



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 PARCIAL

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 Parcial apresentado à Coordenadoria de Iniciação Científica e Integração Acadêmica da Universidade Federal do Paraná - 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	3
2	Introdução	4
3	Revisão da literatura	5
3.1	Cultura da macieira e Mancha Foliar de <i>Glomerella</i> (MFG)	5
3.2	Modelos multiestados de sobrevivência Markovianos	5
4	Materiais e métodos	7
5	Resultados	9
5.1	Análise descritiva	9
5.2	Inoculação: Disco - Variedade: Eva	11
5.3	Inoculação: Disco - Variedade: Gala	14
5.4	Inoculação: Esporo - Variedade: Eva	17
5.5	Inoculação: Esporo - Variedade: Gala	20
6	Discussão	23
	Referências Bibliográficas	25

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 o objetivo 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, 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 fermento. Para tais verificações foram utilizados modelos multiestados de sobrevivência Markovianos. 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. Um modelo multiestados Markoviano descreve como um indivíduo se move entre uma série de estados, sendo fundamentado na suposição Markoviana de que uma futura transição depende apenas do estado atual. Entre os resultados obtidos têm-se a verificação de baixíssimas ocorrências de lesão em frutos sem fermento, independente da variedade e da forma de inoculação; diferenças nas intensidades de progressão ao longo do tempo nos frutos da variedade de maçã Gala; e diferenças entre os gêneros de *Colletotrichum* apenas na combinação de variedade Eva e inoculação em esporo. Contudo, os tempos de acompanhamento variaram de uma combinação para outra e os modelos em geral não tiveram um ajuste satisfatório, tornando seus resultados não muito confiáveis. Outros modelos ainda serão utilizados.

Palavras-chave: Modelos multiestados de sobrevivência Markovianos, maçã, *Colletotrichum*.

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 consequentemente 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 foram utilizados.

Esses modelos podem ser definidos como uma classe de modelos quantitativos estocásticos utilizados para analisar características e fatores associados ao tempo com que um indivíduo se move entre uma série de estados.

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.

Imagine um indivíduo no estado $S(t)$ no tempo t . O movimento em um espaço discreto de estados $1, \dots, R$ é definido por intensidades de transição $q_{rs}(t, z(t)) : r, s = 1, \dots, R$, podendo depender do tempo t , ou mais genericamente, de um conjunto de variáveis explicativas de nível individual ou tempodependente $z(t)$ (Jackson, 2011). A intensidade representa o risco instantâneo de mover do estado r para o estado $s \neq r$

$$q_{rs}(t, z(t)) = \lim_{\delta t \rightarrow 0} \frac{P(S(t + \delta t) = s | S(t) = r)}{\delta t},$$

em que q_{rs} forma uma matriz Q , de ordem $R \times R$ cujas linhas somam 0, onde as entradas da diagonal são definidas por $q_{rr} = -\sum_{s \neq r} q_{rs}$ e δt indica o período de tempo.

Um modelo Markoviano é geralmente utilizado em dados cujo processo é em tempo contínuo e tempos arbitrários, sendo fundamentada na suposição Markoviana de que uma futura transição depende apenas do estado atual, ou seja, $q_{rs}(t, z(t), F_t)$ é independente de F_t , o histórico de observações F_t do processo até o tempo que precede t (Jackson, 2011).

Na presença de covariáveis de nível individual, o efeito de um vetor de variáveis explicativas z_{ij} na intensidade de transição para o indivíduo i no tempo j é modelado usando intensidades proporcionais, substituindo q_{rs} por

$$q_{rs}(z_{ij}) = q_{rs}^0 \exp(\beta_{rs}^\top z_{ij}),$$

em que q_{rs}^0 denota a intensidade de transição de base e β é o vetor de coeficientes associado ao vetor de covariáveis z .

Esses modelos podem ser de tempo homogêneo ou de tempo nãohomogêneo. Num modelo de tempo homogêneo, q_{rs} é independente de t . Já num modelo de tempo nãohomogêneo, covariáveis constantes sob segmentos mudam em diferentes tempos (t_1, \dots, t_{n_i}) , i.e., podemos modelar o efeito de variáveis tempodependente - incluindo o próprio tempo - nas intensidades de transição, quando consideramos que a matriz Q é constante sob segmentos (Jackson, 2011).

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

Todas a análise estatística foi desenvolvida no ambiente de computação estatística R (R Core Team, 2015), com os modelos sendo ajustados com a biblioteca msm (Jackson, 2011).

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 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 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 multiestados de sobrevivência Markoviano.

Foram considerados quatro estados:

- 1: [0, 10] mm
- 2: (10, 30] mm
- 3: (30, 50] mm
- 4: (50, diâmetro máximo observado] mm

e uma matriz de intensidade de transição progressiva Q , i.e., que não permite transições para trás. Também foi considerado que não podemos pular estados.

$$Q = \begin{bmatrix} -q_{12} & q_{12} & 0 & 0 \\ 0 & -q_{23} & q_{23} & 0 \\ 0 & 0 & -q_{34} & q_{34} \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

os valores iniciais considerados para as transições foi igual a 0.5.

Em todos os experimentos foram ajustados quatro tipos de modelos. Dois de tempo homogêneo e dois de tempo nãohomogêneo, dois com a base de dados completa e dois apenas com os dados correspondentes aos frutos com fermento. Na análise descritiva apresentada na seção Resultados observa-se baixas incidências de MFG nos frutos sem fermento, chegando a ser nula para alguns isolados, logo, foi tomada a decisão de desconsiderar os dados correspondentes a esses frutos em metade dos modelos.

Interações entre a variável indicando a presença e ausência de fermento 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 nãohomogêneos se deu com base no observado nas curvas de sobrevivência empíricas construídas pelo estimador de Kaplan-Meier (Kaplan and Meier, 1958).

Resultados

5.1 Análise descritiva

Em todos os experimentos observa-se baixas frequências (incidência) de lesão nos frutos sem fermento (figuras 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4), chegando a ser inexistente em alguns isolados. No experimento da inoculação em disco e variedade Gala esse comportamento é de menor proporção (Figura 5.2), contudo, nele o período de acompanhamento foi maior (56 dias), mais que o dobro do que nos experimentos envolvendo a variedade Eva (22 dias).

Inoculação: Disco – Variedade: Eva

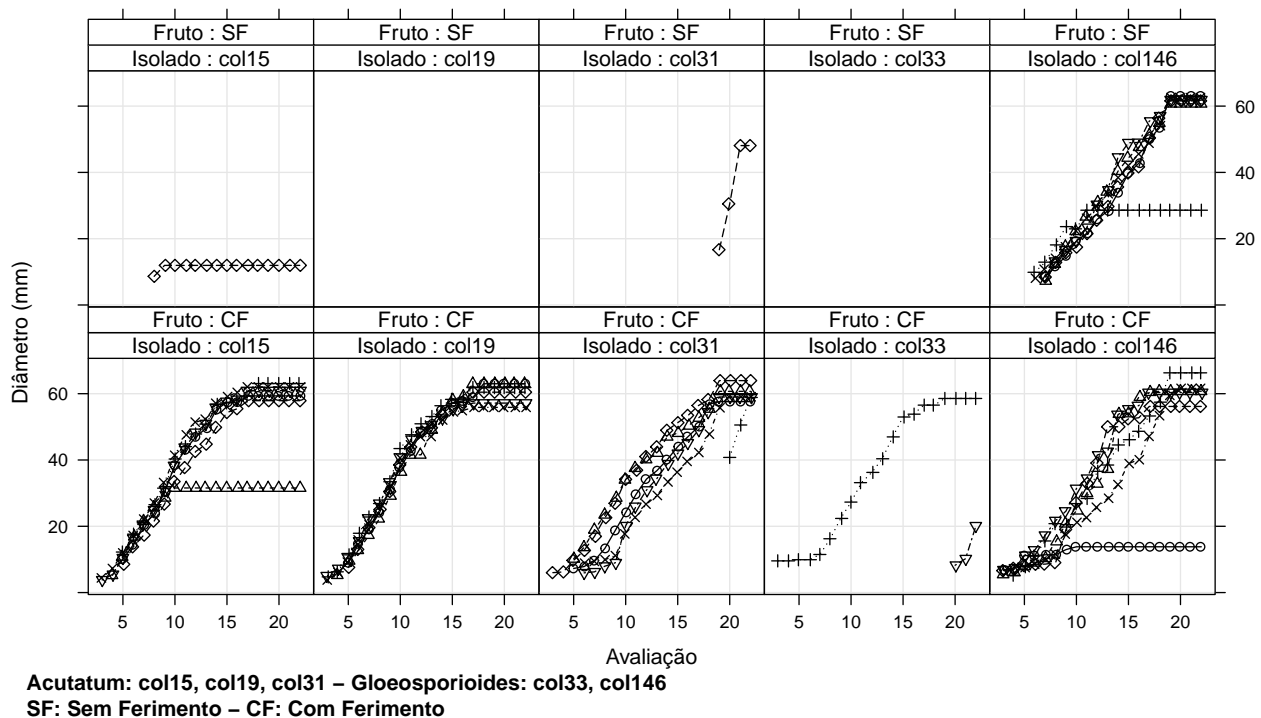


Figura 5.1: Análise descritiva - Dispersão dos diâmetros das lesões em frutos de maçã (6, cada um com um marcador diferente) contra as avaliações para o experimento envolvendo a inoculação em disco e a cultivar Eva, divididos pelos isolados e pela presença e ausência de fermento no fruto

