

# CARACTERIZACIÓN ESPACIAL DE LA SIGATOKA AMARILLA DEL BANANO E IMPLICACIONES EN EL MUESTREO

## SPATIAL CHARACTERIZATION OF BANANA YELLOW SIGATOKA AND ITS IMPLICATIONS FOR SAMPLING

Otacílio M. da Rocha Júnior<sup>1</sup>, Marcos P. Saraiva Câmara<sup>2</sup>, Sami J. Michereff<sup>2</sup>,  
Michelle J. de-Oliveira<sup>3</sup>, Gustavo Mora-Aguilera<sup>4\*</sup>, Noe Ruiz-García<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA). 55890-000. Aliança, PE, Brasil.  
<sup>2</sup>Departamento de Agronomia. Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). 52171-900. Recife, PE, Brasil. (sami@depa.ufrpe.br). <sup>3</sup>Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). 50630-060. Recife, PE, Brasil. <sup>4</sup>Fitopatología. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. México. (morag@colpos.mx). <sup>5</sup>Instituto de Ecología, Campus Puerto Escondido, Universidad del Mar. Oaxaca, México.

### RESUMEN

La sigatoka amarilla, causada por el hongo *Mycosphaerella musicola*, es una enfermedad importante del banano (*Musa* spp.) diseminada ampliamente en Brasil. Este trabajo tuvo como objetivo aplicar criterios de dispersión espacial de la sigatoka amarilla en un sistema de muestreo para estimar la severidad de la enfermedad en el Valle del Siriji, al nordeste de Brasil. El patrón espacial de la enfermedad se caracterizó en tres plantaciones de banano cv. Pacovan, considerando 30 surcos contiguos y 30 plantas por surco, con un total de 900 plantas. La severidad se analizó mediante autocorrelación, índice de Lloyd y mapas interpolativos geostatísticos. A pesar del reducido rango de severidad entre plantaciones (44.2-34.5 %), éstas presentaron un patrón de moderado a fuertemente agregado con dependencias espaciales continuas del orden 2, 14 y 27 implicando distancias de contagio de 81, 42 y 6 m. Los agregados tuvieron una predominancia alargada en dirección de los surcos con distancias de contagio lateral, en dos de las plantaciones, de 39 a 3 m. Las interpolaciones evidenciaron una generalización espacial de agregados, lo cual concordó con valores bajos del índice de Lloyd (1.01-1.04). Se diseñó un muestreo sistemático con intervalos de selección de surcos ( $k_1$ ) y plantas ( $k_2$ ) de 6 unidades para un total  $n=50$ , con lo cual se exploró toda la unidad productiva pero se priorizó la selección intra-surco, por la propiedad agregativa. Este muestreo se aplicó en 30  $i$ -plantaciones para estimar el tamaño de muestra mediante  $n_i = (k + \bar{x}) / (\bar{x} \cdot k \cdot CV_{\bar{x}}^2)$ , donde  $k$  es un estimador de agregación de la distribución binomial negativa y  $CV$  el error

### ABSTRACT

Yellow sigatoka, caused by the fungus *Mycosphaerella musicola*, is a major disease of banana (*Musa* spp.) and is widely spread in Brazil. This study was conducted to apply spatial dispersion criteria of yellow sigatoka in a sampling system to estimate the disease severity in the Valley of Siriji in northeastern Brazil. The disease spatial pattern was characterized in three fields of cv Pacovan bananas, where 30 contiguous rows, 30 plants per row were considered, giving a total of 900 plants. Severity was analyzed by autocorrelation, Lloyd index and geostatistical interpolative maps. In spite of the narrow range of severity among plantations (44.2-34.5 %), they exhibited a moderately to strongly aggregate pattern with continuous spatial dependencies of 2, 14, and 27 order, implicating contagious distances of 81, 42, and 6 m. The aggregates had an elongated predominance in direction of the rows with lateral contagious distances of 39 to 3 m in two of the fields. Interpolations evidenced spatial generalization of aggregates, concurring with the low values of the Lloyd index (1.01-1.04). Systematic sampling was designed with intervals of selection of rows ( $k_1$ ) and plants ( $k_2$ ) of 6 units for a total  $n=50$ , with which the entire production unit was explored, but giving priority to intra-row selection by the aggregative property. This sampling method was applied in an additional 30  $i$ -fields to estimate the sample size using  $n_i = (k + \bar{x}) / (\bar{x} \cdot k \cdot CV_{\bar{x}}^2)$ , where  $k$  is an estimator of aggregation of the negative binomial distribution and  $CV$  the acceptable error. With a 5 % error,  $n_i$  had a range of 111-6 plants and was inversely proportional to the level of severity. In an epidemiological survey, systematic sampling ( $k_1=6, k_2=6$ ) is proposed with a 5 % error and  $n=34$  plants  $ha^{-1}$ , corresponding to 3.8 % of the population.

\*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: Noviembre, 2008. Aprobado: Noviembre, 2009.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 44: 351-361. 2010.

**aceptable. Con un 5 % de error,  $n_i$  tuvo un rango de 111-6 plantas y fue inversamente proporcional al nivel de severidad. En un diagnóstico epidemiológico se propone un muestreo sistemático ( $k_1=6$ ,  $k_2=6$ ) con un 5 % de error y  $n=34$  plantas  $ha^{-1}$  lo que representa 3.8 % poblacional.**

**Palabras clave:** *Musa* spp., *Mycosphaerella musicola*, epidemiología, fitopatometría, muestreo.

## INTRODUCCIÓN

**B**rasil es el segundo mayor productor mundial de banano (*Musa* spp.), con una área cultivada de 499 230 ha y una producción de 7.1 millones t, siendo superado por la India (11.7 millones t, FAO, 2008). La producción promedio en Brasil 13.6 t  $ha^{-1}$ , es menor con respecto a Costa Rica (53.9 t  $ha^{-1}$ ) y Ecuador (27.6 t  $ha^{-1}$ ) que son líderes en el mercado global.

La incidencia de enfermedades es la causa principal de la baja productividad del banano en Brasil. Entre éstas, la sigatoka amarilla, causada por el hongo *Mycosphaerella musicola* Leach (anamorfo *Pseudocercospora musae* (Zimm.) Deighton), se encuentra en todo el territorio nacional y con gran importancia en las regiones donde las lluvias exceden 1000 mm anuales y la temperatura media es 25 °C (Cordeiro *et al.*, 2005). La infección de este hongo ocurre en las hojas jóvenes, incluyendo la hoja cero (hoja no desplegada), uno, dos, tres y excepcionalmente la cuatro (Stover, 1971). El síntoma inicial de la Sigatoka amarilla consiste en una decoloración leve en forma de punto entre las nervaduras foliares, la cual cambia a una lesión elongada necrótica con un amarillamiento marginal. En ataques severos puede ocurrir la coalescencia de lesiones y se afecta poco más de 50 % del área foliar, lo que causa la muerte prematura de las hojas. En Brasil, las pérdidas debido a la sigatoka amarilla son aproximadamente 50 % de la producción (Cordeiro *et al.*, 2005).

