleccionados para la identificación molecular se utilizaron también en los ensayos de patogenicidad. En todos los ensayos se emplearon plantones de cítricos de dos años de edad injertados sobre citrumelo Swingle. Por cada aislado se inocularon dos plantones en cada uno de los ensayos

realizados con sus correspondientes testigos inoculados con agua destilada estéril.

### ***Ensayos de patogenicidad con aislados de *Mycosphaerellaceae****

En las inoculaciones de los aislados de *Mycosphaerellaceae* se utilizaron los aislados 9NCV4 y 17NCC5 (Tabla 3.1). Se emplearon plantones de naranja ‘Valencia’ previamente podados para obtener una brotación uniforme. Con los aislados de *Mycosphaerellaceae* no se logró obtener esporulación en medio de cultivo, por lo que se preparó una suspensión del micelio triturado siguiendo la metodología descrita por Whiteside (1970). A partir de placas con PDA incubadas en oscuridad a 25 °C durante un mes, se les agregó 10 mL de agua destilada estéril y se raspó mecánicamente la superficie con una espátula. La suspensión micelial resultante se filtró a través de una malla estéril N°60 (250 µm). El filtrado de micelio se utilizó para estimar unidades formadoras de colonias (UFC) por mL. Se realizaron diluciones sucesivas del filtrado de micelio y sembrando un mililitro de cada una de ellas en placas Petri con medio PDA, que se incubaron a 25 °C en oscuridad durante 24 h. Pasado este período, se realizó el recuento de las UFC en aquellas placas con un rango cuantificable entre 50 y 200 colonias. El número de UFC resultante se multiplicó por el factor dilución para estimar las UFC mL<sup>-1</sup>. La concentración final para la inoculación se ajustó a  $1 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>. Las suspensiones se pulverizaron sobre los plantones a razón de 75 mL por cada uno.

### ***Ensayos de patogenicidad con aislados de *Colletotrichum****

En el caso de las inoculaciones con los aislados de *Colletotrichum* se utilizaron dos aislados: 36NCC3-3 procedentes de pétalos necróticos de flores de naranja y el aislado 39 LCC3-3 procedente de lesiones necróticas en hojas de lima mejicana (Tabla 3.1). Se realizaron dos ensayos de patogenicidad con estos dos aislados seleccionados. En el primer ensayo, se utilizaron plantones de naranja ‘Valencia’ con flores con los pétalos cerrados (BBCH 59) (Sánchez-Valladares, 2005) y en el segundo ensayo se utilizaron plantones de lima mejicana (*C. aurantifolia*) previamente podados para la inducción de brotes jóvenes uniformes. Ambos aislados se hicieron crecer en PDA durante una

semana en oscuridad a 25 °C. Para preparar el inóculo, a cada placa se le agregó 10 mL de agua destilada estéril y se raspó mecánicamente la superficie con una espátula. La suspensión de conidias se filtró a través de una gasa y se ajustó a una concentración de  $10^6$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  con un hematocitómetro. En el primer ensayo, se pulverizaron 50 mL de la suspensión de conidias sobre las flores en cada uno de los plantones. El segundo ensayo se realizó de la misma forma, pero con la diferencia de que se pulverizó la suspensión de conidias sobre brotes con hojas jóvenes de lima mejicana.

### ***Ensayos de patogenicidad con aislados de *Phomopsis****

Las inoculaciones con los aislados de *Phomopsis* Ph-25-1 y Ph-18-2 (Tabla 3.1) se realizaron sobre plantones de naranja ‘Valencia’. Las suspensiones de conidias se prepararon a partir de la metodología descrita previamente (apdo. 3.2.3). Para preparar el inóculo, a cada placa se le agregaron 10 mL de agua destilada estéril y se raspó mecánicamente la superficie con una espátula. La suspensión de conidias resultante se filtró a través de una gasa y se ajustó a una concentración de  $10^6$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  con un hematocitómetro. Las suspensiones se pulverizaron sobre los plantones a razón de 100 mL por cada uno.

### ***Ensayos de patogenicidad con aislados de *Elsinoë****

Por último, se realizaron inoculaciones con aislados de *Elsinoë* El-12 y El-31 (Tabla 3.1) sobre plantones de lima rangpur podados previamente para obtener una brotación uniforme. Las suspensiones de conidias se prepararon siguiendo la metodología descrita previamente (apdo. 3.2.3). La suspensión de conidias se ajustó a una concentración de  $10^6$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  con un hematocitómetro. Las suspensiones se pulverizaron sobre los plantones a razón de 100 mL cada uno.

En todos los ensayos de patogenicidad descritos se pulverizaron dos plantones con agua destilada estéril como testigos. Una vez inoculados, todos los plantones se cubrieron con bolsas plásticas negras para mantener una humedad alta durante 48 h a  $\sim 27$  °C. Transcurrido este período, se retiraron las bolsas plásticas y los plantones se llevaron a un umbráculo de malla con un rango de temperatura ambiente de 21 a 35 °C hasta la manifestación de los síntomas. El

seguimiento de los plántones para observar el momento de la aparición de los síntomas se realizó semanalmente. Con el objetivo de completar los postulados de Koch-Pasteur en los ensayos de patogenicidad, se colectaron muestras de los tejidos afectados y se realizaron reaislamientos de los patógenos en medio de cultivo PDAS siguiendo la metodología descrita previamente (apdo. 3.2.2).

### 3.3. Resultados

#### 3.3.1. Parcelas afectadas y síntomas observados

Durante la prospección se detectaron parcelas afectadas con diversas sintomatologías en las diferentes especies de cítricos muestreadas. En un 79% de las parcelas se detectó la presencia de pústulas oscuras en el envés de las hojas (Tabla. 3.2) (Fig. 3.2 A). Los síntomas se observaron con mayor frecuencia en las provincias de Coclé (69%), Veraguas (13%) y Chiriquí (12%) (Fig. 3.3). Entre las especies de cítricos con mayor afección se encontraron la naranja (69%) y la lima Tahití (24%) (Fig. 3.4). Los síntomas en hojas de árboles de naranja ‘Valencia’ consistían en numerosas pústulas oscuras en el envés de las hojas (Fig. 3.5 A y B) acompañadas de clorosis en el haz de la hoja (Fig. 3.5 C). Los síntomas se observaron también en hojas de lima Tahití (Fig. 3.5 D) y pomelo (3.5 E). Las parcelas afectadas mostraron un 100% de incidencia de lesiones en las hojas y se observaron también defoliaciones en los árboles afectados por la enfermedad (Fig. 3.5 F y G).

En el 12% de las parcelas de cítricos prospectadas se observaron durante la floración lesiones necróticas de color naranja a marrón en los pétalos florales (Tabla 3.2) (Fig. 3.2 B) y (Fig. 3.6 A y B). Los frutos recién cuajados se desprendían prematuramente (Fig. 3.6 C) a causa de las lesiones quedando únicamente el cáliz con los sépalos adheridos al pedúnculo (Fig. 3.6 D). Las especies de cítricos con mayor afección fueron la naranja y la lima Tahití.

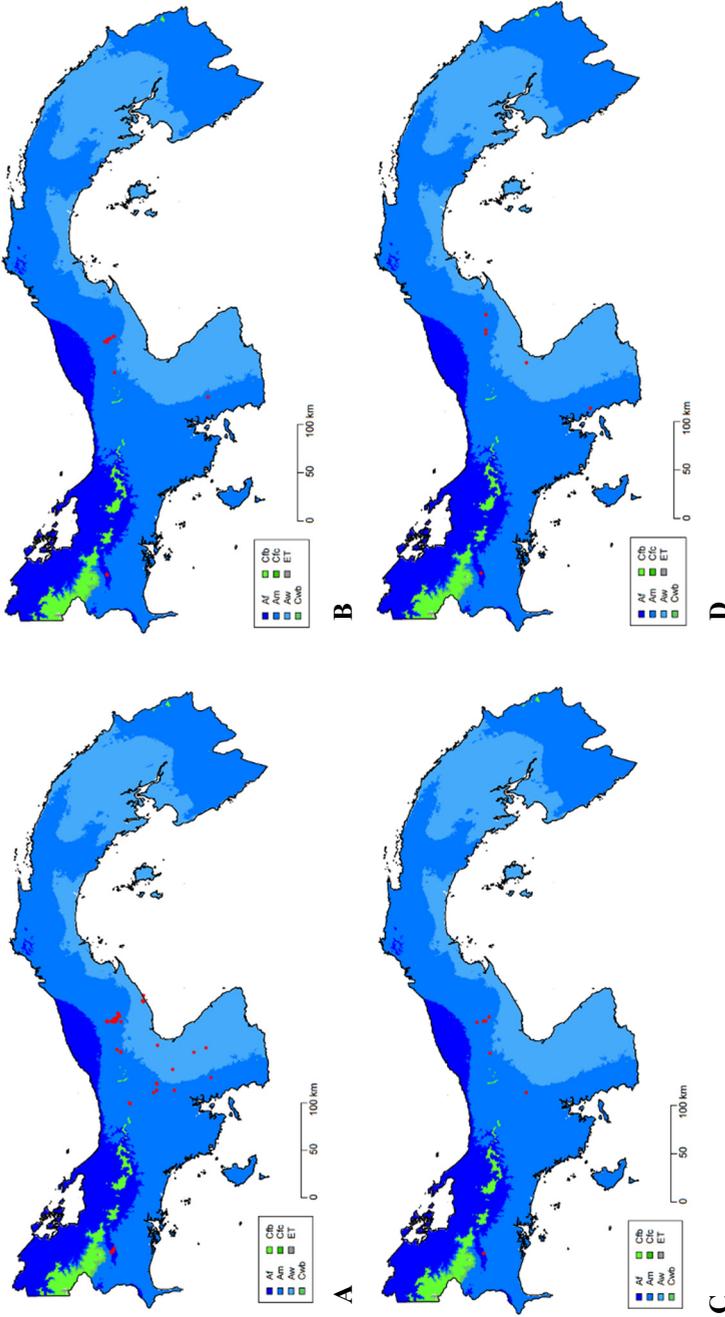
En el 2% de las parcelas se observó la presencia de lesiones necróticas de tamaño variable en hojas maduras específicamente en lima mejicana (Tabla 3.2) (Fig. 3.6 E), que posteriormente se marchitaban y caían prematuramente. En la punta de los brotes se observó un marchitamiento total que provocaba su posterior muerte (Fig. 3.6 F).

En árboles viejos de naranja y pomelo se observó en el 11% de las parcelas prospectadas la presencia de pustulaciones suberosas en hojas nuevas y viejas (Tabla 3.2) (Fig. 3.2 C) y (Fig. 3.7 A y B), ramas (Fig. 3.7 C) y frutos (Fig. 3.7 D y E). En condiciones favorables para la enfermedad se observó la proliferación de numerosas ramitas secas en la copa de árboles. En algunos casos, en muestras de ramitas secas llevadas al laboratorio se pudo observar la presencia de numerosos cirros que emergían sobre la superficie de las ramitas (Fig. 3.7 F). Estos cirros consistían en masas filamentosas que envolvían las conidias y que emergían de los picnidios formados sobre las ramas secas en condiciones de alta humedad.

Otra de las sintomatologías comúnmente observada fue la aparición de numerosas costras suberosas sobre brotes (Fig. 3.8 A) y hojas maduras (Fig. 3.8.B) de árboles de lima rangpur. En los frutos también se observó la presencia de un gran número de costras (Fig. 3.8 D). Estos síntomas solo se detectaron en un 8% de las parcelas prospectadas (Tabla 3.2) (Fig. 3.2 D), sin embargo esto representó el 100% de los campos de lima rangpur afectadas. En el caso de mandarina, durante la prospección solamente se observaron los síntomas descritos en una sola parcela afectando tanto a hojas como a frutos (Fig. 3.8 C y E).

### 3.3.2. Identificación de las especies fúngicas

Del total de las parcelas que mostraron síntomas de pústulas oscuras en el envés de las hojas se aisló en un 68% de los casos un hongo de la familia *Mycosphaerellaceae* (Tabla 3.3). Las colonias presentaban el margen ligeramente lobulado con un color verde oscuro a gris oscuro en medio de cultivo PDA (Fig. 3.9 A y B). A partir de muestras de hojas secas con lesiones caídas al suelo se pudo observar la presencia de cuerpos fructíferos de color oscuro tipo pseudotecio (Fig. 3.9 C). Las ascosporas formadas en su interior eran hialinas con un único septo central y unas dimensiones de 10,0-15,0 (12,6)  $\mu\text{m}$  de largo y 2,5-5,0 (3,6)  $\mu\text{m}$  de ancho (Fig. 3.9 D).

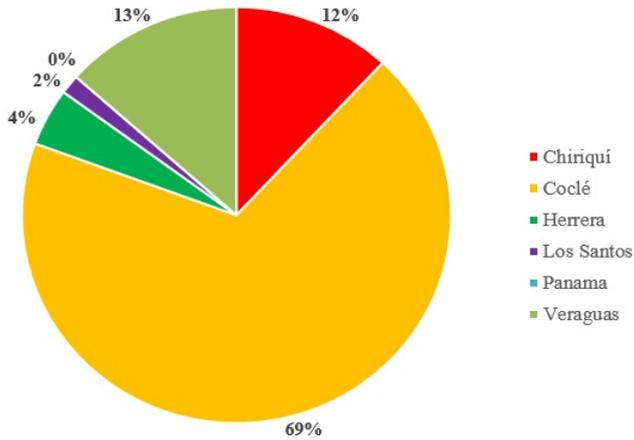


**Figura 3.2:** Mapas con la localización geográfica y zonas climáticas Köppen-Geiger de las parcelas de cítricos prospectadas en Panamá afectadas por los distintos síntomas: **A)** pústulas oscuras en hojas; **B)** lesiones necróticas en pétalos y caída prematura de frutos; **C)** pústulas suberosas en hojas; **D)** costras suberosas en hojas y frutos.

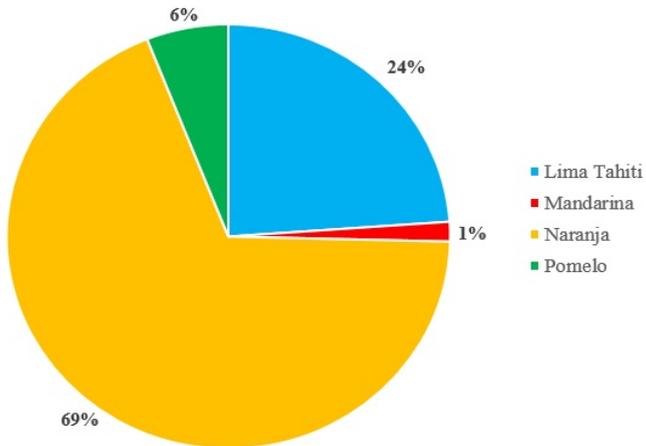
**Tabla 3.2:** Parcelas prospectadas y tipificación de los síntomas observados en los árboles de cítricos.

Provincia	Distrito	N° parcelas					
		Pústulas oscuras en hojas	Lesiones necróticas en pétalos y caída de frutos	Lesiones necróticas en hojas	Pústulas suberosas en hojas	Costras suberosas en hojas y frutos	
Chiriquí	Potrerillo	8	2	--	3	1	
Coclé	Antón	5	--	--	--	--	
	La Pintada	4	1	--	1	1	
	Penonomé	37	6	2	4	2	
Herrera	Las Minas	1	1	--	--	--	
	Pese	1	--	--	--	--	
	Santa María	1	--	--	--	--	
Los Santos	La Villa de Los Santos	1	--	--	--	--	
Panamá	San Carlos	--	--	--	--	2	
Veraguas	Mariato	--	--	--	--	1	
	San Francisco	4	--	--	1	--	
	Santa Fé	3	--	--	--	--	
	Santiago	2	--	--	--	--	
<b>Total</b>		<b>67</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	
<b>%<sup>a</sup></b>		<b>79</b>	<b>12</b>	<b>2</b>	<b>11</b>	<b>8</b>	

<sup>a</sup> Respecto a un total de 85 parcelas prospectadas.



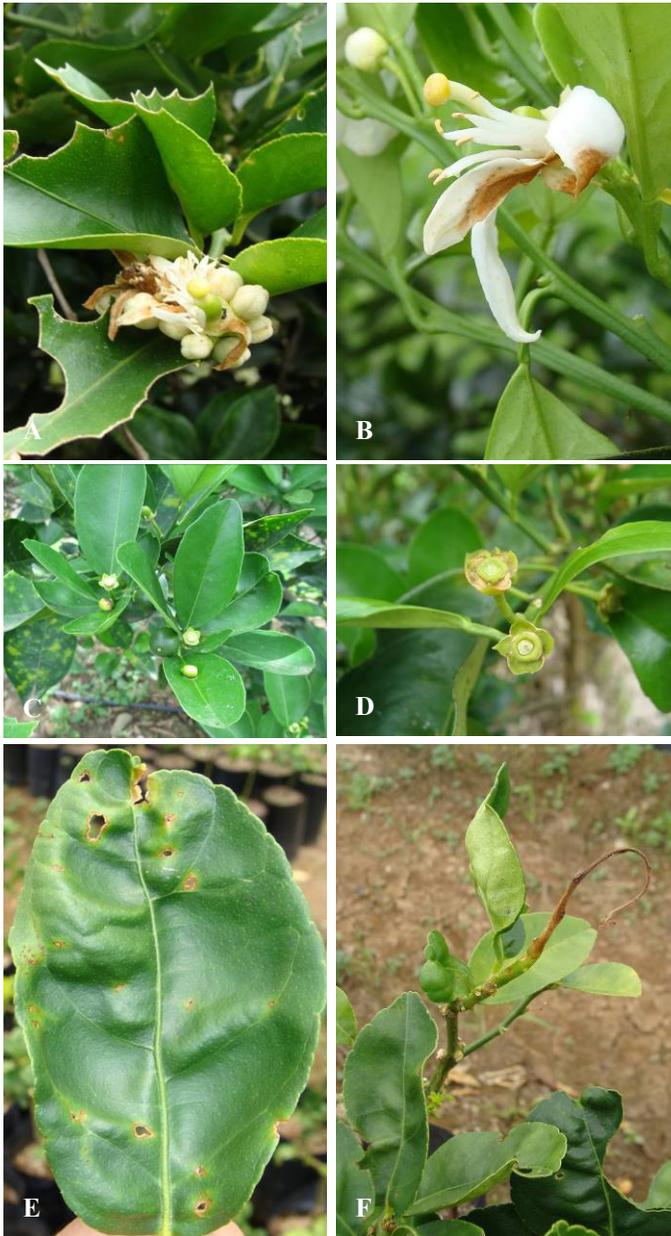
**Figura 3.3:** Distribución porcentual de provincias afectadas con pustulaciones oscuras en el envés de las hojas de un total de 85 parcelas prospectadas.



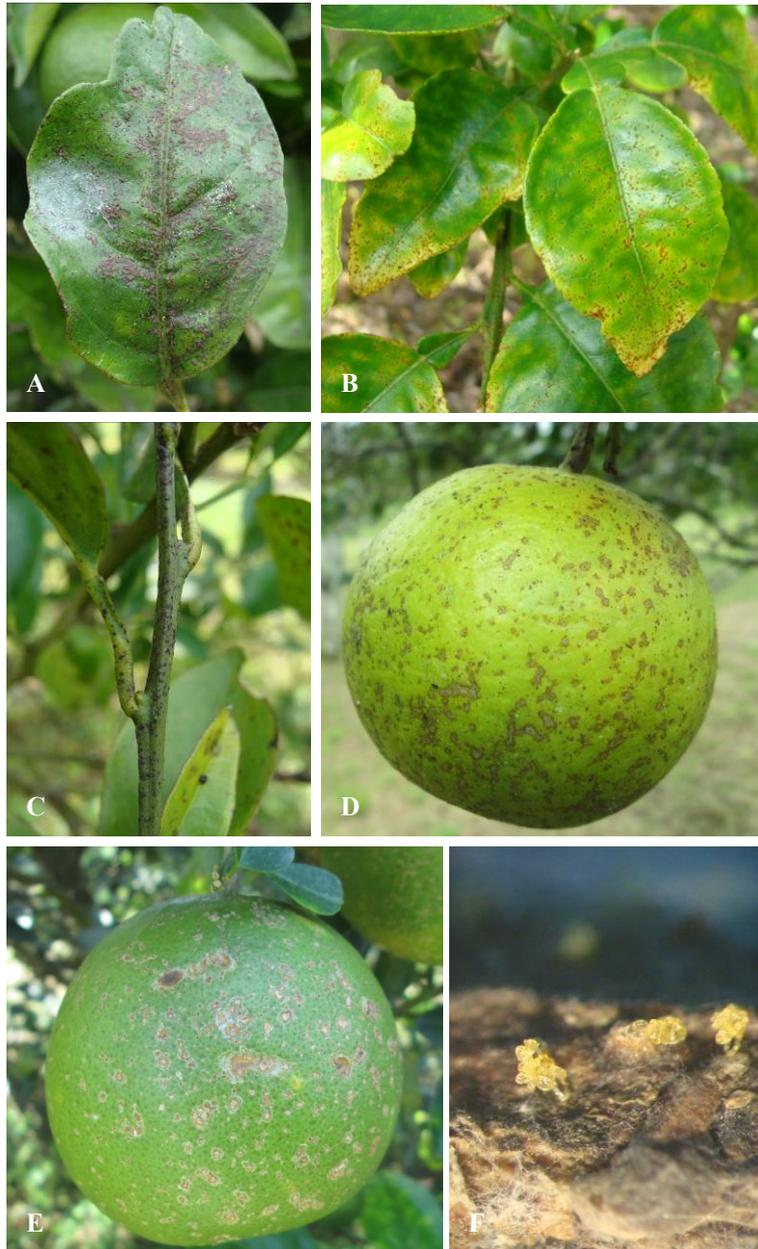
**Figura 3.4:** Distribución porcentual de especies de cítricos afectadas con pustulaciones oscuras en el envés de las hojas de un total de 85 parcelas prospectadas.



**Figura 3.5:** A) y B) Pústulas oscuras observadas en el envés de las hojas de naranja ‘Valencia’; C) clorosis en el haz de las hojas de naranja ‘Valencia’; D) y E) hojas de pomelo y lima Tahití con pustulaciones oscuras en el envés; F) árbol de pomelo con una defoliación muy intensa; G) hojas caídas al suelo en una parcela de pomelo afectada.



**Figura 3.6:** A) y B) Lesiones necróticas de color naranja a marrón en los pétalos de las flores afectadas de lima Tahiti; C) caída prematura de los frutos de naranjo; D) cáliz persistente tras la caída de los frutos de naranjo; E) lesiones necróticas en hojas de lima mejicana; F) marchitamiento y seca de los brotes de lima mejicana afectados.



**Figura 3.7:** A) Pustulaciones suberosas en una hoja vieja de naranja B) hojas jóvenes de pomelo; C) brote de naranja; D) fruto de naranja, E) fruto de pomelo; F) cirros sobre picnidios en la superficie de un brote afectado.



**Figura 3.8:** Presencia de costras suberosas **A)** en brotes jóvenes de lima rangpur; **B)** y **C)** en el haz y el envés de una hoja de mandarina; **D)** en un fruto de lima rangpur; **E)** en un fruto de mandarina.

La identidad de los aislados de *Mycosphaerellaceae* se confirmó mediante la comparación de las secuencias de ITS obtenidas con las depositadas en la base de datos en el GenBank mediante el programa BLAST del NCBI. Los dos aislados seleccionados de este grupo, se identificaron como *Z. citri-griseum* mostrando 99% de homología con el número de accesión AF181703 (Goodwin y Zismann, 2001).

A partir de las lesiones necróticas en los pétalos florales y hojas se logró aislar *Colletotrichum* en un 100% de las muestras procedentes de las parcelas que mostraron estos síntomas. Esto representó un 15% del total de las parcelas muestreadas durante la prospección (Tabla 3.3).

Las colonias presentaron una morfología de margen de crecimiento entero y un color entre blanco y anaranjado en medio de cultivo PDA (Fig. 3.10 A). Las conidias eran fusiformes, unicelulares, hialinas y con unas dimensiones de 6,5-19,8(10,8)  $\mu\text{m}$  de largo y 2,1-4,3(2,9)  $\mu\text{m}$  de ancho (Fig. 3.10 B). A nivel molecular, las secuencias de ITS de los aislados representativos de *Colletotrichum* mostraron un 99% de homología con el número de accesión JN543070 (Falconí *et al.*, 2013) de las secuencias de *C. acutatum* depositadas en la base de datos GenBank.

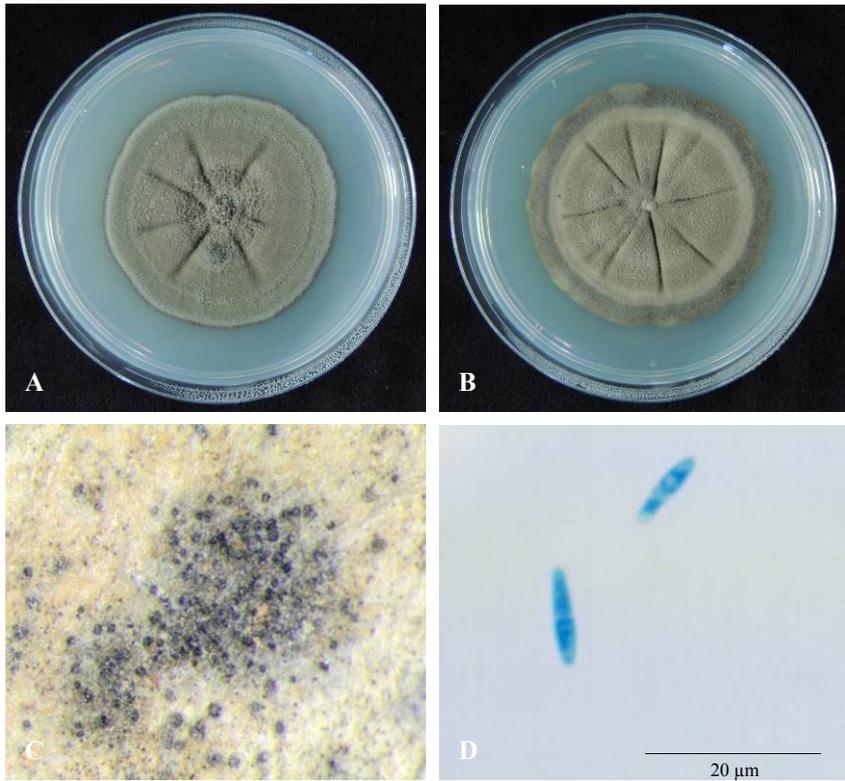
En las parcelas donde se observaron pustulaciones suberosas en hojas, brotes y frutos se logró aislar *Phomopsis* a partir de ramitas secas. Del total de muestras colectadas procedentes de las parcelas con síntomas se logró aislar *Phomopsis* en un 88%. Con respecto al total de los campos de cítricos muestreados durante la prospección esto representó un 8% (Tabla 3.3). Las colonias presentaron el margen de crecimiento entero y de color blanco (Fig. 3.11 A y B). La identidad de los aislados de *Phomopsis* se confirmó con la observación de las conidias alpha ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ) a partir de picnidios producidos en medio de cultivo PDA después de dos meses de incubación (Fig. 3.11 C). Las  $\alpha$  conidias eran fusiformes, hialinas, aseptadas y presentaron dimensiones de 7,1-9,7(8,4)  $\mu\text{m}$  de largo y 2,0-3,6(2,8)  $\mu\text{m}$  de ancho y las  $\beta$  conidias presentaron forma filiforme, hialinas con dimensiones de 21,5-33,8(26,5)  $\mu\text{m}$  de largo y 1,1-1,9(1,4)  $\mu\text{m}$  de ancho (Fig. 3.11 D). Los resultados de la identificación molecular de los aislados de *Phomopsis* mediante la comparación de las secuencias ITS mostró un 100% de homología con el número de accesión KC343052 (Gomes *et al.*, 2013) de *D. citri* depositado en el GenBank.

En las muestras de frutos de lima rangpur y mandarina con costras suberosas se logró aislar *Elsinoë* en un 88% de las muestras procedentes de las parcelas que mostraron estos síntomas. Esto representó el 7% del total de las parcelas muestreadas durante la prospección (Tabla 3.3). Las colonias mostraron el margen lobulado y micelio de color anaranjado a rosa (Fig.3.12 A y B). La identidad de los aislados de *Elsinoë* se confirmó molecularmente mediante la comparación de las secuencias de ITS, que presentaron un 100% de homología con el número de accesión FJ010360 (Hyun *et al.*, 2009) de *E. fawcetti* depositado en el GenBank.

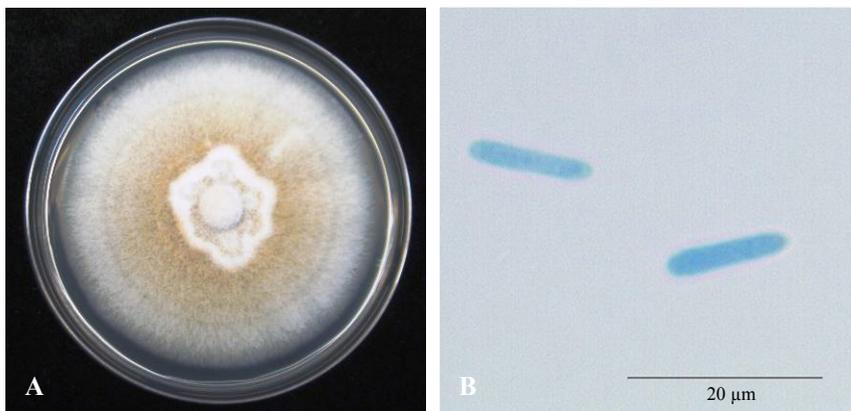
**Tabla 3.3:** Especies fúngicas detectadas en la prospección agrupadas por provincia, distrito y especies de cítricos.

Provincia	Distrito	Especie de cítricos	<i>Zasmidium citri-griseum</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i>	<i>Diaporthe citri</i>	<i>Elsinoë fawcettii</i>
Coclé	Penonomé	<i>Citrus sinensis</i>	22	3	3	--
		<i>C. paradisi</i>	3	--	1	--
		<i>C. latifolia</i>	8	5	--	--
		<i>C. limonia</i>	--	--	--	2
		<i>C. aurantifolia</i>	--	2	--	--
		<i>C. paradisi</i>	1	--	--	--
Antón	La Pintada	<i>C. latifolia</i>	4	--	--	--
		<i>C. sinensis</i>	3	1	1	--
		<i>C. latifolia</i>	1	--	--	--
		<i>C. limonia</i>	--	--	--	1
Chiriquí	Potrerillo	<i>C. sinensis</i>	5	1	1	--
		<i>C. latifolia</i>	--	1	--	--
		<i>C. reticulata</i>	1	--	--	1
		<i>C. limonia</i>	--	--	--	1
Veraguas	Santa Fe	<i>C. sinensis</i>	3	--	--	--
		<i>C. sinensis</i>	4	--	1	--
		<i>C. sinensis</i>	2	--	--	--
		<i>C. limonia</i>	--	--	--	1
Herrera	Santa María	<i>C. sinensis</i>	--	--	--	--
		<i>C. latifolia</i>	1	--	--	--
<b>Total</b>			58	13	7	6
<b>%<sup>a</sup></b>			68	15	8	7

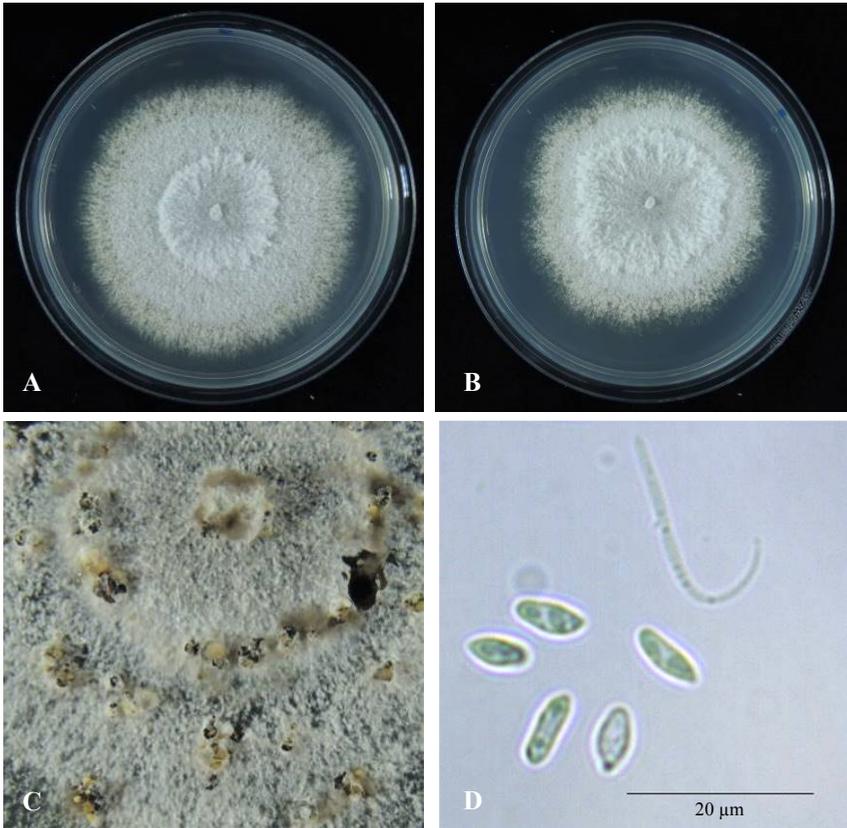
<sup>a</sup> Respecto a 85 parcelas prospectadas



**Figura 3.9:** A) y B) Colonias de *Zasmidium citri-griseum* en medio de cultivo Patata Dextrosa Agar (PDA); C) pseudotecios observados en hojas secas caídas al suelo; D) ascosporas de *Zasmidium citri-griseum*.



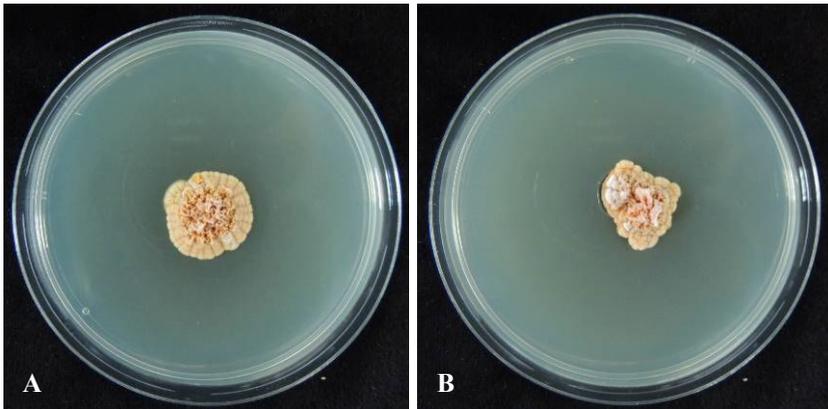
**Figura 3.10:** A) Colonia de *Colletotrichum acutatum* en medio de cultivo Patata Dextrosa Agar (PDA); B) conidias de *Colletotrichum acutatum*.



**Figura 3.11:** A) y B) Colonias de *Diaporthe citri*; C) picnidios de *Diaporthe citri* en medio de cultivo Patata Dextrosa Agar (PDA); D) α y β conidias de *Diaporthe citri*.

### 3.3.3. Ensayos de patogenicidad

Los ensayos de patogenicidad realizados con los aislados de *Z. citri-griseum* (9NCV4 y 17NCC5) resultaron positivos en las plantas inoculadas. Los síntomas observados consistieron en clorosis en el haz (Fig. 3.13 A) y pústulas oscuras en el envés de las hojas (Fig. 3.13 B y C) a los 10 meses después de la inoculación. En hojas de las plantas testigo no se observó ningún síntoma (Fig. 3.13 D). De las lesiones se reaisló *Z. citri-griseum* confirmándose los postulados de Koch-Pasteur.



**Figura 3.12: A) y B)** Colonias de *Elsinoë fawcettii* en medio de cultivo Patata Dextrosa Agar (PDA)

En las inoculaciones realizadas con los aislados de *C. acutatum* (36NCC3-3 y 39LCC3-3) se logró reproducir síntomas en los dos ensayos realizados, confirmando la patogenicidad de los aislados. En el primer ensayo realizado sobre flores de naranja ‘Valencia’ se observó que ambos aislados indujeron la aparición de lesiones necróticas en los pétalos y la abscisión prematura de las flores siete días después de inoculadas (Fig. 3.14 A y B). De las lesiones necróticas en las flores inoculadas se reaisló el patógeno confirmando los postulados de Koch-Pasteur. En las flores de las plantas testigos no se observaron lesiones aparentes y continuaron su desarrollo normal (Fig. 3.14 C).

En el segundo ensayo, al realizar las inoculaciones de los aislados sobre brotes jóvenes de lima mejicana se observó que solo el aislado 39 LCC3-3 indujo lesiones necróticas de color marrón a los siete días de la inoculación (Fig. 3.14 D y E). De las lesiones necróticas observadas en los brotes inoculados con el aislado 39 LCC3-3 se reaisló el patógeno, confirmando los postulados de Koch-Pasteur. El aislado 36NCC3-3 no indujo síntomas en las hojas de lima mejicana. En los brotes de las plantas testigo tampoco se observaron lesiones aparentes (Fig. 3.14 F).

Los ensayos de patogenicidad realizados con los aislados de *D. citri* (Ph-25-1 y Ph-18-2) resultaron positivos en las plantas inoculadas. Los síntomas se observaron un mes después de la inoculación. Inicialmente los síntomas se manifestaron como pequeños puntos necróticos en el haz de las hojas (Fig. 3.15

A), que posteriormente formaron pústulas suberosas color rojizo en el envés y ramas (Fig. 3.15 B y C). En las plantas testigo no se observaron síntomas (Fig. 3.15 D). De las lesiones en las plantas inoculadas se reaisló *D. citri*, confirmandose los postulados de Koch-Pasteur.

En los ensayos de patogenicidad con los aislados de *E. fawcettii* (El-12 y El-31) se reprodujeron síntomas a los siete días después de inoculados. Los síntomas en los brotes formaron pequeñas costras color anaranjado. A partir de estas lesiones se reaisló el patógeno. No se observaron síntomas en las plantas testigo.

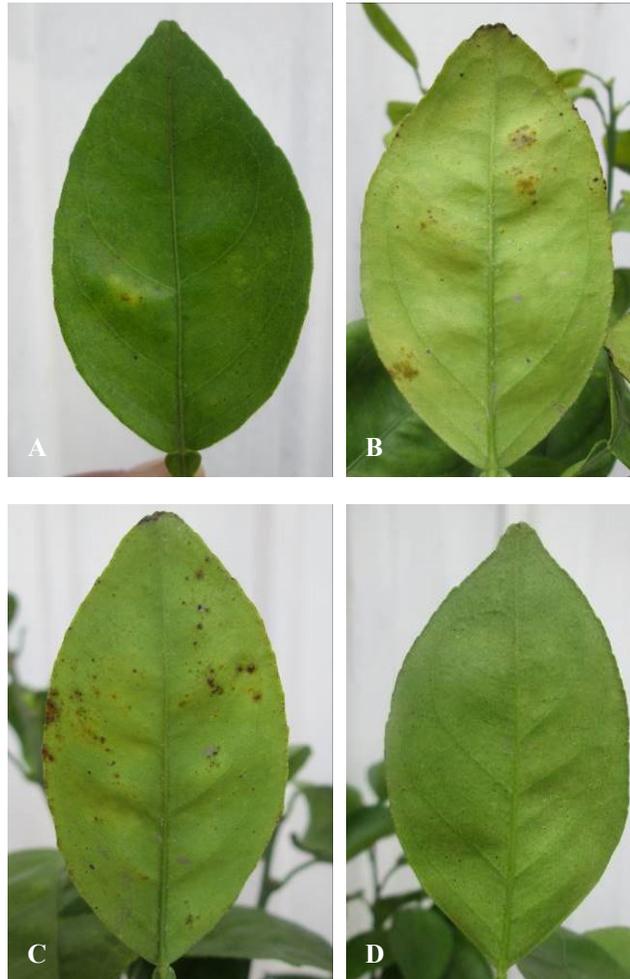
### 3.4. Discusión

En el presente estudio se ha identificado por primera vez el hongo *Z. citri-griseum* (sin. *Mycosphaerella citri* Whiteside) como el agente causal de la mancha grasienta de los cítricos en Panamá. El hongo se aisló de hojas con síntomas procedentes de las diferentes áreas cítricas del país. La mancha grasienta se describió por primera vez en Florida (Whiteside, 1970) y nuestro estudio es la primera cita de la enfermedad en Panamá. Son muchos los daños atribuidos a la mancha grasienta en las áreas donde ha sido citada, causando fuertes defoliaciones y una considerable reducción en el rendimiento productivo de los árboles afectados. En algunos casos puede afectar también a la calidad de los frutos cuando se comercializan para el consumo en fresco (Mondal y Timmer, 2006a).

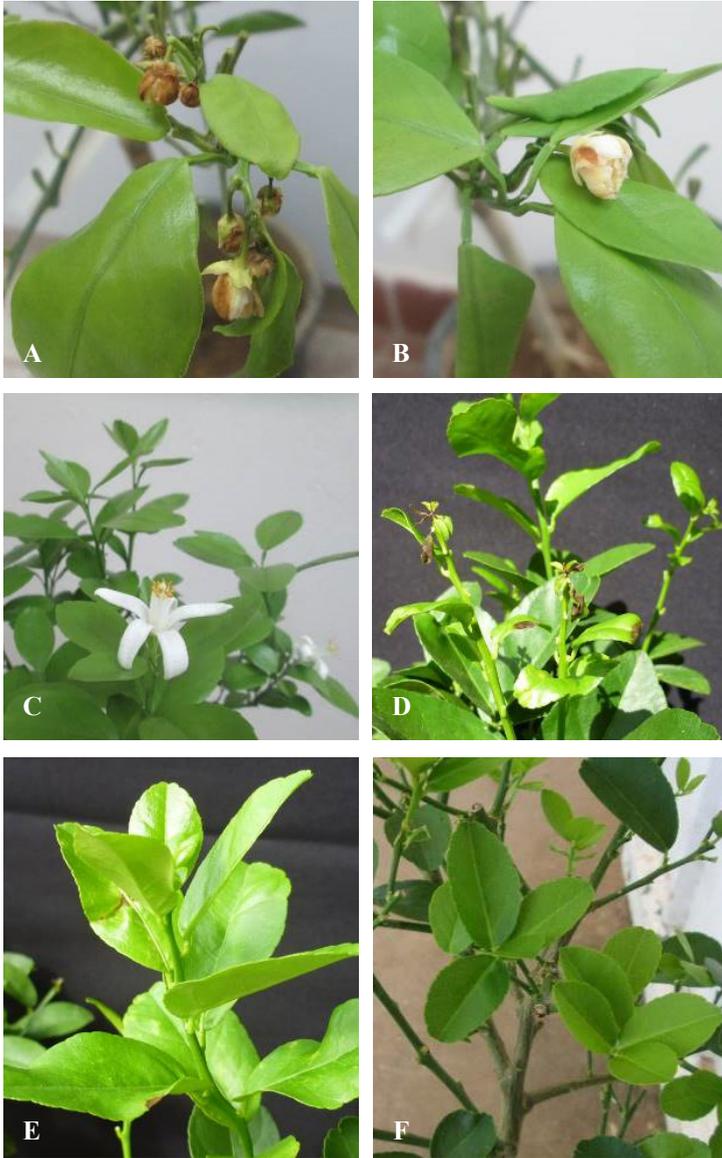
Inicialmente, uno de los aspectos considerados para la identificación de este hongo fue la morfología de las colonias en medio de cultivo y las ascosporas, que resultaron similares a las descritas en la bibliografía para este género. La confirmación de la identidad de los aislados se basó también en la comparación de sus secuencias de ITS con las secuencias de *Z. citri-griseum* depositadas en el GenBank, resultando en un 99% de homología con el número de accesión AF181703 (Goodwin y Zismann, 2001).