Inoculação: Disco – Variedade: Gala

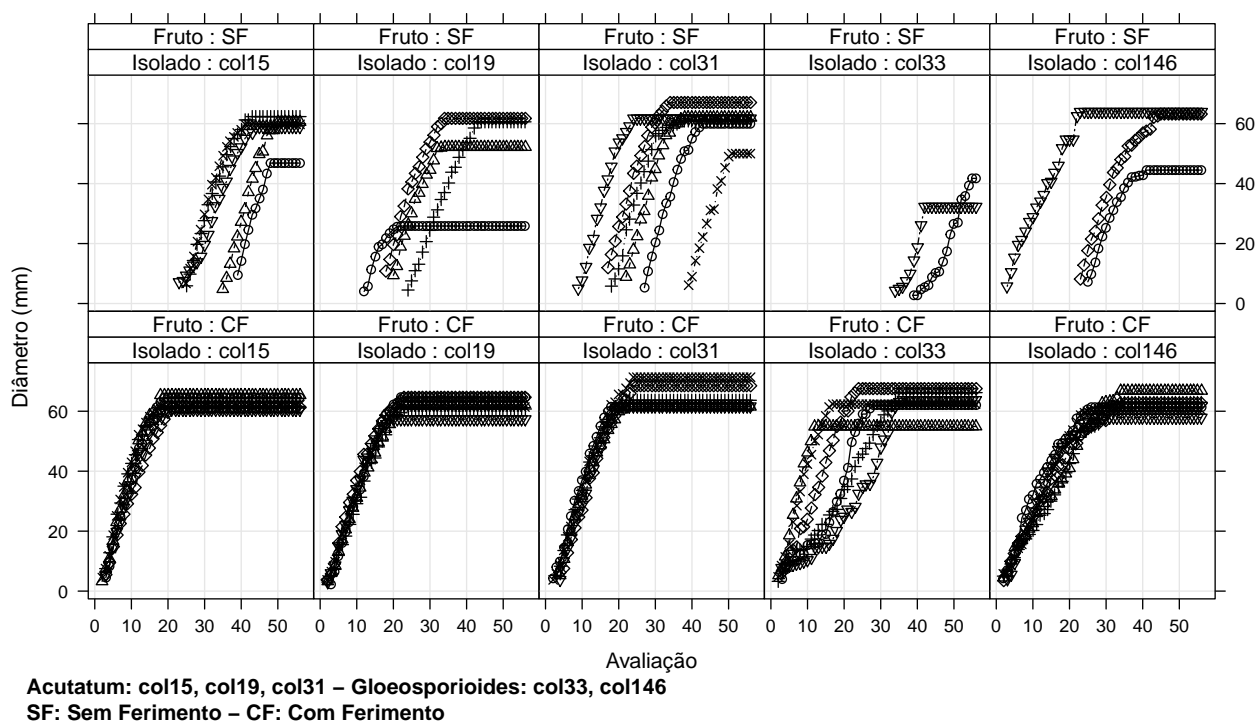


Figura 5.2: Análise descritiva - Dispersão dos diâmetros das lesões em frutos de maçã (6, cada um com um marcador diferente) contra as avaliações para o experimento envolvendo a inoculação em disco e a cultivar Gala, divididos pelos isolados e pela presença e ausência de ferimento no fruto

Inoculação: Esporo – Variedade: Eva

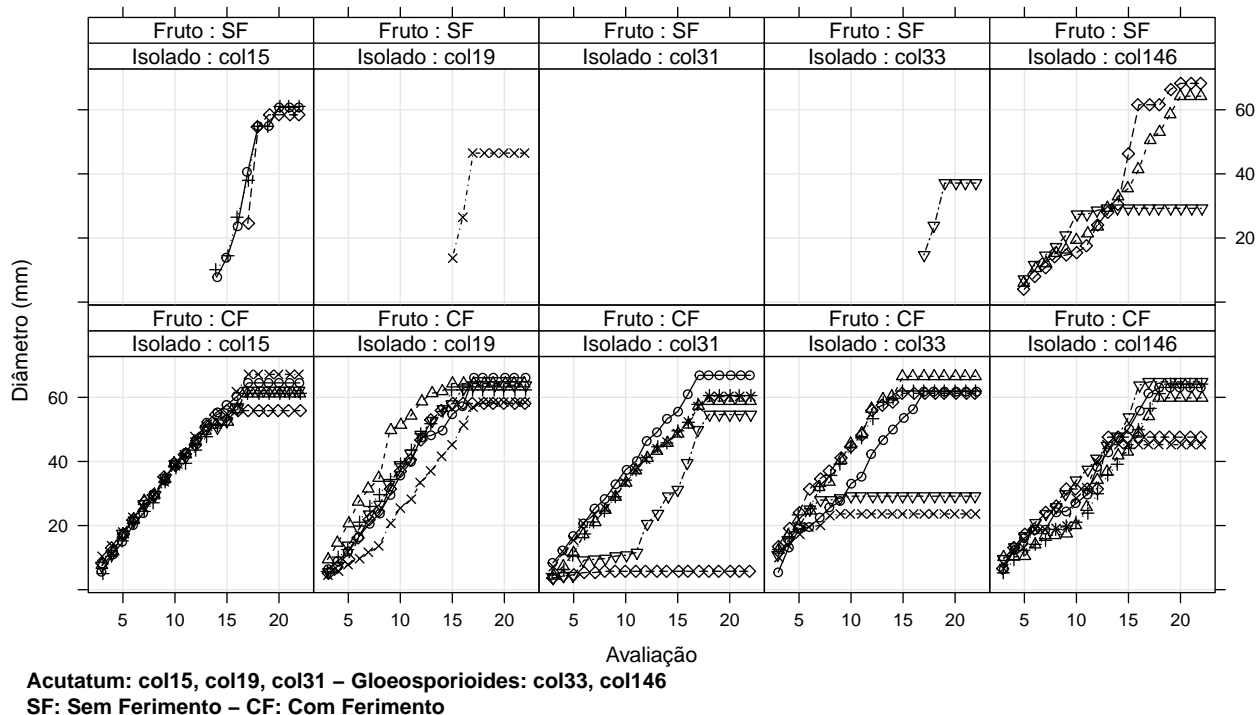


Figura 5.3: Análise descritiva - Dispersão dos diâmetros das lesões em frutos de maçã (6, cada um com um marcador diferente) contra as avaliações para o experimento envolvendo a inoculação em disco e a cultivar Eva, divididos pelos isolados e pela presença e ausência de ferimento no fruto