A pesar de la importancia mundial de la enfermedad no hay propuestas de sistemas de muestreo con fundamento epidemiológico para su aplicación en programas de manejo sanitario, lo que dificulta la eficacia de métodos de control (Martínez y Toledo, 1977). La propuesta clásica de evaluar intensidad de enfermedad en 10 plantas/área (Stover, 1971; Martínez y Toledo, 1977; Pereira *et al.*, 1981), tiene una base empírica que excluye atributos espaciales

**Key words:** *Musa* spp., *Mycosphaerella musicola*, epidemiology, phytopathometry, sampling.

## INTRODUCTION

**B**razil is the second largest world producer of bananas (*Musa* spp.) with a cultivated area of 499 230 ha and a production of 7.1 million t, after India (11.7 million t, FAO, 2008). The average yield in Brazil is 13.6 t  $ha^{-1}$ , which is much lower than that of the leaders on the world market, Costa Rica (53.9 t  $ha^{-1}$ ) and Ecuador (27.6 t  $ha^{-1}$ ).

Occurrence of diseases is the main cause of low productivity in Brazil. Among these, yellow sigatoka, caused by the fungus *Mycosphaerella musicola* Leach (anamorph *Pseudocercospora musae* (Zimm.) (Deighton), is found throughout the country and is a major disease in regions where annual rainfall exceeds 1000 mm and the mean temperature is 25 °C (Cordeiro *et al.*, 2005). The fungus infects young leaves, including leaves zero (unopened leaf), one, two, three and, exceptionally, leaf four (Stover, 1971). The initial symptom of yellow sigatoka is slight discoloring in the form of spots amid leaf venation; these spots become long necrotic lesions with yellowing edges. In severe attacks lesions may coalesce and affect a little over 50 % of the leaf area, causing premature death of the leaf. In Brazil, production losses caused by yellow sigatoka are approximately 50 % (Cordeiro *et al.*, 2005).

In spite of the worldwide importance of the disease, there are no proposals of epidemiologically grounded sampling systems to be used in sanitary management programs, making effective control methods difficult to achieve (Martínez and Toledo, 1977). The classical proposal of evaluating the intensity of the disease in 10 plants/unit of area (Stover, 1971; Martínez and Toledo, 1977; Pereira *et al.*, 1981) has an empirical basis, which excludes spatial attributes that are indispensable because of the dynamic property of the disease. Sampling with an epidemiological approach includes, in a first stage, the characterization of the spatial attributes of the population in order to provide the basis for sampling patterns, as well as for the selection of specifically simple or compound sampling units (Ruiz-García *et al.*, 2005; Ruiz-García, 2008).

indispensables por el carácter dinámico de la enfermedad. Muestreos con un enfoque epidemiológico incluyen, en una primera etapa, la caracterización de atributos espaciales de la población para fundamentar patrones de muestreo, así como la selección de unidades de muestreo simples o compuestas de forma específica (Ruiz-García *et al.*, 2005; Ruiz-García, 2008). Congruente con la importancia de considerar atributos biológicos, en un sistema de muestreo con fines fitosanitarios, el objetivo del presente estudio fue determinar el patrón espacial de la sigatoka amarilla en condiciones de campo y su implicación en la determinación del tamaño de muestra en condiciones contrastantes de intensidad de la enfermedad.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Análisis del patrón espacial de la sigatoka amarilla

El experimento se realizó en el 2006 en el Valle del Siriji, estado de Pernambuco, Brasil, en tres plantaciones de banano cultivar Pacovan (E-1, E-2 y E-3) distanciadas entre sí con un mínimo de 5 km. Las plantaciones carecieron de irrigación y fueron manejadas en un sistema de tres generaciones por sitio de plantación (planta madre, hijuelo-1 y hijuelo-2) y con una densidad de plantación de 3×3 m. El manejo cultural se efectuó con prácticas regionales, excepto el uso de funguicidas para permitir la máxima expresión de la enfermedad.

En cada plantación se delimitó una subparcela de 30 líneas contiguas y 30 plantas madre por línea; esto es 900 plantas madre con sus respectivos vástagos. La severidad de la sigatoka amarilla fue evaluada en la fase fenológica de fructificación, en las nueve hojas más jóvenes de cada planta madre, usando una escala diagramática de 0 a 6 clases (Orjeda, 1998). La severidad total por planta (STP) se calculó con la ecuación:  $STP = \left[ \sum (nb) / (NT) \right] 100$ , donde  $n$ =número de hojas por cada clase de la escala de severidad;  $b$ =clase de severidad conforme la escala;  $N$ =clase máxima de severidad de la escala;  $T$ =número total de hojas evaluadas (Orjeda, 1998).

Para examinar la intensidad y la forma de los agregados de plantas enfermas, se hizo un análisis autocorrelativo de los datos de STP con el programa LCOR2 (Gottwald *et al.*, 1992). Para este fin, en cada parcela se generaron mapas bidimensionales de localización  $[x_i, y_j]$  de cada planta madre. La intensidad y forma promedio de los agregados estuvo definida por el número de dependencias espaciales continuas significativas ( $\alpha=0.05$ ) dentro y entre surcos a partir de posición  $[0,0]$  de la matriz de autocorrelación. La capacidad de contagio de un foco (*i.e.* plantas enfermas conformando un agregado) en forma discreta se

Congruente con la importancia de considerar atributos biológicos en un sistema de muestreo con fines fitosanitarios, el objetivo de este estudio fue determinar el patrón espacial de la sigatoka amarilla en condiciones de campo y su implicación en la determinación del tamaño de muestra en condiciones contrastantes de intensidad de la enfermedad.

## MATERIAL AND METHODS

### Analysis of the spatial pattern of yellow sigatoka

The experiment was conducted in 2006 in the Valley of Siriji, state of Pernambuco, Brazil, on three fields producing the banana cultivar Pacovan (E-1, E-2 and E-3). The plantations fields are separated by at least 5 km. They lacked irrigation and were managed under a three-generation system (mother plant, daughter-1 and daughter-2) in each planting site with a plant density of 3×3 m. Cultural management was done with regional practices, except for the use of fungicides to allow maximum expression of the disease.

