



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

(08/2015 a 07/2016)

**MODELOS MISTOS DE REGRESSÃO E DE SOBREVIVÊNCIA
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 2015/2016.

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: 2013017802

CURITIBA

2016

Sumário

1	Resumo	4
2	Introdução	5
3	Revisão da literatura	6
3.1	Cultura da macieira e Mancha Foliar de <i>Glomerella</i> (MFG)	6
3.2	Modelos multiestados de sobrevivência markovianos	6
3.3	Modelos de regressão não lineares de efeitos mistos	7
4	Materiais e métodos	8
5	Resultados e discussão	11
5.1	Análise descritiva	11
5.2	Inoculação: Disco - Variedade: Eva	13
5.2.1	Modelos multiestados de sobrevivência markovianos	13
5.2.2	Modelos de regressão não lineares de efeitos mistos	14
5.3	Inoculação: Disco - Variedade: Gala	16
5.3.1	Modelos multiestados de sobrevivência markovianos	16
5.3.2	Modelos de regressão não lineares de efeitos mistos	16
5.4	Inoculação: Esporo - Variedade: Eva	19
5.4.1	Modelos multiestados de sobrevivência markovianos	19
5.4.2	Modelos de regressão não lineares de efeitos mistos	20
5.5	Inoculação: Esporo - Variedade: Gala	22
5.5.1	Modelos multiestados de sobrevivência markovianos	22
5.5.2	Modelos de regressão não lineares de efeitos mistos	23
6	Considerações finais	25

Referências Bibliográficas	26
7 Apreciação do Orientador	29
7.1 Relatório científico e desempenho no projeto	29
7.2 Desempenho acadêmico	29

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. Com os objetivos de verificar possíveis diferenças entre os gêneros de *Colletotrichum* em relação ao tempo com que a lesão causada pelo fungo progride no fruto de maçã, quais os diâmetros máximos dessas lesões e seus tempos decorrentes, três diferentes isolados do gênero *acutatum* e dois do gênero *gloeosporioides* foram avaliados nas variedades de maçã Eva e Gala, nas inoculações em disco e esporo, e em frutos com e sem ferimento. Para tais verificações foram utilizados modelos multiestados de sobrevivência markovianos paramétricos e (não e) semiparamétricos e modelos mistos de regressão não linear. Modelos de sobrevivência podem ser definidos como uma classe de modelos quantitativos estocásticos utilizados para analisar características e fatores associados ao tempo até a ocorrência do desfecho de interesse. Já os modelos não lineares de efeitos mistos são atribuídos a dados de medidas repetidas que permitem que variações nos dados possam ser explicadas por um modelo não linear. Entre os resultados obtidos têm-se a verificação de baixíssimas ocorrências de lesão em frutos sem ferimento, independente da variedade e da forma de inoculação, diferenças entre os gêneros de *Colletotrichum* de uma maneira geral e maiores crescimentos da lesão nos isolados do gênero *acutatum*.

Palavras-chave: Modelos multiestados de sobrevivência markovianos, *Colletotrichum*, modelos mistos de regressão não linear.

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*), com o cultivar Gala sendo o predominante no Paraná (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 (da S. Boneti and Katsurayama, 1998).

No Brasil, o gênero *Colletotrichum gloeosporioides* foi inicialmente identificado como agente causal da doença (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 em relação ao tempo com que a lesão causada pelo fungo progride no fruto de maçã perante diferentes variedades, formas de inoculação e estados do fruto, modelos multiestados de sobrevivência markovianos paramétricos (Jackson, 2011), (não e) semiparamétricos (Putter et al., 2007; de Wreede et al., 2010, 2011) e modelos mistos de regressão não linear (Pinheiro et al., 2016) foram utilizados.

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. (1998), 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 (González and Sutton, 1999; Bost and Hale, 2004).

3.2 Modelos multiestados de sobrevivência markovianos

Modelos multiestados de sobrevivência podem ser definidos como uma classe de modelos quantitativos estocásticos utilizados para analisar carac-

terísticas e fatores associados ao tempo com que um indivíduo se move entre uma série de estados.

De maneira geral um modelo multiestado de sobrevivência markoviano pode ser escrito como

$$q_{rs}(Z_{ij}) = q_{rs}^0 \exp(\underline{\beta}_{rs}^\top Z_{ij}),$$

em que o efeito de um vetor de covariáveis Z_{ij} na intensidade de transição para o indivíduo i no tempo j é modelado usando intensidades proporcionais, em que q_{rs}^0 denota a intensidade de transição (a intensidade representa o risco instantâneo de mover do estado r para o estado $s \neq r$) de base para cada transição e $\underline{\beta}$ é o vetor de coeficientes associado ao vetor de covariáveis \underline{Z} (Jackson, 2011).

Os modelos multiestados markovianos são fundamentados na suposição markoviana de que uma futura transição depende apenas do estado atual. Esses modelos podem ser paramétricos, não paramétricos e semiparamétricos. Nos modelos paramétricos é assumido que os tempos médios de permanência em estados transitórios são exponencialmente distribuídos (na grande maioria das situações), eles podem ser de tempo homogêneo e de tempo não homogêneo (Jackson, 2011). Os modelos não e semiparamétricos são modelos de regressão de Cox (Cox, 1972) estratificados pelas transições entre estados. Na presença de covariáveis temos modelos semiparamétricos, em sua ausência temos modelos não paramétricos (Putter et al., 2007; de Wreede et al., 2010, 2011).

3.3 Modelos de regressão não lineares de efeitos mistos

Modelos não lineares de efeitos mistos são atribuídos a dados de medidas repetidas que permitem que variações nos dados possam ser explicadas por um modelo não linear, além de acomodar os efeitos de grupos (tratamentos) e de informações ao nível de unidade experimental (covariáveis). Suas vantagens incluem a capacidade de tratar dados desbalanceados e incompletos, flexibilidade para acomodar diversas fontes de variação e padrões de correlação, além de seu alto poder para comparar tratamentos (Greenland, 2000; Quené and Bergh, 2004; Zhao et al., 2005).

Materiais e métodos

Cinco isolados de *Colletotrichum* de diferentes espécies e regiões produtoras de maçã do Brasil foram utilizados. 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 fructicola</i>	Col33	Rio Grande do Sul	2011
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum siamense</i>	Col146	São Paulo	2010

Toda a análise estatística foi desenvolvida no ambiente de computação estatística R (R Core Team, 2016), com os modelos sendo ajustados com as bibliotecas *msm* (Jackson, 2011), (Putter et al., 2007; de Wreede et al., 2010, 2011) e (Pinheiro et al., 2016).

Quatro experimentos foram realizados onde foram combinados o tipo de inoculação (disco e esporo) e a variedade de maçã (Eva e Gala).

A inoculação nos frutos foi realizada com gotas contendo 10^4 conídios mL^{-1} na região equatorial no caso da inoculação em disco, e com gotas contendo $40 \mu\text{L}$ de suspensão de conídios na região equatorial no caso da inoculação em suspensão. Sendo posteriormente realizado um fermento com agulha histológica esterilizada na epiderme de metade dos frutos, a gota. O diâmetro (mm) médio de cada lesão foi avaliado diariamente após a inoculação, em períodos variados dependendo da combinação de inoculação e cultivar. Nos experimentos envolvendo o cultivar Eva a duração dos períodos de avaliação são iguais, 22 dias. No experimento disco - Gala a

duração do período de avaliação foi de 56 dias e no experimento esporo - Gala a duração do período de avaliação foi de 34 dias. Para cada isolado, seis frutos dos cultivares foram avaliados.

Em cada experimento foi ajustado um modelo multiestado de sobrevivência markoviano paramétrico, (não e) semiparamétrico e quatro modelos mistos de regressão não linear. A reparametrização do modelo Michaelis-Menten, a reparametrização do modelo exponencial assintótico, a reparametrização do modelo Mitscherlich e a reparametrização do modelo de Bleasdale-Nelder.

Nos modelos de sobrevivência foram considerados cinco estados:

- 1: Estado inicial, a inoculação dos conídios nos frutos
- 2: (0, 10] mm
- 3: (10, 30] mm
- 4: (30, 50] mm
- 5: (50, diâmetro máximo observado] mm

e uma matriz de intensidade de transição progressiva Q , i.e., que não permite transições para trás.

Em todos os experimentos foram ajustados quatro tipos de modelos. Dois de tempo homogêneo e dois de tempo não homogêneo, dois com a base de dados completa e dois apenas com os dados correspondentes aos frutos com ferimento, devido as baixas incidências de MFG nos frutos sem ferimento. Interações entre a variável indicando a presença e ausência de ferimento com o gênero de *Colletotrichum* ou a espécie do isolado foram consideradas nos modelos envolvendo a base de dados completa. A especificação para os modelos não homogêneos se deu com base no observado nas curvas de sobrevivência empíricas construídas pelo estimador de Kaplan-Meier (Kaplan and Meier, 1958).

Nos modelos mistos de regressão não linear também foram ajustados modelos para a base de dados completa e modelos apenas com os dados correspondentes aos frutos com ferimento.

Reparametrização do modelo Michaelis-Menten (Zeviani, 2013; Michaelis and Menten, 1913):

$$\frac{\theta_a \cdot x}{\vartheta_q \cdot \frac{1-q}{q} + x}$$

Reparametrização do modelo Exponencial assintótico, também conhecido como modelo negativo exponencial e modelo monomolecular (Zeviani, 2013; Pinheiro and Bates, 2000; Tjorve, 2003; Box and Lucas, 1959):

$$\theta_a \cdot \left(1 - \exp \left\{ \frac{x \cdot \log(1 - q)}{\vartheta_q} \right\} \right)$$

Reparametrização do modelo Mitscherlich (Zeviani, 2013; Pinheiro and Bates, 2000; Schabenberger and Pierce, 2002):

$$\theta_a \cdot \left(1 - \exp \left\{ \log(1 - q) \cdot \frac{x - \theta_0}{\vartheta_q - \theta_0} \right\} \right),$$

em que θ_0 é o tempo de aquecimento pois a função é nula para $x < \theta_0$.

Reparametrização do modelo de Bleasdale-Nelder (Zeviani, 2013; Bleasdale and Nelder, 1960; Schabenberger and Pierce, 2002; Watkinson, 1980; Damgaard and Borksted, 2004):

$$\vartheta_y \cdot \frac{x}{\vartheta_x} \cdot \left(1 - \theta_2 \cdot \left(1 - \frac{x}{\vartheta_x} \right) \right)^{-1/\theta_2},$$

em que $\vartheta_y > 0$ é o valor máximo correspondente ao valor na abscissa $\vartheta_x > 0$ e $(0 < \theta_2 < 1)$ está associado à curvatura da função ao redor do máximo.

