

# Applied regional epidemiology to inductive characterization and forecasting of blue agave gray-spot (*Cercospora agavicola*) in Jalisco, Mexico

## Epidemiología regional aplicada a la caracterización inductiva y pronóstico de la mancha gris del agave azul (*Cercospora agavicola*) en Jalisco, México

Juan José Coria-Contreras, Gustavo Mora-Aguilera\*, María de Jesús Yáñez-Morales, Programa de Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados (CP), Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Estado de México, C. P. 56230; Gerardo Acevedo-Sánchez, Baldemar Santana-Peñaloza, Coral Mendoza-Ramos, Laura Jiménez-González, Verónica Inés Martínez-Bustamante, Dulce Cecilia García-Martínez, Laboratorio de Análisis de Riesgo Epidemiológico Fitosanitario (CP-LAN-REF); Ramón Rubio-Cortés, Área de Investigación, Casa Sauza, Francisco Javier Sauza #80, Tequila, Jalisco, C.P. 46400. \*Autor para correspondencia: morag@colpos.mx

Recibido: 29 de Septiembre, 2018.

Aceptado: 21 de Diciembre, 2018.

Coria-Contreras JJ, Mora-Aguilera G, Yáñez-Morales MJ, Acevedo-Sánchez G, Santana-Peñaloza B, Mendoza-Ramos C, Jiménez-González L, Martínez-Bustamante VI, García-Martínez DC and Rubio-Cortés R. 2018. Applied regional epidemiology to inductive characterization and forecasting of blue agave gray spot (*Cercospora agavicola*) in Jalisco, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 37(1): 71-94.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1809-4

Primera publicación DOI: 31 de Diciembre, 2018.

First DOI publication: December 31, 2018.

**Resumen.** *Cercospora agavicola*, agente causal de la mancha gris del agave azul (*Agave tequilana*), es un hongo reglamentado bajo control oficial en estados bajo Denominación de Origen del Tequila (DOT). Este trabajo se desarrolló en Jalisco,

**Abstract.** *Cercospora agavicola*, causal agent of the gray spot of blue agave (*Agave tequilana*), is a regulated fungus under official control in states under the Denomination of Origin of Tequila (DOT). This work was carried out in Jalisco, Mexico, the main DOT region, to determine the spatial-temporal epidemic inductivity of the fungus and to develop stochastic models to forecast the gray spot in order to support regional preventive programs. Monthly, from October 2016 to December 2017 the severity, incidence and number of diseased plants were evaluated in 41 plots established in commercial agave plantations of 3-4 years of age selected with weighted risk criteria in Los Altos (20), Valleys (11) and South (10). The regional epidemic inductivity of *C. agavicola* was heterogeneous with a greater risk for at least nine counties of Los Altos. However, low epidemic rates (0.0008-0.006 units week<sup>-1</sup>), strong restriction

México, principal región DOT, para determinar la inductividad epidémica espacio-temporal del hongo y desarrollar modelos estocásticos de pronóstico de la mancha gris con el fin de sustentar acciones preventivas regionales. De octubre 2016 a diciembre 2017 se evaluó mensualmente la severidad, incidencia y número de plantas enfermas en 41 parcelas establecidas en plantaciones comerciales de agave de 3-4 años de edad seleccionadas con criterios ponderados de riesgo en Los Altos (20), Valles (11) y Sur (10). La inductividad epidémica regional de *C. agavicola* fue heterogénea con mayor riesgo para al menos nueve municipios de Los Altos. Sin embargo, bajas tasas epidémicas (0.0008-0.006 unidades semana<sup>-1</sup>), fuerte restricción de contagio (1-4 plantas), reducido incremento anual de incidencia (0-32 plantas/0.5 ha) y nula captura de esporas evidenciaron la baja aptitud parasítica y epidémica del hongo. Consecuentemente, se encontró limitada capacidad predictiva aun con los mejores modelos generados ( $R^2_{adj}$  0.51-0.60). Las horas favorables (HFav) de enero-abril, respecto a la infección, fue consistente entre modelos por lo que puede integrarse como algoritmo preventivo en SIVEA ([www.sivea.org.mx](http://www.sivea.org.mx)). Las pérdidas regionales establecidas se estimaron entre 237 mil dólares americanos y 98.01 MDD. La cercosporina, toxina asociada al género *Cercospora*, puede estar implicada en el progreso temporal lineal atípico y debe integrarse en futuras investigaciones.

**Palabras clave:** Pérdidas, dron, tóxina, Weibull, NCBI, ABCPE, SIVEA

México ostenta la Denominación de Origen del Tequila (DOT) conformada por 181 municipios de los estados de Guanajuato (7), Michoacán (30), Nayarit (8), Tamaulipas (11) y la totalidad de Jalisco (125). La DOT representa el 73.4% (81,053 ha) del

spread (1-4 plants), reduced annual increment of incidence (0-32 plants / 0.5 ha) and no spore capture evidenced the low parasitic fitness and reduced fungus epidemic potential. Consequently, limited predictive capacity was found even with the best goodness of fit models ( $R^2_{adj}$  0.51-0.60). The favorable hours (HFav) of January-April, with respect to infection, was consistent among models, so it can be used as preventive algorithm in SIVEA ([www.sivea.org.mx](http://www.sivea.org.mx)). The regional losses were estimated between 237 thousand US dollars and 98.01 MDD. Cercosporin, a toxin associated with *Cercospora* genus, may be involved in atypical linear temporal progress and should be integrated in future research.

**Key words:** Losses, drone, toxin, Weibull, NCBI, AUDPC, SIVEA

Mexico holds the Denomination of Origin of Tequila (DOT) composed by 181 municipalities of the states of Guanajuato (7), Michoacán (30), Nayarit (8), Tamaulipas (11) and Jalisco in its entirety (125). The DOT represents 73.4% (81,053 ha) of the nationally grown blue agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul), Jalisco being the most representative with 64,499 ha (SIAP 2018). Throughout the tequila industry, the DOT directly favors the regional economy by generating estimably 1,600 million of Mexican pesos per year and represents the economic support of 70,000 families (SIAP 2015). The implications of maintaining the DOT agave region, legally defined in time and space, is multidimensional but it is substantiated on the challenge of guaranteeing productive sustainability and profitability with a long-termed resilient model.

From the decade of the '90s, the productive inventories of agave in Jalisco have been strongly

agave azul (*Agave tequilana* Weber var. Azul) cultivado a nivel nacional, siendo Jalisco el más representativo con 64,499 ha (SIAP 2018). La DOT, a través de la industria tequilera, genera de forma directa una derrama económica regional estimada en 1,600 millones de pesos anuales y representa el sustento de 70,000 familias (SIAP 2015). Las implicaciones de mantener la región DOT agave-ra, legalmente definida en el tiempo y espacio, es multidimensional pero se fundamenta en el reto de garantizar la sustentabilidad productiva y rentabilidad bajo un modelo resiliente a largo plazo.

A partir de la década de los 90's, los inventarios productivos del agave en Jalisco han sido fuertemente afectados por factores fitosanitarios entre los que destacan el picudo (*Scyphophorus acupunctatus*), la marchitez por *Fusarium* spp, y la mancha gris causada por *Cercospora agavicola*. Ante los recurrentes desabastos de planta de siembra y la tendencia creciente del precio de la piña (tallo del agave) se ha incrementado el volumen de hijuelos movilizados dentro y entre estados acrecentando los riesgos fitosanitarios por lo que es importante fortalecer el monitoreo y muestreo en el marco de la Campaña Contra Plagas Reglamentadas del Agave (SENASICA, 2017). Así mismo, es importante desarrollar algoritmos de prevención y control para su integración en SIVEA (Sistema Integral de Vigilancia Epidemiológica del Agave), un sistema fitosanitario web operado por el SENASICA-DGSV ([www.sivea.org.mx](http://www.sivea.org.mx)). Actualmente, una de las preocupaciones de productores es la dificultad del control de *C. agavicola*, por lo que este trabajo se enfocó a estudiar la mancha gris en Jalisco, estado en el cual históricamente se han reportado daños en Los Altos (Acatic, San Juan de los Lagos, Tepatitlán y Yahualica), Valles (Amatitán, Ahualulco, Arenal, Magdalena, San Juanito de Escobedo y Tequila), Sur (Autlán, El Grullo, El Limón y Unión de Tula) y Sierra Occidental (Atenguillo,

affected by phytosanitary factors amongst which the weevil (*Scyphophorus acupunctatus*), the agave wilt caused by *Fusarium* spp, and the gray spot caused by *Cercospora agavicola* stand out. Given the recurrent shortages of sowing plants and the increase tendency of the pineapple's price (agave stem) the number of mobilized shoots (hijuelo in spanish) within and between states has increased, rising some major phytosanitary risks. Therefore it is important to strengthen and improve the control and sampling within the framework of the Campaign Against Regulated Pests of the Agave (SENASICA, 2017). Likewise, it is important to develop new preventive and control management algorithms for their incorporation into SIVEA (Comprehensive Epidemiological Surveillance System of the Agave), a phytosanitary web system operated by SENASICA-DGSV ([www.sivea.org.mx](http://www.sivea.org.mx)). At present one of the main concerns of producers is the difficulty of *C. agavicola* control, therefore this project focused on studying the gray spot in Jalisco, a state in which plant damage has historically been reported in Los Altos (Acatic, San Juan de Los Lagos, Tepatitlán and Yahualica), Valleys (Amatitán, Ahualulco, Arenal, Magdalena, San Juanito de Escobedo and Tequila), Sur (Autlán, El Grullo, El Limón and Unión de Tula) and Sierra Occidental (Atenguillo, Mascota and Mixtlán) (Rubio 2007). The gray spot was first reported in 2003 in Pénjamo, Guanajuato and in 2005 the causal agent was identified as *C. agavicola* (Ayala *et al.*, 2005). The fungus' infection apparently occurs within October and March under favorable conditions of relative humidity  $\geq 80\%$  and average temperatures between 15 and 22 ° C (Ángeles-Espino *et al.*, 2016; Valencia 2011; Rubio 2007). The primary infection causes black oval lesions of up to 1-3 cm commonly found in the middle to upper third of non-expanded leaves of the plant's head. The disease develops rapidly producing

Mascota y Mixtlán) (Rubio, 2007). La mancha gris se reportó en 2003 en Pénjamo, Guanajuato y en 2005 se identificó al agente causal como *C. agavicola* (Ayala-Escobar *et al.*, 2005). La infección del hongo aparentemente ocurre en los periodos de octubre a marzo en condiciones favorables de humedad relativa  $\geq 80\%$  y temperatura media entre 15 y 22 °C (Ángeles-Espino *et al.*, 2016; Valencia, 2011; Rubio, 2007). La infección primaria causa lesiones negras, ovaladas de hasta 1-3 cm, generalmente en el tercio medio a superior de hojas no expandidas del cogollo. La enfermedad desarrolla rápidamente produciendo manchas coalescentes, deprimidas grisáceas y termina con colapso del cogollo y muerte de planta.

Aunque no se ha comprobado la implicación de cercosporina en el síntoma, toxina no específica producida por *Cercospora* spp, activada por luz y temperatura (Daub y Ehrenshaft, 2000; Jens *et al.*, 1989), este estudio se planteó bajo la premisa de que es posible pronosticar el proceso infeccioso primario, independiente del efecto de dicha toxina; así mismo, se propuso caracterizar atributos espacio-temporales a nivel parcelario-región con el fin de comprender procesos de dispersión, prevalencia e intensidad epidémica aplicables a la generación de alertas tempranas para fortalecer el manejo preventivo de la mancha gris del agave.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Red de monitoreo e inductividad epidémica regional.** De octubre 2016 a diciembre 2017, se estableció y evaluó una red de monitoreo de 41 parcelas distribuidas en predios comerciales de agave de 3-4 años en Los Altos (20), Valles (11) y Sur (10) del estado de Jalisco. Las parcelas se seleccionaron con base a un análisis de inductividad epidémica regional, para lo cual se emplearon datos de ocu-

coalescing, depressed grayish spots and ends with the collapse of the head and death of the plant.

Although the implication of *cercosporin* in the symptom has not been confirmed a non-specific toxin produced by *Cercospora* spp, activated by light and temperature (Daub and Ehrenshaft, 2000; Jens *et al.*, 1989), this study was based upon the premise that it is possible to predict the primary infectious process independent of the effect of said toxin. Likewise, it was proposed to characterize spatio-temporal attributes at the plot-region level in order to understand processes of dispersion, prevalence and epidemic intensity applicable to the generation of an early warning system to strengthen the preventive management of the agave gray spot.

