



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENADORIA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E INTEGRAÇÃO ACADÊMICA
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E EM DESENVOLVIMENTO
TECNOLÓGICO E INOVAÇÃO

HENRIQUE APARECIDO LAUREANO

RELATÓRIO FINAL

INICIAÇÃO CIENTÍFICA

PIBIC UFPR TN

(08/2014 a 07/2015)

**MODELOS MISTOS DE REGRESSÃO PARA DIFERENCIAÇÃO
FISIOLÓGICA DE ESPÉCIES DE *COLLETOTRICHUM***

Relatório apresentado à Coordenadora de Iniciação Científica e Integração Acadêmica da Universidade Federal do Paraná por ocasião da conclusão das atividades de Iniciação Científica - Edital 2014/2015.

Orientador: Prof. Dr. Walmes Marques Zeviani
Departamento de Estatística

**Epidemiologia comparativa entre espécies de *Colletotrichum*
causadores da Mancha Foliar de *Glomerella* e caracterização de
população de isolados de macieira**
BANPESQ/THALES: 2014990977

CURITIBA

2015

Sumário

1	Resumo	4
2	Introdução	5
3	Revisão da literatura	7
3.1	Cultura da macieira e Mancha Foliar de <i>Glomerella</i> (MFG)	7
3.2	Modelos de regressão não lineares de efeitos mistos	7
3.3	Modelos de regressão lineares de efeitos mistos	9
4	Materiais e métodos	10
4.1	Avaliação do efeito da temperatura na taxa de crescimento micelial das colônias de <i>Colletotrichum</i>	10
4.2	Sensibilidade de isolados de <i>Colletotrichum</i> a fungicidas	11
4.2.1	Inibição da germinação de conídios	11
4.2.2	Crescimento micelial	12
4.3	Inoculação em frutos (disco e suspensão)	12
5	Resultados e discussão	14
5.1	Avaliação do efeito da temperatura na taxa de crescimento micelial das colônias de <i>Colletotrichum</i>	14
5.2	Sensibilidade de isolados de <i>Colletotrichum</i> a fungicidas	17
5.2.1	Inibição da germinação de conídios	17
5.2.2	Crescimento micelial	22
5.3	Inoculação em frutos	29
5.3.1	Inoculação em disco	30
5.3.2	Inoculação em suspensão	33
6	Considerações finais	37

Referências Bibliográficas	39
7 Relatório de atividades	42
8 Apreciação do Orientador	44
8.1 Relatório científico e desempenho no projeto	44
8.2 Desempenho acadêmico	44

Resumo

O fungo *Colletotrichum* é o principal causador da doença Mancha Foliar de *Glomerella* (MFG), muito severa em pomares de macieira do estado do Paraná. Em diversos experimentos foram avaliados três diferentes isolados do gênero *acutatum* e dois do gênero *gloeosporioides*. Com o objetivo de verificar possíveis diferenças entre os gêneros de *Colletotrichum*, avaliou-se o efeito da temperatura na taxa de crescimento micelial, a sensibilidade dos isolados a diferentes concentrações de diferentes fungicidas (*Amistar*, *Carbendazim*, *Mancozebe*, *Tiofanato Metílico*), e a taxa de crescimento micelial em diferentes tipos de inoculação (disco e suspensão). Para tais verificações foram utilizados modelos de regressão mistos não lineares e lineares. Esses modelos são assim chamados (mistos) por possuírem componentes aleatórios e fixos, em todos os experimentos foi considerado o efeito dos isolados como aleatório e com o efeito fixo dependendo do que era estudado. Entre os resultados obtidos têm-se a verificação de diferenças entre as taxas de crescimento micelial dos gêneros sob diferentes temperaturas e sob diferentes combinações de variedade de fruto, condição do fruto e gênero para diferentes tipos de inoculação; diferenças de crescimento entre combinações de concentração e fungicida, concentração e gênero, fungicida e gênero; e diferenças na germinação de conídios entre concentração e fungicida. Com tais resultados pôde-se mensurar as maiores taxas de crescimento; foi possível definir para quais combinações de concentração, fungicida e gênero se obtêm um maior/menor crescimento; para quais combinações de concentração e fungicida se obtêm uma maior/menor germinação e para quais combinações de variedade, condição do fruto e gênero se obtêm uma maior/menor taxa de crescimento para diferentes tipos de inoculação.

Palavras-chave: Maçã, *Colletotrichum*, Modelos Mistos.

Introdução

A fruta de clima temperado de maior importância comercial como fruta fresca e uma das maiores em volume comercializado no país é a maçã (*Malus domestica Borkh*). No Paraná predomina o cultivar da maçã Gala (STADNIK, 2009). A pomicultura sofre sérios problemas com doenças, dentre elas destaca-se a Mancha Foliar de *Glomerella* (MFG), que afeta a Gala e seus clones, podendo causar desfolhamento superior a 75% e conseqüentemente afetar a produção nos anos seguintes. Em todas as regiões produtoras de maçã do Brasil, a MFG vem se disseminando e aumentando sua incidência a cada ciclo produtivo (BONETI and KATSURAYAMA, 1998).

No Brasil, o gênero *Colletotrichum gloeosporioides* foi inicialmente identificado como agente causal da doença (LEITE JUNIOR et al., 1988), mais tarde o gênero *Colletotrichum acutatum* foi também associada à MFG, sendo o gênero *gloeosporioides* mais agressivo e de maior frequência nos pomares (KATSURAYAMA et al., 2000). Estudando o gênero *Colletotrichum* em isolados obtidos de macieira, BRAGANÇA (2013) relatou várias espécies causadoras da MFG coletadas nas diferentes regiões produtoras do Brasil, e descreveu uma nova espécie denominada *Colletotrichum paranaense*.

Para estudar como os gêneros *gloeosporioides* e *acutatum* se comportam perante diferentes temperaturas, fungicidas e demais situações, foram utilizados modelos de regressão mistos lineares e não lineares.

Na regressão não linear a ideia básica é a mesma da regressão linear: relacionar uma variável resposta Y com um vetor de variáveis preditoras $\mathbf{x} = (x_1, \dots, x_k)^\top$. Os modelos de regressão não lineares caracterizam-se pelo fato da função de predição depender não linearmente de pelo menos um dos parâmetros. Embora isto não seja uma regra, a regressão linear é utilizada para especificação de modelos puramente empíricos, enquanto

que os modelos de regressão não linear são considerados quando existe algum conhecimento prévio para sustentar que a relação entre resposta e preditores segue uma particular forma funcional (Zeviani, 2013). Uma das principais vantagens na utilização de modelos de regressão não linear é que frequentemente existe interpretação para a maioria de seus parâmetros (SCHABENBERGER and PIERCE, 2002).

Nos modelos não lineares de efeitos mistos a especificação completa do modelo é feita em pelo menos dois níveis. No primeiro, especifica-se um modelo não linear $f(x, \theta)$ para a média de Y . No segundo, especifica-se um modelo para θ (vetor de parâmetros), que pode considerar fatores de efeito fixo e aleatório. Assim pode-se medir diretamente o efeito de um fator sobre Y por meio do seu efeito sobre alguns parâmetros em θ (Zeviani, 2013).

Revisão da literatura

3.1 Cultura da macieira e Mancha Foliar de *Glomerella* (MFG)

Com origens nas montanhas do Cáucaso, Oriente Médio e Leste Asiático, a maçã (*Malus domestica Borkh*) pertence à família Rosaceae. Apesar do cultivo de macieira ter iniciado no Brasil somente na década de 70, a atividade cresceu rapidamente. A produção brasileira de maçã está concentrada no sul do país, que é responsável por 90% da produção nacional. Contribuindo expressivamente na geração de empregos e riqueza, essa atividade é parte importante para a economia dessa região (STADNIK, 2009). O principal estado brasileiro produtor é Santa Catarina (SC) e possui a maior área de produção. O estado do PR é o terceiro produtor nacional quando se considera a produção, 56.562 toneladas (safra 2010/11), e a área plantada, 2.118 hectares (IBGE, 2012).

A origem do patógeno não é conhecida, sendo provável que tenha chegado às macieiras a partir das culturas tropicais ou subtropicais, pois conforme FREEMAN et al. (1999), as espécies de *Colletotrichum* podem estabelecer relações parasíticas com várias espécies hospedeiras. A MFG é a mais importante entre as diversas doenças foliares da macieira que ocorrem no nosso país, pois afeta as cultivares mais importantes do Brasil, Gala e seus clones, podendo ser considerada tipicamente brasileira, apesar de relatos nos EUA (GONZALEZ and SUTTON, 1999; BOST and HALE, 2004).

3.2 Modelos de regressão não lineares de efeitos mistos

Os modelos não lineares de efeitos mistos (NLMEM, *non linear mixed effects models*), que são os modelos atribuídos a dados de medidas repetidas,

permitem que variações nos dados possam ser explicadas por um modelo não linear (Zeviani, 2013, pg. 117),

$$f(\mathbf{x}, \boldsymbol{\theta}), \quad (3.1)$$

em que f é uma função não linear que depende do vetor de covariáveis (variáveis explicativas, independentes) e $\boldsymbol{\theta}$ é o vetor de p parâmetros, além de acomodar os efeitos de grupos (tratamentos) e de informações ao nível de unidade experimental (variáveis explicativas, independentes, covariáveis). As vantagens dos NLMEM incluem a capacidade de tratar dados desbalanceados e incompletos, flexibilidade para acomodar diversas fontes de variação e padrões de correlação, e seu alto poder para comparar tratamentos (GREENLAND, 2000; QUENÉ and BERGH, 2004; ZHAO et al., 2005).

Representa-se o NLMEM para a j -ésima observação na i -ésima unidade experimental por

$$Y_{ij} \sim N(f(\boldsymbol{\theta}_i, \mathbf{x}_{ij}), \sigma^2), \quad (3.2)$$

em que y_{ij} é a resposta observada (variável resposta, dependente), \mathbf{x}_{ij} é um vetor de variáveis independentes (explicativas, covariáveis), f é uma função não linear do vetor de parâmetros $\boldsymbol{\theta}_i$, de tamanho p , e σ^2 é a variância residual. Os parâmetros podem mudar de indivíduo para indivíduo de acordo com grupos e covariáveis descritos por \mathbf{x}_{ij} , o que é representado por mais um nível de especificação do modelo sobre o termo $\boldsymbol{\theta}_i$,

$$\boldsymbol{\theta}_i = \mathbf{A}_i\boldsymbol{\beta} + \mathbf{B}_i\mathbf{b}_i, \quad \mathbf{b}_i \sim N(\mathbf{0}, \mathbf{D}),$$

em que $\boldsymbol{\beta}$ é um vetor de dimensão maior ou igual à p associado à parâmetros de fatores de efeitos fixos, \mathbf{b}_i é um vetor de dimensão q que representa efeitos aleatórios associados à unidade experimental i . \mathbf{A}_i e \mathbf{B}_i são matrizes de delineamento de dimensão apropriada e \mathbf{D} é a matriz de covariância dos efeitos aleatórios. Através da correta especificação das matrizes \mathbf{A}_i e \mathbf{B}_i é que se acomoda os efeitos de variáveis independentes (explicativas, covariáveis), sejam elas tratamentos ou níveis de amostragem (Zeviani, 2013, pg. 118).

3.3 Modelos de regressão lineares de efeitos mistos

Um modelo linear é denominado modelo fixo quando ele apresenta somente fatores de efeitos fixos, além do erro experimental, que é sempre aleatório. Os modelos que apresentam apenas fatores de efeitos aleatórios, exceto a constante μ inerente a todas as observações, que é sempre fixa, é denominado modelo aleatório. Um modelo misto é aquele que apresenta tanto fatores de efeitos fixos como aleatórios, além do erro experimental e da constante μ (Filho, 2003).

Situações bem comuns são as que os dados sob estudo apresentam comportamentos dependentes entre si, ou seja, casos em que uma observação depende estocasticamente de outra. De forma geral, são chamados de dados agrupados que compreendem dados longitudinais, medidas repetidas e outros. Além disso, é interesse de alguns estudos a análise da correlação entre-grupos e intra-grupos que está relacionada diretamente com a presença de estruturas de dados agrupados. Modelos mistos são os modelos válidos e adequados para tais situações. Eles permitem incorporar e estudar estruturas de covariância que são de fundamental importância no estudo de dados agrupados, além de possibilitar o estudo do comportamento individual e do comportamento médio, ao contrário dos modelos usuais que ajustam o comportamento médio (da Costa, 2010).

Representa-se um modelo linear misto para a i -ésima unidade experimental por

$$\mathbf{y}_i = \mathbf{X}_i\boldsymbol{\alpha} + \mathbf{Z}_i\mathbf{b}_i + \mathbf{e}_i, \quad (3.3)$$

em que $\mathbf{e}_i \sim N(\mathbf{0}, \mathbf{R}_i)$ (distribuição Normal com média $\mathbf{0}$ e matriz de covariância \mathbf{R}_i positiva-definida e de ordem $n_i \times n_i$), $\mathbf{b}_i \sim N(\mathbf{0}, \mathbf{D}_i)$ (distribuição Normal com média $\mathbf{0}$ e matriz de covariância \mathbf{D}_i positiva-definida e de ordem $k_i \times k_i$), e $\boldsymbol{\alpha}$ é efeito fixo. Marginalmente, \mathbf{y}_i são normais independentes com média $\mathbf{X}_i\boldsymbol{\alpha}$ e matriz de covariância $\mathbf{R}_i + \mathbf{Z}_i\mathbf{D}_i\mathbf{Z}_i^T$ (Laird and Ware, 1982).

Materiais e métodos

Cinco isolados de *Colletotrichum* de diferentes espécies e regiões produtoras de maçã do Brasil foram utilizados nas análises desenvolvidas neste trabalho. A partir de tese defendida por BRAGANÇA (2013) os isolados foram selecionados e estão relacionados na tabela 4.1.

Tabela 4.1: Resumo dos isolados de *Colletotrichum* obtidos de macieira (*Malus domestica*) utilizados no trabalho

Gênero	Espécie	Isolado	Origem (Brasil)	Ano
<i>Colletotrichum acutatum</i>	<i>Colletotrichum nymphae</i>	Col15	Paraná	2010
<i>Colletotrichum acutatum</i>	<i>Colletotrichum paranaense</i>	Col19	Paraná	2010
<i>Colletotrichum acutatum</i>	<i>Colletotrichum melonis</i>	Col31	Paraná	2010
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum fruticola</i>	Col33	Rio Grande do Sul	2011
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum siamense</i>	Col146	São Paulo	2010

Todas as análises estatísticas foram desenvolvidas no ambiente de computação estatística R (R Core Team, 2015), com os modelos sendo ajustados com a biblioteca nlme (Pinheiro et al., 2015).