Nos três primeiros modelos θ_a é a assíntota, q é uma constante $(0 < q < 1)$ que representa uma fração de θ_a para o qual $\vartheta_q > 0$ é o valor correspondente na abscissa. Então ϑ_q é o tempo para uma fração q de vida. Foi considerado um $q = 0.5$.

Foram utilizadas reparametrizações dos modelos com o intuito de ter interpretações práticas para os parâmetros.

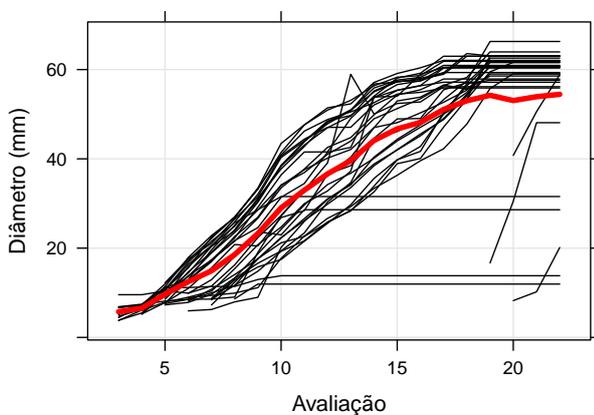
Interações entre a variável indicando a presença e ausência de fermento com o gênero de *Colletotrichum* foram consideradas nos modelos envolvendo a base de dados completa. As espécies de isolado foram consideradas como efeito aleatório.

Resultados e discussão

5.1 Análise descritiva

Em todos os experimentos alguns frutos se destacam por apresentar comportamentos distintos, como um atraso para a progressão da doença ou diâmetros máximos não muito grandes, o que acaba puxando para baixo a média geral e conseqüentemente tornando mais difícil o ajuste global de um modelo de regressão. A maioria desses comportamentos atípicos é observado nos frutos sem ferimento, como é apresentado nos gráficos da direita das Figuras 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4. Os gráficos de análise descritiva indicam uma forte diferença no tempo e na progressão do doença entre frutos com e sem ferimento, com maior ênfase nos frutos da variedade Gala. Os diâmetros máximos em todos os experimentos estão ao redor de 70 mm, mas com média em torno de 60 mm.

Disco – Eva: Todos os frutos



Disco – Eva: Frutos com ferimento

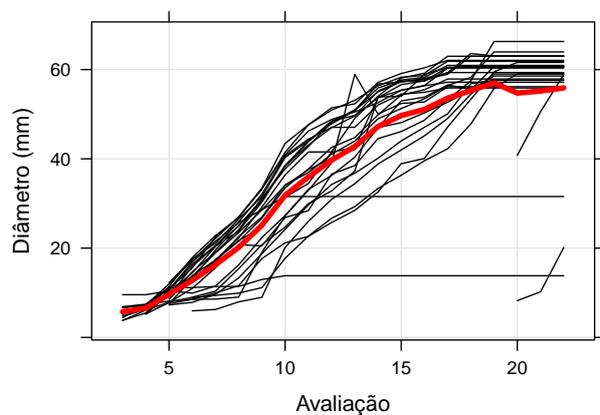
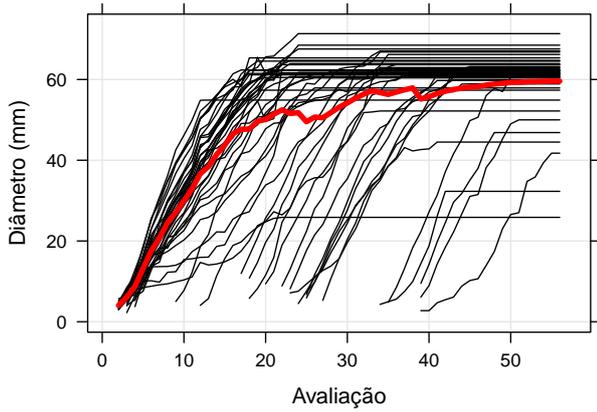


Figura 5.1: Dispersão dos diâmetros das lesões em frutos de maçã contra as avaliações para o experimento envolvendo a inoculação em disco e a cultivar Eva, com diâmetros médios em vermelho

Disco – Gala: Todos os frutos



Disco – Gala: Frutos com ferimento

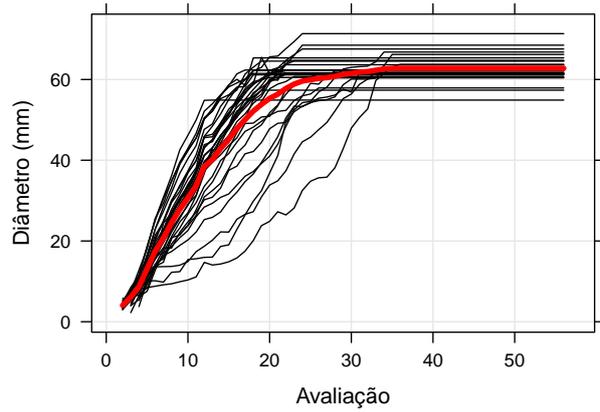
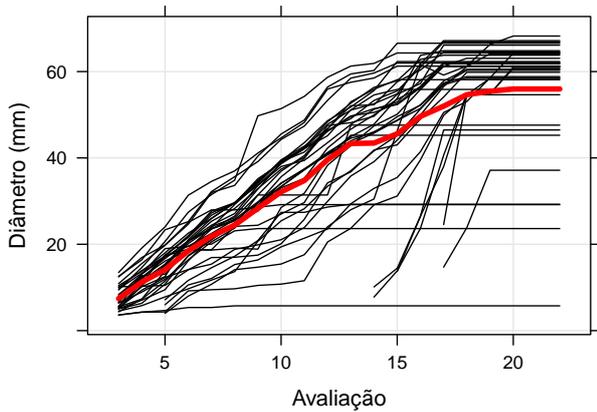


Figura 5.2: Dispersão dos diâmetros das lesões em frutos de maçã contra as avaliações para o experimento envolvendo a inoculação em disco e a cultivar Gala, com diâmetros médios em vermelho

Esporo – Eva: Todos os frutos



Esporo – Eva: Frutos com ferimento

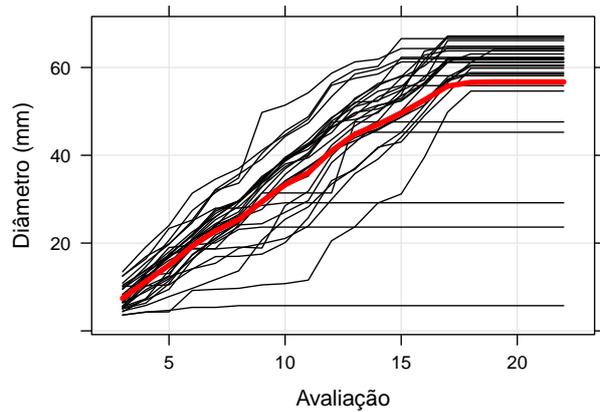
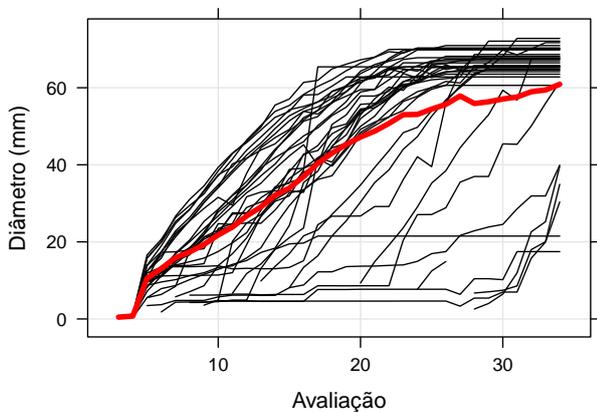


Figura 5.3: Dispersão dos diâmetros das lesões em frutos de maçã contra as avaliações para o experimento envolvendo a inoculação em disco e a cultivar Eva, com diâmetros médios em vermelho

Esporo – Gala: Todos os frutos



Esporo – Gala: Frutos com ferimento

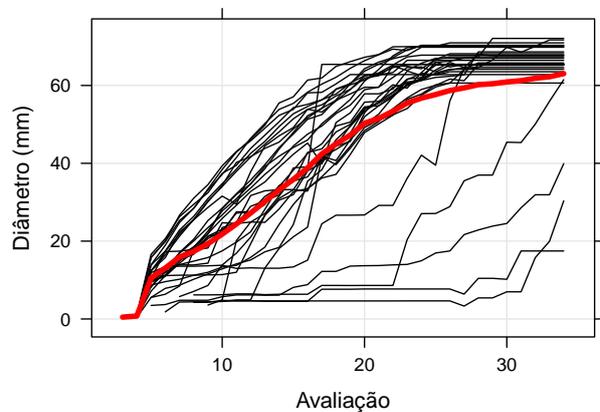


Figura 5.4: Dispersão dos diâmetros das lesões em frutos de maçã contra as avaliações para o experimento envolvendo a inoculação em disco e a cultivar Gala, com diâmetros médios em vermelho

5.2 Inoculação: Disco - Variedade: Eva

5.2.1 Modelos multiestados de sobrevivência markovianos

Quatro modelos paramétricos foram ajustados, dois de tempo homogêneo e dois de tempo não homogêneo, dois para toda a base de dados e dois apenas para os frutos com fermento. O modelo que apresentou o ajuste de maior qualidade foi o modelo de tempo homogêneo.

Modelos com mais de uma covariável não atingiram convergência numérica, e entre os modelos com apenas uma covariável, o fermento (presença ou ausência) foi a única significativa.

Com a figura 5.5 observa-se que dado que se está no estado inicial os frutos com fermento apresentam uma considerável menor probabilidade de sobrevivência (probabilidade de não ir para o estado absorvente, (50, diâmetro máximo observado] mm) ao longo do tempo. Contudo, dado que o fruto transitou do estado inicial a probabilidade de sobrevivência difere pouco.