En la caracterización morfológica de las ascosporas liberadas por los pseudotecios presentes en las hojas caídas al suelo se encontraron coincidencias con las descripciones de *Z. citri-griseum* en estudios previos. En su estudio, Whiteside (1970) señala las ascosporas de *Z. citri-griseum* como fusiformes, hialinas con un único tabique central y dimensiones de 7,2–10,5 x 2,3–2,8  $\mu\text{m}$ .

Por su parte, Timmer y Gottwald (2000) describen las ascosporas de igual forma, hialinas, con un solo tabique y dimensiones de 6–12 x 2–3  $\mu\text{m}$ . En nuestro estudio, las características morfológicas de las ascosporas coincidieron con las descritas por estos autores y las dimensiones de las ascosporas se situaron dentro del rango de las descritas para *Z. citri-griseum* (Tabla 3.4).



**Figura 3.13:** A) Clorosis en el haz de hoja de naranja ‘Valencia’ inoculada con *Zasmidium citri-griseum*; B) y C) pústulas oscuras en el envés de hojas de naranja ‘Valencia’ inoculada con *Zasmidium citri-griseum*; D) hoja sin síntomas de planta naranja testigo ‘Valencia’.



**Figura 3.14:** A) y B) Lesiones necróticas en flores de naranja ‘Valencia’ inoculadas con *Colletotrichum acutatum*; C) flor de naranja ‘Valencia’ en planta testigo sin síntomas; D) y E) lesiones necróticas en brotes y hojas de lima mejicana inoculadas con *Colletotrichum acutatum*; F) hojas de planta testigo de lima mejicana sin síntomas.



**Figura 3.15:** A) Pústulas rojizas en el haz; B) envés; C) brote de naranja ‘Valencia’ inoculada con *Diaporthe citri*; D) hoja de una planta testigo de naranja ‘Valencia’ sin síntomas.

Los resultados de las pruebas de patogenicidad confirmaron que los síntomas observados en las plantaciones prospectadas estaban causados por *Z. citri-griseum*. Estos resultados coinciden con los obtenidos en ensayos previos de patogenicidad realizados en Florida, donde se lograron reproducir síntomas a partir de inoculaciones con suspensiones de micelio sobre plántones de limón rugoso (*C. jambhiri* Lush.), naranja y pomelo (Whiteside, 1970; 1973a).

La caracterización de los síntomas de la mancha grasienta observada sobre las diferentes especies cítricas muestreadas, indica que las hojas son el principal

punto de infección para este patógeno, observándose árboles con una alta incidencia, de hasta el 100% de hojas afectadas, acompañadas de defoliación intensa en algunos casos. La sintomatología se observó con mayor frecuencia sobre hojas de árboles de naranja con un 69% del total de las parcelas de cítricos prospectadas y en menor proporción en árboles lima Tahití con un 24% y pomelos con un 6%. En general, las referencias bibliográficas consultadas indican una elevada susceptibilidad a la mancha grasienta de los pomelos y limas, y una susceptibilidad moderada en las variedades tempranas de naranjas e incluso moderadamente tolerantes en variedades tardías (Timmer, 1999). La alta prevalencia de la mancha grasienta en plantaciones de naranja en Panamá sería aparentemente contradictoria con esta información previa. No obstante, esto podría estar relacionado con el hecho que las naranjas son la especie de cítricos con más área de cultivo en el país. Actualmente existe una gran demanda de naranjas tanto para el consumo en fresco como para zumo, a diferencia de las otras especies como lima Tahití y pomelos que representan una menor área de producción.

Timmer (1999) señala que las temperaturas entre 23,9 – 26,7 °C, acompañadas de noches húmedas favorecen la infección de *Z. citri-griseum*. Por su parte, Whiteside (1974) indica que períodos prolongados y repetidos con humedad relativa cercana al 100%, acompañados de temperaturas entre 25 y 30 °C favorecen la penetración de las hifas del patógeno a través de los estomas. Las zonas citrícolas de Panamá presentan condiciones de temperatura y humedad altamente favorables para el desarrollo parasitario de *Z. citri-griseum*. Las regiones productoras de cítricos se sitúan en su gran mayoría en un clima de tipo tropical monzónico húmedo (Am) según la clasificación de Köppen-Geiger (Fig. 3.1 B). Este clima se caracteriza por una temperatura media mensual  $\leq 18^{\circ}\text{C}$ , con una estación seca corta seguida de una húmeda con fuertes lluvias en torno a los 2.500 mm (Peel *et al.*, 2007). En nuestro estudio, los síntomas de mancha grasienta se detectaron en su gran mayoría en parcelas ubicadas en la zona de clima Am donde se sitúan las principales zonas citrícolas del país. Sin embargo, los síntomas también se observaron en algunas parcelas ubicadas en la zona de clima tropical de sabana (Aw) donde predomina el clima cálido ( $\leq 18^{\circ}\text{C}$ ), pero con precipitaciones inferiores a los 2.000 mm (Fig. 3.2 A). De hecho, *Z. citri-griseum* se detectó en el 68% de las parcelas muestreadas en el país, lo que sugiere que es un patógeno endémico con una amplia distribución geográfica.

**Tabla 3.4:** Descripción morfológica de las esporas de las especies de fúngicas detectadas en la prospección en parcelas de cítricos en Panamá y datos bibliográficos.

Especie fúngica	Referencia	Tipo de esporas	Forma	Color	N° de Septos	Dimensiones	
						Longitud (µm)	Anchura (µm)
<i>Zasmidium citri-griseum</i>	Aislados de Panamá		Fusiforme	Hialinas	1	10-15	2,5-5
	Whiteside (1970)	Ascosporas	--	Hialinas	1	7,2-10,5	2,3-2,8
	Timmer y Gottwald (2000)		Fusiforme	Hialinas	1	6-12	2-3
<i>Colletotrichum acutatum</i>	Aislados de Panamá		Fusiforme	Hialinas	--	6,5-19,8	2,1-4,3
	Mordue (1979)	Conidias	Fusiforme	Hialinas	--	8-16	2,5-4
<i>Diaporthe citri</i>	Aislados de Panamá	Conidias (α)	Fusiforme	Hialinas	--	7,1-9,7	2-3,6
		(β)	Filiforme	Hialinas	--	21,5-33,8	1,1-1,9
	Whiteside (2000)	Conidias (α)	Fusiforme	Hialinas	--	5-9	2,5-4
		(β)	Filiforme	Hialinas	--	20-30	0,7-1,5
	Huang <i>et al.</i> (2013)	Conidias (α)	Fusiforme	Hialinas	--	7,2-9,2	2,7-3,8
	(β)	Filiforme	Hialinas	--	23,1-37,4	1,1-1,7	

Por otro lado, una de las posibles vías de diseminación de la enfermedad en Panamá puede estar relacionada con el uso de plantones de vivero afectados por la enfermedad para el establecimiento de parcelas en nuevas áreas de producción. La mancha grasienta se caracteriza por un período de incubación muy largo, lo que dificulta enormemente la detección de síntomas en viveros. De hecho, Timmer (1999) indica que el período de manifestación de los síntomas puede variar entre cuatro a seis meses. Whiteside (1970) cita que la manifestación de los síntomas puede variar según la especie de cítricos. El limón rugoso es el que más rápido manifiesta síntomas, oscilando entre mes y medio a dos meses, seguido de la naranja entre dos y cuatro meses y en pomelo hasta seis meses. En Panamá la gran mayoría de los viveros de cítricos se encuentran ubicados en las zonas de alta presión de inóculo de la enfermedad y usualmente son a campo abierto.

Durante la prospección se identificó también el hongo *C. acutatum*, agente causal de la enfermedad conocida como caída prematura de frutos o ‘postbloom fruit drop’ (PFD) en cítricos. En Panamá no existían citas previas de la presencia de esta enfermedad. El PFD en cítricos fue descrito por primera vez en Centro América, concretamente en Belice (Fagan, 1979). Actualmente, el PFD en cítricos es una enfermedad que se encuentra ampliamente distribuida en todas las regiones citrícolas de clima tropical y subtropical húmedo en el continente americano (Timmer, 2000b). Se han citado pérdidas de hasta un 100% cuando las floraciones coinciden con los períodos lluviosos (Timmer *et al.*, 1994). Bajo estas condiciones, en Brasil se han citado caídas prematuras de frutos de hasta un 80% (De Goes *et al.*, 2008).

Por otro lado, en la prospección se aisló también *C. acutatum* de muestras de hojas de lima mejicana con lesiones necróticas en lima mejicana. Se ha citado que *C. acutatum* es capaz de producir otra enfermedad en lima mejicana conocida con el nombre de antracnosis. Esta enfermedad afecta únicamente a la lima mejicana y no a otras especies de limas como la lima Tahití (Timmer, 2000a). La antracnosis es la principal enfermedad de la lima mejicana en las áreas de producción en Méjico, causando una reducción significativa en los rendimientos de fruta (Orozco-Santos, 1995). La antracnosis también ha sido citada en Florida, Belice, Costa Rica y Brasil (Peres *et al.*, 2008).

A nivel morfológico, las colonias de *C. acutatum* procedentes tanto de flores de naranja como de hojas de lima mejicana no mostraron diferencias apreciables. Las conidias presentaron forma fusiforme, hialinas, sin septos con dimensiones de 6,5–19,8 x 2,1–4,3  $\mu\text{m}$ . Estos datos coincidieron con los descritos por Mordue (1979) para *C. acutatum* (Tabla 3.4). De igual forma, la identidad de los aislados se confirmó mediante la comparación de sus secuencias ITS con el número de accesoión JN543070 (Falconí *et al.*, 2013) de *C. acutatum* depositado en el GenBank.

Los resultados de los ensayos de patogenicidad contribuyeron a diferenciar los aislados de *C. acutatum* de acuerdo a la sintomatología inducida y a su patogenicidad diferencial sobre los hospedantes inoculados. Al realizar las pruebas de patogenicidad cruzada se observó que el aislado de *C. acutatum* procedente de lima mejicana indujo síntomas tanto en flores de naranja como en hojas de lima mejicana. Por su parte, el aislado de *C. acutatum* procedente de naranja solo indujo síntomas en flores. Según indican Agostini *et al.* (1992) y Brown *et al.* (1996) en ensayos de patogenicidad realizados del mismo modo encontraron resultados similares.

La prevalencia de PFD en la prospección fue baja, con un 12% respecto al total de campos de cítricos muestreados. El patógeno se detectó principalmente afectando a flores de naranja y de lima Tahití. En Florida se ha citado afectado principalmente a los cultivares de naranja ‘Valencia’ y ‘Navel’, mientras que en Brasil afecta principalmente a los cultivares de naranja ‘Pera’ y ‘Natal’ (Timmer *et al.*, 2004).

Los trabajos de Agostini *et al.* (1992) indican que las temperaturas entre 24 y 27 °C favorecen el desarrollo de síntomas de *C. acutatum*. Por su parte, Timmer y Zitko (1993) desarrollaron un modelo para optimizar las aplicaciones de fungicidas, encontrando que la lluvia acumulada durante cinco días era el factor más importante en el desarrollo de las infecciones. En Panamá, las floraciones de los cítricos se dan al inicio de la estación lluviosa en el mes de mayo, con un promedio de 319 mm precipitación y temperaturas de 25,8 °C (CCKP, 2015). Como ya se ha indicado, las áreas de producción de cítricos de Panamá se sitúan en una zona climática tropical monzónico húmedo (Am) (Fig. 3.1 B) con unas condiciones favorables de temperatura y humedad para el desarrollo de *C. acutatum*. La gran mayoría de las parcelas que resultaron afectadas por la

enfermedad se ubicaron dentro de la zona climática Am (Fig. 3.2 B), sin embargo, también se encontraron algunas afectadas en la zona de clima tropical ecuatorial (Af) que se caracteriza por las altas precipitaciones durante todo el año que sobrepasan los 3.000 mm y con temperaturas mínimas 18 °C.

En el caso de la antracnosis de la lima mejicana, a pesar de haberse observado los síntomas, actualmente esta especie de cítricos no se cultiva a nivel comercial en Panamá y los árboles se utilizan fundamentalmente como ornamentales en fincas y zonas residenciales. No obstante, considerando que los aislados de *C. acutatum* de lima mejicana afectan también a las flores de naranjo, esta especie de lima podría constituir una fuente de inóculo para otros cítricos cultivados a escala comercial.

En nuestro estudio se identificó al hongo *D. citri* como el agente causal de la melanosis de los cítricos en Panamá. La especie *Phomopsis citri* H.S. Fawc. se describió por primera vez en Florida como un hongo que producía picnidios sobre ramas muertas y causaba pudriciones del pedúnculo en frutos de cítricos (Fawcett, 1912). Sin embargo, esta descripción fue considerada como un homónimo de la realizada para *Phomopsis citri* (Sacc) Traverso & Spessa, que se basó en una descripción previa de *Phoma citri* Sacc aislada de *C. limonia* en Italia en 1876 (Traverso y Spessa, 1910). Sobre la base del trabajo publicado recientemente por Udayanga *et al.* (2014), se ha propuesto la conservación del nombre *P. citri* H.S. Fawc., y en consecuencia de su sinónimo *D. citri*, como la especie causante de la melanosis y la podredumbre peduncular de los frutos cítricos (Rossman *et al.*, 2013).

La caracterización morfológica de los aislados se basó principalmente en el aspecto cultural de las colonias, forma, color y dimensiones de las  $\alpha$  y  $\beta$  conidias de *D. citri*. En el trabajo de Whiteside (2000) se describen las colonias como de micelio aéreo denso, de color blanco, las  $\alpha$  conidias hialinas, unicelulares y biacanaladas, con unas dimensiones de 5–9 x 2,5–4  $\mu\text{m}$ , mientras que las  $\beta$  conidias las describe como filiformes, hialinas con forma de gancho, de 20–30 x 0,7–1,5  $\mu\text{m}$ . Huang *et al.* (2013) realizaron una caracterización de *D. citri* describiendo el color de las colonias de igual manera que Whiteside (2000) y las dimensiones de las  $\alpha$  conidias de 7,2–9,2 x 2,7–3,8  $\mu\text{m}$  y las  $\beta$  conidias de 23,1–37,4 x 1,1–1,7  $\mu\text{m}$ . En nuestro estudio, la caracterización morfológica de las colonias y de las  $\alpha$  y  $\beta$  conidias de los aislados de *D. citri* de Panamá

coincidieron con las descritas para esta especie (Tabla 3.4). De igual manera, los resultados de las comparaciones de las secuencias de los aislados representativos presentaron un 100% de homología con la accesión KC343052 (Gomes *et al.*, 2013) de *D. citri* depositada en el GenBank. Los resultados de las pruebas de patogenicidad confirmaron que los síntomas observados en las plantaciones estaban causados por *D. citri*.

La melanosis es una enfermedad observada frecuentemente en las zonas cítricas húmedas y está considerada de importancia económica únicamente cuando los frutos se comercializan para el consumo en fresco (Whiteside, 2000). En nuestro estudio, los síntomas de *D. citri* se observaron principalmente en la zona climática tropical monzónico húmedo (Am) y un menor número de parcelas afectadas se situaron en la zona climática tropical ecuatorial (Af) (Fig. 3.2 C). Estos resultados coinciden con lo descrito por Whiteside (2000), que indica que *D. citri* es un patógeno adaptado a condiciones de clima tropical húmedo como Panamá, donde predominan las altas precipitaciones. En Panamá no existía información previa acerca de los síntomas y daños ocasionados por esta enfermedad. La prevalencia de la melanosis en la prospección fue del 11% con respecto al total de las parcelas muestreadas. Se observó una mayor prevalencia en plantaciones de naranja y pomelo con más de 10 años de edad, por lo general con un mal manejo fitosanitario y de fertilización. Whiteside (2000) indica que todas las especies de cítricos son susceptibles a la enfermedad, aunque los pomelos y los limones tienden a verse más seriamente afectados. En algunos casos se observaron síntomas de melanosis junto con los de mancha grasienta en los mismos árboles. Ambas enfermedades podrían actuar de forma sinérgica debido a la defoliación progresiva inducida por la mancha grasienta y a la proliferación de ramas y ramitas secas debida a la melanosis. Las ramas secas o muertas son el tejido sobre el que se forman los picnidios de *D. citri*, que comienzan a producir inóculo en forma de conidias a los dos y tres meses (Whiteside, 2000). Los picnidios se forman solamente sobre las ramas secas y no esporulan ni sobreviven sobre tejido vivo (Timmer, 1999). Las conidias exudan en forma de cirros que emergen de los picnidios y se diseminan por salpicaduras de lluvia sobre las hojas y frutos (Mondal *et al.*, 2007).

La roña o sarna de los cítricos causada por *E. fawcettii* (sin. *Sphaceloma fawcettii* Jenk.) fue otra de las enfermedades identificadas durante la prospección.

La primera cita de este patógeno a nivel mundial se realizó en Brasil (Bitancourt y Jenkins, 1936) y está considerado un problema importante en el cultivo de frutos para el mercado en fresco. En la actualidad se han identificado tres tipos de roña: la roña de los cítricos, la roña del naranjo y la roña de Tryon. La roña de los cítricos es la que se encuentra comúnmente distribuida en las áreas húmedas de cítricos y puede afectar a limoneros, pomelos y mandarinas así como especies de patrones como limón rugoso, naranjo amargo, lima rangpur y Citrange Carrizo (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) (Timmer, 2000c).

La identidad de los aislados se confirmó mediante la comparación de sus secuencias con las depositadas en el GenBank mostrando un 100% de homología con el número de accesión FJ010360 (Hyun *et al.*, 2009) de *E. fawcettii*. En los ensayos de patogenicidad se logró reproducir los síntomas de la enfermedad en los plántones inoculados, confirmando los resultados obtenidos en la identificación molecular de este patógeno.

Durante la prospección se observaron síntomas de la roña de los cítricos en el 8% del total de las parcelas muestreadas. La especie de cítricos que mostró mayor prevalencia de la enfermedad fue la lima rangpur, con 86% del total de las parcelas afectadas por esta enfermedad, en donde los síntomas se observaron tanto en hojas como en frutos. Estos resultados coinciden con lo descrito por Timmer (2000c) que cita a esta especie de lima como uno de los patrones susceptibles a la enfermedad. El hongo *E. fawcettii* se aisló en un 100% de las muestras de frutos con síntomas de roña procedentes de las diferentes áreas cítricas del país. Los síntomas causados por *E. fawcettii* se observaron en las zonas climáticas Am y Aw, lo que indica que es un patógeno adaptado a condiciones climáticas tropicales como las que presenta Panamá.

Como ya se ha indicado, en Panamá la lima rangpur no se utiliza como patrón y se cultiva principalmente como árbol en huertos familiares y por lo general no recibe ningún tipo de manejo fitosanitario. La fruta con síntomas de roña se comercializa normalmente en mercados locales para el consumo en fresco.

En la prospección realizada se ha identificado la mancha grasienta causada por *Z. citri-griseum* como la enfermedad más prevalente de los cítricos en Panamá, por lo que se hace necesario el desarrollo de estudios posteriores de su epidemiología y control. Otro aspecto de gran relevancia en estudio es que, tras

una amplia prospección en las diferentes áreas cítricas y zonas climáticas de Panamá, no se detectó la presencia de otras enfermedades fúngicas cuarentenarias como la mancha negra causada por *P. citricarpa* o la cercosporiosis causada por *Pseudocercospora angolensis* (T. Carvalho & O. Mendes) Crous & U. Braun. Ambas enfermedades afectan gravemente a la calidad de frutos de cítricos, en especial a los de naranja, pomelo y lima. Por otro lado, durante la prospección solo se encontró la especie *E. fawcettii* afectando con mayor frecuencia árboles de lima rangpur y no se detectó la presencia *E. australis*. La especie *E. australis* está considerada en algunos países como una enfermedad cuarentenaria que afecta principalmente a los frutos de naranja. La ausencia de estas enfermedades cuarentenarias en Panamá abre la posibilidad de comercializar frutos cítricos hacia países libres de estas enfermedades.



## Capítulo 4

---



# Capítulo 4

## ESPECIES DE MYCOSPHAERELLACEAE ASOCIADAS CON LA MANCHA GRASIENTA DE LOS CITRICOS EN DIFERENTES REGIONES CLIMATICAS

### 4.1. Antecedentes

Los hongos de la familia *Mycosphaerellaceae* tiene un amplio rango de hospedantes y sustratos como el eucalipto, el banano y los cítricos, donde aparecen como saprofitos, endófitos o patógenos (Crous, 1998; Arzanlou *et al.*, 2007; Crous *et al.*, 2009a). Esta familia fúngica se caracteriza por producir pseudotecios que pueden estar sumergidos o superficialmente incrustados en el tejido vegetal. Las ascas son ovoides bitunicadas con ascosporas usualmente hialinas y con un único septo transversal (Cannon y Kirk, 2007). La familia *Mycosphaerellaceae* incluye numerosos géneros, entre los que se han descrito *Cercospora*, *Cercospora*, *Dothistroma*, *Lecanosticta*, *Phaeophleospora*, *Polythrincium*, *Pseudocercospora*, *Ramularia*, *Ramulispora*, *Septoria*, *Sonderhenia* y *Zasmidium*, aunque estos y otros géneros están actualmente bajo reclasificación taxonómica (Crous *et al.*, 2009b; Crous *et al.*, 2009c).

Como ya se ha comentado, la mancha grasienta o ‘greasy spot’ de los cítricos es una enfermedad fúngica ampliamente distribuida en las regiones húmedas del Caribe y América Central (Hidalgo *et al.*, 1997; Timmer y Gottwald, 2000; Aguilera-Cogley y Vicent, 2015). En la prospección realizada en Panamá (Cap. 3) se detectó la presencia de síntomas de mancha grasienta en un 78% de las parcelas muestreadas, lo que indica que la enfermedad está ampliamente distribuida en las zonas cítricas del país. Las especies de cítricos más afectadas por la mancha grasienta fueron las naranjas y la lima Tahití.

Los árboles de cítricos afectados por la enfermedad se caracterizan por la aparición de clorosis amarillenta en el haz de las hojas con pústulas oscuras en el envés y acompañadas por lo general de graves defoliaciones en los árboles afectados (Timmer y Gottwald, 2000; Mondal y Timmer, 2006a). Se han detectado síntomas muy similares a los de mancha grasienta en diferentes regiones del mundo como Japón (Yamada, 1956), Argentina (Marco y Whiteside, 1986) y recientemente también en las regiones cítricas semi-áridas del Mediterráneo como Sicilia en Italia (Grasso *et al.*, 2005), Comunidad Valenciana en España (Vicent *et al.*, 2006) y Egipto (Haggag, 2012).

El hongo *Z. citri-griseum* se ha identificado de forma consistente como agente causal de la mancha grasienta en las regiones cítricas del Caribe y América Central. Sin embargo, en otras regiones del mundo los resultados no han sido concluyentes. En Argentina, se observaron síntomas de mancha grasienta en naranja y otras especies de cítricos, sin embargo no se logró determinar el agente causal de la enfermedad (Marco y Whiteside, 1986). En Japón, Yamada (1956) indicó que los síntomas de mancha grasienta estaban causados por la especie *M. horii* Hara, que tenía una *Cercospora* sp. como forma asexual. Por otro lado, los aislados obtenidos de muestras sintomáticas en las regiones mediterráneas en Italia y España solo se han identificado a nivel de género como *Mycosphaerella* sp. (Grasso *et al.*, 2005; Vicent *et al.*, 2006). Sin embargo, en Egipto los aislados obtenidos se identificaron a nivel de especie como *Z. citri-griseum* (Haggag, 2012), lo que indica que probablemente hayan varias especies de *Mycosphaerellaceae* asociadas a la mancha grasienta de los cítricos en las regiones mediterráneas.

En este capítulo se plantea abordar la etiología de la mancha grasienta en zonas previamente no estudiadas, y que representan dos tipos de clima muy diferentes; tropical en África Occidental y América Central y semi-árido en la cuenca mediterránea.

## **4.2. Materiales y métodos**

### **4.2.1. Aislados fúngicos**

En el presente estudio se utilizó una colección de 42 aislados de *Mycosphaerellaceae* procedentes de diferentes regiones productoras de cítricos

de España, Marruecos, Ghana y Panamá, obtenidos entre 2001 y 2013. Los aislados se seleccionaron en función del tipo de hospedante, órgano afectado y origen geográfico (Fig. 4.1, 4.2, 4.3 y 4.4). También se incluyó un aislado de referencia de *Z. citri-griseum* (CBS 122445) y tres aislados de la especie *Amycosphaerella africana* (Crous & M.J. Wingf.) Quaedvlieg & Crous: CBS 680.95 (anteriormente *M. africana* Crous & M.J. Wingf.), CBS 110500 (anteriormente *M. aurantia* A. Maxwell) y CBS 110843 (anteriormente *M. ellipsoidea* Crous & M.J. Wingf.), que se obtuvieron de la Colección Holandesa de Cultivos Tipo, 'Centraalbureau voor Schimmelcultures' (CBS) (Tabla 4.1).

Los aislados se obtuvieron a partir de hojas de diferentes especies de cítricos que exhibían síntomas de mancha grasienta que consistieron en pústulas oscuras en el envés de la hoja. La metodología empleada para los aislamientos fue la misma descrita anteriormente (apdo. 3.2.2). En el caso de los aislados procedentes de hojas secas con lesiones se siguió la metodología empleada por Crous *et al.* (1991) con algunas modificaciones. Se prepararon segmentos de hojas secas con presencia de pseudotecios que se observaron con una lupa binocular a 50X. Seguidamente, los segmentos de hojas con pseudotecios se humedecieron con agua destilada estéril durante 30 min y se adhirieron con vaselina estéril a la tapa de placas Petri que contenían en el fondo medio de cultivo PDA. Los segmentos de hoja se dejaron secar y tras 24 h se examinó la germinación de las ascosporas en el medio PDA. Se obtuvieron cultivos monoascospóricos a partir de las ascosporas germinadas según la metodología descrita por Crous (1998). Se seleccionaron ascosporas individuales bajo la lupa binocular a 50X y luego se transfirieron con una aguja estéril a placas Petri con Agar Extracto de Malta (MEA) (Oxoid Ltd., Basing-stoke, Hants, England), que fueron incubadas durante dos semanas a 25 °C en oscuridad. Todos los aislados obtenidos se conservaron siguiendo la metodología descrita en apdo. 3.2.2.

#### **4.2.2. Caracterización morfológica**

Los aislados se sembraron en diferentes medios de cultivo: PDA, Agar Avena (OA) (60 g avena; 12,5 g agar), Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) (1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 g KNO<sub>3</sub>; 0,5 g MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O; 0,5 g KCl; 0,2 g glucosa; 0,2 g sacarosa; 20 g agar en 1 L de agua destilada) y MEA. Las colonias se incubaron a 25 °C en oscuridad durante 30 días. En todos los medios se evaluaron aspectos

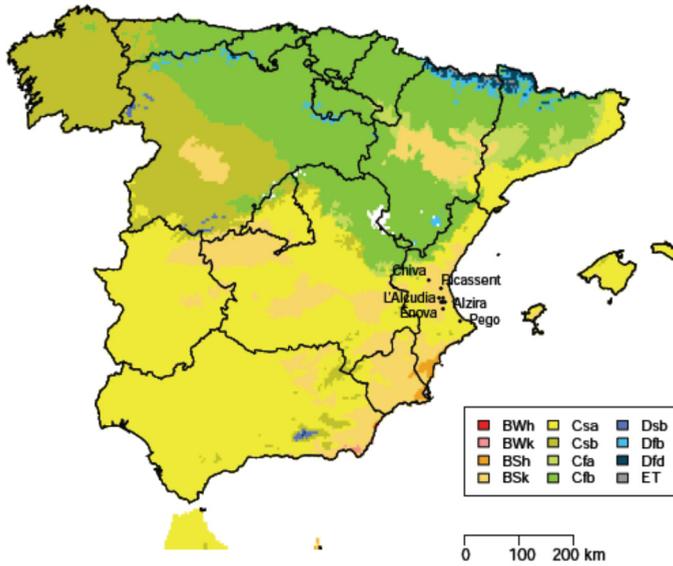
culturales tales como el color del anverso y reverso de la colonia (Rayner, 1970), tipo de margen de crecimiento y producción de pigmento.

En la caracterización de las ascosporas se determinó la forma, color y presencia de septos; además se midieron la longitud y anchura de un total de 100 ascosporas con un microscopio óptico a 400X. Debido a que ninguno de los aislados de estudio produjo ascosporas en los medios de cultivos evaluados, las ascosporas se extrajeron a partir de hojas secas. Las muestras de hojas secas se recolectaron únicamente en dos parcelas, una en España y otra en Panamá en los que previamente se observaron los síntomas de mancha grasienta y se había logrado obtener consistentemente aislados de *Mycosphaerellaceae*. La metodología empleada para la extracción de las ascosporas fue la misma descrita en el apdo. 3.2.3.

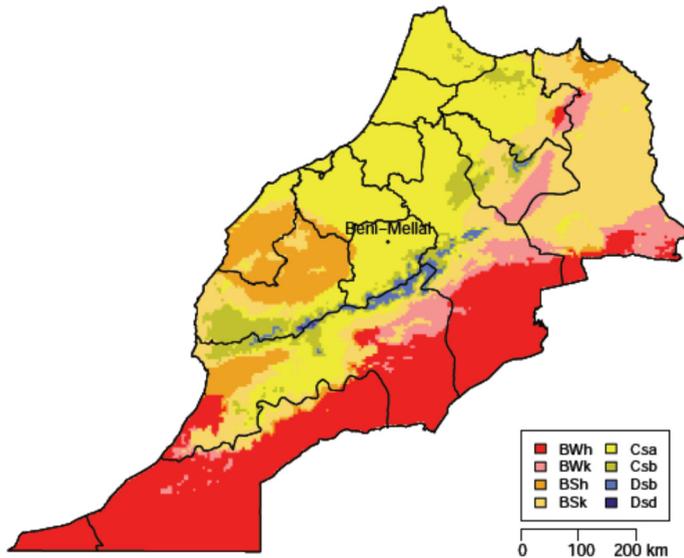
#### **4.2.3. Caracterización molecular**

Se obtuvo el ADN genómico de los distintos aislados (Tabla 4.1) a partir de micelio de colonias crecidas en PDA durante tres semanas a 25 °C en oscuridad. Cada colonia se raspó con una espátula y el micelio se trituró mecánicamente en presencia de nitrógeno líquido en un mortero con ayuda de una maza. La extracción del DNA se realizó mediante el 'kit' de extracción EZNA Plant Miniprep (Omega Bio-tek, Norcross, GA, EE.UU.), siguiendo las recomendaciones sugeridas por el proveedor. El ADN extraído se visualizó en un gel de agarosa (agarosa D-1 Low EEO, Conda, Madrid, España) al 0,7 %. El resto de ADN se almacenó a -20 °C.

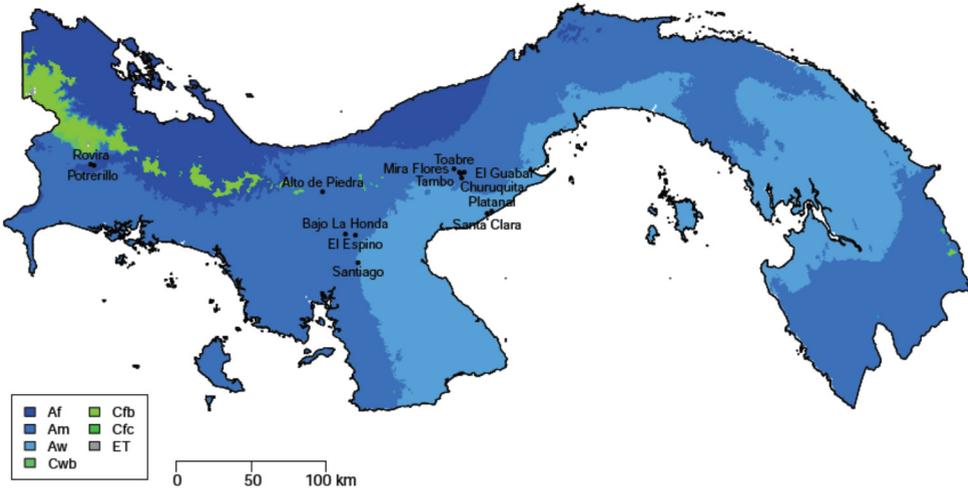
Se amplificó la región ITS (Quaedvlieg *et al.*, 2014), que comprende las secuencias de los espaciadores internos transcritos ITS1 e ITS2 del ARNr, con los cebadores universales ITS1F (Gardes y Bruns, 1993) e ITS4 (White *et al.*, 1990). Las condiciones de la PCR fueron las mismas descritas en el apdo. 3.2.3. Los productos de PCR obtenidos con los cebadores ITS1F/ITS4, se purificaron y se secuenciaron en un secuenciador multicapilar (ABI, Prism 3100 Genetic Analyzer) en Macrogen (Amsterdam, Holanda).



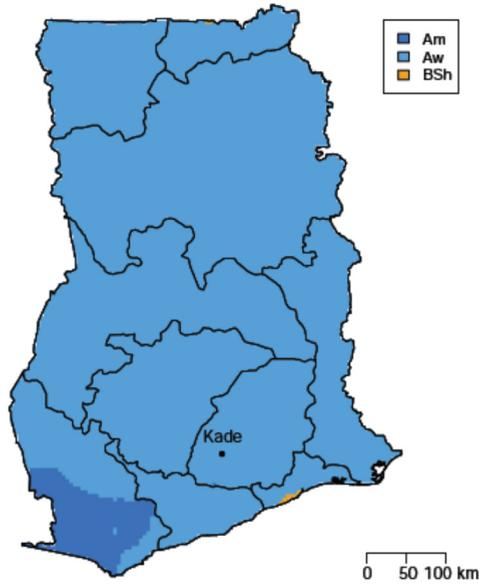
**Figura 4.1:** Mapa con origen geográfico y zona climática Köppen-Geiger de los aislados de *Mycosphaerellaceae* de cítricos de España.



**Figura 4.2:** Mapa con origen geográfico y zona climática Köppen-Geiger de los aislados de *Mycosphaerellaceae* de cítricos de Marruecos.



**Figura 4.3:** Mapa con origen geográfico y zona climática Köppen-Geiger de los aislados de *Mycosphaerellaceae* de cítricos de Panamá.



**Figura 4.4:** Mapa con origen geográfico y zona climática Köppen-Geiger de los aislados de *Mycosphaerellaceae* de cítricos de Ghana.

**Tabla 4.1:** Aislados de *Mycosphaerellaceae* incluidos en el estudio de caracterización morfológica, molecular, temperaturas y patogenicidad.

Aislado	Origen geográfico			Hospedante	Órgano afectado	Año	Código GenBank
	País	Provincia	Localidad				
MC-84	España	Alicante	Pego	<i>Citrus reticulata</i>	Pústula en hoja	2008	KF963135
MC-129	España	Valencia	Algemesí	<i>C. sinensis</i>	Pústula en hoja	2013	KF963139
MC-106	España	Valencia	Alzira	<i>C. reticulata</i>	Pústula en hoja	2011	KF963136
MC-140	España	Valencia	Alzira	<i>C. reticulata</i>	Hoja seca	2013	KF963146
MC-141	España	Valencia	Alzira	<i>C. reticulata</i>	Hoja seca	2013	KF963147
MC-142	España	Valencia	Alzira	<i>C. reticulata</i>	Hoja seca	2013	KF963148
MC-144	España	Valencia	Alzira	<i>C. reticulata</i>	Hoja seca	2013	KF963149
MC-145	España	Valencia	Alzira	<i>C. reticulata</i>	Hoja seca	2013	KF963150
MC-17	España	Valencia	Benimuslem	<i>C. reticulata</i>	Pústula en hoja	2005	KF963140
MC-01	España	Valencia	Chiva	<i>C. reticulata</i>	Pústula en hoja	2001	KF963133
MC-02	España	Valencia	Chiva	<i>C. reticulata</i>	Hoja seca	2001	KF963143
MC-03	España	Valencia	Chiva	<i>C. reticulata</i>	Hoja seca	2001	KF963144
MC-21	España	Valencia	Cogullada	<i>C. sinensis</i>	Pústula en hoja	2005	KF963134
MC-116	España	Valencia	Enova	<i>C. reticulata</i>	Pústula en hoja	2011	KF963137
MC-136	España	Valencia	L'Alcudia	<i>C. unshiu</i>	Pústula en hoja	2013	KF963142
MC-120	España	Valencia	Picassent	<i>C. reticulata</i>	Pústula en hoja	2011	KF963138

Tabla 4.1: (Continuación)

Aislado	Origen geográfico			Hospedante	Órgano afectado	Año	Código GenBank
	País	Provincia	Localidad				
MC-102	Marruecos	Beni-Melal	Beni-Melal	<i>C. reticulata</i>	Pústula en hoja	2011	KF963141
MC-105	Marruecos	Beni-Melal	Beni-Melal	<i>C. reticulata</i>	Pústula en hoja	2011	KF963145
MC-69	Ghana	Eastern Region	Kade	<i>C. sinensis</i>	Pústula en hoja	2008	KF963151
MC-76	Ghana	Eastern Region	Kade	<i>C. sinensis</i>	Pústula en hoja	2008	KF963152
48NCCCh1	Panamá	Chiriquí	Potrerrillo	<i>C. sinensis</i>	Pústula en hoja	2011	KF963157
43NCCCh2	Panamá	Chiriquí	Rovira	<i>C. sinensis</i>	Pústula en hoja	2011	KF963153
6NCV4	Panamá	Veraguas	Bajo de la Honda	<i>C. sinensis</i>	Pústula en hoja	2010	KF963154
9NCV4	Panamá	Veraguas	El Espino	<i>C. sinensis</i>	Pústula en hoja	2010	KF963158
4NTV1	Panamá	Veraguas	Santiago	<i>C. sinensis</i>	Pústula en hoja	2010	KF963155
15NCV4	Panamá	Veraguas	Alto de Piedra	<i>C. sinensis</i>	Pústula en hoja	2010	KF963161
Myc-14	Panamá	Coclé	Churuquita	<i>C. sinensis</i>	Hoja seca	2011	KF963170
Myc-23	Panamá	Coclé	Churuquita	<i>C. sinensis</i>	Hoja seca	2011	KF963172
12NCC9	Panamá	Coclé	Churuquita	<i>C. sinensis</i>	Pústula en hoja	2010	KF963159
19NCC3	Panamá	Coclé	El Guabal	<i>C. sinensis</i>	Pústula en hoja	2010	KF963164
17NCC5	Panamá	Coclé	Mira Flores	<i>C. sinensis</i>	Pústula en hoja	2010	KF963163
17NCC3	Panamá	Coclé	Mira Flores	<i>C. sinensis</i>	Pústula en hoja	2010	KF963162

Tabla 4.1: (Continuación)

Aislado	Origen geográfico			Hospedante	Órgano afectado	Año	Código GenBank
	País	Provincia	Localidad				
31TCC4	Panamá	Coclé	Platanal	<i>C. paradisi</i>	Pústula en hoja	2011	KF963169
31TCC2	Panamá	Coclé	Platanal	<i>C. paradisi</i>	Pústula en hoja	2011	KF963160
26LCC5	Panamá	Coclé	Santa Clara	<i>C. latifolia</i>	Pústula en hoja	2011	KF963167
27LCC2	Panamá	Coclé	Santa Clara	<i>C. latifolia</i>	Pústula en hoja	2011	KF963168
37LCC2	Panamá	Coclé	Tambo	<i>C. latifolia</i>	Pústula en hoja	2011	KF963166
Myc-21	Panamá	Coclé	Tambo	<i>C. sinensis</i>	Hoja seca	2011	KF963171
38NCC2	Panamá	Coclé	Tambo	<i>C. sinensis</i>	Pústula en hoja	2011	KF963156
34NCC4	Panamá	Coclé	Toabre	<i>C. sinensis</i>	Pústula en hoja	2011	KF963165
Myc-34	Panamá	Coclé	Toabre	<i>C. paradisi</i>	Hoja seca	2011	KF963173
Myc-36	Panamá	Coclé	Toabre	<i>C. paradisi</i>	Hoja seca	2011	KF963174
<b>Aislados de referencia</b>							
CBS 110843 ( <i>A. africana</i> )	Sudáfrica	Western Cape	Pampoenvlei	<i>Eucalyptus cladocalyx</i>	...	1994	AY725545
CBS 680.95 ( <i>A. africana</i> )	Sudáfrica	Western Cape	Stellenbosch	<i>E. viminalis</i>	...	1994	AY490773
CBS 110500 ( <i>A. africana</i> )	Australia	Great Southern	Denmark	<i>E. globulus</i>	...	...	AY725531
CBS 122455 ( <i>Z. citri-griseum</i> )	EE.UU.	...	Florida	<i>Citrus</i> sp.	...	...	AY752144

Las secuencias se editaron usando el programa Sequencher v. 5.0 (Gene Codes, Ann Arbor, MI, EE.UU) y se alinearon con el programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) implementado en MEGA versión 5.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, EE.UU.) (Tamura *et al.*, 2011). Posteriormente, se calcularon las distancias genéticas con el modelo Kimura 2-parameter (Kimura, 1980). Seguidamente, se efectuó un análisis de ‘bootstrap’ de 1.000 repeticiones y se construyó un árbol filogenético utilizando el método Neighbor-Joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987) mediante el mismo programa. En el alineamiento se incluyeron secuencias adicionales, previamente contrastadas, de la región ITS de las especies *Z. citri-griseum*, *A. africana* y *P. angolensis* ‘outgroup’ que se obtuvieron de la base datos GenBank del NCBI (Tabla 4.2).

#### 4.2.4. Efecto de la temperatura en el crecimiento miceliar

Para determinar el efecto de la temperatura en el crecimiento radial de las colonias, cada uno de los aislados incluidos en estudio (Tabla 4.1) se sembró en placas Petri con medio de cultivo PDA y se incubaron a 25 °C en oscuridad durante 30 días. Posteriormente, de cada aislado se obtuvieron discos de PDA con micelio de 5 mm de diámetro que se sembraron en el centro de placas Petri con medio de cultivo PDA, realizando cuatro repeticiones por cada aislado. Las placas se hicieron crecer a las temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 °C en oscuridad durante 21 días, tras los cuales se midieron dos diámetros perpendiculares por placa. Con estos datos se calculó el ratio de crecimiento diario de cada aislado expresado en mm día<sup>-1</sup>.

Con los datos del ratio de crecimiento diario se determinó el efecto de la temperatura sobre el crecimiento miceliar de los aislados mediante la función de respuesta de la temperatura ( $f_T$ ) del modelo genérico de infección descrito por Magarey *et al.* (2005). La función  $f_T$  fue desarrollada inicialmente por Yin *et al.* (1995) para describir el efecto de la temperatura sobre la tasa de desarrollo en cultivos utilizando datos de experimentos realizados en yuca, maíz y arroz.

**Tabla 4.2:** Información sobre las secuencias de referencia de *Mycosphaerellaceae* y ‘outgroup’ utilizadas en el análisis filogenético.

Especie	Aislado	País	Hospedante	Código GenBank	Referencia bibliográfica
<i>Zasmidium citri-griseum</i>	Fellsmere 18S	EE.UU.	<i>Citrus paradisi</i>	AF181703	Goodwin y Zismann (2001)
	CBS 122455 (X126) <sup>a</sup>	EE.UU.	<i>Citrus</i> sp.	AY752144	Crous <i>et al.</i> (2004b)
	CBS 116426 (X115)	EE.UU.	<i>Musa</i> sp.	AY752146	Crous <i>et al.</i> (2004b)
	CBS 116366 (CPC 10522)	Tailandia	<i>Acacia mangium</i>	AY752145	Crous <i>et al.</i> (2004b)
	CMW 22518	Vietnam	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	DQ632685	Burgess <i>et al.</i> (2007)
	CBS 122456 (X723)	Tonga	<i>Musa</i> ‘SH 3436’	EU514228	Arzanlou <i>et al.</i> (2008)
<i>Amycosphaerella africana</i>	CBS 680.95	Sudáfrica	<i>E. viminalis</i>	AY490773	Verkley <i>et al.</i> (2004)
	CBS 110843	Sudáfrica	<i>E. cladocalyx</i>	AY725545	Crous <i>et al.</i> (2004a)
	CBS 110500	Australia	<i>E. globulus</i>	AY725531	Crous <i>et al.</i> (2004a)
<i>Pseudocercospora angolensis</i>	CBS 112933	Zimbabue	<i>Citrus</i> sp.	GU269836	Crous <i>et al.</i> (2013)

<sup>a</sup> Código del aislado en colecciones personales.