## MATERIALS AND METHODS

**Network monitoring and regional epidemiological inductivity.** From October 2016 to December 2017 a monitoring network of 41 plots distributed in commercial agave plots of 3-4 years in Los Altos (20), Valley(11) and South (10) in the state of Jalisco was established and evaluated. The plots were selected based on an analysis of regional epidemic inductivity, for which data from the occurrence of focus points of infestation were used. These were generated during 2012-2015 by the Regulated Pests Campaign of the Agave ([www.sivea.org.mx](http://www.sivea.org.mx)) cultivated surface (SIAP, 2015), weather (CONAGUA 2015) and edaphic factors. The Reg-N methodology was applied to the incorporated data matrix to generate a multivariate inductive epidemic indicator and to select plots that maximize the regional epidemic variability of the disease (Table 1) (Acevedo-Sánchez *et al.*, 2017; Aguilera and Acevedo-Sánchez 2016). The epidemic indicator was used to generate a regional inductivity map using ArcMap from ArcGis v10.3.

rrencia de focos de infestación generados durante 2012-2015 por la Campaña de Plagas Reglamentadas del Agave ([www.sivea.org.mx](http://www.sivea.org.mx)), superficie cultivada (SIAP, 2015), clima (CONAGUA 2015) y factores edáficos. Se empleó la metodología RegN a la matriz integrada de datos para generar un indicador epidémico multivariado de inductividad y para seleccionar parcelas que maximicen la variabilidad epidémica regional de la enfermedad (Cuadro 1) (Acevedo-Sánchez *et al.*, 2017; Mora-Aguilera y Acevedo-Sánchez, 2016). El indicador epidémico se usó para generar un mapa de inductividad regional mediante ArcMap de ArcGis v10.3. Por predio comercial se seleccionó una parcela con una población de plantas de aproximadamente 0.5 ha; 25 parcelas tuvieron un foco central de 1-94 plantas enfermas con una severidad de macha gris entre 6-65%. Este foco constituyó el  $Y_0$  o intensidad inicial de epidemia. En 16 parcelas se tuvieron únicamente poblaciones de plantas aparentemente sanas. Al centro de la parcela se colocó una trampa TIDE modificada con un dispositivo pasivo de impacto y deposición (Mora-Aguilera *et al.*, 2014). En cada trampa se colocaron tres portaobjetos con cinta adhesiva doble cara, dos el dispositivo de deposición y uno en la de impacto. En el mismo soporte de la trampa se instaló un *datalogger* Hobo® Pro V2 configurado a intervalos de 30 minutos con el propósito de relacionar cambios de intensidad de enfermedad con variables de temperatura y humedad relativa ambiental. Quincenalmente se colectaron los portaobjetos de trampas y se realizó la extracción *in situ* de datos climáticos.

**Diagnóstico molecular de *C. agavicola*.** Con el objetivo de confirmar la asociación del agente causal con la mancha gris se colectó en 13 parcelas de monitoreo muestras vegetales con lesiones típicas de la enfermedad. En laboratorio, el tejido se desinfectó con hipoclorito de sodio al 1.5% durante dos

A plot with a plant population of approximately 0.5 ha was selected per commercial property amongst which 25 plots had a focal point of 1-94 infected plants with gray spot severity between 6-65%. This focal point constituted the  $Y_0$  or initial epidemic intensity. In 16 plots there were only apparent healthy plant populations. At the center of each plot, a modified TIDE trap was placed with a device of passive impact and deposition (Mora-Aguilera *et al.*, 2014). In each trap, three slides were placed with double-sided adhesive tape, two in the disposition device and one on the impact device. A Hobo® Pro V2 data logger configured at 30-minute intervals was installed in the trap support in order to relate changes in disease intensity with temperature and relative humidity variables. The trap slides were collected on a 15-days interval and *in situ* extraction of climatic data was conducted.

**Molecular diagnosis of *C. Agavicola*.** In order to confirm the relation between the gray spot and the disease-causing agent, plant samples with common disease lesions were collected in 13 monitoring plots. In the laboratory, the tissue was disinfested with 1.5% sodium hypochlorite for two minutes, rinsed 3 times with sterile water and incubated in a humid chamber at 24-28 °C alternating 12:12 h light:dark for 3 days. From the mycelial growth, the fungus was isolated and cultured in agave-agar medium (Ayala *et al.*, 2005). DNA extraction was performed by the modified AP method (Sambrook and Russel, 2001) and the ITS region 1-4 was amplified through PCR (White *et al.*, 1990). The PCR product was sent to Macrogen (Seoul Korea) for sequencing and the sequences identification was made through the web program Blast® *blastn suite* at NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

**Variables evaluation.** The infected plants incidence and severity were evaluated monthly in



**Cuadro 1. Localización de 41 parcelas de monitoreo en plantaciones comerciales de agave azul de 3-4 años de edad seleccionadas por criterio de inductividad epidémica para el estudio regional de la mancha gris, y condición inicial ( $Y_0$ ) de ocurrencia de la enfermedad representado por número de plantas sintomáticas (P.enf) y severidad promedio de planta enferma (SProm) por parcela. Jalisco, México. 2016-2017.**

**Table 1. Location of 41 monitoring plots in commercial blue agave plantations of 3-4 years of age selected by criteria of epidemic inducibility for the regional study of gray spot, and initial condition ( $Y_0$ ) of disease occurrence represented by the number of symptomatic plants (P.enf) and average severity of diseased plant (SProm) per plot. Jalisco, Mexico. 2016-2017.**

Región	Municipio	Latitud	Longitud	ID Plantación	P.enf ( $Y_0$ ) <sup>x</sup>	SProm( $Y_0$ ) <sup>y</sup>
Altos	Arandas	20.6973	-102.2572	A-ARA-CP01	94	32.8
		20.8508	-102.1592	A-ARA-CP04	1	100
		20.7618	-102.2936	A-ARA-CP05	3	63.6
		20.7624	-102.3470	A-ARA-CP06	7	31.4
		20.6954	-102.3241	A-ARA-CP20	22	22.5
	Jesús María	20.6161	-102.1381	A-JM-CP02	12	58.5
		20.6698	-102.0802	A-JM-CP03	0	0.0
		20.5931	-102.1582	A-JM-CP19	4	57.2
	Tepatitlán M.	20.7891	-102.5530	A-TEP-CP08	0	0.0
		20.8581	-102.6558	A-TEP-CP09	1	6.0
		20.6605	-102.6456	A-TEP-CP14	0	0.0
	Zapotlanejo	20.5797	-102.8915	A-ZAP-CP10	1	85.0
	Cerro Gordo	20.6842	-102.5042	A-SICG-CP15	10	43.5
		20.7505	-102.4838	A-SICG-CP07	18	61.1
	Ocotlán	20.4247	-102.7568	A-OCO-CP11	0	0.0
	Atotonilco A.	20.5151	-102.6127	A-ATO-CP12	2	85.0
	Mextican	21.2626	-102.7186	A-MEX-CP16	1	22.0
	Yahualica G. G.	21.1117	-102.8675	A-YAH-CP17	0	0.0
		21.1674	-102.8727	A-YAH-CP18	2	2.0
	Ayotlán	20.5357	-102.3696	A-AYO-CP13	1	65.0
Valles	Hostotipaquillo	21.0404	-104.1994	V-HOS-CP01	3	42.6
		20.9298	-104.1078	V-MAG-CP02	0	0.0
	Magdalena	20.8982	-103.9450	V-MAG-CP03	1	85
		20.9674	-104.0410	V-AMA-CP11	0	0.0
	Tequila	20.9362	-103.8726	V-TEQ-CP04	0	0.0
	Amatitán	20.8589	-103.7688	V-AMA-CP05	0	0.0
		20.8344	-103.6795	V-AMA-CP06	1	6.0
	San Juanito E.	20.7724	-103.9958	V-SJE-CP07	0	0.0
	Ahualulco M.	20.7388	-103.9321	V-AHU-CP08	0	0.0
	Ameca	20.5029	-103.9862	V-AME-CP09	1	2.0
Cocula	20.3672	-103.8636	V-COC-CP10	0	0.0	
Sur	Tecolotlán	20.1896	-104.0236	S-TEC-CP01	0	0.0
	Juchitlán	20.0756	-104.1008	S-JUC-CP02	0	0.0
	Autlán de N.	19.8322	-104.3041	S-AUT-CP03	0	0.0
	Tuscacuesco	19.7397	-103.8802	S-TUS-CP04	0	0.0
	San Gabriel	19.6659	-103.8135	S-SGA-CP05	4	56.0
	San Andrés I.	19.8257	-103.5072	S-GF-CP06	3	64
	Teocuitatlán C.	20.0920	-103.4223	S-TEO-CP07	5	39
		20.1270	-103.3524	S-TEO-CP08	1	6
	Zacoalco de T.	20.2014	-103.5321	S-ZAC-CP09	14	35.2
	Acatlán de J.	20.4808	-103.6357	S-ACA-CP10	1	85

<sup>x</sup>Penf=Número de plantas enfermas con mancha gris al seleccionar el sitio localizadas al centroide de parcela. / Penf = Number of diseased plants with gray spot when selecting the site located at the plot centroid.

<sup>y</sup>SProm $Y_0$  = Severidad promedio en planta enferma al seleccionar el sitio / SProm $Y_0$  = Average severity of diseased plant when selecting the site.

minutos, se enjuagó 3 veces con agua estéril y se incubó en cámara húmeda a 24-28 °C alternando 12:12 h luz:oscuridad durante 3 días. A partir del crecimiento micelial se aisló y cultivó al hongo en medio Agave-agar (Ayala-Escobar *et al.*, 2005). La extracción de DNA se realizó por el método AP modificado (Sambrook y Russel, 2001) y se amplificó por PCR la región ITS 1-4 (White *et al.*, 1990). El producto de PCR fue enviado a Macrogen (Seoul Corea) para su secuenciación. La identidad de las secuencias se realizó por medio del programa web Blast® *blastn suite* en NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

**VARIABLES DE EVALUACIÓN.** En cada parcela se evaluó mensualmente la incidencia de plantas enfermas y la severidad en planta mediante una escala diagnóstica de 7 clases (0=sana, 1=2%, 2=6%, 3=22%, 4=65%, 5=85% y 6=100%) (Jiménez-González *et al.*, 2017). La evaluación se realizó siempre en las mismas en plantas para lo cual se seleccionaron y marcaron en un patrón sistemático discontinuo de 1x2 surcos y 1x3 plantas/surco, totalizando 273 plantas. El registro de las evaluaciones y su localización espacial se realizó directamente en App-SIVEA v1.1, una aplicación Android para telefonía móvil generada por COLPOS-LANREF (Guzmán-Hernández *et al.*, 2017). Los datos se enviaron por vía satelital a la plataforma SIVEA ([www.sivea.org.mx](http://www.sivea.org.mx)) para la integración automática de la matriz de datos regional. Para el monitoreo aerobiológico se contabilizó el número de esporas en 7 cm<sup>2</sup> de cada portaobjeto por trampa.

**Caracterización de epidemias, análisis espacial y temporal.** Se caracterizó temporal y espacialmente un total de 41 epidemias inducidas por *C. agavicola*. Con base en un análisis gráfico exploratorio de parámetros epidémicos (Mora-Aguilera *et al.*, 1993) se seleccionaron 14 epidemias, ocho en

each plot throughout a diagrammatic scale of 7 classes (0 = healthy, 1 = 2%, 2 = 6%, 3 = 22%, 4 = 65%, 5 = 85% and 6 = 100%) (Jiménez-González *et al.*, 2017). The evaluation was solely conducted in the same plants, for which they were selected and marked in a discontinuous systematic pattern of 1x2 rows and 1x3 plants per row, with a total of 273 plants.

The evaluations record was made directly in App-SIVEA v1.1, an Android application for mobile phones developed by COLPOS-LANREF (Guzmán-Hernández *et al.*, 2017). The data was sent via satellite to the SIVEA platform ([www.sivea.org.mx](http://www.sivea.org.mx)) for automatic incorporation of the regional data matrix. The number of spores in 7 cm<sup>2</sup> of each slide of the trap was counted in the aerobiological monitoring.