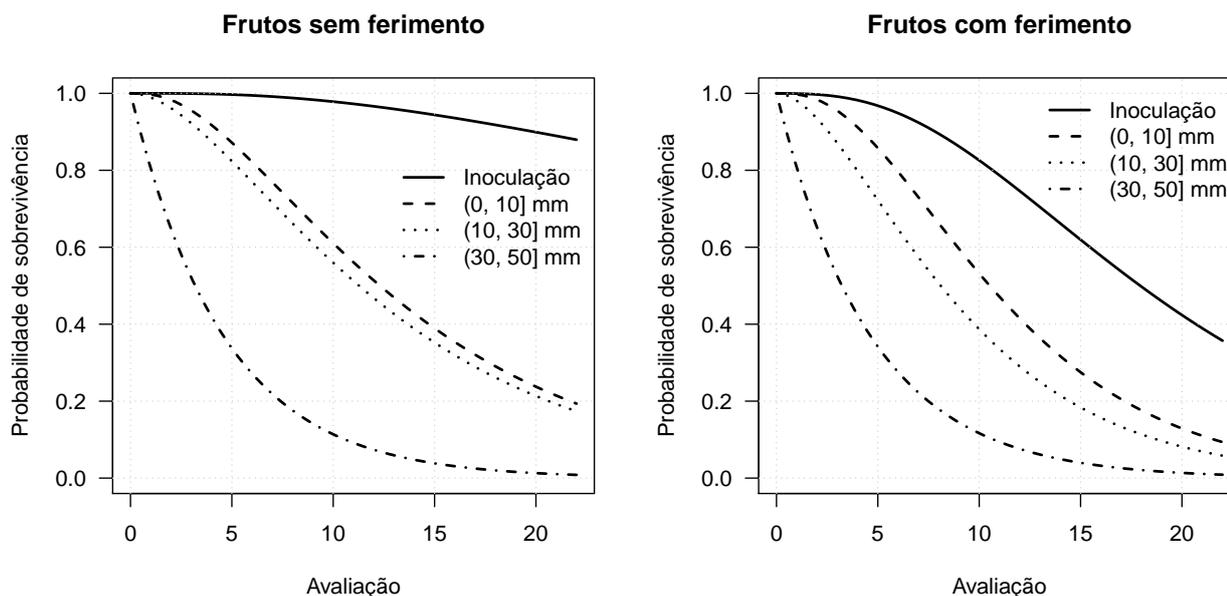


Figura 5.5: Probabilidade de sobrevivência para cada estado transitório dividido pelo nível da covariável presente no modelo paramétrico de tempo homogêneo ajustado aos dados envolvendo a inoculação em disco e a cultivar Eva

Entre os modelos (não e) semiparamétricos ajustados o que se mostrou mais significativo e adequado foi o modelo apenas com a covariável fermento. Com a Figura 5.6 observa-se grandes diferenças nas probabilidades de transição ao longo do tempo entre os frutos sem e com fermento. Fru-

tos sem fermento tendem a permanecer mais tempo no estado inicial, sem desenvolvimento de lesão, e quando transitam suas probabilidades de progressão são baixas durante todo o período de acompanhamento.

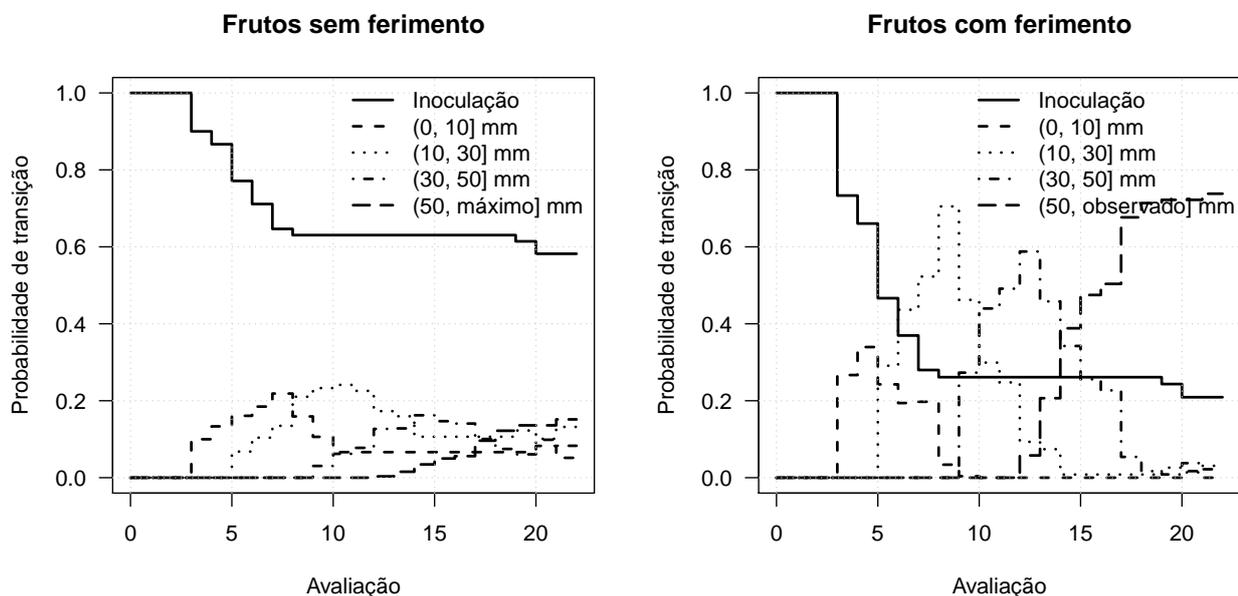


Figura 5.6: Probabilidades de transição para cada estado dividido pelo nível da covariável presente no modelo semiparamétrico ajustado aos dados envolvendo a inoculação em disco e a cultivar Eva

5.2.2 Modelos de regressão não lineares de efeitos mistos

Dos quatro modelos apenas a reparametrização do modelo Mitscherlich se ajustou bem. Na Figura 5.7 observa-se maiores diâmetros nos isolados do gênero de *Colletotrichum acutatum*, contudo, no isolado de *Colletotrichum fructicola* apenas dois frutos apresentaram lesões, e um deles apenas na vigésima avaliação. Na Figura 5.8 foram retirados os frutos sem fermento, ali, conseqüentemente, uma maior precisão foi obtida, além de apresentar maiores diferenças entre os gêneros.

Em ambos modelos apenas a variável gênero foi significativa, entretanto, para os dados completos ela foi significativa nos parâmetros referentes à assíntota e à avaliação correspondente a uma fração meia da assíntota. Nos frutos com fermento ela foi significativa na assíntota e no tempo de aquecimento. No modelo mais preciso (frutos com fermento), uma assíntota de 86 mm foi estimada para os frutos do gênero *acutatum*, e de 74 mm para os frutos do gênero *gloeosporioides*. Em ambos gêneros um fração meia de treze dias foi estimada.

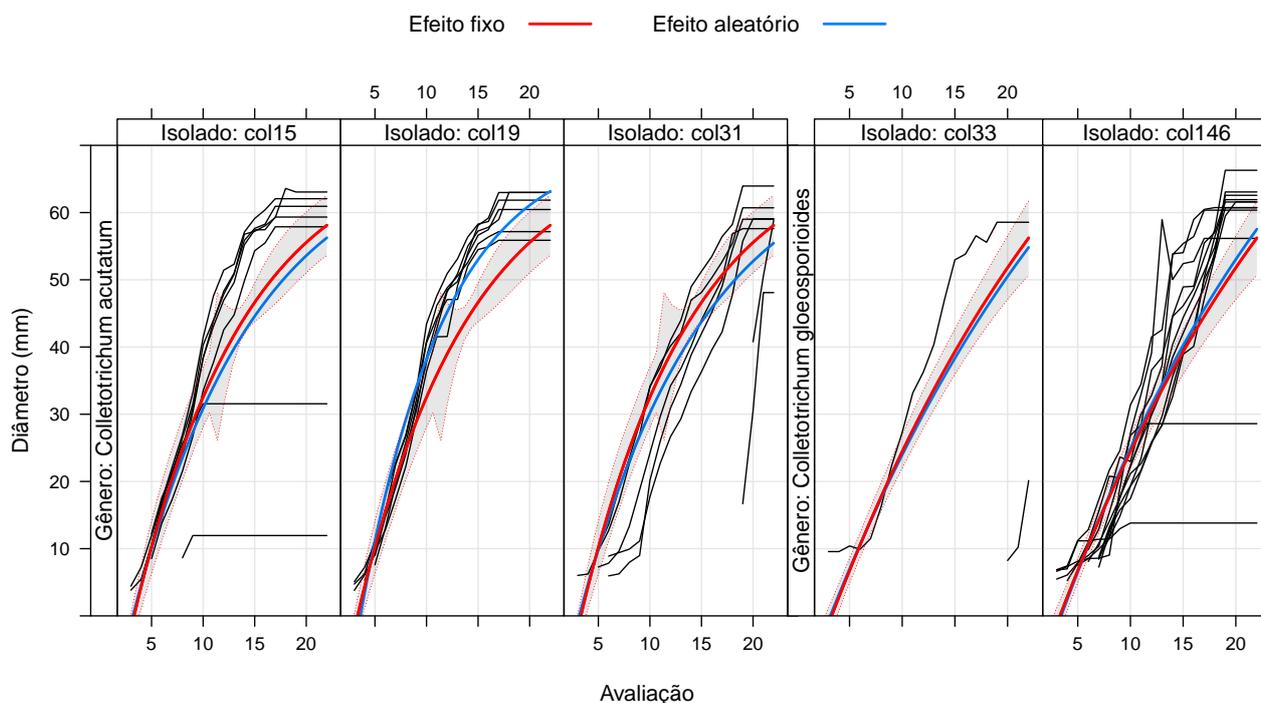


Figura 5.7: Dispersão fragmentada por gênero e isolado, do diâmetro (mm) *vs.* avaliações (dias) com curva estimada para o efeito fixo e para o efeito aleatório com banda de predição de 95 por cento de confiança para o efeito fixo, para o modelo Mitscherlich ajustado a base de dados completa envolvendo a inoculação em disco e a cultivar Eva