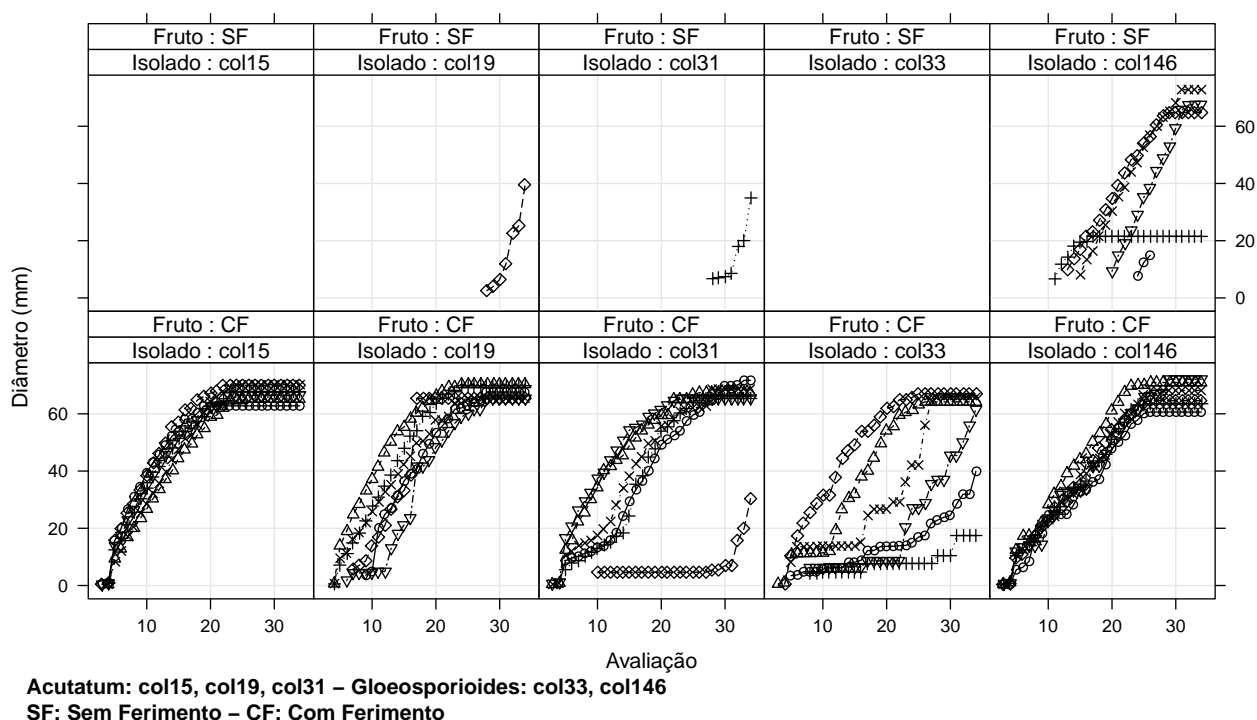


Figura 5.4: Análise descritiva - Dispersão dos diâmetros das lesões em frutos de maçã (6, cada um com um marcador diferente) contra as avaliações para o experimento envolvendo a inoculação em disco e a cultivar Gala, divididos pelos isolados e pela presença e ausência de ferimento no fruto

Outro comportamento que se mostra evidente é que independente do experimento a incidência de MFG se destaca no isolado col146.

Nos frutos com ferimento o isolado col146 (gênero *gloeosporioides*) também se destaca, não obstante a incidência é relativamente semelhante entre os isolados e consequentemente entre os gêneros de *Colletotrichum*.

5.2 Inoculação: Disco - Variedade: Eva

Observando a curva de sobrevivência empírica estimada por Kaplan-Meier, Figura 5.5, foi decidido segmentar a intensidade de transição no 12º dia de avaliação.

Considerando todos os frutos, no modelo homogêneo nenhuma interação ou efeito principal foi estatisticamente significativa, já no modelo nãohomogêneo a variável para ferimento foi significativa.

Quando consideramos apenas os frutos de maçã com ferimento, tanto no modelo homogêneo quanto no nãohomogêneo as interações e os efeitos principais não são significativos.

Comparando as curvas de sobrevivência empíricas e ajustadas (Figura 5.5) observamos que nenhum modelo resultou em bom ajuste, já que as curvas não se sobrepõem por longos períodos.

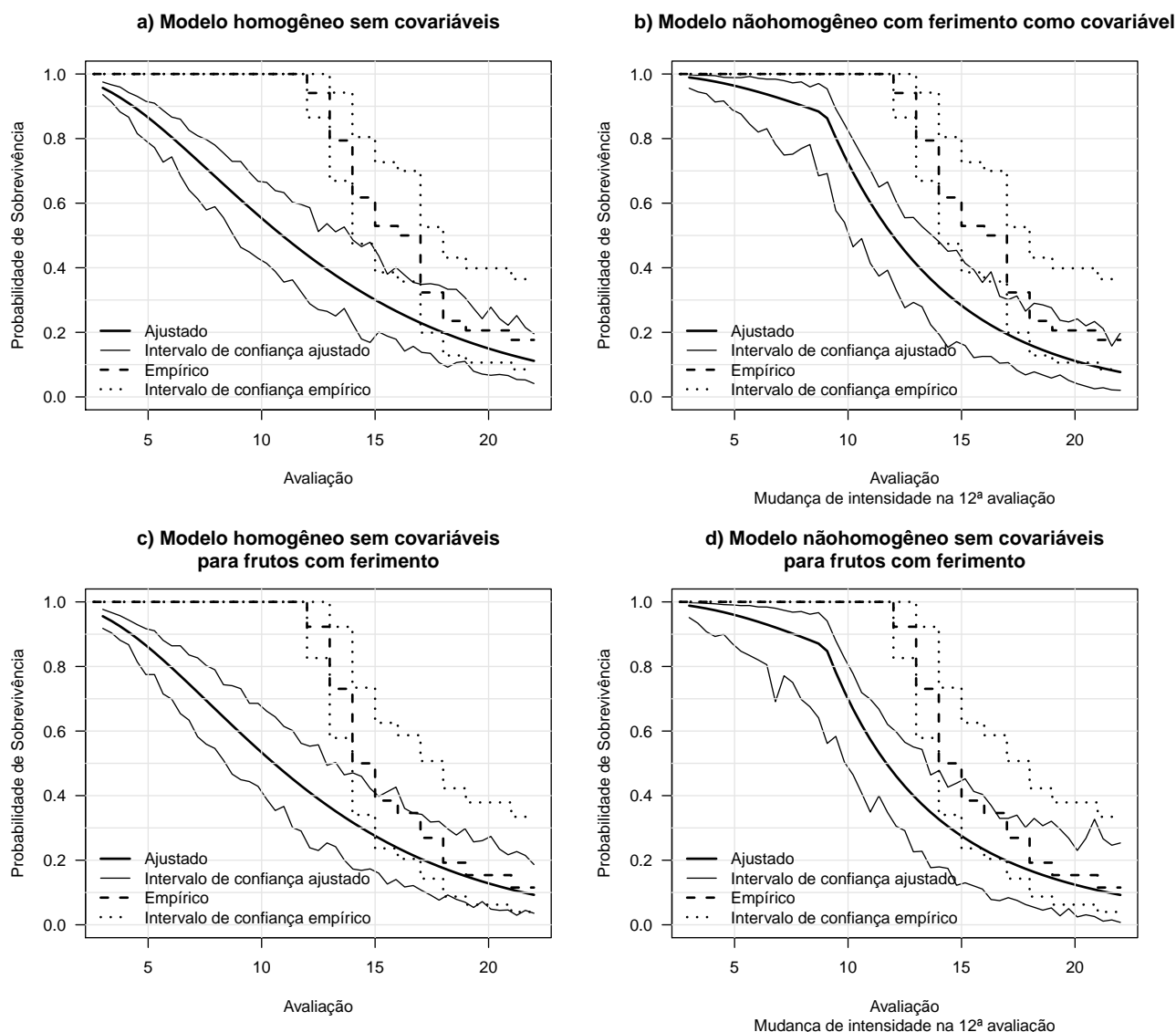


Figura 5.5: Probabilidade de sobrevivência contra as avaliações para cada um dos modelos obtidos. Na linha sólida temos a probabilidade de sobrevivência ajustada pelo modelo e em tracejado a probabilidade de sobrevivência empírica, i.e., a estimativa de Kaplan-Meier. Ambos os intervalos de confiança são de 95 por cento. a) Modelo homogêneo considerando todos os frutos; b) Modelo considerando todos os frutos e com intensidades segmentada-constante (nãohomogêneo) com ponto de quebra no 12º dia de avaliação; c) Modelo homogêneo considerando apenas os frutos com fermento; d) Modelo considerando apenas os frutos com fermento e com intensidades segmentada-constante (nãohomogêneo) com ponto de quebra no 12º dia de avaliação

Nada obstante, dentre esses considera-se que o modelo nãohomogêneo obteve um ajuste um pouco melhor, e algumas medidas obtidas com o mesmo são analisadas.

Na Figura 5.6 é apresentada uma representação das prevalências observada e esperada, pelo modelo, nos estados. Observa-se mais evidências de

um ajuste ruim, já que as curvas divergem consideravelmente. Em determinados períodos o modelo subestima e em outros, superestima.