4.1 Avaliação do efeito da temperatura na taxa de crescimento micelial das colônias de *Colletotrichum*

Os isolados foram incubados nas temperaturas de 7, 10, 13, 15, 18, 20, 25, 28 e 30 °C (9 níveis). O experimento foi conduzido segundo delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições por tratamento.

A avaliação do diâmetro perpendicular foi realizada diariamente, durante sete dias. A partir disto foi calculada a área abaixo da curva de progressão da doença, com esta sendo considerada como variável resposta na análise.

Para análise dos dados foi considerado um modelo não linear de efeitos mistos. O modelo não possui um nome próprio, sendo proposto dado o

comportamento observado através de uma análise descritiva/exploratória. O modelo é apresentado na equação 4.1

$$\theta_y \exp \{ \theta_c (x - \theta_x)^2 + \theta_q (x - \theta_x)^3 \}, \quad (4.1)$$

onde

- θ_y é o valor correspondente a resposta ótima;
- θ_x é o valor na abscissa (temperatura) correspondente a resposta ótima;
- θ_c determina a forma da função:
 - $\theta_c > 0$ = função côncava
 - $\theta_c < 0$ = função convexa
- θ_q é um parâmetro de forma, sem interpretação prática, que está relacionado a simetria (se 0) ao redor da resposta ótima ou assimetria (se > 0 ou < 0).

O gênero de *Colletotrichum* foi utilizado como efeito fixo e as cinco espécies de isolados como efeito aleatório.

Além de verificar possível diferença na taxa de crescimento micelial entre os gêneros, é de interesse verificar como a taxa se comporta perante as temperaturas.

4.2 Sensibilidade de isolados de *Colletotrichum* a fungicidas

4.2.1 Inibição da germinação de conídios

A sensibilidade dos isolados de *Colletotrichum* aos fungicidas Amistar e Mancozebe foi testada por meio da germinação de conídios. Foram utilizadas as concentrações 0, 0.01, 0.1, 1, 10 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (6 níveis) no caso do fungicida Amistar, e 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (7 níveis) no caso do fungicida Mancozebe. Conídios germinados foram aqueles que apresentaram tubo germinativo com comprimento de, no mínimo, uma vez o tamanho do conídio. Cinco repetições com 100 conídeos foram realizadas por isolado, ou seja, a germinação pôde variar entre 0 e 100. Também realizou-se cinco repetições com 100 conídeos por isolado com apenas água pura (testemunha).

Dois modelos lineares mistos foram ajustados, um para os fungicidas, e outro para a água pura. Para o modelo dos fungicidas, considerou-se como efeito fixo a concentração, o fungicida, o gênero e testou-se suas interações (duplas e tripla). Para o outro modelo (água pura), considerou-se o gênero como efeito fixo. Em ambos os modelos, as espécies de isolado foram consideradas como efeito aleatório. A germinação para a concentração 1000 do fungicida Mancozebe se mostrou muito baixa, logo, esta concentração foi desconsiderada para possibilitar o ajuste do modelo.

Deseja-se verificar a existência de diferença estatisticamente significativa na inibição da germinação de conídios entre a aplicação dos fungicidas Amistar e Mancozebe, verificar diferenças na inibição da germinação entre os gêneros de *Colletotrichum*, como ela se apresenta perante apenas a água pura, e estudar as interações estatisticamente significativas.

4.2.2 Crescimento micelial

A sensibilidade dos isolados de *Colletotrichum* aos fungicidas Carbendazim, Mancozebe e Tiofanato Metílico foi testada por meio da medição do seu crescimento micelial. Foram utilizadas as concentrações 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Cinco repetições foram realizadas por isolado, com o crescimento micelial sendo medido em diâmetro (mm).

Para a análise dos dados foi ajustado um modelo linear misto. Como efeito fixo considerou-se a concentração, o fungicida, o gênero e testou-se suas interações (duplas e tripla). As espécies de isolado foram consideradas como efeito aleatório.

Deseja-se verificar a existência de diferença estatisticamente significativa no crescimento micelial entre a aplicação dos fungicidas Carbendazim, Mancozebe e Tiofanato Metílico, verificar diferenças no crescimento micelial entre os gêneros de *Colletotrichum*, e estudar as interações estatisticamente significativas.

4.3 Inoculação em frutos (disco e suspensão)

A inoculação foi realizada com gotas contendo 10^4 conídios mL^{-1} na região equatorial no caso da inoculação em disco, e com gotas contendo 40

μL de suspensão de conídios na região equatorial no caso da inoculação em suspensão. Sendo posteriormente realizado um ferimento com agulha histológica esterilizada na epiderme de metade dos frutos, a gota. O diâmetro (mm) médio de cada lesão foi avaliado diariamente, sendo obtida a taxa (área abaixo da curva) de progresso da lesão em um período de 15 dias após a inoculação. Para cada isolado, seis frutos das cultivares Eva e Gala foram avaliados.

Um modelo linear misto foi utilizado para análise dos dados provenientes de cada tipo de inoculação. Considerou-se como efeito fixo o cultivar (variedade), o ferimento (presença e ausência), o gênero de *Colletotrichum* e suas interações (duplas e tripla). As espécies de isolado foram consideradas como efeito aleatório.

Deseja-se verificar para cada tipo de inoculação, a existência de diferença estatisticamente significativa na taxa de crescimento micelial (área abaixo da curva) entre os cultivares, entre a presença e ausência de ferimento, entre os gêneros de *Colletotrichum*, e estudar as interações estatisticamente significativas.

Resultados e discussão

5.1 Avaliação do efeito da temperatura na taxa de crescimento micelial das colônias de *Colletotrichum*

Até uma dada temperatura, a área abaixo da curva (taxa) de progressão da doença aumenta conforme a temperatura aumenta, a partir desta dada temperatura a taxa começa a baixar. A partir de qual temperatura isto se inicia varia de isolado para isolado (Tabela 5.1). Com o auxílio da Figura 5.1, observa-se menores áreas abaixo da curva para os isolados do gênero *acutatum*.

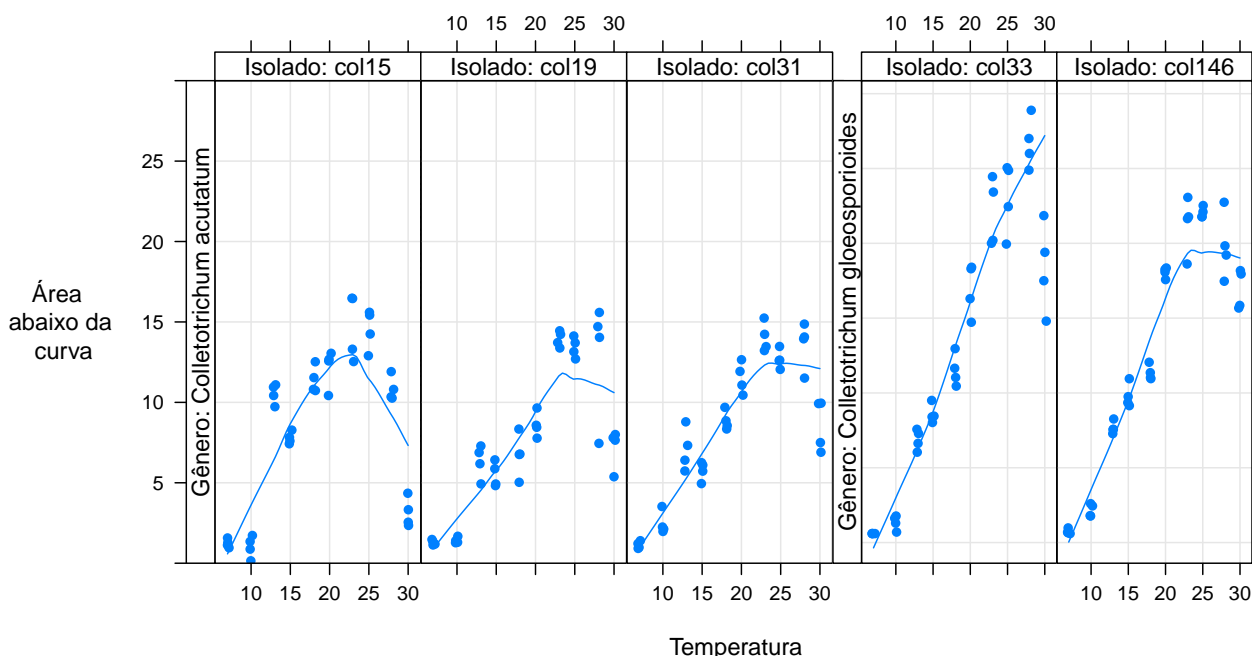


Figura 5.1: Análise descritiva - Dispersão fragmentada por gênero e isolado da área abaixo da curva (dia * mm de diâmetro) vs. temperatura (°C) com curva de tendência não paramétrica estimada através de suavização

Tabela 5.1: Temperatura (°C) correspondente as maiores taxas (área abaixo da curva - aac) observadas para cada isolado

Gênero	Isolado	Temperatura	aac
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col15	23	16.475
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col19	28	15.590
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col31	23	15.240
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	col33	28	28.890
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	col146	23	23.070

O modelo misto não linear ajustado é composto por quatro parâmetros, sendo que dois deles possuem interpretação prática. θ_y corresponde ao valor da resposta ótima e θ_x ao valor correspondente na abscissa (neste caso, temperatura). Como gênero é efeito fixo no modelo, é de interesse a verificação de diferenças estatisticamente significativas entre suas classes. Para cada uma delas (CA: *Colletotrichum acutatum* e CG: *Colletotrichum gloeosporioides*) é obtida uma estimativa de cada parâmetro.

As estimativas referentes ao gênero (classe) CG aparecem como diferenças em relação ao gênero CA, ou seja, estimativas positivas significam um acréscimo em relação ao gênero CA e estimativas negativas significam um decréscimo. Na Tabela 5.2 temos além das estimativas pontuais de cada parâmetro, as estimativas dos limites dos seus intervalos de Wald com 95% de confiança e a significância de cada parâmetro. Considerando um nível de significância usual de 5% ($\alpha = 0.05$), observa-se que as estimativas dos parâmetros com interpretação de forma, θ_c e θ_q , não diferem entre as classes de *Colletotrichum*. Este comportamento pode ser visualizado com o auxílio da Figura 5.2, já que a forma das curvas é praticamente igual nas classes, se diferenciando na resposta ótima (θ_y) e na sua respectiva temperatura (θ_x).

Tabela 5.2: Resumo das estimativas dos parâmetros do modelo misto não linear ajustado

	Mínimo	Estimativa	Máximo	Erro padrão	Graus de liberdade	Estatística T	P-valor
$\theta_{y,CA}$	12.964992	13.977538	14.990084	0.5238733	188	26.68114	0.0000
$\theta_{y,CG}$	7.699471	9.335716	10.971961	0.8465642	188	11.02777	0.0000
$\theta_{x,CA}$	23.323307	23.814667	24.306028	0.2542212	188	93.67695	0.0000
$\theta_{x,CG}$	1.151953	1.813658	2.475362	0.3423544	188	5.29760	0.0000
$\theta_{c,CA}$	-0.015926	-0.013146	-0.010366	0.0014384	188	-9.13891	0.0000
$\theta_{c,CG}$	-0.001948	0.001973	0.005895	0.0020290	188	0.97259	0.3320
$\theta_{q,CA}$	-0.000591	-0.000372	-0.000153	0.0001134	188	-3.28020	0.0012
$\theta_{q,CG}$	-0.000106	0.000197	0.000501	0.0001569	188	1.25713	0.2103

$$aac = 13.98\exp(-0.013(T - 23.81)^2) + -4e-04(T - 23.81)^3$$

$$aac = 23.31\exp(-0.011(T - 25.63)^2) + -2e-04(T - 25.63)^3$$

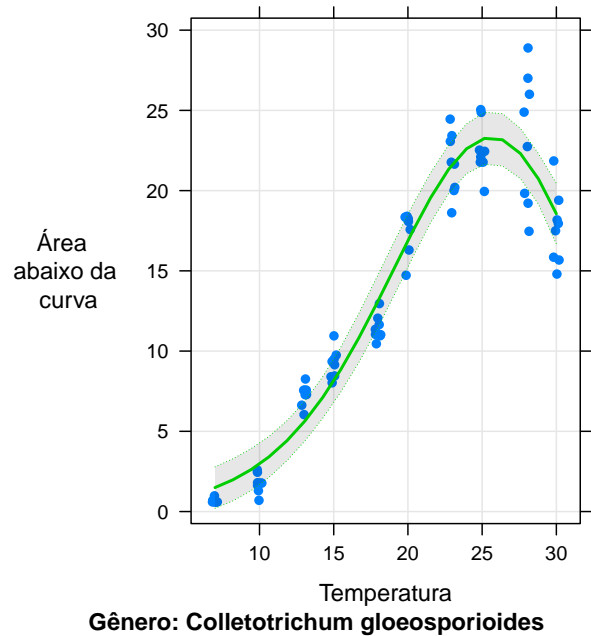
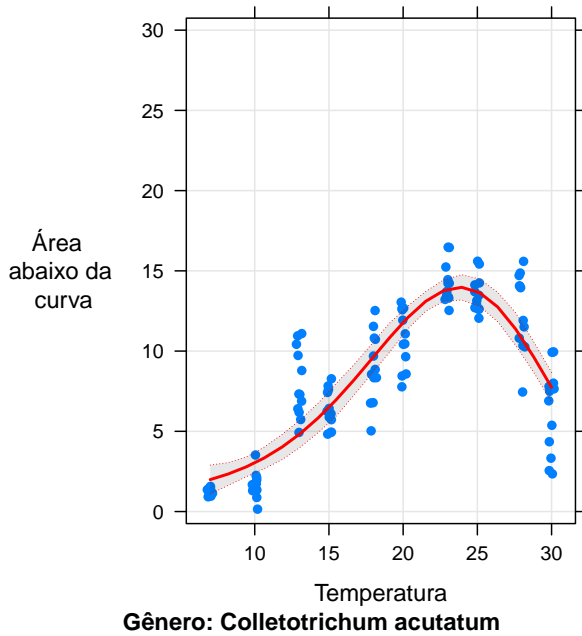


Figura 5.2: Dispersão fragmentada por gênero, da taxa de crescimento micelial (área abaixo da curva - dia * mm de diâmetro) *vs.* temperatura (T - °C) com curva estimada para o efeito fixo e banda de predição com 95 por cento de confiança. Acima de cada figura tem-se a equação do modelo não linear que a descreve

No modelo ajustado temos os isolados (5 níveis) como efeito aleatório no parâmetro θ_y , isto significa que temos um ruído no valor estimado para a resposta ótima em cada isolado. Na Tabela 5.3 são dados os valores preditos para esta variabilidade. Cada valor deve ser somado a estimativa geral do parâmetro fornecido na Tabela 5.2 para obtenção da estimativa correspondente a cada isolado. As maiores diferenças aparecem nos isolados do gênero *gloeosporioides*.