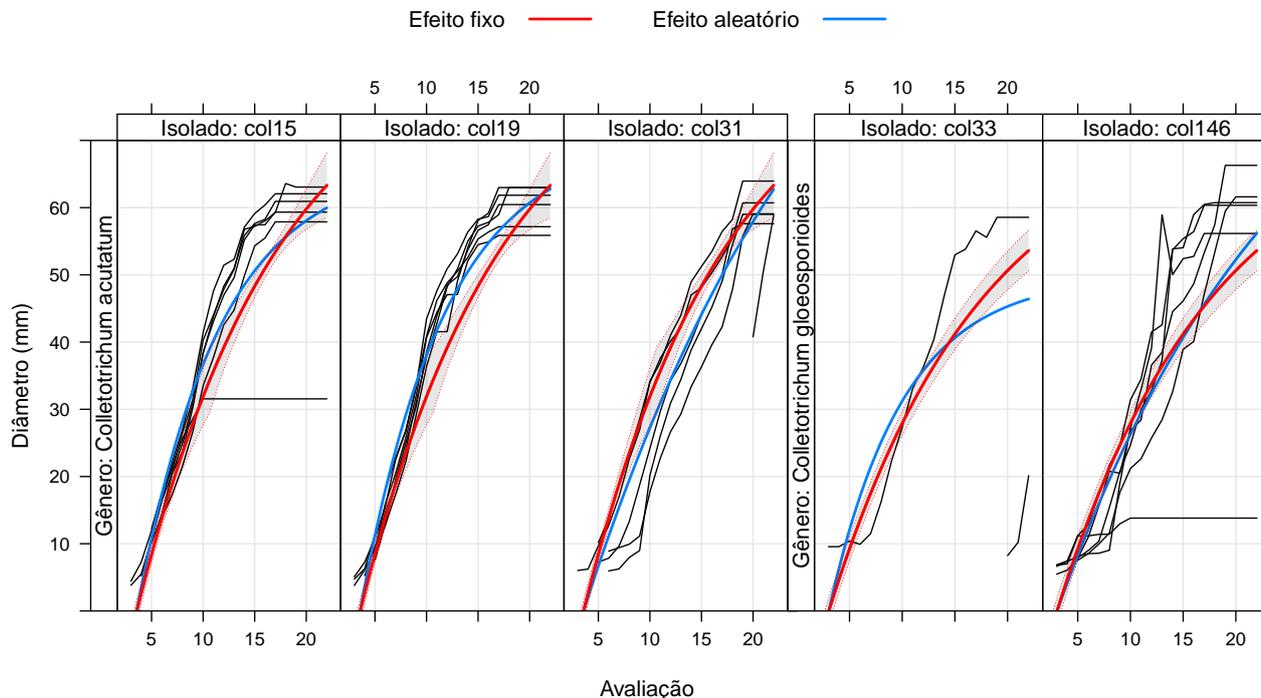


Figura 5.8: Dispersão fragmentada por gênero e isolado, do diâmetro (mm) *vs.* avaliações (dias) com curva estimada para o efeito fixo e para o efeito aleatório com banda de predição de 95 por cento de confiança para o efeito fixo, para o modelo Mitscherlich ajustado a base de dados de frutos com fermento envolvendo a inoculação em disco e a cultivar Eva

5.3 Inoculação: Disco - Variedade: Gala

5.3.1 Modelos multiestados de sobrevivência markovianos

Entre os quatro modelos paramétricos ajustados o de maior qualidade foi o modelo de tempo homogêneo ajustado para os frutos com ferimento. As covariáveis gênero e espécie não foram significativas. Com o gráfico esquerdo da Figura 5.9 observa-se a probabilidade de sobrevivência (probabilidade de não ir para o estado absorvente, (50, diâmetro máximo observado] mm) ao longo do tempo.

Entre os modelos (não e) semiparamétricos ajustados o que se mostrou mais significativo e adequado foi o modelo apenas com a covariável ferimento, ajustado para todos os frutos. Por problemas numéricos só foi possível obter as probabilidades de transição ao longo do tempo para os frutos sem ferimento (gráfico da direita da Figura 5.9).

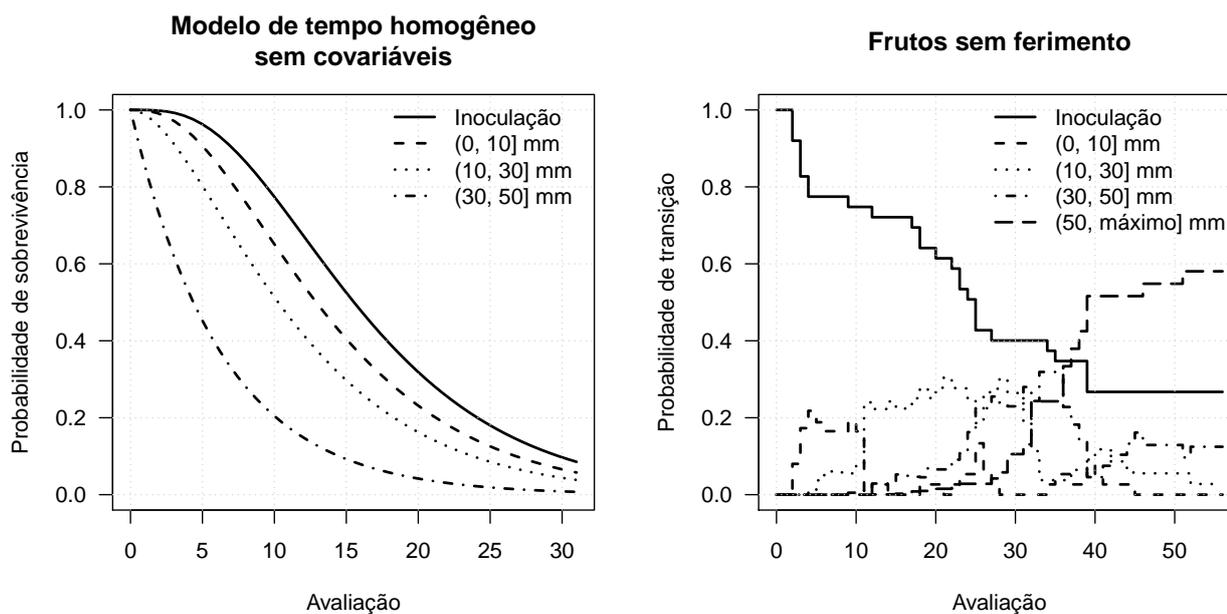


Figura 5.9: Esquerda: Probabilidade de sobrevivência para cada estado transitório no modelo paramétrico de tempo homogêneo ajustado aos frutos com ferimento envolvendo a inoculação em disco e a cultivar Gala; Direita: Probabilidades de transição para cada estado para os frutos sem ferimento do modelo semiparamétrico ajustado aos dados envolvendo a inoculação em disco e a cultivar Gala

5.3.2 Modelos de regressão não lineares de efeitos mistos

Todos os modelos tiveram ajustes satisfatórios, contudo, devido menores variações nos comportamentos, os modelos ajustaram melhor quando foram considerados apenas os frutos com ferimento.

Nas Figuras 5.10, 5.11, 5.12 e 5.13 os ajustes são apresentados.

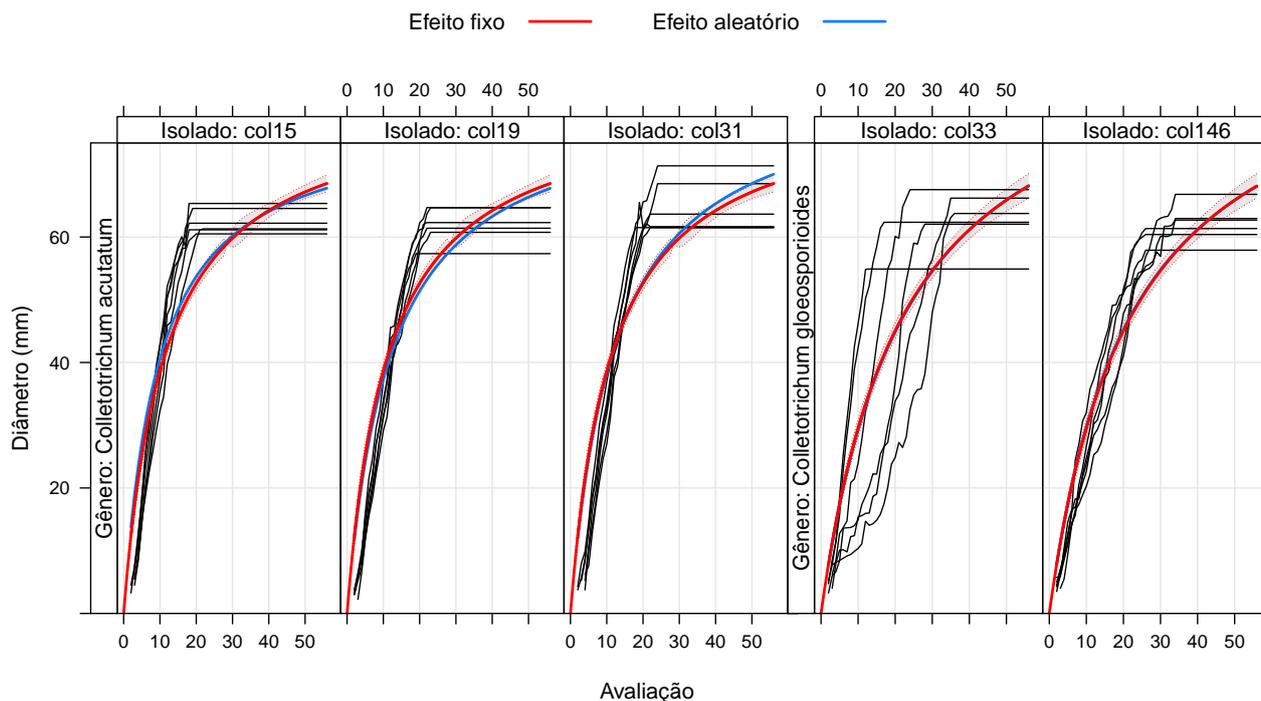


Figura 5.10: Dispersão fragmentada por gênero e isolado, do diâmetro (mm) *vs.* avaliações (dias) com curva estimada para o efeito fixo e para o efeito aleatório com banda de previsão de 95 por cento de confiança para o efeito fixo, para o modelo Michalies-Menten ajustado para os frutos com fermento envolvendo a inoculação em disco e a cultivar Gala