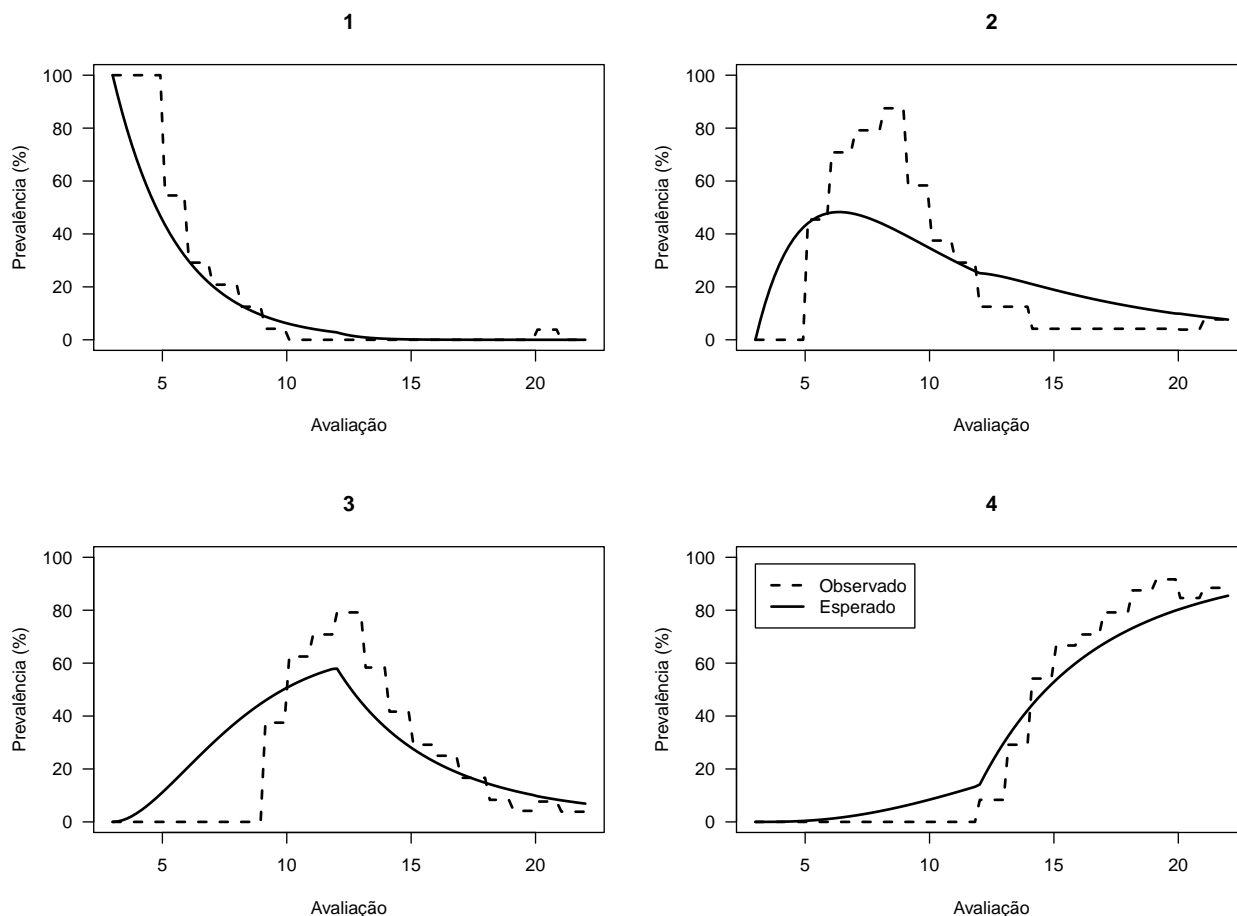


Figura 5.6: Representação gráfica da prevalência percentual observada e esperada contra as avaliações para cada estado do modelo nãohomogêneo apenas para os frutos de maçã com fermento

Probabilidades de transição para o período de 1 dia são apresentadas nas tabelas 5.1 e 5.2. Com exceção da transição $2 \rightarrow 3$, observa-se um aumento em todas as probabilidades de transição após a 12ª avaliação. Com exceção do estado 2, após essa avaliação as probabilidades de permanecer no mesmo estado diminuem.

Tabela 5.1: Matriz de probabilidade de transição para o intervalo de 1 dia com intervalo normal de 95 por cento de confiança do modelo nãohomogêneo sem covariáveis, para os frutos de maçã com fermento e antes da 12ª avaliação

	1	2	3	4
1	0.6729 (0.546, 0.7721)	0.2921 (0.2032, 0.4039)	0.0345 (0.0193, 0.0573)	6e-04 (1e-04, 0.0023)
2	0	0.8053 (0.7201, 0.8674)	0.1898 (0.1276, 0.2739)	0.0048 (0.0011, 0.0183)
3	0	0	0.9524 (0.8223, 0.9893)	0.0476 (0.0107, 0.1777)
4	0	0	0	1

Tabela 5.2: Matriz de probabilidade de transição para o intervalo de 1 dia com intervalo normal de 95 por cento de confiança do modelo nãohomogêneo sem covariáveis, para os frutos de maçã com fermento e após a 12ª avaliação

	1	2	3	4
1	0.3679 (0.0016, 0.8876)	0.5853 (0.1029, 0.9266)	0.0418 (0.0047, 0.2028)	0.005 (5e-04, 0.0294)
2	0	0.8752 (0.5335, 0.9689)	0.1065 (0.0267, 0.3891)	0.0183 (0.0041, 0.0744)
3	0	0	0.7275 (0.6131, 0.8155)	0.2725 (0.1845, 0.3869)
4	0	0	0	1

5.3 Inoculação: Disco - Variedade: Gala

A segmentação da intensidade de transição foi considerada no 12º dia de avaliação, Figura 5.7.

Considerando todos os frutos, no modelo homogêneo nenhuma interação ou efeito principal foi significativo, já no modelo nãohomogêneo as variáveis para fermento e gênero foram significativas.

Considerando apenas os frutos com fermento, tanto no modelo homogêneo quanto no nãohomogêneo as interações e os efeitos principais não são significativos.

Observa-se na Figura 5.7 que os ajustes para os modelos com a base completa ficaram bem ruins. Por falta de convergência numérica não foi possível obter um intervalo de confiança para o modelo nãohomogêneo para os frutos com fermento. O modelo que mostrou um melhor ajuste é o modelo homogêneo para os frutos com fermento.

Mesmo com um ajuste não muito bom analisamos algumas medidas obtidas com esse modelo.

Na Tabela 5.3 temos a matriz de probabilidade de transição estimada para o intervalo de tempo de 1 dia.

Tabela 5.3: Matriz de probabilidade de transição para o intervalo de 1 dia com intervalo normal de 95 por cento de confiança do modelo homogêneo sem covariáveis, para os frutos de maçã com fermento

	1	2	3	4
1	0.6773 (0.5754, 0.7585)	0.2955 (0.2191, 0.3844)	0.0257 (0.0163, 0.0408)	0.0015 (8e-04, 0.0026)
2	0	0.8457 (0.7894, 0.8859)	0.1422 (0.1053, 0.1936)	0.0121 (0.0075, 0.019)
3	0	0	0.8518 (0.7917, 0.893)	0.1482 (0.107, 0.2083)
4	0	0	0	1

Observa-se que as probabilidades estimadas de permanecer nos atuais estados é maior do que as probabilidades de fazer a transição para o estado

seguinte. Também observa-se amplitudes pequenas para os intervalos de confiança, o que é um bom indício de precisão.