In each field, a subplot of 30 continuous rows and 30 mother plants per row was delimited; this made a total of 900 mother plants with their respective daughters in each subplot. Severity of yellow sigatoka was assessed during the phenological stage phase of fructification on the nine youngest leaves of each mother plant using a diagrammatic scale of 0 to 6 classes (Orjeda, 1998). Total severity per plant (STP) was calculated with the equation  $STP = \left[ \sum (nb) / (NT) \right] 100$ , where  $n$ =number of leaves per class on the severity scale;  $b$ =severity class according to the scale;  $N$ =maximum severity class of the scale;  $T$ =total number of leaves assessed (Orjeda, 1998).

To examine the intensity and form of the aggregates of the diseased plants, an autocorrelation analysis was applied to the STP data with the software LCOR2 (Gottwald *et al.*, 1992). To this end, in each plot bi-dimensional maps of the location  $[x_i, y_j]$  of each mother plant were generated. Average intensity and shape of the aggregates were defined by the number of significant ( $\alpha=0.05$ ) continuous spatial dependencies within and between rows, beginning with position  $[0,0]$  of the autocorrelation matrix. The ability of contagium from a focus (*i.e.* diseased plants forming an aggregate) in discrete form was evaluated with the significant discontinuous dependencies within and between rows. Also, the Lloyd aggregation index was calculated (Campbell and Madden, 1990) with the software MorLloyd version 1.0 in Microsoft® Excel® (Rivas and Mora-Aguilera, 2008<sup>[6]</sup>), and geo-statistical interpolation maps were constructed using Surfer® version 6.04 for bi- and tri-dimensional exploration.

evaluó con las dependencias discontinuas significativas dentro y entre surcos. Además se calculó el índice de agregación de Lloyd (Campbell y Madden, 1990) con el programa MorLloyd ver 1.0 en Microsoft® Excel® (Rivas y Mora-Aguilera, 2008<sup>[6]</sup>) y se realizaron mapas de interpolación geoestadística mediante Surfer® ver. 6.04 con fines de exploración bi- y tridimensional.

### Cálculo del tamaño de la muestra

De abril de 2006 a febrero de 2007 se realizaron muestreos piloto evaluando la severidad de la sigatoka amarilla en 30 plantaciones de banano (S-01 a S-30) cultivar Pacovan, en el Valle del Siriji. La distancia mínima entre plantaciones fue 3.5 km; y el manejo y densidad fue análogo a las plantaciones E1-E3. En cada parcela se delimitó una sub-parcela de aproximadamente 2 ha (100×200 m), conformada por  $N_1=64$  surcos y  $N_2=32$  plantas madre cada una. En esta población se seleccionó una muestra sistemática simple de 50 plantas madre, con  $n_1=10$  surcos y  $n_2=5$  plantas madre por surco. Con un intervalo de muestreo de  $k_1=64/10\approx 6$  surcos y  $k_2=32/5\approx 6$  plantas, se seleccionó aleatoriamente el surco  $r_1=5$  y la planta madre  $r_2=3$  como primer punto de muestreo; los demás surcos se seleccionaron según  $r_1+(i-1)k_1$ ,  $i=1,\dots,n_1$ , y dentro de cada surco seleccionado a la planta madre ubicada en la posición  $r_2+(j-1)k_2$ ,  $j=1,\dots,n_2$ . El punto de inicio estuvo ubicado en la esquina superior izquierda, desde la cual se evaluó la severidad de las plantas ubicadas en las coordenadas proporcionadas por el esquema de muestreo sistemático. La severidad por hoja y la total por planta (STP) se calculó con el procedimiento ya descrito.

Los datos de severidad de la sigatoka amarilla obtenidos en los muestreos sistemáticos se usaron para estimar el tamaño de muestra ( $n$ ) por parcela, considerando que el patrón espacial de plantas enfermas se definió como tipo agregado mediante el análisis autocorrelativo. Para este fin, la estimación de  $n$  se obtuvo mediante la ecuación:  $n = (k + \bar{x}) / (\bar{x} \cdot k \cdot CV_{\bar{x}}^2)$ , donde  $k$  es el parámetro asociado a la distribución binomial negativa, descriptiva de la disposición agregada de plantas enfermas, y puede ser estimado como:  $k = \bar{x}^2 / (S^2 - \bar{x})$ , siendo  $\bar{x}$  la severidad media de la enfermedad en 50 plantas y  $S^2$  la varianza de la muestra, mientras que  $CV_{\bar{x}}$  es valor de confiabilidad (error aceptable) preestablecido a 3, 5 y 10 % (CV=0.03, 0.05, 0.10) (Karandinos, 1978; Campbell y Madden, 1990).

El desempeño del esquema de muestreo sistemático anterior y el tamaño de muestra resultante se evaluó en los tres huertos censados (E1-E3) mediante simulación Montecarlo, en las cuales se conoce la severidad promedio ( $\bar{x}$ ) y varianza ( $S_x^2$ ) verdaderas.

### Calculation of sample size

From April 2006 to February 2007 pilot samplings were conducted to assess yellow sigatoka severity in 30 banana fields (S-01 to S-30), cultivar Pacovan, in the Siriji Valley. The shortest distance between fields was 3.5 km; management and density was analogous to fields E1-E3. In each plot a subplot was delimited of approximately 2 ha (100×200 m), formed by  $N_1=64$  rows and  $N_2=32$  mother plants each. From this population a simple systematic sample of 50 mother plants was selected, with  $n_1=10$  rows and  $n_2=5$  mother plants per row. With a sampling interval of  $k_1=64/10\approx 6$  rows and  $k_2=32/5\approx 6$  plants, row  $r_1=5$  and the mother plant  $r_2=3$  was randomly designated the first sampling point; the rest of the rows were selected by  $r_1+(i-1)k_1$ ,  $i=1,\dots,n_1$ , and, within each selected row, the mother plant located in position  $r_2+(j-1)k_2$ ,  $j=1,\dots,n_2$ , was selected. The initial point was in the upper left-hand corner; from there severity of the disease was assessed on plants located on the coordinates provided by the systematic sampling schema. Severity on each leaf and the total per plant (STP) were calculated with the procedure described above.