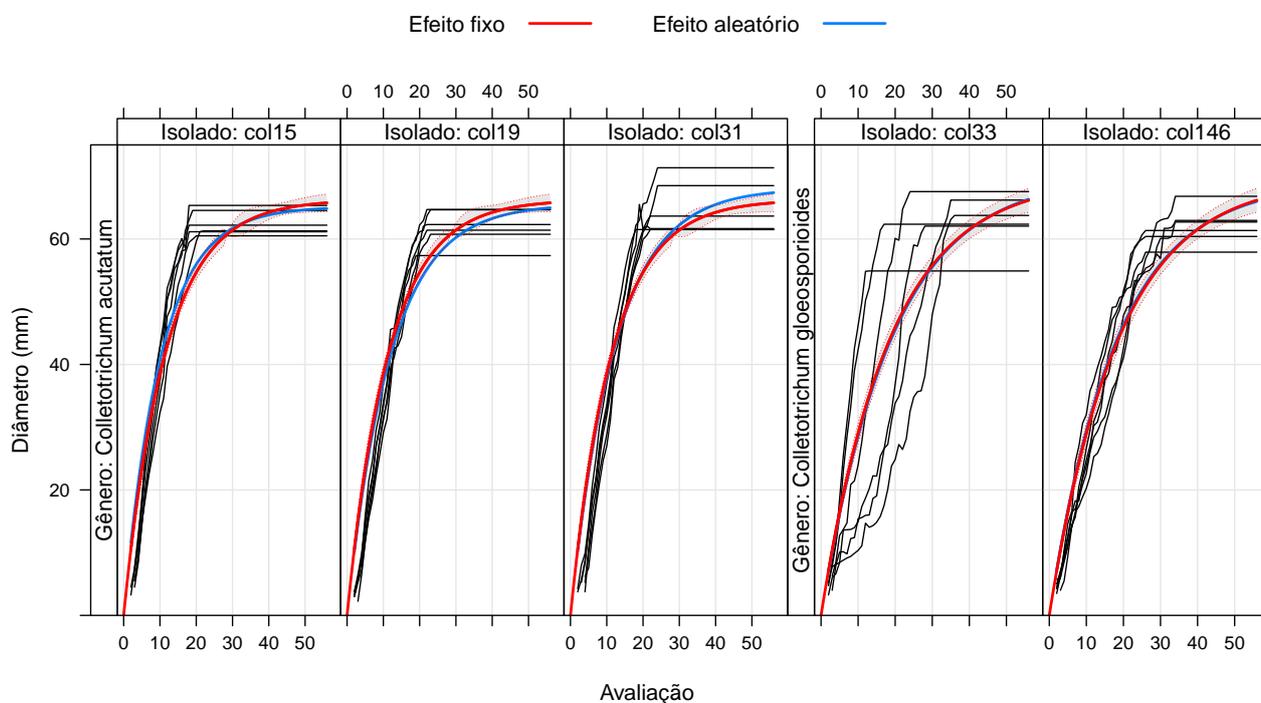


Figura 5.11: Dispersão fragmentada por gênero e isolado, do diâmetro (mm) *vs.* avaliações (dias) com curva estimada para o efeito fixo e para o efeito aleatório com banda de previsão de 95 por cento de confiança para o efeito fixo, para o modelo exponencial assintótico ajustado para os frutos com fermento envolvendo a inoculação em disco e a cultivar Gala

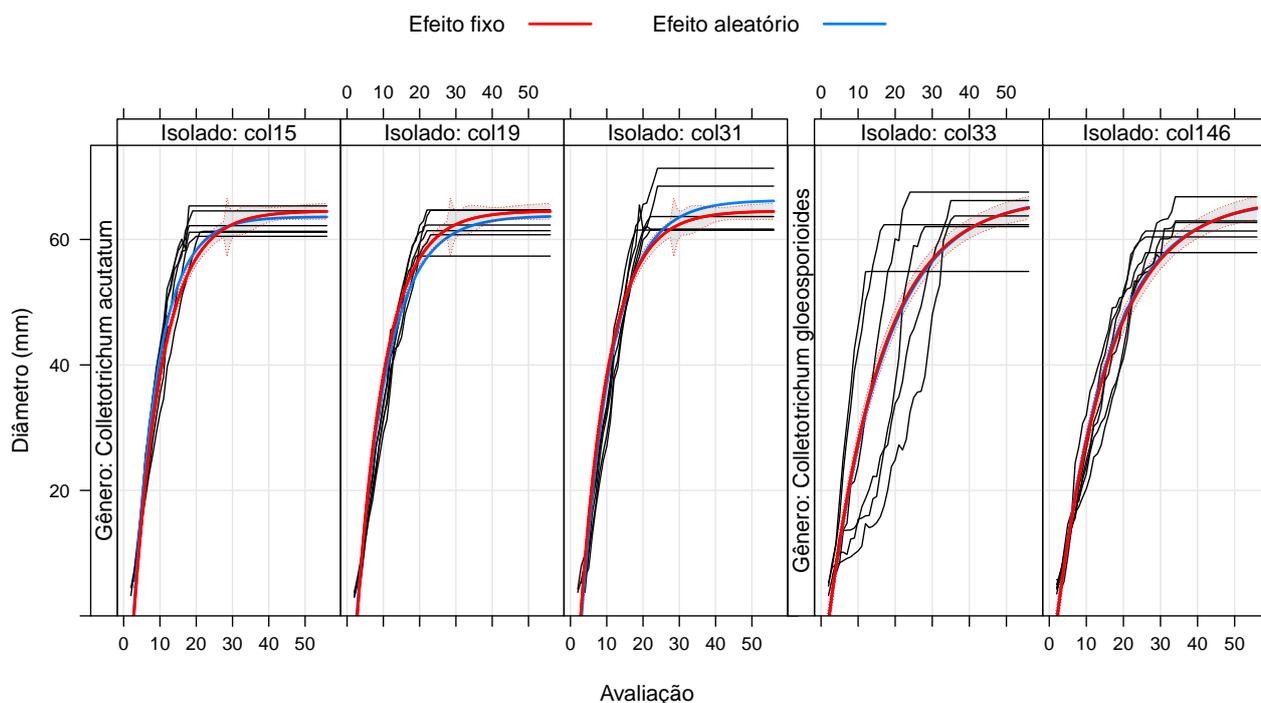


Figura 5.12: Dispersão fragmentada por gênero e isolado, do diâmetro (mm) *vs.* avaliações (dias) com curva estimada para o efeito fixo e para o efeito aleatório com banda de previsão de 95 por cento de confiança para o efeito fixo, para o modelo Mitscherlich ajustado para os frutos com ferimento envolvendo a inoculação em disco e a cultivar Gala

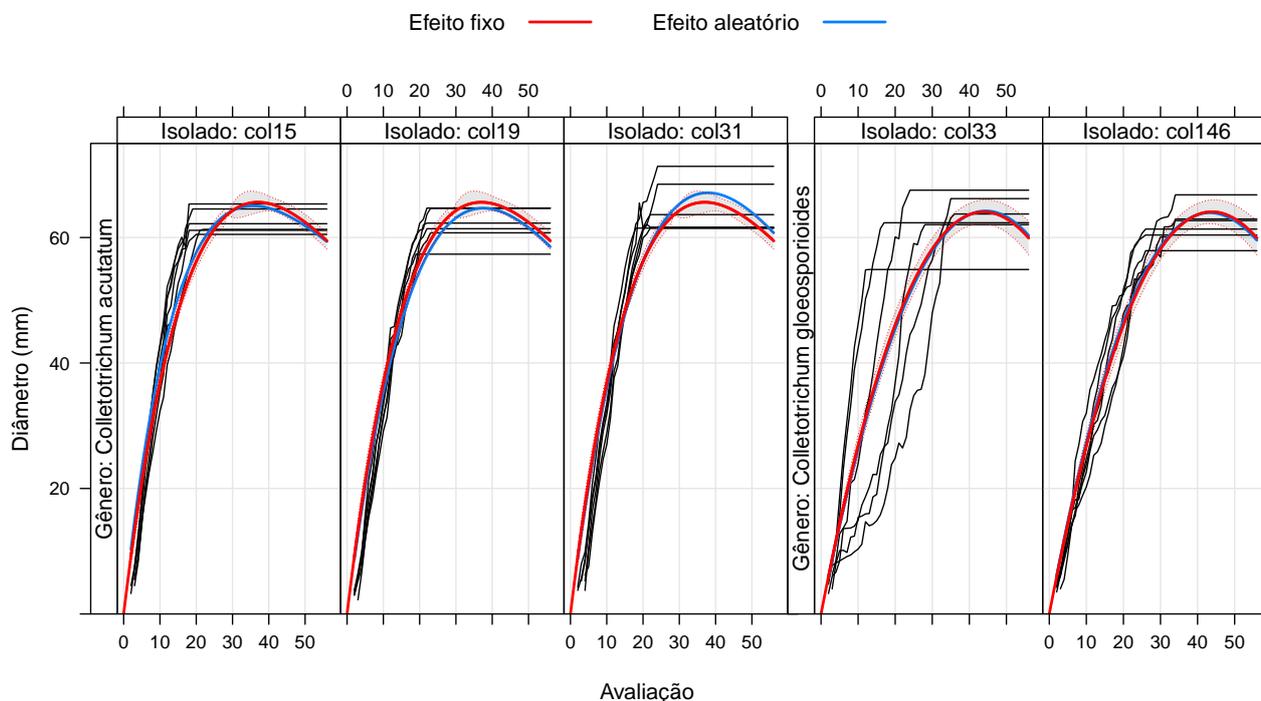


Figura 5.13: Dispersão fragmentada por gênero e isolado, do diâmetro (mm) *vs.* avaliações (dias) com curva estimada para o efeito fixo e para o efeito aleatório com banda de previsão de 95 por cento de confiança para o efeito fixo, para o modelo Bleasdale-Nelder ajustado para os frutos com ferimento envolvendo a inoculação em disco e a cultivar Gala

Com exceção do modelo de Bleasdale-Nelder os resultados foram muito similares, visualmente falando. Diferenças entre as espécies se mostraram pequenas.

O diâmetro máximo estimado entre os modelos para o gênero *acutatum* variou de 64 à 83 mm, e para o gênero *gloeosporioides* de 64 à 95 mm. Já o tempo de fração meia variou de 8 até 11 dias no gênero *acutatum*, e de 13 até 22 dias no gênero *gloeosporioides*.

5.4 Inoculação: Esporo - Variedade: Eva

5.4.1 Modelos multiestados de sobrevivência markovianos

Entre os quatro modelos paramétricos ajustados o de maior qualidade foi o modelo de tempo homogêneo ajustado para os frutos com ferimento. A covariável gênero foi significativa.

Com a figura 5.14 observa-se maiores probabilidades de sobrevivência nos frutos com ferimento, o que é contra intuitivo, entretanto, pouquíssimos frutos sem ferimento apresentaram lesão.