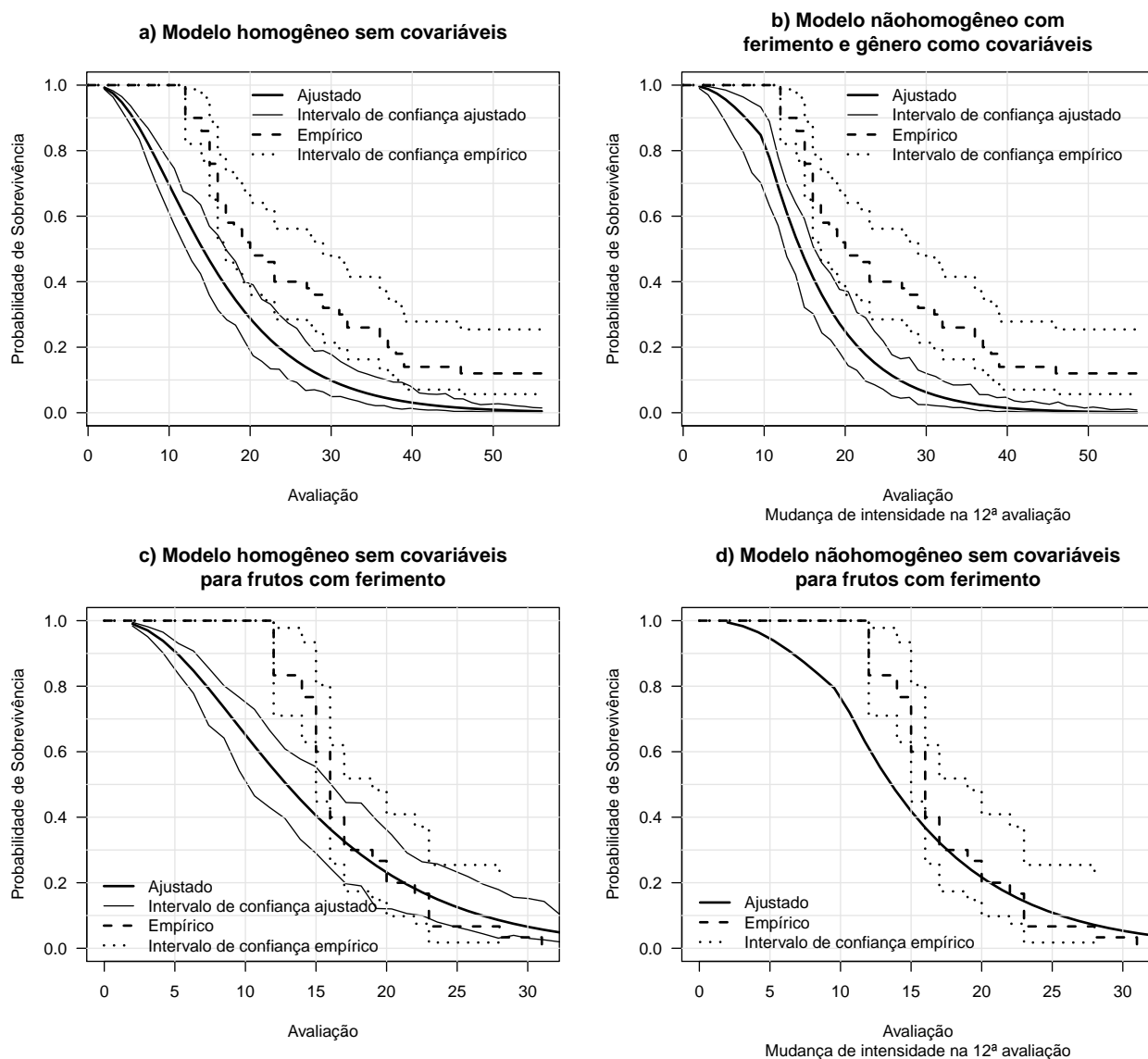


Figura 5.7: Probabilidade de sobrevivência contra as avaliações para cada um dos modelos obtidos. Na linha sólida temos a probabilidade de sobrevivência ajustada pelo modelo e em tracejado a probabilidade de sobrevivência empírica, i.e., a estimativa de Kaplan-Meier. Ambos os intervalos de confiança são de 95 por cento. a) Modelo homogêneo considerando todos os frutos; b) Modelo considerando todos os frutos e com intensidades segmentada-constante (nãohomogêneo) com ponto de quebra no 12º dia de avaliação; c) Modelo homogêneo considerando apenas os frutos com ferimento; d) Modelo considerando apenas os frutos com ferimento e com intensidades segmentada-constante (nãohomogêneo) com ponto de quebra no 12º dia de avaliação

Em modelos homogêneos somos capazes de obter os tempos médios de permanência nos estados transitórios (transitórios), 1, 2 e 3. Esses tempos são apresentados na Tabela 5.4 junto de seus respectivos erros padrão e intervalos de confiança.

Se espera permanecer no estado 1 (lesões de 0 até 10 mm) por 2 dias e meio, com seu intervalo de confiança variando de 1 dia e meio até 3 dias e

meio, aproximadamente. No estado 2 (lesões de 10 até 30 mm) se espera permanecer por 6 dias, e no estado 3 (lesões de 30 até 50 mm) também.

Tabela 5.4: Estimativas dos tempos médios de permanência dos estados transientes com erro padrão e intervalo normal de 95 por cento de confiança do modelo homogêneo sem covariáveis, para os frutos de maçã com fermento

	Estimativa	Erro padrão	Limite inferior	Limite superior
1	2.5667	0.4650	1.7386	3.6137
2	5.9666	1.1154	4.1948	8.3861
3	6.2333	1.1509	4.2747	8.9706

As prevalências observada e esperada tem sua representação gráfica na figura 5.8.

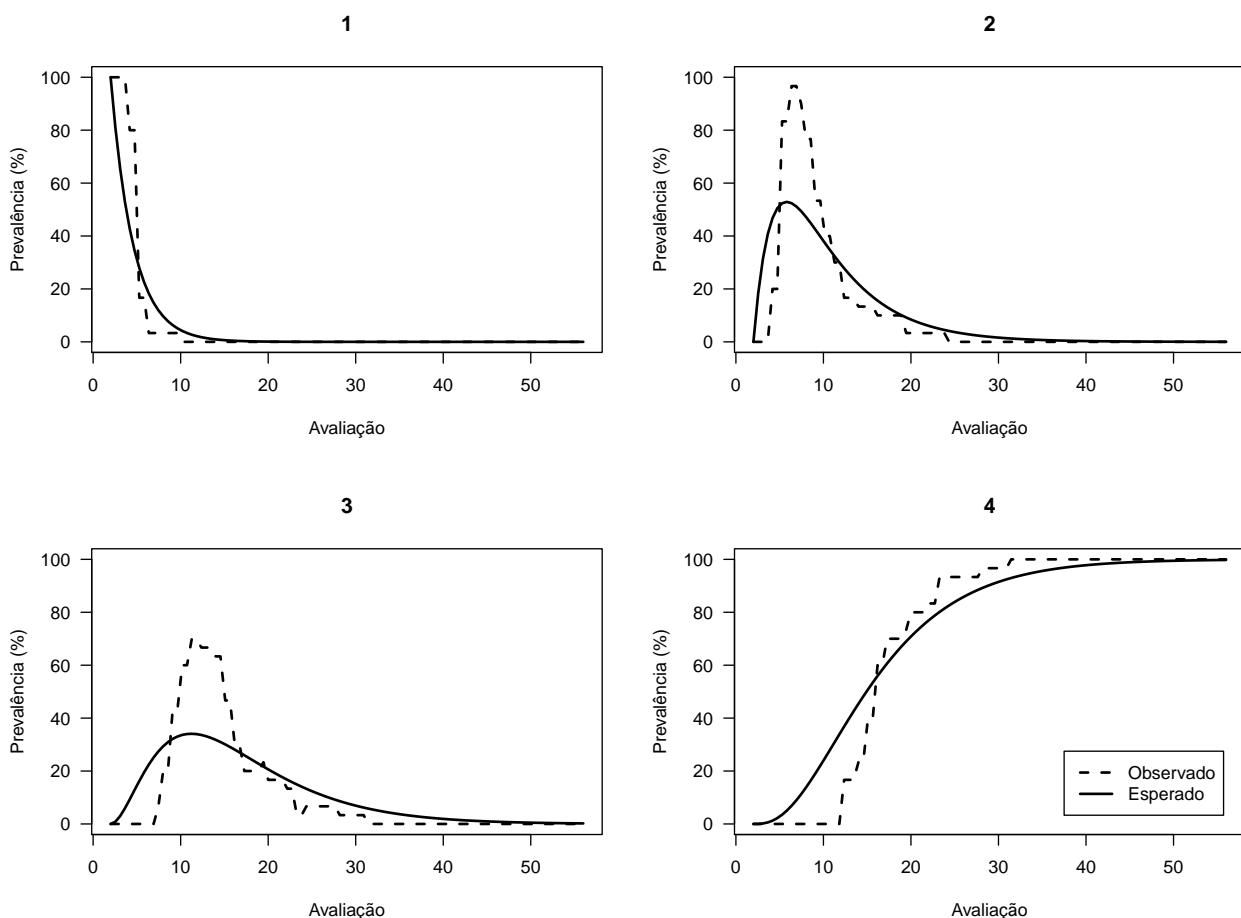


Figura 5.8: Representação gráfica da prevalência percentual observada e esperada contra as avaliações para cada estado do modelo homogêneo apenas para os frutos de maçã com fermento

Para o estado 1 as curvas coincidem de maneira consideravelmente satisfatória, contudo, para os estados 2 e 3 as curvas divergem, também consideravelmente. No estado 4 também não ocorre uma boa convergência. Em todos os estados existem períodos de tempo em que o modelo subestima e

superestima a prevalência, sendo assim indicativo de um ajuste não muito bom do modelo.

5.4 Inoculação: Esporo - Variedade: Eva

A convergência não foi obtida para nenhum modelo com a base de dados completa. Para os frutos de maçã com ferimento a covariável para o gênero de *Colletotrichum* se mostra significativa tanto no modelo homogêneo quanto no nãohomogêneo. A variável para as espécies de isolado não se mostra significativa, e nem sua interação com gênero.

Na Figura 5.9 temos as probabilidades de sobrevivência *versus* as avaliações para os dois modelos. Visualmente podemos justificar a segmentação da intensidade de transição no 10º dia.