El modelo consiste en una función no lineal  $f(T)$ :

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

donde  $T$  = temperatura media de crecimiento (°C),  $T_{min}$  = temperatura mínima de crecimiento,  $T_{max}$  = temperatura máxima de crecimiento y  $T_{opt}$  = temperatura óptima de crecimiento, siendo  $T_{min} \leq T \leq T_{max}$  y 0 en caso contrario.

Los parámetros del modelo se estimaron mediante inferencia bayesiana. Las distribuciones previas de los parámetros se definieron considerando la información existente antes de iniciar el estudio. En concreto, las distribuciones previas de los tres parámetros del modelo siguieron distribuciones uniformes. Los parámetros mínimo y máximo de estas distribuciones fueron obtenidos a partir de los datos publicados para distintas especies de hongos fitopatógenos (Magarey *et al.*, 2005). Las distribuciones previas que se utilizaron fueron las siguientes:  $T_{min} \sim \text{Un}(4, 10)$ ,  $T_{max} \sim \text{Un}(32, 38)$ ,  $T_{opt} \sim \text{Un}(23, 26)$ . En cuanto a las distribuciones a posteriori se calcularon incorporando las distribuciones previas y la verosimilitud de los datos obtenidos en el experimento. Para ello se utilizó el programa WinBUGS (Lunn *et al.*, 2000) mediante simulación de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC). Se realizaron inicialmente 2.000 iteraciones para conseguir cadenas de Markov estables. Posteriormente se efectuaron 50.000 iteraciones adicionales a partir de las cuales se obtuvieron las distribuciones a posteriori que permitieron realizar la inferencia estadística. De esta forma se pudieron calcular los intervalos de credibilidad al 95% para cada parámetro.

#### 4.2.5. Ensayos de patogenicidad

Los ensayos de patogenicidad se realizaron únicamente con los aislados procedentes de España y Panamá debido a las restricciones fitosanitarias de bioseguridad. En el caso de los aislados de España, los experimentos se realizaron en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) ubicado en Moncada, provincia de Valencia; mientras que las inoculaciones con los aislados de Panamá se llevaron a cabo en el Instituto de Investigación

Agropecuaria de Panamá (IDIAP), en el Centro de Investigaciones Agropecuarias Central ubicado en Divisa, provincia de Herrera.

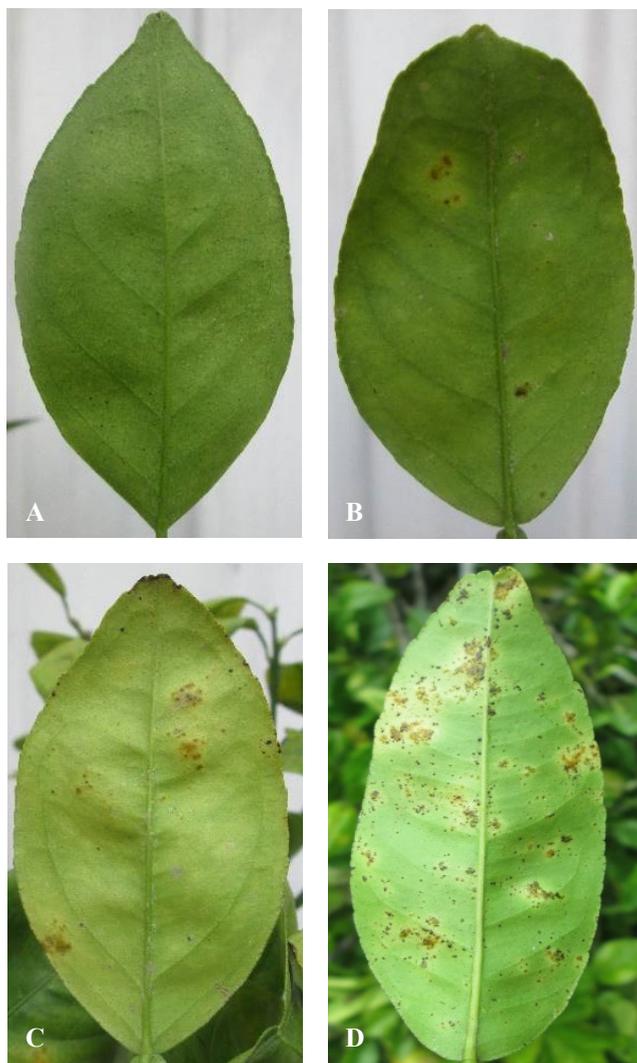
Los aislados de Panamá y España (Tabla 4.1), conservados con el método de papel filtro descrito anteriormente (apdo. 3.2.2), se hicieron crecer en medio PDA durante un mes a 25 °C en oscuridad. Para preparar el inóculo de cada aislado se siguió la metodología descrita en el apdo. 3.2.4.

Los ensayos de patogenicidad con los aislados de España se realizaron en agosto de 2013 sobre plántones de mandarina de dos años de edad del híbrido ‘Ortanique’ injertado sobre Citrange Carrizo. Esta variedad se eligió por ser la más afectada por la enfermedad en España. Las plantas se prepararon en macetas de plástico de 25 cm de diámetro y 20 cm de profundidad con sustrato mezcla de 75% de turba y 25% de arena en volumen. Los plántones se podaron por completo para forzar el crecimiento de nuevos brotes. Para cada aislado se utilizaron dos plántones, que se pulverizaron con 100 mL de la suspensión de micelio y se cubrieron con bolsas plásticas negras para mantener una humedad alta durante 48 h a ~23 °C. Se incluyeron también dos plántones testigo que se pulverizaron con 75 mL de agua destilada estéril cubiertos también con bolsas plásticas. Posteriormente, se retiraron las bolsas plásticas y los plántones se trasladaron a umbráculo de malla donde se mantuvieron a ~25 °C.

Los ensayos de patogenicidad con los aislados de Panamá se realizaron en marzo de 2014 de la misma forma descrita anteriormente, pero sobre plántones de naranja ‘Valencia’ injertados sobre citrumelo Swingle y con una temperatura en el umbráculo de malla de ~27 °C.

Las evaluaciones de incidencia y severidad en los ensayos de patogenicidad, tanto de España como Panamá, se realizaron en el período comprendido entre 10 a 18 meses después de las inoculaciones. La incidencia de la enfermedad se calculó como la proporción de hojas sintomáticas y la severidad de la enfermedad se evaluó siguiendo una escala de severidad de 0 a 3; donde 0 = no hay presencia de pústulas oscuras en el envés de la hoja, 1 = 1-10 pústulas oscuras en el envés de la hoja, 2 = 11-20 pústulas oscuras en el envés de la hoja, y 3 = < 20 pústulas oscuras en el envés de la hoja (Fig. 4.5). Por último, se tomaron muestras de hojas de los plántones que desarrollaron síntomas para reaislar el patógeno en

medio de cultivo PDAS siguiendo la metodología descrita previamente (apdo. 3.2.2).



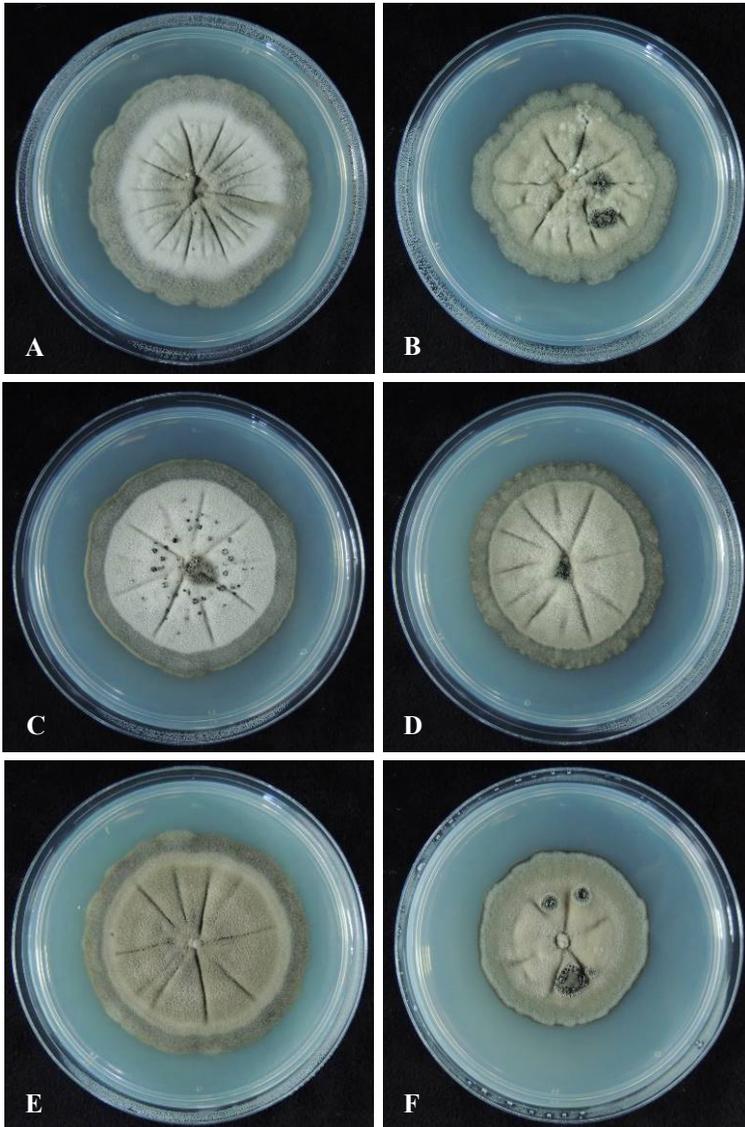
**Figura 4.5:** Escala de severidad de la mancha grasienta en categorías de 0 a 3. **A)** 0 = no hay presencia de pústulas oscuras en el envés de la hoja; **B)** 1 = 1-10 pústulas oscuras en el envés de la hoja; **C)** 2 = 11-20 pústulas oscuras en el envés de la hoja; **D)** 3 = < 20 pústulas oscuras en el envés de la hoja.

### **4.3. Resultados**

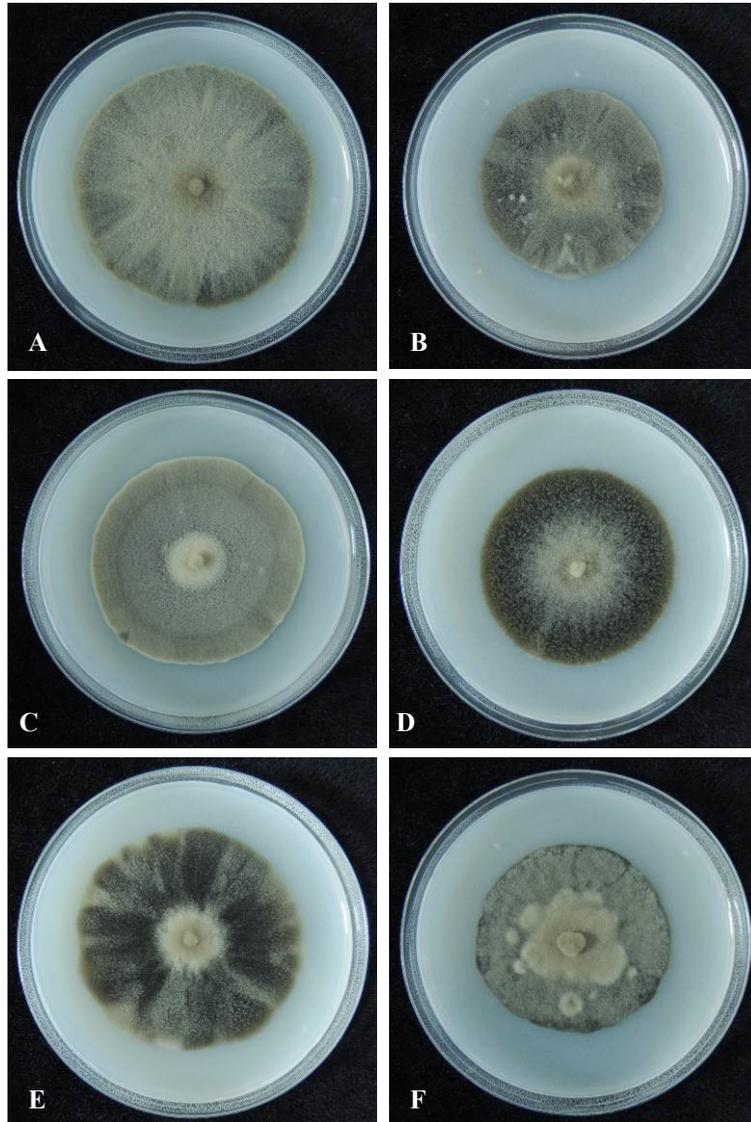
#### **4.3.1. Caracterización morfológica**

A partir de las características culturales de las colonias y la producción de pigmentos en el medio de cultivo PDA los aislados de *Mycosphaerellaceae* estudiados se separaron en dos grupos. Un primer grupo formado por los aislados de Panamá y Ghana (24 aislados) (Tabla 4.3). Las colonias en medio PDA mostraron margen ligeramente lobulado y el color en el anverso varió de ‘olivaceous-grey’ en el margen a ‘mouse-grey’ hacia el centro de la colonia (Fig. 4.6). Las colonias en medio OA mostraron margen ligeramente lobulado y el color en el anverso varió de ‘grey-olivaceous’ a ‘greenish-glaucous’ (Fig. 4.7). Las colonias en medio SNA mostraron margen ligeramente lobulado y el color en el anverso ‘olivaceous’ (Fig. 4.8). Las colonias en medio MEA mostraron margen ligeramente lobulado y el color en el anverso ‘olivaceous-grey’ (Fig. 4.9). La formación de pigmento amarillo solo se observó en medio PDA en cuatro de los aislados (4/24) (Fig. 4.10).

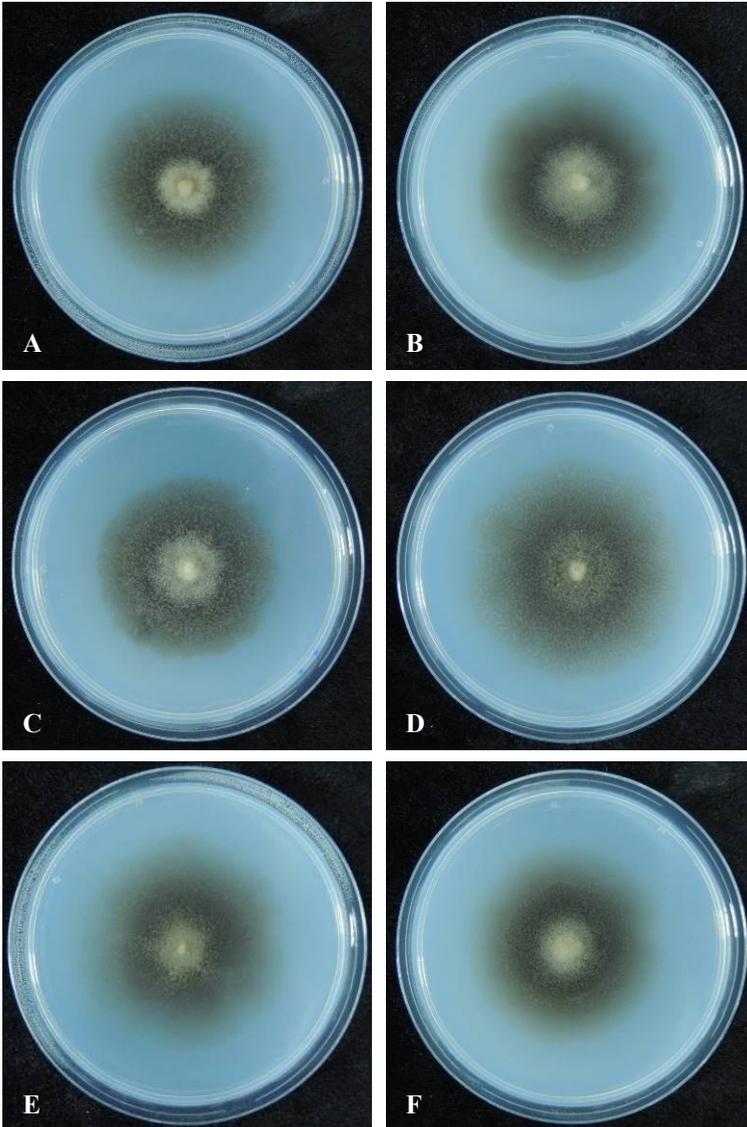
El segundo grupo incluía los aislados procedentes de España y Marruecos (18 aislados) (Tabla 4.3). Las colonias en medio PDA mostraron margen ligeramente lobulado a lobulado y el color en el anverso varió de ‘pale olivaceous-grey’ en el margen a ‘pale mouse-grey’ hacia el centro de la colonia (Fig. 4.11). Las colonias en medio OA mostraron margen ligeramente lobulado y el color en el anverso varió de ‘grey-olivaceous’ en el margen a ‘greenish-glaucous’ hacia el centro de la colonia (Fig. 4.12). Las colonias en medio SNA mostraron margen ligeramente lobulado a lobulado y el color en el anverso ‘greenish-glaucous’ (Fig. 4.13). Las colonias en medio MEA mostraron margen ligeramente lobulado a lobulado y el color en el anverso varió de ‘mouse-grey’ en el margen a ‘pale purplish-grey’ hacia el centro de la colonia (Fig. 4.14). La formación de pigmento rojo solo se observó en medio PDA en algunos de los aislados (7/18) (Fig. 4.15)



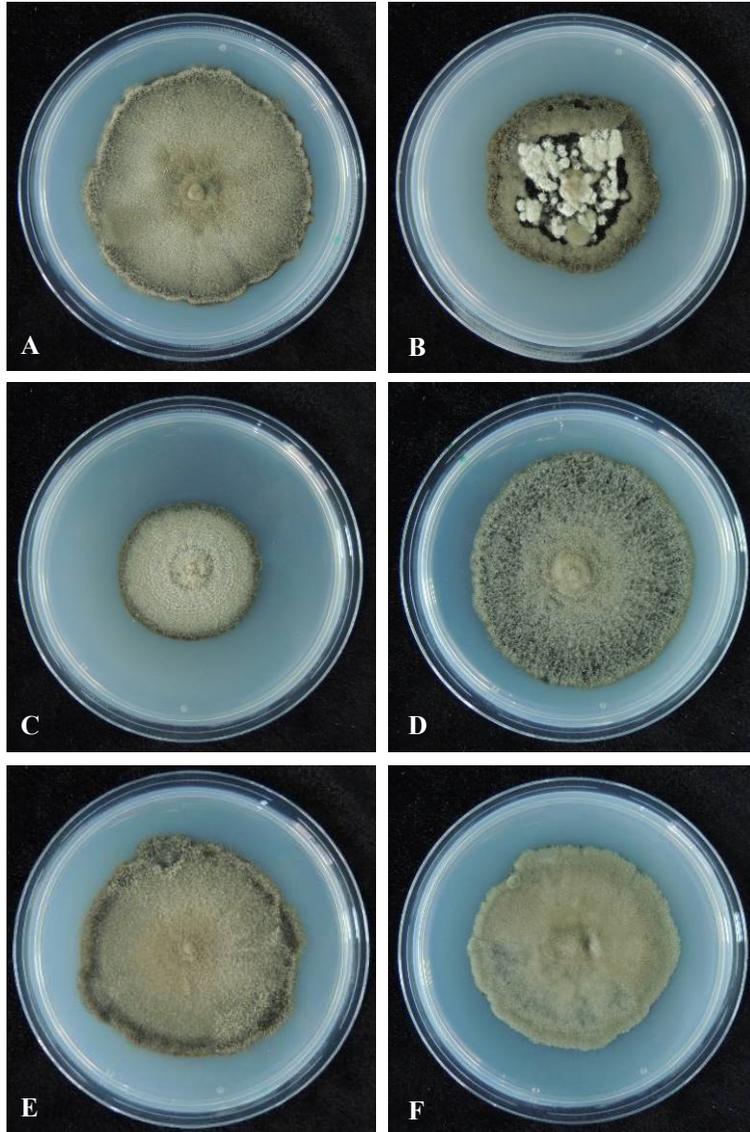
**Figura 4.6:** Aspecto del anverso de las colonias del grupo 1: *Mycosphaerellaceae* procedentes de Panamá y Ghana crecidas en medio de cultivo Patata Dextrosa Agar (PDA) tras 30 días de incubación a 25 °C. Aislados **A)** MC76; **B)** MC69; **C)** 4NTV1; **D)** 9NCV4; **E)** 43NCCh2; **F)** 38NCC2.



**Figura 4.7:** Aspecto del anverso de las colonias del grupo 1: *Mycosphaerellaceae* procedentes de Panamá y Ghana crecidas en medio de cultivo Agar Avena (OA) tras 30 días de incubación a 25 °C. Aislados **A)** MC76; **B)** MC69; **C)** 4NTV1; **D)** 9NCV4; **E)** 43NCCh2; **F)** 38NCC2.



**Figura 4.8:** Aspecto del anverso de las colonias del grupo 1: *Mycosphaerellaceae* procedentes de Panamá y Ghana crecidas en medio de cultivo Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) tras 30 días de incubación a 25 °C. Aislados **A)** MC76; **B)** MC69; **C)** 4NTV1; **D)** 9NCV4; **E)** 43NCCh2; **F)** 38NCC2.



**Figura 4.9:** Aspecto del anverso de las colonias del grupo 1: *Mycosphaerellaceae* procedentes de Panamá y Ghana crecidas en medio de cultivo Agar Extracto de Malta (MEA) tras 30 días de incubación a 25 °C. Aislados **A)** MC76; **B)** MC69; **C)** 4NTV1; **D)** 9NCV4; **E)** 43NCCh2; **F)** 38NCC2.

**Tabla 4.3:** Características de los dos grupos de *Mycosphaerellaceae* obtenidos y de los aislados de referencia estudiados.

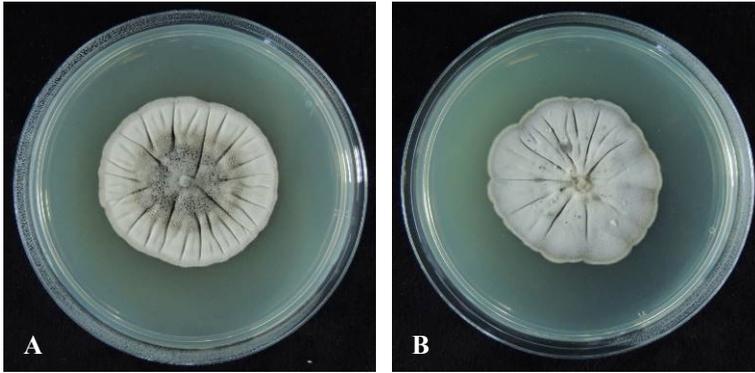
Características de las colonias	Aislados en estudio		Aislados de referencia			
			<i>Zasmidium citri-griseum</i>		<i>Amycosphaerella africana</i>	
	Grupo 1	Grupo 2	CBS 122455	CBS 680.95	CBS 110500	CBS 110843
Color en PDA <sup>a</sup>	'Olivaceous grey' en el margen a 'mouse grey' hacia el centro e 'iron grey' en el reverso	'Pale olivaceous grey' en el margen a 'pale mouse-grey' hacia el centro e 'iron grey' en el reverso	'Olivaceous grey' en el anverso e 'iron grey' en el reverso	'Grey lavender' en el margen a 'rosy buff' hacia el centro y 'greenish black' en el reverso	'Umber' a 'rosy buff' en el reverso	'Olivaceous grey' en el margen a 'pale greenish grey' hacia el centro e 'iron grey' en el reverso
Color en OA	'Grey olivaceous' a 'greenish glaucous' y 'olivaceous black' en el reverse	'Grey olivaceous' en el margen a 'greenish glaucous' hacia el centro y 'grey olivaceous' en el reverso	'Grey olivaceous' y 'olivaceous black' en el reverso	'Grey olivaceous' en el anverso y el reverso	'Grey olivaceous' en el margen a 'pale mouse grey' hacia el centro y 'grey olivaceous' en el reverso	'Grey olivaceous' en el margen a 'pale mouse grey' hacia el centro y 'grey olivaceous' en el reverso
Color en SNA	'Olivaceous' en el anverso y reverso	'Greenish glaucous' en el anverso y reverso	'Olivaceous' en el anverso y reverso	'Rosy buff' en el anverso y reverso	'Greenish glaucous' en el anverso y reverso	'Greenish glaucous' en el anverso y reverso

Tabla 4.3: (Continuación)

Características de las colonias	Aislados en estudio		Aislados de referencia		
	Grupo 1	Grupo 2	<i>Zasmidium citri-griseum</i> <i>Amycosphaerella africana</i>		
			CBS 22455	CBS 680.95	CBS 110500 CBS 110843
Color en MEA	'Olivaceous grey' en el reverso	'Mouse grey' en el margen a 'pale grey' purplish hacia el centro e 'olivaceous black' reverso en el reverso	'Olivaceous buff' en el margen a 'white' hacia el centro e 'honey' en el reverso	'Olivaceous buff' en el margen a 'rosy grey' hacia el centro e 'olivaceous' en el reverso	'Pale mouse grey' en el margen a 'rosy grey' hacia el centro e 'olivaceous' en el reverso
Producción de pigmento en PDA	4/24 <sup>b</sup>	7/18	0/1	0/1	1/1 0/1

<sup>a</sup> Medios de cultivo: Patata Dextrosa Agar (PDA); Agar Avena (OA); Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA); Agar Extracto de Malta (MEA).

<sup>b</sup> N° de aislados respecto al total evaluado.

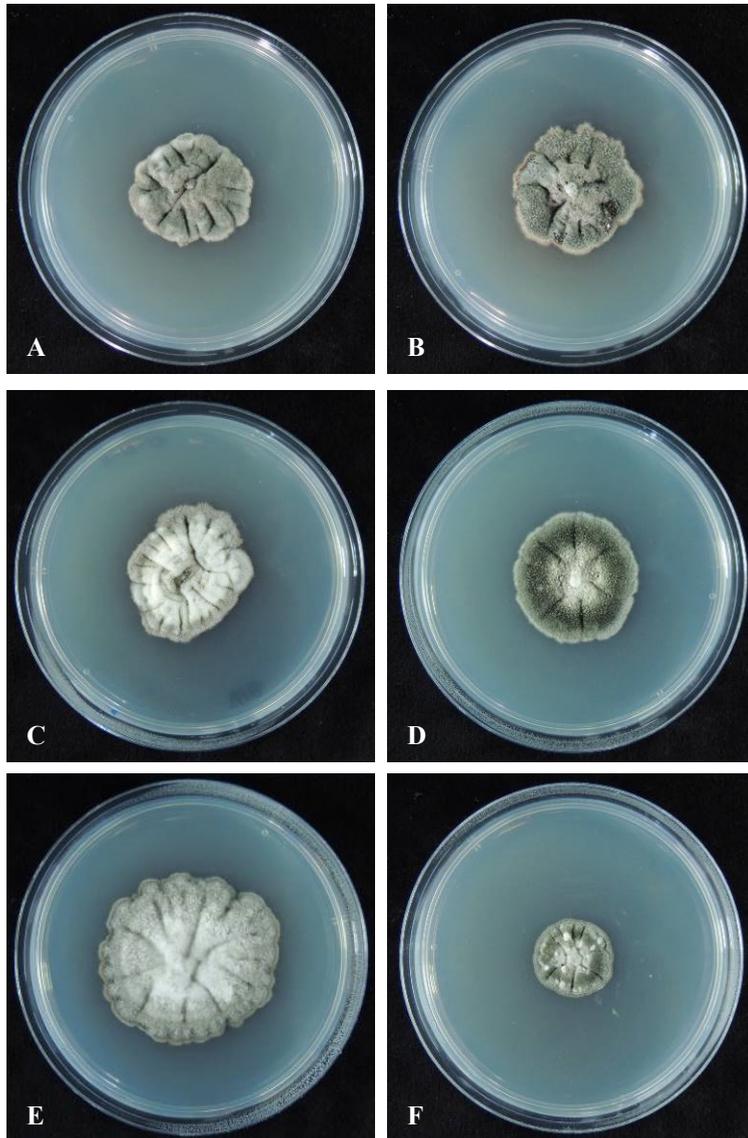


**Figura 4.10:** *Mycosphaerellaceae* pertenecientes al grupo 1 que produjeron pigmento amarillo en medio de cultivo patata dextrosa agar (PDA) tras 30 días de incubación a 25 °C. Aislados **A)** 34NCC4; **B)** Myc-14.

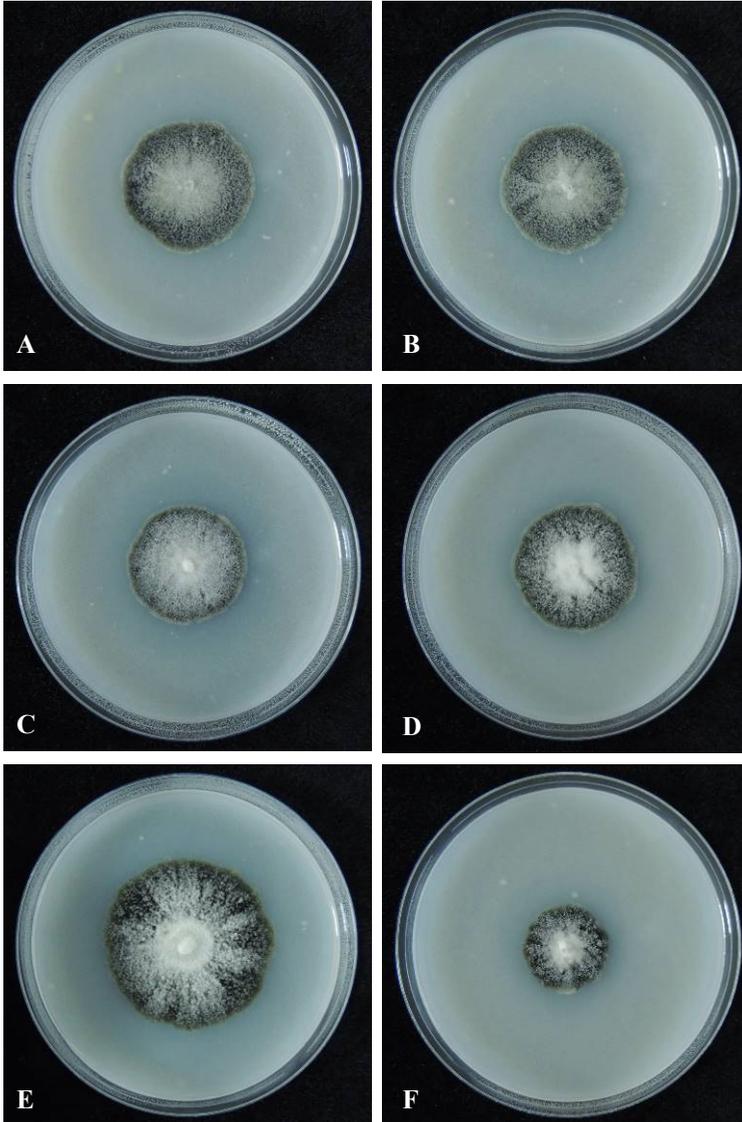
Las características de la colonia y la producción de pigmentos de los aislados de referencia de *Z. citri-griseum* (CBS 122455) y *A. africana* CBS 680.95 (ant. *M. africana*), CBS 110500 (ant. *M. aurantia*) y CBS 110843 (ant. *M. ellipsoidea*) en los diferentes medios de cultivo evaluados se muestran la Tabla 4.3 y Fig. 4.16.

A partir de muestras de hojas secas procedentes de España obtenidas de una parcela seleccionada con síntomas de la enfermedad, se observaron en el envés de las hojas pseudotecios de color oscuro inmersos en el tejido y distribuidos sobre la lámina foliar en forma agregada. Al realizar disecciones se observaron numerosas ascas con forma elipsoidal que contenían usualmente ocho ascosporas. Las ascosporas presentaron forma ligeramente fusiforme, hialinas, con un único tabique central y las medidas oscilaron entre 9,9-16,1  $\mu\text{m}$  de largo x 2,01-3,03  $\mu\text{m}$  de ancho.

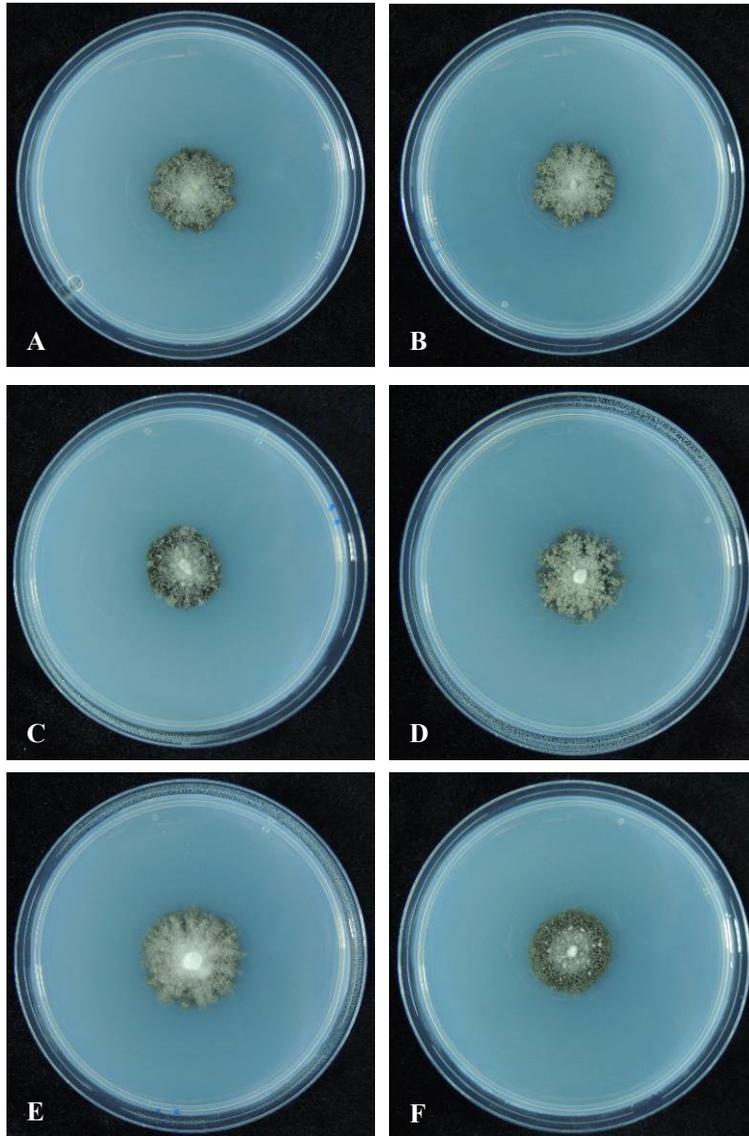
Del mismo modo en las muestras de hojas secas procedentes de un campo con síntomas de Panamá se observaron también pseudotecios de color oscuro en el envés de las hojas. Las ascas y ascosporas observadas resultaron similares a las descritas en la muestra procedente de España en cuanto a la forma, color y presencia de un único tabique central. Las medidas oscilaron entre 10-15  $\mu\text{m}$  de largo x 2,5-5  $\mu\text{m}$  de ancho. Las medidas de las ascosporas de los aislados de referencia y otros estudios previos se indican en la Tabla 4.4.



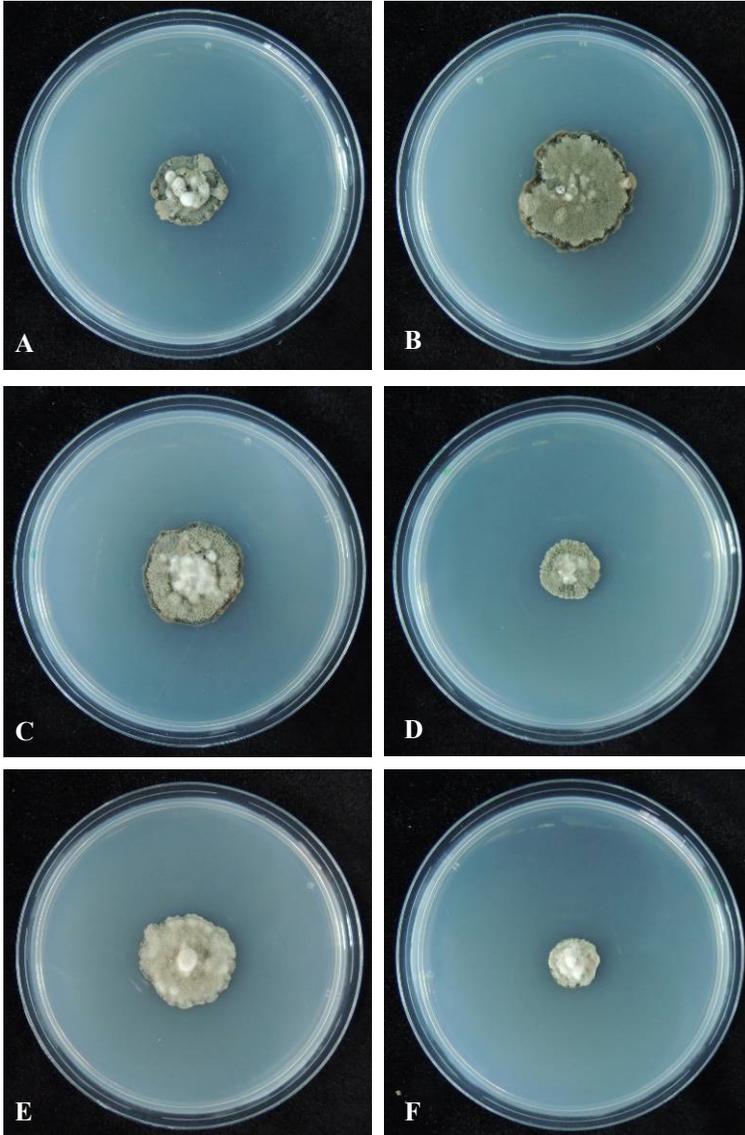
**Figura 4.11:** Aspecto del anverso de las colonias del grupo 2: *Mycosphaerellaceae* procedentes de España y Marruecos crecidas en medio de cultivo Patata Dextrosa Agar (PDA) tras 30 días de incubación a 25 °C. Aislados **A)** MC-140; **B)** MC-141; **C)** MC-116; **D)** MC-03; **E)** MC-01; **F)** MC-102.



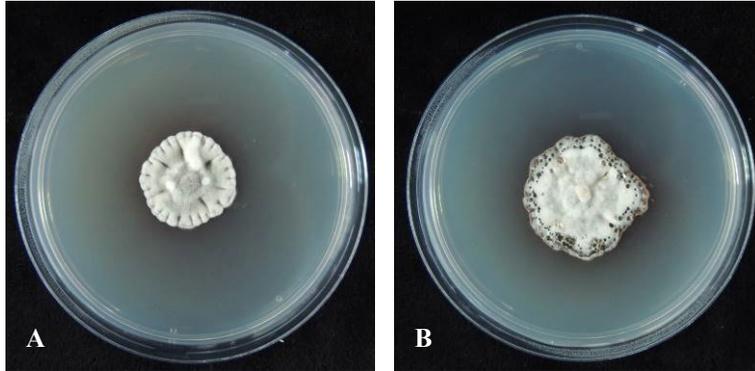
**Figura 4.12:** Aspecto del anverso de las colonias del grupo 2: *Mycosphaerellaceae* procedentes de España y Marruecos crecidas en medio de cultivo Agar Avena (OA) tras 30 días de incubación a 25 °C. Aislados **A)** MC-140; **B)** MC-141; **C)** MC-116; **D)** MC-03; **E)** MC-01; **F)** MC-102.



**Figura 4.13:** Aspecto del anverso de las colonias del grupo 2: *Mycosphaerellaceae* procedentes de España y Marruecos crecidas en medio de cultivo Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) tras 30 días de incubación a 25 °C. Aislados **A)** MC-140; **B)** MC-141; **C)** MC-116; **D)** MC-03; **E)** MC-01; **F)** MC-102.



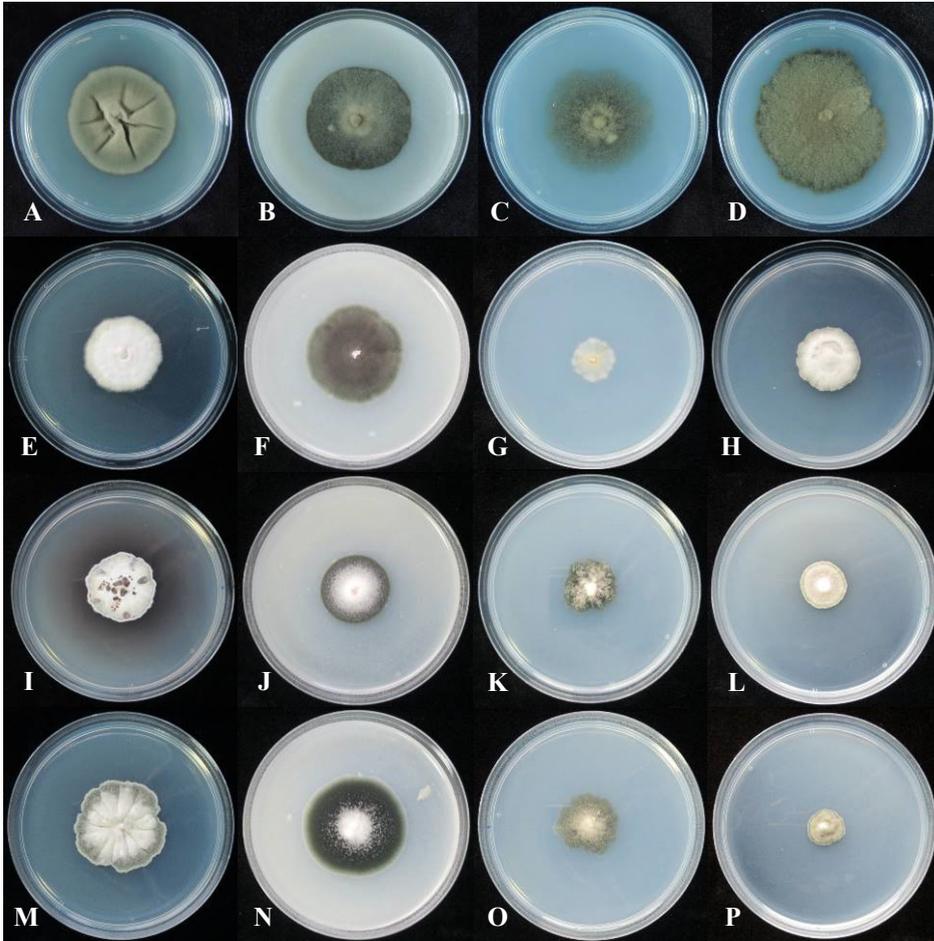
**Figura 4.14:** Aspecto del anverso de las colonias del grupo 2: *Mycosphaerellaceae* procedentes de España y Marruecos crecidas en medio de cultivo Agar Extracto de Malta (MEA) tras 30 días de incubación a 25 °C. Aislados **A)** MC-140; **B)** MC-141; **C)** MC-116; **D)** MC-03; **E)** MC-01; **F)** MC-102.



**Figura 4.15:** *Mycosphaerellaceae* pertenecientes al grupo 2 que produjeron pigmento rojizo en medio de cultivo Patata Dextrosa Agar (PDA) tras 30 días de incubación a 25 °C. Aislados **A)** MC-17; **B)** MC-21.

#### 4.3.2. Caracterización molecular

En los 42 aislados de *Mycosphaerellaceae* estudiados (Tabla 4.1) se obtuvieron productos de amplificación de aproximadamente 491 pb con los cebadores universales ITS1/ITS4. El análisis filogenético de las secuencias de la región ITS de los aislados identificó dos clados bien diferenciados (Fig. 4.17). Uno de ellos formado por los 24 aislados procedentes de Panamá y Ghana y las secuencias de *Z. citri-griseum* (AY752144, AF181703, AY752145, DQ632685 y EU514228) con un valor de 'bootstrap' de 59%. El otro clado incluyó los 18 aislados procedentes de España y Marruecos y los aislados de referencia de *A. africana* CBS 680.95 (ant. *M. africana*), CBS 110500 (ant. *M. aurantia*) y CBS 110843 (ant. *M. ellipsoidea*) con un valor de 'bootstrap' de 99%, resultado todos ellos muy similares entre sí. Los resultados del análisis molecular coincidieron con los dos grupos obtenidos en la caracterización morfológica.