Tabela 5.3: Valores preditos para os efeitos aleatórios. Considerou-se efeito aleatório apenas no parâmetro θ_y (valor correspondente a resposta ótima)

Gênero	Isolado	θ_y
Colletotrichum acutatum	col15	0.3438392
Colletotrichum acutatum	col19	-0.4995749
Colletotrichum acutatum	col31	0.1557357
Colletotrichum gloeosporioides	col33	0.5065742
Colletotrichum gloeosporioides	col146	-0.5065742

A Figura 5.2 pode ser fragmentada em isolados, isto é o que temos na Figura 5.3. As curvas de efeito fixo são as mesmas para os isolados que compõem cada classe de *Colletotrichum*, o que varia são as curvas estima-

das para o efeito aleatório, i.e., a curva de efeito fixo acrescida dos valores fornecidos na tabela anterior (Tabela 5.3). Além de contemplar as respectivas curvas para o efeito aleatório, todas as bandas de predição são estreitas, o que mostra a precisão do modelo e a qualidade do seu ajuste.

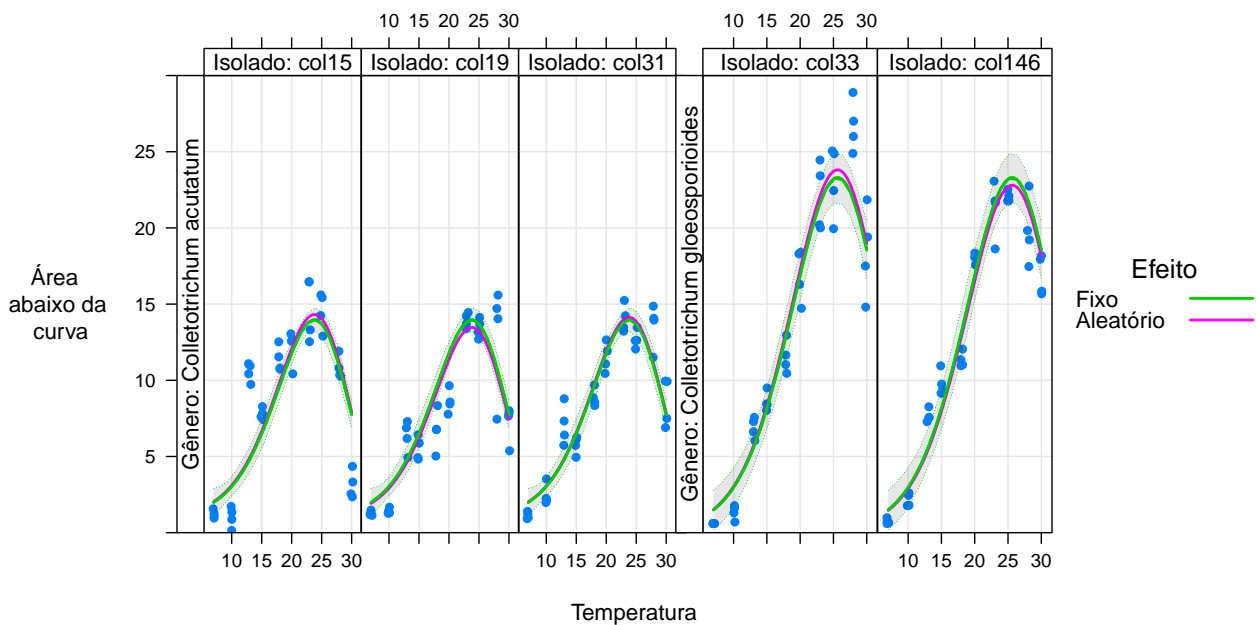


Figura 5.3: Dispersão fragmentada por gênero e isolado, da taxa de crescimento micelial (área abaixo da curva - dia * mm de diâmetro) *vs.* temperatura (°C) com curva estimada para o efeito fixo e para o efeito aleatório com banda de predição de 95 por cento de confiança para o efeito fixo

A partir do modelo ajustado, concluímos que existe diferença na taxa de crescimento micelial (taxa de progressão da doença) entre os gêneros de *Colletotrichum*, sob o efeito da temperatura, com maiores taxas para a classe *gloeosporioides*, e que dentro de cada gênero, as respostas dos isolados são semelhantes.

5.2 Sensibilidade de isolados de *Colletotrichum* a fungicidas

5.2.1 Inibição da germinação de conídios

Conforme a concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de fungicida aplicada aumenta, o número de conídios germinados diminui, contudo, para algumas combinações de fungicida e isolado, conforme a concentração aumenta o número de conídios germinados aumenta, para logo em seguida diminuir com a próxima concentração (Figura 5.4). A concentração correspondente a esse fenô-

meno varia de combinação para combinação, na Tabela 5.4 temos essas concentrações com seus respectivos números máximos de conídios germinados.

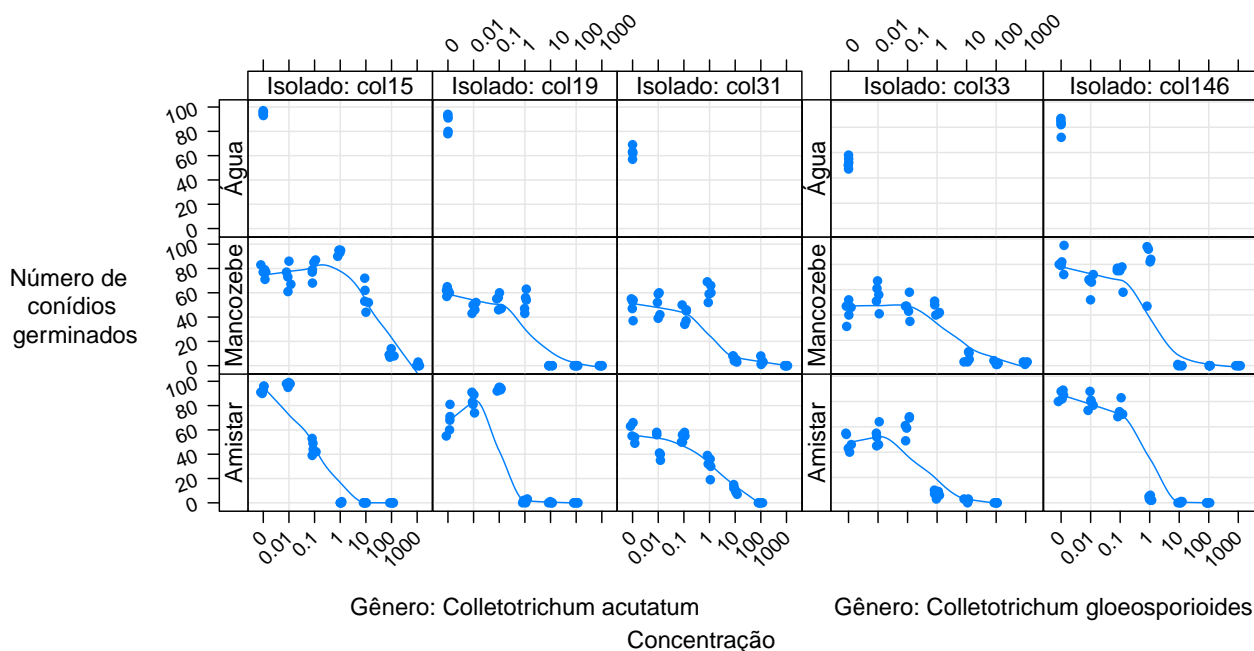


Figura 5.4: Análise descritiva - Dispersão fragmentada por gênero, isolado e fungicida, do número de conídios germinados *vs.* concentração de fungicida com curva de tendência não paramétrica estimada através de suavização

Tabela 5.4: Concentração correspondente aos maiores números de conídios germinados observados para cada combinação de fungicida e isolado

Gênero	Isolado	Fungicida	Número de conídios germinados	Concentração
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col15	Água	97	0
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col19	Água	94	0
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col31	Água	69	0
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	col33	Água	58	0
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	col146	Água	87	0
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col15	Mancozebe	95	1
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col19	Mancozebe	65	0
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col31	Mancozebe	69	1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	col33	Mancozebe	67	0.01
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	col146	Mancozebe	95	0
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col15	Amistar	99	0.01
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col19	Amistar	95	0.1
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col31	Amistar	66	0
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	col33	Amistar	68	0.1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	col146	Amistar	89	0

Observa-se baixas germinações máximas principalmente nos isolados 31 (gênero *acutatum*) e 33 (gênero *gloeosporioides*), tanto para o fungicida Mancozebe quanto para o fungicida Amistar. Já o isolado 19 (gênero *acutatum*) mostra uma baixa germinação máxima para o fungicida Mancozebe, e alta para o fungicida Amistar. Vale ressaltar que mesmo na ausência de fungicida (água), os isolados 31 (gênero *acutatum*) e 33 (gênero *gloeosporioides*) obtêm baixas germinações máximas.

O ajuste do modelo linear misto para os fungicidas Mancozebe e Amistar é satisfatório, como é possível observar na análise de resíduos fornecida na Figura 5.5.

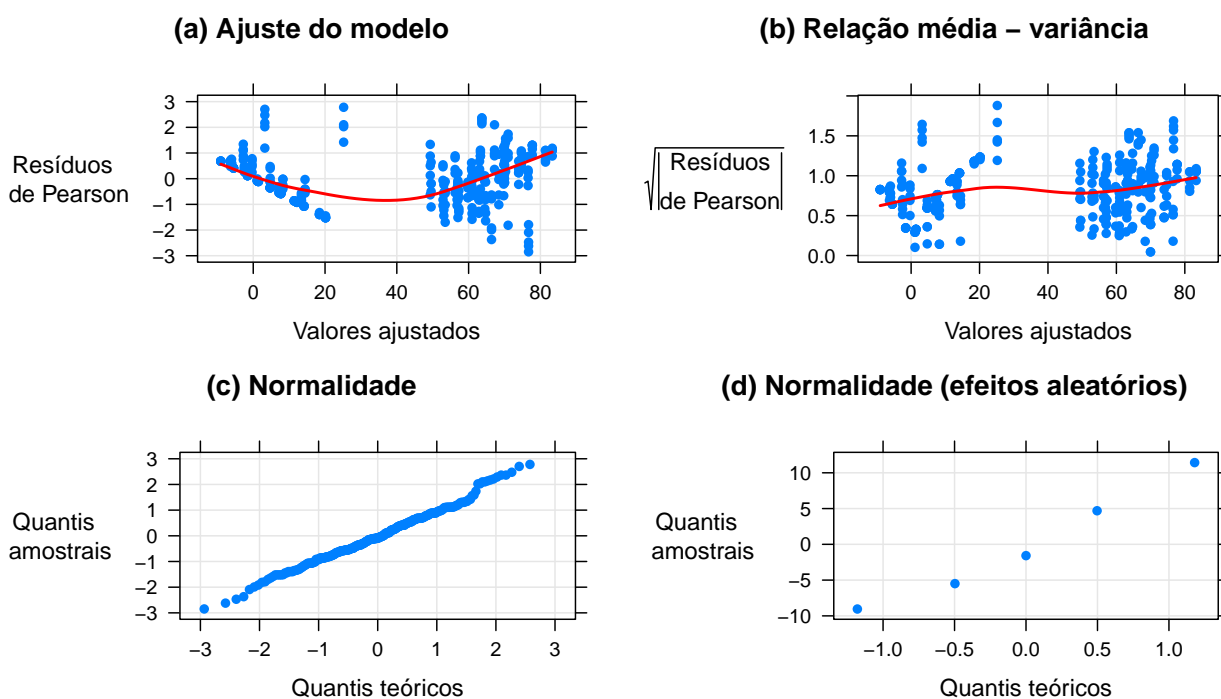


Figura 5.5: Análise de resíduos do modelo linear misto com interação entre concentração e fungicida. (a): Verificação da qualidade do ajuste do modelo; (b): Verificação do pressuposto de ausência de relação média - variância; (c) e (d): Verificação do pressuposto de normalidade

Considerou-se o efeito dos isolados como aleatório, logo, para cada isolado foi obtido um valor predito da variabilidade (Tabela 5.5) que deve ser acrescentada ao intercepto do modelo.

Na Tabela 5.6 são fornecidas as estimativas do modelo ajustado, onde as estimativas pontuais e intervalares devem ser acrescentadas ao nível de referência (intercepto).

Tabela 5.5: Valores preditos para os efeitos aleatórios, as mesmas devem ser acrescentadas ao intercepto do modelo misto linear ajustado

Gênero	Isolado	Intercepto
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col15	11.4258
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col19	-1.5811
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col31	-5.4943
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	col33	-9.0431
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	col146	4.6926

Tabela 5.6: Resumo das estimativas dos parâmetros do modelo misto linear ajustado com interação entre concentração e fungicida

	LI ^a	Estimativa	LS ^b	Erro padrão	gl ^c	Estatística T	P-valor
Intercepto ^d	61.5914	70.00	78.4086	4.3600	284	16.0552	0.0000
Concentração 0.01	-5.4912	1.88	9.2512	3.8221	284	0.4919	0.6232
Concentração 0.1	-12.0912	-4.72	2.6512	3.8221	284	-1.2349	0.2179
Concentração 1	-68.6512	-61.28	-53.9088	3.8221	284	-16.0331	0.0000
Concentração 10	-74.6512	-67.28	-59.9088	3.8221	284	-17.6029	0.0000
Concentração 100	-77.3712	-70.00	-62.6288	3.8221	284	-18.3145	0.0000
Mancozebe	-14.8512	-7.48	-0.1088	3.8221	284	-1.9570	0.0513
0.01 : Mancozebe ^e	-16.4645	-6.04	4.3845	5.4053	284	-1.1174	0.2648
0.1 : Mancozebe	-9.6245	0.80	11.2245	5.4053	284	0.1480	0.8824
1 : Mancozebe	54.6555	65.08	75.5045	5.4053	284	12.0401	0.0000
10 : Mancozebe	8.0955	18.52	28.9445	5.4053	284	3.4263	0.0007
100 : Mancozebe	0.0555	10.48	20.9045	5.4053	284	1.9388	0.0535

^aLimite Inferior de um intervalo de confiança de 95%

^bLimite Superior de um intervalo de confiança de 95%

^cGraus de liberdade

^dConcentração 0, Fungicida Amistar e interações envolvendo Amistar

^eInteração (:), Concentração : Fungicida

Como a interação entre concentração e fungicida se mostrou significativa, é de interesse aprofundar a investigação fazendo o estudo dos efeitos de forma separada. Gênero não se mostrou significativo, tanto presente em interações quanto individualmente.

