



ANÁLISE DE DADOS DE SOBREVIVÊNCIA COM RISCOS COMPETITIVOS COM A ESPÉCIE *Chrysodeixis includens*

OLIVEIRA, M.C.N. de¹; BALDO, G.R.²; GIOLO, S.R.³; SOSA-GÓMEZ, D.R.¹

¹Embrapa Soja, Londrina, PR; ²Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG; ³Universidade Federal do Paraná - UFPR.

A preocupação da pesquisa relacionada ao aumento da produtividade da cultura da soja (*Glycine max* L.) está em função de vários fatores tais como: as condições climáticas, a qualidade do solo, o controle de pragas e doenças e o meio ambiente, entre outras. Sob o aspecto do controle de pragas há maior interesse numa linha de pesquisa biológica, como o uso dos vírus de poliedrose nuclear (NPV), devido sua importância como agentes de controle microbiológico, principalmente das lagartas (Grzywacz, 2016). Na natureza existem muitas interferências na atividade desses agentes, inclusive na interação com plantas hospedeiras de importância econômica capazes de reduzir a atividade do vírus frente a seus insetos praga. Dessa forma, entender como ocorre a interação do vírus de *Chrysodeixis includens*, ChinNPV, com as lagartas se alimentando de duas importantes plantas, a soja e o algodão (*Gossypium hirsutum* L.), pode permitir o aumento do uso de inseticidas biológicos reduzindo suas limitações. As lagartas de *C. includens* foram obtidas no laboratório de Entomologia da Embrapa Soja e criadas em dieta artificial de Greene et al. (1976). O isolado do vírus utilizado, ChinNPV (Isolado CNPSo-VPN168), está armazenado na coleção de entomopatógenos da Embrapa Soja e foi obtido de lagartas infectadas e coletadas em plantações de soja em Iguaraçu, PR, na safra 2005/2006. As plantas hospedeiras de *C. includens* (Soja – BRS 360 RR e algodão - FMT 701), foram cultivadas em casa de vegetação. As plantas foram utilizadas aos 30 a 40 dias após a semeadura. Os bioensaios foram realizados pelo método de incorporação de tecidos da folha em dieta (Baldo, 2018). As folhas das culturas foram cortadas, liofilizadas (Liofilizador LS3000 - Terroni) e em seguida trituradas em moinho de facas com peneira de abertura de 1 mm. As folhas trituradas foram incorporadas à dieta artificial na proporção de 3% (p/v), juntamente com o ChinNPV na concentração final de 5×10^3 CO.mL⁻¹. Posteriormente a dieta foi vertida em bandejas com 32 células, onde, após sua solidificação, lagartas de terceiro instar foram transferidas individualmente para cada célula. As lagartas foram avaliadas diariamente durante 12 dias. O bioensaio foi conduzido em câmara B.O.D. a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 14:10 (L:E) e umidade relativa de $60 \pm 10\%$, no Laboratório de Entomologia da Embrapa Soja, em Londrina.

O delineamento experimental foi completamente casualizado com os tratamentos em arranjo fatorial: seis tratamentos: T1-Dieta artificial, T2-Dieta artificial + 3% de folha de algodão triturada, T3-Dieta artificial + 3% de folha de soja triturada, T4-Dieta artificial + ChinNPV, T5-Dieta artificial + 3% de folha de algodão triturada + ChinNPV, T6-Dieta artificial + 3% de folha de soja triturada + ChinNPV, 32 subamostras e nove repetições, totalizando 1728 observações. Neste bioensaio, foi aplicado um novo método estatístico - a Análise de Sobrevivência com estrutura de Riscos Competitivos – ASRC, devido à ocorrência de uma causa de mortalidade não identificada ou diferente daquela planejada pelos tratamentos. Essa metodologia com essa característica é bastante recente (Colosimo; Giolo, 2006, Pintilie, 2006, Carmes, 2015) e permite uma avaliação mais criteriosa dos tratamentos e morte das lagartas. Um contexto comum de riscos competitivos envolve a morte do inseto, em que a probabilidade de falha causa-específica, ou curva de incidência acumulada, sumariza corretamente a probabilidade de falha em um cenário de análise de dados com riscos competitivos. Os dados obtidos foram codificados da seguinte forma: 0- lagarta viva, 1- lagarta morta por vírus, 2- lagarta morta por causa desconhecida. A hipótese é que se