**Figura 4.16:** Aspecto del anverso de las colonias de los aislados de referencia crecidos en los diferentes medios de cultivo tras 30 días de incubación a 25 °C. *Zasmidium citri-griseum* CBS 122455 **A)** Patata Dextrosa Agar (PDA); **B)** Agar Avena (OA); **C)** Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA); **D)** Agar Extracto de Malta (MEA); *Amycosphaerella africana* CBS 680.95 (ex. *Mycosphaerella africana*) **E)** PDA; **F)** OA; **G)** SNA; **H)** MEA; CBS 110500 (ex. *Mycosphaerella aurantia*) **I)** PDA; **J)** OA; **K)** SNA; **L)** MEA; CBS 110843 (ex. *Mycosphaerella ellipsoidea*) **M)** PDA; **N)** OA; **O)** SNA; **P)** MEA.

**Tabla 4.4:** Dimensiones de las ascosporas de las especies de *Mycosphaerellaceae* de Panamá y España obtenidas en este estudio y medidas de referencia publicadas por otros autores.

<b>Especies</b>	<b>Referencia</b>	<b>Dimensiones de las ascosporas (<math>\mu\text{m}</math>)<sup>a</sup></b>
<i>Zasmidium citri-griseum</i>	Muestras de Panamá	(10-)12,6(-15) x (2,5-)3,6(-5)
<i>Z. citri-griseum</i>	Whiteside (1970)	7,2-10,5 x 2,3-2,8
<i>Amycosphaarella africana</i>	Muestras de España	(9,9-)12,6(-16,1) x (2,01-)2,72(-3,03)
<i>A. africana</i> (ant. <i>Mycosphaarella africana</i> )	Crous y Wingfield (1996)	(7-)8-10(-11) x (2-)2,5-3
<i>A. africana</i> (ant. <i>M. ellipsoidea</i> )	Crous y Wingfield (1996)	(8-)10-11 x (2-)2,5-3
<i>A. africana</i> (ant. <i>M. aurantia</i> )	Maxwell <i>et al.</i> (2003)	(9-)11-12(-15) x 2-2,5(-3)

<sup>a</sup> Entre paréntesis los valores máximos y mínimos y promedio en el centro.



**Figura 4.17:** Resultados del análisis filogenético de los aislados de *Mycosphaerellaceae* de cítricos mediante el método Neighbor-Joining basado en las distancias genéticas de las secuencias de la región ITS, calculadas con el modelo Kimura 2-parameter. Los números en los nodos corresponden a la frecuencia con que aparecen los grupos en el análisis ‘bootstrap’ de 1.000 repeticiones.

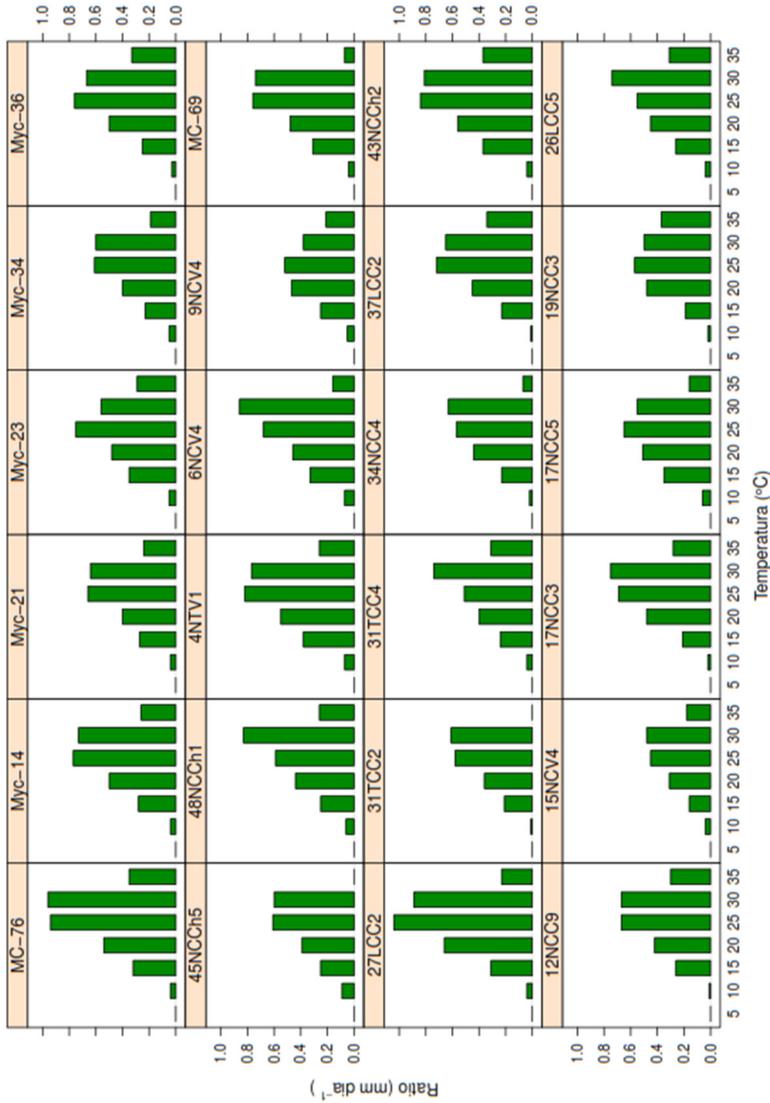
### **4.3.3. Efecto de la temperatura en el crecimiento miceliar**

Todos los aislados de *Mycosphaerellaceae* estudiados crecieron a todas las temperaturas evaluadas, encontrándose diferencias en las temperaturas óptimas entre los dos grupos. Los aislados de *Z. citri-griseum* procedentes de Panamá y Ghana junto con el aislado de referencia de *Z. citri-griseum* CBS 122455 crecieron de forma similar en todas las temperaturas evaluadas (Fig. 4.18 y Fig. 4.20 A) y alcanzaron el óptimo crecimiento a 27,88 °C (Tabla 4.5). Se encontraron diferencias con respecto al grupo de aislados de *A. africana* procedentes de España, Marruecos y los aislados de referencia de esta especie (CBS 680.95, CBS 110843 y CBS 110500) que mostraron un crecimiento similar en las temperaturas evaluadas (Fig. 4.19 y Fig. 4.20 B-D) y alcanzaron el óptimo de crecimiento a 22,78 °C (Tabla 4.5). Mediante los intervalos de credibilidad al 95% se detectaron diferencias entre las temperaturas óptimas de los aislados de *Z. citri-griseum* y los de *A. africana* al no solaparse entre ellos (Tabla 4.5). Con respecto a las temperaturas máximas y mínimas los aislados de *Z. citri-griseum* y *A. africana* presentaron valores similares, aunque se detectaron diferencias entre los intervalos de temperaturas máximas de estas especies (Tabla 4.5).

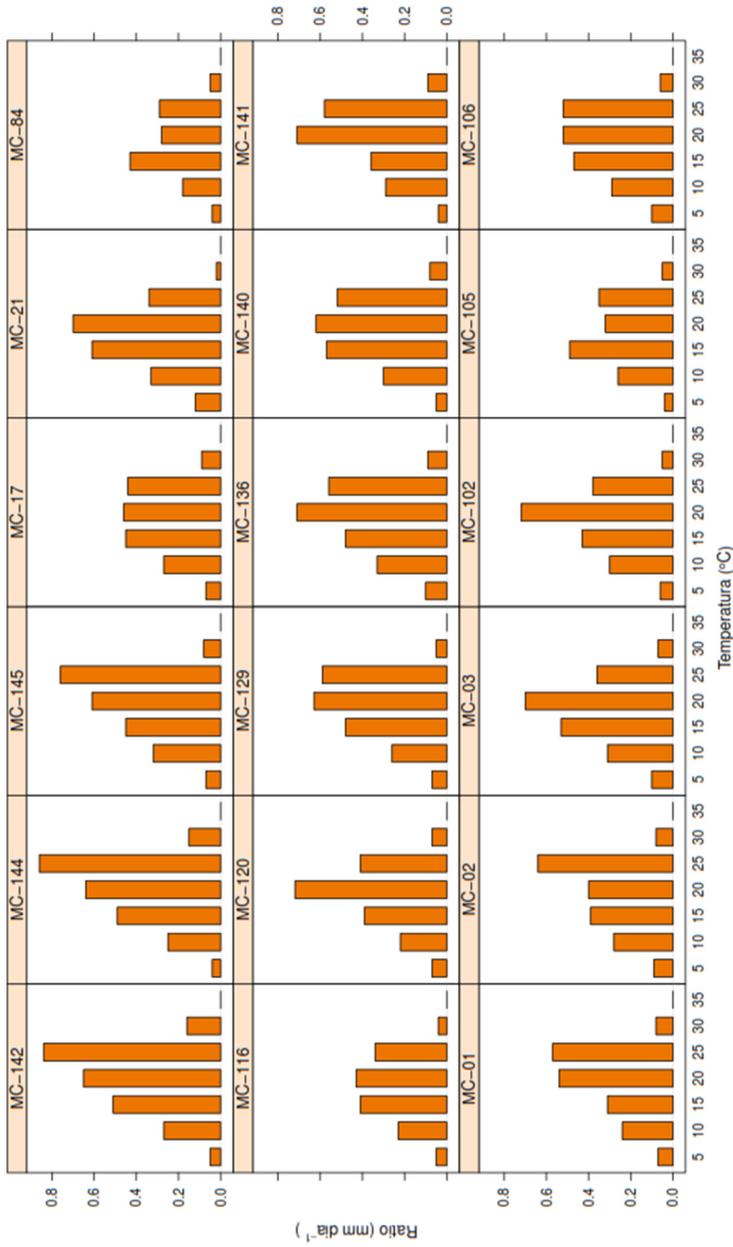
Las curvas de crecimiento resultantes muestran diferencias en el patrón de crecimiento del grupo de aislados de *Z. citri-griseum* de Panamá, Ghana y el aislado de referencia CBS 122455 respecto al grupo de aislados de *A. africana* procedentes de España, Marruecos y los aislados de referencia (CBS 680.95, CBS 110843 y CBS 110500) (Fig. 4.21). Los resultados encontrados en los ensayos de temperatura concuerdan con los encontrados en el análisis morfológico y molecular, que separan claramente estas dos especies fúngicas.

### **4.3.4. Ensayos de patogenicidad**

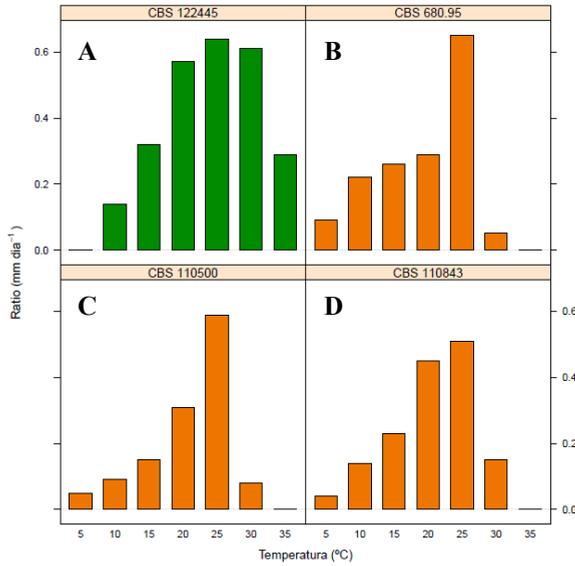
Ninguno de los aislados de *A. africana* procedentes de España reprodujo síntomas de la enfermedad en hojas de los plantones del híbrido ‘Ortanique’ después de transcurridos 18 meses desde la inoculación. No obstante, se tomaron muestras de hojas con lesiones inespecíficas y se realizaron aislamientos en medio de cultivo PDAS, pero no se obtuvo ninguna colonia de *Mycosphaerellaceae*.



**Figura 4.18:** Ratio de crecimiento diario (mm día<sup>-1</sup>) de los aislados de *Zasmidium citri-griseum* de Panamá y Ghana a diferentes temperaturas.



**Figura 4.19:** Ratio de crecimiento diario (mm día<sup>-1</sup>) de los aislados de *Mycosphaerella africana* de España y Marruecos a diferentes temperaturas.



**Figura 4.20:** Ratio de crecimiento diario (mm día<sup>-1</sup>) de los aislados de referencia: **A)** *Zasmidium citri-griseum* CBS 122455; **B)** *Amycosphaerella africana* CBS 680.95 (ant. *M. africana*); **C)** CBS 110500 (ant. *M. aurantia*); **D)** CBS 110843 (ant. *M. ellipsoidea*).

**Tabla 4.5:** Parámetros estimados de la función no lineal de respuesta a la temperatura de los aislados de *Mycosphaerellaceae* evaluados.

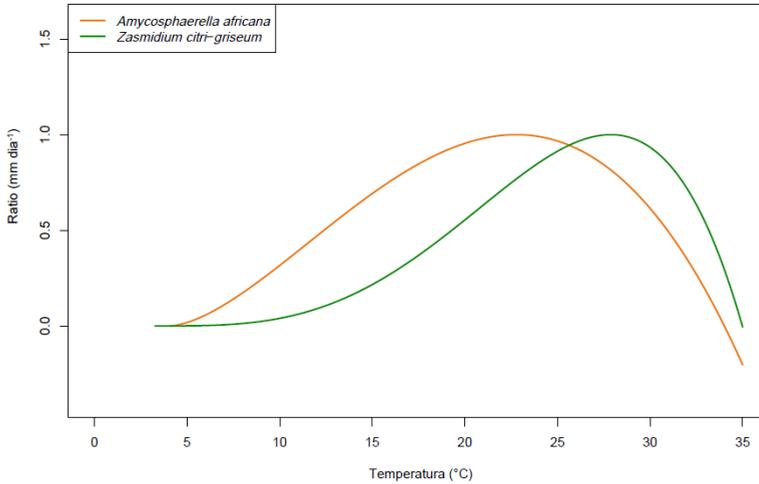
Especies	<i>T</i> max <sup>a</sup> (°C)	<i>T</i> min <sup>b</sup> (°C)	<i>T</i> opt <sup>c</sup> (°C)
<i>Zasmidium citri-griseum</i>	34,98 (34,93-35) <sup>d</sup>	3,26 (1,18-4,92)	27,88 (27,60-28)
<i>Amycosphaerella africana</i>	34,01 (33,34-34,69)	4,07 (1,75-4,98)	22,78 (20,84-24,59)

<sup>a</sup>*T*max= Temperatura máxima.

<sup>b</sup>*T*min= Temperatura mínima.

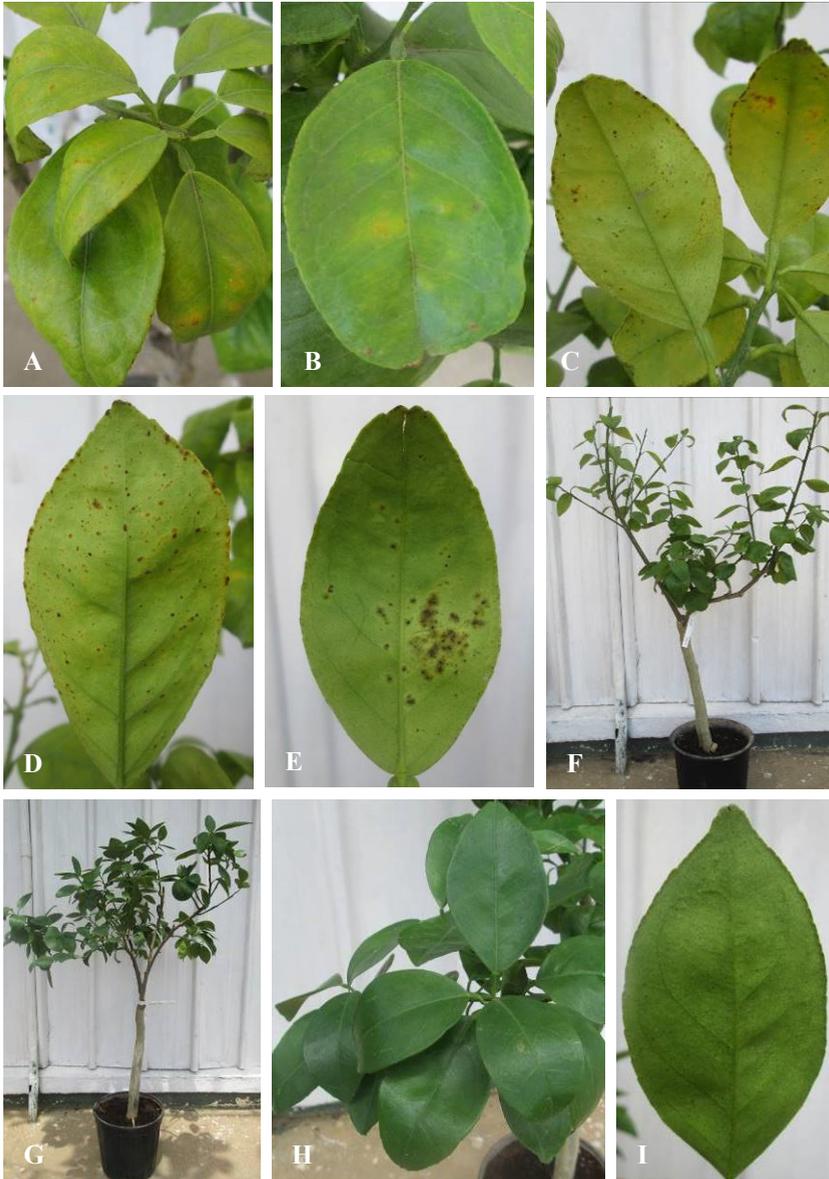
<sup>c</sup>*T*opt= Temperatura óptima.

<sup>d</sup>Media e intervalos de credibilidad del 95%.



**Figura. 4.21:** Función no lineal de respuesta a la temperatura (°C) (Magarey *et al.*, 2005) ajustada para los aislados de *Zasmidium citri-griseum* (n=25) y *Amycosphaerella africana* (n=21).

En cambio, los ensayos de patogenicidad con los aislados de Panamá resultaron positivos, observándose síntomas en los plántones a los 10 meses de la inoculación. Los síntomas consistían en áreas cloróticas en el haz de las hojas (Fig. 4.22 A y B) y numerosas pústulas oscuras en el envés de la hoja (Fig. 4.22 C-E), acompañadas de defoliación prematura (Fig. 4.22 F). La incidencia de la enfermedad en los plántones inoculados varió de un aislado a otro y con un mínimo del 2% de hojas afectadas hasta un máximo de 85,7% (Tabla 4.6). En las evaluaciones de severidad las categorías 0 (ninguna pústula) y 1 (1-10 pústulas) se presentaron con mayor frecuencia, observándose en el 100% de los plántones inoculados; mientras que las categorías 2 (11-20 pústulas) y 3 (<20 pústulas) de la escala de severidad se presentaron en menor proporción con 72% y 50%, respectivamente (Tabla 4.6). El patógeno se reaisló en un 68% de los aislados inoculados, confirmándose los postulados de Koch-Pasteur. No se observaron lesiones en las plantas del tratamiento testigo ni tampoco se reaisló el patógeno (Fig. 4.22 G-I).



**Figura. 4.22:** A) y B) Lesiones cloróticas en el haz de las hojas de un plantón de naranja ‘Valencia’ inoculado con *Zasmidium citri-griseum*, aislado Myc-21; C) – E) pústulas oscuras en el envés de las hojas; F) plantón de naranja ‘Valencia’ inoculado con *Z. citri-griseum* (Myc-21) con defoliación de hojas; G) plantón testigo inoculado con agua destilada estéril sin síntomas; H) y I) haz y envés de hoja de plantón testigo sin lesiones.

**Tabla 4.6:** Patogenicidad sobre plantones de naranja 'Valencia' de los aislados de *Zasmidium citri-griseum* obtenidos de plantaciones de cítricos de Panamá afectadas por la mancha grisienta.

Aislados	Provincia	Severidad <sup>a</sup>			Incidencia (%)	Reaislamiento (%)
		0	1	2		
4NTV1	Veraguas	96,55	3,45	0	3,45	... <sup>b</sup>
6NCV4	Veraguas	41,10	28,83	22,70	58,90	6,0
9NCV4	Veraguas	45,19	34,07	13,33	7,41	40,8
15NCV4	Veraguas	90,83	9,17	0	0	...
12NCC9	Coelé	54,55	41,15	3,83	0,48	4,1
17NCC3	Coelé	78,05	21,95	0	0	...
17NCC5	Coelé	26,24	65,35	8,42	0	51,0
19NCC3	Coelé	66,96	27,83	4,35	0,87	...
26LCC5	Coelé	72,49	25,40	2,12	0	10,2
27LCC2	Coelé	93,75	6,25	0	0	...
31TCC2	Coelé	92,25	7,75	0	0	...
31TCC4	Coelé	18,23	64,06	15,63	2,08	14,2
34NCC4	Coelé	51,89	46,23	1,89	0	12,2
37LCC2	Coelé	54,97	38,41	6,62	0	...
38NCC2	Coelé	63,89	34,13	1,98	0	63,2
MYC14	Coelé	81,01	18,99	0	0	34,6
MYC21	Coelé	50	31,53	7,21	11,26	20,4
MYC23	Coelé	34,97	48,63	13,66	2,73	51,0
MYC34	Coelé	49,54	35,32	11,47	3,67	61,2
MYC36	Coelé	28,71	56,93	6,93	7,43	85,7
43NCC2	Chiriquí	59,01	21,12	18,01	1,86	65,0
48NCC1	Chiriquí	44,44	39,15	8,99	7,41	2,0
Testigo	...	100	0	0	0,00	...

<sup>a</sup> Porcentaje de hojas en cada categoría de severidad: 0 = no hay presencia de pústulas oscuras en el envés de la hoja, 1 = 1-10 pústulas oscuras en el envés de la hoja, 2 = 11-20 pústulas oscuras en el envés de la hoja, y 3 = > 20 pústulas oscuras en el envés de la hoja.

<sup>b</sup> No se logró reaislar el patógeno.

#### 4.4. Discusión

En este estudio se caracterizó por primera vez una colección de aislados de *Mycosphaerellaceae* obtenidos de cítricos con síntomas de mancha grasienta procedentes de España, Marruecos, Ghana y Panamá basados en sus características morfológicas, culturales (fisiológicas), moleculares (región ITS) y patogénicas. Siguiendo las recomendaciones de Quaedvlieg *et al.* (2014), el estudio filogenético realizado se basó en secuencias de la región ITS, que permitió separar claramente dos especies.

Los aislados de Panamá y Ghana se identificaron como *Z. citri-griseum* formando un clado con las secuencias referencia de esta especie depositadas en el GenBank y procedentes de diferentes regiones del mundo como EE.UU., Tailandia, Vietnam y Tonga.

La nomenclatura del agente causal de la mancha grasienta ha sufrido una serie de cambios desde su primera descripción. Fisher (1961) citó a *Cercospora citri-grisea* F.E. Fisher como el agente causal de la mancha grasienta en los cítricos. Posteriormente, Whiteside (1970) realizó una serie de estudios sobre la etiología de la enfermedad y la biología de su agente causal, que nombró como *M. citri* Whiteside para su forma sexual y *Stenella* sp. para su forma asexual.

Por su parte, Sivanesan (1984) denominó al anamorfo de *M. citri* como *Stenella citri-grisea* (F.E. Fisher) Sin. Posteriormente, en el estudio de Pretorius *et al.* (2003) se refieren también a *S. citri-grisea* como sinónimo de *M. citri*, indicando que en realidad se trata de un complejo de especies. Es importante reseñar que los especímenes de *M. citri* analizados morfológicamente por Pretorius *et al.* (2003) no fueron sometidos a ningún tipo de análisis molecular. Por otra parte, las secuencias ITS de referencia de *M. citri* analizadas incluidas en nuestro estudio corresponden a dos aislados de Goodwin y Zismann (2001), que no fueron analizados morfológicamente en el estudio de Pretorius *et al.* (2003). Algunos años más tarde, Crous *et al.* (2009c) basándose en estudios filogenéticos moleculares, propusieron un cambio al nombre del género del agente causal de la mancha grasienta de los cítricos nombrándolo como *Z. citri* (Whiteside) Crous. Con este cambio, se priorizaba el nombre más antiguo, independientemente de si era teleomorfo o anamorfo. Esta propuesta incumplía las normas de nomenclatura botánica vigentes en aquel momento, pero el nuevo código de

Melbourne aprobado en 2011 aceptó finalmente el uso de un único nombre para hongos pleomorfos priorizando el más antiguo (Norvell, 2011).

Braun y Urtiaga (2013) indicaron el nombre *Zasmidium citri-grisea* (F.E. Fisher) Crous como sinónimo preferente de *M. citri*. Por su parte, Braun *et al.* (2014) propusieron una nueva combinación denominada *Z. citri-griseum* (F.E. Fisher) U. Braun & Crous, comb. nov., curiosamente sin ni siquiera nombrar a *Z. citri-grisea* como sinónimo. Braun *et al.* (2014) formularon esta combinación considerando como nombre más antiguo a *C. citri-grisea* F.E. Fisher. Sin embargo, estos autores cuestionan que *C. citri-grisea* y *M. citri* sean realmente conespecíficas, ya que no se ha demostrado que exista una conexión genética entre ellas. En estudios previos, Aptroot *et al.* (2006) realizaron observaciones morfológicas del isotipo y el topotipo de *M. citri*. Estos autores indicaron que el isotipo era idéntico a *Davidiella ammophilae* (Durieu & Mont.) Aptroot y el topotipo pertenecía en realidad a la especie *M. punctiformis* (Pers.) Starbäck. Aunque el estudio de Aptroot *et al.* (2006) no incluye datos moleculares, actualmente se considera que el género *Davidiella* pertenece a la familia *Cladosporiaceae*, lo que no encaja con las evidencias genéticas que sitúan a *Z. citri-griseum* dentro de la familia *Mycosphaerellaceae*.

Esta situación plantea un serio problema a la hora de nombrar de forma correcta y unívoca al agente causal de la mancha grasienta. Considerando que en la presente tesis doctoral se ha utilizado material de referencia clasificado como *Z. citri-griseum*, se ha optado por adoptar este nombre para el agente causal de la mancha grasienta en Panamá y Ghana. No obstante, como se indicará más adelante, se mantienen serias dudas sobre la perspectiva fitopatológica de todos estos trabajos taxonómicos previos.

Los resultados del análisis filogenético indican que los aislados de Panamá y Ghana obtenidos de parcelas de cítricos corresponden a la especie *Z. citri-griseum*. Con las salvedades indicadas anteriormente, esta especie se considera como el agente causal de la mancha los cítricos en las regiones citrícolas del Caribe y Centro América (Whiteside, 1970; Hidalgo *et al.*, 1997; Aguilera-Cogley y Vicent, 2015). Como ya se ha comentado, esta especie solo había sido citada causando daños en cítricos, principalmente en pomelos, naranjas, mandarinas y limas (Timmer y Gottwald, 2000; Mondal y Timmer, 2006a). Recientemente, se ha citado también asociada a manchas necróticas en hojas de

otros hospedantes como *Musa*, *Acacia mangium* Willd (Crous *et al.*, 2004b) y *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh (Burgess *et al.*, 2007). Estos autores confirmaron la identificación a nivel de especie mediante secuencias de ADN llegando a la conclusión de que este importante patógeno en cítricos tiene otros hospedantes alternativos. Por su parte, Crous *et al.* (2004b) llegan incluso a sugerir que la presencia de *Z. citri-griseum* en hospedantes distintos a los cítricos, como la *Acacia* y *Musa*, se deba probablemente a que todas estas especies vegetales son nativas del Sudeste Asiático y están ampliamente cultivadas como especies exóticas en otras zonas del mundo.

En nuestro estudio, las secuencias de los aislados de *Z. citri-griseum* de Panamá y Ghana resultaron muy similares a la del aislado de referencia de *Z. citri-griseum* CBS 122455 obtenido de *Citrus* sp. y las secuencias de aislados obtenidos de otros hospedantes distintos a los cítricos como *Musa* sp. (CBS116426 y CBS 122456), *A. mangium* (CBS 116366), *E. camaldulensis* (CMW 22518). Sin embargo, para determinar si los aislados de *Z. citri-griseum* de cítricos de Panamá pueden inducir síntomas sobre estos otros hospedantes sería necesario realizar pruebas de patogenicidad sobre ellos. En cualquier caso, la consideración de estas especies vegetales como hospedantes de *Z. citri-griseum* no está clara. El número de aislados obtenidos en estos estudios previos es muy bajo y las prospecciones son poco representativas. Por otro lado, no hay descripciones claras de los síntomas asociados a *Z. citri-griseum* en estas especies vegetales. En algunos casos, se ha detectado *Z. citri-griseum* en lesiones necróticas en hojas de *Acacia* conjuntamente con otras especies como *M. thailandica* Crous, Himaman & M.J. Wingf y *C. acaciae-mangii* Crous, Pongpanich & M.J. Wingf. (Crous *et al.*, 2004b), por lo que no queda claro cuál de ellas sería realmente el agente causal de la enfermedad. En ninguno de estos estudios previos se realizaron pruebas de patogenicidad ni reisolamientos para confirmar los postulados de Koch-Pasteur. Este aspecto es fundamental para diferenciar entre los hongos saprofitos o endófitos que utilizan la planta como sustrato, de aquellos realmente patógenos que infectan y causan enfermedad en la planta hospedante.

La detección de *Z. citri-griseum* en Ghana supone la primera cita de este patógeno en África Occidental. Previo a este estudio, en el continente africano solo se había citado a *Z. citri-griseum* afectando a naranja en Egipto (Haggag,

2012). En este estudio se presentan datos morfológicos del hongo y ensayos de patogenicidad, pero no se incluyen datos moleculares que confirmen su identidad. Sería de gran interés analizar estos aislados de Egipto conjuntamente con los de otras zonas citricolas del Mediterráneo como España, Italia y Marruecos para esclarecer su posición taxonómica.

En nuestro estudio los aislados procedentes de España y Marruecos se identificaron como *A. africana*, con una alta similitud genética con los aislados de referencia de esta especie: CBS 680.95 (ant. *M. africana*), CBS 110500 (ant. *M. aurantia*) y CBS 110843 (ant. *M. ellipsoidea*). La especie *A. africana* ha sido descrita asociada a manchas necróticas en hojas y defoliación en plantaciones de *Eucalyptus* spp. (Crous, 1998; Carnegie, 2000; Park *et al.*, 2000; Maxwell *et al.*, 2003; Hunter *et al.*, 2011), pero su patogenicidad no ha sido demostrada debido a que ninguno de los trabajos citados incluyen ensayos de patogenicidad ni reaislamientos para confirmar los postulados de Koch-Pasteur. Fueron Crous y Wingfield (1996) quienes identificaron por primera vez a *M. africana* asociada a manchas necróticas en hojas de árboles de *E. deanei* Maiden, *E. globulus* Labill, *E. grandis* W. Hill ex Maiden, *E. radiata* Sieber ex DC y *E. viminalis* Labill. en Sudáfrica. Por otra parte, Crous y Wingfield (1996) describieron también a *M. ellipsoidea* como especie asociada a manchas necróticas en hojas de *E. cladocalyx* F. Muell. En Australia, Maxwell *et al.* (2003) describieron por primera vez a *M. aurantia* asociada al mismo síndrome en plantaciones de *E. globulus*. En España, se ha citado la presencia de *M. aurantia* asociada a manchas necróticas en hojas de plantaciones de *E. globulus* en Galicia (Otero *et al.*, 2006). Posteriormente, se citó también a *M. ellipsoidea* afectando a la misma especie de eucalipto en el País Vasco (De Blas *et al.*, 2009). Más recientemente se ha descrito la especie *M. africana* asociada a la misma sintomatología en plantaciones de *E. globulus* en Galicia (Aguín *et al.*, 2013). Los estudios filogenéticos con secuencias de varios genes realizados por Quaedvlieg *et al.* (2014) agruparon las tres especies mencionadas anteriormente, *M. africana*, *M. ellipsoidea* y *M. aurantia*, dentro de una única especie denominada *A. africana*. Nuestro estudio sería la primera cita de *A. africana* en una especie vegetal distinta a los eucaliptos.

En el estudio morfológico se encontró una gran variabilidad entre los aislados de las dos especies identificadas, *Z. citri-griseum* y *A. africana*. Las

colonias mostraron diferentes coloraciones en el anverso y reverso en los medios de cultivo evaluados. Los aislados de *Z. citri-griseum* incluidos en nuestro estudio mostraron similitud en la coloración en los diferentes medios de cultivo con el aislado de referencia de *Z. citri-griseum* CBS 122455. Sin embargo, con los aislados de *A. africana* no fue posible establecer una concordancia clara de las coloraciones con los aislados de referencia utilizados. La presencia de pigmento se observó solo en el medio de cultivo PDA y únicamente en algunos aislados de *Z. citri-griseum* de color amarillo y de color rojo en otros de *A. africana*. De los aislados de referencia de *A. africana* estudiados solo el CBS 110500 (ant. *M. aurantia*) produjo pigmento rojo en medio de cultivo PDA, coincidiendo con el pigmento observado en algunos de los aislados de *A. africana* de este estudio. Crous y Wingfield (1996) citan que *A. africana* CBS 680.95 (ant. *M. africana*) produce pigmento difuso color chocolate en medio de cultivo MEA. De igual manera, Maxwell *et al.* (2003) citan que *A. africana* CBS 110500 (ant. *M. aurantia*) también produce pigmento color naranja marrón en MEA. En nuestro caso, ninguno de los aislados de esta especie evaluados, incluidos los tres de referencia arriba incluidos, desarrollaron dicho pigmento en este medio de cultivo.

En relación a la forma, dimensiones y color de las ascosporas, los aislados de *Z. citri-griseum* de Panamá coincidieron con las descritas para esta especie (Whiteside, 1970), encontrándose ligeras diferencias de longitud. En el caso de *A. africana* las ascosporas mostraron similitud en la forma de las mismas y se situaron dentro del rango descrito para esta especie (Crous y Wingfield, 1996; Maxwell *et al.*, 2003) (Tabla 4.4). Al comparar las ascosporas de *Z. citri-griseum* de Panamá con respecto a las de *A. africana* de España no se observaron diferencias en cuanto a la forma, color y presencia de un único tabique central. En relación a las medidas de largo y ancho de las ascosporas tampoco se encontraron diferencias notables entre ambas especies.

En el presente estudio los datos de crecimiento micelial se analizaron mediante la función de respuesta a la temperatura de Magarey *et al.* (2005), previamente desarrollada por Yin *et al.* (1995). Se determinaron las curvas de crecimiento y las temperaturas óptimas, máximas y mínima para las especies *Z. citri-griseum* y *A. africana*, considerando un total de 42 aislados. Una de las ventajas de esta función es que produce curvas suaves y realistas tomando en

cuenta únicamente tres parámetros ( $T_{\min}$ ,  $T_{\text{opt}}$  y  $T_{\max}$ ) con una interpretación biológica clara. Otro aspecto interesante es que combina diferentes tipos de respuesta: exponencial a bajas temperaturas, lineal positiva a temperaturas intermedias, en forma de parábola a temperaturas óptimas y negativa a altas temperaturas (Yan y Hunt, 1999).

En el estudio de temperaturas se encontraron diferencias notables entre las dos especies identificadas. El primer grupo formado por los aislados de *Z. citri-griseum* de Panamá, Ghana y el aislado de referencia CBS 122455 que presentaron una temperatura óptima de crecimiento de 27,88 °C. Estos resultados coinciden con los descritos por Mondal y Timmer (2002) para la formación y desarrollo de pseudotecios de *Z. citri-griseum* con una temperatura óptima de 28 °C. Los aislados de *A. africana* de España y Marruecos y los tres de referencia presentaron una temperatura óptima de crecimiento significativamente menor de 21,9 °C. En este sentido, Crous y Wingfield (1996) indicaron que la temperatura óptima de crecimiento de *A. africana* se situaba entre los 20-25 °C, lo que coincide con los resultados obtenidos en nuestro trabajo. El estudio de respuesta a la temperatura demuestra que la especie *Z. citri-griseum* es más termófila que *A. africana*. De hecho, *A. africana* fue capaz de crecer a 5 °C pero no a 35 °C, justo al contrario que *Z. citri-griseum*.

La diferente respuesta de *Z. citri-griseum* y *A. africana* a la temperatura podría tener relación también con la biogeografía de ambas especies. Las regiones de Panamá y Ghana donde se ha detectado *Z. citri-griseum* se consideran de clima tropical según la clasificación de Köppen-Geiger. En países de Centro América como Costa Rica y Belice, donde *Z. citri-griseum* ha sido descrito causando daños en cítricos, las condiciones climáticas son también tropicales. La característica diferencial de este tipo de climas es que la temperatura media mensual es de al menos 18°C. En cambio, los climas semi-áridos Mediterráneos, donde se ha detectado *A. africana* en España y Marruecos, se caracterizan por presentar inviernos fríos, con temperaturas medias muy por debajo de los 18 °C. Florida, donde la macha grasienta causada por *Z. citri-griseum* ha sido ampliamente estudiada, se ubica en una zona de clima subtropical húmedo (Cfa) caracterizada por veranos muy calurosos y con precipitaciones constantes a lo largo del año. Estos patrones climáticos sugieren

que *Z. citri-griseum* sería una especie adaptada a las zonas citrícolas cálidas mientras que *A. africana* se desarrolla mejor en climas templados.

En los ensayos de patogenicidad realizados con suspensiones de micelio se demostró que los aislados de *Z. citri-griseum* procedentes de Panamá eran capaces de inducir síntomas típicos de mancha grasienta en plántones de naranja ‘Valencia’. En las plantas inoculadas se observó clorosis en el haz de las hojas y pústulas de color oscuro en el envés, síntomas idénticos a los descritos para esta enfermedad (Timmer y Gottwald, 2000). Estos resultados coinciden con estudios previos donde se realizaron también inoculaciones con suspensiones de micelio lográndose reproducir síntomas de mancha grasienta (Whiteside, 1970; 1972; 1973a; 1974). En nuestro caso, los valores de severidad más frecuentes fueron los de la categoría 1 (1-10 pústulas), observándose daños foliares de esta categoría en un 100% de los plántones. Whiteside (1974), inoculando suspensiones de micelio, obtuvo también valores de severidad relativamente bajos del 16-44% del área foliar afectada en plantas de limón rugoso. Por su parte, Mondal y Timmer (2006b) inocularon plántones de esta misma especie con suspensiones de  $10^4$  ascosporas  $\text{mL}^{-1}$ , obteniendo valores de severidad de 2,78-3,30 en una escala de 0-5, siendo el valor 5 aproximadamente un 20% del área foliar afectada. En el presente estudio no se realizaron inoculaciones con ascosporas debido a imposibilidad de obtener pseudotecios en medio de cultivo artificial. Todos los aislados evaluados se sembraron en PDA, OA, SNA y MEA, sin que se observara ningún tipo de esporulación. Por otro lado, obtener volúmenes y concentraciones altas de ascosporas a partir de hojas secas caídas al suelo resulta difícil debido a la ingente cantidad de hojarasca necesaria. Por otra parte, con este sistema basado en la hojarasca tampoco habría certeza de que las ascosporas extraídas correspondan con el aislado concreto a estudiar.

En los ensayos de patogenicidad realizados con aislados de *A. africana* procedentes de plantaciones de cítricos de España, ninguno fue capaz de reproducir síntomas sobre plántones de ‘Ortanique’. En estudios preliminares Vicent *et al.* (2006) realizaron inoculaciones con suspensiones de micelio sobre plántones de diferentes cultivares de mandarina y pomelo logrando reproducir síntomas, pero sin completar el reaislamiento necesario para confirmar los postulados de Koch-Pasteur. Además de la escasa actividad parasitaria de *A. africana*, un aspecto que podría haber afectado negativamente a estos ensayos de

patogenicidad fue que las condiciones del umbráculo de malla no reprodujeron las situaciones de estrés que seguramente predisponen a los árboles para desarrollar la enfermedad en nuestras condiciones.

En la cuenca del Mediterráneo se han observado síntomas de mancha grasienta en varias especies de cítricos, aunque los daños de la enfermedad son poco importantes si los comparamos con los descritos en las regiones húmedas de clima tropical. Uno de los aspectos que favorecen las infecciones de *Z. citri-griseum* en estas zonas es la formación de micelio epifítico, que crece superficialmente sobre las hojas y facilita la infección del patógeno a través de los estomas de las hojas (Timmer y Gottwald, 2000). Este micelio epifítico se desarrolla en condiciones de alta humedad y elevada temperatura, donde claramente compete mejor una especie termófila como *Z. citri-griseum*. Aunque no se ha comprobado experimentalmente, es probable que los aislados de *A. africana* no desarrollen este micelio epifítico en cítricos debido a las condiciones climáticas semi-áridas, donde la pluviometría es muy baja.

Hasta la fecha, la especie *A. africana* solo se había citado en *Eucalyptus*. En prospecciones realizadas durante los años 1999 a 2002 en plantaciones de diferentes cultivares de *E. globulus* en Australia, se observaron incidencias de necrosis foliares de hasta un 100% (Barber *et al.*, 2008). Por su parte, Agúin *et al.* (2013) realizaron prospecciones en Galicia durante los años 2005 y 2007, determinando que un 93% de las plantaciones de eucalipto presentaban síntomas de manchas necróticas en hojas. No obstante, ninguno de estos estudios aporta evidencias que demuestren la patogenicidad de *A. africana* sobre estas especies vegetales y podría tratarse por lo tanto de un saprófito o endófito que utiliza al eucalipto como sustrato.

En nuestro estudio, no fue posible realizar inoculaciones con los aislados de *Z. citri-griseum* de Ghana y *A. africana* de Marruecos debido a las restricciones bioseguridad. No obstante, en una situación ideal, lo recomendable sería un estudio de patogenicidad conjunto con aislados procedentes de todos estos países. En conclusión, basándonos en los resultados obtenidos, se ha identificado la especie *A. africana* asociada a la mancha grasienta de los cítricos en España y Marruecos y *Z. citri-griseum* como agente causal de la mancha grasienta en Panamá, estando asociada también a la enfermedad en Ghana.



## Capítulo 5

---



# Capítulo 5

## EPIDEMIOLOGÍA Y CONTROL DE LA MANCHA GRASIENTA DE LOS CÍTRICOS EN PANAMÁ

### 5.1. ANTECEDENTES

La mancha grasienta de los cítricos, causada por *Z. citri-griseum*, es una enfermedad que se caracteriza por inducir la defoliación prematura y una reducción en el rendimiento en diferentes especies de cítricos. La gran mayoría de los estudios epidemiológicos de esta enfermedad se han realizado en EE.UU., en áreas cítricas de Florida y Texas donde la enfermedad ha sido históricamente un problema (Whiteside, 1970; Timmer *et al.*, 1980; Timmer *et al.*, 1995; Timmer *et al.*, 2000). Por otro lado, en Centro América y el Caribe la enfermedad ha sido reportada afectando plantaciones de diferentes especies de cítricos, aunque únicamente en Costa Rica se han realizado estudios para determinar su epidemiología bajo condiciones climáticas tropicales (Hidalgo *et al.*, 1997).

El ciclo de la enfermedad de la mancha grasienta se inicia con la formación de pseudotecios en la hojarasca infectada en descomposición debajo de los árboles (Timmer y Gottwald, 2000). Los pseudotecios contienen numerosas ascas que expulsan al aire las ascosporas cuando se mojan las hojas (Timmer, 1999). Las ascosporas se depositan en el envés de las hojas, donde luego germinan y desarrollan un micelio epifítico. La infección se da a través de los estomas y el desarrollo del hongo en el mesófilo de la hoja es lento y generalmente necesita de tres a seis meses para producir síntomas (Timmer, 2002). Finalmente, las hojas infectadas caen al suelo y producen más ascosporas completando el ciclo.