**Characterization of epidemics, spatial and temporal analysis.** A total of 41 epidemics induced by *C. agavicola* were temporally and spatially characterized. Based on an exploratory graphic analysis of epidemic parameters (Mora-Aguilera *et al.*, 1993), 14 epidemics were selected, eight in Los Altos, three in Valleys and three in the South for the estimation of regionally representative epidemic rates. For this purposes, the Weibull flexible model was used, which describes and adjusts epidemic curves of diverse form (Mora-Aguilera *et al.*, 1996). For the model fit, data of plant severity and number of infected plants accumulated proportionally, divided by their respective maximum value accumulated per region was transformed in order to standardize different epidemics. The Weibull model, with two parameters was adjusted with the NLIN procedure of SAS® v9.4 through the equation  $y = 1 - \exp(-t/b)^c$  where:  $y$  = severity or the number of infected plants in proportion,  $t$  = time,  $b$  = rate estimator parameter and  $c$  = shape parameter of the curve. Additionally, the area under the disease

Los Altos, tres en Valles y tres en Sur para la estimación de tasas epidémicas representativas regionalmente. Para este fin se empleó el modelo flexible Weibull, el cual describe y ajusta curvas epidémicas de forma diversa (Mora-Aguilera *et al.*, 1996). Para el ajuste del modelo se realizó la transformación de los datos de severidad en planta y número de plantas enfermas acumuladas a proporción dividido entre su respectivo valor máximo acumulado por cada región con el propósito de estandarizar las diferentes epidemias. El modelo Weibull, con dos parámetros fue ajustado con el procedimiento NLIN de SAS® v9.4 mediante la ecuación  $y = 1 - \exp(-t/b)^c$  donde:  $y$  = severidad o número de plantas enfermas en proporción,  $t$  = tiempo,  $b$  = parámetro estimador de tasa y  $c$  = parámetro de forma de la curva. Adicionalmente, se estimó el Área Bajo la Curva de Progreso de Enfermedad (ABCPE) con datos de severidad de planta enferma y con el número de plantas enfermas. La combinación aditiva se empleó como un estimador de índice de daño (ID). Para el análisis espacial se seleccionó la epidemia con mayor intensidad por cada región para analizar el comportamiento de contagio intraparcelario. Con las evaluaciones en  $Y_o$  (Nov-2016) y  $Y_{max}$  (pico de incremento absoluto máximo) (Dic-2017) se generaron mapas interpolados y se analizaron los semivariogramas geostadísticos con el programa Surfer® v10.6 (Golden software, EUA). Adicionalmente, a través del programa MorLloyd versión 1.0 desarrollado en MS Excel (Rivas-Valencia y Mora-Aguilera 2010. No publicado) se calculó el índice de Morisita y Loyd para estimar el patrón de dispersión espacial parcelario de la enfermedad (Campbell y Madden, 1990).

**Detección de focos con dron.** Para analizar la capacidad de detección temprana de focos asistido con vehículos no tripulados, se empleó el dron Phantom4 de DJI® con cámara RGB 14mpx. Se

progress curve (AUDPC) was estimated with data on plant severity and the number of infected plants. The additive combination was used as a damage index estimator (DI). For the spatial analysis, the epidemic with the highest intensity was selected per region to analyze the spreading behavior amongst plots. With the evaluations on  $Y_o$  (Nov-2016) and  $Y_{max}$  (Dec-2017), interpolated maps were generated and geostatistical semivariograms were analyzed with the Surfer® v10.6 program (Golden software, USA). Additionally, through the MorLloyd version 1.0 program developed in MS Excel (Rivas-Valencia and Mora-Aguilera 2010. Not published) the index of Morisita and Loyd was calculated to estimate the plot spatial dispersion pattern of the disease (Campbell and Madden, 1990).

**Detection of foci with drone.** To analyze the capacity of early detection of foci assisted with not tripulated vehicle, the DJI® Phantom4 drone with RMP 14mpx camera was used. Orchards of 3-5 years with variable incidence-severity of gray spot were chosen. To optimize the time, energy resources, digital and analytical storage, needed in regional approaches, flights were conducted on vertical trajectory from the centroid/orchard to capture of images between 10-200 m height. Images were collected between 8:00 a.m. and 6:00 p.m. to evaluate the effect of reflected light. The analysis of images by the classification method of the maximum probability and improvement of the resolution was made with ArcMap® v10.1 and QGIS® v2.18.2.

**Development of forecast models.** The generation of stochastic forecast models to estimate changes in disease intensity was developed in two stages: 1) Selection of representative epidemics per region and 2) Generation of multiple linear regression models between five dependent variables  $Y_i$  with



eligieron predios de 3-5 años con incidencia-severidad variable de mancha gris. Para optimizar tiempo, recursos energéticos, almacenamiento digital y analíticos, necesarios en enfoques regionales, los vuelos se realizaron en trayectoria vertical partiendo del centroide/predio para captura de imágenes a alturas entre 10-200m. Las capturas se realizaron entre 8:00 y 18:00h para evaluar efecto de luz reflejada. El análisis de imágenes mediante método de clasificación por máxima probabilidad y mejora de resolución se realizó con ArcMap® v10.1 y QGIS® v2.18.2.

**Desarrollo de modelos de pronóstico.** La generación de modelos estocásticos de pronóstico para estimar cambios en la intensidad de enfermedad se desarrolló en dos etapas: 1) Selección de epidemias representativas para cada región, y 2) Generación de modelos de regresión lineal múltiple entre cinco variables dependientes  $Y_i$  con respecto a ocho variables independientes  $X_i$  con desfases (LAG) de 2-20 semanas para incluir el efecto del periodo de incubación. Los modelos se generaron para dos ventanas de inductividad epidémica ( $VI_i$ ) correspondientes a los periodos enero-abril 2017 ( $VI_1$ ) y junio-octubre 2017 ( $VI_2$ ), los cuales se definieron por exploración gráfica entre horas favorables y  $Y_i$ . La bondad de ajuste de los modelos se evaluó con *CP-Mallow*, factor de inflación de la varianza (VIF en inglés) y el coeficiente de regresión ajustado  $R^2_{Adj}$  (Mora-Aguilera *et al.*, 1993). La generación de modelos se realizó en los procedimientos REG y GLM del programa estadístico SAS v9.4.

**Selección de variables independientes.** Debido a las características parasíticas de *C. agavicola* se eligieron variables climáticas para correlacionar con variables dependientes. Se usó el promedio, máximo y mínimo acumulado semanal de temperatura y humedad relativa. Una infección exitosa del

respect to eight independent variables  $X_i$  with lags (LAG) of 2-20 weeks to include the effect of the incubation period. Models were generated for two epidemic inductivity period ( $VI_i$ ) corresponding to january-april 2017 ( $VI_1$ ) and june-october 2017 ( $VI_2$ ), which was obtained by graphical exploration between favorable hours and  $Y_i$ . The goodness of fit of the models was evaluated with *CP-Mallow*, variance inflation factor (VIF) and the adjusted regression coefficient  $R^2_{adj}$  (Mora-Aguilera *et al.*, 1993). Model generation was performed with the REG and GLM procedures of the statistical program SAS v9.4.

**Independent variables selection.** Due to the parasitic characteristics of *C. agavicola*, climatic variables were chosen to correlate with dependent variables. The maximum and minimum average of temperature and relative humidity accumulated weekly were used. Successful infection of the fungus requires relative humidity greater than 80% and between 15-22°C for optimal development (Ángeles-Espino *et al.*, 2016). Based on this, the number of weekly accumulated optimal hours for the germination of *C. agavicola conidia* that met the two requirements was calculated. The calculation was made with the MS CalculaHF program (Santana-Peñaloza *et al.*, 2015). In total, eight independent  $X_i$  variables were used to generate forecast models (Table 2).

**Dependent variables selection.** The dependent variables analyzed were the number of infected plants ( $Y_1$ ), the total number of infected plants ( $Y_2$ ), plant severity ( $Y_3$ ), plant severity in proportion ( $Y_4$ ), and the number of infected plants in proportion ( $Y_5$ ). All the variables represented absolute increments for each time interval  $t_i-t_{i-1}$  per plot ( $Y_1, Y_3 - Y_5$ ) or for the  $n$ -plots of each region ( $Y_2$ ) (Table 2).

hongo requiere humedad relativa mayor a 80% y entre 15-22 °C (Ángeles-Espino *et al.*, 2016). Con esta base, se calculó el número acumulado semanalmente de horas favorables que cumplieran los dos requerimientos para la germinación de conidios de *C. agavicola*. El cálculo se realizó con el programa MS CalculaHF (Santana-Peñaloza *et al.*, 2015). En total, ocho variables independientes  $X_i$  se emplearon para generar modelos de pronóstico (Cuadro 2).

**Selección de variables dependientes.** Las variables dependientes analizadas incluyeron el número de plantas enfermas ( $Y_1$ ), sumatoria del número de plantas enfermas ( $Y_2$ ), severidad de planta ( $Y_3$ ), severidad de planta en proporción ( $Y_4$ ) y número de plantas enfermas en proporción ( $Y_5$ ). Todas las variables representaron incrementos absolutos por cada intervalo de tiempo  $t_i-t_{i-1}$ , por parcela ( $Y_1$ ,  $Y_3$ - $Y_5$ ) o por las  $n$ -parcelas de cada región ( $Y_2$ ) (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Variables dependientes e independientes para generar modelos estocásticos de pronóstico de cambios de intensidad de la enfermedad mancha gris del agave azul en Jalisco, México.**

**Table 2. Dependent and independent variables to generate stochastic models to forecast disease intensity change of blue-agave gray spot in Jalisco, Mexico.**

Variabes	Símbolo
Independientes ( $X_i$ ) <sup>x</sup>	
Temperatura promedio semanal	Tprom <sub>(2-20 semanas)</sub>
Temperatura mínima semanal	Tmin <sub>(2-20 semanas)</sub>
Temperatura máxima semanal	Tmax <sub>(2-20 semanas)</sub>
Humedad relativa promedio semanal	HRprom <sub>(2-20 semanas)</sub>
Humedad relativa mínima semanal	HRmin <sub>(2-20 semanas)</sub>
Humedad relativa promedio semanal	HRmax <sub>(2-20 semanas)</sub>
Número de horas favorables con desfase (lag) de $n$ semanas	HFav <sub>(2-20 semanas)</sub>
Número de horas supresivas con desfase (lag) de $n$ semanas	HSup <sub>(2-20 semanas)</sub>
Dependientes en incrementos absolutos ( $Y_i$ ) <sup>y</sup>	
Número de plantas enfermas	$Y_1$
Sumatoria de plantas enfermas <sup>z</sup>	$Y_2$
Severidad en planta enferma (%)	$Y_3$
Proporción de severidad en planta	$Y_4$
Proporción del número de plantas enfermas	$Y_5$

<sup>x</sup>El cálculo de variables se realizó por parcela de monitoreo / The calculation of variables was done per each monitoring plot.

<sup>y</sup>Incremento absoluto:  $Y_i - Y_{i-1}$  / Absolut increment:  $Y_i - Y_{i-1}$

<sup>z</sup>La sumatoria se realizó para las  $n$ -parcelas de monitoreo de cada región (Los Altos, Valles y Sur) por cada tiempo- $i$  de evaluación. / The summatory was made for the  $n$ -monitoring plots per each region (Los Altos, Valleys and South) for evaluation time- $i$ .

## RESULTS

**Characterization of the fungus.** The cultural, morphological and molecular characteristics of 13 fungal isolates corresponded to *C. agavicola*. The DNA sequences of the isolates were analyzed with the Blast® *blastn* suit program, resulting in 99% homology with respect to the sequence with accession number AY647237 corresponding to *C. agavicola* (Ayala *et al.*, 2005). The sequenced samples were registered in GenBank with accession numbers MH458575-MH458587.

**Regional epidemic inductivity.** The map of epidemic inductivity at the level of Jalisco showed the potential of *C. agavicola* to induce epidemics with spatially heterogeneous intensity. The highest potential was estimated for Los Altos with moderate to very high levels, highlighting the municipalities of Jesus Maria, Atotonilco, Ayotlán,

## RESULTADOS

**Caracterización del hongo.** Las características culturales, morfológicas y moleculares de 13 aislados fungosos correspondieron a *C. agavicola*. Las secuencias de ADN de los aislados se analizaron con el programa Blast® *blastn suit* resultando 99% de homología con respecto a la secuencia con número de accesoión AY647237 correspondiente a *C. agavicola* (Ayala-Escobar *et al.*, 2005). Las muestras secuenciadas fueron registradas en el *GenBank* con números de accesoión MH458575- MH458587.