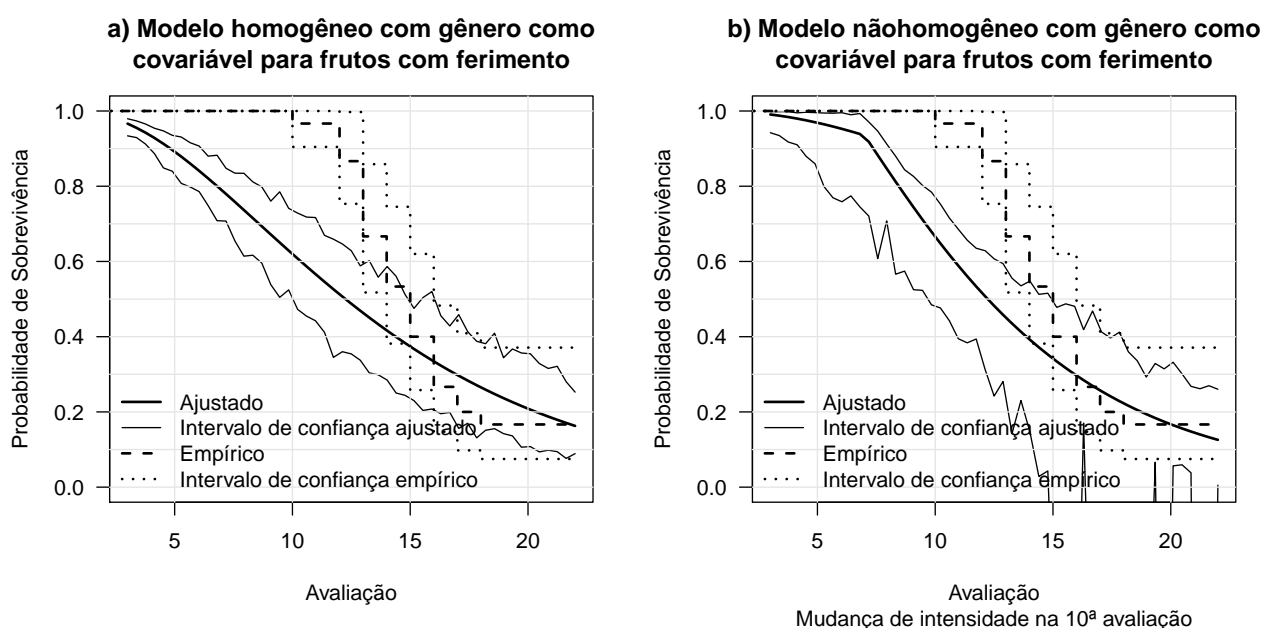


Figura 5.9: Probabilidade de sobrevivência contra as avaliações para cada um dos modelos obtidos. Na linha sólida temos a probabilidade de sobrevivência ajustada pelo modelo e em tracejado a probabilidade de sobrevivência empírica, i.e., a estimativa de Kaplan-Meier. Ambos os intervalos de confiança são de 95 por cento. a) Modelo homogêneo considerando apenas os frutos com ferimento; d) Modelo considerando apenas os frutos com ferimento e com intensidades segmentada-constante (nãohomogêneo) com ponto de quebra no 10º dia de avaliação

Podemos observar que nenhum dos modelos obteve um ajuste muito bom, contudo, o modelo nãohomogêneo gerou uma curva de sobrevivência mais próxima da empírica. Mesmo com esse ajuste não tão bom analisamos algumas medidas.

Nas tabelas 5.5, 5.6, 5.7 e 5.8 temos as matrizes de probabilidade de transição estimada para o intervalo de tempo de 1 dia. São quatro tabelas porque analisamos os dois níveis da covariável gênero antes e depois do 10º dia de avaliação (mudança de intensidade).

Antes do 10º dia é estimada uma maior probabilidade de permanecer no estado 1 nos frutos com o fungo do gênero *acutatum*. Para os demais estados transientes as maiores probabilidades de permanecer no atual estado são estimadas nos frutos com o fungo do gênero *gloeosporioides*, contudo as estimativas são próximas.

Tabela 5.5: Matriz de probabilidade de transição para o intervalo de 1 dia com intervalo normal de 95 percento de confiança do modelo nãohomogêneo com gênero como covariável (pro nível *Colletotrichum acutatum*) para os frutos de maçã com ferimento, antes da 10ª avaliação

	1	2	3	4
1	0.649 (0.4911, 0.764)	0.3162 (0.2136, 0.4583)	0.0342 (0.019, 0.0604)	6e-04 (1e-04, 0.0046)
2	0	0.8202 (0.7271, 0.8859)	0.1751 (0.107, 0.2651)	0.0047 (7e-04, 0.0315)
3	0	0	0.9499 (0.6952, 0.9919)	0.0501 (0.0081, 0.3048)
4	0	0	0	1

Tabela 5.6: Matriz de probabilidade de transição para o intervalo de 1 dia com intervalo normal de 95 percento de confiança do modelo nãohomogêneo com gênero como covariável (pro nível *Colletotrichum gloeosporioides*) para os frutos de maçã com ferimento, antes da 10ª avaliação

	1	2	3	4
1	0.4168 (0.1657, 0.6498)	0.5537 (0.3324, 0.7797)	0.0292 (0.0115, 0.0686)	3e-04 (0, 0.0033)
2	0	0.9127 (0.8214, 0.9558)	0.0859 (0.043, 0.1773)	0.0013 (2e-04, 0.0129)
3	0	0	0.9702 (0.7754, 0.9961)	0.0298 (0.0039, 0.2246)
4	0	0	0	1

Após o 10º dia as probabilidades de transição são próximas para ambos os gêneros de *Colletotrichum*.

Independente do período de avaliação as amplitudes dos intervalos de confiança são extensos, o que torna as estimativas menos precisas.

Tabela 5.7: Matriz de probabilidade de transição para o intervalo de 1 dia com intervalo normal de 95 percento de confiança do modelo nãohomogêneo com gênero como covariável (pro nível *Colletotrichum acutatum*) para os frutos de maçã com ferimento, após a 10ª avaliação

	1	2	3	4
1	0.9999 (0, 1)	1e-04 (0, 1)	0 (0, 0.3938)	0 (0, 0.0641)
2	0	0.7588 (0.4785, 1)	0.2116 (0.088, 0.4633)	0.0296 (0.0108, 0.0763)
3	0	0	0.7747 (0.6594, 1)	0.2253 (0.1474, 0.343)
4	0	0	0	1

Tabela 5.8: Matriz de probabilidade de transição para o intervalo de 1 dia com intervalo normal de 95 por cento de confiança do modelo nãohomogêneo com gênero como covariável (pro nível *Colletotrichum gloeosporioides*) para os frutos de maçã com fermento, após a 10ª avaliação

	1	2	3	4
1	0.9997 (0, 1)	2e-04 (0, 1)	0 (0, 0.1937)	0 (0, 0.0191)
2	0	0.8806 (0.7473, 1)	0.1107 (0.0506, 0.2361)	0.0087 (0.0031, 0.0243)
3	0	0	0.8604 (0.7427, 1)	0.1396 (0.0726, 0.2638)
4	0	0	0	1

Na Figura 5.10 temos as representações gráficas das prevalências observada e esperada para cada um dos estados do modelo.