Las ascosporas están consideradas la principal fuente de inóculo de *Z. citri-griseum*, mientras que las conidias asexuales están consideradas de poca importancia en la epidemiología de la enfermedad. En Florida, donde este patógeno ha sido estudiado ampliamente, la dinámica de liberación de ascosporas ha variado con el paso de los años. Whiteside (1974) reportó que la mayor concentración de ascosporas en el aire ocurría a partir del mes de junio. Posteriormente, con el aumento de la frecuencia del riego con microaspersores, este patrón de liberación de ascosporas se adelantó a los meses de abril y mayo (Timmer *et al.*, 2000). Las infecciones dependen principalmente de la velocidad con que se desarrolla el micelio epifítico del hongo, que está influido por las condiciones de temperatura y lluvia (Timmer *et al.*, 2004).

Por otro lado, el control de la mancha grasienta de los cítricos se basa en la aplicación de fungicidas químicos dirigidos a disminuir la severidad de la enfermedad en hojas y la posterior defoliación. En Florida se han citado reducciones de cosecha de hasta un 45% en pomelo y 25% en naranja (Timmer y Gottwald, 2000). Los aceites minerales, junto con benomilo y los fungicidas cúpricos se han utilizado ampliamente en el control de la mancha grasienta. No obstante, en algunos casos los cobres pueden resultar fitotóxicos y causar daños en la corteza de los frutos (Timmer, 2002).

Se han realizado también algunos experimentos de control dirigidos a reducir el inóculo en la hojarasca. Whiteside (1973b) evaluó la aplicación de varios fungicidas sobre la hojarasca en descomposición en parcelas de pomelo, siendo benomilo el único capaz de reducir la producción de ascosporas. Por su parte, Mondal y Timmer (2003a) realizaron tratamientos con urea, carbonato de calcio y dolomita sobre la hojarasca, que limitaron el desarrollo de los pseudotecios de *Z. citri-griseum* reduciendo así la cantidad de inóculo disponible en la parcela. Sin embargo, a pesar de su potencial para reducir el inóculo en las parcelas, estas medidas no parecen proporcionar un control suficientemente eficaz y son poco utilizadas en la práctica, por lo que las aplicaciones foliares de fungicidas siguen siendo necesarias.

Actualmente, en Panamá no se dispone de información sobre la epidemiología y el control de la mancha grasienta de los cítricos. Por tal motivo, es necesario realizar experimentos para estudiar la dinámica de la defoliación, determinar los momentos de disponibilidad de inóculo y los períodos de

infección de *Z. citri griseum* bajo las condiciones de Panamá, así como también evaluar la eficacia de las estrategias de aplicaciones fungicidas.

## **5.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.2.1. Epidemiología de la mancha grasienta**

#### **5.2.1.1. Parcela experimental**

El estudio se llevó a cabo en una parcela comercial de naranja ‘Valencia’ fuertemente afectada por la mancha grasienta, con una superficie de cinco hectáreas situada en la localidad de Churuquita, provincia de Coclé, Panamá (Fig. 4.3). La parcela se plantó en 1998 sobre citrumelo Swingle, con un marco de plantación de 3 x 7 m. Dentro de la parcela se seleccionó un área experimental de 80 árboles donde no se había realizado previamente ningún tratamiento fungicida. Como área experimental efectiva de trabajo se seleccionaron los 24 árboles centrales, donde se realizó el seguimiento epidemiológico de la enfermedad.

Las variables meteorológicas en la parcela experimental se registraron cada hora con una estación meteorológica automática (Watch Dog Series 1.000 Plant Disease Station, Spectrum Technologies, EE.UU.) con sensores de temperatura del aire (precisión  $\pm 0,6^{\circ}\text{C}$ ), humedad relativa (precisión  $\pm 3,0\%$ ), lluvia (resolución 0,2 mm) y un sensor humectación con un rango de 0 (seco) – 15 (mojado). El sensor de humectación se colocó a una altura de 1,5 m del suelo, orientado al norte y con un ángulo de inclinación de  $30^{\circ}$  sobre la horizontal.

#### **5.2.1.2. Dinámica de la defoliación**

Desde marzo de 2012 hasta abril de 2013 se siguió la dinámica de defoliación de los árboles de naranja en el área experimental de la parcela en estudio. Los árboles se cubrieron con una malla plástica de 10 x 10 m, con aberturas de 1 x 1 cm y fijada al suelo por pasadores de acero inoxidable de 15 cm de largo. En total se cubrieron con malla seis grupos de dos árboles cada uno

(Fig. 5.1). Previamente a la colocación de las redes se eliminó toda la hojarasca presente en el suelo en cada grupo de árboles. Se estableció una frecuencia mensual para la retirada de las hojas caídas al suelo que luego se pesaron de forma individual para cada grupo de árboles, estimando así la cantidad mensual de hojas (g) defoliadas por árbol. Posteriormente, las hojas recogidas cada mes se colocaron en la superficie del suelo bajo una malla en un área anexa a la parcela experimental, para ser utilizadas en el experimento de seguimiento de la producción de inóculo a partir de la hojarasca (apdo. 5.2.1.3).



**Figura 5.1:** Grupos de dos árboles de naranja ‘Valencia’ cubiertos con mallas plásticas donde se realizó el seguimiento de la dinámica de la defoliación en Churuquita, Panamá.

### 5.2.1.3. Dinámica de la producción de inóculo en la hojarasca

Desde marzo de 2011 hasta marzo de 2013 se siguió la producción de las ascosporas de *Z. citri-griseum* a partir de las hojas caídas al suelo en el área experimental de la parcela en estudio. Durante el primer año la producción de inóculo se estudió mediante la recolección mensual de todas las hojas caídas al suelo en el área experimental comprendida por 24 árboles. En el segundo año de estudio la metodología se modificó realizando la recogida de las hojas

únicamente en un área experimental de 12 árboles, los mismos que se cubrieron con mallas plásticas (apdo. 5.2.1.2). Las hojas del suelo recogidas mensualmente se agruparon y se colocaron bajo una malla de plástico de 2 x 2 m, con aberturas de 2 x 2 cm y fijadas al suelo por seis pasadores de acero inoxidable de 15 cm de largo (Fig. 5.2).



**Figura 5.2:** Malla plástica con hojas secas caídas al suelo recolectadas mensualmente para medir la producción de inóculo en la hojarasca.

De las mallas plásticas con hojas del suelo colectadas mensualmente (Fig. 5.2) se recogieron muestras de 25 g de hojas con una frecuencia quincenal y se llevaron al laboratorio de Protección Vegetal del IDIAP en el Centro de Investigaciones Agropecuarias Central ubicado en Divisa, provincia de Herrera. Una vez en el laboratorio, se determinó el grado de descomposición de las hojas siguiendo la metodología descrita por Mondal y Timmer (2002). Esta técnica consiste en seleccionar 10 hojas al azar de cada muestra y determinar su grado de descomposición mediante una escala de 0 a 3 donde 0 = no descompuesta, todavía firme; 1 = parcialmente descompuesta, flexible todavía intacta; 2 = moderadamente descompuesta, pérdida de algunas laminas y 3 = altamente descompuesta, hoja esqueletizada (Fig. 5.3). Seguidamente, se calculó un índice promedio de descomposición de las hojas (IPD) en porcentaje, mediante la siguiente formula:

$$IPD = \frac{\sum n_i g_i}{N * G} * 100$$

donde  $n_i$ = número de unidades en la categoría  $i$ ,  $g_i$ = grado de la categoría  $i$ ,  $N$ = número total de las unidades evaluadas y  $G$ = grado máximo de la escala. Con los datos resultantes se estimó el número de días hasta la descomposición total de las hojas (DDH) cuando la muestra alcanzó el valor 100%.



**Figura 5.3:** Escala de descomposición de la hojarasca en categorías **A)** 0 = no descompuesta, todavía firme; **B)** 1 = parcialmente descompuesta, flexible todavía intacta; **C)** 2 = moderadamente descompuesta, pérdida de algunas laminas; **D)** 3 = altamente descompuesta, hoja esqueletizada.

Para cuantificar el número de ascosporas presentes en cada muestra de hojas (25 g), éstas se sumergieron durante 15 min en agua destilada estéril e inmediatamente después de la inmersión se colocaron dentro de un túnel de viento (Fig. 5.4 A) con el envés expuesto hacia arriba durante 30 min hasta que aparecían visiblemente secas (Whiteside, 1973b; Vicent *et al.*, 2011). La temperatura del aire y el agua se mantuvo a  $\sim 23$  °C durante todo el proceso. Las ascosporas liberadas de la hojarasca se recogieron en un portaobjetos de vidrio (26 × 76 mm) recubierto con aceite de silicona (Merck GmbH, Alemania) (Fig. 5.4 B). Los portaobjetos se tiñeron con azul de lactofenol y se fijaron con un cubreobjetos de 22 x 22 mm. Finalmente se cuantificó el número de ascosporas de *Zasmidium* basándose en el protocolo de la Red Española de Aerobiología (Soldevilla *et al.*, 2007) que consiste en realizar cuatro barridos longitudinales con un microscopio óptico a 400X. Solo se cuantificaron las ascosporas que mostraban la morfología característica de *Z. citri-griseum* (apdo. 3.3.2). Con estos valores se obtuvo la variable número acumulado de ascosporas liberadas en las muestras mensuales de hojas de cada malla hasta la descomposición total de las hojas (ASCH).



**Figura 5.4:** **A)** Túnel de viento utilizado para la extracción de ascosporas de *Zasmidium citri-griseum* de la hojarasca; **B)** portaobjeto recubierto con silicona para la captura de ascosporas.

A partir de los datos registrados por la estación meteorológica se calcularon para cada período mensual de recolección de hojas las siguientes variables meteorológicas: PPA: precipitación pluvial acumulada (mm), DPP: días con precipitación pluvial  $>1$  mm ( $n^\circ$ ), TP: temperatura promedio ( $^\circ\text{C}$ ) y HRP: humedad relativa promedio (%).

Todos los análisis de los datos de los experimentos del presente Capítulo se realizaron con el software R v 2.15.1 (R Development Core Team, 2013). Inicialmente se aplicó un análisis descriptivo numérico y gráfico sobre las variables respuesta y explicativas. Posteriormente, se estudió la posible correlación lineal entre las variables mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Por último, los datos se analizaron mediante modelos lineales generalizados (GLM) para determinar las posibles relaciones entre las variables respuesta (DDH y ASCH) y las variables meteorológicas (PPA, DPP, TP y HRP).

En el modelo para la variable respuesta DDH, al tratarse de una variable de tipo conteo, se ajustó con una regresión de Poisson. Además, se incluyeron en el modelo como variables explicativas las variables meteorológicas y la variable ASCH.

El modelo inicial fue el siguiente:

$$DDH_i \sim Po(\mu_i)$$

$$\log(\mu_i) = \beta_0 + \beta_1DPP_i + \beta_2PPA_i + \beta_3TP_i + \beta_4HRP_i + \beta_5ASCH_i \quad i = 1 \dots 25$$

donde  $\beta_0$  y  $\beta_j$ ,  $j = 1 \dots 5$  son los parámetros de regresión. Como nexo de unión entre el predictor lineal y la respuesta media se utilizó el logaritmo.

De igual manera, al ser también de tipo conteo, la variable respuesta ASC se modelizó inicialmente con la regresión de Poisson, pero se encontraron graves problemas de sobredispersión. Por tal motivo, se decidió aplicar la distribución binomial negativa con la que se consiguió solucionar el problema de la sobredispersión aplicando el siguiente modelo:

$$ASC_i \sim BN(r_i, p_i)$$

$$\log(\mu_i) = \beta_0 + \beta_1DPP_i + \beta_2PPA_i + \beta_3TP_i + \beta_4HRP_i + \beta_5DDH_i \quad i = 1 \dots 25$$

donde:  $ASC_i$  el número de ascosporas liberadas hasta su total liberación en  $r_i$  ocasiones en el mes  $i$ .

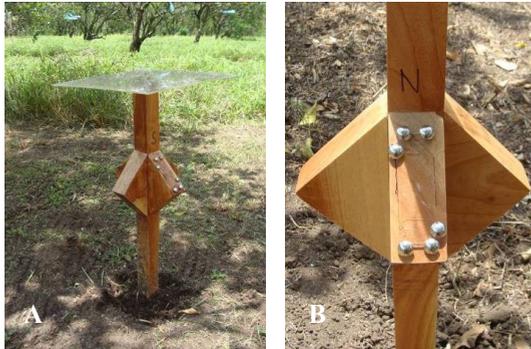
$\mu_i = \frac{r_i(1-p_i)}{p_i}$  ( $r_i$ : el número de éxitos donde todas las ascosporas están liberadas y  $p_i$  es la probabilidad de que no se liberen ascosporas). Los coeficientes  $\beta_0$  y  $\beta_j$ ,  $j = 1 \dots 5$  los parámetros de regresión. Como nexo de unión entre el predictor lineal y la respuesta media se utilizó el logaritmo.

La elección de los modelos se realizó mediante una búsqueda secuencial basada en el valor mas bajo del criterio de información de Akaike (AIC) (Akaike, 1974). También se observó si las variables incluidas en el modelo fueron significativas buscando el principio de máxima parsimonia. Adicionalmente, se confirmó la ausencia de sobredispersión en el modelo ajustado mediante el cálculo del parámetro de dispersión dividiendo el valor de la 'deviance' residual del modelo ajustado éntre los grados de libertad. Por último, se realizó un diagnóstico de los modelos de las variables respuesta (DDH y ASCH) mediante la representación gráfica de los residuos 'deviance'.

#### 5.2.1.4. Seguimiento del inóculo en el aire y períodos de infección

Desde marzo de 2011 hasta marzo de 2013 se siguió la dinámica de las ascosporas de *Z. citri-griseum* en el aire en la parcela experimental. Para ello se empleó un sistema de captura pasiva de ascosporas colocando dos portaobjetos de vidrio (26 x 76 mm) impregnados con aceite de silicona. Los portaobjetos se colocaron en el centro del área 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 con una orientación norte y sur a 0,25 m de la superficie del suelo y con una inclinación de 45° sobre la horizontal (Fig. 5.5 A y B) (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 40 x 22 mm. Se cuantificó el número de ascosporas de *Z. citri-griseum* en cada portaobjetos siguiendo la misma metodología descrita en el apdo. 5.2.1.3 (Soldevilla *et al.*, 2007). Finalmente, se calculó el número total de ascosporas capturadas por semana (ASC).

La presencia de infecciones en la parcela experimental se determinó semanalmente durante el mismo período durante el que se siguió el inóculo en el aire. Para ello se realizaron exposiciones de plantas trampa, que consistían en plantones de naranja 'Valencia' de dos años de edad injertados sobre citrumelo Swingle. La preparación de los plantones se realizó de la misma forma descrita en el apdo. 4.2.5. Los plantones se mantuvieron en un umbráculo de malla a ~27 °C. Las plantas se podaron por completo para forzar el crecimiento de nuevos brotes y se llevaron a campo al menos dos plantas con una altura aproximada de 1,50 m (Fig. 5.6). Las podas se realizaron de forma escalonada para disponer de plantas en todos los períodos de exposición semanal. Tras el período de exposición semanal, coincidente con el período de exposición de los portaobjetos, las plantas se trasladaron al umbráculo de malla (~27 °C) y transcurridos diez meses se evaluó en cada planta la incidencia (INC) de la mancha grasienta, definida como número de hojas con síntomas de mancha grasienta sobre un total de 100 evaluadas.



**Figura 5.5:** Sistema empleado para el seguimiento de la dinámica del inóculo: **A)** soporte de madera para colocación de los portaobjetos de vidrio; **B)** portaobjeto con una inclinación de 45° sobre la horizontal.



**Figura 5.6:** Planta trampa de naranja ‘Valencia’ de dos años de edad empleada en el seguimiento de los periodos de infección de *Zasmidium citri-griseum*.

A partir de los datos registrados por la estación meteorológica, se calcularon para cada período semanal las siguientes variables meteorológicas: PPA: precipitación pluvial acumulada por semana (mm), DPP: días con precipitación pluvial >1 mm por semana (n°), TP: temperatura promedio por semana (°C), HRP: humedad relativa promedio por semana (%), HH: humectación por semana (h), PH: periodos de humectación >1 h por semana (n°) y PPH: promedio de la duración de los periodos de humectación >1 h por semana (h).

Los valores de las variables respuesta (ASC e INC) y explicativas (PPA, DPP, TP, HRP, HH, PH y PPH) se analizaron inicialmente de forma descriptiva. Posteriormente, se estudió la posible correlación lineal entre las variables mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

Se estudiaron las relaciones de las variables respuesta ASC y INC con las variables explicativas mediante un GLM. Para cada una de estas variables respuesta se propusieron dos tipos de modelos. Un primer modelo que incluía únicamente variables meteorológicas y un segundo modelo al que se le añadió una componente temporal. Debido a la mayor complejidad de estos modelos respecto a los del apdo. 5.2.1.3, su ajuste se realizó mediante estadística bayesiana con el paquete R-INLA. A diferencia de la estadística frecuentista, la estadística bayesiana incorpora información previa mediante distribuciones de probabilidad que, junto con la función de verosimilitud de los datos, proporcionan la distribución a posteriori de los parámetros. En nuestro estudio, al no disponer de ningún tipo de información previa, se utilizaron las distribuciones previas no informativas que aplica por defecto el paquete R-INLA.

Para plantear estos modelos se siguieron los siguientes pasos: de todas las posibles combinaciones de modelos se seleccionaron los que presentaron inicialmente un menor valor del estadístico ‘Deviance Information Criterion’ (DIC) (Spiegelhalter *et al.*, 2002), similar al AIC pero para modelos bayesianos. El proceso de selección de modelos se realizó también en base al valor del estadístico ‘Conditional Predictive Ordinate’ (LCPO) (Roos y Held, 2011) que evalúa la capacidad predictiva del modelo. En concreto, se empleó el valor LCPO calculado como  $-\overline{\log(CPO)}$ . Se consideró el mejor modelo áquel que presentaba el valor LCPO más próximo a cero.

La variable respuesta ASC se modelizó mediante una regresión de Poisson, donde la transformación que une el predictor lineal con la variable respuesta es el logaritmo. En el primer modelo se consideraron como variables explicativas todas las variables meteorológicas descritas anteriormente y en el segundo modelo propuesto se añadió a las variables meteorológicas una componente temporal autorregresiva de orden 1 mediante la variable ‘semana’. Es decir, el número de ascosporas podía depender del número de ascosporas de la semana anterior.

Los modelos planteados fueron los siguientes:

Modelo 1: solo variables meteorológicas explicativas

$$ASC_i \sim Po(\mu_i) \quad i = 1 \dots 104$$

$$\log(\mu_i) = \mathbf{X}_i\beta$$

$$\beta_j \sim N(0, 0.001)$$

Modelo 2: variables meteorológicas explicativas + componente temporal

Función de verosimilitud de los datos:

$$ASC_i \sim Po(\mu_i) \quad i = 1 \dots 104$$

$$\log(\mu_i) = \mathbf{X}_i\beta + f_1(\text{Semana}_i)$$

donde

$$f_1(\text{Semana}_i) = \rho f_1(\text{Semana}_{i-1}) + \epsilon_i \quad i = 2 \dots 104$$

$$|\rho| < 1$$

Distribuciones a priori de los parámetros:

$$\beta_0 \sim N(0, 0.01) \quad \beta_j \sim N(0, 0.001) \quad j = 1 \dots 7$$

$$f_1(\text{Semana}_1) \sim N\left(0, (\tau(1 - \rho^2))^{-1}\right)$$

$$\epsilon_i \sim N(0, \tau^{-1})$$

Distribuciones a priori de los hiperparámetros que utiliza por defecto R-INLA:

$$\log(\tau(1 - \rho^2)) \sim \log\text{Gamma}(1, 5 * 10^{-5})$$

$$\log\left(\frac{1 + \rho}{1 - \rho}\right) \sim N(0, 0.15)$$

En cuanto a la variable respuesta INC se modelizó mediante una regresión logística utilizando el logit como ‘link’ entre el predictor lineal y la respuesta media. En un primer modelo se incluyeron como variables explicativas todas las variables meteorológicas descritas anteriormente y también la variable ASC. En un segundo modelo se incluyó también una componente temporal autorregresiva de orden 1, puesto que la incidencia de una semana podía depender de la incidencia de la semana anterior.

Los modelos planteados fueron los siguientes:

Modelo 1: solo variables explicativas

$$INC_i \sim Bin(100, \pi_i) \quad i = 1 \dots 104$$

$$\log\left(\frac{\pi_i}{1 - \pi_i}\right) = \mathbf{X}_i\beta$$

$$\beta_j \sim N(0, 0.001)$$

donde

$$\pi_i = \frac{\exp(\mathbf{X}_i\beta)}{1 + \exp(\mathbf{X}_i\beta)}$$

Modelo 2: variables explicativas + componente temporal

Función de verosimilitud de los datos:

$$INC_i \sim Bin(100, \pi_i) \quad i = 1 \dots 104$$

$$\log\left(\frac{\pi_i}{1 - \pi_i}\right) = \mathbf{X}_i\beta + f_1(\text{Semana}_i)$$

donde

$$f_1(\text{Semana}_i) = \rho f_1(\text{Semana}_{i-1}) + \epsilon_i \quad i = 2 \dots 104$$

$$|\rho| < 1$$

Distribuciones a priori de los parámetros:

$$\beta_0 \sim N(0, 0.01) \quad \beta_j \sim N(0, 0.001) \quad j = 1 \dots 7$$

$$f_1(\text{Semana}_1) \sim N\left(0, (\tau(1 - \rho^2))^{-1}\right)$$

$$\epsilon_i \sim N(0, \tau^{-1})$$

Distribuciones a priori de los hiperparámetros que aplica por defecto R-INLA:

$$\log(\tau(1 - \rho^2)) \sim \log\text{Gamma}(1, 5 * 10^{-5})$$

$$\log\left(\frac{1 + \rho}{1 - \rho}\right) \sim N(0, 0.15)$$

## 5.2.2. Ensayos de control de la mancha grasienta

### 5.2.2.1. Parcelas experimentales

Los experimentos de control se realizaron en las localidades de Tambo y Miraflores, ubicadas en la provincia de Coclé, Panamá (Fig. 4.3). En la localidad de Tambo, los experimentos se realizaron en la finca comercial Gabriela con árboles de pomelo ‘Star Ruby’ de seis años de edad y un marco de plantación de 5 x 10 m. En la localidad de Miraflores, los experimentos se llevaron a cabo en la finca comercial Bella Vista con árboles de naranja ‘Valencia’ de cinco años de edad y un marco de plantación de 3,5 x 7 m. En ambos casos los árboles estaban injertados sobre citrumelo Swingle. Estas parcelas se seleccionaron basándose en su historial de elevada incidencia de mancha grasienta.

En todos los experimentos se dispuso de un diseño completamente al azar, con parcelas elementales de 10 árboles y seis repeticiones con un árbol barrera entre las parcelas elementales. Se comparó una estrategia de aplicaciones foliares con el fungicida fenbuconazol respecto a un testigo sin tratar (Tabla 5.1). En la finca Gabriela las aplicaciones del fungicida se realizaron mediante un pulverizador hidroneumático (Arbus 2000 Super Export, Jacto) hasta alcanzar el punto de goteo (~7 L árbol<sup>-1</sup>). En la finca Bella Vista las aplicaciones del fungicida se realizaron mediante un atomizador (SR 430, Still) hasta alcanzar el punto de goteo (~3 L árbol<sup>-1</sup>).

En el 2011 se realizaron tres aplicaciones del fungicida en los dos experimentos separadas entre sí unos 21 días (Tabla 5.2). En 2012 solo se realizó una aplicación fungicida en cada experimento (Tabla 5.2), basándose en los resultados del seguimiento epidemiológico de ascosporas (Fig. 5.20), que mostraba una mayor cantidad de inóculo disponible del hongo en mayo. En 2013, siguiendo el criterio del año anterior, solo se realizó una aplicación fungicida en el experimento en la finca Gabriela y el experimento de la finca Bella Vista no se continuó. Los tratamientos coincidieron con los brotes entre el 20% (BBCH 32) y 90% (BBCH 39) de su tamaño final (Sánchez-Valladares, 2005).

**Tabla 5.1:** Tratamiento fungicida evaluado para el control de la mancha grasienta en Panamá.

Tratamiento	Producto Comercial	Materia activa	Formulado	Riqueza	Dosis (g m.a. L <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>
Fungicida	Indar	Fenbuconazol	OF <sup>a</sup>	25%	0,12
Testigo	---	---	---	---	---

<sup>a</sup> OF, suspensión en aceite.<sup>b</sup> Dosis de materia activa (m.a.) empleada en los experimentos utilizando un volumen de caldo aproximado entre 1.200 – 1.400 L ha<sup>-1</sup>

### 5.2.2.2. Severidad de la enfermedad

Previo a las aplicaciones del fungicida, en el mes de mayo de cada año de estudio se seleccionaron al azar 10 brotes nuevos que se marcaron con una cinta de color rojo (10 cm de largo) en cada uno de los árboles de los experimentos. La evaluación de la severidad de la enfermedad se realizó en cada uno de los brotes marcados previamente empleando la escala de severidad (0-3) descrita en el apdo. 4.2.5.

**Tabla 5.2:** Fechas de las aplicaciones fungicidas en los experimentos de control de la mancha grasienta en Panamá.

Experimentos	Especie	Aplicaciones fungicidas				
Gabriela	Pomelo	20/05/11	7/06/11	30/06/11	18/05/12	21/05/13
Bella Vista	Naranja	9/06/11	1/07/11	21/07/11	16/05/12	---

A los datos de severidad obtenidos en cada uno de los dos experimentos durante los diferentes años de estudio se les aplicó en primera instancia un análisis descriptivo numérico y gráfico mediante diagramas de cajas.

Como la variable repuesta severidad es de tipo ordinal, para el análisis estadístico inferencial de los datos se aplicó un modelo de regresión logística

ordinal (ORL) del tipo ‘Proportional Odds’, también llamados ‘Cumulative Odds’, que se basan en las probabilidades acumuladas (Guisan y Harrell, 2000):

$$\text{logit}(P(Y \leq j)) = \log\left(\frac{P(Y \leq j)}{1 - P(Y \leq j)}\right) = \beta_{0j} - \eta_1 X_1$$

donde  $-\eta_1 = \beta_1$  en el modelo de regresión ordinal.

### 5.2.2.3. Rendimiento de la cosecha

Los datos de cosecha se obtuvieron pesando todos los frutos de cada uno de los árboles (kg árbol<sup>-1</sup>) de los experimentos en el momento de la recolección comercial. A los datos de cosecha se les aplicó un análisis descriptivo numérico y gráfico mediante diagramas de cajas. Posteriormente, los datos de cosecha se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor. Previo al análisis ANOVA se comprobaron los supuestos de normalidad mediante el test de Shapiro-Wilk, homogeneidad de varianza mediante el test de Bartlett e independencia. Una vez ajustado el modelo ANOVA, se realizó un diagnóstico aplicando el test de normalidad de los residuos estudentizados, el test de Breusch-Pagan para determinar la homocedasticidad de la varianza así como la independencia de los residuos.

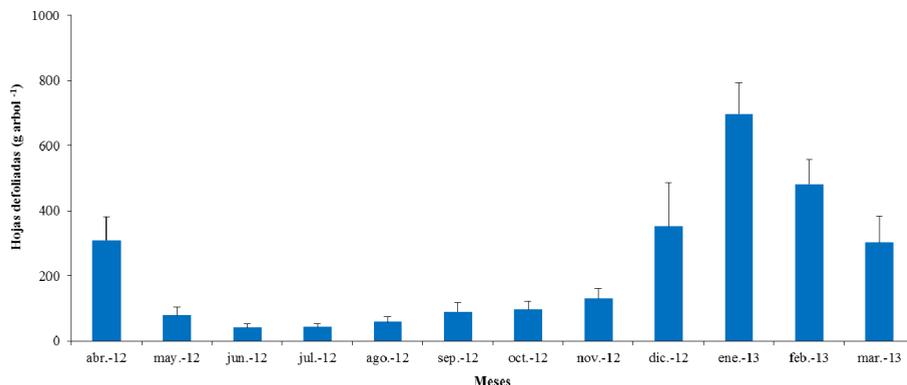
## 5.3. RESULTADOS

### 5.3.1. Seguimiento epidemiológico de la mancha grasienta

#### 5.3.1.1. Dinámica de la defoliación

En el experimento de seguimiento de la dinámica de defoliación de los árboles afectados por la mancha grasienta se observaron dos períodos con diferentes intensidades de defoliación. Un período caracterizado por la poca pérdida de hojas comprendido entre los meses de mayo a noviembre, siendo los meses de junio y julio donde se registró una menor pérdida de hojas con valores de 41,6 y 44,2 g árbol<sup>-1</sup> (Fig. 5.7). Por otro lado, el período de diciembre a abril se caracterizó por una mayor pérdida de hojas defoliadas por árbol, siendo los

meses de enero y febrero los de mayor pérdida de hojas con valores de 697,5 y 481,8 g árbol<sup>-1</sup> (Fig. 5.6).

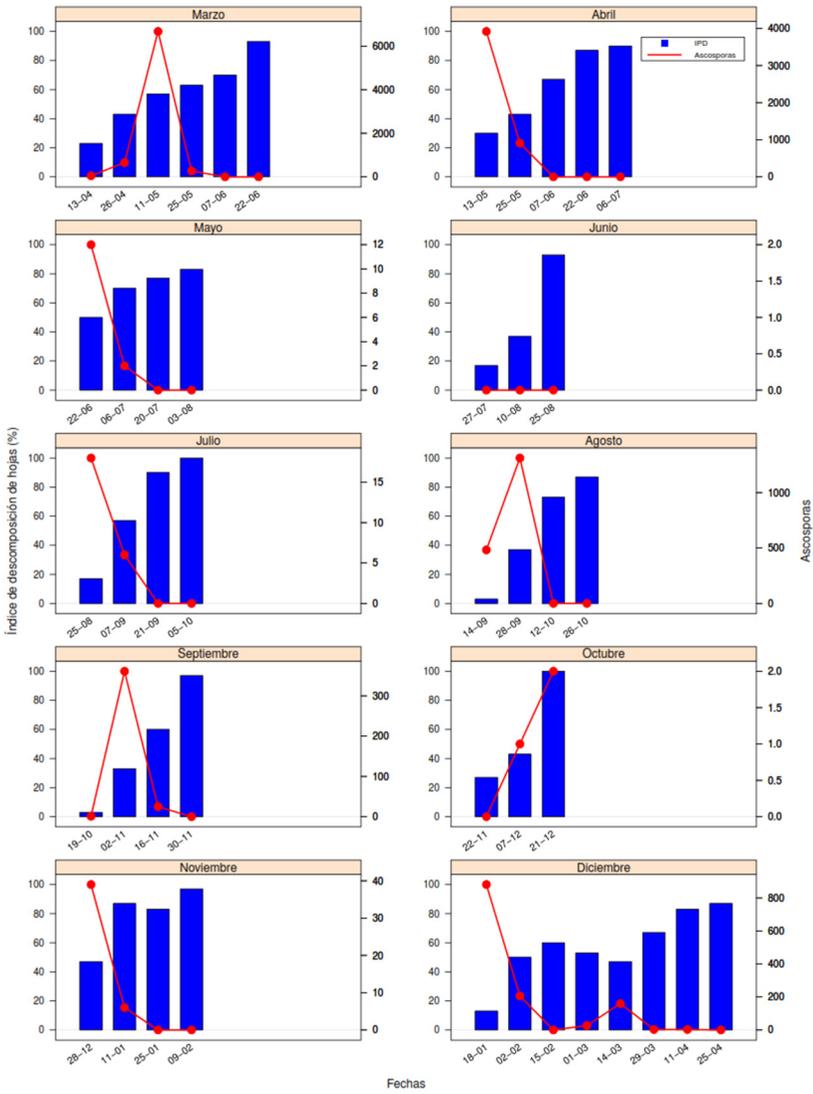


**Figura 5.7:** Dinámica de la defoliación en árboles de naranja ‘Valencia’ afectados por mancha grasienta desde abril de 2012 a marzo de 2013.

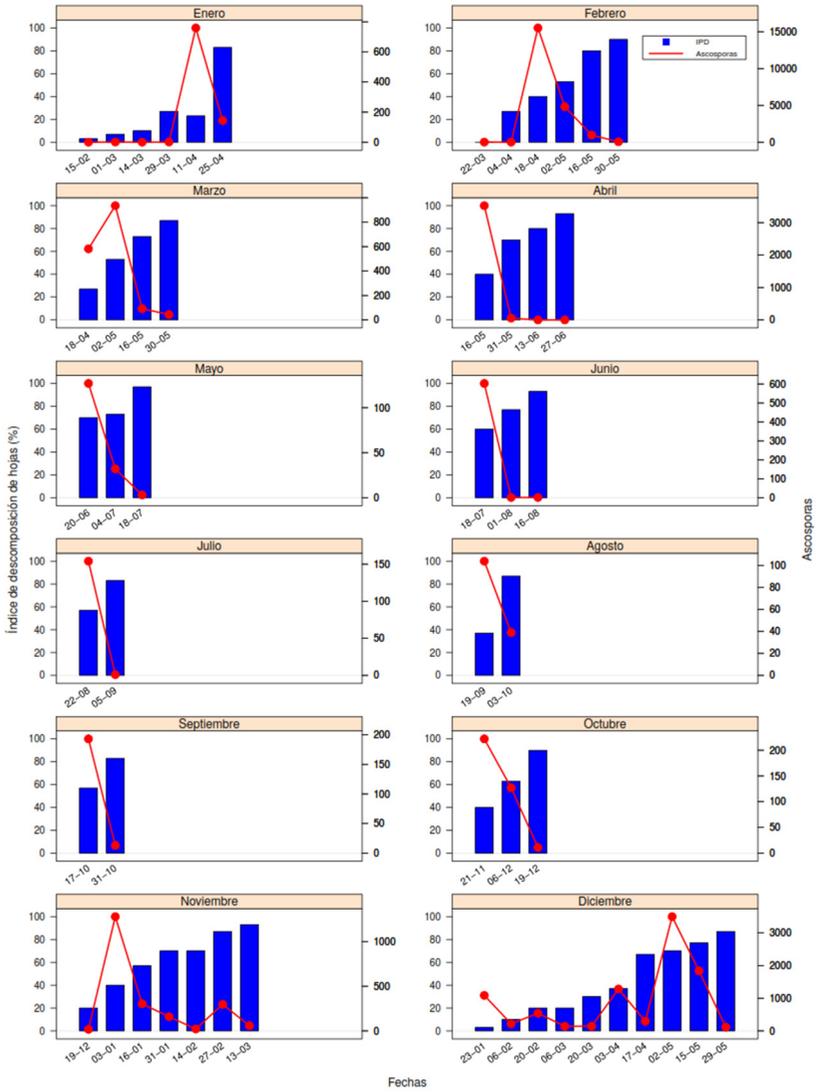
### 5.3.1.2. Dinámica de la producción de inóculo en la hojarasca

En las Figs. 5.8-5.10 se muestran los datos del índice promedio de descomposición de las hojas (IPD) utilizado para estimar los DDH y las ascosporas liberadas en cada uno de los muestreos durante los años de estudio. De igual manera, en las figuras 5.11-5.13 se muestran los datos diarios de las variables PPA y HRP durante los años de estudio. En las figuras 5.14-5.16 se presentan los datos diarios de la variable TP. En la Tabla 5.3 se presentan en forma resumida todos los datos obtenidos de las variables respuesta (ASCH y DDH) y las variables explicativas (DPP, PPA, TP y HRP) en la dinámica de la producción de inóculo en la hojarasca.

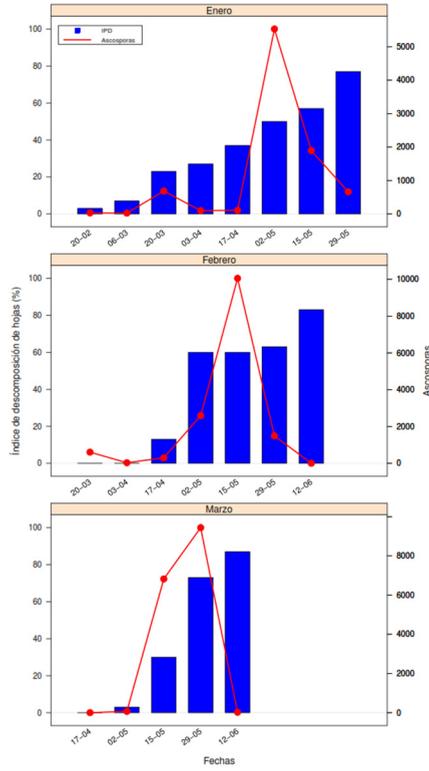
Los resultados del análisis descriptivo realizado con todas las variables estudiadas se muestran en la Tabla 5.4. Se puede observar que las variables TP y HRP presentaron poca variabilidad en los datos a diferencia de la variable ASCH, que presentó una alta variabilidad.



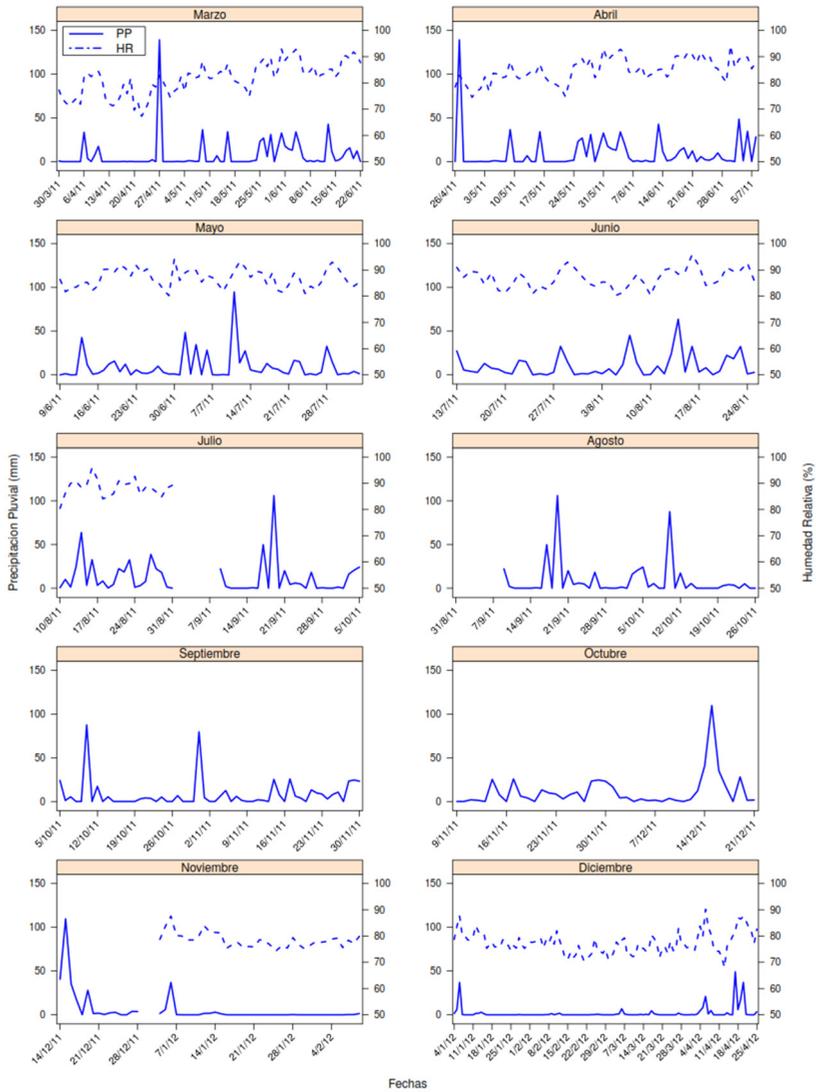
**Figura 5.8:** Índice promedio de descomposición de las hojas (IPD) y número de ascosporas de *Zasmidium citri-griseum* liberadas en las muestras de hojarasca recogidas en 2011.



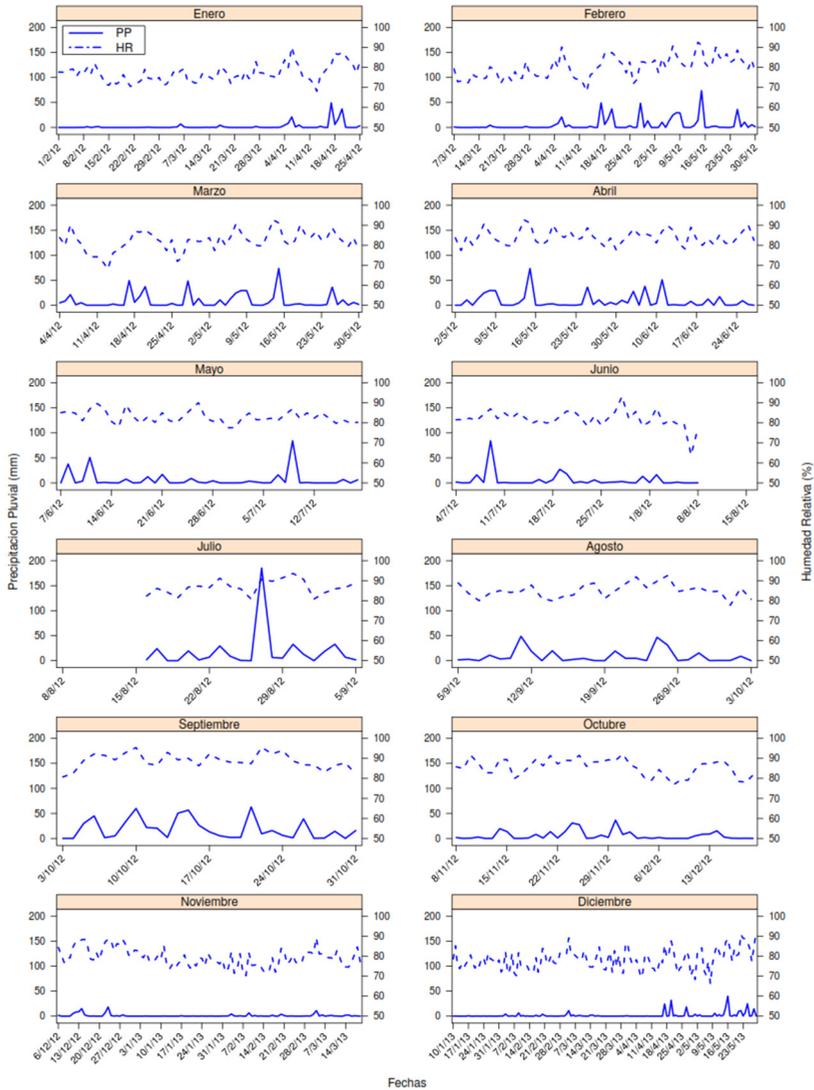
**Figura 5.9:** Índice promedio de descomposición de las hojas (IPD) y número de ascosporas de *Zasmidium citri-griseum* liberadas en las muestras de hojarasca recogidas en 2012.



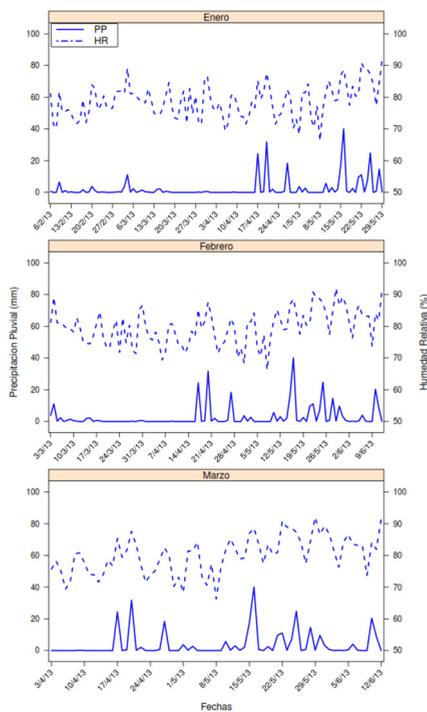
**Figura 5.10:** Índice promedio de descomposición de las hojas (IPD) y número de ascosporas de *Zasmidium citri-griseum* liberadas en las muestras de hojarasca recogidas en 2013.