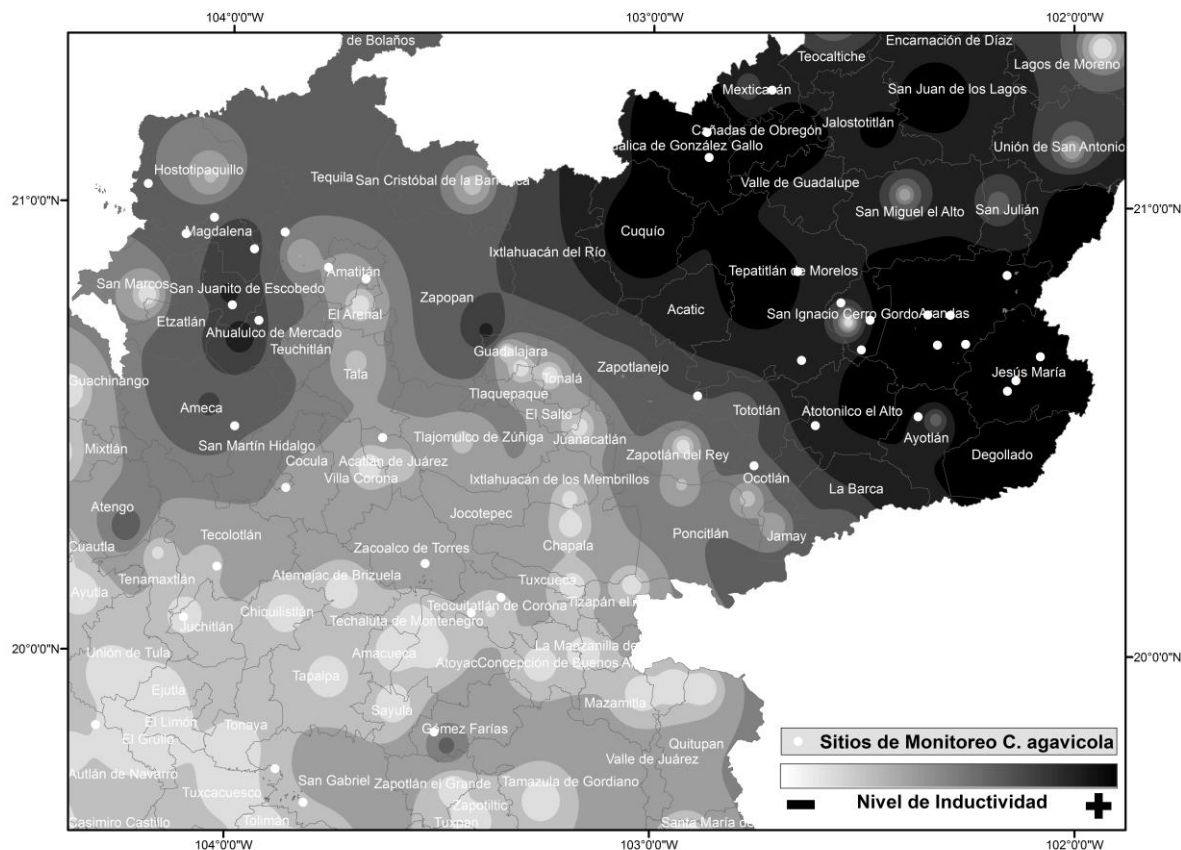
**Inductividad epidémica regional.** El mapa de inductividad epidémica a nivel del estado de Jalisco mostró el potencial de *C. agavicola* para inducir epidemias con intensidad espacialmente heterogénea. El mayor potencial se estimó para Los Altos con niveles de moderado a muy alto resaltando municipios de Jesús María, Atotonilco, Ayotlán, Degollado, San Ignacio, Cerro Gordo, Arandas, Tepatitlán y Cuquio (Figura 1). En Valles, el potencial se categorizó de bajo a moderado sobresaliendo Ahualulco, San Juan y Magdalena. La región Sur exhibió condiciones homogéneas de baja inductividad (Figura 1).

**Caracterización de epidemias.** En un total de 12 evaluaciones mensuales de incidencia y severidad, la mancha gris del agave se presentó con baja intensidad en 33 de las 41 parcelas de monitoreo. En los ocho restantes la ocurrencia de la enfermedad fue nula. En  $Y_o$ , la incidencia regional promedio en Los Altos fue 3.6%, Valles 0.33% y Sur 0.51%. En la fase final del estudio epidémico ( $Y_f$ ) se observó poca variación con 2.0, 0.9 y 0.1% con incrementos absolutos máximos en el periodo de marzo a mayo 2017 de 4.4, 1.3 y 0.2%, respectivamente. En general, la severidad de plantas enfermas estuvo en el rango de 2-100%, con severidad promedio entre

Degollado, San Ignacio, Cerro Gordo, Arandas, Tepatitlán and Cuquio (Figure 1). In Valleys, the epidemic induction potential was low to moderate, highlighting Ahualulco, San Juan and Magdalena. The South region showed homogeneous conditions of low inductivity (Figure 1).

**Characterization of epidemics.** In a total of 12 monthly assessments of plant disease incidence severity, the gray spot of the agave was shown with low intensity in 33 of the 41 monitoring plots. In the remaining eight, the disease occurrence was null. In  $Y_o$ , the average regional incidence in Los Altos was 3.6%, Valleys 0.33%, and South 0.51%. In the final phase of the epidemic study ( $Y_f$ ) little variation on disease incidence was observed with 2.0, 0.9 and 0.1% with maximum absolute increments in the period from March to May 2017 of 4.4, 1.3 and 0.2%, respectively. In general, the severity of infected plants was within the range of 2-100%, with average severity somewhat between 0.01-12.8%. The absolute annual, regional incidence was in the range of 0-25%. Per plot, the greatest absolute increase in the number of infected plants from  $Y_o$  to  $Y_{max}$  was 94 to 125 plants in Los Altos, 1 to 6 in Valleys and 14 to 17 in the South. Of these plants, the mortality was 9, 1 and 9 in  $Y_f$ , respectively. The absolute severity increased from 11.3 to 28.1% in Altos, 1.8 to 5.7% in the South and 0.02 to 0.7% in the Valleys. Amongst epidemics of 14 plots selected for temporal modeling, the Los Altos region had the highest damage index (DI) with 74.1-329.9 %num.day<sup>-1</sup>, followed by the South with 108-144.5 and Valleys 0-51.2 (Table 3).

**Spatial Analysis.** The analysis of spatial patterns at the plot level showed a limited increase of  $Y_o$  to  $Y_{max}$  in the number and expansion of foci in a period of 5-8 months. The biggest increase including foci coalescence was observed in the plots located in Los Altos, an extreme condition



**Figura 1.** Mapa de inductividad epidémica de *Cercospora agavicola* estimado con un indicador multivariado de ocurrencia de enfermedad (2012-2015), clima, tipología de suelo y superficie municipal de agave azul (*Agave tequilana*). Parcelas de monitoreo epidémico (puntos blancos) en plantaciones de agave comerciales de 3-4 años de edad. Jalisco, México.

**Figure 1.** Map of epidemic inductivity of *Cercospora agavicola* estimated with a multivariate index of disease occurrence (2012-2015), climate, soil typology and municipal hectares of blue agave (*Agave tequilana*). Epidemic monitoring plots (white dots) in commercial agave plantations 3-4 years old. Jalisco, Mexico.

0.01-12.8%. La incidencia total absoluta anual regional estuvo en el rango de 0-11%. Por parcela, el mayor incremento absoluto del número de plantas enfermas de  $Y_0$  a  $Y_{max}$  fue de 94 a 125 plantas en Los Altos, 1 a 6 en Valles y 14 a 17 en Sur. De estas plantas, la mortalidad fue de 9, 1 y 9 en  $Y_p$ , respectivamente. La severidad absoluta incrementó de 11.3-28.1% en Altos, 1.8-5.7% en Sur y 0.02-0.7% en Valles. A partir de epidemias de 14 parcelas seleccionadas para modelaje temporal, la región Los Altos tuvo el mayor índice de daño (ID) con 74.1-

not observed in other monitoring plots (Figure 2). In the plot located on the South and in the Valleys, the increase was mainly in number and intensity of estimated foci with disease severity. The foci maintained practically their original size in  $Y_0$  and increased from 5 to 9 and from 0 to 2 respectively (Figure 2). The Morisita aggregation index was within the range of 2.4-10.9, indicating moderate to strong aggregation (foci). However, the autocorrelation variograms showed a limited spatial dependence of 2 and 4 plants for the South

329.9 %núm.día<sup>-1</sup> seguido de Sur con 108-144.5 y Valles 0-51.2 (Cuadro 3).

**Análisis Espacial.** El análisis de patrones espaciales a nivel parcela demostró un limitado incremento de  $Y_o$  a  $Y_{max}$  en el número y expansión de focos en un periodo de 5-8 meses. El mayor incremento, incluyendo coalescencia de focos, se observó en una parcela de Los Altos, una condición extrema no observada en otros predios estudiados (Figura 2). En parcelas de Sur y Valles, el incremento fue principalmente en número e intensidad de foco estimado con la severidad de enfermedad. Los focos mantuvieron prácticamente su tamaño original en  $Y_o$  y se incrementaron de 5 a 9 y de 0 a 2, respectivamente (Figura 2). El índice de agregación de Morisita estuvo en el rango de 2.4-10.9, indicando agregación moderada a fuerte (focos). Sin embargo, los variogramas de autocorrelación mostraron una dependencia espacial limitada de 2 y 4 plantas para Sur y Los Altos, respectivamente. En la región

and Los Altos, respectively. In the Valley region, the lowest spatial dependence with a value of 1 was observed, indicating a strong contagion restriction. Early foci detection of the gray spot was possible in vertical flights set to 50-100 m. The detection-delimitation of foci efficiency was >85%. The most accurate damage characterization was the variable of incidence with a percentage error of  $\pm 7\%$ . Accuracy was related to the disease development, age, weeds, height and time/flight (Figure 3).

**Temporary Analysis.** The estimated epidemic behavior for the standardized and cumulative plant severity ratio ( $Y_d$ ) was the most adequate to forecast epidemic rates in the 14 selected epidemics. The Weibull model with two parameters had moderate goodness of fit in 8/13 epidemics with a range of  $R^2$  of 0.62-0.87 ( $p \leq 0.001$ ). On 4/13 the regression coefficient ( $R^2$ ) was within the range of 0.96-0.99 ( $p < 0.0001$ ). A plot of the Valley region had only one infected plant in the 12-month period, therefore the