houver a compreensão da interação entre as plantas hospedeiras e a atividade do vírus de poliedrose nuclear de *C. includens* será possível potencializar o controle das pragas sem agressão ao meio ambiente. Os objetivos desse trabalho foram: 1) avaliar a influência do substrato foliar das culturas de soja e de algodão sobre o vírus de poliedrose nuclear de *Chrysodeixis includens*, 2) a aplicação de métodos estatísticos que permita interpretar adequadamente dados categóricos referentes a sobrevivência e a morte de insetos, 3) identificar a causa da mortalidade e se estava associada a algum tratamento, 4) comparar funções de sobrevivência e avaliar a relação das variáveis ou covariáveis explicativas com o tempo de sobrevivência. Existem algumas razões para estas ocorrências: 1- o acontecimento não se dá antes do fim do estudo, 2- o inseto não é observado no fim da pesquisa ou morre pela infecção do vírus no início da investigação. Essas informações são importantes para que os dados sejam analisados por métodos estatísticos específicos para cada situação. O modelo estatístico do delineamento é o que segue:

$$Y_{ijk} = m + \text{tratamentos}_i + \text{subamostras}_k + \text{tratamentos} * \text{subamostras}_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

em que, Y_{ijk} é o efeito da variável resposta tempo de sobrevivência;

m é o efeito da média geral; tratamentos_i é o efeito de combinações de dietas, folhas de algodão e soja trituradas e vírus;

subamostras_k é o efeito da pseudorrepetição dos tratamentos;

$\text{tratamentos} * \text{subamostras}_{ik}$ é o efeito da interação entre os fatores em estudo e,

ε_{ijk} é o efeito do erro aleatório com distribuição $\cong N(0, \sigma^2)$.

Na análise de sobrevivência com estrutura de Riscos Competitivos (ASRC), a variável tempo até a ocorrência do evento foi analisada sob a abordagem não paramétrica. Para tanto, foram obtidas as curvas de incidência acumulada causa-específica para todos os tratamentos, sendo a comparação entre elas realizada com o auxílio do teste de Gray (1988), que considera todos os tempos t . Neste método, tem-se que: a) os indivíduos estão sob risco de falha por k causas diferentes; e b) a ocorrência de uma das k causas impede que se observe a ocorrência de qualquer outra. Portanto, $k=1,2$ denota as causas de falha (1 = morte por vírus e 2 = morte por causa desconhecida). O tempo t denota os dias, ou seja, $t=0, 1, 2, 3, \dots, 12$ dias. Ainda, $F_k(t) = P(T \leq t, C=k | x)$ denota a probabilidade de um indivíduo sob risco, e com vetor de covariáveis x , apresentar o desfecho até o tempo t devido à causa k . Os dados de mortalidade foram analisados no contexto de Análise de Sobrevivência com estrutura de Riscos Competitivos (ASRC), conforme mencionado anteriormente, pois, além da mortalidade causada pelo NPV (causa 1), foi observada também mortalidade por causas desconhecidas (causa 2). O estimador da Função de Incidência Acumulada (FIA) é expresso por

$$\hat{F}_k(t) = \sum_{\text{all } j, t_j \leq t} \frac{d_{kj}}{n_j} \hat{S}_{(t_{j-1})},$$

d_{kj} é o número de lagartas que falharam no tempo t_j devido à causa k , para $k=1,2$, t_j tal que $t_j \in \{1, 2, 3, \dots, 12\}$ são os tempos distintos em que ocorreram falhas, n_j é o total de lagartas sob risco em t_j , e $\hat{S}_{(t_{j-1})}$ é o estimador de Kaplan-Meier da probabilidade de permanecer livre de falha, por qualquer causa, anterior a t_j .