Data on severity of yellow sigatoka obtained from the systematic samplings were used to estimate the sample size ( $n$ ) by plot, considering that the spatial pattern of diseased plants was defined as an aggregate type with the autocorrelation analysis. To this end, estimation of  $n$  was obtained with the equation  $n = (k + \bar{x}) / (\bar{x} \cdot k \cdot CV_{\bar{x}}^2)$ , where  $k$  is the parameter associated with the negative, descriptive binomial distribution of the aggregate disposition of the diseased plants and can be estimated as  $k = \bar{x}^2 / (S^2 - \bar{x})$ , where  $\bar{x}$  is the mean severity of the disease in 50 plants and  $S^2$  is the sample variance, while  $CV_{\bar{x}}$  is the confidence value (acceptable error) pre-established at 3, 5 and 10 % (CV=0.03, 0.05, 0.10) (Karandinos, 1978; Campbell and Madden, 1990).

Performance of the above systematic sampling schema and the resulting sample size was evaluated in the three fields (E1-E3) using Monte Carlo simulations, by which true average severity ( $\bar{x}$ ) and variance ( $S_x^2$ ) are determined. The performance criteria used were the following: accuracy:  $\bar{x}^* - \bar{x}$ ; efficiency:  $S_x^{2*} / S_x^2$ ; percentage of simulations within an interval of 95 % for true mean, where  $\bar{x}^*$  and  $S_x^{2*}$  are average severity and its variance obtained from 200 simulations, programmed in PROC IML (SAS, 2001). To analyze the possible effect of  $n$  on the estimation due to the age of the field and the intensity of disease severity by field, a Pearson correlation analysis was performed.

<sup>6</sup> Rivas, V. y G. Mora-Aguilera. 2008. Morlloyd ver. 1.0 Microsoft® Excel®. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. (Disponible con el autor).

Los criterios de desempeño usados fueron: exactitud:  $\bar{x}^* - \bar{x}$ ; eficiencia:  $S_x^{2*} / S_x^2$ ; precisión: porcentaje de simulaciones comprendidos en un intervalo de 95 % para media verdadera, donde  $\bar{x}^*$  y  $S_x^{2*}$  son el promedio de la severidad y su varianza obtenida de 200 simulaciones, programado en PROC IML (SAS, 2001). Para analizar el posible efecto en la estimación de  $n$  debido a la edad de la plantación y a la intensidad de severidad de la enfermedad por plantación, se realizó un análisis de correlación de Pearson.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Patrón espacial de la sigatoka amarilla

La severidad promedio de la sigatoka amarilla varió entre 34.5 % y 44.2 % en las plantaciones de banano establecidas para la caracterización espacial (Cuadro 1). Las tres áreas presentaron un patrón uniformemente agregado de plantas enfermas (Figura 1). Mediante autocorrelación, la mayor intensidad de agregación se encontró en E-1 seguido de E-2 y E-3 (Cuadro 1).

La forma de los agregados tuvo una clara predominancia alargada en sentido de los surcos (Figura 1). Las dependencias espaciales continuas en dirección a lo largo de los surcos fueron 27, 14 y 2 plantas, lo cual implica una capacidad de contagio del hongo, desde el centro de foco de la enfermedad, de 81, 42 y 6 m. La capacidad de expansión lateral de los focos desde el eje principal del agregado sólo se observó en E-1 y E-2. En estos casos, las dependencias continuas fueron 13 y 1, lo cual correspondió a 39 y 3 m (Cuadro 1). Las interpolaciones geoestadísticas evidenciaron una generalización espacial de agregados lo cual concordó con valores bajos del índice de

## RESULTS AND DISCUSSION

### Spatial pattern of yellow sigatoka

Average severity of yellow sigatoka varied between 34.5 % and 44.2 % in the banana fields established for spatial characterization (Table 1). The three areas had a uniform aggregate pattern of diseased plants (Figure 1). Through autocorrelation, the highest intensity of aggregation was found in E-1, followed by E-2 and E-3 (Table 1).

The shape of the aggregates was clearly predominantly elongated along the rows (Figure 1). The continuous spatial dependencies in direction of row length were 27, 14 and 2 plants, implying the ability of the fungus to spread from the center of the disease focus, to 81, 42, and 6 m. The capacity of the focus to expand laterally from the main axis of the aggregate was observed only in E-1 and E-2. In these cases, the continuous dependencies were 13 and 1, corresponding to 39 and 3 m (Table 1). The geostatistical interpolations evidenced a spatial aggregate generalization, which coincided with low values of the Lloyd index (1.01-1.04; Table 1; Figure 1). The dispersion pattern, in aggregates with a wide range of inoculum dispersion, is congruent with the biology of pathogens and their mechanisms of aerial dissemination. In this case there are two types of spores: sexual (*M. musicola*) and asexual (*P. musae*), which are similar in importance in the dispersion process (Cordeiro *et al.*, 2005). However, the predominant pattern along the rows suggests that management practices are implicated in increasing the dissemination of the inoculum. Moreover, in this pathosystem there

**Cuadro 1. Índice de Lloyd y dependencias espaciales autocorrelativas de la severidad de sigatoka amarilla del banano (cv. Pacovan) en tres áreas de plantación en el Valle del Siriji, estado de Pernambuco, Brasil.**

**Table 1. Lloyd index and autocorrelation spatial dependencies of yellow sigatoka severity in banana (cv. Pacovan) in three fields in the Valley of Siriji, state of Pernambuco, Brazil.**

Área	Localidad (municipio)	Severidad <sup>†</sup>	Índice Lloyd	Dependencias espaciales <sup>‡</sup>	
				Dentro	Entre
E-1	São Vicente Férrer	38.8 ± 10.4	1.01	27	13
E-2	Vicência	34.5 ± 10.1	1.04	14	1
E-3	Machados	44.2 ± 8.2	1.01	2	0

<sup>†</sup> Media ± desviación estándar ❖ Mean ± Standard deviation

<sup>‡</sup> Número de dependencias continuas dentro y entre surcos ❖ Number of continuous dependencies within and between rows.

**Figura 1.** Mapas geostatísticos interpolativos de la severidad de la sigatoka amarilla en banano cv Pacovan. Valle del Siriji, Pernambuco Brasil. A-C representan las plantaciones E1-E3. Las flechas indican la dirección de los surcos.

**Figure 1.** Interpolative geostatistical maps of yellow sigatoka severity in cv Pacovan banana. Valley of Siriji, Pernambuco, Brazil. A-C represent fields E1-E3. Arrows indicate direction of the rows.