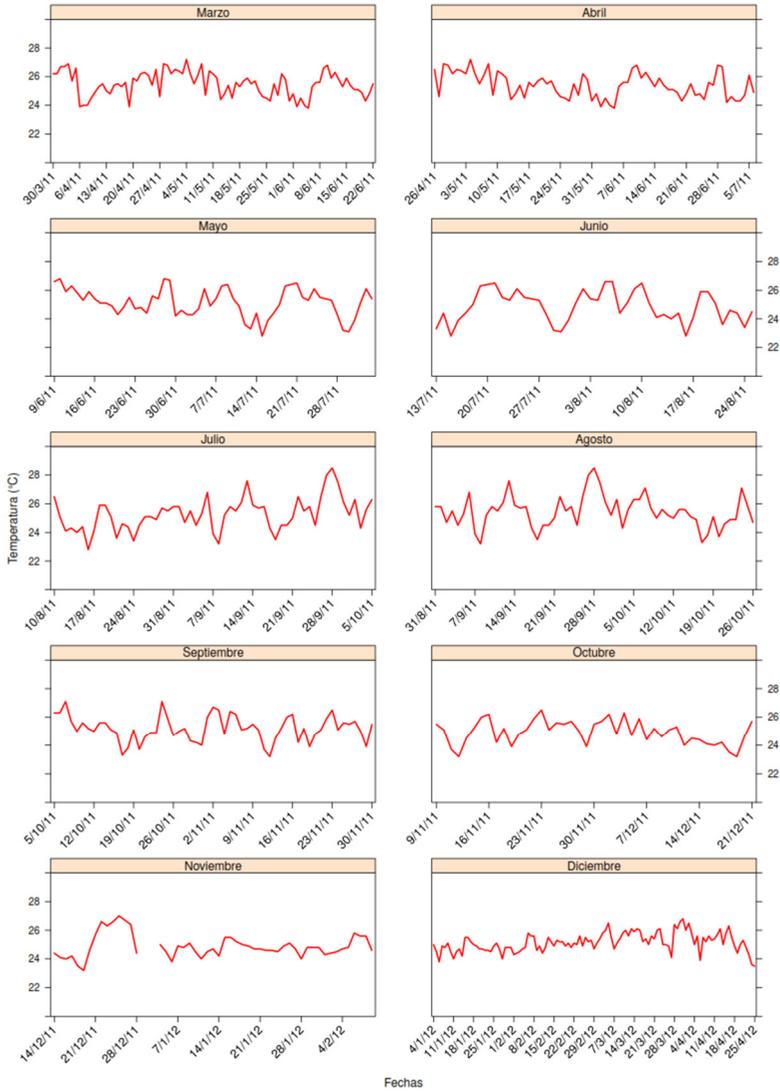
**Figura 5.11:** Precipitación pluvial y humedad relativa promedio registradas durante el seguimiento de la dinámica de producción de inóculo de *Zasmidium citri-griseum* en la hojarasca recogida en 2011.



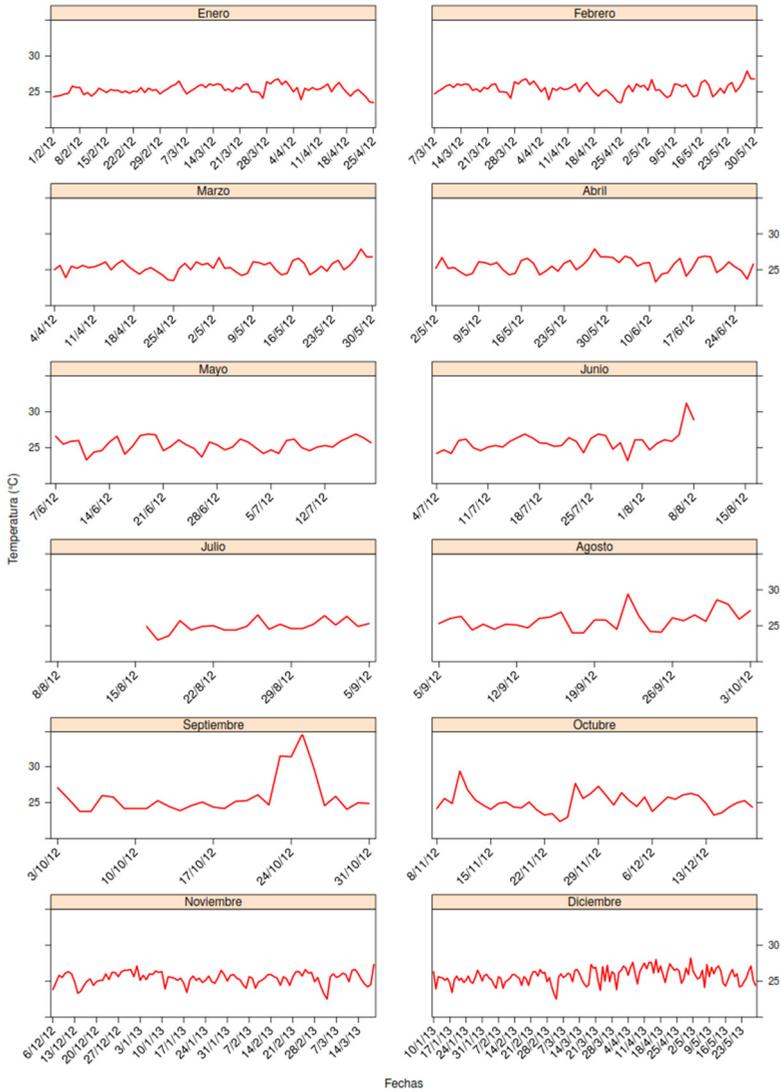
**Figura 5.12:** Precipitación pluvial y humedad relativa promedio registradas durante el seguimiento de la dinámica de producción de inóculo de *Zasmidium citri-griseum* en la hojarasca recogida en 2012.



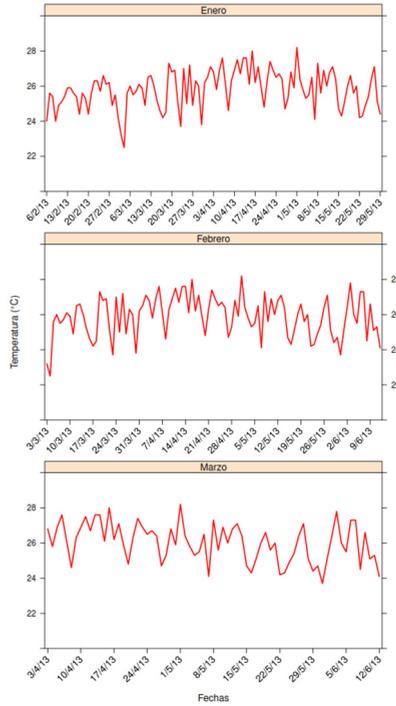
**Figura 5.13:** Precipitación pluvial y humedad relativa promedio registradas durante el seguimiento de la dinámica de producción de inóculo de *Zasmidium citri-griseum* en la hojarasca recogida en 2013.



**Figura 5.14:** Temperatura registrada durante el seguimiento de la dinámica de producción de inóculo de *Zasmidium citri-griseum* en la hojarasca recogida en 2011.



**Figura 5.15:** Temperatura registrada durante el seguimiento de la dinámica de producción de inóculo de *Zasmidium citri-griseum* en la hojarasca recogida en 2012.



**Figura 5.16:** Temperatura registrada durante el seguimiento de la dinámica de producción de inóculo de *Zasmidium citri-griseum* en la hojarasca recogida en 2013.

**Tabla 5.3:** Datos mensuales de las variables respuesta y explicativas estudiadas el experimento de producción de inóculo de *Zasmidium citri-griseum* en la hojarasca.

Año	Mes	ASCH <sup>a</sup>	DDH	DPP	PPA	TP	HRP
2011	Marzo	7.642	85	33	636	25,48	81,52
2011	Abril	4.829	55	27	431	25,45	84,43
2011	Mayo	14	58	41	524	25,16	86,76
2011	Junio	0	44	37	471	24,86	86,90
2011	Julio	24	43	25	518	24,97	88,25
2011	Agosto	1.796	56	17	429	25,44	NA <sup>b</sup>
2011	Septiembre	388	57	33	470	25,20	NA
2011	Octubre	3	50	36	506	25,05	NA
2011	Noviembre	46	63	11	319	24,39	78,42
2011	Diciembre	1.281	113	23	234	25,16	77,27
2012	Enero	951	85	16	181	25,30	76,84
2012	Febrero	21.362	86	31	490	25,49	80,00
2012	Marzo	1.653	57	28	478	25,41	82,04
2012	Abril	3.581	57	28	445	25,58	83,96
2012	Mayo	162	42	16	269	25,42	83,00
2012	Junio	606	44	16	212	25,79	81,99
2012	Julio	155	29	16	394	25,12	86,34
2012	Agosto	143	29	18	252	25,77	85,01
2012	Septiembre	205	29	24	539	25,85	88,77
2012	Octubre	360	44	16	204	25,14	85,98
2012	Noviembre	2.134	98	21	122	25,37	79,35
2012	Diciembre	9.161	140	29	276	25,70	78,31
2013	Enero	9.032	113	28	268	25,81	78,64
2013	Febrero	15.073	99	26	284	25,96	79,61
2013	Marzo	16.348	71	22	272	26,04	80,13

<sup>a</sup>ASCH: ascosporas liberadas por muestra mensual de hojas hasta su descomposición total; DDH: días hasta la descomposición total; DPP: días con precipitación pluvial (>1 mm); PPA: precipitación pluvial acumulada (mm); TP: temperatura promedio (°C); y HRP: humedad relativa promedio (%).

<sup>b</sup>Datos no registrados.

**Tabla 5.4:** Análisis descriptivo de las variables respuesta y explicativas estudiadas el experimento de producción de inóculo de *Zasmidium citri-griseum* en la hojarasca.

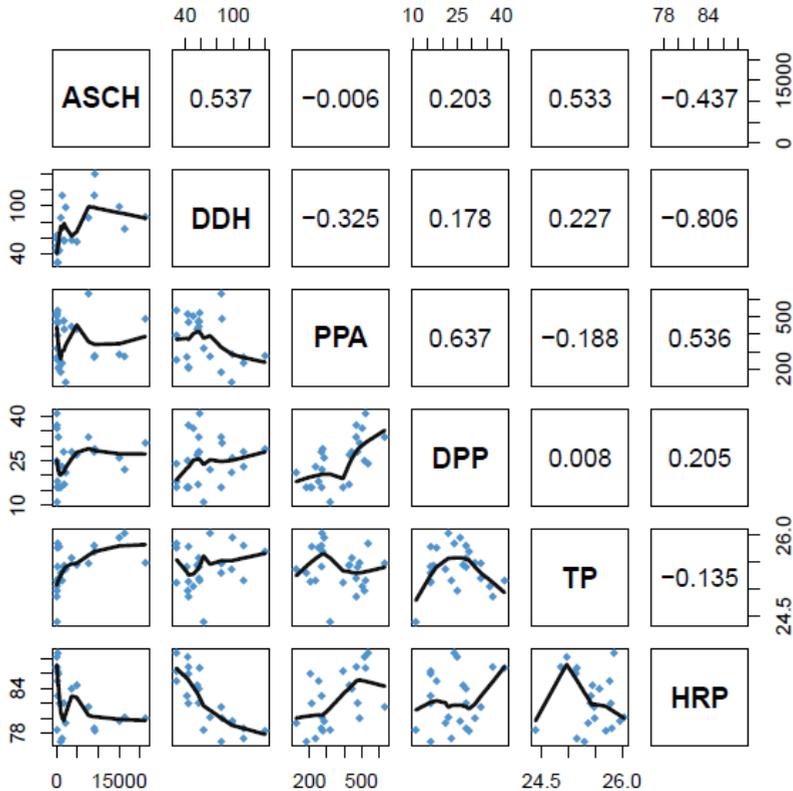
Variables <sup>a</sup>	Mediana	Media	Mínimo	Primer cuartil	Tercer cuartil	Máximo
ASCH	951	3.878	0	155	4.829	21.362
DDH	57	65,88	29	44	85	140
DPP	25	24,72	11	17	29	41
PPA	394	369	122	268	478	636
TP	25,42	25,4	24,39	25,16	25,7	26,04
HRP	82,02	82,43	76,84	79,42	85,74	88,77

<sup>a</sup> DDH: días hasta la descomposición total; DPP: días con precipitación pluvial (>1 mm); PPA: precipitación pluvial acumulada (mm); TP: temperatura promedio (°C); HRP: humedad relativa promedio (%) y ASCH: ascosporas liberadas por muestra mensual de hojas hasta su descomposición total.

Los valores del coeficiente de correlación lineal de Pearson entre las variables respuesta y las variables meteorológicas resultaron variados. Con la variable ASCH los valores más altos del coeficiente de correlación fueron de 0,537 y 0,533 con las variables DDH y TP, respectivamente y el más bajo fue de -0,006 con la variable PPA (Fig. 5.17). Por otra parte, con la variable respuesta DDH el valor más alto del coeficiente de correlación de Pearson fue de -0,806 con la variable HRP y el más bajo fue de 0,178 con la variable DPP. Con respecto a las correlaciones entre las variables explicativas, no se observó una alta correlación entre las variables meteorológicas.

Al ajustar el modelo utilizando la regresión de Poisson para la variable respuesta DDH, el modelo cuyo valor AIC (163,33) era el más bajo estaba constituido por las variables DDP, HRP y PPA (Tabla 5.5). Además todas estas variables explicativas eran significativas ( $P < 0,05$ ). Por otro lado, se comprobó la asunción de la distribución Poisson de igualdad de media y varianza para la variable DDH. Se calculó el parámetro de dispersión dividiendo el valor de la ‘deviance’ residual (24,404) del modelo ajustado entre 18 (grados de libertad) resultando en un valor de 1,356, comprobando la ausencia de sobredispersión. El diagnóstico de modelo se realizó mediante la representación gráfica de los

residuos ‘deviance’, observándose que se concentraron dentro de los valores -2 y 2, con tan solo un residuo ligeramente por encima del valor 2 (Fig. 5.18).



**Fig. 5.17:** Representación gráfica y valores del coeficiente de correlación lineal de Pearson entre las variables del estudio sobre la dinámica de la producción de inóculo de *Zasmidium citri-griseum* en la hojarasca. ASCH: ascosporas liberadas por muestra mensual de hojas hasta su descomposición total, DDH: días hasta la descomposición total, PPA: precipitación pluvial acumulada (mm), DPP: días con precipitación pluvial (>1 mm), TP: temperatura promedio (°C); HRP: humedad relativa promedio (%).

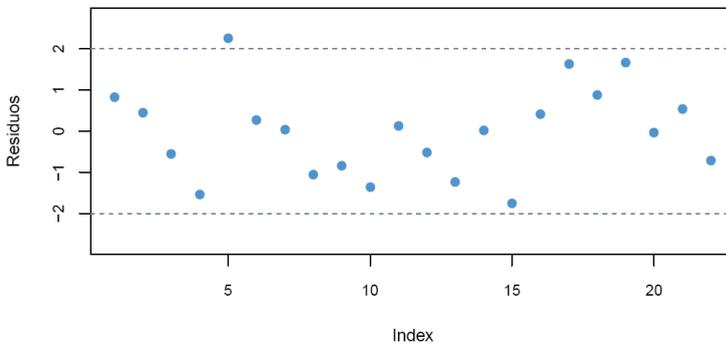
El modelo resultante indicó que para la variable DPP, manteniendo el resto de variables constantes, el número medio de días hasta descomposición total de las hojas aumentaría un 3% por cada día con precipitaciones >1mm. Para la variable PPA, manteniendo el resto de variables constantes, el número medio de días hasta descomposición total de las hojas disminuiría en solo 0,065% si aumenta la precipitación pluvial acumulada en 1 mm. Con la HRP, manteniendo el resto de variables constantes, el número medio de días hasta descomposición total de las hojas disminuiría un 10,48% si aumenta la humedad relativa promedio en un 1%.

**Tabla 5.5:** Valores de los estimadores de los parámetros del modelo lineal generalizado (GLM) para la variable respuesta número de días hasta la descomposición total de las hojas (DDH).

	Estimación	Error estándar	Valor z	P-valor <sup>b</sup>
$\hat{\beta}_0$	12,6021568	0,7388443	17,057	$< 2e^{-16**}$
$\hat{\beta}_1^a$	0,0360224	0,0049005	7,351	$1,972e^{-13**}$
$\hat{\beta}_2$	-0,0006534	0,0002907	-2,248	0,0246*
$\hat{\beta}_4$	-0,1107078	0,0094647	-11,697	$< 2e^{-16**}$

<sup>a</sup> Estimaciones de los parámetros correspondientes a las variables:  $\hat{\beta}_1$ : días con precipitación pluvial (>1 mm) (DPP);  $\hat{\beta}_2$ : precipitación pluvial acumulada (mm) (PPA);  $\hat{\beta}_4$ : humedad relativa promedio (%) (HRP).

<sup>b\*\*</sup>Significativo a  $P<0,01$ ; \*Significativo a  $P<0,05$ ; <sup>n.s.</sup> No significativo  $P\geq 0,05$ .



**Figura 5.18:** Gráfico de los residuos ‘deviance’ del modelo lineal generalizado (GLM) seleccionado para la variable respuesta número de días hasta la descomposición total de las hojas (DDH).

Con la variable respuesta ASCH, en la regresión binomial negativa, el modelo con menor valor del estadístico AIC (415,52) fue el que incluía a las variables DDH, DDP, PPA y TP, todas ellas significativas  $\alpha=0,01$  ( $P<\alpha$ ) (Tabla 5.6). Se cálculo el parámetro de dispersión del valor de ‘deviance’ residual (29,952) entre 20 grados de libertad resultando un valor de 1,498 y por tanto, sin problemas graves de sobredispersión. Como en el caso anterior, el diagnóstico del modelo se realizó mediante la representación gráfica de los residuos ‘deviance’ observándose que los valores se concentraron entre -2 y 2, con un único residuo ligeramente por debajo del valor -2 (Fig. 5.19).

**Tabla 5.6:** Valores de los estimadores de los parámetros del modelo lineal generalizado (GLM) para la variable respuesta número de ascosporas liberadas por muestra mensual de hojas hasta la descomposición total (ASCH).

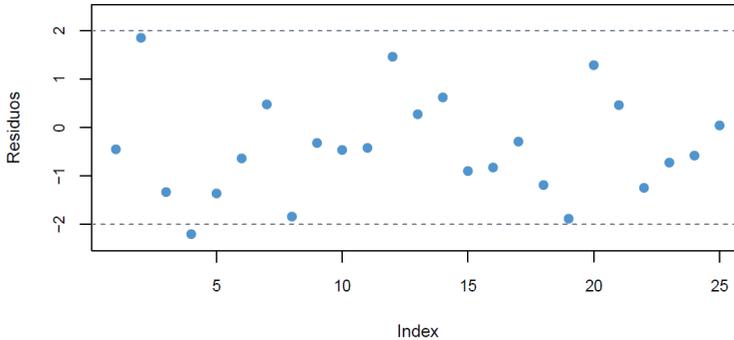
	Estimación	Error estándar	Valor z	P-valor <sup>b</sup>
$\hat{\beta}_0$	-1,030e <sup>+02</sup>	1,614e <sup>+01</sup>	-6,383	1,74e <sup>-10**</sup>
$\hat{\beta}_1^a$	-1,398e <sup>-01</sup>	4,546e <sup>-02</sup>	-3,076	0,00210**
$\hat{\beta}_2$	8,199e <sup>-03</sup>	2,704e <sup>-03</sup>	3,032	0,00243**
$\hat{\beta}_3$	4,213e <sup>+00</sup>	6,349e <sup>-01</sup>	6,636	3,21e <sup>-11**</sup>
$\hat{\beta}_5$	5,324e <sup>-02</sup>	9,893e <sup>-03</sup>	5,382	7,38e <sup>-08**</sup>

<sup>a</sup>Estimaciones de los parámetros correspondientes a las variables.  $\beta_1$ : días con precipitación pluvial (>1 mm) (DPP);  $\beta_2$ : precipitación pluvial acumulada (mm) (PPA);  $\beta_3$ : temperatura promedio (°C) (TP),  $\beta_5$ : días hasta la descomposición total (DDH).

<sup>b</sup>\*\*Significativo a  $P<0,01$ ; \*Significativo a  $P<0,05$ ; <sup>n.s.</sup> No significativo  $P\geq 0,05$ .

El modelo resultante indicó que para la variable DDH, manteniendo el resto de variables constantes, el número de ascosporas liberadas aumentaría un 5,3% por cada día hasta la descomposición total de las hojas. Para la variable DPP, manteniendo el resto de variables constantes, el número de ascosporas liberadas disminuirá un 12,98% por cada día con precipitación pluvial >1mm. Con la variable PPA, manteniendo el resto de variables constantes, el número de ascosporas liberadas aumentará en 0,82% por cada mm de incremento en la precipitación pluvial acumulada. Por último, con la variable TP, manteniendo el

resto de variables constantes, el riesgo relativo de que aumente el número de ascosporas liberadas es 4,213 veces superior si aumenta la temperatura promedio en 1 °C.

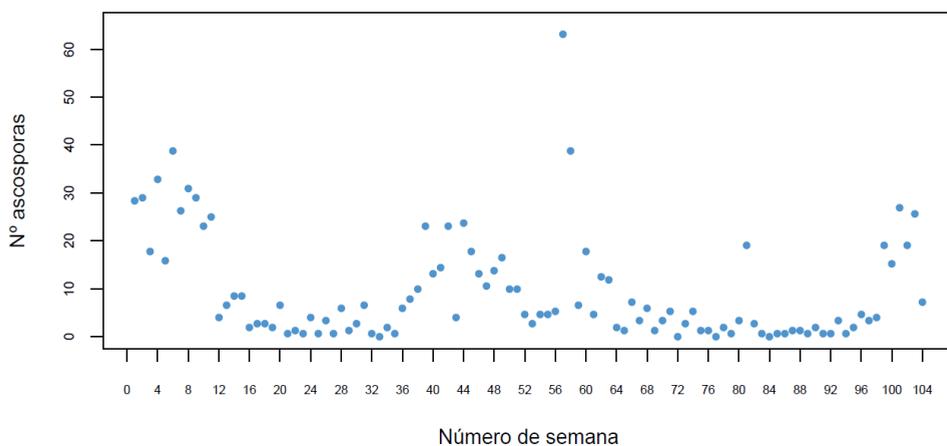


**Figura 5.19:** Gráfico de los residuos ‘deviance’ del modelo lineal generalizado (GLM) seleccionado para la variable respuesta número de ascosporas liberadas por muestra mensual de hojas hasta la descomposición total (ASCH).

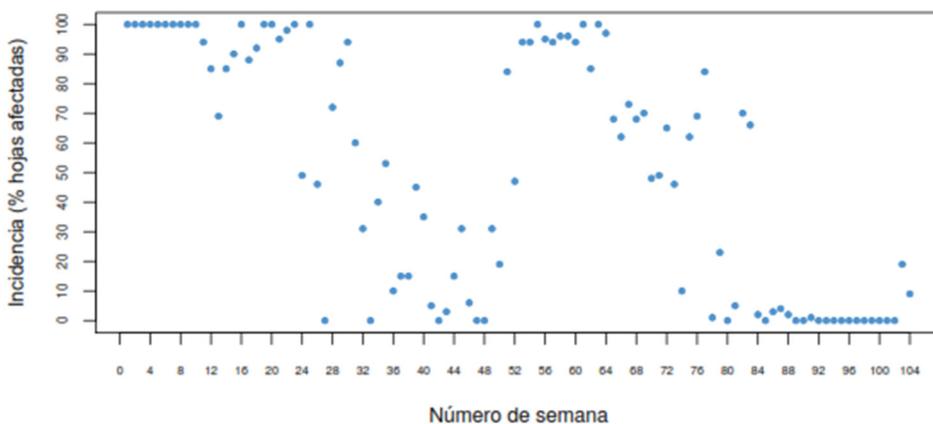
**5.3.1.3. Seguimiento del inóculo en el aire y períodos de infección**

En la Fig. 5.20 se presentan los datos de la variable número de ascosporas capturadas por semana (ASC) observándose un comportamiento estacional con un patrón anual de unas 52 semanas. De todos los datos registrados durante las 104 semanas de estudio, solo el valor registrado en la semana 57 sobrepasó de forma anormal a los valores registrados en el resto de semanas. Aunque podría tratarse de un valor fuera de rango (‘outlier’), se decidió no eliminarlo y mantenerlo en los análisis.

En relación a la variable incidencia (INC), se observó también un comportamiento estacional de la curva repitiéndose el mismo patrón de 52 semanas (Fig. 5.21). Los resultados observados en ambos gráficos indican claramente que el valor de la observación en una semana  $i$  probablemente esté relacionado con la observación de la semana anterior  $i-1$ . Este resultado motivó la inclusión de una componente temporal en el modelo, que podría ayudar a modelizar de una forma más adecuada los datos de las variables número de ascosporas e incidencia.

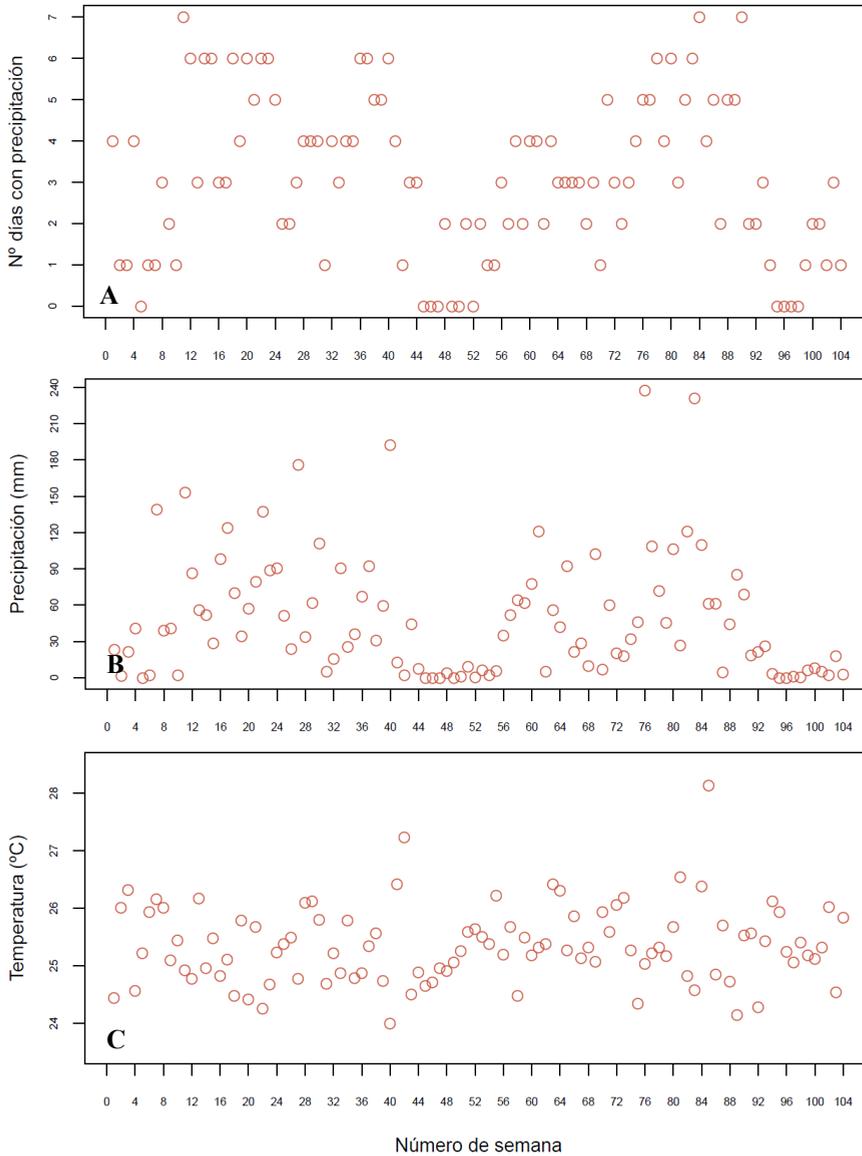


**Figura 5.20:** Dinámica del número de ascosporas de *Zasmidium citri-griseum* capturadas por semana (ASC) durante las 104 semanas de estudio desde marzo de 2011 a marzo de 2013.

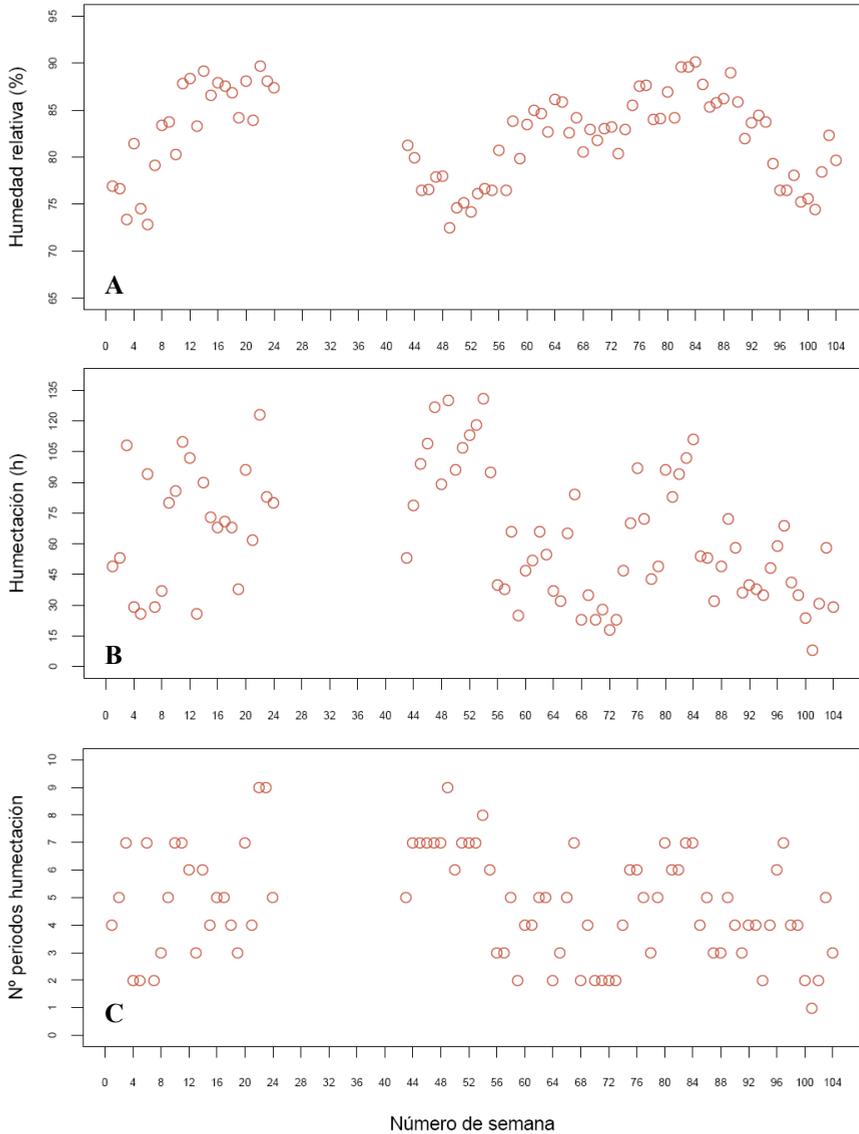


**Figura 5.21:** Dinámica de la incidencia de la mancha grasienta (INC) en las plantas trampa durante las 104 semanas de estudio desde marzo de 2011 a marzo de 2013.

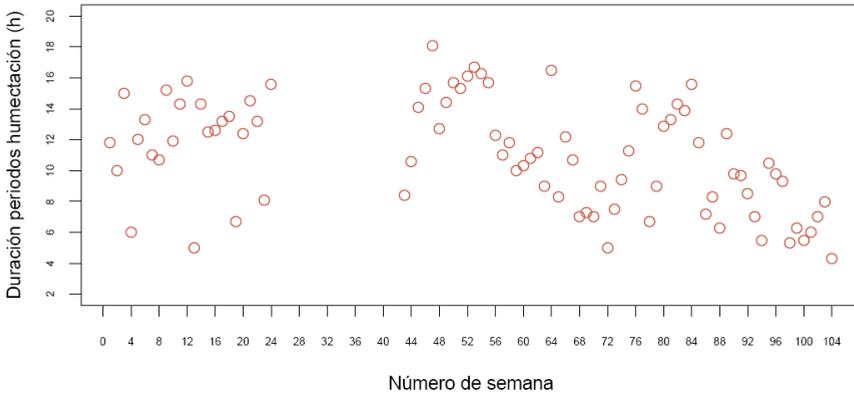
En las Figs. 5.22-5.24 se muestra la dinámica de las variables meteorológicas durante las 104 semanas de estudio. Se observó que los datos relativos a la variable promedio de temperatura (Fig. 5.22 C) presentaron un comportamiento constante con pocas fluctuaciones durante todo el estudio, a diferencia del resto de las variables estudiadas.



**Figura 5.22:** Dinámica de los datos de las variables explicativas **A)** número de días con precipitación pluvial >1 mm por semana (DDP); **B)** precipitación pluvial acumulada por semana (PPA); **C)** temperatura promedio por semana (TP), durante las 104 semanas de estudio desde marzo de 2011 a marzo de 2013.



**Figura 5.23:** Dinámica de los datos de las variables explicativas **A)** humedad relativa promedio por semana (HRP); **B)** horas con humectación por semana (HH); **C)** periodos de humectación >1 h por semana (PH), durante las 104 semanas de estudio desde marzo de 2011 a marzo de 2013.



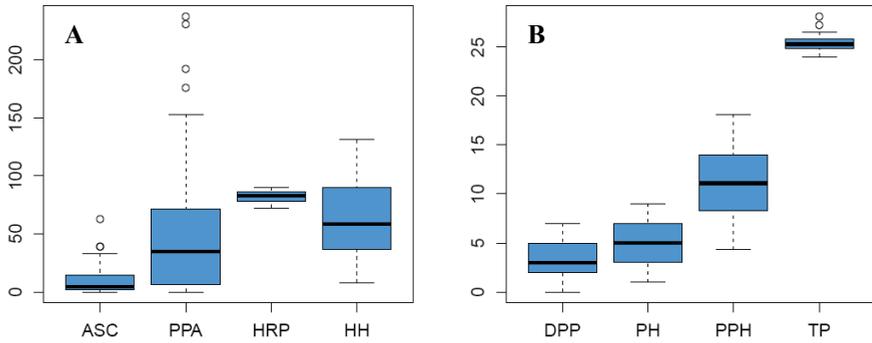
**Figura 5.24:** Dinámica de los datos de la variable explicativa promedio de la duración de los periodos de humectación >1 h por semana (PPH) durante las 104 semanas de estudio desde marzo de 2011 a marzo de 2013.

Al observar los diagramas de cajas de las variables meteorológicas, se observó una muy baja variabilidad de HRP y TP (Fig. 5.25 A y B). En la variable ASC se pudo comprobar la posible presencia de ‘outliers’ indicada anteriormente (Fig. 5.25 A). Las variables DPP, TP, HRP, PH y PPH presentaron distribuciones relativamente simétricas, con valores de media y mediana muy cercanos (Fig. 5.25 A y B).

Los valores del coeficiente de correlación lineal de Pearson indicaron una muy baja correlación entre las variables meteorológicas y la variable respuesta INC. El valor más alto del coeficiente de correlación fue de 0,333 con la variable PPH y el más bajo fue de -0,025 con la variable TP (Fig. 5.26). Por otra parte, se observó también una muy baja correlación de las variables meteorológicas con la variable respuesta ASC. El valor más bajo del coeficiente de Pearson fue de 0,024 con la variable TP. Con respecto a las correlaciones entre las variables explicativas, se observó una alta correlación entre las variables de humectación (HH, PH, PPH), siendo la más alta de 0,921 entre las variables HH y PH.

En la Tabla 5.7 se presentan los dos modelos de menor DIC para la variable respuesta ASC incluyendo solo variables meteorológicas explicativas. En este caso el modelo seleccionado fue el 1.b, que no incluía la variable TP que como se observó en los diagramas de cajas (Fig. 5.25 B) apenas presentó variabilidad. Por

otra parte, la correlación lineal entre la variable TP y la variable ASC fue la más baja entre todas. La capacidad predictiva de los modelos no fue buena puesto que el valor LCPO quedaba bastante alejado de 0.



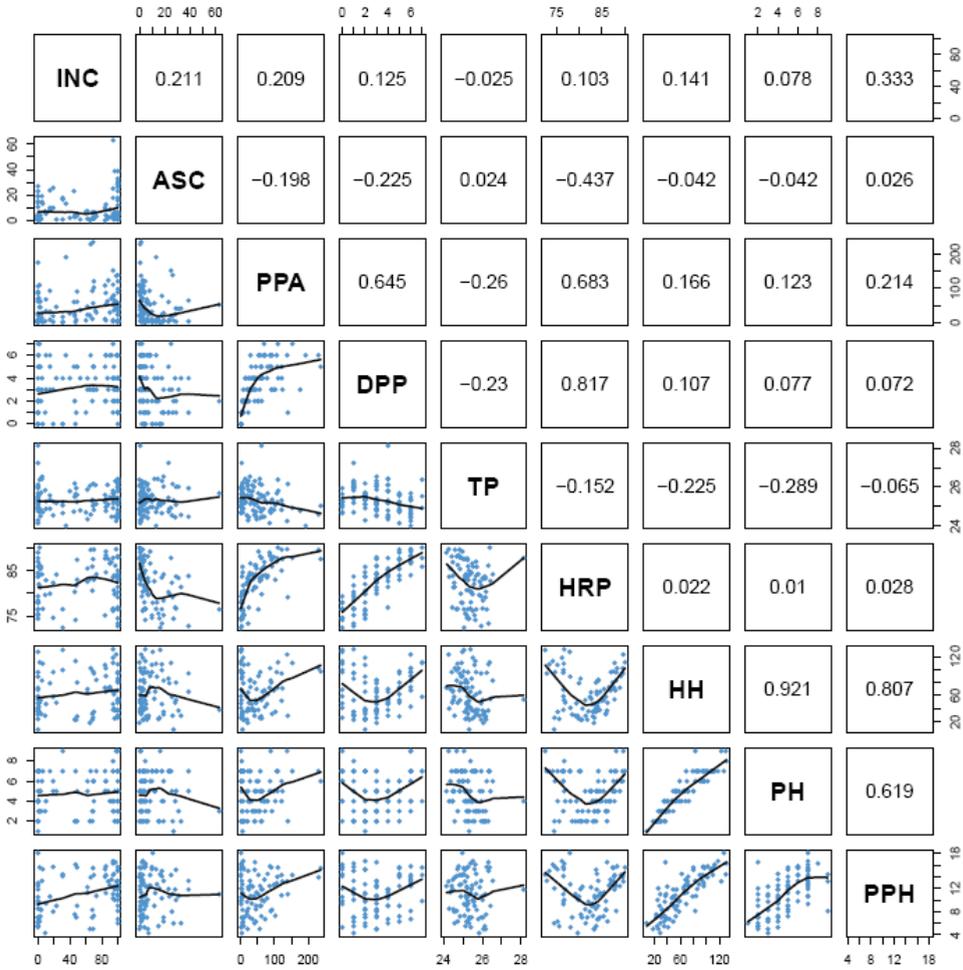
**Figura 5.25:** Diagrama de cajas para las variables del estudio del inóculo en el aire y periodos de infección de *Zasmidium citri-griseum* **A)** ASC: ascosporas capturadas por semana (n°), PPA: precipitación pluvial acumulada por semana (mm), HRP: humedad relativa promedio por semana (%), HH: horas con humectación por semana (h); **B)** DPP: días con precipitación pluvial >1 mm por semana (n°), PH: periodos de humectación >1 h por semana (n°), PPH: promedio de la duración de los periodos de humectación >1 h por semana (h), TP: temperatura promedio por semana (°C).

**Tabla 5.7:** Modelos lineales generalizados (GLM) para la variable respuesta número de ascosporas capturadas por semana (ASC) incluyendo únicamente variables meteorológicas explicativas.

Modelos	DIC <sup>a</sup>	LCPO <sup>b</sup>
1a		
$\log(\mu_i) = \beta_0 + \beta_1 PPA_i + \beta_2 DPP_i + \beta_3 TP_i + \beta_4 HRP_i + \beta_5 HH_i + \beta_6 PH_i + \beta_7 PPH_i$	1.348,65	6,90
1b		
$\log(\mu_i) = \beta_0 + \beta_1 PPA_i + \beta_2 DPP_i + \beta_3 HRP_i + \beta_4 HH_i + \beta_5 PH_i + \beta_6 PPH_i$	1.349,71	6,84

<sup>a</sup>DIC: Deviance Information Criterion

<sup>b</sup>LCPO: -mean of CPO's logarithm



**Fig. 5.26:** Representación gráfica y valores del coeficiente de correlación lineal de Pearson entre las variables del estudio del inóculo en el aire y períodos de infección de *Zasmidium citri-griseum*. INC: incidencia de la mancha grasienta en las plantas trampa, ASC: ascosporas capturadas por semana (nº), PPA: precipitación pluvial acumulada por semana (mm), DPP: días con precipitación pluvial >1 mm por semana (nº), TP: temperatura promedio por semana (°C), HRP: humedad relativa promedio por semana (%), HH: humectación por semana (h), PH: períodos de humectación >1 h por semana (nº), PPH: promedio de la duración de los períodos de humectación >1 h por semana (h). Total de 104 períodos semanales desde marzo de 2011 a marzo de 2013.

Al integrar en el modelo una componente temporal autorregresiva de orden 1 mediante la variable ‘semana’ se logró reducir considerablemente el valor del estadístico DIC, y por lo tanto mejorar el ajuste del modelo. En la Tabla 5.8 se indican los cinco modelos de menor DIC para la variable respuesta ASC incluyendo además de las variables explicativas a la componente temporal. De entre los cinco modelos se seleccionó el 1.e que además de la componente temporal ‘semana’ incluía a las variables meteorológicas explicativas PPA y DPP.

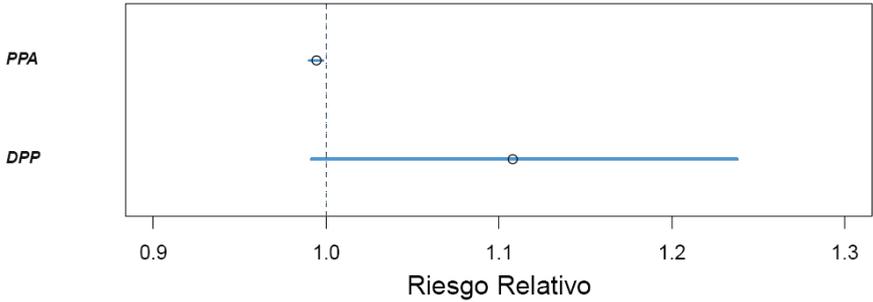
**Tabla 5.8:** Modelos lineales generalizados (GLM) para la variable respuesta número de ascosporas capturadas por semana (ASC) con las variables meteorológicas explicativas y la componente temporal de orden 1.

Modelos	DIC <sup>a</sup>	LCPO <sup>b</sup>
1c		
$\log(\mu_i) = \beta_0 + \beta_1 PPA_i + \beta_2 DPP_i + \beta_3 HRP_i + \beta_4 HH_i + f_1(\text{Semana}_i)$	524,19	4,68
1d		
$\log(\mu_i) = \beta_0 + \beta_1 PPA_i + \beta_2 DPP_i + \beta_3 HRP_i + f_1(\text{Semana}_i)$	524,26	4,53
1e		
$\log(\mu_i) = \beta_0 + \beta_1 PPA_i + \beta_2 DPP_i + f_1(\text{Semana}_i)$	524,31	4,64
1f		
$\log(\mu_i) = \beta_0 + \beta_1 PPA_i + \beta_2 DPP_i + \beta_3 HRP_i + \beta_4 PH_i + f_1(\text{Semana}_i)$	524,31	4,62
1g		
$\log(\mu_i) = \beta_0 + \beta_1 PPA_i + \beta_2 DPP_i + \beta_3 HH_i + f_1(\text{Semana}_i)$	524,49	4,80

<sup>a</sup>DIC: Deviance Information Criterion

<sup>b</sup>LCPO: -mean of CPO's logarithm

Los intervalos de credibilidad al 95% para los riesgos relativos del modelo 1.e indican que el número de ascosporas capturadas en un período semanal está relacionado con el número de ascosporas del período semanal anterior y que el riesgo relativo de aumentar el número de ascosporas sería mayor cuanto mayor sea el número de días de lluvia (DPP) pero con menor cantidad de lluvia (PPA) (Fig. 5.27).