As curvas de probabilidades acumuladas foram avaliadas por métodos clássicos calculando-se as estimativas pontuais para o total dos 12 dias de duração do bioensaio. Os dados foram analisados pelo software R, versão 3.4.1 (R Core Team, 2014), pelos pacotes *cmprsk*, *lattice*, *lattice Extra* e *survival* (Gray, 2014). O teste de Gray na comparação entre as curvas das funções de incidência acumulada (FIA) dos tratamentos não indicou significância na mortalidade causada por vírus quando as lagartas se alimentaram de dieta artificial com folhas de algodão ou de soja (T5 e T6), e que ambos provocaram infecções inferiores à testemunha - dieta artificial (T4)



(Tabela 1). A atividade do ChinNPV foi afetada pelas folhas de soja e do algodão. A mortalidade causada pelo ChinNPV foi de 53,12% na testemunha, 26,04% no tratamento com folha de algodão e 27,8% no tratamento com folha de soja. A redução média da mortalidade de lagartas foi de aproximadamente 50,6% quando elas se alimentaram da mistura dieta/substrato em comparação à dieta contendo apenas o vírus (Figura 1).

Pela hipótese formulada pode-se observar que a atividade do ChinNPV reduziu quando tecidos foliares do algodão e da soja foram incorporados à dieta artificial em detrimento a testemunha (dieta artificial). No entanto, as folhas de ambas as culturas, quando liofilizadas, interferiram de forma semelhante na atividade viral do NPV. Houve interação entre as plantas hospedeiras e a atividade do vírus de poliedrose nuclear de *C. includens*. O método de ASRC foi eficiente para avaliar diferenças entre curvas de tratamentos na mortalidade acumulada de *Chrysodeixis includens*.

Referências

- BALDO, G.R. **Interações de folhas de soja e algodão com a atividade do vírus de poliedrose nuclear de *Chrysodeixis includens***. 2018. 97 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.
- CARMES, E. R. **Análise de dados de sobrevivência na presença de riscos competitivos**. 2015. 45 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Estatística) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Curitiba.
- COLOSIMO, E. A.; GIOLO, S. R. **Análise de sobrevivência aplicada**. São Paulo: Editora Blucher, 2006. 370p.
- GRAY, R. J. A class of K-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk. **Annals of Statistics**, v. 16, p. 1141-1154, 1988.
- GRAY, R. J. **cmprsk: subdistribution analysis of competing risks**. R package version 2.2-7. 2014. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=cmprsk>>. Acesso em: 15 out. 2014.
- GREENE, G. L.; LEPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v.69, n.4, p.488-497, 1976.
- GRZYWACZ, D. Basic and applied research: Baculovirus. In: LACEY, L. A. (Ed.). **Microbial control of insect and mite pests: from theory to practice**. 1. ed. Yakima: Academic Press, 2016, p. 27-46.
- PINTILIE, M. **Competing risks: a practical perspective**. Chichester: Wiley, 2006. 240 p.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2014. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 20 abr. 2018.



Tabela 1. Comparação entre os tratamentos pelo teste Não-Paramétrico de Gray para dados do bioensaio de Incorporação de 3% de Folha Liofilizada em Dieta. Resultados obtidos pela Análise de Sobrevivência por Riscos Competitivos. Londrina, PR. 2016/2017