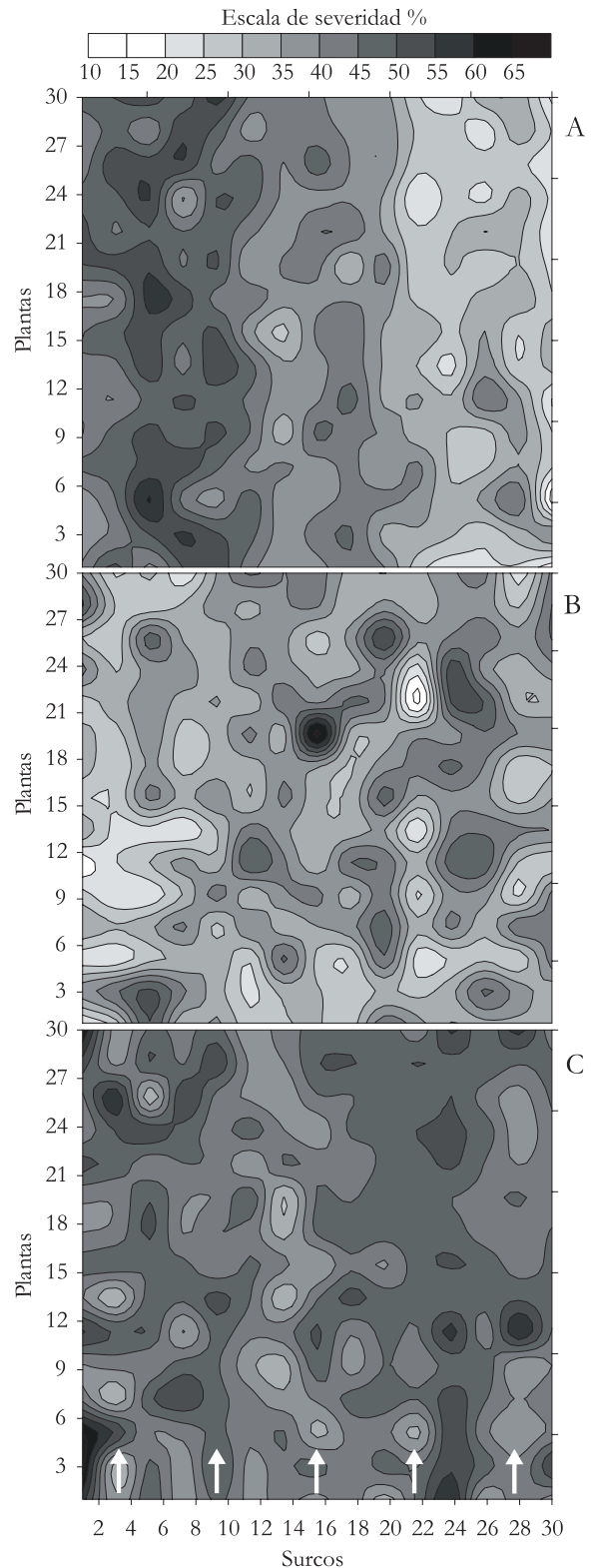
Lloyd (1.01-1.04; Cuadro 1; Figura 1). El patrón de dispersión, en agregados con un amplio rango de dispersión del inóculo, es congruente con la biología de patógenos y sus mecanismos de diseminación aérea. En el presente caso existen dos tipos de esporas, la sexual (*M. musicola*) y asexual (*P. musae*), con similar importancia en el proceso de dispersión (Cordeiro *et al.*, 2005). Sin embargo, el patrón predominante en dirección a los surcos sugiere la implicación de prácticas de manejo en el incremento de la diseminación del inóculo. Además, en este patosistema hay un proceso de autoinfección desde las hojas más viejas a las jóvenes, tanto dentro del dosel como entre la planta madre y los hijuelos a través del escurrimiento de agua de lluvia (Cordeiro *et al.*, 2005).

El manejo intensivo y continuado del cultivo en el Valle del Siriji sugiere la presencia de una alta presión de inóculo primario en el cultivar Pacovan, considerado altamente susceptible, y la subsiguiente inducción de un mayor número de ciclos secundarios durante el desarrollo del cultivo. Este proceso explica la alta severidad promedio observada (39.2 %) en las hojas fotosintéticamente más activas al inicio de la fructificación, lo que además explica pérdidas de hasta 50 % (Cordeiro *et al.*, 2005).

La contribución de inóculo externo en un proceso de aloinfección en la sigatoka amarilla no se detectó con las evaluaciones realizadas en la etapa de fructificación. La importancia e intensidad de este proceso no se excluye y requeriría estudios durante fases fenológicas previas como la de desarrollo foliar.

### Tamaño de la muestra para la cuantificación de la sigatoka amarilla

El tamaño de muestra *n* necesario para determinar la severidad promedio de la sigatoka amarilla, con 3, 5 y 10 % de error, estuvo en intervalos de 308-16, 111-6 y 28-2 plantas ha<sup>-1</sup> (Cuadro 2), valores que representaron 34.2-1.7 %, 12.3-0.6 % y 3.1-0.2 %



is a process of autoinfection from older to younger leaves, both within the canopy and between the mother plant and the daughters, carried by

**Cuadro 2. Tamaños de muestra para cuantificar la severidad de la sigatoka amarilla con base en muestreos sistemáticos de 30 áreas establecidas con banano cv. Pacovan en el Valle del Siriji, estado de Pernambuco, Brasil.**
**Table 2. Sample sizes for quantifying yellow sigatoka severity based on systematic sampling of 30 areas established with cv. Pacovan banana in the Valley of Siriji, state of Pernambuco, Brazil.**