**Fig. 5.27:** Representación gráfica de los intervalos de credibilidad al 95% del riesgo relativo para las variables meteorológicas PPA: precipitación pluvial acumulada por semana (mm) y DPP: días con precipitación pluvial >1 mm por semana (nº) en el modelo 1.e para la variable respuesta número de ascosporas capturadas por semana (ASC) que incorpora también una componente temporal de orden 1 como variable explicativa.

En la Tabla 5.9 se indican los dos modelos con menor DIC para la variable INC que incluyen únicamente las variables meteorológicas explicativas. El modelo seleccionado (2.b) no incluía la variable meteorológica TP, que apenas presentó variabilidad (Fig. 5.25 B) y que además su correlación lineal con la variable respuesta fue la más baja. La capacidad predictiva no era adecuada ya que los valores de LCPO quedaban muy lejos de 0.

Al incorporar una componente temporal autorregresiva de orden 1 mediante la variable ‘semana’ se redujo considerablemente el valor del estadístico DIC. Los cinco modelos con menor valor de DIC se indican en la Tabla 5.10. Entre ellos se seleccionó el modelo 2.g por su mejor interpretación biológica. Además de la componente temporal, este modelo incluía las variables meteorológicas explicativas HH y PH. En cuanto a su capacidad predictiva, tampoco fue buena ya que presentó un valor de LCPO muy superior a 0.

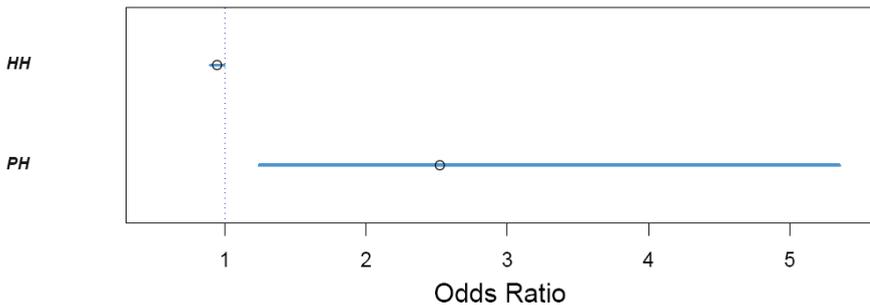
**Tabla 5.9:** Modelos lineales generalizados (GLM) para la variable respuesta incidencia de la mancha grasienta en las plantas trampa (INC) incluyendo únicamente variables meteorológicas explicativas.

Modelos	DIC <sup>a</sup>	LCPO <sup>b</sup>
2a		
$\log\left(\frac{\pi_i}{1-\pi_i}\right) = \beta_0 + \beta_1 ASC_i + \beta_2 PPA_i + \beta_3 DPP_i + \beta_4 TP_i + \beta_5 HRP_i + \beta_6 HH_i + \beta_7 PH_i + \beta_8 PPH_i$	7.401,76	37,58
2b		
$\log\left(\frac{\pi_i}{1-\pi_i}\right) = \beta_0 + \beta_1 ASC_i + \beta_2 PPA_i + \beta_3 DPP_i + \beta_4 HRP_i + \beta_5 HH_i + \beta_6 PH_i + \beta_7 PPH_i$	7.401,78	37,73

<sup>a</sup>DIC: Deviance Information Criterion

<sup>b</sup>LCPO: - mean of CPO's logarithm

Los intervalos de credibilidad al 95% para los odds ratio del modelo 2.g. indican que la incidencia de la enfermedad (INC) en un período semanal dependerá de la incidencia del período anterior y que la presencia de períodos de humectación cortos pero más frecuentes favorecería el desarrollo de la enfermedad (Fig. 5.28).



**Fig. 5.28:** Representación gráfica de los intervalos de credibilidad al 95% para los odds ratios de las variables meteorológicas HH: humectación por semana (h) y PH: períodos de humectación >1 h por semana (nº) en el modelo 2.g para la variable respuesta incidencia de la enfermedad (INC) que incorpora también una componente temporal de orden 1 como variable explicativa.

**Tabla 5.10:** Modelos lineales generalizados (GLM) para la variable respuesta incidencia de la mancha grasienta en las plantas trampa (INC) incluyendo variables meteorológicas explicativas y una componente temporal de orden 1 (semana).

Modelos	DIC <sup>a</sup>	LCPO <sup>b</sup>
2c		
$\log\left(\frac{\pi_i}{1-\pi_i}\right) = \beta_0 + \beta_1 ASC_i + \beta_2 PPA_i + \beta_3 HRP_i + \beta_4 HH_i + \beta_5 PH_i + f_1(Semana_i)$	460,86	11,52
2d		
$\log\left(\frac{\pi_i}{1-\pi_i}\right) = \beta_0 + \beta_1 ASC_i + \beta_2 PPA_i + \beta_3 DPP_i + \beta_4 HRP_i + \beta_5 HH_i + \beta_6 PH_i + f_1(Semana_i)$	461,11	11,53
2e		
$\log\left(\frac{\pi_i}{1-\pi_i}\right) = \beta_0 + \beta_1 PPA_i + \beta_2 HH_i + \beta_3 PH_i + f_1(Semana_i)$	461,13	11,50
2f		
$\log\left(\frac{\pi_i}{1-\pi_i}\right) = \beta_0 + \beta_1 ASC_i + \beta_2 PPA_i + \beta_3 HH_i + \beta_4 PH_i + f_1(Semana_i)$	461,14	11,50
2g		
$\log\left(\frac{\pi_i}{1-\pi_i}\right) = \beta_0 + \beta_1 HH_i + \beta_2 PH_i + f_1(Semana_i)$	461,16	11,45

<sup>a</sup> DIC: Deviance Information Criterion

<sup>b</sup> LCPO:- mean of CPO's logarithm

### 5.3.2. Ensayos de control de la mancha grasienta

#### 5.3.2.1. Severidad de la enfermedad

En el análisis descriptivo de la variable severidad en el experimento de la finca Gabriela en 2011, los diagramas de cajas mostraron diferencias visuales en

los porcentajes de las hojas entre los árboles tratados y los testigo para las categorías 0, 1 y 3 de la escala de severidad. Esto no se observó en la categoría 2 donde las cajas (i.e. rango intercuantílico, RI) se solaparon (Fig. 5.29). En cuanto a la variabilidad de los datos, las diferencias más notables se apreciaron en la categoría 0, observándose valores de RI en los árboles tratados del 48,95 – 65,44%, con respecto al 1,26 – 4,82% de los árboles testigo. De igual forma, se observaron diferencias en la categoría 3 de severidad entre el RI de los árboles testigo (78,99 – 87,70%) y los árboles tratados (8,55 – 15,21%) (Fig. 5.29).

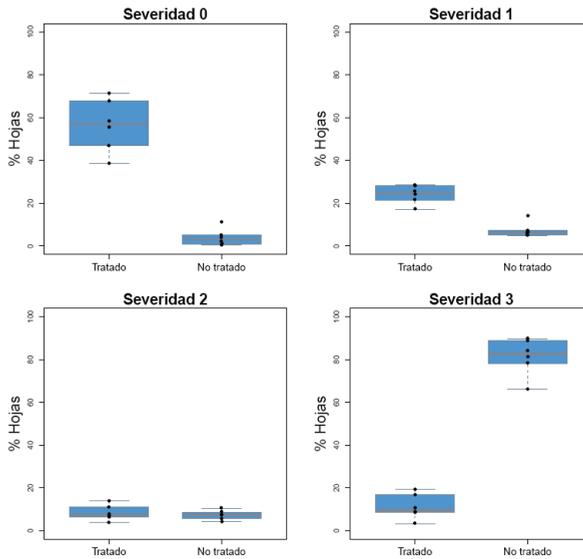
En 2012, se observaron diferencias entre el tratamiento y el testigo en todas las categorías de la escala de severidad, puesto que no se apreció solape entre los RI (Fig. 5.30). En cuanto a la variabilidad de los datos se observó que el RI en la categoría 1 para los árboles tratados (32,53 – 42,75%) era mayor que el de los árboles testigo (8,52 – 12,68%). Por otro lado, en la categoría 3 de la escala también se observaron diferencias entre los valores del primer y tercer cuartil para los árboles testigo (68,21 – 79,53%) con respecto a los árboles tratados (28,62 – 37,08%) (Fig. 5.30).

En 2013, se observaron diferencias entre los resultados obtenidos con tratamiento y sin él para todas las categorías de la escala de severidad (Fig. 5.31). Nuevamente, las diferencias más notables se presentaron en la categoría 1 entre el RI de los árboles tratados (37,41 – 46,95%) con respecto a los testigo (8,11 – 10,06%). De igual forma, en la categoría 3 de la escala se registraron diferencias entre los valores del primer cuartil y los del tercer cuartil en los árboles testigo (70,06 – 74,67%) y los tratados (21,02 – 30,63%) (Fig. 5.31).

En el caso de los experimentos realizados en la finca Bella Vista en 2011, los diagramas de cajas mostraron diferencias entre los árboles tratados y los testigo en las categorías 0, 2 y 3 de la escala de severidad (Fig. 5.32). En cuanto a la variabilidad de los datos, en la categoría 0, se observó una mayor variabilidad en los árboles tratados (39,75 – 54,33%) que en los árboles testigo (1,72 – 3,84%). Igualmente, se observaron diferencias en la categoría 3 entre los valores del primer y tercer cuartil para los árboles testigo (63,38 – 69,76%, respectivamente) y los árboles tratados (12,94 – 18,14%) (Fig. 5.32).

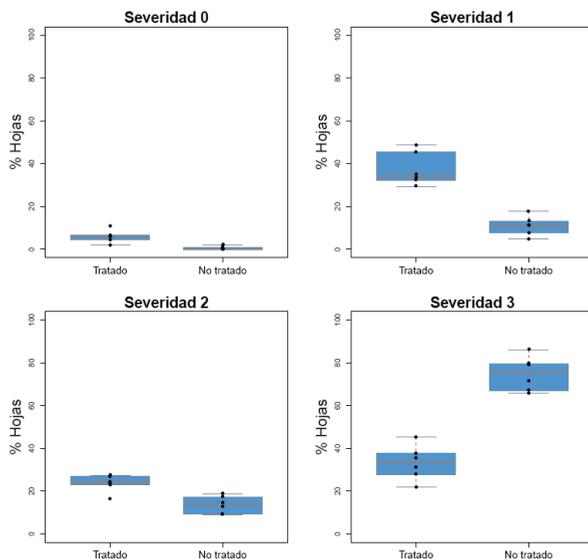
En 2012, en todas las categorías de la escala de severidad se observaron diferencias entre los árboles tratados y los testigo. En la categoría 1 de la escala de severidad se observó una mayor variabilidad de los datos en los árboles

tratados (25 – 37,94 %) que en los árboles testigo (15,13 – 20,55%) (Fig. 5.33). Por otro lado, las diferencias más notables se observaron en la categoría 3 de la escala entre el RI de los porcentajes de casos en árboles testigo (61,54 – 70,02%) y los árboles tratados (32,40 – 49,91%) (Fig 5.33).

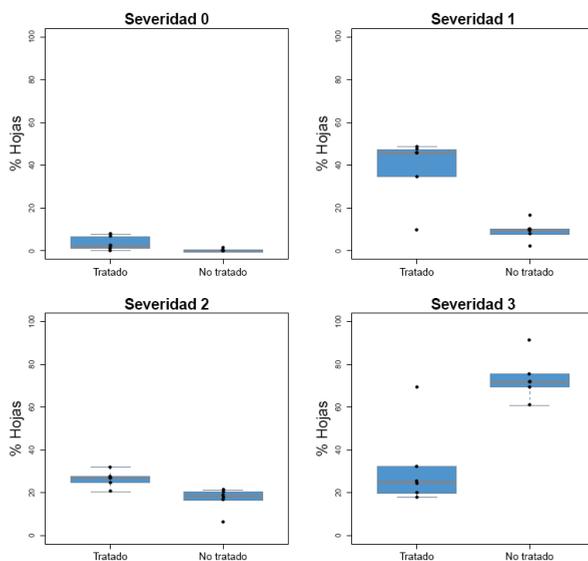


**Figura 5.29:** Diagrama de cajas de los porcentajes de hojas en cada una de las categorías de la escala de severidad (0-3) de mancha grasienta en los árboles tratados y no tratados con el fungicida fenbuconazol en el experimento de finca Gabriela en 2011.

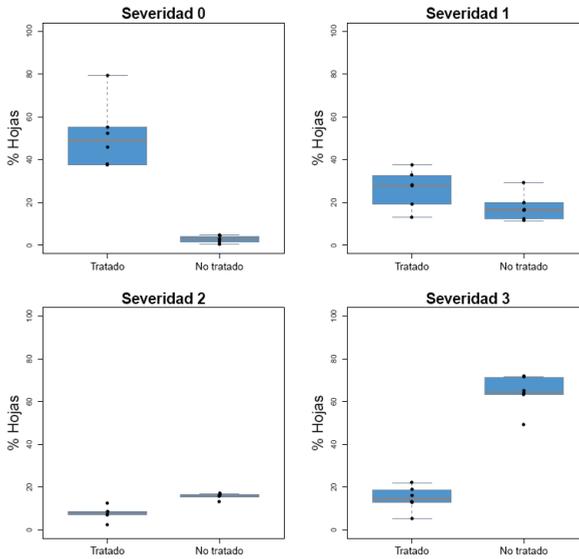
El modelo de regresión logística ordinal aplicado sobre la variable severidad en los experimentos en finca Gabriela mostró diferencias significativas ( $P < 0,01$ ) en el factor tratamiento en los tres años de estudio (2011, 2012 y 2013) (Tabla 5.11). Los valores negativos de  $\hat{\eta}_1$  relativos al factor tratamiento en los años 2011 (-3,5500), 2012 (-1,7927) y 2013 (-1,8009) (Tabla 5.11) indican una mayor probabilidad de obtener categorías bajas de la escala de severidad de la mancha grasienta en los arboles tratados con el fungicida fenbuconazol.



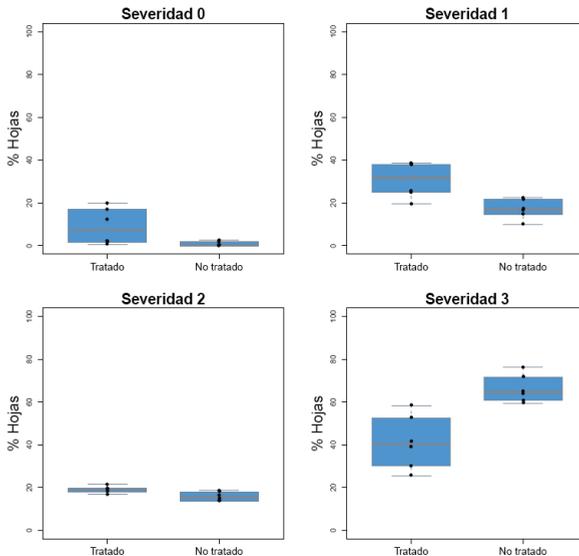
**Figura 5.30:** Diagrama de cajas de los porcentajes de hojas en cada una de las categorías de la escala de severidad (0-3) de mancha grasienta en los árboles tratados y no tratados con el fungicida fenbuconazol en el experimento de finca Gabriela en 2012.



**Figura 5.31:** Diagrama de cajas de los porcentajes de hojas en cada una de las categorías de la escala de severidad (0-3) de mancha grasienta en los árboles tratados y no tratados con el fungicida fenbuconazol en el experimento de finca Gabriela en 2013.



**Figura 5.32:** Diagrama de cajas de los porcentajes hojas en cada una de las categorías de la escala de severidad (0-3) de mancha grasienta en los árboles tratados y no tratados con el fungicida fenbuconazol en el experimento de finca Bella Vista en 2011.



**Figura 5.33:** Diagrama de cajas de los porcentajes de hojas en cada una de las categorías de la escala de severidad (0-3) de mancha grasienta en los árboles tratados y no tratados con el fungicida fenbuconazol en el experimento de finca Bella Vista en 2012.

En el caso de los experimentos en la finca Bella Vista, los resultados del modelo de regresión logística ordinal mostraron también diferencias significativas ( $P < 0,01$ ) en el factor tratamiento en los dos años de estudio (2011 y 2012) (Tabla 5.12). Los valores negativos de  $\hat{\eta}_1$  del factor tratamiento en los años 2011 (-2,7024) y 2012 (-1,0483) (Tabla 5.12) indican una mayor probabilidad de obtener categorías bajas de la escala de severidad de la mancha grasienta en los árboles tratados con el fungicida fenbuconazol.

**Tabla 5.11:** Resultados del modelo de regresión logística ordinal sobre los valores de severidad en los experimentos de control de la mancha grasienta en la finca Gabriela 2011-2013.

Fuente de variación	Estimación	Error estándar	Valor $t$	$P$ -valor <sup>b</sup>
<b>2011</b>				
Factor tratamiento <sup>a</sup>	-3,55	0,0636	-55,7921	0,00e <sup>+00</sup> **
Puntos de corte				
0 1	-3,255	0,0592	-55,0246	0,00e <sup>+00</sup>
1 2	-2,0972	0,0502	-41,7526	0,00e <sup>+00</sup>
2 3	-1,4714	0,0445	-33,0739	8,87e <sup>-223</sup>
<b>2012</b>				
Factor tratamiento	-1,7927	0,0445	-40,2616	0,00e <sup>+00</sup> **
Puntos de corte				
0 1	-4,6456	0,0686	-67,7305	0,00e <sup>+00</sup>
1 2	-2,0737	0,039	-53,1581	0,00e <sup>+00</sup>
2 3	-1,0982	0,0343	-32,0547	4,34e <sup>-214</sup>
<b>2013</b>				
Factor tratamiento	-1,8009	0,052	-34,622	6,30e <sup>-242</sup> **
Puntos de corte				
0 1	-5,3068	0,1036	-51,1995	0,00e <sup>+00</sup>
1 2	-2,2011	0,046	-47,8993	0,00e <sup>+00</sup>
2 3	-1,0714	0,0391	-27,4156	3,69e <sup>-157</sup>

<sup>a</sup> En todos los contrastes de hipótesis como referente el testigo sin tratar.

<sup>b</sup> \*\*Significativo a  $P < 0,01$ ; \*Significativo a  $P < 0,05$ ; n.s. No significativo  $P \geq 0,05$ .

En la Tabla 5.13 se muestran las probabilidades de las predicciones del modelo logístico ordinal para cada una de las categorías de severidad en los árboles tratados y testigo en los experimentos realizados en finca Gabriela. En 2011, se observó una mayor probabilidad de que aparecieran valores de la categoría 0 de la escala de severidad en los árboles tratados (0,57) a diferencia de una baja probabilidad (0,04) en los árboles testigo. También, se observa que hay

una alta probabilidad (0,81) de que valores de la categoría 3 de la escala aparecieran en los árboles testigo a diferencia de una baja probabilidad (0,11) en los árboles tratados con el fungicida.

**Tabla 5.12:** Resultados del modelo de regresión logística ordinal sobre los valores de severidad en los experimentos de control en finca Bella Vista 2011-2012.

Fuente de variación	Estimación	Error estándar	Valor <i>t</i>	<i>P</i> -valor <sup>b</sup>
<b>2011</b>				
Factor tratamiento <sup>a</sup>	-2,7024	0,0621	-43,5453	0,00e <sup>+00**</sup>
Puntos de corte				
0 1	-2,7161	0,0564	-48,1717	0,00e <sup>+00</sup>
1 2	-1,3275	0,044	-30,1749	7,32e <sup>-185</sup>
2 3	-0,6461	0,0401	-16,1087	2,55e <sup>-57</sup>
<b>2012</b>				
Factor tratamiento	-1,0483	0,0517	-20,2775	1,05e <sup>-88**</sup>
Puntos de corte				
0 1	-3,6715	0,0714	-51,438	0,00e <sup>+00</sup>
1 2	-1,4951	0,0422	-35,4203	1,87e <sup>-249</sup>
2 3	-0,6905	0,0385	17,9441	1,97e <sup>-70</sup>

<sup>a</sup> En todos los contrastes de hipótesis como referente el testigo sin tratar.

<sup>b</sup> \*\*Significativo a  $P < 0,01$ ; \*Significativo a  $P < 0,05$ ; <sup>n.s.</sup> No significativo  $P \geq 0,05$ .

En 2012, se observó que las probabilidades de que aparecieran valores de la categoría 3 son mayores en los árboles testigo (0,74) a diferencia de una menor probabilidad (0,33) en los árboles tratados con el fungicida. (Tabla 5.13). En 2013, nuevamente se observaron diferencias en las probabilidades en la categoría 3 de la escala en donde los árboles testigo presentaron una alta probabilidad (0,74) a diferencia de una menor probabilidad (0,33) en los árboles tratados (Tabla 5.13).

En el caso de los experimentos en finca Bella Vista, las probabilidades de las predicciones del modelo logístico ordinal para cada una de las categorías de severidad en los árboles tratados y testigo se presentan en la Tabla 5.14. En 2011, se obtuvo una probabilidad de 0,50 para la categoría 0 de la escala de severidad en los árboles tratados con fungicida respecto a una probabilidad de 0,06 en los árboles testigo. También se observaron diferencias en las probabilidades de la categoría 3 de la escala, donde los árboles testigo presentaron una alta probabilidad (0,66) a diferencia de una baja probabilidad (0,11) en los árboles

tratados con el fungicida. En 2012, se observó que la probabilidad de la categoría 3 es mayor en los árboles testigo (0,67) respecto a los árboles tratados con el fungicida (0,41) (Tabla 5.14).

**Tabla 5.13:** Probabilidades obtenidas con el modelo de regresión logística ordinal para las categorías de severidad de la mancha grasienta en los experimentos de Gabriela en 2011, 2012 y 2013.

Año	Tratamiento	Categorías de la escala de severidad de la mancha grasienta			
		0	1	2	3
2011	Tratado	0,57	0,24	0,08	0,11
	No tratado	0,04	0,07	0,08	0,81
2012	Tratado	0,05	0,38	0,24	0,33
	No tratado	0,01	0,10	0,14	0,75
2013	Tratado	0,03	0,37	0,27	0,33
	No tratado	0,00	0,09	0,16	0,74

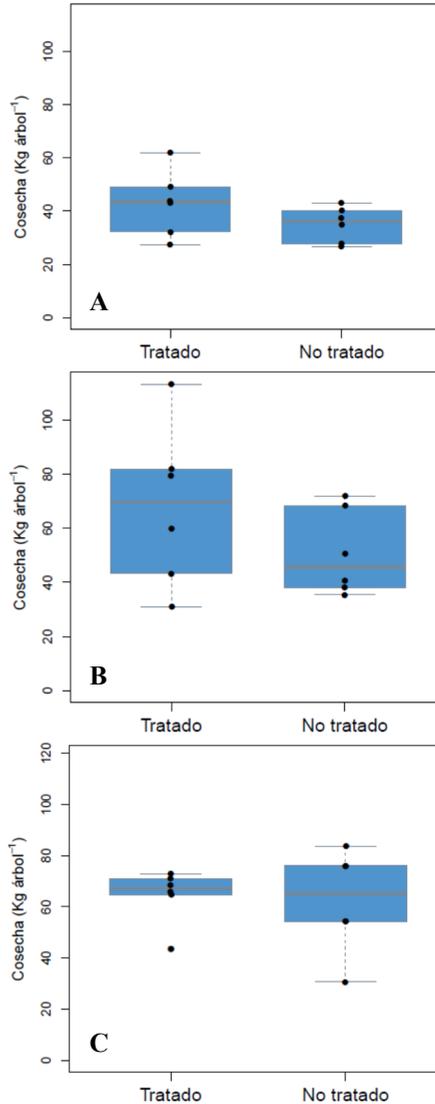
**Tabla 5.14:** Probabilidades obtenidas con el modelo de regresión logística ordinal para las categorías de severidad de la mancha grasienta en los experimentos de Bella Vista en 2011 y 2012.

Año	Tratamiento	Categorías de la escala de severidad de la mancha grasienta			
		0	1	2	3
2011	Tratado	0,50	0,30	0,09	0,11
	No tratado	0,06	0,15	0,13	0,66
2012	Tratado	0,07	0,32	0,20	0,41
	No tratado	0,02	0,16	0,15	0,67

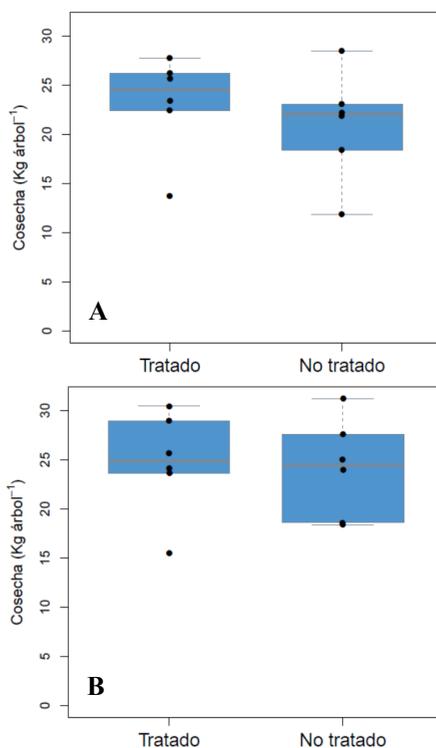
### 5.3.2.2. Rendimiento de la cosecha

En los diagramas de cajas de los datos de cosecha de los experimentos de la finca Gabriela se observa un solape de las cajas y por tanto, no se presumen

diferencias entre la cosecha de los árboles tratados y la de los testigo en cada uno de los años de estudio (Fig. 5.34 A-C). De igual manera, se observa también un solape de las cajas en los experimentos de la finca Bella Vista en los años de estudio 2011 y 2012 (Fig. 5.35 A y B).



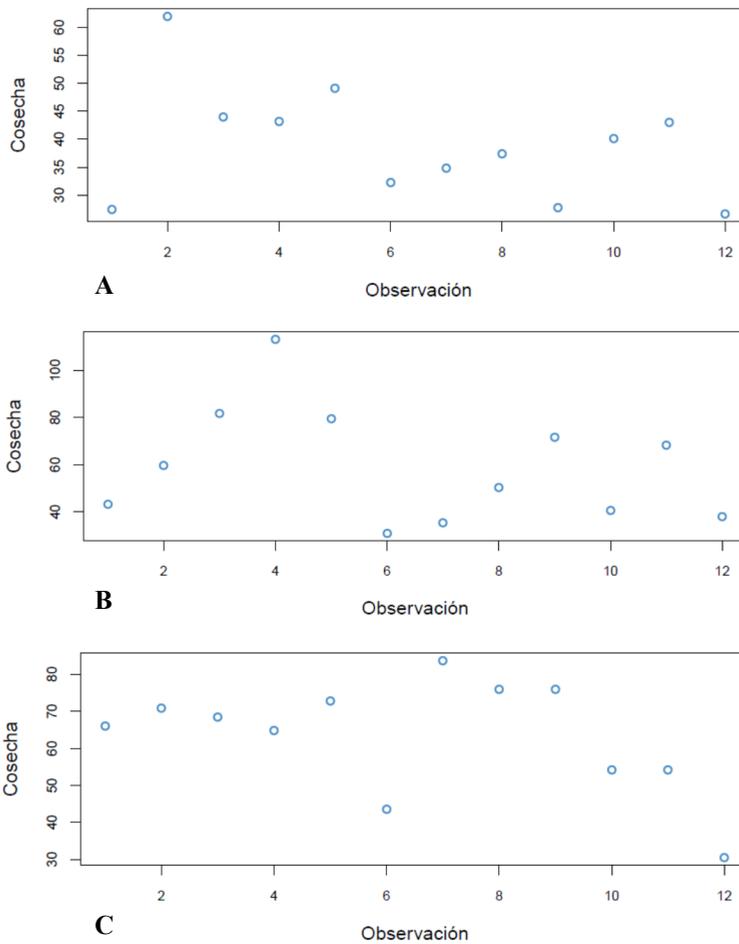
**Figura 5.34:** Diagrama de cajas de la cosecha (kg árbol<sup>-1</sup>) en los árboles tratados y no tratados con el fungicida fenbuconazol en la finca Gabriela en los años de estudio **A)** 2011; **B)** 2012; **C)** 2013.



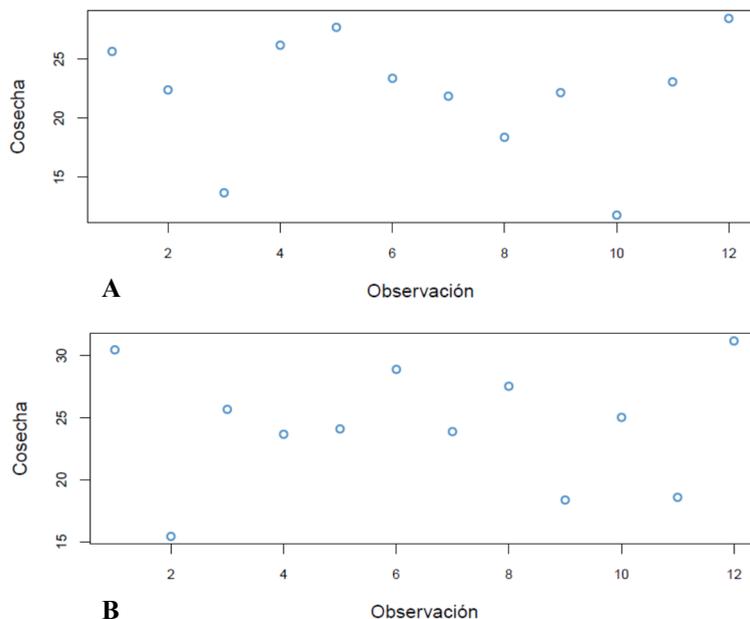
**Figura 5.35:** Diagrama de cajas de la cosecha (kg árbol<sup>-1</sup>) en los árboles tratados y no tratados con el fungicida fenbuconazol en la finca Bella Vista en los años de estudio **A)** 2011; **B)** 2012.

Previo al análisis ANOVA, los datos de cosecha de los experimentos de Gabriela se sometieron a diferentes pruebas estadísticas para verificar si cumplían con los criterios de aplicabilidad de este tipo de análisis. Para ello, a los datos se les aplicó el test de normalidad de Shapiro-Wilk, no detectándose desviaciones significativas en 2011 ( $P= 0,3588$ ), 2012 ( $P= 0,2861$ ) y 2013 ( $P= 0,3358$ ). De igual manera, se les aplicó el test de homogeneidad de varianza de Bartlett, no detectándose problemas de homogeneidad de varianza en 2011 ( $P= 0,2011$ ), 2012 ( $P= 0,1928$ ) y 2013 ( $P= 0,1978$ ). Por último, se obtuvieron gráficos de la variable de estudio, mostrando que los datos tenían una distribución aleatoria en los tres años y por tanto, se cumplía la hipótesis de independencia (Fig. 5.36).

De igual manera, los datos de cosecha de los experimentos en la finca Bella Vista se sometieron a las mismas pruebas estadísticas para verificar si cumplían con los supuestos de aplicabilidad del ANOVA. A los datos se les aplicó el test de normalidad de Shapiro-Wilk, sin desviaciones significativas en 2011 ( $P=0,1947$ ) y 2012 ( $P=0,5761$ ). El test de homogeneidad de varianza de Bartlett no detectó problemas de heterocedasticidad en 2011 ( $P=0,8396$ ) y 2012 ( $P=0,9214$ ). Los gráficos indicaron que los datos tenían una distribución aleatoria en los dos años de estudio (Fig. 5.37).



**Figura 5.36:** Representación gráfica de la cosecha de frutos ( $\text{kg arbol}^{-1}$ ) obtenida en la finca Gabriela **A)** 2011; **B)** 2012; **C)** 2013.



**Figura 5.37:** Representación gráfica de la cosecha de frutos (kg árbol<sup>-1</sup>) obtenida en la finca Bella Vista **A)** 2011; **B)** 2012.

El análisis ANOVA aplicado a la variable rendimiento de la cosecha de frutos (kg árbol<sup>-1</sup>) en los ensayos en finca Gabriela no detectó diferencias significativas entre los árboles tratados y testigo en los años 2011 ( $P= 0,1921$ ), 2012 ( $P= 0,2384$ ) y 2013 ( $P= 0,833$ ) (Tabla 5.16). De igual forma, en los ensayos en finca Bella Vista tampoco se detectaron diferencias significativas entre los árboles tratados y testigo en los años 2011 ( $P= 0,4837$ ) y 2012 ( $P= 0,8429$ ) (Tabla 5.17). Estos resultados indican que en ninguno de los experimentos ni años evaluados se detectó un efecto significativo del tratamiento con fenbuconazol en la producción de frutos de los árboles de pomelo y naranja.

**Tabla 5.15:** Análisis de la varianza (ANOVA) realizado sobre la cosecha de frutos (kg arbol<sup>-1</sup>) en la finca Gabriela en 2011, 2012 y 2013.

Año	Factor	g.l. <sup>a</sup>	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de <i>F</i>	<i>P</i> -valor <sup>b</sup>
2011	Tratamiento	1	190,56	190,563	1,9567	0,1921 <sup>n.s.</sup>
	Residual	10	973,91	97,391	---	---
2012	Tratamiento	1	893,2	893,21	1,5723	0,2384 <sup>n.s.</sup>
	Residual	10	5680,8	568,08	---	---
2013	Tratamiento	1	11,84	11,841	0,0468	0,833 <sup>n.s.</sup>
	Residual	10	2528,14	252,814	---	---

<sup>a</sup> Grados de libertad.

<sup>b</sup> \*\*Significativo a  $P < 0,01$ ; \*Significativo a  $P < 0,05$ ; n.s. No significativo  $P \geq 0,05$ .

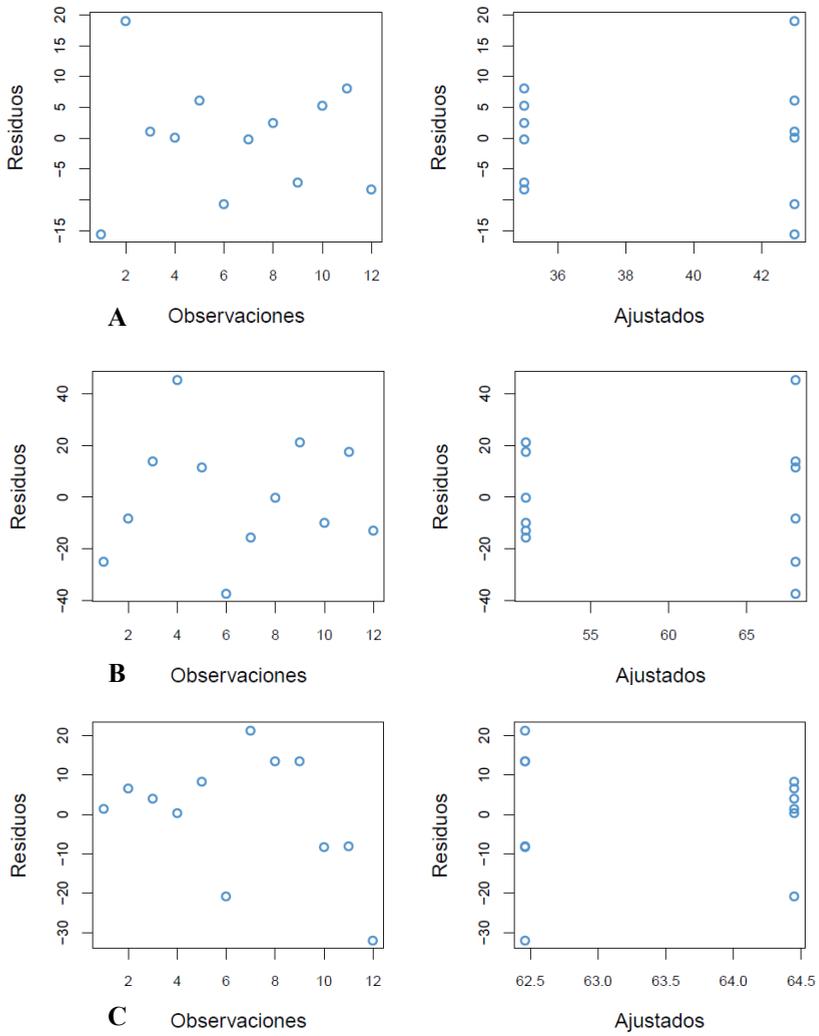
**Tabla 5.16:** Análisis de la varianza (ANOVA) realizado sobre la cosecha de frutos (kg arbol<sup>-1</sup>) en la finca Bella Vista en 2011 y 2012.

Año	Factor	g.l. <sup>a</sup>	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de <i>F</i>	<i>P</i> -valor <sup>b</sup>
2011	Tratamiento	1	14,807	14,807	0,5291	0,4837 <sup>n.s.</sup>
	Residual	10	279,853	27,985	---	---
2012	Tratamiento	1	1,098	1,0981	0,0414	0,8429 <sup>n.s.</sup>
	Residual	10	265,504	26,5504	---	---

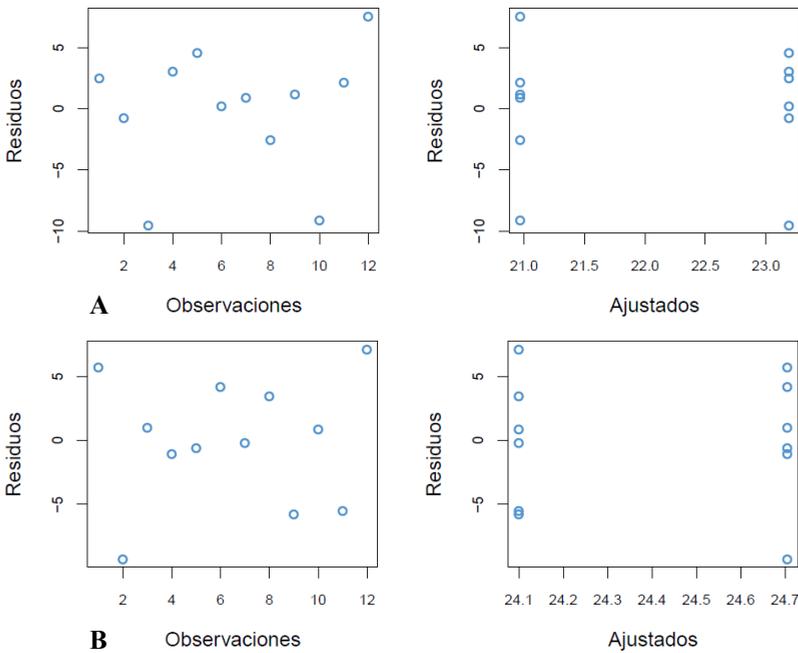
<sup>a</sup> Grados de libertad.

<sup>b</sup> \*\*Significativo a  $P < 0,01$ ; \*Significativo a  $P < 0,05$ ; n.s. No significativo  $P \geq 0,05$ .

Se realizó un diagnostico del modelo comprobando la hipótesis de normalidad de los residuos mediante el test de Shapiro-Wilk en el modelo ajustado para los datos de cosecha de la finca Gabriela en 2011 ( $P = 0,6689$ ), 2012 ( $P = 0,8281$ ) y 2013 ( $P = 0,2235$ ) y la finca Bella Vista en 2011 ( $P = 0,072$ ) y 2012 ( $P = 0,7338$ ). El test de Breusch-Pagan no detectó problemas de heterocedasticidad de las varianzas en Gabriela en 2011 ( $P = 0,1463$ ), 2012 ( $P = 0,1215$ ) y 2013 ( $P = 0,156$ ) ni tampoco en Bella Vista en 2011 ( $P = 0,8118$ ) y 2012 ( $P = 0,8878$ ). Por último, se comprobó la independencia de los residuos mediante su representación gráfica (Fig. 5.38 y Fig. 5.39).



**Figura 5.38:** Gráfico de los residuos del modelo ANOVA ajustado para los datos de cosecha obtenidos en la finca Gabriela **A)** 2011; **B)** 2012; **C)** 2013.



**Figura 5.39:** Gráfico de los residuos del modelo ANOVA ajustado para los datos de cosecha obtenidos en la finca Bella Vista **A)** 2011; **B)** 2012.

## 5.4. DISCUSIÓN

En el estudio de la dinámica de la defoliación de los árboles de naranja ‘Valencia’ afectados por mancha grasienta se observó que la mayor caída de hojas se daba entre los meses de diciembre a abril. En Panamá, estos meses se caracterizan por ser cálidos y secos con precipitaciones pluviales relativamente bajas de unos 100 mm mensuales (CCKP, 2015). Durante este período las plantaciones de cítricos no suelen regarse, por lo que probablemente el estrés hídrico favorezca una mayor defoliación en los árboles afectados por la mancha grasienta. En Florida, donde el invierno y la primavera son relativamente secos, Timmer y Gottwald (2000) indican que la caída de las hojas se produce principalmente desde finales de enero hasta abril. Resultados similares se encontraron en nuestro estudio, donde el período que presentó una mayor defoliación de los árboles coincidió con los meses secos de verano. No obstante, hay que tener en cuenta que no todas las hojas defoliadas son debidas al efecto de

la enfermedad ya que los cítricos sufren también una pérdida natural de hojas. En un futuro, lo recomendable sería realizar experimentos con árboles tratados y no tratados con fungicidas para determinar de forma más precisa el efecto de la enfermedad en la defoliación.

En el análisis estadístico de la variable respuesta DDH (días hasta la descomposición total de las hojas), el modelo resultante detectó un efecto estadísticamente significativo de las variables explicativas DPP, PPA y HRP. La variable DPP indica que, manteniendo el resto de variables constantes, los días hasta la descomposición total de las hojas aumentarían en un 3% por cada día con precipitaciones pluviales  $>1$  mm. Mondal y Timmer (2002) citan que períodos de humedad de entre tres y cinco días por semana aceleran la descomposición de las hojas de cítricos comparados con períodos de humedad de entre uno y dos días por semana, donde el proceso de descomposición es más lento. De hecho, en la mayoría de plantas, la tasa de descomposición de la hojarasca aumenta con la temperatura y la pluviometría (Zhang *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo parecen contradecir estos estudios. No obstante, hay que tener en cuenta que la variable DPP considera todas las precipitaciones  $>1$  mm, lo que incluye también los días con precipitaciones de tan solo unos pocos mm, que apenas tendrían trascendencia en el proceso de descomposición de las hojas. En Panamá, estas lluvias de poco volumen son muy frecuentes durante la época seca con un rango promedio de entre  $1 - 10$  mm día<sup>-1</sup>. Cuanto más largo sea el período de permanencia de las hojas en el suelo (mayor número de días hasta su descomposición total), se incrementaría también el número acumulado de días con este tipo de precipitaciones de poca intensidad, de ahí la relación positiva entre ambas variables.

En el caso de la variable PPA, el modelo indica que los días hasta la descomposición total de las hojas disminuirían ligeramente si aumentan las precipitaciones pluviales acumuladas. En experimentos de campo realizados por Mondal y Timmer (2002) en Florida encontraron que el aumento en las precipitaciones acumuladas de verano favorecía la rápida descomposición de las hojas de cítricos. En Panamá, la época de lluvias ocurre durante los meses de mayo a noviembre con precipitaciones pluviales promedio superiores a 200 mm por mes, lo que posiblemente favorezca la rápida descomposición de las hojas (CCKP, 2015). A diferencia de la variable DPP, la PPA considera la

precipitación acumulada total y es un indicador mas adecuado de la pluviometría que han soportado las hojas en el suelo.

La variable HRP es la que mayor variabilidad aportó en el modelo, indicando que los días hasta la descomposición total de las hojas disminuirían en un 10,48% si aumenta la humedad relativa promedio. Mondal y Timmer (2002) señalaron que la descomposición de la hojarasca era más rápida con humedades relativas cercanas al 100% y temperaturas entre 28 y 30 °C, mientras que con temperaturas bajas era más lenta. En nuestro estudio la HRP media fue de 82,42%, mientras que la TP registrada se situó en 25 °C, lo que coincide en cierta manera con los resultados de Mondal y Timmer (2002) en cítricos y con los estudios en otras especies vegetales, que indican que la descomposición de la hojarasca se ve favorecida por las altas humedades relativas.