Para o fungicida Mancozebe as concentrações podem ser divididas em três grupos, um com as concentrações 0, 0.01, 0.1 e 1, e dois com apenas uma concentração cada (10 e 100). Já para o fungicida Amistar temos dois grupos, um formado pelas concentrações 0, 0.01 e 0.1 e outro pelas concentrações 1, 10 e 100. Na Figura 5.6 temos as estimativas e seus respectivos intervalos.

Para o modelo misto linear dos isolados sem aplicação de fungicida - ape-

nas água - o ajuste também foi satisfatório, como observa-se na Figura 5.7.

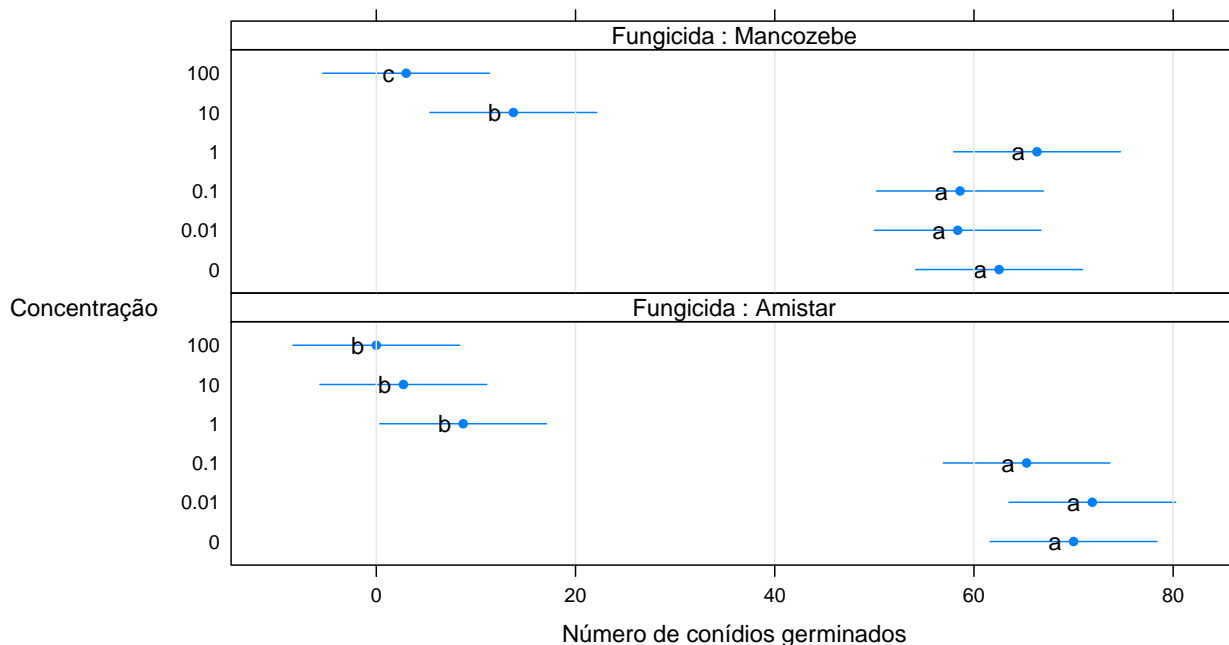


Figura 5.6: Comparações múltiplas, estudando a interação concentração - fungicida: Estimativas com respectivos intervalos de 95 por cento de confiança. Letras iguais em cada fungicida significa que as concentrações não diferem com um nível de significância de 5 por cento

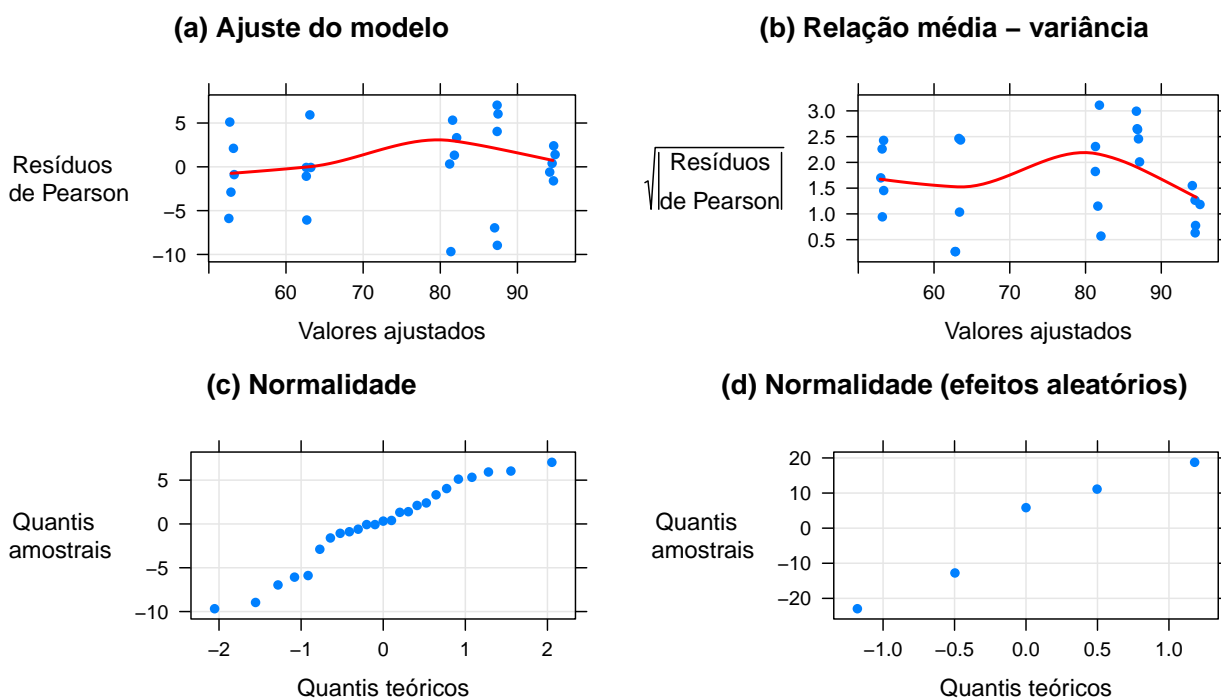


Figura 5.7: Análise de resíduos do modelo linear misto para os dados sem fungicida (água). (a): Verificação da qualidade do ajuste do modelo; (b): Verificação do pressuposto de ausência de relação média - variância; (c) e (d): Verificação do pressuposto de normalidade

O efeito de gênero não se mostrou significativo, i.e., o efeito da água não difere significativamente entre as classes de *Colletotrichum*.

Um resumo das estimativas do parâmetro do modelo ajustado é fornecido na Tabela 5.7. Estima-se um número médio de conídios germinados igual a 76, aproximadamente.

Tabela 5.7: Resumo das estimativas do parâmetro do modelo misto linear ajustado para os isolados sem aplicação de fungicida

	LI ^a	Estimativa	LS ^b	Erro padrão	Graus de liberdade	Estatística T	P-valor
Intercepto	61.0832	75.84	90.5968	7.2202	20	10.5039	0.0000

^aLimite Inferior de um intervalo de confiança de 95%

^bLimite Superior de um intervalo de confiança de 95%

Na Tabela 5.8 temos os valores preditos para os efeitos aleatórios, os valores preditos do número médio de conídios germinados varia bastante de um isolado para outro, com maior média de germinação para o isolado 15 (gênero *acutatum*) e menor para o isolado 33 (gênero *gloeosporioides*).

Tabela 5.8: Valores preditos para os efeitos aleatórios

Gênero	Isolado	Intercepto
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col15	18.7606
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col19	11.1232
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col31	-12.7682
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	col33	-22.9514
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	col146	5.8358

5.2.2 Crescimento micelial

Conforme a concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de fungicida aplicada aumenta, o crescimento micelial (mm) diminui, este comportamento é observado independente do fungicida utilizado (Figura 5.8). Contudo, perante o fungicida Mancozebe a diminuição é menos acentuada, com destaque para o isolado 33 (gênero *gloeosporioides*), que obteve baixas variações de crescimento para todos os fungicidas utilizados.

Na Tabela 5.9 temos os maiores crescimentos miciliais e suas correspondentes concentrações para cada combinação de isolado e fungicida. Independente do fungicida, o isolado 31 (gênero *acutatum*) obteve os menores crescimentos miciliais máximos.

O modelo misto linear considerado mostra ter um ajuste satisfatório, como pode-se observar na análise de resíduos disposta na Figura 5.9.

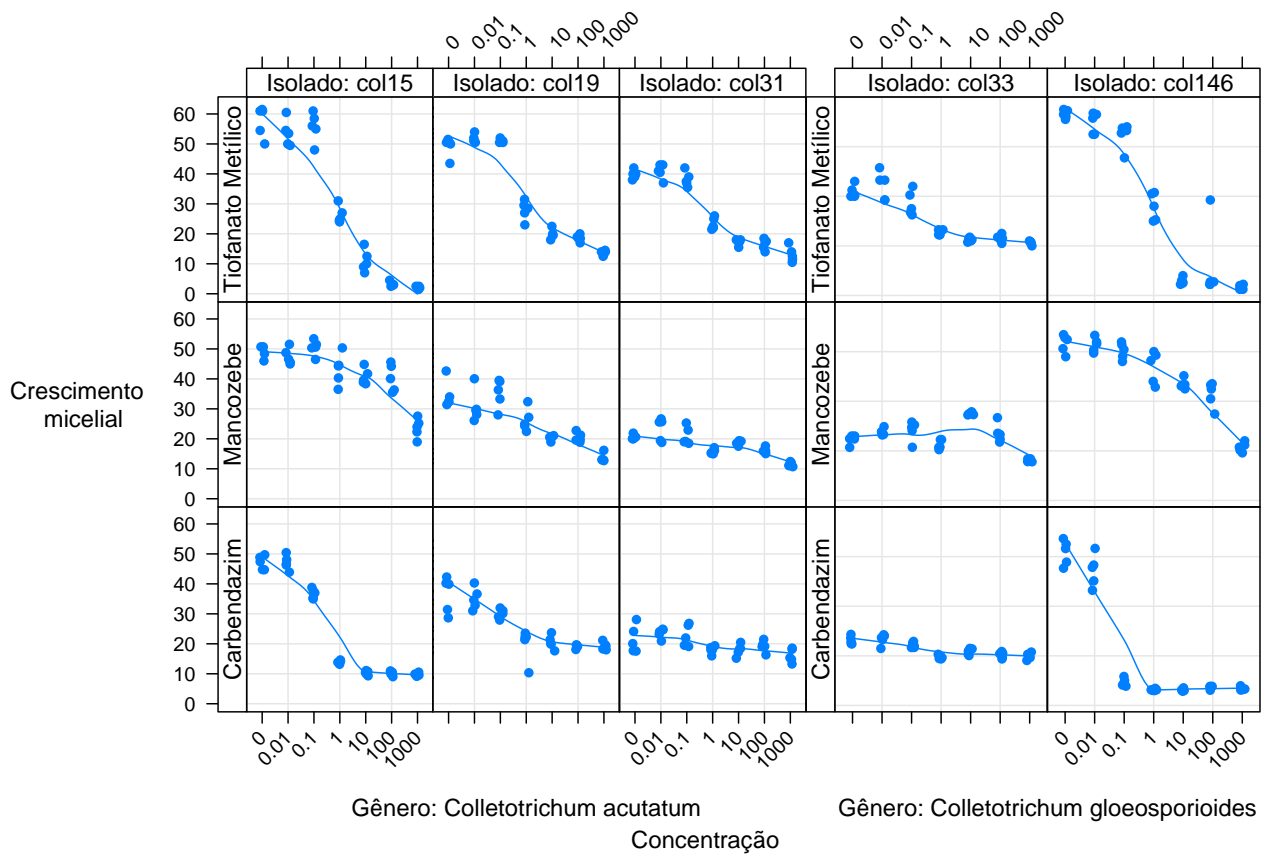


Figura 5.8: Análise descritiva - Dispersão por gênero, isolado e fungicida, do crescimento micelial (mm) *vs.* concentração de fungicida com curva de tendência não paramétrica estimada através de suavização

Tabela 5.9: Concentração correspondente aos maiores crescimentos miceliais observados para cada combinação de fungicida e isolado

Gênero	Isolado	Fungicida	Crescimento micelial	Concentração
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col15	Tiofanato Metílico	61.5	0
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col19	Tiofanato Metílico	54	0.01
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col31	Tiofanato Metílico	43	0.01
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	col33	Tiofanato Metílico	51.5	0.01
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	col146	Tiofanato Metílico	75	0
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col15	Mancozebe	53.4	0.1
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col19	Mancozebe	42.63	0
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col31	Mancozebe	26.665	0.01
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	col33	Mancozebe	35.7	0.1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	col146	Mancozebe	66.855	0
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col15	Carbendazim	50.42	0.01
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col19	Carbendazim	42.29	0
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col31	Carbendazim	28.09	0
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	col33	Carbendazim	28.66	0
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	col146	Carbendazim	67.275	0