Área	Localidad (municipio)	E <sup>†</sup> (año)	F <sup>‡</sup>	Severidad <sup>§</sup> (%)	Tamaño de muestra <sup>b</sup>		
					3 %	5 %	10 %
S-01	Vicência	14	FR	5.3 ± 2.7	149	54	14
S-02	Vicência	21	FL	6.1 ± 4.5	308	111	28
S-03	São Vicente Férrer	12	DF	10.5 ± 4.3	93	34	9
S-04	Bom Jardim	14	FR	10.7 ± 6.2	190	69	17
S-05	Orobó	15	FR	12.1 ± 6.7	173	62	16
S-06	Machados	12	FR	12.3 ± 7.7	219	79	20
S-07	Machados	16	FR	13.5 ± 5.1	78	28	7
S-08	São Vicente Férrer	15	FR	14.3 ± 7.5	153	55	14
S-09	Machados	21	FL	15.0 ± 7.1	124	45	11
S-10	São Vicente Férrer	19	FR	17.3 ± 7.9	114	41	11
S-11	São Vicente Férrer	16	DF	18.6 ± 8.4	113	41	10
S-12	São Vicente Férrer	13	FR	20.7 ± 9.5	117	42	11
S-13	Vicência	21	DF	20.8 ± 9.7	121	44	11
S-14	Bom Jardim	20	FR	21.3 ± 8.1	82	30	8
S-15	Orobó	13	FR	21.6 ± 7.1	61	22	6
S-16	Vicência	17	FR	22.2 ± 8.3	78	28	7
S-17	Machados	22	FR	22.4 ± 6.9	53	19	5
S-18	Orobó	10	FR	24.0 ± 9.9	94	34	9
S-19	São Vicente Férrer	10	DF	24.7 ± 6.5	39	14	4
S-20	Bom Jardim	14	FR	25.0 ± 9.5	80	29	7
S-21	Vicência	17	FL	27.0 ± 8.5	56	20	5
S-22	Vicência	10	FR	28.6 ± 6.9	33	12	3
S-23	Machados	20	FR	29.7 ± 7.7	37	14	4
S-24	Machados	13	FL	33.2 ± 7.6	29	11	3
S-25	Siriji	10	FR	33.8 ± 9.6	45	16	4
S-26	São Vicente Férrer	20	FL	34.5 ± 7.9	29	11	3
S-27	Macaparana	15	FR	38.2 ± 8.8	30	11	3
S-28	Vicência	17	FR	41.1 ± 7.7	20	7	2
S-29	Vicência	15	FR	44.2 ± 7.4	16	6	2
S-30	São Vicente Férrer	20	FL	46.7 ± 9.2	22	8	2
Média	-	16	-	23.2 ± 7.7	92	33	8

<sup>†</sup> Edad del cultivo ❖ Crop age.

<sup>‡</sup> Estado fenológico: DF=desarrollo foliar; FL=floración; FR=fructificación ❖ Phenological stage: DF: foliar development; FL: flowering; FR: fructification.

<sup>§</sup> Severidad de la enfermedad medida con una escala diagramática de siete clases. Media ± desviación estándar de 50 plantas ❖ Severity of the disease measured with a diagrammatic scale of seven classes. Mean ± standard deviation of 50 plants.

<sup>b</sup> Calculado con  $n = (k + \bar{x}) / (\bar{x} \cdot k \cdot CV_{\bar{x}}^2)$  para tres niveles de error ❖ Calculated with  $n = (k + \bar{x}) / (\bar{x} \cdot k \cdot CV_{\bar{x}}^2)$  for three error levels.

de la población total. Las consideraciones fundamentales en estos resultados son: 1) el tamaño de muestra  $n$  se calculó considerando la condición agregada de las plantaciones E1-E3 y en este caso se incorporó a los cálculos del parámetro  $k$  de la función de distribución binomial negativa propuesto por Karandinos (1978), enfoque usado en varios patosistemas probando su viabilidad principalmente con condiciones de moderada a alta intensidad de enfermedad

rainwater running down onto the young plants (Cordeiro *et al.*, 2005).

Intensive, continuous management of the crop in the Valley of Siriji suggests the presence of high pressure of primary inoculum in the Pacovan cultivar, considered highly susceptible, and the subsequent induction of a higher number of secondary cycles during crop development. This process explains the high average severity observed (39.2 %) on the most

(Michereff *et al.*, 1998; Tavares *et al.*, 2000); 2) la selección de plantas para constituir una muestra piloto se realizó mediante un esquema sistemático de  $n$ -surcos y  $n$ -plantas; por tanto, la aplicación práctica de un tamaño de muestra  $n$  debe realizarse con el mismo criterio sistemático para reducir problemas de exactitud y precisión debido a la heterogeneidad espacial del atributo medible. A un mismo tamaño de muestra  $n$ , la selección de unidades de muestreo mediante diferentes esquemas sistemáticos o con un criterio aleatorio genera diferentes niveles de precisión (Hau *et al.*, 1982; Ruiz-García, 2008). Sin embargo, debido a que  $n$  de la muestra piloto es generalmente distinto a  $n$  del tamaño calculado, para fines operativos es necesario modificar los intervalos de muestreo  $k_1$  y  $k_2$  para surco y planta. Una alternativa para evitar variaciones en el esquema de muestreo sistemático, incluyendo los intervalos de muestreo  $k_i$ , es el uso de métodos simulativos con porcentajes de  $N$  prefijados. Este enfoque se ha probado para condiciones de baja prevalencia de enfermedad (Ruiz-García, 2008).

La variabilidad del tamaño de muestra  $n$  obtenida de las 30 plantaciones indica que depende de los atributos poblacionales específicos de un área, los cuales tienen una variación espacio-temporal. Así, la severidad de la sigatoka amarilla estuvo en un intervalo de 5.3 a 46.7 % (Cuadro 2), siendo más dependiente del estado fenológico, una condición temporal, que de la edad de la plantación ( $p=0.05$ ). La severidad promedio asociada con los estados fenológicos de floración y fructificación fue 27 % contrastando con el 14.2 % observado para el estado de desarrollo foliar. Esta tendencia de incremento de la severidad con el desarrollo del cultivo explica la correlación negativa entre esta variable y el tamaño de muestra ( $r=-0.60$ ), debido a la reducción de la intensidad de agregación y en consecuencia de la varianza. Por tanto, a mayor severidad de sigatoka amarilla se requiere menor número de plantas para conformar una muestra con un valor análogo de precisión. Esto se ha mostrado para otros patosistemas (Jong, 1995; Michereff *et al.*, 1998; Tavares *et al.*, 2000).

Considerado lo anterior, para seleccionar un tamaño de muestra  $n$ -general con un nivel de error de 5 % para cuantificar la severidad de la sigatoka amarilla, primero se consideraron promedios de  $n$  por categoría fenológica de desarrollo foliar, floración y fructificación y los valores fueron 33, 34 y 33

photosynthetically active leaves at the beginning of fructification, which also explains the losses of up to 50 % (Cordeiro *et al.*, 2005).

The contribution of external inoculum in a process of aloinfection in yellow sigatoka was not detected with the assessments conducted at the stage of fructification. The importance and intensity of this process is not ruled out, and studies during phenological stages previous to fructification, such as leaf development, are needed.