En el presente estudio la identificación de las ascosporas se basó en las características morfológicas de *Z. citri-griseum* descritas en el apdo. 3.3.2. sin embargo esta técnica podría no ser suficientemente precisa en el caso de que coexistan otras especies de *Mycosphaerellaceae* en la hojarasca. La presencia de *Z. citri-griseum* en la parcela experimental se confirmó también por métodos moleculares, pero en cualquier caso sería necesario desarrollar y validar técnicas moleculares que permitieran detectar y cuantificar las diferentes especies de *Mycosphaerellaceae* de cítricos en los sistemas de aerobiología. Actualmente, este aspecto está lejos de estar resuelto.

Con la variable número de ascosporas liberadas por muestra mensual de hojas hasta su descomposición total (ASCH), el modelo mostró un efecto estadísticamente significativo de las variables DDH, DPP, PPA y TP. Con la variable DDH el modelo indicó que el número de ascosporas liberadas aumentaría en 5,3% por cada día que se prolongue el período de descomposición de las hojas. Esto podría atribuirse a que una mayor duración de las hojas en el suelo, implica una mayor oportunidad para la formación y maduración de pseudotecios y por ende un aumento en el número de ascosporas producidas.

Con respecto a la variable DPP, el modelo indicó que el número de ascosporas liberadas disminuirá en 12,98% si aumentaban el número de días con precipitaciones pluviales >1 mm. En experimentos en condiciones controladas, Mondal *et al.* (2003) encontraron que el mayor número de ascosporas liberadas se conseguía al humedecer las hojas una sola vez. Sin embargo, al ser

humedecidas sucesivamente durante varios días, la cantidad de ascosporas disminuía considerablemente con respecto al día inicial. Por otra parte, como ya se ha comentado, la variable DPP incluye también los días con precipitaciones poco importantes, que probablemente no tengan una gran influencia en el proceso de formación y liberación de ascosporas.

Con la variable PPA el modelo indicó que el número de ascosporas liberadas aumentaba en tan solo 0,82% por cada mm de precipitación pluvial acumulada. Por lo tanto, la magnitud de este efecto sobre la liberación de ascosporas sería directamente proporcional a la pluviometría acumulada durante el período de permanencia de las hojas en el suelo. En relación a la variable TP, que fue la que mayor variabilidad aportó al modelo con un riesgo relativo de 4,213, indicaba que a mayor aumento en la temperatura promedio durante el período de permanencia de las hojas en el suelo, mayor era el aumento de ascosporas liberadas. Se ha reportado que la mayor cantidad de ascosporas liberadas a partir de hojas en descomposición se da con un rango de temperatura de 28-30 °C (Mondal y Timmer, 2002). En nuestra zona de estudio se registraron condiciones similares de temperatura, con 25 °C en promedio que no varió sustancialmente durante todo el año, condición que probablemente favorezca una liberación constante de las ascosporas.

En el análisis de los datos de inóculo disponible en el aire se logró determinar los momentos con el mayor número de ascosporas capturadas. En el gráfico descriptivo de la variable número de ascosporas capturadas (Fig. 5.9) se observa que en los dos años de estudio los picos más altos de disponibilidad se dieron durante los meses de abril y mayo, momento en que se inicia la época lluviosa y a su vez coincide con las brotaciones cítricas. En Costa Rica, Hidalgo *et al.* (1997) han citado resultados similares que indican una mayor disponibilidad de inóculo del patógeno en el mes junio, coincidiendo con el inicio de la época lluviosa. En Florida, el mayor número de ascosporas disponibles se da durante los meses de abril y mayo (Timmer *et al.*, 1995; Timmer *et al.*, 2000). En nuestro estudio, el método de captura de ascosporas en los portaobjetos permitió determinar los momentos de mayor cantidad de inóculo. Como ya se ha comentado anteriormente, es probable que durante el desarrollo del estudio se hayan capturado ascosporas de otras especies de *Mycosphaerellaceae* siendo difícil diferenciarlas de *Z. citri-griseum*. No

obstante, las capturas de ascosporas se realizaron en una parcela fuertemente afectada por la mancha grasienta, donde se había comprobado la presencia de *Z. citri-griseum* con métodos moleculares. Además, el área experimental era lo suficientemente grande para garantizar la disponibilidad del inóculo de la especie patógena en estudio y no de otras especies externas.

El modelo seleccionado para la variable número de ascosporas capturadas (ASC) incorpora el efecto de la componente temporal autorregresiva de orden 1 junto con las variables meteorológicas DPP y PPA. La componente temporal indicó que el número de ascosporas presentes en una semana estaba relacionado con el número de ascosporas registradas en la semana anterior. Estos resultados sugieren que el comportamiento de las ascosporas disponibles en el aire probablemente no experimente cambios bruscos de una semana a otra, si no más bien evolucionan de forma creciente o decreciente de acuerdo a la época del año. En este sentido, el efecto de la variable meteorológica DPP en el modelo indicaría que las ascosporas aumentarían en la medida en que aumenten el número de días con precipitación pluvial  $>1$  mm.

En los dos años de estudio, los momentos con mayor número de ascosporas registradas fueron precedidos por períodos relativamente secos en donde las hojas se descomponen más lentamente. En estos períodos de verano la hojarasca recibe lluvias de baja frecuencia, lo que favorece que las hojas estén húmedas en algunos momentos pero que luego se sequen rápidamente. Estas condiciones probablemente favorecen una mayor formación y maduración de los pseudotecios presentes en la hojarasca en el momento del inicio de la época de lluvias. En Florida, Whiteside (1970) indicó que los períodos alternos de mojado y secado de las hojas aceleran la formación de pseudotecios de *Z. citri-griseum* en las hojas en proceso de descomposición. Por otro lado, el modelo incluyó también a la variable PPA, indicándo que el número de ascosporas capturadas aumentaría en la medida en que se incremente el volumen de lluvia acumulada. En Panamá, las lluvias experimentan un incremento en la época de invierno, desde mayo a noviembre, con promedios de precipitación mensual de unos 200 mm, con un aumento en la frecuencia de las lluvias. Estas condiciones climáticas favorecerían una rápida descomposición de las hojas, limitando la formación y maduración de los pseudotecios y en consecuencia también una menor producción de ascosporas.

En lo que respecta a la incidencia de la mancha grasienta en las plantas trampa, se observaron oscilaciones en los dos años de estudio. Los mayores valores de incidencia se presentaron al inicio de la época lluviosa, en los meses de abril a junio, coincidiendo con la máxima disponibilidad de ascosporas. Sin embargo, aunque más bajos, se registraron también valores de incidencia fuera de ese período, indicando que las infecciones pueden ocurrir durante todo el año. Timmer *et al.* (1995) señalaron que si las condiciones ambientales son favorables y hay inóculo disponible, las infecciones de *Z. citri-griseum* pueden ocurrir prácticamente en cualquier momento del año. Por su parte, Timmer *et al.* (2000) indicaron que en Florida los daños de la mancha grasienta en las plantas trampa pueden ser de moderados a altos durante todo el año, excepto en los meses más fríos de noviembre a febrero.

El modelo seleccionado para la incidencia de la mancha grasienta integró de forma aditiva el efecto de la componente temporal y las variables meteorológicas HH y PH. Al igual que en la variable número de ascosporas capturadas, la componente temporal indica que la incidencia de la mancha grasienta en las plantas trampa en una semana dependerá de la incidencia registrada en las plantas trampa de la semana anterior. El modelo incorpora a su vez las variables HH y PH, indicando que los períodos de humectación cortos y frecuentes favorecerían las infecciones de *Z. citri-griseum* en las plantas trampa. En Florida, Whiteside (1974) indicó que los períodos de humectación de al menos 6 h durante varias noches consecutivas favorecerían las infecciones de *Z. citri-griseum*. En nuestro estudio, la duración de los períodos de humectación fue de 11 h en promedio que junto con las altas humedades relativas, probablemente son suficientes para el desarrollo del micelio epifítico sobre las hojas que daría lugar a las infecciones.

Los modelos resultantes para las variables número de ascosporas capturadas (ASC) y la incidencia (INC) presentaron en general una baja capacidad predictiva. Esto probablemente pueda atribuirse a la duración del período de estudio y a la limitada cantidad de datos, ya que para los análisis de series temporales es necesario disponer de una mayor cantidad de años para obtener predicciones más fiables. En cualquier caso, los modelos han permitido identificar los factores climáticos relacionados con la presencia de ascosporas en el aire y las infecciones de las plantas trampa. Esta información permitirá avanzar

en el diseño de estrategias de control más eficientes de la mancha grasienta en Panamá.

Como ya se ha indicado, el hongo *Z. citri-griseum* es un patógeno sensible a un amplio rango de productos, como los aceites minerales, fungicidas cúpricos, benzimidazoles, inhibidores de la biosíntesis del esterol y estrobilurinas (Timmer y Gottwald, 2000; Timmer *et al.*, 2004). Los primeros ensayos de control de la mancha grasienta los realizó Whiteside (1973a) en condiciones controladas utilizando productos como el aceite mineral, sulfato de cobre tribásico y benomilo. Los resultados obtenidos indicaron que el único producto capaz de reducir la severidad de la enfermedad con respecto al testigo era el aceite mineral, aplicado antes o después de las inoculaciones del patógeno. Posteriormente, Whiteside (1982) presentó los resultados de una serie de experimentos realizados durante 1977-1981 en parcelas de pomelos con los mismos productos ensayados en condiciones controladas. En este nuevo estudio, se comprobó que todos eran capaces de controlar la enfermedad en campo, aunque su eficacia variaba de un año a otro. Aunque los aceites minerales son eficaces para el control de la mancha grasienta, se desconoce cuál es exactamente su modo de acción frente a *Z. citri-griseum*. Su actividad sobre el patógeno se atribuye a un efecto de inhibición sobre el crecimiento miceliar epifítico, así como también a una posible inducción de resistencia de la planta evitando el crecimiento del hongo dentro del mesófilo de la hoja (Whiteside, 1973a).

Por otro lado, el fungicida benomilo se ha mostrado eficaz en el control de la mancha grasienta, aunque ha quedado en desuso debido al desarrollo de resistencias (Timmer y Gottwald, 2000). Los productos cúpricos como el hidróxido de cobre y el oxiclóruo de cobre han resultado eficaces en el control de la mancha grasienta (Hidalgo *et al.*, 1997; Timmer *et al.*, 2000). Recientemente se han citado también como eficaces frente a la enfermedad a algunos triazoles como el fenbuconazol y las estrobilurinas (azoxistrobin, piraclostrobin y trifloxistrobin) (Mondal y Timmer, 2006; Dewdney, 2014).

En el presente estudio se comprobó la eficacia del fungicida fenbuconazol para reducir la severidad de la mancha grasienta en las hojas de árboles de pomelo y naranja, de forma consistente en dos parcelas y varios años consecutivos. En 2011 se realizaron tres aplicaciones de fenbuconazol de forma sistemática de mayo a julio, con una reducción significativa de la severidad de la

enfermedad en todas las parcelas y años de estudio. El modelo de regresión logística ordinal mostró una alta probabilidad de valores de severidad 0 en los árboles tratados y una alta probabilidad de severidad 3 en los árboles testigo. Estos resultados coinciden con los de Mondal y Timmer (2003b), que controlaron completamente la mancha grasienta durante un período de 12-18 meses con 1-2 aplicaciones de fenbuconazol.

Estos mismos autores indicaron que si las aplicaciones de fenbuconazol se realizaban de forma temprana se lograba inhibir el desarrollo del crecimiento micelial epifítico del hongo y de esta forma se conseguía controlar completamente la enfermedad. En Florida, las aplicaciones tempranas de fungicidas entre finales de abril a junio proporcionan un buen control de la enfermedad en hojas (Timmer *et al.*, 1995; Timmer *et al.*, 2000). Por su parte, Hidalgo *et al.* (1997) indicaron que en Costa Rica las aplicaciones tempranas de fungicidas cúpricos en el mes de mayo reducían significativamente los daños de la enfermedad. En nuestro caso, las aplicaciones se realizaron coincidiendo con las brotaciones de mayo, justo cuando los resultados del seguimiento epidemiológico indicaban los picos más altos de ascosporas (Fig. 5.9). Es probable que al realizar más de una aplicación del fungicida durante esta etapa crítica se haya logrado controlar el crecimiento epifítico del hongo y por ende los buenos resultados de control obtenidos.

Por otro lado, cuando se realizó una sola aplicación de fenbuconazol en 2012 y 2013, se consiguió también reducir significativamente la severidad de la enfermedad. No obstante, las predicciones del modelo logístico ordinal para la categoría 0 de severidad difirieron considerablemente con respecto las obtenidas en 2011. En cambio, las probabilidades asociadas a la categoría 3 de la escala mostraron un comportamiento similar respecto a las de 2011. En la finca Gabriela, la probabilidad para esta categoría de severidad en los árboles testigo fue el doble que la obtenida para los árboles tratados. En finca Bella Vista en 2012 la probabilidad para la categoría 3 de severidad en los árboles no tratados fue de 0,67 respecto a un 0,41 en los árboles tratados.

Bhatia *et al.* (2002), en un experimento realizado durante 2000 y 2001, concluyeron que con una sola aplicación de fenbuconazol se obtuvo una reducción moderada de la severidad de la mancha grasienta. Posteriormente, en experimentos realizados en 2002 y 2003 en pomelos ‘Marsh’ redujeron

prácticamente a la mitad la severidad de los daños foliares de la enfermedad respecto a los árboles no tratados (Johnston y Timmer, 2004a). Se obtuvieron resultados similares en las evaluaciones realizadas en pomelo 'Red Blush', donde con un solo tratamiento de fenbuconazol se redujo significativamente la severidad de la mancha grasienta (Johnston y Timmer, 2004b). Estos resultados son similares a los obtenidos en nuestros experimentos en Panamá, donde con una sola aplicación de fenbuconazol se logró reducir significativamente la severidad de la enfermedad.

A pesar de la reducción significativa de la severidad de la mancha grasienta en los árboles tratados con fenbuconazol, no se encontraron diferencias significativas entre la cosecha de frutos de los árboles tratados respecto a los no tratados. Actualmente, existe muy poca información disponible sobre el efecto de los fungicidas en el incremento de la cosecha en los árboles afectados por la mancha grasienta. En trabajos realizados en Texas, bajo unas condiciones climáticas menos favorables para la enfermedad, Timmer *et al.* (1980) evaluaron durante cuatro años diferentes estrategias de aplicación de fungicidas para el control de la mancha grasienta. Aunque se obtuvieron reducciones significativas de la severidad de la enfermedad en los árboles tratados, ninguna de las estrategias evaluadas aumento significativamente la cosecha. Estos resultados coinciden con los de nuestro estudio, donde se demostró la eficacia del tratamiento con fenbuconazol sobre la severidad de la enfermedad, pero sin detectarse un incremento significativo de la cosecha en los árboles tratados.

Un aspecto muy importante a considerar sería la realización de ensayos de control que abarcaran un mayor número de años, ya que posiblemente los árboles tratados necesiten períodos mas largos para la completa recuperación de su masa foliar y poder así traducirse en un efecto detectable en la cosecha. Por otro lado, habría que considerar la concurrencia de otros factores agronómicos limitantes, como las deficiencias nutricionales o el estrés hídrico estacional, que podrían limitar el potencial productivo de los árboles más allá del efecto de la enfermedad.

En conclusión, en el presente estudio se logró determinar que la mayor disponibilidad de inóculo del hongo *Z. citri-griseum* ocurre entre los meses de abril y mayo, así como también el mayor número de infecciones, que por otra parte pueden darse con menor incidencia en otras épocas del año. También se

determinó el efecto del fungicida fenbuconazol sobre la reducción de la severidad de la mancha grasienta en hojas de árboles de pomelo y naranja en Panamá. Las aplicaciones realizadas en el mes de mayo lograron reducir significativamente la severidad de la enfermedad con respecto a los árboles no tratados, pero no se detectó un efecto significativo sobre la cosecha.



## Capítulo 6

---



# Capítulo 6

## CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en cada uno de los capítulos de la presente tesis doctoral, se extraen las siguientes conclusiones:

### Capítulo 3. Prospección de enfermedades fúngicas en los cítricos de Panamá

1. Se confirmó la presencia en Panamá de la mancha grasienta causada por *Zasmidium citri-griseum*, la melanosis causada por *Diaporthe citri*, la roña de los cítricos causada por *Elsinoë fawcettii* y la caída prematura de frutos y antracnosis causada por *Colletotrichum acutatum*.
2. La presencia de la mancha grasienta de los cítricos causada por *Z. citri-griseum* se confirmó en el 68% de las parcelas prospectadas en Panamá, considerándose la enfermedad fúngica más prevalente de los cítricos en Panamá.
3. No se detectó la presencia en Panamá de ninguna de las siguientes enfermedades cuarentenarias: la mancha negra causada por *Phyllosticta citricarpa*, la cercosporiosis causada por *Pseudocercospora angolensis* y la roña de la naranja causada por *Elsinoë australis*.

**Capítulo 4. Especies de *Mycosphaerellaceae* asociadas con la mancha grasienta de los cítricos en diferentes regiones climáticas**

4. Se identificó la especie *Amycosphaerella africana* asociada a la mancha grasienta de los cítricos en España y Marruecos y *Z. citri-griseum* como agente causal de la mancha grasienta en Panamá, estando asociada también a la enfermedad en Ghana.

**Capítulo 5. Epidemiología y control de la mancha grasienta de los cítricos en Panamá**

5. La mayor defoliación de los árboles de naranja ‘Valencia’ afectados por mancha grasienta se dio durante la época relativamente seca de diciembre a abril.
6. Los días hasta la descomposición total de la hojarasca se relacionó de forma negativa con la precipitación pluvial acumulada por semana y la humedad relativa promedio por semana y positivamente con los días con precipitación pluvial >1 mm por semana.
7. El número de ascosporas de *Zasmidium citri-griseum* liberadas de la hojarasca se relacionó positivamente con los días hasta la descomposición total de las hojas, la precipitación pluvial acumulada por semana y la temperatura promedio y de forma negativa con los días con precipitación pluvial >1 mm por semana.
8. La mayor disponibilidad de inóculo de *Z. citri-griseum* en Panamá se registró en abril y mayo, disminuyendo notablemente con el inicio de la estación de lluvias. Los valores más altos de incidencia de la mancha grasienta en las plantas trampa coincidieron con estos meses de mayor disponibilidad de inóculo. Aunque con menor incidencia, se registraron también infecciones en otras épocas del año.
9. El número de ascosporas capturadas y la incidencia de la mancha grasienta en las plantas trampa se relacionaron con los valores registrados en la semana anterior así como con algunas variables climáticas. En concreto, el

número de ascosporas capturadas por semana se relacionó de forma positiva con los días con precipitación pluvial  $>1$  mm por semana y negativamente con precipitación pluvial acumulada por semana. La incidencia de la mancha grasienta se relacionó positivamente con los períodos de humectación  $>1$  h por semana y de forma negativa con la humectación semanal. Aunque los modelos mejoraron notablemente al incorporar la componente temporal, su capacidad predictiva fue baja.

10. Con la aplicación foliar del fungicida fenbuconazol en el mes de mayo se consiguió reducir significativamente la severidad de la mancha grasienta respecto a los árboles no tratados. No obstante, no se detectó ningún efecto de los tratamientos fungicidas sobre la cosecha de frutos.



## Capítulo 7

---



# Capítulo 7

## BIBLIOGRAFÍA

- Agostini, J. P., Bushong, P. M., Bhatia, A., and Timmer, L. W. 2003. Influence of environmental factors on severity of citrus scab and melanose. *Plant Disease*, 87:1102-1106.
- Agostini, J. P., Timmer, L. W., and Mitchell, D. J. 1992. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Phytopathology*, 82:1377-1382.
- Aguilera-Cogley, V., and Vicent, A. 2015. Fungal disease of citrus in Panama. *Acta Horticulturae*, 1065:947-952.
- Aguín, O., Sainz, M. J., Ares, A., Otero, L., and Mansilla, J. P. 2013. Incidence, severity and causal fungal species of *Mycosphaerella* and *Teratosphaeria* diseases in *Eucalyptus* stands in Galicia (NW Spain). *Forest Ecology and Management*, 302:379-389.
- Akaike H (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19:716–723
- Aptroot, A. 2006. *Mycosphaerella* and its anamorphs: conspectus of *Mycosphaerella*: Centraalbureau voor Schimmelcultures. 231 pp.
- Arzanlou, M., Groenewald, J., Fullerton, R., Abeln, E., Carlier, J., Zapater, M.-F., Buddenhagen, I., Viljoen, A., and Crous, P. 2008. Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and related anamorphs on banana. *Persoonia*, 20:19-37.

- Arzanlou, M., Groenewald, J., Gams, W., Braun, U., Shin, H. D., and Crous, P. 2007. Phylogenetic and morphotaxonomic revision of *Ramichloridium* and allied genera. *Studies in Mycology*, 58:57-93.
- Barber, P., Carnegie, A. J., Burgess, T., and Keane, P. J. 2008. Leaf diseases caused by *Mycosphaerella* species in *Eucalyptus globulus* plantations and nearby native forest in the Green Triangle Region of southern Australia. *Australasian Plant Pathology*, 37:472-481.
- Bassimba, D. D. M., Mira, J. L., and Vicent, A. 2014. Inoculum sources, infection periods, and effects of environmental factors on *Alternaria* brown spot of mandarin in Mediterranean climate conditions. *Plant Disease*, 98:409-417.
- Bhatia, A., Tesoriero, A., and Timmer, L. 2002. Evaluation of fungicides for control of greasy spot on grapefruit, 2000-2001. Fungicide and Nematicide Tests. Online, Report, 57:V02.
- Bitancourt, A. A., and Jenkins, A. 1936. *Elsinoe fawcettii*, the perfect stage of the Citrus scab fungus. *Phytopathology*, 26:393-395.
- Braun, U., Crous, P. W., and Nakashima, C. 2014. Cercosporoid fungi (*Mycosphaerellaceae*) 2. Species on monocots (*Acoraceae* to *Xyridaceae*, excluding *Poaceae*). *IMA Fungus*, 5:203-390.
- Braun, U., and Urtiaga, R. 2013. New species and new records of cercosporoid hyphomycetes from Cuba and Venezuela (Part 2). *Mycosphere*, 4:165-205.
- Brown, A. E., Sreenivasaprasad, S., and Timmer, L. W. 1996. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology*, 86:523-527.
- Burgess, T. I., Barber, P. A., Sufaati, S., Xu, D., Hardy, G. S. J., and Dell, B. 2007. *Mycosphaerella* spp. on *Eucalyptus* in Asia: new species, new hosts and new records. *Fungal Diversity*, 24:135-157.
- Campbell, C. L., and Madden, L. V. 1990. Introduction to plant disease epidemiology: John Wiley & Sons. 532 pp.

- Cannon, P. F., and Kirk, P. M. 2007. Fungal families of the world: CABI Publishing. 456 pp.
- Carnegie, A. J. 2000. A study of the species of *Mycosphaerella* on eucalypts in Australia and the impact of *Mycosphaerella* leaf diseases on *Eucalyptus globulus* Labill. Melbourne School of Land and Environment, PhD thesis.
- CCKP. 2015. Global climate data. [www.climateknowledgeportal.worldbank.org](http://www.climateknowledgeportal.worldbank.org).
- Crous, P. W. 1998. *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs associated with leaf spot diseases of *Eucalyptus*. Mycologia Memoir. 170 pp.
- Crous, P. W., Braun, U., Hunter, G. C., Wingfield, M. J., Verkley, G., Shin, H.-D., Nakashima, C., and Groenewald, J. Z. 2013. Phylogenetic lineages in *Pseudocercospora*. Studies in Mycology, 75:37-114.
- Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Mansilla, J. P., Hunter, G. C., and Wingfield, M. J. 2004a. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus*. Studies in Mycology, 50:195-214.
- Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Pongpanich, K., Himaman, W., Arzanlou, M., and Wingfield, M. J. 2004b. Cryptic speciation and host specificity among *Mycosphaerella* spp. occurring on Australian acacia species grown as exotics in the tropics. Studies in Mycology, 50:457-469.
- Crous, P., Schoch, C., Hyde, K., Wood, A., Gueidan, C., De Hoog, G., and Groenewald, J. 2009a. Phylogenetic lineages in the Capnodiales. Studies in Mycology, 64:17-47.
- Crous, P. W., Summerell, B. A., Carnegie, A. J., Wingfield, M. J., and Groenewald, J. Z. 2009b. Novel species of *Mycosphaerellaceae* and *Teratosphaeriaceae*. Persoonia, 23:119-146.
- Crous, P. W., Summerell, B. A., Carnegie, A. J., Wingfield, M. J., Hunter, G. C., Burgess, T. I., Andjic, V., Barber, P. A., and Groenewald, J. Z. 2009c. Unravelling *Mycosphaerella*: do you believe in genera? Persoonia, 23:99-118.

- Crous, P. W., and Wingfield, M. J. 1996. Species of *Mycosphaerella* and their anamorphs associated with leaf blotch disease of *Eucalyptus* in South Africa. *Mycologia*, 88:441-458.
- Crous, P. W., Wingfield, M. J., and Park, R. F. 1991. *Mycosphaerella nubilosa* a synonym of *M. molleriana*. *Mycological Research*, 95:628-632.
- Chung, K. R. 2011. *Elsinoë fawcettii* and *Elsinoë australis*: the fungal pathogens causing citrus scab. *Molecular Plant Pathology*, 12:123-135.
- De Blas, B., Iturrutxa, E., and Diez, J. 2009. New species of *Mycosphaerella* causing leaf spot on *Eucalyptus globulus* in Spain. *Australasian Plant Disease Notes*, 4:59.
- De Goes, A., Garrido, R., Reis, R., Baldassari, R. B., and Soares, M. 2008. Evaluation of fungicide applications to sweet orange at different flowering stages for control of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum*. *Crop Protection*, 27:71-76.
- Dewdney, M. M. 2014. Greasy spot. In: M. E. Rogers & M. M. Dewdney (Eds.). 2014 Florida citrus pest management guide (pp. 69-70). Gainesville: University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences.
- Dhingra, O. D., and Sinclair, J. B. 1995. Basic plant pathology methods (2 ed.). CRC Press. 434 pp.
- Fagan, H. 1979. Postbloom fruit drop, a new disease of citrus associated with a form of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Annals of Applied Biology*, 91:13-20.
- Falconí, C. E., Visser, R. G., and van Heusden, A. W. 2013. Phenotypic, molecular, and pathological characterization of *Colletotrichum acutatum* associated with Andean lupine and tamarillo in the Ecuadorian Andes. *Plant Disease*, 97:819-827.
- FAO. 2012. Datos agrícolas de FAOSTAT. [www.faostat.fao.org](http://www.faostat.fao.org)
- Fawcett, H. S. 1912. The cause of stem end rot of citrus fruits (*Phomopsis citri* n. sp.). *Phytopathology*, 2:109-113.

- Fisher, F. 1961. Greasy spot and tar spot of citrus in Florida. *Phytopathology*, 51:297-303.
- Gardes, M., and Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2:113-118.
- Gomes, R., Glienke, C., Videira, S., Lombard, L., Groenewald, J., and Crous, P. 2013. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia*, 31:1-41.
- Goodwin, S. B., and Zismann, V. L. 2001. Phylogenetic analyses of the ITS region of ribosomal DNA reveal that *Septoria passerinii* from barley is closely related to the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Mycologia*, 93: 934-946.
- Grasso, S., Catara, A., and Grasso, F. M. 2005. First report of *Mycosphaerella* sp. associated to gum spots of citrus leaves in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 87:295.
- Guisan, A., and Harrell, F. E. 2000. Ordinal response regression models in ecology. *Journal of Vegetation Science*, 11:617-626.
- Haggag, W. 2012. First report of *Mycosphaerella citri*, the agent of greasy spot of orange in Egypt. *Journal of Plant Pathology*, 94:4
- Hidalgo, H., Sutton, T. B., and Arauz, F. 1997. Epidemiology and control of citrus greasy spot on Valencia orange in the humid tropics of Costa Rica. *Plant Disease*, 81:1015-1022.
- Huang, F., Hou, X., Dewdney, M. M., Fu, Y., Chen, G., Hyde, K. D., and Li, H. 2013. *Diaporthe* species occurring on citrus in China. *Fungal Diversity*, 61:237-250.
- Hunter, G. C., Crous, P. W., Carnegie, A. J., Burgess, T. I., and Wingfield, M. J. 2011. *Mycosphaerella* and *Teratosphaeria* diseases of *Eucalyptus*; easily confused and with serious consequences. *Fungal Diversity*, 50:145-166.
- Hyun, J., Yi, S., MacKenzie, S., Timmer, L., Kim, K., Kang, S., Kwon, H., and Lim, H. 2009. Pathotypes and genetic relationship of worldwide

- collections of *Elsinoë* spp. causing scab diseases of citrus. *Phytopathology*, 99:721-728.
- IDIAP. 2015. Mapas de suelo de Panamá. Laboratorio de suelos del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá.
- IICA. 2009. La fruticultura en Panamá: su potencial socioeconómico e iniciativas para su desarrollo. 169 pp.
- INEC. 2015. Contraloría General de la República de Panamá. [www.contraloria.gob.pa/inec/Default.aspx](http://www.contraloria.gob.pa/inec/Default.aspx)
- Jaen, M. 2010. Manejo sanitario de enfermedades comunes. Serie de frutales N° 4. IDIAP. Panamá. 2 pp.
- Johnston, T., and Timmer, L. 2004a. Evaluation of products for control of citrus greasy spot on Marsh grapefruit, 2002–03. Fungicide and Nematicide Tests. Online, Report, 59:V029.
- Johnston, T., and Timmer, L. 2004b. Evaluation of products for control of citrus greasy spot on Redblush grapefruit, 2002–03. Fungicide and Nematicide Tests. Online, Report, 59:V030.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16:111-120.
- Kotzé, J. M. 2000. Black spot. In: L. W. Timmer, S. M. Garnsey & J. H. Graham (Eds.). *Compendium of citrus diseases* (pp. 23-25). St. Paul, MN: APS Press.
- Luke, H., and Wheeler, H. 1955. Toxin production by *Helminthosporium victoriae*. *Phytopathology*, 45:453-458.
- Lunn, D., Thomas, A., Best, N., and Spiegelhalter, D. 2000. WinBUGS - A bayesian modelling framework: Concepts, structure, and extensibility. *Statistics and Computing*, 10:325-337.
- Magarey, R., Sutton, T., and Thayer, C. 2005. A simple generic infection model for foliar fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 95:92-100.

- Marco, G. M., and Whiteside, J. O. 1986. A disease similar to greasy spot but of unknown etiology on citrus leaves in Argentina. *Plant Disease*, 70:1074.
- Maxwell, A., Dell, B., Neumeister-Kemp, H. G., and Hardy, G. E. S. J. 2003. *Mycosphaerella* species associated with *Eucalyptus* in south-western Australia: new species, new records and a key. *Mycological Research*, 107:351-359.
- MIDA. 2013. Reglamento para la produccion de cítricos en Panamá. Resuelto N° DAL-045-ADM-2013 del Ministerio de Desarrollo Agropecuario de Panamá. [www.mida.gob.pa/upload/documentos/resuelto\\_dal\\_054\\_adm\\_2009\\_sobre\\_citricos.pdf](http://www.mida.gob.pa/upload/documentos/resuelto_dal_054_adm_2009_sobre_citricos.pdf)
- MIDA. 2015. Direccion Nacional de Agricultura - Programa Nacional de Frutales.
- Mondal, S. N., Agostini, J. P., Zhang, L., and Timmer, L. W. 2004. Factors affecting pycnidium production of *Diaporthe citri* on detached citrus twigs. *Plant Disease*, 88:379-382.
- Mondal, S. N., Gottwald, T. R., and Timmer, L. W. 2003. Environmental factors affecting the release and dispersal of ascospores of *Mycosphaerella citri*. *Phytopathology*, 93:1031-1036.
- 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., and Timmer, L. W. 2003a. Effect of urea, CaCO<sub>3</sub>, and dolomite on pseudothecial development and ascospore production of *Mycosphaerella citri*. *Plant Disease*, 87:478-483.
- Mondal, S. N., and Timmer, L. W. 2003b. Relationship of epiphytic growth of *Mycosphaerella citri* to greasy spot development on citrus and to disease control with fenbuconazole. *Plant Disease*, 87:186-192.
- Mondal, S. N., and Timmer, L. W. 2006a. Greasy spot, a serious endemic problem for citrus production in the Caribbean Basin. *Plant Disease*, 90:532-538.

- Mondal, S. N., and Timmer, L. W. 2006b. Relationship of the severity of citrus greasy spot, caused by *Mycosphaerella citri*, to ascospore dose, epiphytic growth, leaf age, and fungicide timing. *Plant Disease*, 90:220-224.
- Mondal, S. N., Vicent, A., Reis, R. F., and Timmer, L. W. 2007. Saprophytic colonization of citrus twigs by *Diaporthe citri* and factors affecting pycnidial production and conidial survival. *Plant Disease*, 91:387-392.
- Mordue, J. E. 1979. *Colletotrichum acutatum*. CMI (Commonwealth Mycological Institute) descriptions of pathogenic fungi and bacteria, N° 630.
- Norvell, L. L. 2011. Fungal nomenclature. 1. Melbourne approves a new code. *Mycotaxon*, 116:481-490.
- Orozco-Santos, M. 1995. Enfermedades presentes y potenciales de los cítricos en Méjico. Universidad Autónoma, Chapingo, Texcoco, Méjico.
- Otero, L., Augín, O., Mansilla, J., Hunter, G., and Wingfield, M. 2006. Identificación de species de *Mycosphaerella* en *Eucalyptus globulus* y *E. nitens* en Galicia. XIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, Murcia. 207 pp.
- Park, R. F., Keane, P. J., Wingfield, M. J., and Crous, P. W. 2000. Fungal diseases of eucalypt foliage. In: P. J. Keane, G. A. Kile, F. D. Podger & B. B. N. (Eds.). *Diseases and pathogens of eucalypts* (pp. 153–239). Collingwood, Victoria: CSIRO.
- Peel, M. C., Finlayson, B. L., and McMahon, T. A. 2007. Updated world map of the Koppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences*, 11:1633-1644.
- 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.
- Peres, N. A., MacKenzie, S. J., Peever, T. L., and Timmer, L. W. 2008. Postbloom fruit drop of citrus and key lime anthracnose are caused by distinct phylogenetic lineages of *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology*, 98:345-352.

- Peres, N. A., Timmer, L. W., Adaskaveg, J. E., and Correll, J. C. 2005. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease*, 89:784-796.
- Pretorius, M., Crous, P., Groenewald, J., and Braun, U. 2003. Phylogeny of some cercosporoid fungi from citrus. *Sydowia*, 55:286-305.
- Quaedvlieg, W., Binder, M., Groenewald, J., Summerell, B., Carnegie, A., Burgess, T., and Crous, P. 2014. Introducing the consolidated species concept to resolve species in the *Teratosphaeriaceae*. *Persoonia*, 33:1-40.
- Rayner, R. W. 1970. A mycological colour chart. Commonwealth Mycological Institute and British Mycological Society.
- Reis, R. F., Goes, A. d., 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.
- Roos, M., and Held, L. 2011. Sensitivity analysis in Bayesian generalized linear mixed models for binary data. *Bayesian Analysis*, 6:259-278.
- Rossmann, A., Udayanga, D., Castlebury, L. A., and Hyde, K. D. 2013. Proposal to conserve the name *Phomopsis citri* HS Fawc. (*Diaporthe citri*), with a conserved type, against *Phomopsis citri* (Sacc.) Traverso & Spessa (Ascomycota: *Diaporthales*: *Diaporthaceae*). *Taxon*, 62:627.
- Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4:406-425.
- Sánchez-Valladares, A. M. 2005. Codificación BBCH de los estadios fenológicos del desarrollo de los agríos. *Levante Agrícola*, 375:140-141.
- Schubert, T., Dewdney, M., Peres, N., Palm, M., Jeyaprakash, A., Sutton, B., Mondal, S., Wang, N. Y., Rascoe, J., and Picton, D. 2014. First report of *Guignardia citricarpa* associated with citrus black spot on sweet orange (*Citrus sinensis*) in North America. *Plant Disease*, 98:780-789.
- Sivanesan, A. 1984. The bitunicate ascomycetes and their anamorphs. Lubrecht & Cramer Ltd. 701 pp.

- Soldevilla, C. G., González, P. C., Teno, P. A., and Vilches, E. D. 2007. Spanish Aerobiology Network (REA): Management and quality manual: Servicio de publicaciones, Universidad de Córdoba. 36 pp.
- Spiegelhalter, D. J., Best, N. G., Carlin, B. P., and Van Der Linde, A. 2002. Bayesian measures of model complexity and fit. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*, 64:583-639.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28:2731-2739.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680.
- Timmer, L. W. 1999. Diseases of fruit and foliage. In: L. W. Timmer & L. W. Duncan (Eds.). *Citrus health management* (pp. 107-115). St. Paul: APS Press.
- Timmer, L., and Zitko, S. 1993. Relationships of environmental factors and inoculum levels to the incidence of postbloom fruit drop of citrus. *Plant Disease*, 77:501-504.
- Timmer, L. W. 2000a. Lime anthracnose. In: L. W. Timmer, S. M. Garnsey & J. H. Graham (Eds.). *Compendium of citrus diseases* (pp. 23). St. Paul, MN: APS Press.
- Timmer, L. W. 2000b. Postbloom fruit drop. In: L. W. Timmer, S. M. Garnsey & J. H. Graham (Eds.). *Compendium of citrus diseases* (pp. 22-23). St. Paul, MN: APS Press.
- Timmer, L. W. 2000c. Scab diseases. In: L. W. Timmer, S. M. Garnsey & J. H. Graham (Eds.). *Compendium of citrus diseases* (pp. 31-33). St. Paul, MN: APS Press.
- Timmer, L. W. 2002a. Mancha grasienta (Greasy spot). In: N. Duran-Vila & P. Moreno (Eds.). *Enfermedades de los cítricos* (pp. 35-36). Madrid, España: SEF.

- Timmer, L. W. 2002b. Roña de los cítricos (*Citrus scab*). In: N. Duran-Vila & P. Moreno (Eds.). Enfermedades de los cítricos (pp. 41-43). Madrid, España: SEF.
- Timmer, L. W., Agostini, J. P., Zitko, S. E., and Zulfiqar, M. 1994. Postbloom fruit drop, an increasingly prevalent disease of citrus in the America. *Plant Disease*, 78:329-334.
- Timmer, L. W., Garnsey, S. M., and Broadbent, P. 2003a. Diseases of citrus. In: R. C. Ploetz (Ed.). *Diseases of tropical fruit crops* (pp. 163-195): CABI Publishing.
- Timmer, L. W., and Gottwald, T. R. 2000. Greasy spot and similar diseases. In: L. W. Timmer, S. M. Garnsey & J. H. Graham (Eds.). *Compendium of citrus diseases* (pp. 25-28). St. Paul, MN: APS Press.
- Timmer, L. W., Gottwald, T. R., McGovern, R. J., and Zitko, S. E. 1995. Time of ascospore release and infection by *Mycosphaerella citri* in central and southwest Florida. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 108:374-377.
- Timmer, L. W., Mondal, S. N., Peres, N. A. R., and Bhatia, A. 2004. Fungal diseases of fruit and foliage of citrus trees. In: S. A. M. H. Naqvi (Ed.). *Diseases of fruits and vegetables volume I* (pp. 191-227): Springer Netherlands.
- Timmer, L. W., Peever, T. L., Solel, Z., and Akimitsu, K. 2003b. *Alternaria* diseases of citrus novel pathosystems. *Phytopathologia Mediterranea*, 42: 3-16.
- Timmer, L. W., Reeve, R. J., and Davis, R. M. 1980. Epidemiology and control of citrus greasy spot on grapefruit in Texas. *Phytopathology*, 70:863-867.
- Timmer, L. W., Roberts, P. D., Darhower, H. M., Bushong, P. M., Stover, E. W., Peever, T. L., and Ibañez, A. M. 2000. Epidemiology and control of citrus greasy spot in different citrus-growing areas in Florida. *Plant Disease*, 84:1294-1298.
- Timmer, L. W., Solel, Z., Gottwald, T. R., Ibañez, 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. 1995. Evaluation of nutritional products and fungicides for control of citrus greasy spot. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 108:83-87.
- Traverso, G. B., and Spessa, C. 1910. La flora micologica del Portogallo. *Boletim da Sociedade Broteriana*, 25:26-187.
- Udayanga, D., Castlebury, L., Rossman, A., and Hyde, K. 2014. Species limits in *Diaporthe*: molecular re-assessment of *D. citri*, *D. cytospora*, *D. foeniculina* and *D. rudis*. *Persoonia*, 32:83-101.
- Verkley, G. J., Crous, P. W., Groenewald, J., Braun, U., and Aptroot, A. 2004. *Mycosphaerella punctiformis* revisited: morphology, phylogeny, and epitypification of the type species of the genus *Mycosphaerella* (Dothideales, Ascomycota). *Mycological Research*, 108:1271-1282.
- Vicent, A. 2006. Enfermedades fungicas de los cítricos en Florida (I). *Levante Agrícola*, 380:155-158.
- Vicent, A., Álvarez, A., Leon, M., and García-Jiménez, J. 2006. *Mycosphaerella* sp. asociada a manchas foliares de cítricos en España. XIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, Murcia. 200 pp.
- Vicent, A., Armengol, J., Cuenca, F., Alfaro-Lassala, F., and 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., 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., Bassimba, D. D. M., and Intrigliolo, D. 2011. Effects of temperature, water regime and irrigation system on the release of ascospores of *Mycosphaerella nawae*, causal agent of circular leaf spot of persimmon. *Plant Pathology*, 60:890-898.

- Vicent, A., Campos, P. A., Armengol, J., and Jiménez, J. G. 2004. Patógenos fúngicos de cuarentena que afectan a los frutos cítricos. I: descripción. *Levante Agrícola*, 371:252-260.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White (Eds.). *PCR protocols, a guide to methods and applications* (pp. 315-322). San Diego, CA: Academic Press.
- Whiteside, J. O. 1970. Etiology and epidemiology of citrus greasy spot. *Phytopathology*, 60:1409-1414.
- Whiteside, J. O. 1972. Histopathology of citrus greasy spot and identification of causal fungus. *Phytopathology*, 62:260-263.
- Whiteside, J. O. 1973a. Action of oil in control of citrus greasy spot. *Phytopathology*, 63:262-266.
- Whiteside, J. O. 1973b. Evaluation of spray materials for control of greasy spot of citrus. *Plant Disease Reporter*, 57:691-694.
- Whiteside, J. O. 1973c. The possibilities of using ground sprays to control citrus greasy spot. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 86:19-23.
- Whiteside, J. O. 1974. Environmental factors affecting infection of citrus leaves by *Mycosphaerella citri*. *Phytopathology*, 64:115-120.
- Whiteside, J. O. 1978. Pathogenicity of 2 biotypes of *Elsinoe Fawcetti* to sweet orange and some other cultivars. *Phytopathology*, 68:1128-1131.
- Whiteside, J. O. 1982. Timing of single spray treatments for optimal control of greasy spot on grapefruit leaves and fruit. *Plant Disease*, 66:687-690.
- Whiteside, J. O. 1986. Semiselective media for the isolation of *Elsinoe fawcettii* from citrus scab pustules. *Plant Disease*, 70:204-206.
- Whiteside, J. O. 2000. Melanosis. In: L. W. Timmer, S. M. Garnsey & J. H. Graham (Eds.). *Compendium of citrus diseases* (pp. 28-30). St. Paul, MN: APS Press.

- Yamada, S. 1956. Studies on the greasy spot (black melanose) of citrus. II. Morphological characteristics of the causal fungus (*Mycosphaerella horii* Hara). Horticulture Division, National Tokai-kinki Agricultural Experiment Station, Okitsu Japan. Bulletin, 3:49-62.
- Yan, W., and Hunt, L. 1999. An equation for modelling the temperature response of plants using only the cardinal temperatures. *Annals of Botany*, 8:607-614.
- Yin, X., Kropff, M. J., McLaren, G., and Visperas, R. M. 1995. A nonlinear model for crop development as a function of temperature. *Agricultural and Forest Meteorology*, 77:1-16.
- 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.