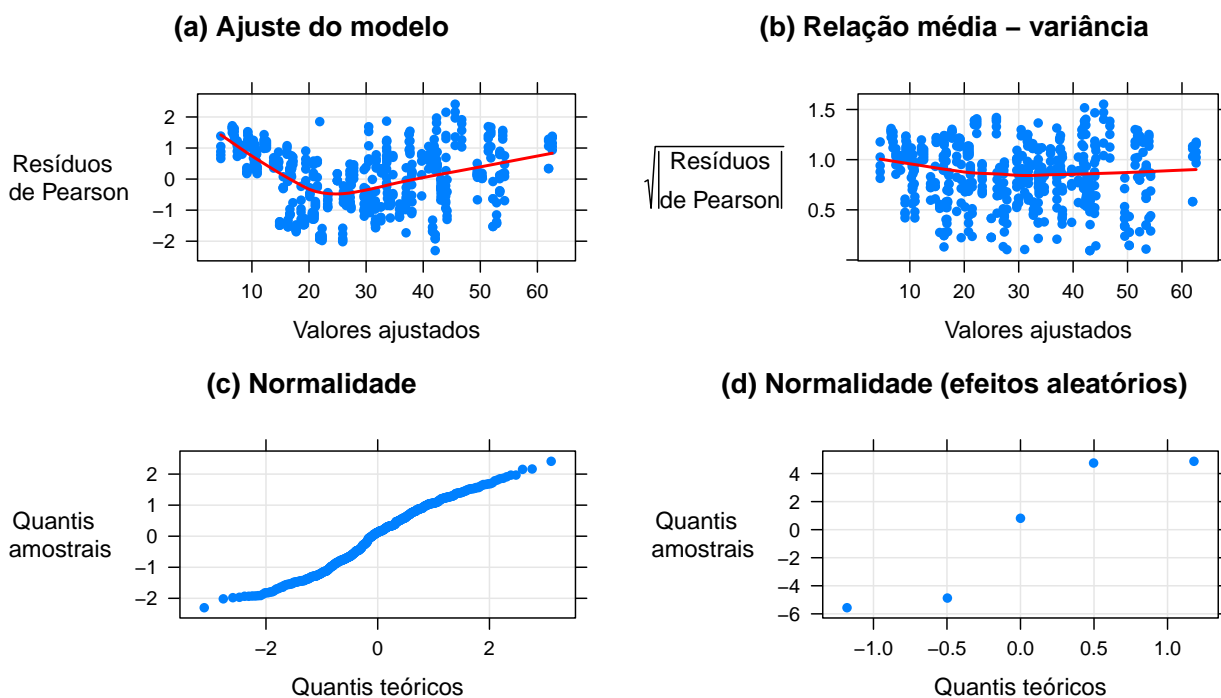


Figura 5.9: Análise de resíduos do modelo linear misto com interação dupla entre concentração, fungicida e gênero. (a): Verificação da qualidade do ajuste do modelo; (b): Verificação do pressuposto de ausência de relação média - variância; (c) e (d): Verificação do pressuposto de normalidade

A interação tripla entre concentração, fungicida e gênero não foi significativa, todavia, as interações duplas foram. Valores preditos para os efeitos

aleatórios são fornecidos na Tabela 5.10, e um resumo do modelo ajustado é dado na Tabela 5.11. Estimativas pontuais e intervalares referem-se a acréscimos no intercepto (nível de referência).

Maiores crescimentos miceliais são observados no isolado 146 (gênero *gloeosporioides*) e menores crescimentos miceliais são observados no isolado 31 (gênero *acutatum*).

Tabela 5.10: Valores preditos para os efeitos aleatórios, os mesmos devem ser acrescentados ao intercepto do modelo linear misto ajustado

Gênero	Isolado	Intercepto
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col15	4.7515
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col19	0.8121
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col31	-5.5636
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	col33	-4.8746
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	col146	4.8746

A interação entre concentração e fungicida é estudada na Figura 5.10.

Tabela 5.11: Resumo das estimativas dos parâmetros do modelo linear misto ajustado com interações duplas entre concentração, fungicida e gênero

	LI ^a	Estimativa	LS ^b	Erro padrão	gl ^c	Estatística T	P-valor
Intercepto ^d	30.6521	37.2225	43.7929	3.4439	492	10.8082	0.0000
Concentração 0.01	-6.5359	-1.0140	4.5080	2.8944	492	-0.3503	0.7262
Concentração 0.1	-15.7277	-10.2058	-4.6838	2.8944	492	-3.5261	0.0005
Concentração 1	-26.3792	-20.8573	-15.3353	2.8944	492	-7.2062	0.0000
Concentração 10	-26.6132	-21.0913	-15.5693	2.8944	492	-7.2870	0.0000
Concentração 100	-26.9140	-21.3921	-15.8701	2.8944	492	-7.3909	0.0000
Concentração 1000	-26.7447	-21.2227	-15.7007	2.8944	492	-7.3324	0.0000
Mancozebe	-9.6661	-4.4389	0.7884	2.7399	492	-1.6201	0.1059
T. Metílico ^e	6.2327	11.4599	16.6872	2.7399	492	4.1826	0.0000
CG ^f	-11.8754	3.4997	18.8748	4.9755	3	0.7034	0.5325
0.01 : Mancozebe ^g	-5.9049	1.1588	8.2225	3.7025	492	0.3130	0.7544
0.1 : Mancozebe	7.5279	14.5916	21.6553	3.7025	492	3.9410	0.0001
1 : Mancozebe	9.8441	16.9078	23.9715	3.7025	492	4.5666	0.0000
10 : Mancozebe	10.1077	17.1714	24.2351	3.7025	492	4.6378	0.0000
100 : Mancozebe	7.2459	14.3096	21.3733	3.7025	492	3.8649	0.0001
1000 : Mancozebe	-3.9469	3.1168	10.1805	3.7025	492	0.8418	0.4003
0.01 : T. Metílico	-6.0899	0.9738	8.0375	3.7025	492	0.2630	0.7927
0.1 : T. Metílico	3.9577	11.0214	18.0851	3.7025	492	2.9768	0.0031
1 : T. Metílico	-8.5417	-1.4780	5.5857	3.7025	492	-0.3992	0.6899
10 : T. Metílico	-20.7993	-13.7356	-6.6719	3.7025	492	-3.7098	0.0002
100 : T. Metílico	-21.3571	-14.2934	-7.2297	3.7025	492	-3.8605	0.0001
1000 : T. Metílico	-24.4127	-17.3490	-10.2853	3.7025	492	-4.6858	0.0000
0.01 : CG	-6.4860	-0.5996	5.2869	3.0854	492	-0.1943	0.8460
0.1 : CG	-15.3755	-9.4891	-3.6026	3.0854	492	-3.0755	0.0022
1 : CG	-11.4483	-5.5618	0.3246	3.0854	492	-1.8026	0.0721
10 : CG	-11.3693	-5.4828	0.4036	3.0854	492	-1.7770	0.0762
100 : CG	-10.9228	-5.0363	0.8501	3.0854	492	-1.6323	0.1033
1000 : CG	-13.6072	-7.7207	-1.8343	3.0854	492	-2.5023	0.0127
Mancozebe : CG	6.8371	10.6906	14.5442	2.0199	492	5.2927	0.0000
T. Metílico : CG	1.6906	5.5442	9.3978	2.0199	492	2.7448	0.0063

^aLimite Inferior de um intervalo de confiança de 95%

^bLimite Superior de um intervalo de confiança de 95%

^cGraus de liberdade

^dConcentração 0, Fungicida Carbendazim, *Colletotrichum acutatum* (CA), e interações os envolvendo

^eTiofanato Metílico

^f*Colletotrichum gloeosporioides*

^gInteração (:), Concentração : Fungicida

Para os fungicidas Tiofanato Metílico e Carbendazim as concentrações podem ser divididas em três grupos, em todos, um dos grupos é composto por uma única concentração (1 e 0.1, respectivamente). Para o fungicida

Mancozebe a divisão de grupos não é tão simples. Nele as concentrações 0, 0.01, 0.1 diferem significativamente das concentrações 100 e 1000, as concentrações 1 e 10 diferem apenas da concentração 1000 e a concentração 100 difere significativamente das concentrações 0, 0.01, 0.1 e 1000.

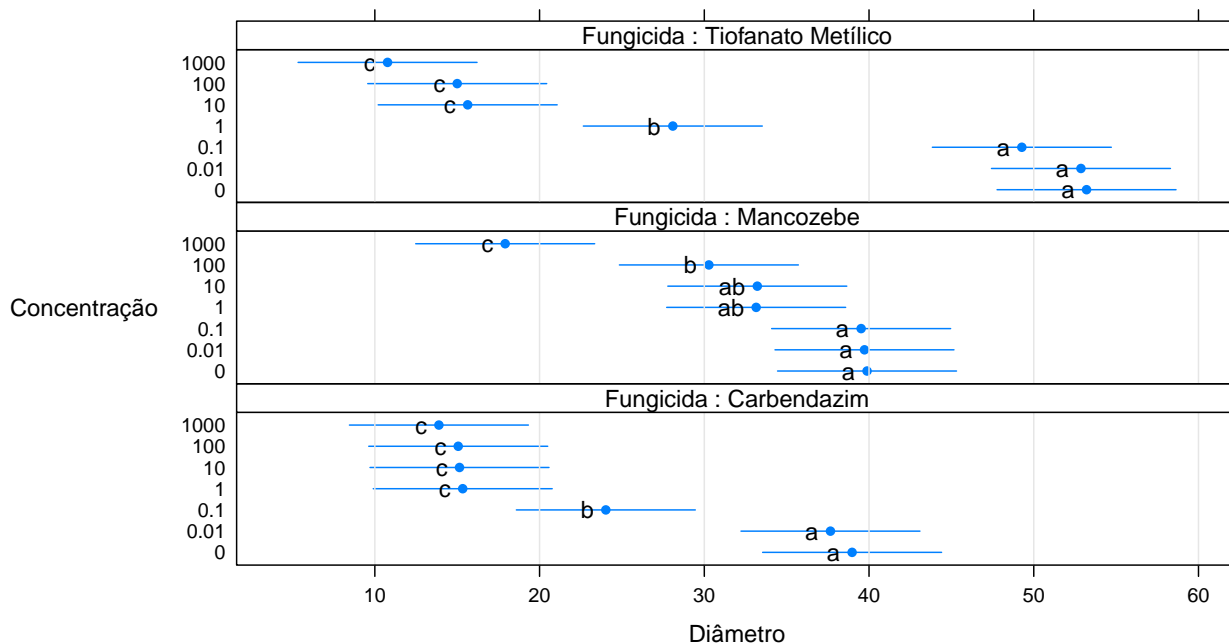


Figura 5.10: Comparações múltiplas, estudando a interação concentração - fungicida: Estimativas com respectivos intervalos de 95 por cento de confiança. Letras iguais em cada fungicida significa que as concentrações não diferem com um nível de significância de 5 por cento

Na Figura 5.11 temos o estudo da interação entre concentração e gênero. Para o gênero *gloeosporioides* as concentrações podem ser divididas em quatro grupos. Para o gênero *acutatum*, as concentrações 0, 0.01 e 0.1 diferem significativamente de todas as demais, a concentração 1 difere de todas (com exceção da concentração 10), a concentração 10 difere das concentrações 0, 0.01, 0.1 e 1000, a concentração 100 difere das concentrações 0, 0.01, 0.1 e 1, e a concentração 1000 difere significativamente de todas as concentrações (com exceção da concentração 100).

A interação entre fungicida e gênero é apresentada na Figura 5.12. Para o gênero *gloeosporioides* os fungicidas diferem entre si, já para o gênero *acutatum* os fungicidas Tiofanato Metílico e Mancozebe não diferem significativamente.

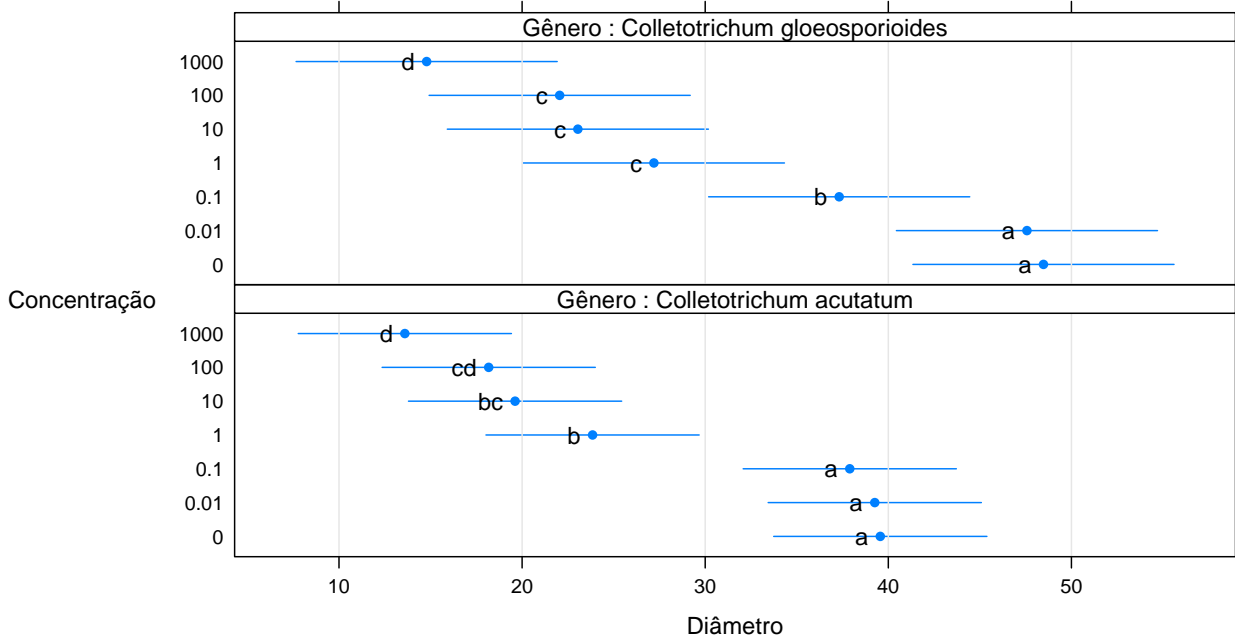


Figura 5.11: Comparações múltiplas, estudando a interação concentração - gênero: Estimativas com respectivos intervalos de 95 por cento de confiança. Letras iguais em cada fungicida significa que as concentrações não diferem com um nível de significância de 5 por cento