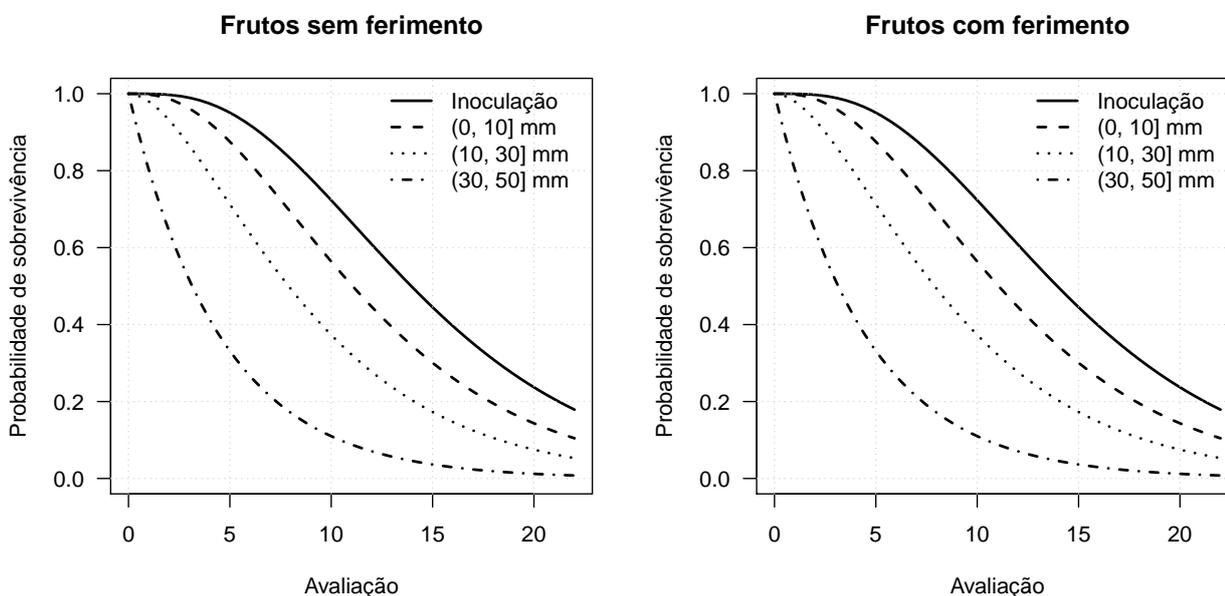


Figura 5.14: Probabilidade de sobrevivência para cada estado transitório dividido pelo nível da covariável presente no modelo paramétrico de tempo homogêneo ajustado aos dados envolvendo a inoculação em esporo e a cultivar Eva

Entre os modelos (não e) semiparamétricos ajustados o que se mostrou mais significativo e adequado foi o modelo apenas com a covariável ferimento, ajustado para todos os frutos. Com a Figura 5.15 observa-se gran-

des diferenças nas probabilidades de transição ao longo do tempo entre os frutos sem e com ferimento. Frutos sem ferimento tendem a permanecer mais tempo no estado inicial, sem desenvolvimento de lesão, e quando transitam suas probabilidades de progressão são baixas durante todo o período de acompanhamento.

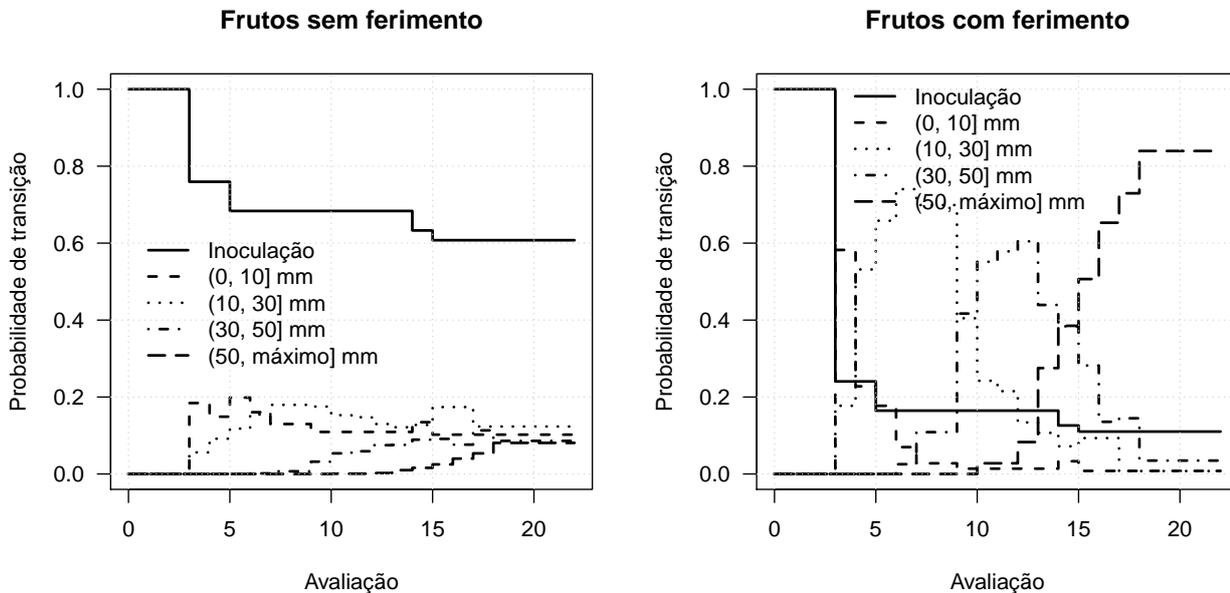


Figura 5.15: Probabilidades de transição para cada estado dividido pelo nível da covariável presente no modelo semiparamétrico ajustado aos dados envolvendo a inoculação em esporo e a cultivar Eva

5.4.2 Modelos de regressão não lineares de efeitos mistos

Apenas os modelos Mitscherlich e Bleasdale-Nelder tiveram resultados satisfatórios, mas apenas para os frutos com ferimento. No modelo Mitscherlich o gênero do *Colletotrichum* foi significativo, e no modelo de Bleasdale-Nelder só foi possível obter um ajuste com o modelo sem covariáveis.

Nas Figuras 5.16 e 5.17 os ajustes são apresentados. No modelo de Mitscherlich maiores diâmetros são estimados para os isolados do gênero *acutatum*, e em ambos modelos diferenças visíveis entre os isolados são observadas.

Pelo modelo de Bleasdale-Nelder o diâmetro máximo estimado é de 59 mm. Pelo modelo Mitscherlich é estimado um diâmetro de 80 mm e um tempo de fração média de 11 dias para o gênero *acutatum*, e um diâmetro de 72 mm e um tempo de fração média de 10 dias para o gênero *gloeosporioides*.

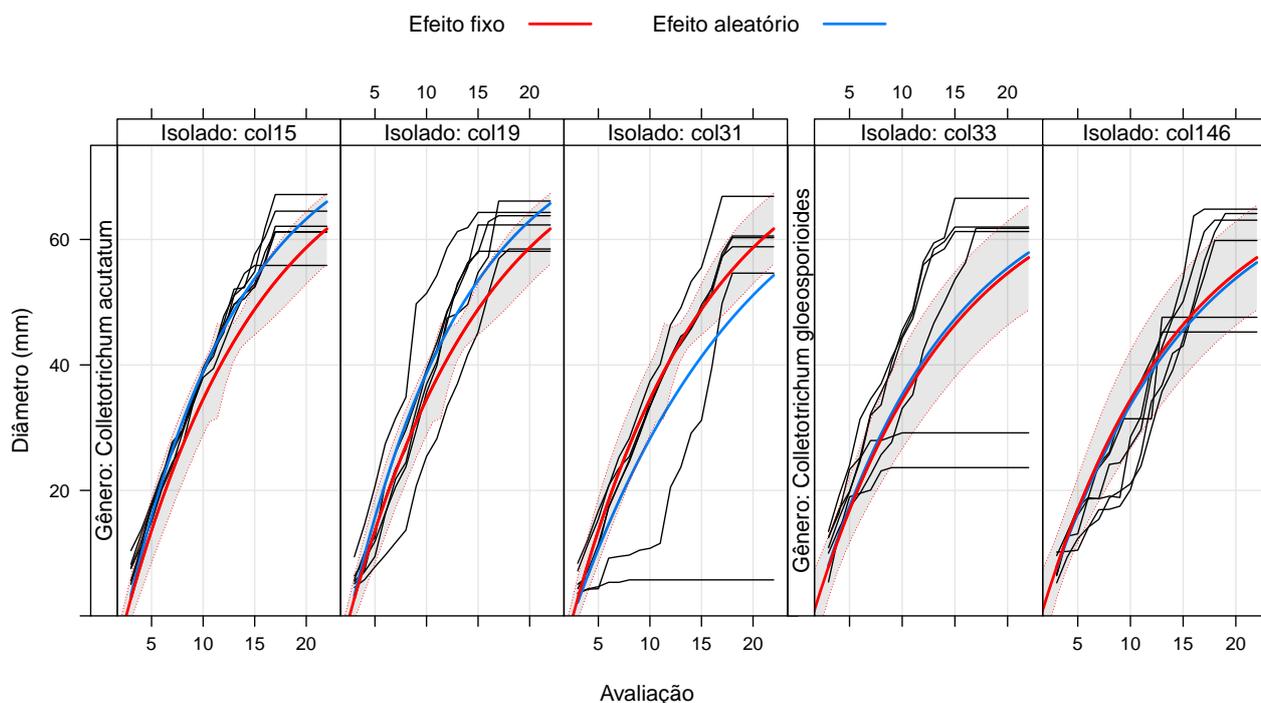


Figura 5.16: Dispersão fragmentada por gênero e isolado, do diâmetro (mm) *vs.* avaliações (dias) com curva estimada para o efeito fixo e para o efeito aleatório com banda de predição de 95 por cento de confiança para o efeito fixo, para o modelo Mitscherlich ajustado para os frutos com fermento envolvendo a inoculação em esporo e a cultivar Eva