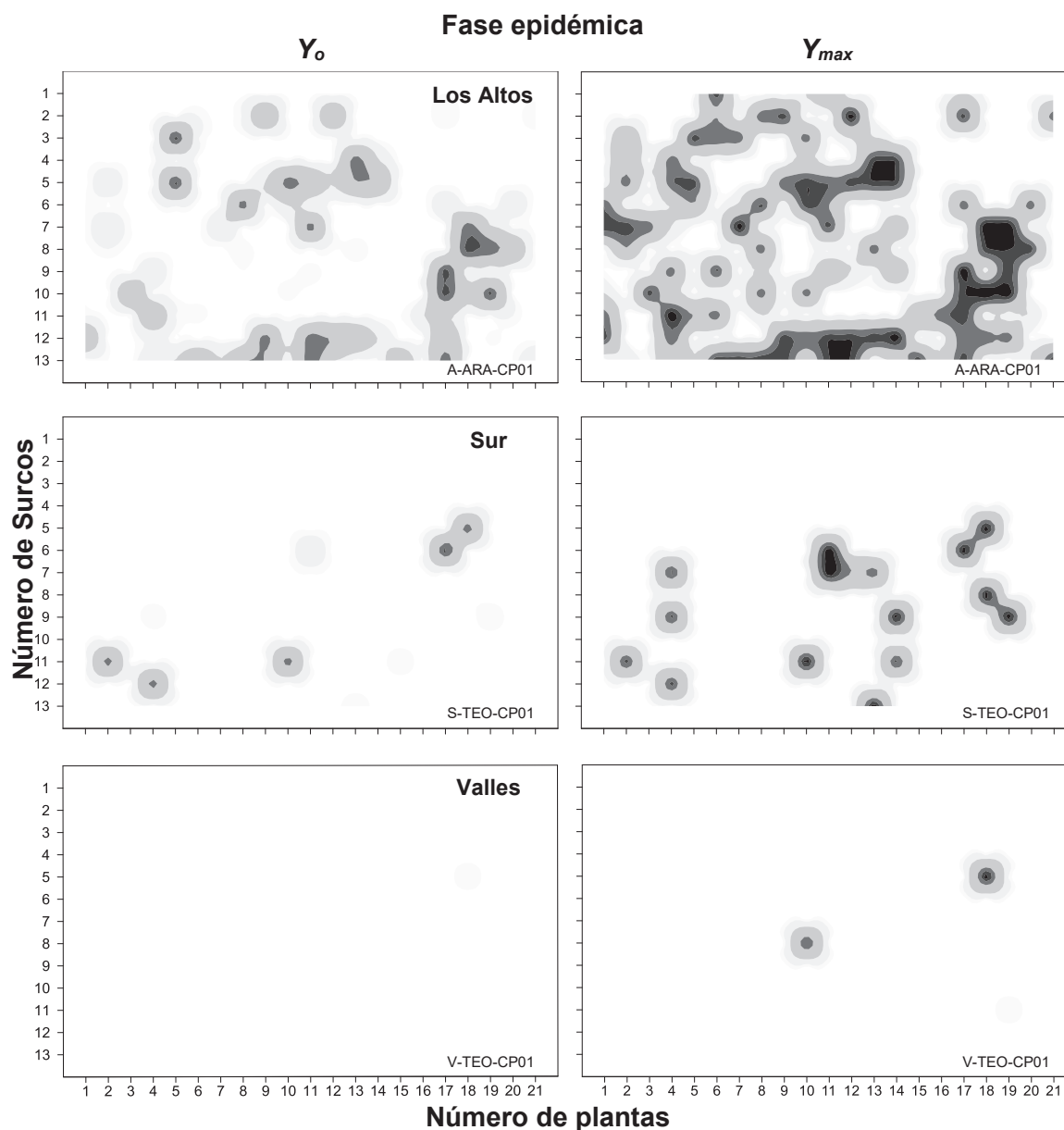
**Cuadro 3. Parámetros de ajuste del modelo Weibull e Índice de Daño (ID) de curvas de proporción estandarizada de severidad ( $Y_d$ ) de 14 epidemias seleccionadas regionalmente para estimar la tasa de epidémica ( $l/b$ ) e intensidad epidémica (ID) inducida por *C. agavicola* en Jalisco, México. 2016-2017.**

**Table 3. Weibull model fit parameters and Damage Index (DI) of standardized severity proportion ( $Y_d$ ) curves of 14 regionally selected epidemics to estimate the epidemic rate ( $l/b$ ) and epidemic intensity (DI) induced by *C. agavicola* in Jalisco, Mexico. 2016-2017.**

Región	Parcela	Latitud	Longitud	Modelo	l/b	ID <sup>x</sup>	R <sup>2</sup>	Pr > F
Altos	A1	20.69727	- 102.25716	$Y_d = 1 - \text{EXP}(t/112.7)^{1.24}$	0.003	329.9	0.98	<.0001
	A4	20.85077	- 102.15921	$Y_d = 1 - \text{EXP}(t/65149.7)^{0.74}$	0.005	168.0	0.71	0.001
	A7	20.75053	- 102.48384	$Y_d = 1 - \text{EXP}(t/1197.1)^{0.86}$	0.003	161.4	0.96	<.0001
	A10	20.57965	- 102.89150	$Y_d = 1 - \text{EXP}(t/28742.1)^{0.85}$	0.004	149.9	0.62	0.004
	A13	20.53568	- 102.36955	$Y_d = 1 - \text{EXP}(t/1716.4)^{2.76}$	0.0008	74.1	0.77	0.0003
	A15	20.68421	- 102.50424	$Y_d = 1 - \text{EXP}(t/116.3)^{1.14}$	0.003	120.0	0.96	<.0001
	A17	21.11167	- 102.86754	$Y_d = 1 - \text{EXP}(t/3311)^{1.90}$	0.003	93.0	0.75	0.0005
	A20	20.69541	- 102.32411	$Y_d = 1 - \text{EXP}(t/472)^{1.60}$	0.003	130.4	0.99	<.0001
Sur	S5	19.66587	- 103.81346	$Y_d = 1 - \text{EXP}(t/113353)^{0.58}$	0.004	131.1	0.86	<.0001
	S7	20.09198	- 103.42234	$Y_d = 1 - \text{EXP}(t/25831.5)^{0.83}$	0.003	102.8	0.85	<.0001
	S9	20.20140	- 103.53209	$Y_d = 1 - \text{EXP}(t/3629.6)^{0.86}$	0.004	144.5	0.99	<.0001
Valles	V9	20.50290	- 103.98623	$Y_d = 1 - \text{EXP}(t/5740.9)^{5.15}$	0.0002	0.0	0	-
	V10	20.36717	- 103.86355	$Y_d = 1 - \text{EXP}(t/6490.9)^{1.26}$	0.004	30.6	0.87	<.0001
	V11	20.96739	- 104.04096	$Y_d = 1 - \text{EXP}(t/28742.1)^{0.85}$	0.006	51.2	0.63	0.004

<sup>x</sup>Índice de daño=ABCPE del número de plantas enfermas + ABCPE de la severidad de plantas enfermas / Damage index = AUDPC of the number of diseased plants + AUDPC of the severity of diseased plants.





**Figura 2.** Patrón espacial en las fases epidémicas  $Y_0$  y  $Y_{max}$  en tres parcelas comerciales seleccionadas por el mayor número de plantas enfermas en tres regiones agaveras de Jalisco, México.  $Y_0$  para Altos y Sur fue octubre 2016;  $Y_0$  en Valles noviembre 2016.  $Y_{max}$  en Altos y Sur Junio y Julio 2017, respectivamente; Valles septiembre 2017.

**Figure 2.** Spatial pattern in the epidemic stages  $Y_0$  and  $Y_{max}$  in three commercial plots selected by the largest number of diseased plants in three agave regions of Jalisco, Mexico.  $Y_0$  for Altos and South was October 2016;  $Y_0$  in Valleys November 2016.  $Y_{max}$  in Altos and South June and July 2017, respectively; Valleys September 2017.

Valles se observó la menor dependencia espacial con valor de uno, indicativo de una fuerte restricción de contagio. La detección de focos tempranos de mancha gris fue posible en vuelos verticales a alturas 50-100m. La eficiencia detección-delimitación focos fue >85%. La caracterización de daño más preciso fue la variable de incidencia con error  $\pm 7\%$ . La precisión estuvo en función al desarrollo de enfermedad, edad, maleza, altura y hora/vuelo (Figura 3).

**Análisis Temporal.** El comportamiento epidémico estimado con la proporción de severidad de planta estandarizada y acumulada ( $Y_4$ ) fue la más adecuada para estimar tasas epidémicas en las 14 epidemias seleccionadas. El modelo Weibull con dos parámetros tuvo una moderada bondad de ajuste en 8/13 epidemias con un rango de  $R^2$  de 0.62-0.87 ( $p \leq 0.001$ ). En 4/13 el coeficiente de regresión ( $R^2$ ) estuvo en el rango de 0.96-0.99 ( $p < 0.0001$ ). Una parcela de Valles tuvo una sola planta enferma en el periodo de 12 meses, por lo que no se requirió el ajuste del modelo (Figura 4, Cuadro 3). Las tasas epidémicas estimadas ( $b^{-1}$ ) estuvieron en el rango de 0.0008-0.006 unidades semana<sup>-1</sup>, correspondiendo con epidemias de muy baja intensidad. Las tasas epidémicas relativamente superiores se observaron en Los Altos seguido de Sur. La forma de las curvas epidémicas ( $c$ ) estuvieron en el rango de 0.58-5.15 y representaron un progreso de tipo lineal, atípico para un proceso infeccioso multiplicativo (Campbell y Madden, 1990).

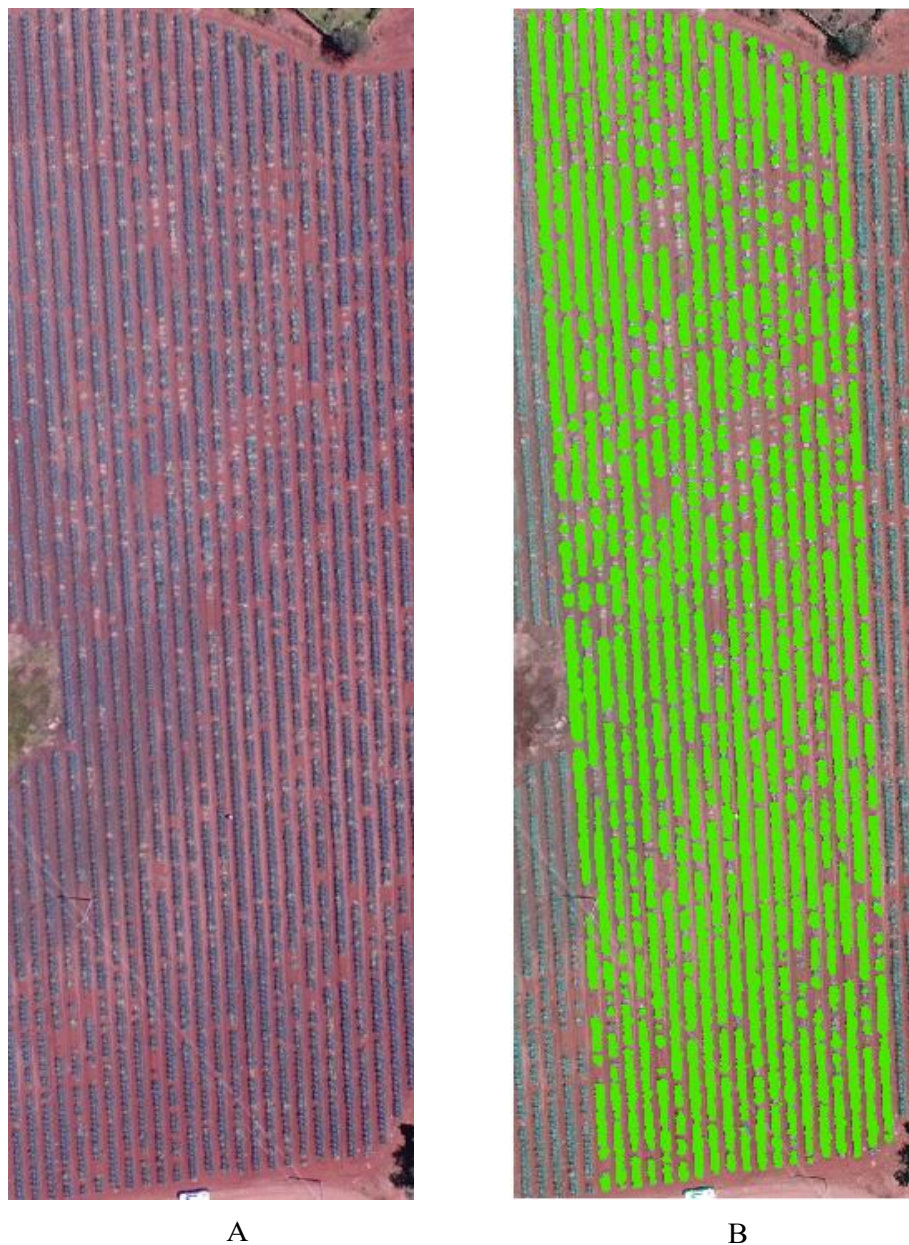
**Modelos de Pronóstico.** Se seleccionaron 14 epidemias por tipología de forma e intensidad contrastante en el tiempo para el desarrollo de modelos regionales de pronóstico. Se generaron y analizaron un total de 82 modelos a partir del número de epidemias mencionadas y las variables dependientes  $Y_p$ , los cuales resultaron con  $R^2_{adj}$  de 0.15-0.60. Aunque con baja capacidad de pronóstico, los mejores

adjustment of the model was not required (Figure 3, Table 3). The estimated epidemic rates ( $b^{-1}$ ) were within the range of 0.0008-0.006, corresponding to very low-intensity epidemics. Relatively higher epidemic rates were observed in Los Altos followed by the South region. The shape of the epidemic curves ( $c$ ) was within the range of 0.58-5.15 and represented atypical linear progress for a multiplicative infectious process (Campbell and Madden, 1990).