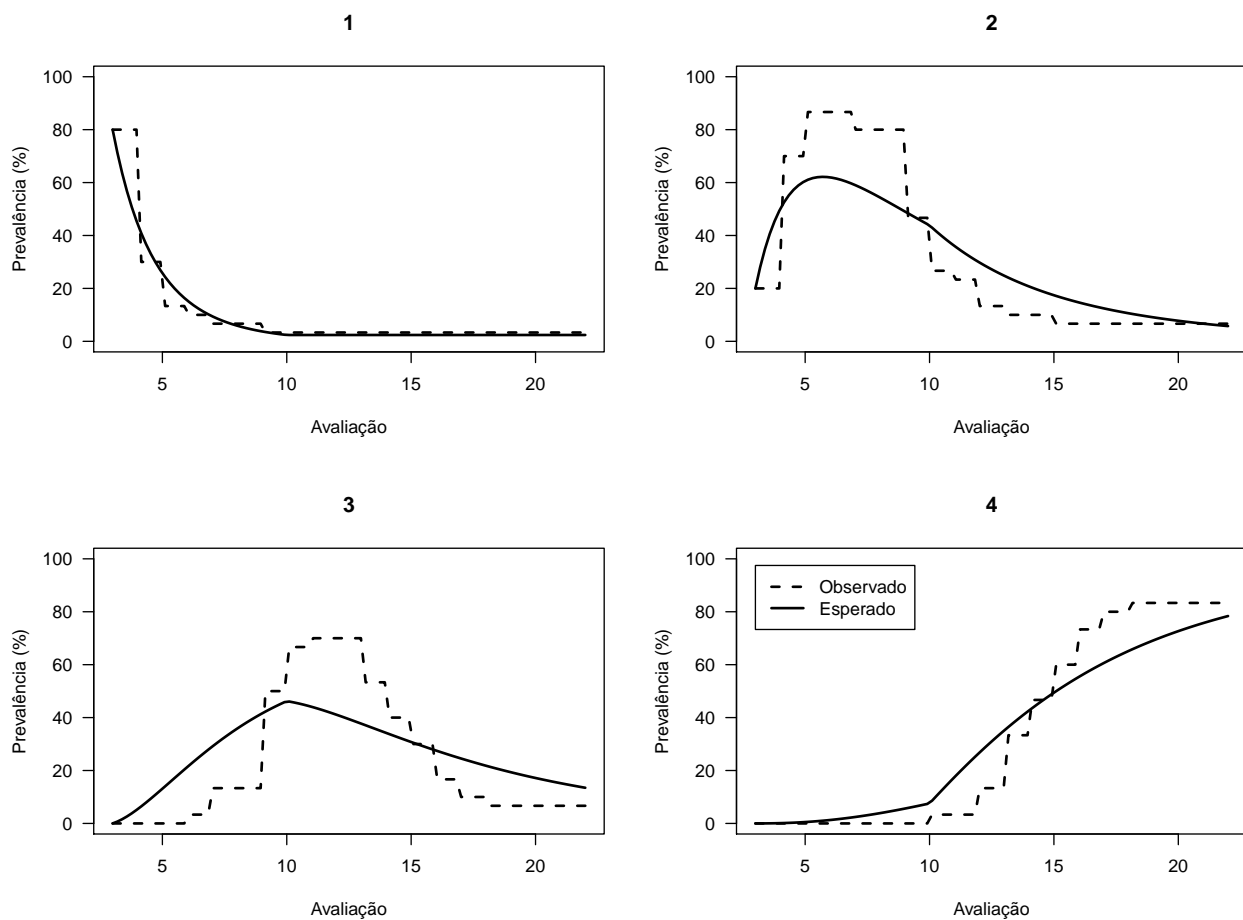


Figura 5.10: Representação gráfica da prevalência percentual observada e esperada contra as avaliações para cada estado do modelo nãohomogêneo apenas para os frutos de maçã com fermento

Com exceção do estado 1, observamos que o modelo ou subestima ou superestima a contagem de prevalência, o que é indicativo de um ajuste não satisfatório do modelo.

5.5 Inoculação: Esporo - Variedade: Gala

Na Figura 5.11 temos as probabilidades de sobrevivência *versus* as avaliações para os quatro modelos. Visualmente já podemos justificar a segmentação da intensidade de transição no 13º dia.

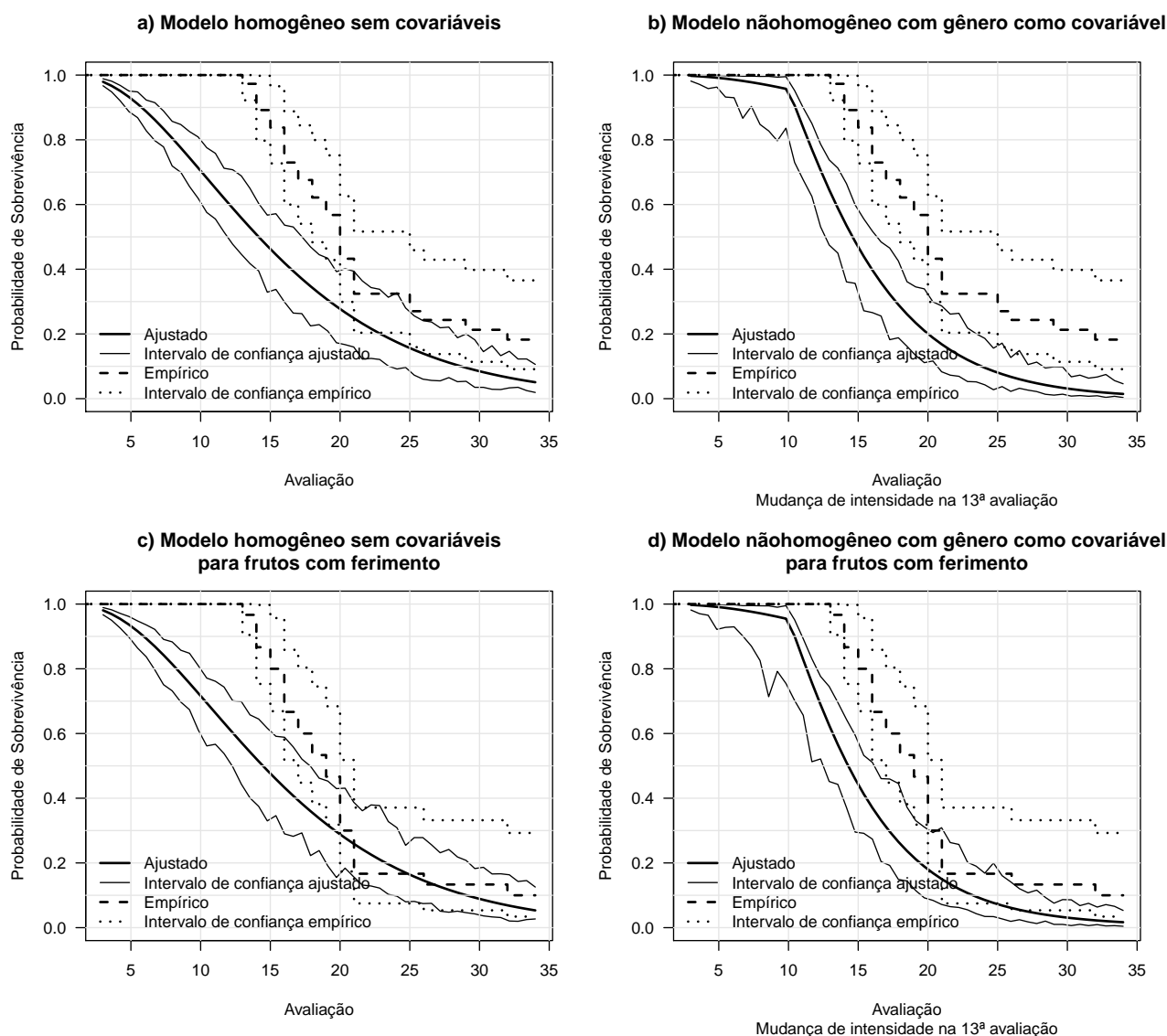


Figura 5.11: Probabilidade de sobrevivência contra as avaliações para cada um dos modelos obtidos. Na linha sólida temos a probabilidade de sobrevivência ajustada pelo modelo e em tracejado a probabilidade de sobrevivência empírica, i.e., a estimativa de Kaplan-Meier. Ambos os intervalos de confiança são de 95 por cento. a) Modelo homogêneo considerando todos os frutos; b) Modelo considerando todos os frutos e com intensidades segmentada-constante (nãohomogêneo) com ponto de quebra no 13º dia de avaliação; c) Modelo homogêneo considerando apenas os frutos com fermento; d) Modelo considerando apenas os frutos com fermento e com intensidades segmentada-constante (nãohomogêneo) com ponto de quebra no 13º dia de avaliação

Nos modelos com a base completa as interações não se mostram significativas. No modelo homogêneo nem os efeitos principais são significativos, no modelo nãohomogêneo a variável categórica para gênero de *Colletotri-*

chum é significativa.

Quando consideramos apenas os dados para os frutos com fermento, os resultados são os mesmos, i.e., as interações não são significativas. No modelo homogêneo nem os efeitos principais são significativos e no modelo não homogêneo a variável para gênero é significativa.

Nenhum dos modelos ajustou de maneira satisfatória, já que as curvas de sobrevivência não se sobrepõem totalmente (Figura 5.11), entretanto, o modelo homogêneo para os frutos de maçã com fermento foi o que ajustou um pouco melhor, já que a partir da 20ª avaliação as curvas se sobrepõem.

Mesmo com um ajuste não muito bom analisamos algumas medidas obtidas com esse modelo.

Na Tabela 5.9 temos a matriz de probabilidade de transição estimada para o intervalo de tempo de 1 dia.