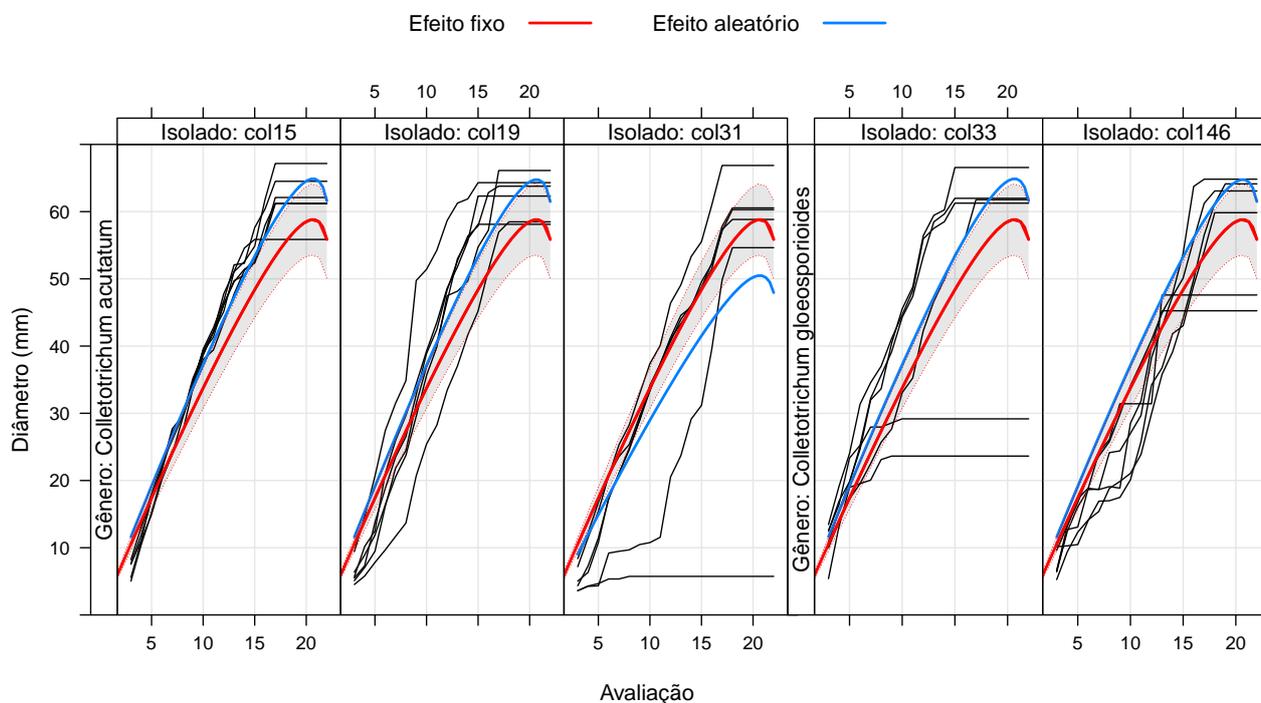


Figura 5.17: Dispersão fragmentada por gênero e isolado, do diâmetro (mm) *vs.* avaliações (dias) com curva estimada para o efeito fixo e para o efeito aleatório com banda de predição de 95 por cento de confiança para o efeito fixo, para o modelo Bleasdale-Nelder ajustado para os frutos com fermento envolvendo a inoculação em esporo e a cultivar Eva

5.5 Inoculação: Esporo - Variedade: Gala

5.5.1 Modelos multiestados de sobrevivência markovianos

Entre os quatro modelos paramétricos ajustados o de maior qualidade foi o modelo de tempo homogêneo ajustado para os frutos com ferimento. Nenhuma covariável foi significativa.

Com o gráfico de baixo da Figura 5.18 observa-se que as probabilidades de sobrevivência decaem bastante ao longo do tempo.

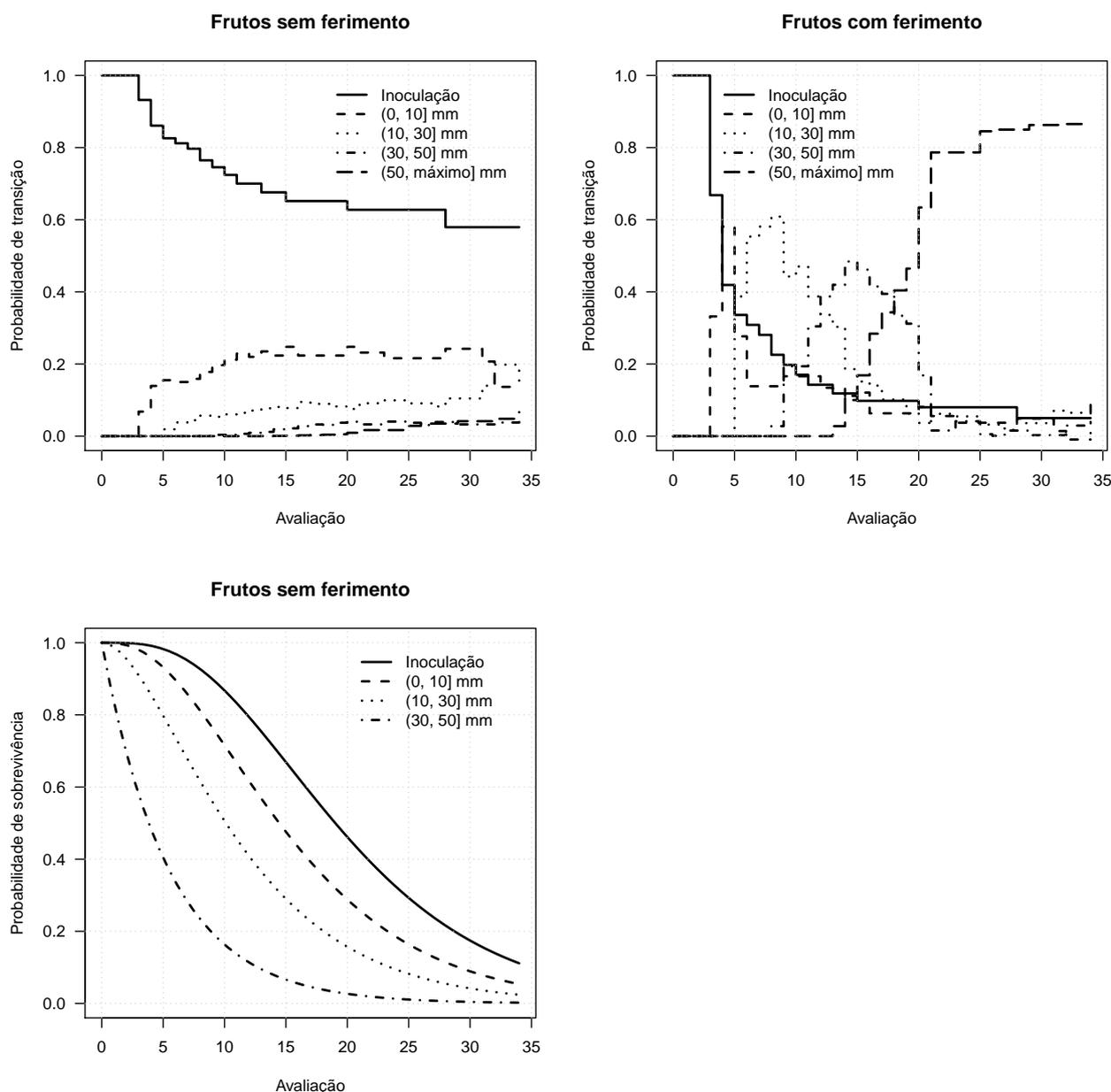


Figura 5.18: Gráficos de cima: Probabilidades de transição para cada estado dividido pelo nível da covariável presente no modelo semiparamétrico ajustado aos dados envolvendo a inoculação em esporo e a cultivar Gala; Gráfico de baixo: Probabilidade de sobrevivência para cada estado transitório presente no modelo paramétrico de tempo homogêneo ajustado aos dados envolvendo a inoculação em esporo e a cultivar Gala

Entre os modelos (não e) semiparamétricos ajustados o que se mostrou mais significativo e adequado foi o modelo apenas com a covariável ferimento, ajustado para todos os frutos.

Com os gráficos de cima da Figura 5.18 observa-se grandes diferenças nas probabilidades de transição ao longo do tempo entre os frutos sem e com ferimento. Frutos sem ferimento tendem a permanecer muito mais tempo no estado inicial, e quando transitam suas probabilidades de progressão são baixas durante todo o período de acompanhamento. Enquanto que nos frutos com ferimento a probabilidade de sobrevivência chega muito próxima de zero ao longo do tempo.

5.5.2 Modelos de regressão não lineares de efeitos mistos

Dos quatro modelos apenas a reparametrização do modelo Mitscherlich se ajustou bem, tanto para a base de dados completa quanto para apenas os frutos com ferimento.

Na Figura 5.19 observa-se maiores diâmetros nos isolados de *Colletotrichum acutatum*. Na Figura 5.20 foram retirados os frutos sem ferimento, e uma menor precisão na banda de precisão foi observada, talvez devido o menor tamanho da amostra, contudo, maiores diferenças entre os gêneros ainda são observadas.

Em ambos modelos apenas a variável gênero foi significativa, além de ter sido significativa apenas nos parâmetros referentes a assíntota e a avaliação correspondente a uma fração meia da assíntota.

No modelo para a base de dados completa foi estimada uma assíntota de 72 mm e um tempo de fração meia de 12 dias nos frutos do gênero *acutatum*, e de 104 mm e 30 dias para os frutos do gênero *gloeosporioides*.

No modelo para os frutos com ferimento foi estimada uma assíntota de 72 mm e um tempo de fração meia de 14 dias nos frutos do gênero *acutatum*, e de 104 mm e 30 dias para os frutos do gênero *gloeosporioides*.

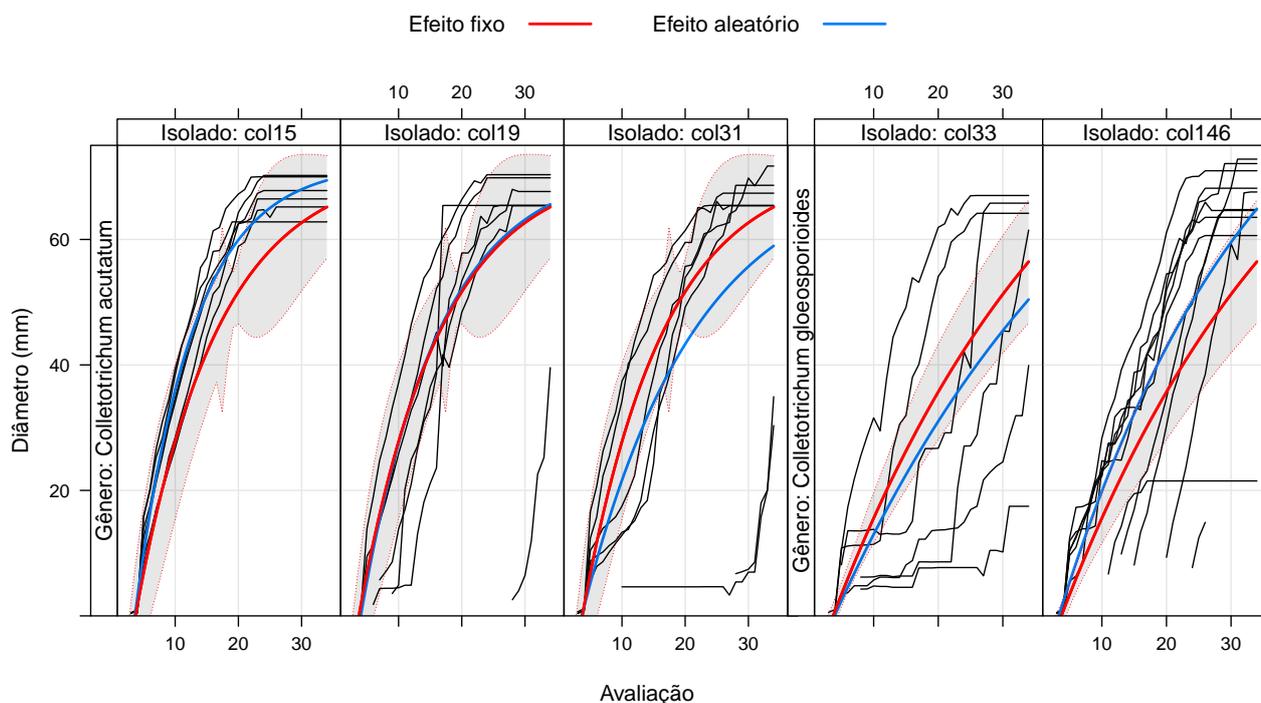


Figura 5.19: Dispersão fragmentada por gênero e isolado, do diâmetro (mm) *vs.* avaliações (dias) com curva estimada para o efeito fixo e para o efeito aleatório com banda de previsão de 95 por cento de confiança para o efeito fixo, para o modelo Mitscherlich ajustado a base de dados completa envolvendo a inoculação em esporo e a cultivar Gala