**Forecast models.** 14 epidemics were selected according to their form typology and time intensity contrast for the development of regional forecast models. A total of 82 models were generated and analyzed based on the number of epidemics previously mentioned and dependents variables  $Y_i$  which was  $R^2_{adj}$  of 0.15-0.60. Through with a low forecast capacity, the best models were obtained with  $Y_2$ , the total sum of infected plants per unit of time and per region, and with the variables HFav and HRprom, with a LAG of 2 and 12 weeks as independent variables. These models obtained  $R^2_{adj}$  within the range of 0.29-0.60, C(p) of 0.03-8.84, VIF of 1.00-5.93 and  $p < 0.003$ . The best forecast models were for  $VI_i$  (January-April 2017) for Los Altos and the South (Table 4, Figure 5).

## DISCUSSION

The causal agent of the gray spot of blue agave caused by *C. agavicola*, has a heterogeneous regional epidemic potential with a higher risk for the region of Los Altos (Figure 1). This insight was verified with 12 months worth of thorough data obtained from a monitoring network of 41 plots under commercial production conditions in Jalisco. However, all parameters, indicators and estimated variables consistently demonstrated the low epidemic capacity of *C. agavicola*. Due to the



**Figura 3. A.** Imagen RGB capturada las 13 horas a 220 m de altura en vuelo centroide-vertical sobre una hectárea de agave azul de 3 años con incidencia de mancha gris en Arandas, Jalisco. **B.** Imagen procesada en ArcGis para estimación del número de plantas e incidencia de plantas enfermas. Censo terrestre: 3600 plantas vs Censo estimado por análisis de imagen: 3717. Incidencia censada vs estimada: 40.5 y 38.3%, respectivamente. Notar la discontinuidad dentro de surcos (ausencia de color verde o pérdida del bandeo) representando focos simples o coalescentes de enfermedad.

**Figure 3. A.** RGB image captured at 13 hr at 220 m height in centroid-vertical flight over a hectare of 3-year-old blue agave with incidence of gray spot in Arandas, Jalisco. **B.** Image processed in ArcGis to estimate plants number and disease incidence. Scout census: 3600 plants vs estimated census by image analysis: 3717. Census incidence vs estimated: 40.5 and 38.3%, respectively. Note the discontinuity within rows (absence of green color or loss of banding) representing simple or coalescent disease foci.

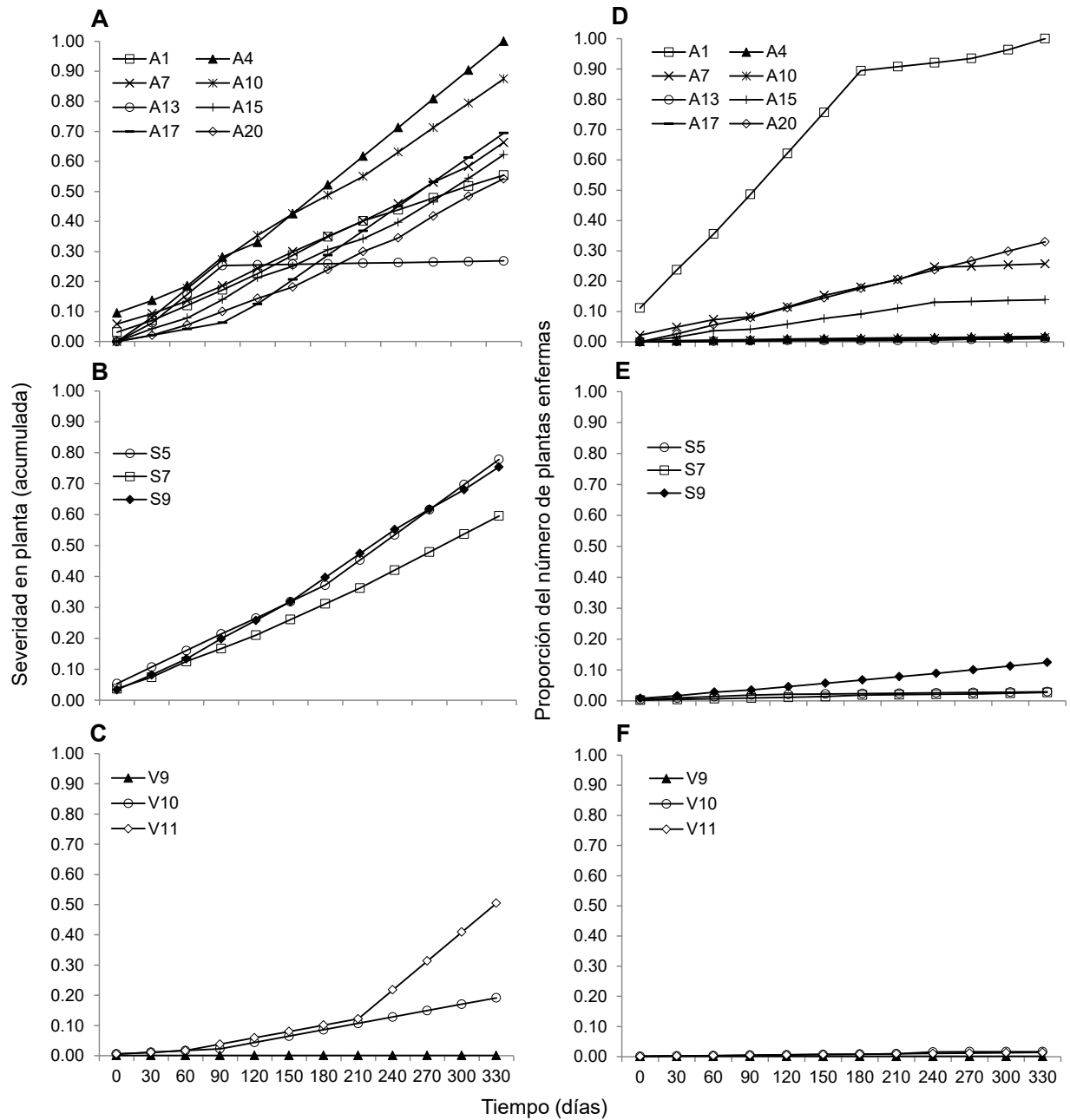


Figura 4. Progreso epidémico en 14 parcelas comerciales de agave en Jalisco, México. Proporción estandarizada acumulada de severidad en planta para A) Altos, B) Sur y C) Valles. Proporción estandarizada acumulada del número de plantas enfermas para D) Altos, E) Sur y F) Valles.

Figure 4. Epidemic progress in 14 commercial agave plots in Jalisco, Mexico. Cumulative standardized proportion of plant severity for A) Los Altos, B) South and C) Valleys. Accumulated standardized proportion of the number of diseased plants for D) Los Altos, E) South and F) Valleys.

modelos se obtuvieron con  $Y_2$ , la sumatoria del número de plantas enfermas por unidad de tiempo y por región, y con las variables HFav y HRprom, con un LAG de 2 y 12 semanas como variables independientes. Estos modelos tuvieron  $R^2_{adj}$  en rango de 0.29-0.60, C(p) de 0.03-8.8, VIF de 1-5.9 y  $p < 0.003$ . Los mejores modelos de pronóstico fueron para la  $VI_1$  (enero-abril 2017) para Los Altos y Sur (Cuadro 4, Figura 5).

## DISCUSIÓN

El agente causal de la mancha gris del agave azul, causado por *C. agavicola*, tiene un potencial epidémico regional heterogéneo con mayor riesgo para Los Altos (Figura 1). Este resultado se con-

regional approach applied, which allows optimizing the epidemiological system and capturing regional epidemic variability, these results are inherently strong. Thus, very low epidemic rates (0.0008-0.006, units weeks<sup>-1</sup>), strongly restricted contagion parameters (1-4 plants), an annual increase of diseased plants (0-32 plants) and no captures of spores amongst 41 traps show the low parasitic aptitude of the fungus (Table 2-3, Figure 2).

Stochastic forecast models are recurrent in epidemiology because of the analytical ease of including a set of variables in an automatic statistical process of selection of variables and models (Mora-Aguilera *et al.*, 1993; Chuang y Jeger, 1987; Coakley *et al.*, 1985). However, the practical application of these models is limited by regional level due to the restricted uptake of

**Cuadro 4. Modelos estocásticos seleccionados para el pronóstico en dos ventanas de inductividad,  $VI_1$  (enero-abril) y  $VI_2$  (junio-octubre), del incremento absoluto de la sumatoria de plantas enfermas ( $Y_2$ ) de mancha gris del agave azul en tres regiones agaveras de Jalisco. 2016-2017.**

**Table 4. Stochastic models selected to forecast in two inductance windows,  $VI_1$  (January-April) and  $VI_2$  (June-October), the absolute increase of the summatory diseased plants ( $Y_2$ ) of gray spot of blue agave in three agave regions of Jalisco 2016-2017.**

Región	Modelos <sup>x</sup>	F	C(p) <sup>y</sup>	VIF	$R^2_{adj}$ <sup>z</sup>
Altos / $VI_1$	$Y_2 = 1.31(\text{HFav}_{12})$	<.0001	8.84	2.04	0.47
Altos / $VI_1$	$Y_2 = 0.8(\text{HFav}_2)$	<.0001	0.03	1.00	0.51
Altos / $VI_1$	$Y_2 = 0.95(\text{HFav}_{12}) + 0.25(\text{HRprom}_{12})$	<.0001	2.00	2.04	0.50
Altos / $VI_2$	$Y_2 = 0.0005(\text{HFav}_{12}) + 0.17(\text{HRprom}_{12})$	<.0001	2.00	2.54	0.23
Sur / $VI_1$	$Y_2 = -0.04(\text{HFav}_{12}) + 0.25(\text{HRprom}_{12})$	<.0001	2.00	4.75	0.60
Sur / $VI_1$	$Y_2 = 0.04(\text{HRprom}_2)$	<.0001	6.46	4.00	0.57
Sur / $VI_2$	$Y_2 = 0.002(\text{HFav}_{12}) + 0.02(\text{HRprom}_{12})$	<.0001	2.00	3.67	0.31
Sur / $VI_2$	$Y_2 = 0.004(\text{HFav}_2)$	<.0001	1.04	1.00	0.32
Valles / $VI_1$	$Y_2 = -0.006(\text{HFav}_{12}) + 0.01(\text{HRprom}_{12})$	0.0003	2.00	3.67	0.32
Valles / $VI_1$	$Y_2 = -0.003(\text{HFav}_2) + 0.008(\text{HRprom}_2)$	<.0001	2.00	3.25	0.31
Valles / $VI_2$	$Y_2 = -0.001(\text{HFav}_{12}) + 0.02(\text{Hprom}_{12})$	<.0001	2.00	4.15	0.32
Valles / $VI_2$	$Y_2 = -0.001(\text{HFav}_2) + 0.014(\text{Hprom}_2)$	<.0001	2.00	5.93	0.29

<sup>x</sup>HRprom<sub>2,12</sub>=porcentaje de humedad relativa promedio semanal, HFav<sub>2,12</sub>= horas favorables acumuladas por una semana y desfazadas 2 o 12 semanas a partir de la evaluación de  $Y_2$  / HRprom<sub>2,12</sub>= percentage of weekly relative humidity, HFav<sub>2,12</sub>= favorable hours week accumulated and lag-2 or lag-12 weeks from the evaluation of  $Y_2$ .

<sup>y</sup>Estadísticos de bondad de ajuste: Cp-Mallow. VIF=Factor de inflación de la varianza.  $R^2_{adj}$ =Coeficiente de regresión ajustado / Statistics of goodness of fit: Cp-Mallow. VIF = Variance inflation factor.  $R^2_{adj}$  = Adjusted regression coefficient.