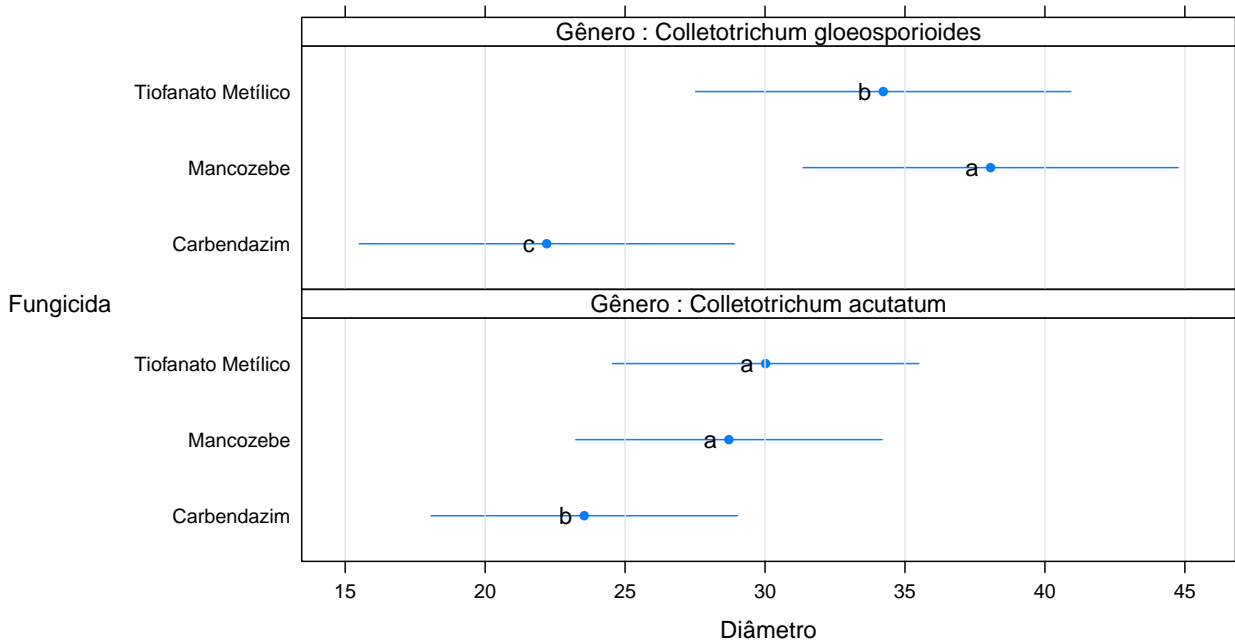


Figura 5.12: Comparações múltiplas, estudando a interação fungicida - gênero: Estimativas com respectivos intervalos de 95 por cento de confiança. Letras iguais em cada fungicida significa que as concentrações não diferem com um nível de significância de 5 por cento

5.3 Inoculação em frutos

Para os dados do experimento em inoculação em disco e com ferimento, observa-se uma variabilidade menor da taxa de crescimento micelial (área abaixo da curva - aac) nos isolados do gênero *acutatum* (Figura 5.13).

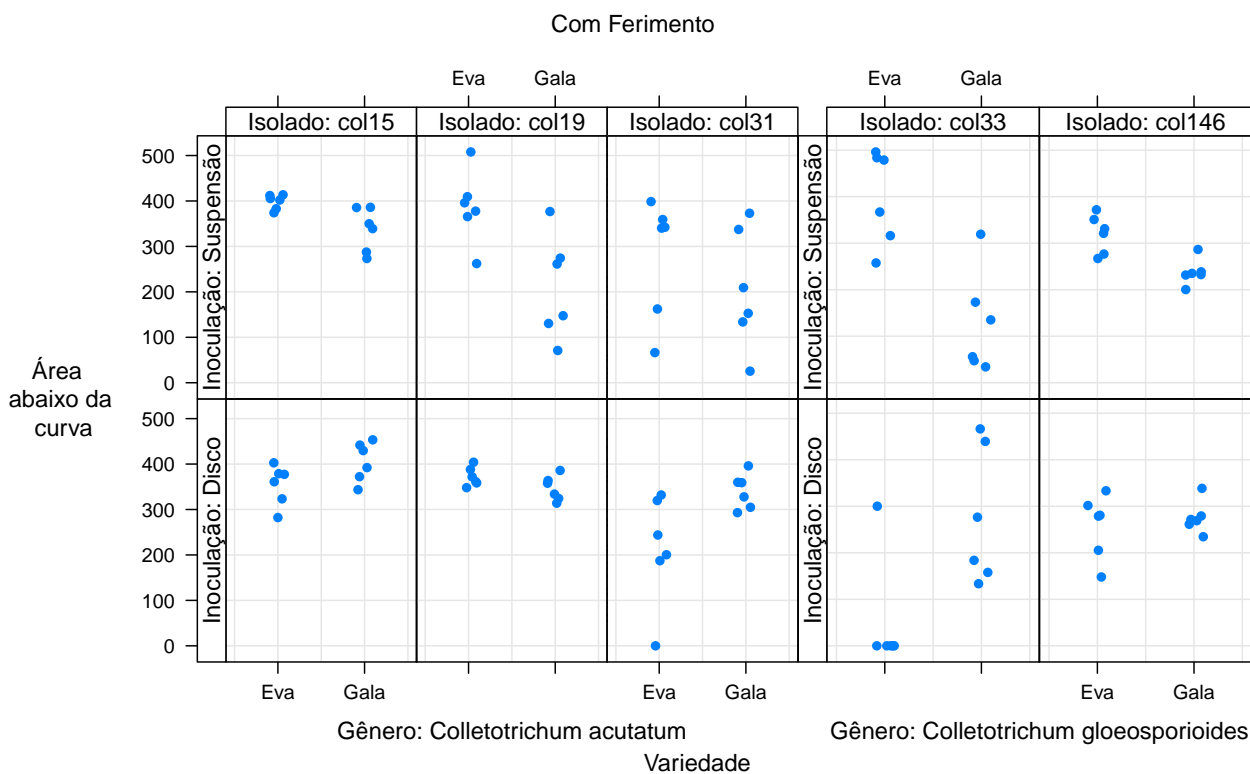


Figura 5.13: Análise descritiva - Dispersão fragmentada por gênero, isolado e tipo de inoculação, da área abaixo da curva de progressão da doença (dia * mm de diâmetro) *vs.* variedade com curva de tendência não paramétrica estimada através de suavização para os dados com ferimento

No isolado 33 (gênero *gloeosporioides*), observamos que para inoculação em suspensão a variedade Eva gera maiores taxas, e que para a inoculação em disco é o contrário, i.e., maiores taxas são obtidas para a variedade Gala, com destaque para o grande número de taxas nulas.

Para os dados sem ferimento, as taxas de crescimento micelial nulas ou baixas é extremamente dominante, com uma pequena exceção do isolado 146 (gênero *gloeosporioides*) na inoculação em suspensão e para a variedade Eva na inoculação em disco (Figura 5.14). Contudo, as taxas não são muito altas.

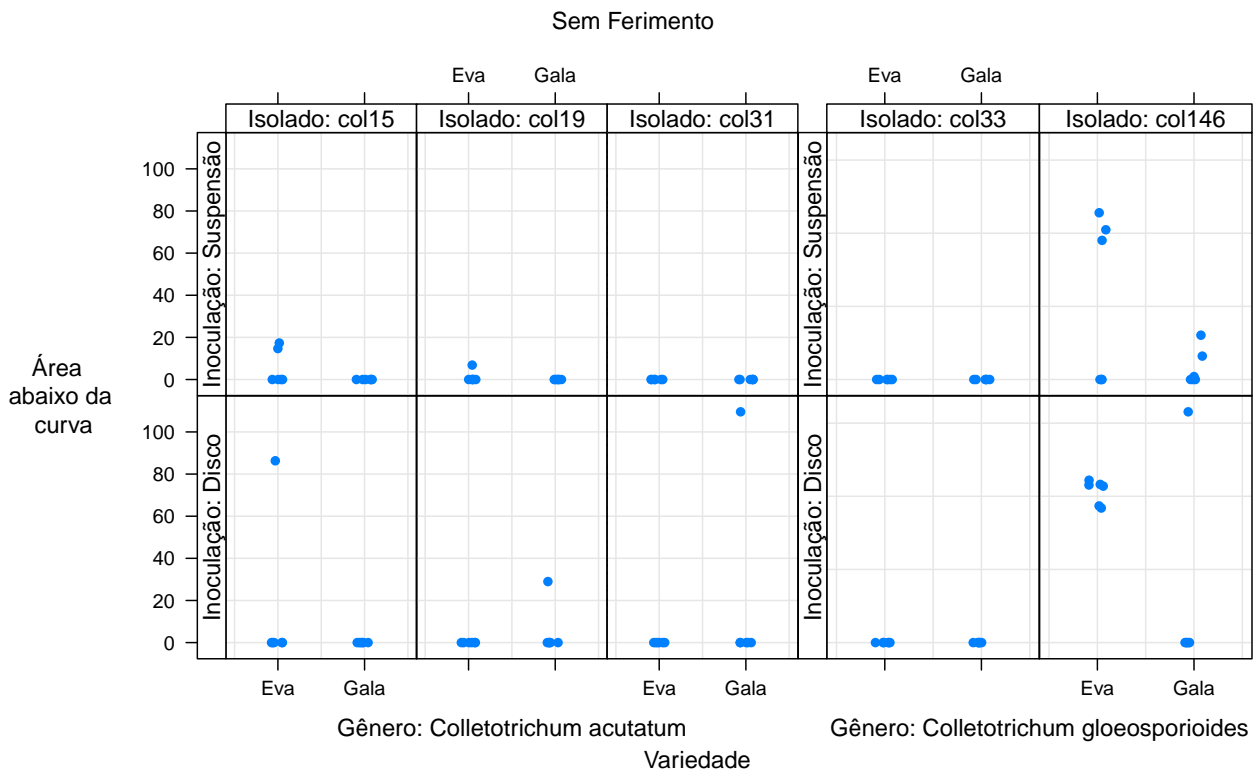


Figura 5.14: Análise descritiva - Dispersão fragmentada por gênero, isolado e tipo de inoculação, da área abaixo da curva de progressão da doença (dia * mm de diâmetro) *vs.* variedade com curva de tendência não paramétrica estimada através de suavização para os dados sem ferimento

A diferença entre as taxas para dados com e sem ferimento é altíssima.

5.3.1 Inoculação em disco

O ajuste do modelo linear misto foi satisfatório, como pode-se observar na análise de resíduos disposta na Figura 5.15.

A partir dos valores preditos para os efeitos aleatórios, observamos maiores taxas de crescimento micelial no isolado 146 (gênero *gloeosporioides*) - com grande diferença para os demais. Menores taxas são observadas no isolado 33 (também do gênero *gloeosporioides*) (Tabela 5.12). Essa grande diferença no isolado 146 pode vir a ser atribuída as observações sem ferimento (Figura 5.13).

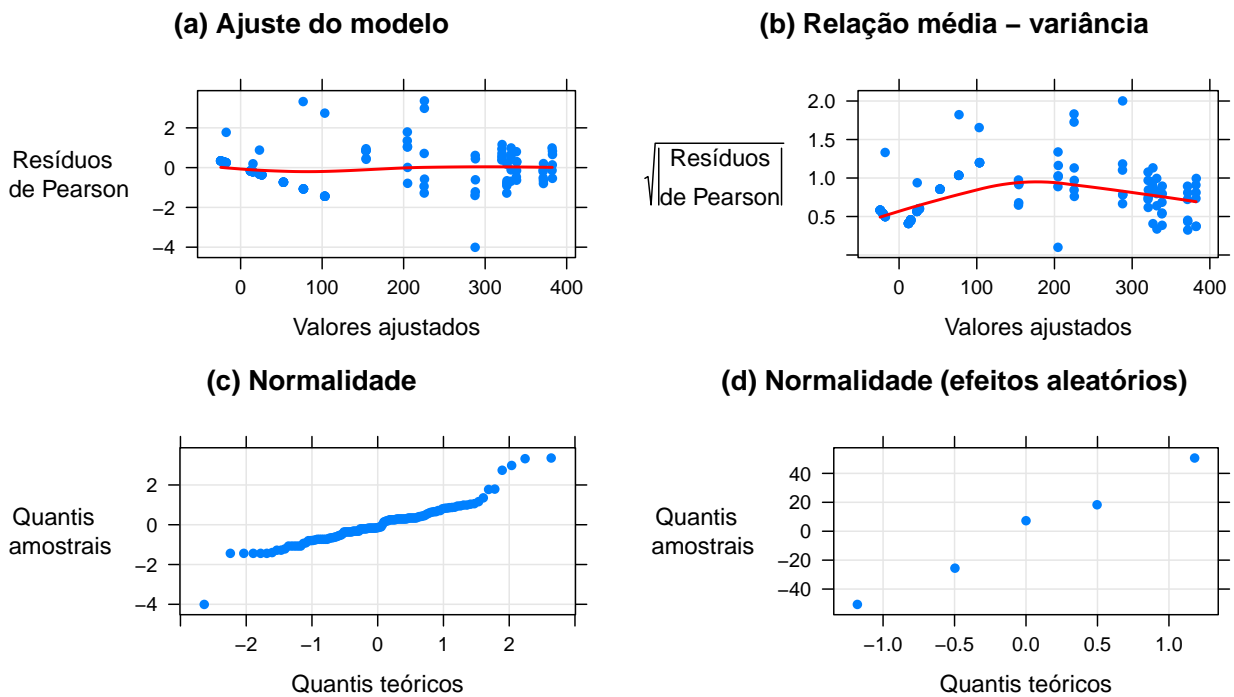


Figura 5.15: Análise de resíduos do modelo linear misto para os dados do experimento com inoculação em disco, e com interação entre variedade, fermento e gênero. (a): Verificação da qualidade do ajuste do modelo; (b): Verificação do pressuposto de ausência de relação média - variância; (c) e (d): Verificação do pressuposto de normalidade

Tabela 5.12: Valores preditos para os efeitos aleatórios, os mesmos devem ser acrescentados ao intercepto do modelo linear misto ajustado

Gênero	Isolado	Intercepto
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col15	18.2823
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col19	7.2732
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col31	-25.5556
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	col33	-50.6316
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	col146	50.6316

Um resumo das estimativas do modelo ajustado é fornecido na Tabela 5.13. Estimativas pontuais e intervalares devem ser acrescentadas a estimativa do intercepto.

Como a interação (tripla) entre fermento, gênero e variedade se mostrou significativa, é de interesse estudá-la (Figura 5.16).