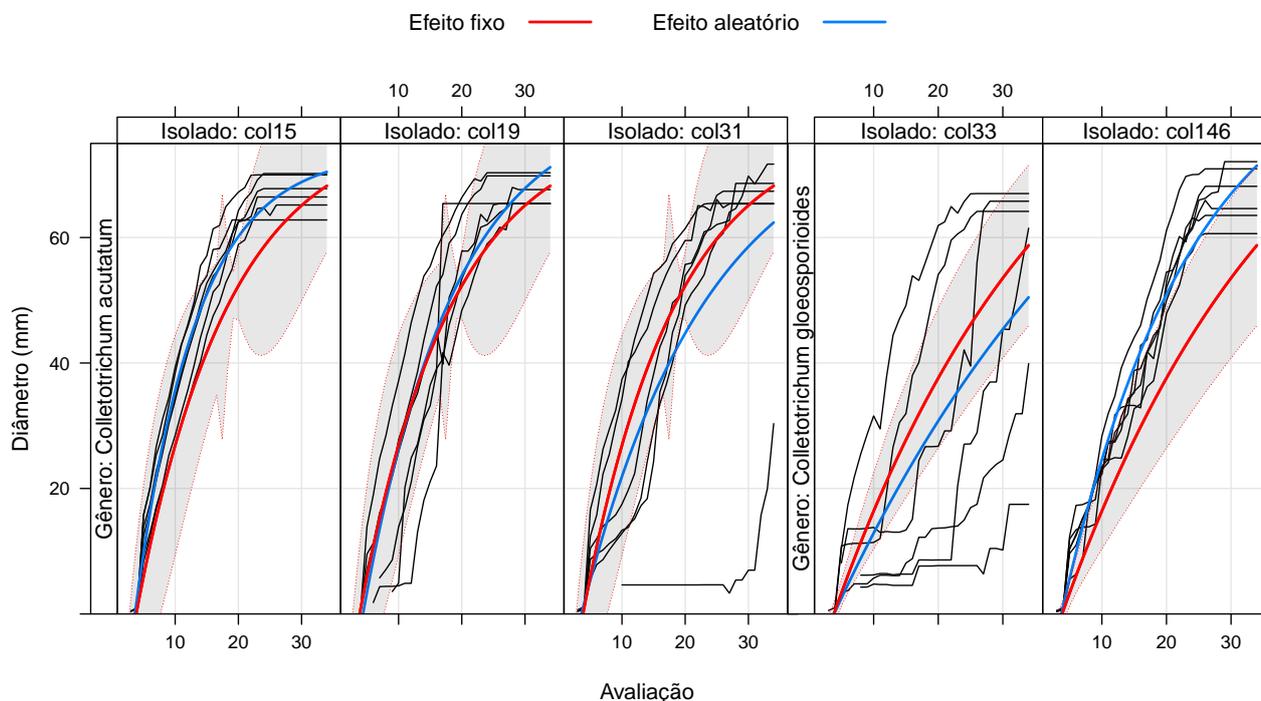


Figura 5.20: Dispersão fragmentada por gênero e isolado, do diâmetro (mm) *vs.* avaliações (dias) com curva estimada para o efeito fixo e para o efeito aleatório com banda de previsão de 95 por cento de confiança para o efeito fixo, para o modelo Mitscherlich ajustado a base de dados de frutos com ferimento envolvendo a inoculação em esporo e a cultivar Gala

Considerações finais

Entre as diferentes abordagens de modelos multiestados markovianos aqui utilizados, em todos os experimentos melhores ajustes foram obtidos com os modelos (não e) semiparamétricos (Putter et al., 2007; de Wreede et al., 2010, 2011), que por não assumirem distribuição de probabilidade são mais flexíveis. Na implementação existente no software R (R Core Team, 2016) do modelo paramétrico (Jackson, 2011), é assumida uma distribuição exponencial para os tempos de permanência, e a não adequação dessa suposição pode ser o principal motivo para esses ajustes não tão bons.

Devido a grande heterogeneidade de comportamentos dos frutos, foi difícil o ajuste dos modelos não lineares mistos, até mesmo quando foram considerados apenas os frutos com ferimento. De maneira geral, o modelo não linear que apresentou os melhores ajustes foi o modelo Mitscherlich.

Os modelos de sobrevivência e os modelos de regressão não linear mistos não são comparáveis, já que o modelo de sobrevivência modela o tempo até a ocorrência de um evento, neste caso, a transição de um estado para outro estado, e o modelo de regressão não linear modela o diâmetro da lesão nos frutos. Enquanto o modelo multiestados de sobrevivência fornece inferências no âmbito do tempo médio de permanência em estados e probabilidades de transição, os modelos de regressão não linear utilizados fornecem inferências no âmbito de crescimento máximo da lesão e tempos correspondentes a esse e outros crescimentos desejados.

De maneira geral, foi observado maiores crescimentos tardios de lesão nos frutos de maçã Gala, independente da forma de inoculação, diferenças consideráveis entre frutos com e sem ferimento e maiores crescimentos envolvendo *Colletotrichum* do gênero *acutatum*.

Referências Bibliográficas

- Bleasdale, J. K. A. and Nelder, J. A. (1960). Plant population and crop yield. *Nature*, 188(4747):342–342.
- Bost, S. and Hale, F. (2004). The apple leaf blotches: Necrotic, alternaria, and glomerella. *Fruit Pest News*, 5:1–3.
- Box, G. and Lucas, H. (1959). Design of experiments in non-linear situations. *Biometrika*, 46:77–90.
- Bragança, C. A. D. (2013). *Molecular characterization of Colletotrichum spp. Associated with fruits in Brasil*. PhD thesis, Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Universidade de São Paulo, Piracicaba. Doutorado em Fitopatologia.
- Cox, D. R. (1972). Regression models and life tables. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*, 34(2):187–220.
- da S. Boneti, J. I. and Katsurayama, Y. (1998). *Doenças da Macieira*. BASF, São Paulo.
- Damgaard, C. and Borksted, B. (2004). Transgenic insect resistant arabidopsis may show chaotic population dynamic. *Ecological Complexity*, 1(3):261–265.
- de Wreede, L. C., Fiocco, M., and Putter, H. (2010). The *mstate* package for estimation and prediction in non- and semi-parametric multi-state and competing risks models. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, (99):261–274.

- de Wreede, L. C., Fiocco, M., and Putter, H. (2011). *mstate*: An r package for the analysis of competing risks and multi-state models. *Journal of Statistical Software*, 38(7):1–30. <http://www.jstatsoft.org/v38/i07/>.
- Freeman, S., Katan, T., and Shabi, E. (1998). Characterization of colletotrichum species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease*, 82(6):596–605.
- González, E. and Sutton, T. B. (1999). First report of glomerella leaf spot (*Glomerella cingulata*) of apple in the unites states. *Plant Disease*, 83(11):1074.
- Greenland, S. (2000). Principles of multilevel modelling. *International Journal of Epidemiology, Oxford*, 29(1):158–167.
- IBGE (2012). *Levantamento sistemático da produção agrícola*. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro. v. 25, n. 2, p. 1-88.
- Jackson, C. H. (2011). Multi-state models for panel data: The *msm* package for R. *Journal of Statistical Software*, 38(8):1–29. <http://www.jstatsoft.org/v38/i08/>.
- Junior, R. P. L., Tsuneta, M., and Kishino, A. Y. (1988). *Ocorrência de mancha foliar de Glomerella em macieira no Estado do Paraná*. Iapar - Instituto Agrônômico do Paraná, Londrina.
- Kaplan, E. L. and Meier, P. (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53(282):457–481.
- Katsurayama, Y., da S. Boneti, J. I., and Ozawa, T. (2000). Sobrevivência de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da mancha foliar da gala. *Fitopatologia brasileira*, 25(383).
- Michaelis, L. and Menten, M. (1913). Die kinetik der invertinwirkung. *Biochemische zeiturg*, 49:333–369.
- Pinheiro, J. and Bates, D. (2000). *Mixed-effects models in S and S-plus*. Springer, New York, 1 edition.

- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., and R Core Team (2016). *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*. R package version 3.1-128 <http://CRAN.R-project.org/package=nlme>.
- Putter, H., Fiocco, M., and Geskus, R. (2007). Tutorial in biostatistics: Competing risks and multi-state models. *Statistics in Medicine*, (26):2389–2430.
- Quené, H. and Bergh, H. (2004). On multi-level modeling of data from repeated measures designs: a tutorial. *Speech Communication, Amsterdam*, 43(1-2):103–121.
- R Core Team (2016). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Schabenberger, O. and Pierce, F. J. (2002). *Contemporary statistical models for the plant and soil Sciences*. CRC, Boca Raton, 1 edition.
- Stadnik, M. J. (2009). *Manejo integrado de doenças da macieira*. Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Centro de Ciências Agrárias (CAA), Florianópolis.
- Tjorve, E. (2003). Shapes and functions of species-area curves: a review of possible models. *Journal of Biogeography*, 30(6):827–835.
- Watkinson, A. (1980). Density-dependence in single-species populations of plants. *Journal of Theoretical Biology*, 83(2):345–357.
- Zeviani, W. M. (2013). *Parametrizações Interpretáveis em Modelos Não 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 multi-level nonlinear mixed-effects model approach. *Canadian Journal of Forest Research, Ottawa*, 35(1):122–132.

Apreciação do Orientador

7.1 Relatório científico e desempenho no projeto

O Bolsista Henrique Aparecido 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.

7.2 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.

Pretensões futuras do bolsista: Mestrado/Doutorado

Data: Curitiba, 10/08/2016

Bolsista: Henrique Aparecido Laureano

Orientador: Walmes Marques Zeviani