Comparação dos Tratamentos	Valor da Estatística pelo teste de Gray		Valor de p	
	C1-Morte por Vírus	C2-Morte por causa desconhecida	C1-Morte por Vírus	C2-Morte por causa desconhecida
T1 vs T2	-	0,572	≅ 1,00 ^{Ns}	0,4494
T1 vs T3	-	2,648	≅ 1,00 ^{Ns}	0,1037
T1 vs T4	179,681	8,889	≅ 0,00 ^{**}	0,0029 ^{**}
T1 vs T5	82,099	0,362	≅ 0,00 ^{**}	0,5476
T1 vs T6	77,370	4,860	≅ 0,00 ^{**}	0,0275 ^{**}
T2 vs T3	-	0,815	≅ 1,00 ^{Ns}	0,3668
T2 vs T4	179,136	6,057	≅ 0,00 ^{**}	0,0139 ^{**}
T2 vs T5	81,152	1,713	≅ 0,00 ^{**}	0,1906
T2 vs T6	76,966	2,448	≅ 0,00 ^{**}	0,1177
T3 vs T4	195,208	2,210	≅ 0,00 ^{**}	0,1371
T3 vs T5	90,965	4,739	≅ 0,00 ^{**}	0,0295 ^{**}
T3 vs T6	86,934	0,372	≅ 0,00 ^{**}	0,5420
T4 vs T5	32,990	12,355	≅ 0,0000 ^{**}	0,0004 ^{**}
T4 vs T6	37,901	0,884	≅ 0,0000 ^{**}	0,3471
T5 vs T6	0,138	7,487	0,7107	0,0062 ^{**}

T1= Dieta Artificial; T2= Dieta Artificial + 3% de Folha de Algodão; T3= Dieta Artificial + 3% de Folha de Soja; T4= Dieta Artificial + ChinNPV; T5= Dieta Artificial + 3% de Folha de Algodão + ChinNPV; T6= Dieta Artificial + 3% de Folha de Soja + ChinNPV. Ns= Não Significativo Curvas de Tratamentos; ** As Funções de Incidência Acumulada (FIA) diferem entre si pelo teste de Gray ($p \leq 0,05$).

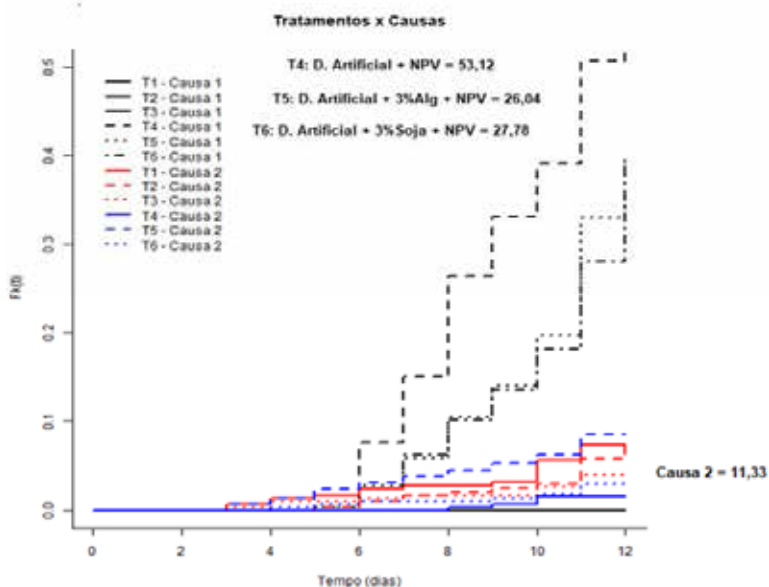


Figura 1. Funções de incidência acumulada [Fk(t)] para as causas 1- Lagarta morta por vírus e 2- Lagarta morta por causa desconhecida. T1 = Dieta Artificial; T2 = Dieta Artificial + 3% de Folha de Algodão; T3 = Dieta Artificial + 3 % de Folha de Soja; T4 = Dieta Artificial + ChinNPV; T5 = dieta Artificial + 3% de Folha de algodão + ChinNPV; T6 = Dieta Artificial + 3 % de Folha de Soja + ChinNPV.