Tabela 5.13: Resumo das estimativas dos parâmetros do modelo linear misto ajustado, com interação entre variedade, fermento e gênero

	LI ^a	Estimativa	LS ^b	Erro padrão	gl ^c	Estatística T	P-valor
Intercepto ^d	258.7267	313.3656	368.0044	28.5356	109	10.9816	0.0000
Gala	3.2312	50.6831	98.1349	24.7821	109	2.0451	0.0432
SF ^e	-356.0222	-308.5703	-261.1184	24.7821	109	-12.4513	0.0000
CG ^f	-298.1058	-159.3868	-20.6678	45.1187	3	-3.5326	0.0386
Gala : SF ^g	-114.8896	-47.7825	19.3246	35.0472	109	-1.3634	0.1756
Gala : CG	-3.7482	71.2799	146.3079	39.1840	109	1.8191	0.0716
SF : CG	182.7556	257.7836	332.8116	39.1840	109	6.5788	0.0000
Gala : SF : CG	-257.1886	-151.0829	-44.9773	55.4145	109	-2.7264	0.0075

^aLimite Inferior de um intervalo de confiança de 95%

^bLimite Superior de um intervalo de confiança de 95%

^cGraus de liberdade

^dVariedade Eva, Com Ferimento (CF - Situação), *Colletotrichum acutatum* (CA), e interações os envolvendo

^eSem Ferimento

^f*Colletotrichum gloeosporioides*

^gInteração (:), Variedade : Situação

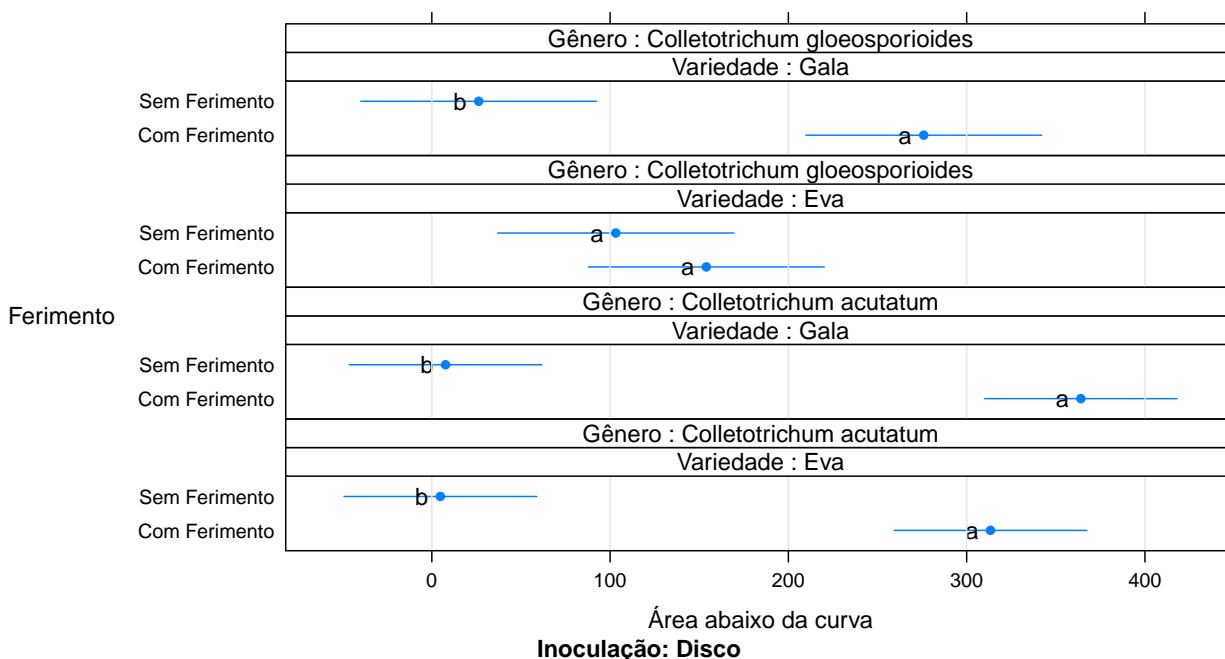


Figura 5.16: Comparações múltiplas, estudando a interação fermento, gênero e variedade: Estimativas com respectivos intervalos de 95 por cento de confiança. Letras iguais em cada combinação de gênero e variedade significa que as situações (possuir ou não fermento) não diferem com um nível de significância de 5 por cento

Com exceção da combinação gênero *gloeosporioides* e variedade Eva, existe diferença estatisticamente significativa entre as situações com e sem fermento, com maior destaque no gênero *acutatum*.

5.3.2 Inoculação em suspensão

Com a análise de resíduos fornecida na Figura 5.17, concluímos que o ajuste do modelo linear misto foi satisfatório.

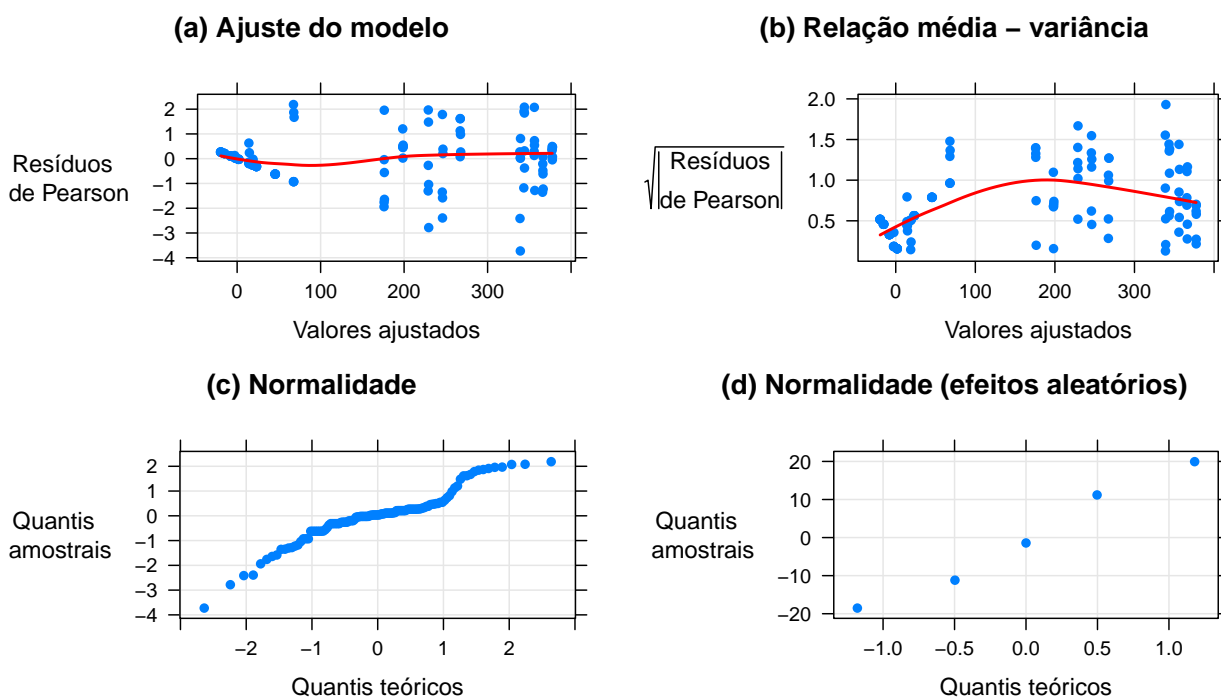


Figura 5.17: Análise de resíduos do modelo linear misto para os dados do experimento com inoculação em suspensão, com interação dupla entre variedade, fermento e gênero. (a): Verificação da qualidade do ajuste do modelo; (b): Verificação do pressuposto de ausência de relação média - variância; (c) e (d): Verificação do pressuposto de normalidade

A partir dos valores preditos para os efeitos aleatórios fornecidos na Tabela 5.14, observa-se maiores taxas de crescimento micelial no isolado 15 (gênero *acutatum*) e menores taxas no isolado 33 (também do gênero *acutatum*).

Tabela 5.14: Valores preditos para os efeitos aleatórios, os mesmos devem ser acrescentados ao intercepto do modelo linear misto ajustado

Gênero	Isolado	Intercepto
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col15	19.9372
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col19	-1.4174
<i>Colletotrichum acutatum</i>	col31	-18.5199
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	col33	-11.1913
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	col146	11.1913

Na Tabela 5.15 temos um resumo das estimativas do modelo linear misto ajustado. Estimativas pontuais e intervalares devem ser acrescentadas a esti-

mativa do intercepto.

Tabela 5.15: Resumo das estimativas dos parâmetros do modelo linear misto ajustado, com interação entre variedade, ferimento e gênero

	LI ^a	Estimativa	LS ^b	Erro padrão	gl ^c	Estatística T	P-valor
Intercepto ^d	318.9740	357.5276	396.0812	20.0477	110	17.8339	0.0000
Gala	-153.1833	-109.9441	-66.7048	22.4842	110	-4.8898	0.0000
SF ^e	-401.8258	-358.5866	-315.3473	22.4842	110	-15.9484	0.0000
CG ^f	-94.4823	-2.5440	89.3944	29.7706	3	-0.0855	0.9373
Gala : SF ^g	61.2649	114.2220	167.1791	27.5374	110	4.1479	0.0001
Gala : CG	-111.8419	-57.7928	-3.7437	28.1053	110	-2.0563	0.0421
SF : CG	6.2898	60.3389	114.3880	28.1053	110	2.1469	0.0340

^aLimite Inferior de um intervalo de confiança de 95%

^bLimite Superior de um intervalo de confiança de 95%

^cGraus de liberdade

^dVariedade Eva, Com Ferimento (CF - Situação), *Colletotrichum acutatum* (CA), e interações (duplas) os envolvendo

^eSem Ferimento

^f*Colletotrichum gloeosporioides*

^gInteração (:), Variedade : Situação

Diferentamento dos dados do experimento com inoculação em disco, aqui a interação (tripla) entre variedade, ferimento e gênero não se mostrou estatisticamente significativa. Contudo, as interações duplas, sim.

Com o estudo da interação entre variedade e ferimento, observa-se que em ambas as variedades existe diferença estatística significativa entre ferimento, presença e ausência de ferimento (Figura 5.18).

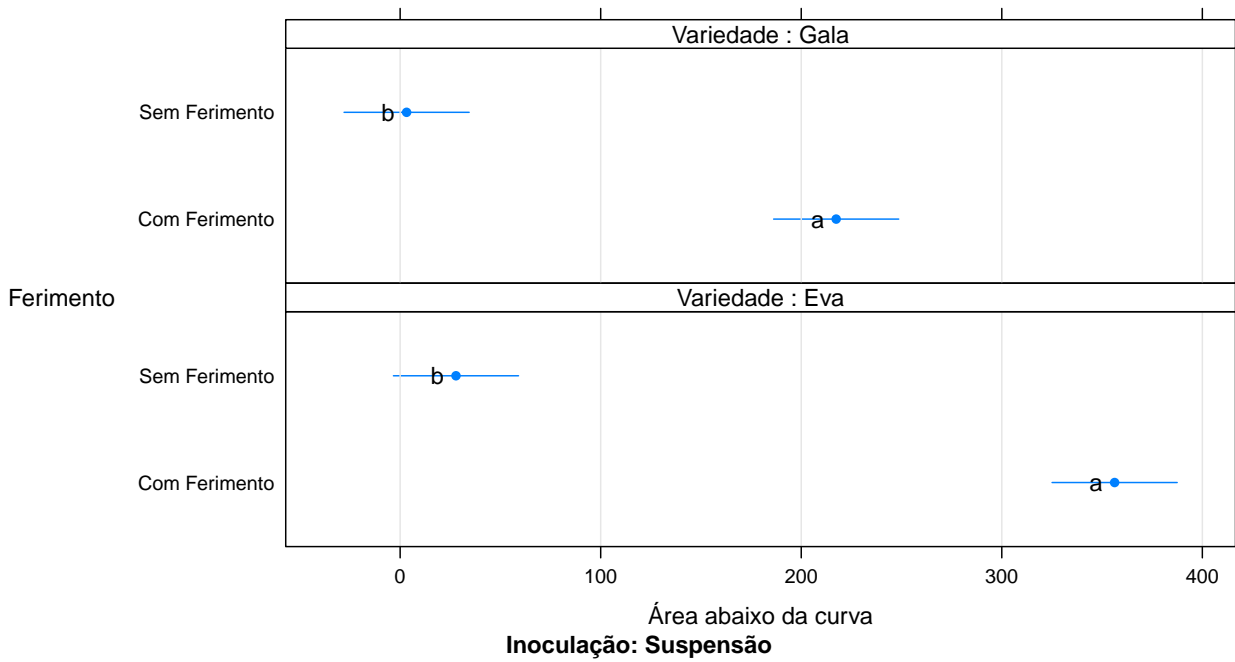


Figura 5.18: Comparações múltiplas, estudando a interação variedade - ferimento: Estimativas com respectivos intervalos de 95 por cento de confiança. Letras iguais em cada fungicida significa que as concentrações não diferem com um nível de significância de 5 por cento

Com o estudo da interação entre variedade e gênero, observa-se que em ambos os gêneros existe diferença na taxa de crescimento micelial entre as variedades (Figura 5.19).

Com o estudo da interação entre ferimento e gênero, observa-se que em ambos os gêneros existe diferença na taxa de crescimento micelial entre os ferimentos, presença e ausência do mesmo (Figura 5.20).