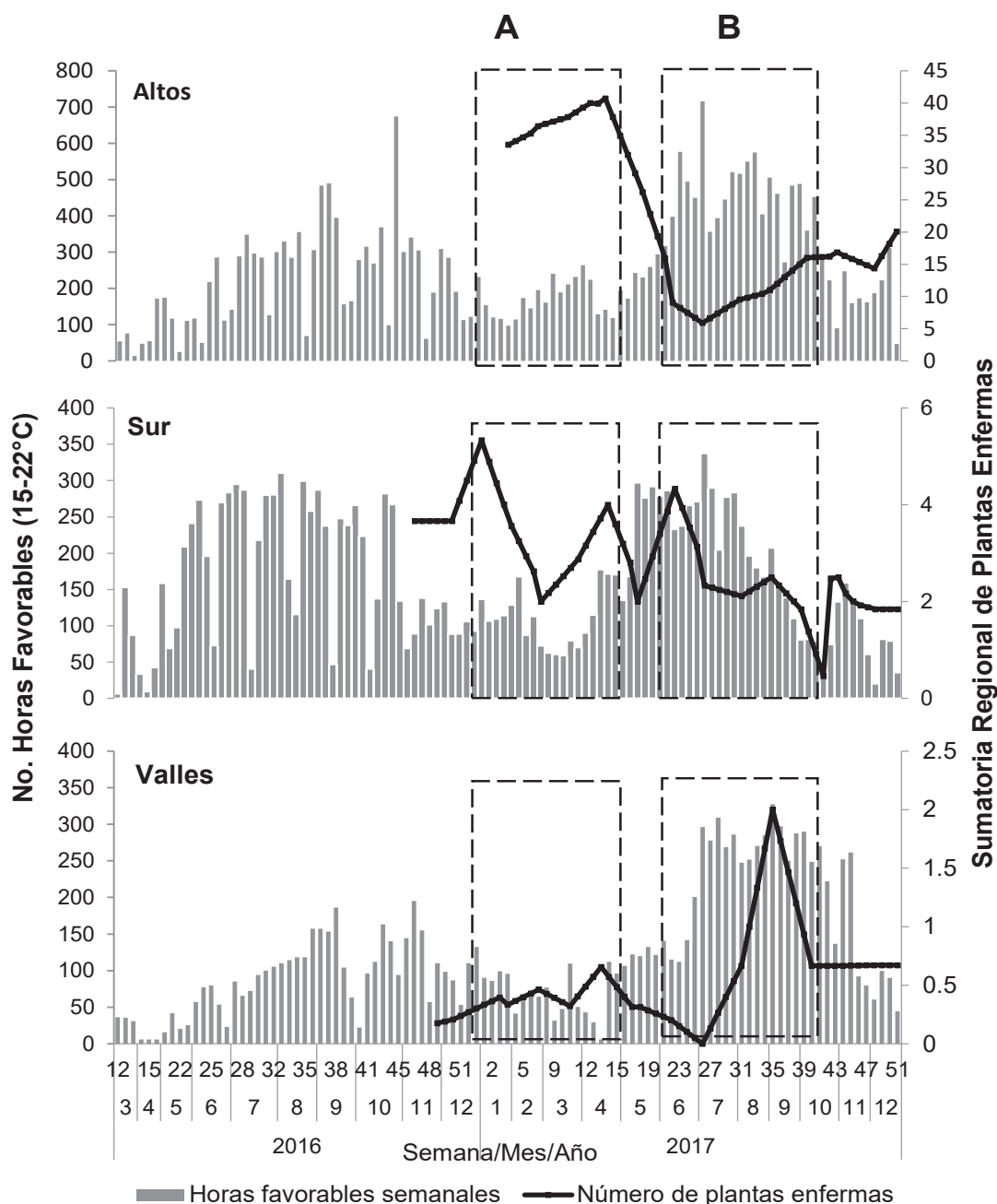


Figura 5. Curvas epidémicas de la sumatoria del número de plantas enfermas de agave azul con mancha gris en 8, 3 y 3 parcelas de monitoreo para Los Altos, Sur y Valles, respectivamente (líneas). Número acumulado por semana de horas favorables para la infección de *C. agavícola* obtenidas de marzo 2016 a dic 2017 (barras). A) Ventana de inductividad epidémica correspondiente al periodo enero-abril 2017 ( $VI_1$ ). B) Ventana de inductividad epidémica correspondiente al periodo jun-oct 2017 ( $VI_2$ ).

Figure 5. Epidemic curves of the sum of the number of diseased blue-agave plants with gray spot in 8, 3 and 3 monitoring plots for Los Altos, South and Valleys, respectively (lines). Accumulated number per week of favorable hours for *C. agavícola* infection obtained from March 2016 to December 2017 (bars). A) Epidemic inductivity window corresponding to January-April 2017 period ( $VI_1$ ). B) Epidemic inductivity window corresponding to Jun-Oct 2017 period ( $VI_2$ ).

firmó con datos exhaustivos de 12 meses obtenidos a partir de una red de monitoreo de 41 parcelas en condición productiva comercial de Jalisco. Sin embargo, todos los parámetros, indicadores y variables estimados demostraron consistentemente la baja capacidad epidémica de *C. agavicola*. Debido al enfoque regional aplicado, el cual permite optimizar el sistema epidemiológico, para captar la variabilidad epidémica regional, estos resultados son inherentemente robustos. Así, tasas epidémicas muy bajas (0.0008-0.006 unidades semana<sup>-1</sup>), contagio fuertemente restringido (1-4 plantas), reducido incremento anual de plantas enfermas (0-32 plantas) y nula captura de esporas en 41 trampas muestran la baja aptitud parasítica del hongo (Cuadro 2-3, Figura 2).

Los modelos estocásticos de pronóstico son recurrentes en la epidemiología por la facilidad analítica de incluir un conjunto de variables en un proceso estadístico automática de selección de variables y modelos (Mora-Aguilera *et al.*, 1993; Chuang y Jeger, 1987; Coakley *et al.*, 1985). Sin embargo, la aplicación práctica de estos modelos puede ser limitada por la captación restringida de la variabilidad implícita en estudios parcelarios en contraposición con enfoques regionales (Mora-aguilera *et al.*, 2015; Carmona *et al.*, 2010). Por otra parte, una condición obligada para la viabilidad del pronóstico es la ocurrencia de epidemias con picos de variable intensidad para garantizar la identificación de variables independientes con una significativa capacidad descriptiva (Mora-Aguilera *et al.*, 1993). En este trabajo, aunque exhaustivo en la caracterización de la varianza epidémica regional con el estudio de 41 epidemias, la baja intensidad de la enfermedad no permitió la generación de modelos con aceptable capacidad predictiva (*i.e.*  $R^2 > 0.70$ ). Esta restricción, más que temporal puede ser inherente a la limitada aptitud parasítica del *C. agavicola* y al rol de la toxina en la intensidad

implicit variability in plot studies different with regional approaches (Mora-aguilera *et al.*, 2015; Carmona *et al.*, 2010). On the other hand, an obligatory condition for the viability of the forecast is the occurrence of epidemics with peaks of variable intensity to guarantee the identification of independent variables with a significant exploratory capacity (Mora-Aguilera *et al.*, 1993). In this work, exhaustive in the characterization of the regional epidemic variance with the study of 41 epidemics, the low intensity of the disease did not allow the development of models with acceptable productive capacity (*i.e.*  $R^2 > 0.70$ ). This restriction, more than temporal, may be associated with the limited parasitic fitness of *C. agavicola* and to the role of the toxin in damage intensity (Apoga *et al.*, 2002; Franco-Navarro y Zavaleta-Mejía, 2001; Daub y Ehrenshaft, 2000; Jens *et al.*, 1989; Kurppa, 1985), which may be important due to the absence of a typical curve of infectious processes with linear temporal trends (Figure 4). Consequently, the premise of this research to predict the primary infectious process successfully, independent of the effect of the toxin could be ruled out and in future mixed models which include the infectious and toxic process would be necessary. More over considering the adaptation of agave to dry weather and high solar radiation, conditions which are possibly optimal for the activation of cercosporin (Daub and Ehrenshaft, 2000). The implications of fungal toxins and other abiotic factors in atypical epidemic processes have been recognized by Vanderplank (1984) and others (Apoga *et al.*, 2002; Liljeroth, 1994, Kurppa, 1985; Ludwig, 1957). However, despite the limited predictive capacity, even of the best models generated, corresponding to Los Altos region and the South ( $R^2_{adj}$  0.51-0.60), some consistent analytical trends were observed: 1). Identification of two disease induction periods, the most important one being on January-April,

del daño (Apoga *et al.*, 2002; Franco-Navarro y Zavaleta-Mejía, 2001; Daub y Ehrenshaft, 2000; Jens *et al.*, 1989; Kurppa, 1985), el cual puede ser importante debido a la ausencia de una curva típica de procesos infecciosos con tendencias temporales lineales (Figura 4). En consecuencia, la premisa de esta investigación de pronosticar el proceso infeccioso primario con éxito, independiente del efecto de la toxina, podría descartarse y en el futuro serían necesarios modelos mixtos que incluyan el proceso infeccioso y el tóxico. Sobre todo, considerando la adaptación del agave a climas secos con alta radiación solar posiblemente óptimos para la activación de la cercosporina (Daub y Ehrenshaft, 2000). Las implicaciones de toxinas fungosas y otros factores abióticos en procesos epidémicos y de patogénesis atípicos han sido reconocidos por Vanderplank (1984) y otros (Apoga *et al.*, 2002; Liljeroth, 1994; Kurppa, 1985; Ludwig, 1957). Sin embargo, a pesar de la limitada capacidad predictiva, aun de los mejores modelos generados, correspondientes a Los Altos y Sur ( $R^2_{adj}$  0.51-0.60), se observaron tendencias analíticas consistentes: 1). Identificación de dos ventanas de inductividad de enfermedad siendo más importante la de enero-abril, posiblemente por las condiciones más ideales para el desarrollo de la infección primaria con limitado efecto de toxina (Ángeles-Espino *et al.*, 2016). 2). Selección de un periodo LAG de 2 y 12 semanas que podrían estimar el periodo de incubación y latencia del hongo, respectivamente. En *Pseudocercospora opuntiae*, un hongo con similar comportamiento epidémico (Hernández-Sánchez *et al.*, 2014), se reporta un periodo de latencia de 14 semanas (Quezada-Salinas *et al.*, 2013). 3). La inclusión de horas favorables acumuladas (HFav) respecto a la infección del hongo, lo cual sugiere que este indicador puede integrarse a SIVEA ([www.sivea.org.mx](http://www.sivea.org.mx)) mediante un algoritmo que automatice su cálculo para representar un indicador de riesgo o inductividad. Este

posiblemente due to the most ideal conditions for the development of the primary infection with limited toxin effect (Ángeles-Espino *et al.*, 2016). 2). Selection of a LAG period of 2 and 12 weeks that could estimate the incubation period and latency of the fungus, respectively. In *Pseudocercospora opuntiae*, a fungus with similar epidemic behavior (Hernández-Sánchez *et al.*, 2014), a latency period of 14 weeks is reported (Quezada-Salinas *et al.*, 2013). 3). The inclusion of cumulative favorable hours (HFav) regarding the infection of the fungus suggests that this indicator can be integrated into SIVEA ([www.sivea.org.mx](http://www.sivea.org.mx)) through an algorithm that automates its calculation to represent an indicator of risk or inductance. This indicator could activate the monitoring of diseased plants at parcel and regional level for their early elimination, a practice that agave producers already undertake on an observational basis. The elimination of damaged plants, assisted by HFav with emphasis on inductive periods ( $VI$ ), can be successful considering that the disease has a strong contagion restriction, an idea reinforced by the absence of spore capture in the impact and deposition devices, limited to a maximum of 1-4 plants in initial to advanced foci. In this context, the use of drones can be a promising strategy for the surveillance of early foci at parcel level (Figure 3), for both leading producers and companies, as well as for personnel from the Campaign against Regulated Pests of the Agave ([www.sivea.org.mx](http://www.sivea.org.mx)).

Finally, in spite of the low parasitic fitness and epidemic potential of *C. agavicola*, the estimation of the productive impact at commercial level (6 years) can be significant at regional level under the scenario of the epidemic rates found in this investigation, 84 % of affected plots after 3 years and the absence of sanitary jimas that reduce the inoculum load. Thus, at the average price/kilo 2018 of 24 pesos MXN and pineapples / 50 kg, regional

indicador, podría activar el monitoreo de plantas enfermas a nivel de predio y región para su temprana eliminación. Una práctica que los productores de agave ya realizan sobre la base observacional. La eliminación de plantas dañadas, asistida por HFav con énfasis en ventanas de inductividad ( $VI_t$ ), puede ser exitosa considerando que la enfermedad tiene una fuerte restricción de contagio, idea reforzada por la ausencia de captura de esporas en los dispositivos de impacto y deposición, limitándose a un máximo de 1-4 plantas en focos iniciales a avanzados. En este contexto el empleo de drones pueden ser una estrategia promisoría para la vigilancia de focos tempranos a nivel de predio (Figura 3), tanto por productores líderes y empresas, como por personal de la Campaña contra Plagas Reglamentadas del Agave ([www.sivea.org.mx](http://www.sivea.org.mx)).