### Sample size for quantification of yellow sigatoka

The sample size  $n$  necessary to determine average severity of yellow sigatoka, with 3, 5, and 10 % error, was in the intervals of 308-16, 111-6 and 28-2 plants  $ha^{-1}$  (Table 2), values that represented 34.2-1.7 %, 12.3-0.6 % and 3.1-0.2 % of the total population. The fundamental considerations in these results were the following: 1) the sample size  $n$  was calculated considering the aggregate condition of plantations E1-E3, and in this case, it was incorporated into the calculations of the  $k$  parameter of the negative binomial distribution function proposed by Karandinos (1978), an approach previously proved in several pathosystems, mainly under conditions of moderate to high disease intensity (Michereff *et al.*, 1998; Tavares *et al.*, 2000); 2) to constitute a pilot sample, plants were selected using a systematic scheme of  $n$ -rows and  $n$ -plants; therefore, the practical application of a sample size  $n$  must use the same systematic criterion to reduce problems affecting exactitude and precision that may occur because of spatial heterogeneity of the measurable attribute. For the same sample size  $n$ , the selection of sampling units using different systematic schemes or a random criterion will generate different levels of precision (Hau *et al.*, 1982; Ruiz-García, 2008). However, because  $n$  of the pilot sample is generally different from  $n$  of the calculated size, operationally, it is necessary to modify the sampling intervals  $k_1$  and  $k_2$  for row and plant. One alternative for avoiding variations in the systematic sampling scheme, including the  $k_i$  sampling intervals, is the use of simulation with pre-fixed percentages of  $N$ . This approach has been tested for conditions of low disease prevalence (Ruiz-García, 2008).

The variability of the sample size  $n$  obtained from the 30 fields indicates that it depends on the



plantas  $\text{ha}^{-1}$ . Estos valores promedio subestimaron ( $n$ -promedio  $< n_i$ , donde  $i=1$  a 30 plantaciones) en 3/4, 2/6 y 7/20 casos. Mientras que subestimar  $n_i$  puede incrementar el error, sobrestimar afecta el costo y eficiencia de muestreo; así, ambas condiciones no son deseables. La evaluación del esquema de muestreo sistemático y del tamaño de muestra promedio por evento fenológico ( $n=33$ ), mediante simulación Montecarlo con datos de las huertas E1-E3, mostraron un sesgo de  $-0.02$  a  $0.07$  %, eficiencia de  $0.95$  a  $1.04$ , y precisión de  $42$  a  $63.5$  %. Estos resultados indican que se podría calcular la severidad en campo con error de  $5$  % en  $42$  a  $63.5$  % de las veces debido a la gran variabilidad de la severidad de la enfermedad.

Un segundo criterio para generar una  $n$ -general fue usar la media de las  $n_i$  y se tuvieron 92, 33 y 8 plantas  $\text{ha}^{-1}$  para 3, 5 y 10 % de error (Cuadro 2). Con este criterio se subestimó en 13/30, 13/30 y 11/30 casos, lo que implica un intervalo 43.3-36.6 % de riesgo de usar un  $n$  inferior al requerido para determinar adecuadamente la severidad de la enfermedad. Un tercer criterio (datos no mostrados) fue calcular un  $n$  general que considera categorías de severidad relativa; por ejemplo,  $<12$  %,  $12-25$  % y  $>25$  %, lo cual implica una inspección piloto en campo y requeriría experiencia en la evaluación de la enfermedad.

La definición del nivel de error y un tamaño de muestra general depende del propósito del muestreo. En estudios regionales epidemiológicos, niveles de 5 y 10 % son convencionales y un tamaño de muestra promedio de 33 u 8 plantas  $\text{ha}^{-1}$  sería aceptable. Para establecer programas de control químico se recomienda una precisión de 5 %. Este caso implicaría además considerar plantaciones con severidad reducida para operar efectivamente sobre la infección (p.e. 12 % o menor). Así, un tamaño de muestra promedio de 66 plantas  $\text{ha}^{-1}$  sería aceptable (Cuadro 2). Otras consideraciones pueden incluir manejo, variedad y condiciones climáticas, así como el propósito (Martínez y Toledo, 1977; Southwood, 1978; Perry, 1994), para generar un sistema de muestreo con validez biológica.

## CONCLUSIONES

La sigatoka amarilla (*M. musicola*) se presentó en banano cultivar Pacovan con una severidad promedio de 5.3 a 46.6 %, en el Valle del Siriji, Brasil. La

specific attributes of the population of an area, which vary spatially and temporally. Thus, severity of yellow sigatoka was within an interval of 5.3 % to 46.7 % (Table 2), depending more on phenological stage, a temporal condition, than on plantation age ( $p=0.05$ ). Average severity associated with the phenological stages of flowering and fructification was 27 %, contrasting with the 14.2 % observed in the leaf development stage. This tendency of severity to increase as the crop develops explains the negative correlation between this variable and sample size ( $r=-0.60$ ) due to the decrease in the intensity of aggregation and, consequently, in the variance. Therefore, the more severe the yellow sigatoka disease, the fewer the plants needed to make up a sample with an analogous value of precision. This has been shown for other pathosystems (Jong, 1995; Michereff *et al.*, 1998; Tavares *et al.*, 2000).

Based on these arguments, to select a general- $n$  sample size with a 5 % level of error in quantifying yellow sigatoka severity, average  $n$  values were considered by phenological category of leaf development, flowering and fruiting; these average values were 33, 34, and 33 plants  $\text{ha}^{-1}$ , which underestimated ( $n$ -average  $< n_i$ , where  $i=1$  to 30 fields) in 3/4, 2/6 and 7/20 cases. While underestimating  $n_i$  may increase the error, overestimating affects the cost and efficiency of sampling; thus, neither condition is desirable. Evaluation of the systematic sampling scheme and of average sample size by phenological event ( $n=33$ ) using Monte Carlo simulation with data from the plantations E1-E3 revealed a bias of  $-0.02$  to  $0.07$  %, efficiency of  $0.95$  to  $1.04$ , and precision of  $42$  to  $63.5$  %. These results indicate that severity could be calculated in the field with 5 % error in 42 to 63.5 % of the occasions due to the ample variability in disease severity.