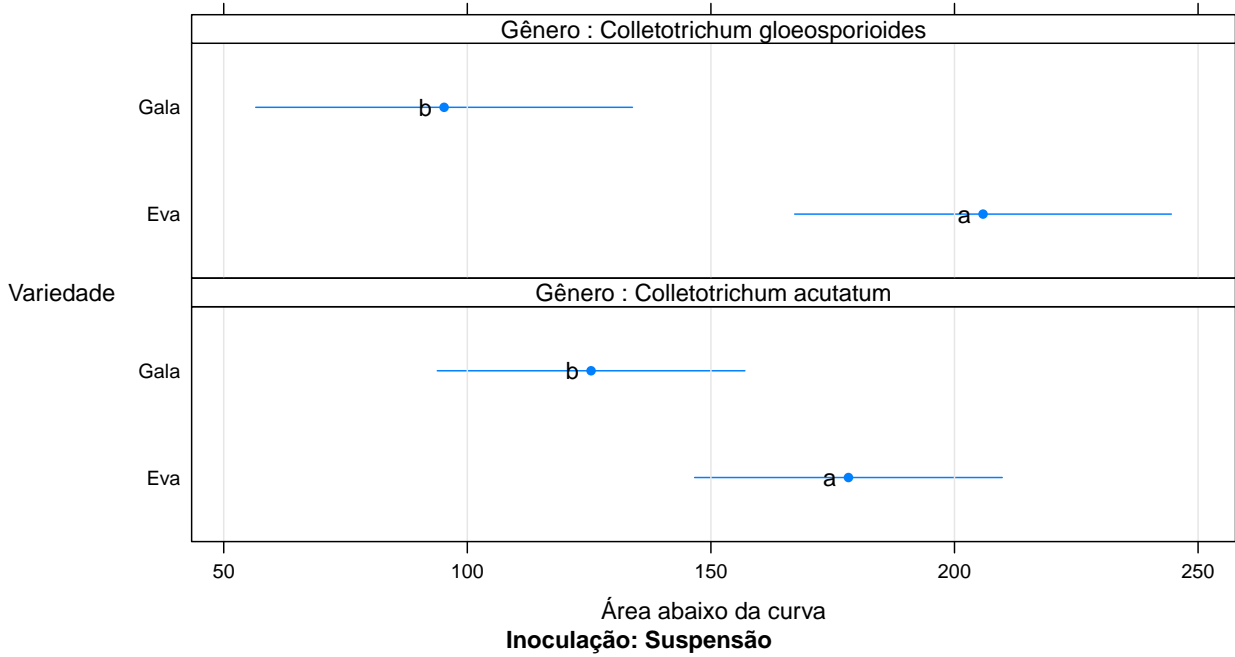


Figura 5.19: Comparações múltiplas, estudando a interação variedade - gênero: Estimativas com respectivos intervalos de 95 por cento de confiança. Letras iguais em cada fungicida significa que as concentrações não diferem com um nível de significância de 5 por cento

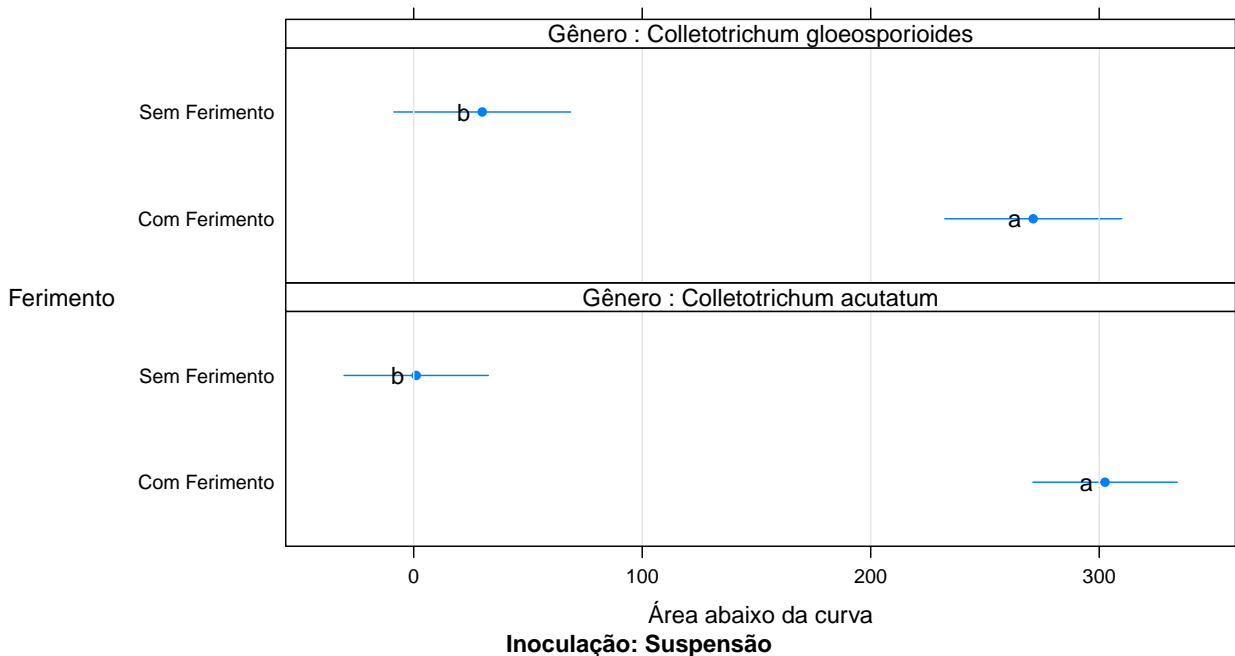


Figura 5.20: Comparações múltiplas, estudando a interação ferimento - gênero: Estimativas com respectivos intervalos de 95 por cento de confiança. Letras iguais em cada fungicida significa que as concentrações não diferem com um nível de significância de 5 por cento

Considerações finais

Concluimos que existem diferenças estatisticamente significativas nas taxas de crescimento micelial entre os gêneros *acutatum* e *gloeosporioides* de *Colletotrichum* sob diferentes temperaturas. As temperaturas de 7, 10, 13, 15, 18, 20, 25, 28 e 30°C foram as temperaturas estudadas. A taxa máxima de crescimento micelial estimada para o gênero *acutatum* é de aproximadamente 13.98 mm (diâmetro) dia, já para o gênero *gloeosporioides* a estimativa é de aproximadamente 23.3 mm * dia. Dentro destes gêneros, as repostas obtidas para as espécies de *Colletotrichum* diferem pouquíssimo.

Sob aplicação de diferentes concentrações (0, 0.01, 0.1, 1, 10 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) dos fungicidas Amistar e Mancozebe, o número de conídios germinados pode ser dividido em grupos de concentrações, baseado nas diferenças das estimativas. Para o fungicida Amistar podemos estabelecer dois grupos, e para o fungicida Mancozebe, três. Na Figura 5.6 temos a representação visual destes. Com aplicação de água pura, o número de conídios germinados não difere significativamente de um gênero para outro.

Sob aplicação de diferentes concentrações (0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) dos fungicidas Carbendazim, Mancozebe e Tiofanato Metílico, o crescimento micelial pode ser dividido em grupos de concentrações para cada fungicida (Figura 5.10) e em grupos de concentrações para cada gênero de *Colletotrichum* (Figura 5.11). Para o gênero *acutatum* o crescimento micelial não difere significativamente entre os fungicidas Mancozebe e Tiofanato Metílico. Para o gênero *gloeosporioides* o crescimento difere significativamente entre os três fungicidas.

Sob dois tipos de inoculação em frutos, disco e suspensão, notamos que a taxa de crescimento micelial é extremamente influenciada pelo fato do fruto ter ou não um ferimento. Na caso da ausência de ferimento, as taxas caem

drasticamente em todas as espécies de *Colletotrichum*, com uma pequena exceção no isolado 146. Para a inoculação em disco, existe uma interação entre o gênero do isolado, o fato do fruto ter ou não ferimento e o cultivar do fruto (Eva e Gala). Entre todas as combinações de gênero e variedade, apenas para o gênero *gloeosporioides* e variedade Eva, o fato do fruto ter ou não ferimento se mostrou não significativa, ou seja, apenas para essa combinação, não existe diferença significativa na taxa de crescimento micelial entre frutos com e sem ferimento (Figura 5.16). Para a inoculação em suspensão, essa interação tripla é inexistente, contudo, as interações duplas são significativas. A taxa de crescimento para os frutos com e sem ferimento se mostra diferente nas variedades de cultivar (Figura 5.18) e nos gêneros de *Colletotrichum* (Figura 5.20). A taxa nas variedades também se mostra estatisticamente diferente nos gêneros de *Colletotrichum* (Figura 5.19).

Para futuras análises, pode-se pensar em efeitos aleatórios mais elaborados e em demais modelos, no caso dos modelos mistos não lineares, e em modelos de sobrevivência no caso dos experimentos de inoculação em frutos.

Referências Bibliográficas

- BONETI, J. I. d. S. and KATSURAYAMA, Y. (1998). Doenças da macieira. *São Paulo: BASF.*
- BOST, S. and HALE, F. (2004). The apple leaf blotches: Necrotic, alternaria, and glomerella. *Fruit Pest News, v. 5, p. 1-3.*
- BRAGANÇA, C. A. D. (2013). Molecular characterization of colletotrichum spp. associated with fruits in brasil. *Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba.*
- da Costa, T. R. (2010). Modelos lineares mistos: Uma aplicação na produção de leite de vacas da raça sindi. Dissertação de mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco. http://www.pgbiom.ufrpe.br/dissertacoes/2010/dissertacao_final_tadeu_rodrigues_da_costa.pdf.
- Filho, J. A. C. (2003). *Nota Metodológica sobre Modelos Lineares Mistos.* <http://www.est.ufpr.br/rt/jom03a.pdf>.
- FREEMAN, S., KATAN, T., and SHABI, E. (1999). Characterization of colletotrichum species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease, v. 82, p. 596-604.*
- GONZALEZ, E. and SUTTON, T. B. (1999). First report of glomerella leaf spot (*Glomerella cingulata*) of apple in the unites states. *Plant Disease, v. 83, p. 1174.*
- GREENLAND, S. (2000). Principles of multilevel modelling. *International Journal of Epidemiology, Oxford, v. 29, n. 1, p. 158-167.*

- IBGE (2012). Instituto brasileiro de geografia e estatística. *Levantamento sistemático da produção agrícola. Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p. 1-88.*
- KATSURAYAMA, Y., BONETI, J. I. d. S., and OZAWA, T. (2000). Sobrevivência de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da mancha foliar da gala. *Fitopatologia brasileira, 25 (suplemento): 383 (Resumos).*
- Laird, N. M. and Ware, J. H. (1982). Random-effects models for longitudinal data. *Biometrics, 38(4):963–974.* <http://www.jstor.org/stable/2529876>.
- LEITE JUNIOR, R. P., TSUNETTA, M., and KISHINO, A. Y. (1988). Ocorrência de mancha foliar de glomerella em macieira no estado do paraná. *Londrina:lapar.*
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., and R Core Team (2015). *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models.* R package version 3.1-120, <http://CRAN.R-project.org/package=nlme>.
- QUEN , H. and BERGH, H. (2004). On multi-level modeling of data from repeated measures designs: a tutorial. *Speech Communication, Amsterdam, v. 43, n. 1-2, p. 103-121.*
- R Core Team (2015). *R: A Language and Environment for Statistical Computing.* R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- SCHABENBERGER, O. and PIERCE, F. J. (2002). Contemporary statistical models for the plant and soil sciences, 1.ed. *Boca Raton: CRC, p. 738.*
- STADNIK, M. J. (2009). Manejo integrado de doenças de macieira. *Florian polis: CAA-UFSC.*
- Zeviani, W. M. (2013). *Parametriza es Interpret veis em Modelos N o Lineares.* Tese de doutorado, Universidade Federal de Lavras. <http://www.leg.ufpr.br/~walmes/docs/WalmesTese.pdf>.
- ZHAO, D., WILSON, M., and BORDERS, B. E. (2005). Modeling response curves and testing treatment effects in repeated measures experiments: a

multilevel nonlinear mixed-effects model approach. *Canadian Journal of Forest Research, Ottawa, v. 35, n. 1, p. 122-132.*

Relatório de atividades

Apresentação oral realizada por Erica Camila Zielinski no 48º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, que ocorreu no período de 10 à 14 de agosto de 2015 na cidade de São Pedro, estado de São Paulo.

Por se tratar de uma apresentação oral, o único material disponível é o resumo solicitado pela organização do evento, segue:

Sensibilidade de isolados de *Colletotrichum* agente da Mancha Foliar de Glomerela a fungicidas/Sensitivity of *Colletotrichum* Isolates agent of Glomerella Leaf Spot to fungicides. E. C. Zielinski; R. R. Moreira; H. A. Laureano; L. L. May De Mio. Depto. de Fitossanidade/SCA-UFPR, CEP 14884-900, Curitiba, PR. E-mail: ericacamilazielinski@gmail.com.

A Mancha Foliar de Glomerela é a principal doença associada à cultura da macieira, sendo a principal forma de controle, a aplicação preventiva de fungicidas. O objetivo do trabalho foi avaliar a sensibilidade a fungicidas de cinco espécies de *Colletotrichum* pertencentes a dois complexos: complexo *acutatum* - cCa (*C. nymphae*, *C. paranaense*, *C. melonis*) e complexo *gloeosporioides* - cCg (*C. fructicola*, *C. siamense*). A sensibilidade foi avaliada pelo diâmetro de colônias e germinação de conídios na presença de fungicida, através do cálculo da EC50. Foram testados para diâmetro da colônia mancozebe, tiofanato metílico e carbendazin e para germinação de conídios azoxistrobin e mancozebe nas doses de: 0; 0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Foram 5 repetições por isolado, para cada dose e fungicida testados. Tiofanato metílico foi o mais eficiente em inibir o crescimento micelial de espécies de *Colletotrichum* pertencentes a ambos os complexos, a EC50 variou de 2 a 3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para espécies pertencentes ao cCg e de 17 a 47 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para espécies pertencentes ao cCa. Azoxistrobin foi o mais eficiente em inibir a germinação de espécies de *Colletotrichum* pertencentes a ambos os complexos, a EC50 variou de 0,1 a 0,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para espécies pertencentes ao cCg e de 0,5 a 0,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para espécies pertencentes ao cCa. Mancozebe teve uma considerável alteração na EC50 quando comparadas as duas metodologias, para crescimento micelial esta dose variou de 218 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a valores superiores a 10.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e para germinação variou de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 19 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Palavras-chave: controle químico, complexo de espécies, EC50

Apreciação do Orientador

8.1 Relatório científico e desempenho no projeto

O Bolsista Henrique A. Laureano desenvolveu o projeto de forma organizada e comprometida. Ele foi sempre assíduo às reuniões e atividades desenvolvidas com as demais pessoas envolvidas e também sempre foi atento aos prazos estabelecidos. No desenvolvimento das análises dos dados, procurou aprofundar nas questões práticas do problema e se interar dos procedimentos estatísticos mais adequados para as questões levantadas. As demais pessoas ligadas a ele no projeto deram testemunhos positivos sobre o envolvimento do Henrique.

8.2 Desempenho acadêmico

Durante o período de desenvolvimento do Projeto, seu desempenho acadêmico não demonstrou decaimento. Pelo contrário, o contato com aspectos aplicados de estatística despertou nele maior interesse pelos temas e necessidade de aprofundar além daquilo visto em sala de aula.

Data: Curitiba, 06/08/2015

Bolsista: Henrique Aparecido Laureano

Orientador: Walmes Marques Zeviani