Finalmente, a pesar de la baja aptitud parasítica y epidémica del *C. agavicola*, la estimación en el impacto productivo, a jima comercial (6 años), puede ser significativo a nivel regional bajo un escenario de las tasas epidémica encontradas en este trabajo, 84% de predios afectados a partir de los 3 años y ausencia de jimas sanitarias que reduzcan la carga de inóculo. Así, a precio/kilo promedio 2018 de 24 pesos MXN y piñas/50 kg, las pérdidas regionales pueden ser de 2,058,187,075 MXN (98.01 MDD) a 4,985,330 MXN (237 mil USD). A nivel de una hectárea, bajo los mismos supuestos, las pérdidas pueden oscilar entre 915,448 MXN a 124,500 MXN, respectivamente. Para una industria que depende de inventarios productivos planeados a mediano plazo; una creciente exportación de tequila, ubicándose en 2018 en cuarto lugar en captación de dividendos agrícolas; competencia con la industria de inulina de agave, y la reconversión de predios al cultivo de berries, hace imperativo la eficiencia sanitaria y productiva.

losses go from 2,058,187,075 MXN (98.01 MDD) to 4,985,330 MXN (237 thousand USD). At the level of one hectare under the same assumptions, the losses can range from 915,448 MXN to 124,500 MXN, respectively. For an industry that depends on medium-term productive inventories; growing exports of tequila, ranking in 2018 in fourth place on capturing agricultural divisions parasitic fitness and epidemic potential; competition with the agave insulin industry and the conversion of properties to the cultivation of berries make sanitary and productive efficiency imperative.

## CONCLUSIONS

This work constitutes the first regional epidemiological study in Jalisco of *Cercospora agavicola*, the causal agent of the gray spot in blue agave (*Agave tequilana*). The regional epidemic inductivity of *C. agavicola* was heterogeneous with a greater risk for at least nine municipalities of Los Altos. However, all parameters, indicators and estimated variables consistently demonstrated the low epidemic potential of *C. agavicola*. Therefore a limited predictive capacity was found even with the best models generated ( $R^2_{adj}$  0.51-0.60). The cumulative favorable hours variable (HFav) with respect to the infection of the fungus was consistent among the best models, which suggests that this indicator could be integrated into SIVEA ([www.sivea.org.mx](http://www.sivea.org.mx)) for preventive and control purposes. It is necessary to strengthen the understanding of the biology of the fungus with an emphasis on pathogenesis, dispersion, inoculum charge, and the effect of cercosporin. In spite of the low parasitic fitness of *C. agavicola*, the regional losses can range between 98.01 MDD and 237 thousand US dollars.

## CONCLUSIONES

Este trabajo constituye el primer estudio epidemiológico regional en Jalisco de *Cercospora agavicola*, agente causal de la mancha gris del agave azul (*Agave tequilana*). La inductividad epidémica regional de *C. agavicola* fue heterogénea con mayor riesgo para al menos nueve municipios de Los Altos. Sin embargo, todos los parámetros, indicadores y variables estimadas demostraron consistentemente la baja capacidad epidémica de *C. agavicola*. Por lo anterior, se encontró una limitada capacidad predictiva aun con los mejores modelos generados ( $R^2_{adj}$  0.51-0.60). La variable horas favorables acumuladas (HFav) respecto a la infección del hongo fue consistente entre los mejores modelos, lo cual sugiere que este indicador puede integrarse a SIVEA ([www.sivea.org.mx](http://www.sivea.org.mx)) con fines preventivos y de control. Es necesario fortalecer la comprensión de la biología del hongo con énfasis en la patogénesis, dispersión, carga de inóculo, y el efecto de la cercosporina. A pesar de la baja aptitud parasítica de *C. agavicola*, las pérdidas regionales pueden oscilar entre 98.01 MDD y 237 mil dólares americanos.

## AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece a COLPOS y CONACYT por la beca para estudios de maestría. Al LANREF por su apoyo incondicional en el desarrollo del proyecto. A Miranda Mora Gutiérrez por la traducción al inglés.

## LITERATURA CITADA

- Apoga D, Åkesson H, Jansson HB, Odham G. 2002. Relationship between production of the phytotoxin prehelminthosporol and virulence in isolates of the plant pathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana*. *European Journal of Plant Pathology* 108: 519-526. <https://doi.org/10.1023/A:1019976403391>
- Acevedo-Sánchez G, Santana-Peñaloza B, López-Bautista V, Martínez-Bustamante V, Coria-Contreras J, Mendoza-

## ACKNOWLEDGMENTS

The first author thanks COLPOS and CONACYT for the scholarship for master's studies. To LANREF for its unconditional support in the development of the project. To Miranda Mora Gutiérrez for the English translation.

### End of the English version

- Ramos C, Jiménez-González L y Mora-Aguilera G. 2017. Criterios epidemiológicos para implementar una red de monitoreo de enfermedades causadas por *Fusarium* spp. en regiones agaveras de Jalisco. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(S): 176-177. <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento352017.html>
- Ángeles-Espino A, Virgen-Calleros G, Valencia-Botín J, Ramírez-Serrano C, Paredes-Gutiérrez L y Hurtado de la Peña S. 2016. Evaluación no destructiva de la patogenicidad de *Cercospora agavicola* en vitroplántulas de agave azul tequilero irradiadas con rayos gamma Co<sup>60</sup>. *Acta Universitaria* 26(6): 3-10. doi: 10.15174/au.2016.1121
- Ayala-Escobar V, Yañez-Morales M, Braun U, Groenewald JZ and Crous PW. 2005. *Cercospora agavicola* a new foliar pathogen of *Agave tequilana* var. azul from Mexico. *Mycotaxon* 93:115-121. <https://www.researchgate.net/publication/25481243>
- Carmona M, Moschini RC, Cazenave G y Sautua F. 2010. Relación entre la precipitación registrada en estados reproductivos de la soja y la severidad de *Septoria glycines* y *Cercospora kikuchii*. *Tropical Plant Pathology* 35:71-78. [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1982-56762010000200001&script=sci\\_abstract&tlng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1982-56762010000200001&script=sci_abstract&tlng=es)
- Campbell CL and Madden LV. 1990. *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. John Wiley and Sons. New York, USA. 532 p.
- Chuang TY. and Jeger MJ. 1987. Predicting the rate of development of black sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*) disease in southern Taiwan. *Phytopathology* 77: 1542-1547.
- Coakley SM, McDaniel LR and Shaner G. 1985. Model for predicting severity of *Septoria tritici* blotch on winter wheat. *Phytopathology* 75: 1245-1251.
- Daud ME and Ehrenshaft M. 2000. The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: Contributions to plant disease and fundamental biology. *Annual Review of Phytopathology* 38: 461-490. doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.461.
- Franco-Navarro F y Zavaleta-Mejía E. 2001. Estado actual del conocimiento acerca del modo de acción de las toxinas no selectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19(2): 237-244
- Guzmán-Hernández E, Flores-Colorado OE, Acevedo-Sánchez G, Mora-Aguilera G, López-Javier MA y González-



- Gómez R. 2017. APPS como herramientas de soporte epidemiológico aplicado a sistemas regionales de vigilancia epidemiológica. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(S): 178-179. <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento352017.html>
- Hernández-Sánchez E, Mora-Aguilera G, Tlalpal-Bolaños B, Rodríguez-Leyva E y Alvarado-Rosales D. 2014. Effect of initial disease intensity of cactus black spot (*Opuntia ficus-indica*) in temporal and spatial characterization. *Mexican Journal of Phytopathology* 32(2): 132-146. [http://rmf.smf.org.mx/Vol322014/AR/32-2\\_05.pdf](http://rmf.smf.org.mx/Vol322014/AR/32-2_05.pdf)
- Jens AE, Daub ME and Upchurch RG. 1989. Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. *Phytopathology* 79: 213-219. DOI: 10.1094/Phyto-79-213.
- Jiménez-González LR, Mendoza-Ramos C, Santana-Peñaloza B, Coria-Contreras J, Delgado-Mora F, Acevedo-Sánchez G, Guzmán-Hernández E y Mora-Aguilera G. 2017. Escala logarítmica diagramática de severidad para medición de pudrición seca del cogollo, marchitez y mancha gris del agave azul. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(S): 177. <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento352017.html>
- Kurppa A. 1985. Reaction of spring barley cultivars grown in Finland to soil-borne infection by *Bipolaris sorokiniana* and to its toxic metabolites. *Journal of Agricultural Science in Finland* 57: 85-96. <file:///C:/Users/Editor%20en%20Jefe%20-%20RMF/Downloads/72189-Article%20Text-96272-1-10-20180618.pdf>
- Liljeroth E, Franzon-Almgren I, and Gustafsson M. 1994. Effect of prehelminthosporol, a phytotoxin produced by *Bipolaris sorokiniana*, on barley roots. *Canadian Journal of Botany* 72: 558-563. <https://doi.org/10.1139/b94-074>
- Ludwig RA. 1957. Toxin production by *Helminthosporium sativum* and its significance in disease development. *Canadian Journal of Botany* 35: 291-304. <https://doi.org/10.1139/b57-026>
- Mora-Aguilera G y Acevedo-Sánchez G. 2016. Desarrollo de REG-NCafé v1.0 para determinar n-sitios de monitoreo-muestreo regional de roya del café en México usando criterios epidemiológicos ponderados. *Acta del 49° Congreso Brasileiro de Fitopatología*; 29 ago - 01 sep; Alagoas, Maceio, Brasil.
- Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Coria-Contreras J, González-Gómez R, López-Buenfil A y Javier-López MA. 2015. Alertas tempranas regionales para manejo de focos de roya del café en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33(S): 62. <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento332015.html>
- Mora-Aguilera G, Coria-Contreras J, Flores-Sánchez J, Domínguez-Monje S, Acevedo-Sánchez G, Aguilar-Pérez L, Martínez-Bolaños M y Guzmán-Deheza A. 2014. Desarrollo y validación de una trampa pasiva para monitoreo de esporas de *Hemileia vastatrix*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32(S): 83. <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento322014.html>
- Mora-Aguilera G, Nieto AD, Campbell CL, Téliz D, and García E. 1996. Multivariate comparison of papaya ringspot epidemics. *Phytopathology* 86:70-78. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1996Articles/Phyto86n01\\_70.pdf](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1996Articles/Phyto86n01_70.pdf)
- Mora-Aguilera G, Téliz D, Nieto D, and Campbell CL. 1993. Development and validation of a prediction model for papaya ringspot in Veracruz, México. *Plant Disease* 77:1205-1211. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1996Articles/Phyto86n01\\_70.pdf](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1996Articles/Phyto86n01_70.pdf)
- Quezada-Salinas A, Sandoval-Islas JS, Alvarado-Rosales D y Moreno-Velázquez, M. 2013. Histopatología y patogénesis de *Pseudocercospora opuntiae* en nopal. *Rev. Mex. Micología* 38: 9-18. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-31802013000200003&lng=es&tln=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802013000200003&lng=es&tln=es).
- Rubio CR. 2007. Enfermedades del cultivo de agave. Pp. 170-195. Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la zona de Denominación de Origen del Tequila. Rulfo VFO (ed.). Libro Técnico 4. INIFAP. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México.
- SIAP. 2015 y 2018. Servicio de Información Agrícola y Pesquera. SAGARPA. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (consultado enero 2015 y abril 2018).
- Sambrook JF and Russell DW (Eds). 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2100p. <https://www.cshlpress.com/pdf/sample/2013/MC4/MC4FM.pdf>
- Santana-Peñaloza B, Acevedo-Sánchez G, Coria-Contreras J, Mora-Aguilera G, González-Gómez R y López-Buenfil A. 2015. CALCULA-HF V.1.0: Estimación de horas favorables de inductividad epidémica debido a la germinación de uredosporas de *Hemileia vastatrix*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33(S): 117. <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento332015.html>
- SENASICA. 2017. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Manual operativo de la campaña contra plagas reglamentadas del agave. Dirección de Protección Fitosanitaria. Clave: MOP-DPF-PRAV. <http://www.sivea.org.mx/>
- Vanderplank JE. 1984. *Disease Resistance in Plants*. 2ed. Academic Press Inc. London. 208p.
- Valencia BA. 2011. Evolución histórica y situación actual de la mancha gris en el cultivo del Agave azul tequilero. *In: 1er Foro de discusión fitosanitaria en el cultivo del agave azul tequilero integrando esfuerzos para impulsar bienestar en el sector*. 31 de may-01 jun Guadalajara, Jalisco, México. <https://www.crt.org.mx/images/documentos/MEMORIA1erFORODEDISCUSIONFITOSANITARIA%28FINAL%29.pdf>
- White TJ, Brüns T, Lee S, Taylor J, Innis A, Gelfand HD and Sninsky J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 *In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, and White TJ. (Eds). Academic Press, Inc. New York.