Tabela 5.9: Matriz de probabilidade de transição para o intervalo de 1 dia com intervalo normal de 95 por cento de confiança do modelo homogêneo sem covariáveis, para os frutos de maçã com fermento

	1	2	3	4
1	0.7911 (0.7148, 0.845)	0.193 (0.1417, 0.2609)	0.015 (0.0093, 0.0243)	9e-04 (5e-04, 0.0017)
2	0	0.8563 (0.7962, 0.8994)	0.1312 (0.092, 0.1873)	0.0124 (0.0073, 0.0204)
3	0	0	0.8363 (0.7677, 0.8834)	0.1637 (0.1166, 0.2323)
4	0	0	0	1

Observa-se que as probabilidades de permanecer no atual estado é maior do que as probabilidades estimadas de prosseguir para o próximo estado, no período de 1 dia. As amplitudes dos intervalos de confiança são consideravelmente pequenas, o que é um bom indício de precisão.

As estimativas dos tempos médios de permanência para os estados transientes são apresentadas na Tabela 5.10.

Tabela 5.10: Estimativas dos tempos médios de permanência dos estados transientes com erro padrão e intervalo normal de 95 por cento de confiança do modelo homogêneo sem covariáveis, para os frutos de maçã com fermento

	Estimativa	Erro padrão	Limite inferior	Limite superior
1	4.2666	0.8541	2.9094	6.2222
2	6.4481	1.2115	4.3669	9.1867
3	5.5925	1.1596	3.8800	8.2756

Se espera passar 4 dias, aproximadamente, no estado 1, com essa estimativa podendo variar de 3 até 6 dias. No estado 2 se espera passar 6 dias

e meio e no estado 3 se espera passar 5 dias e meio.

Na Figura 5.11 temos a representação gráfica das prevalências observada e esperada nos estados do modelo.

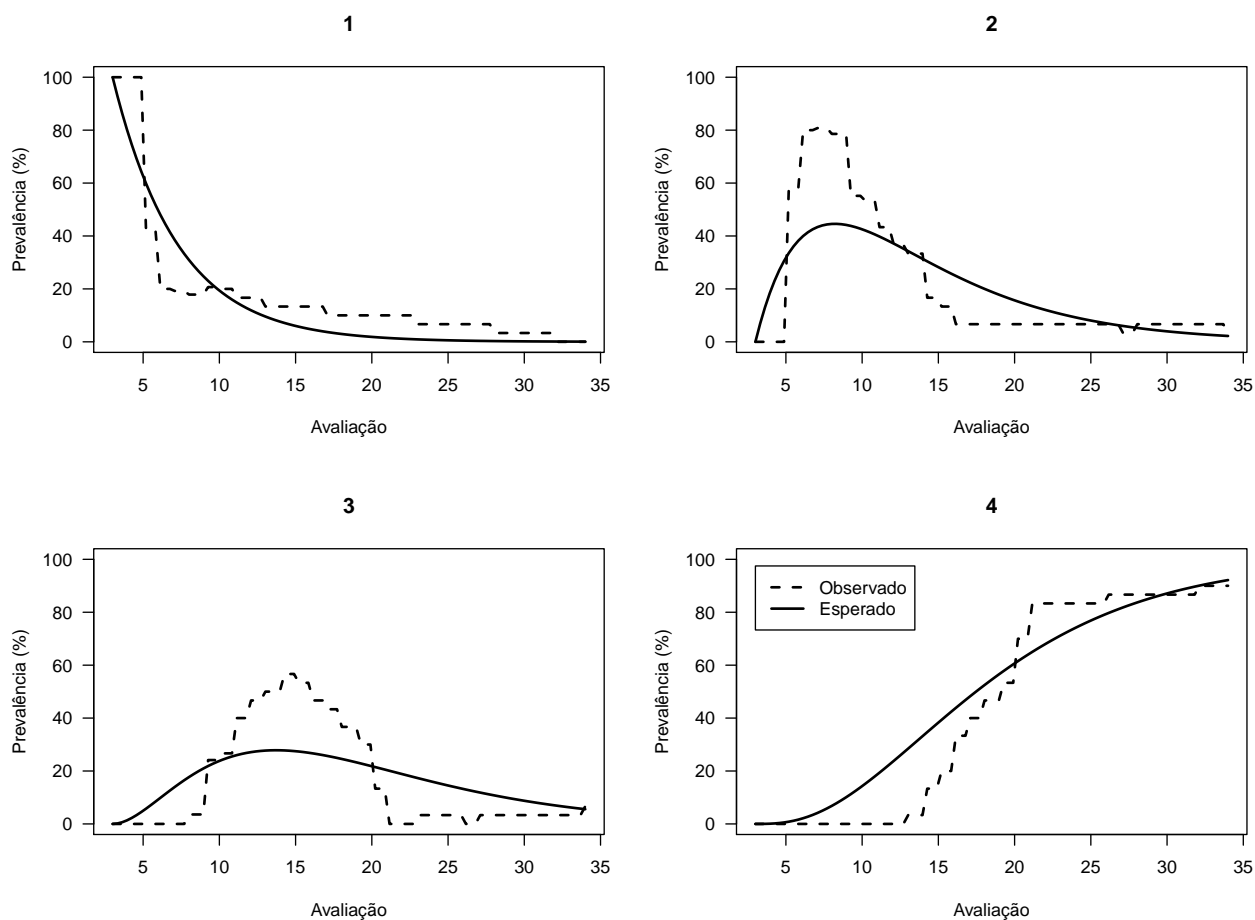


Figura 5.12: Representação gráfica da prevalência percentual observada e esperada contra as avaliações para cada estado do modelo homogêneo apenas para os frutos de maçã com fermento

Para todos os estados observa-se que o modelo subestima ou superestima a contagem de prevalência, o que é um indicativo da má qualidade do ajuste do modelo aos dados.

Discussão

Em todos os experimentos não se obteve nenhum ajuste realmente satisfatório, o que mostra que um modelo Markoviano multiestados não é a escolha adequada. A implementação existente na biblioteca Jackson (2011) do software R Core Team (2015) foi desenvolvida com foco principal em experimentos cujos indivíduos são avaliados em diferentes tempos e com uma maior esparsidade, o que é exatamente o contrário do que temos aqui.

Mesmo com ajustes não tão bons vamos tentar tirar algumas conclusões a partir do melhor modelo obtido para cada experimento.

- Experimento → modelo selecionado
 - Disco - Eva → modelo nãohomogêneo para frutos com ferimento
 - Disco - Gala → modelo homogêneo para frutos com ferimento
 - Esporo - Eva → modelo nãohomogêneo para frutos com ferimento
 - Esporo - Gala → modelo homogêneo para frutos com ferimento
- Em nenhum experimento foi selecionado modelos obtidos com a base de dados completa, isso pode ser justificado pelas baixas ocorrências de lesões nos frutos de maçã sem ferimento.
- Nos experimentos envolvendo maçãs da variedade Eva foram selecionados modelos nãohomogêneos, já nos experimentos envolvendo maçãs da variedade Gala foram selecionados modelos homogêneos, independente do tipo de inoculação. Isso nos diz que com a variedade Eva podemos considerar uma igual intensidade de transição durante todo o período de avaliação e que isso não pode ser considerado com a variedade Gala.

- Apenas no experimento esporo - Eva a variável gênero se mostrou estatisticamente significativa, i.e., apenas nesse experimento as intensidades de transição diferem significativamente entre os gêneros de *Colletotrichum*.
- Nos experimentos envolvendo a variedade 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.
- Os tempos médios de permanência só podem ser obtidos em modelos homogêneos, contudo, os experimentos onde modelos homogêneos foram selecionados tiveram períodos de avaliação de diferentes durações, sendo assim mais difícil fazer comparações diretas, já que a quantidade de informação disponível para as estimativas difere. No modelo do experimento disco - Gala (56 dias de duração) o tempo médio de permanência estimado para o estado 1 é de 2 dias e meio, com 6 dias de permanência média nos estados 2 e 3. Para o experimento esporo - Gala (34 dias de duração) o tempo médio de permanência estimado para o estado 1 é de 4 dias, para o estado 2 é de 6 dias e meio, e para o estado 3 é de 5 dias e meio.
- Essas foram algumas das informações obtidas, não obstante, como os modelos não tiveram um ajuste satisfatório seus resultados não são muito confiáveis.
- Pretende-se ajustar outros modelos de sobrevivência multiestados a estes quatro conjunto de dados.

Referências Bibliográficas

- Bost, S. and Hale, F. (2004). The apple leaf blotches: Necrotic, alternaria, and glomerella. *Fruit Pest News*, 5:1–3.
- 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.
- da S. Boneti, J. I. and Katsurayama, Y. (1998). *Doenças da Macieira*. BASF, São Paulo.
- 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.
- 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 Agronômico 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).
- R Core Team (2015). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Stadnik, M. J. (2009). *Manejo integrado de doenças da macieira*. Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Centro de Ciências Agrárias (CAA), Florianópolis.