A second criterion for generating a general- $n$  was to use the mean of the  $n_i$ , with which 92, 33 and 8 plants  $\text{ha}^{-1}$  were obtained for 3, 5, and 10 % error (Table 1). With this criterion there was a underestimation of 13/30, 13/30 and 11/30 cases, implicating an interval of 43.3-36.6 % risk of using an  $n$  lower than that required for adequately determining severity of the disease. A third criterion (data not shown) was to calculate a general  $n$  that considers categories of relative severity, for example,  $<12$  %,  $12-25$  % and  $>25$  %, implicating the need for a pilot inspection of

enfermedad presentó un patrón agregado de plantas enfermas. La forma de los agregados fue alargada con dirección a los surcos; en esta dirección, la dependencia espacial continua fue hasta 81 m mientras que lateralmente fue hasta 39 m. La determinación del tamaño de muestra  $n$  incorporó el parámetro  $k$  de la función de distribución de la binomial negativa, con el fin de considerar la condición agregada y un muestreo sistemático en bandas para incorporar el efecto de direccionalidad del surco. El análisis de los resultados muestra que en condiciones de alta heterogeneidad espacial existe riesgo de subestimar la precisión con un tamaño de muestra  $n$  general. En un diagnóstico epidemiológico con 95 % de precisión se propone una muestra sistemática de  $n=33$  plantas  $\text{ha}^{-1}$ , lo que equivale aproximadamente a un intervalo de muestreo de  $6 \times 6$  ( $k_1$  surcos  $\times$   $k_2$  plantas), que representa 3.8 % de la población.

## LITERATURA CITADA

- Campbell, C. L., and L. V. Madden. 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley & Sons. New York. 532 p.
- Cordeiro, Z. J. M., A. P. Matos, e H. Kimati. 2005. Doenças da bananeira (*Musa* spp.). In: Kimati, H., L. Amorim, A. Bergamin Filho, L. E. A. Camargo, e J. A. M. Rezende (eds). Manual de Fitopatologia. Doenças das Plantas Cultivadas. Agronômica Ceres. 4 ed. São Paulo, Brasil. v. 2. pp: 99-117.
- FAO. 2008. Crops & Livestock Primary & Processed. <http://www.fao.org.br>. May, 2008.
- Gottwald, T. R., S. M. Richie, and C.L. Campbell. 1992. LCOR2 - Spatial correlation analysis software for the personal computer. Plant Dis. 76: 213-215.
- Hau, F. C., C.L.Campbell, and M.K.Beute. 1982. Inoculum distribution and sampling methods for *Cylindrocladium crotalaria* in peanut field. Plant Dis. 66: 568-571.
- Jong, P. D. 1995. Sampling for detection: leek rust as an example. International J. Pest Manage. 41: 31-35.
- Karandinos, M. G. 1978. Optimum sample size and comments on some published formulae. Bull. Entomol. Soc. Am. 22: 417-421.
- Martínez, J. A., e A. C. D. Toledo. 1977. Estudo do comportamento de produtos químicos no combate ao "Mal de sigatoka", com especial destaque à eficiência e fitotoxidez. In: Anais do Congresso Brasileiro de Fruticultura. Salvador, BA, Brasil. pp: 65-74.
- Michereff, S. J., R. A. Pedrosa, M. A. Noronha, R. B. Martins, e F. V. Silva. 1998. Escala diagramática e tamanho de amostras para avaliação da severidade da mancha parda da mandioca (*Cercosporidium henningsii*). Agrotrópica 10: 143-148.
- Orjeda, G. 1998. Evaluación de la Resistencia de los Bananos a las Enfermedades de Sigatoka y Marchitamiento por *Fusarium*. INIBAP, Montpellier, Francia. 63 p.

the field, which requires experience in assessing the disease.

Definition of the level of error and a general sample size depends on the purpose of the sampling. In regional epidemiological studies, levels of 5 and 10 % are conventional and an average sample size of 33 or 8 plants  $\text{ha}^{-1}$  would be acceptable. To establish chemical control programs, a precision of 5 % is recommended. This would also imply considering fields with low severity to operate effectively against the infection (for example, 12 % or lower). Thus, an average sample size of 66 plants  $\text{ha}^{-1}$  would be acceptable (Table 2). Other considerations in generating a sampling system with biological validity may include management, variety and climatic conditions, as well as the purpose of sampling (Martínez and Toledo, 1977; Southwood, 1978; Perry, 1994).

## CONCLUSIONS

Yellow sigatoka (*M. musicola*) was present in the banana cultivar Pacovan with average severity of 5.3 to 46.6 % in the Valley of Siriji, Brazil. The disease showed an aggregate pattern of diseased plants. Aggregate shape was elongated along the rows; in this direction, spatial dependence was up to 81 m, while laterally it was up to 39 m. The determination of sample size  $n$  incorporated the  $k$  parameter of the negative binomial distribution function in order to consider the aggregate condition and systematic sampling in bands to incorporate the effect of row directionality. Analysis of the results showed that under conditions of high spatial heterogeneity there is a risk of underestimating precision with a general  $n$  sample size. In an epidemiological survey with 95 % precision, a systematic sample of  $n=33$  plants  $\text{ha}^{-1}$  is proposed, approximately equivalent to a sampling interval of  $6 \times 6$  ( $k_1$  rows  $\times$   $k_2$  plants), corresponding to 3.8 % of the population.

—End of the English version—



- Pereira, L. V., E. J. Alves, and R. C. Caldas. 1981. Método de amostragem e avaliação de área foliar da bananeira afetada por *Cercospora musae*. Pesquisa Agropec. Br. 16: 665-667.
- Perry, J. N. 1994. Sampling and applied statistics for pests and diseases. Aspects Appl. Biol. 37: 1-14.

- Rossi, V., and P. Battilani. 1989. Assessment of intensity of Cercospora disease on sugarbeet. *J. Phytopathol.* 124: 67-70.
- Ruiz-García, N., G. Mora-Aguilera, P. Rivas-Valencia, D. Ochoa-Martínez, C. Góngora-Canul, E. Loeza-Kuk, A. Gutiérrez-Espinosa, and R. Alvarez-Ramos. 2005. Probability model of *Citrus tristeza virus* detection in the tree canopy and reliability and efficiency of direct immunoprinting-ELISA. *In: Proc. 16th Conf. IOCV.* IOCV, Riverside, CA. pp: 196-204.
- Ruiz-García, N. 2008. Detección, dispersión y muestreo en la erradicación del *Citrus tristeza virus* en plantaciones comerciales de cítricos. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 104 p.
- SAS Institute Inc. 2001. SAS/IML User's Guide. Version 8. SAS Institute Inc. Cary NC. 856 p.
- Southwood, T. R. E. 1978. *Ecological Methods.* 2 ed. Chapman & Hall, London. 524 p.
- Stover, R. H. 1971. A proposed international scale for estimating intensity of banana leaf spot (*Mycosphaerella musicola* Leach). *Trop. Agric.* 48: 185-195.
- Tavares, L. A., S. J. Michereff, R. M. Souza, e R. L. R. Mariano. 2000. Plano de amostragem para quantificação da murcha bacteriana do tomateiro no campo. *Summa Phytopathol.* 26: 306-310.