

Abordagens descritivas e inferenciais para avaliação da eficiência de bioagentes no controle de doenças pós-colheita

Aline de H. N. Maia¹

Alfredo José B. Luiz¹

Daniel Terao²

1. Introdução

No presente estudo, propomos o uso de métodos estatísticos descritivos e inferenciais para avaliação de métodos de controle de doenças de frutos no período de pós-colheita. Dependendo do tipo de ensaio e da natureza da variável resposta, é proposto o uso de métodos para análise de dados categorizados baseados na abordagem de quadrados mínimos ponderados (ADC/QMP; STOKES et al, 2000) ou modelos lineares generalizados mistos (MLGM; McCULLAGH & NELDER, 1989). Essas abordagens tem a vantagem de considerar as distribuições de probabilidade das variáveis-resposta, sem necessidade de transformação dos dados originais.

A eficiência de métodos de controle de doenças pós-colheita em frutos é avaliada em testes de laboratório onde são quantificados as seguintes variáveis-resposta ao longo do tempo: porcentagem de frutos infectados, tamanho médio das lesões por fruto ou ainda escores indicadores da severidade da doença. Quando a unidade experimental é o fruto e a variável resposta é binária (com ou sem infecção) ou ordinal (escores de severidade), propomos o uso de ADC/QMP; quando a unidade experimental é um grupo de frutos, os MLGM com função de ligação logito são recomendados para avaliar a influência dos métodos de controle sobre a porcentagem de infecção. Para o tamanho médio de lesões, os MLGM permitem a inclusão do fruto como efeito aleatório para modelagem da susceptibilidade individual de cada unidade experimental. Essa abordagem representa um avanço em relação aos métodos de análise de variância com efeito fixo tradicionalmente utilizados nesse tipo de ensaio.

Como exemplos, apresentamos análises descritivas gráficas e métodos inferenciais adequados para visualização e análise dos resultados de ensaios para avaliação da eficiência de bioagentes de controle da podridão de *Fusarium* (*Fusarium pallidoroseum*) em melão, nos quais vários bioagentes de controle são comparados com um fungicida convencional e o controle absoluto (sem tratamento). Inicialmente, tratamentos com perfis similares são identificados, considerando as avaliações longitudinais para uma determinada resposta, via análise de agrupamentos. Gráficos descritivos dos perfis são construídos para cada grupo, de modo a representar a evolução temporal da doença nos frutos, informação crítica para o planejamento do armazenamento e transporte . A seguir, são utilizados ADC/QMP para modelar o efeito dos tratamentos sobre a porcentagem de frutos infectados e MLGM para o tamanho médio de lesões.

A utilização de métodos adequados para análise de ensaios de sanidade pós-colheita é importante para o desenvolvimento de tecnologias naturais, limpas e seguras, entre elas o uso de bioagentes que visa o controle de doenças de frutos e busca minimizar a presença de resíduos tóxicos.

¹ Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. E-mail: ahmaia@cnpmma.embrapa.br

² Embrapa Semiárido

2. Material e métodos

2.1. Dados experimentais. Foram utilizados dados de dois ensaios, ambos com delineamento inteiramente casualizado para avaliar a eficiência de bioagentes de controle sobre a podridão de Fusarium (*Fusarium pallidoroseum*) em melões da variedade Gália. Foram inoculados dez frutos para cada tratamento e a porcentagem de frutos infectados foi quantificada em diferentes tempos após a infecção.

No experimento I, foram avaliados onze bioagentes potenciais, um fungicida convencional e um controle absoluto (Tabela 1). As avaliações foram feitas aos 8, 10, 12 e 14 dias após a infecção. No experimento II, foram excluídos dois bioagentes do experimento anterior. As avaliações ocorreram aos 7, 9 e 11 dias após a inoculação.

2.2. Análises descritivas. Inicialmente, tratamentos com perfis similares são identificados, considerando as avaliações longitudinais para uma determinada resposta, via análise de agrupamentos. Como exemplo, utilizamos os dados de porcentagem de frutos infectados em cada tratamento nas avaliações realizadas aos 8, 10, 12 e 14 dias após a inoculação. Na análise de agrupamentos, foi utilizado o PROC CLUSTER do software SAS[®]/STAT (SAS[®], 2008), considerando como métrica a distância euclidiana e como método de agrupamento o método do centróide. Gráficos descritivos dos perfis são construídos para cada grupo, de modo a representar a evolução temporal da doença nos frutos.

2.3. Análises inferenciais. Apresentamos o uso do método de quadrados mínimos ponderados para comparar os bioagentes testados no Experimento I com o controle absoluto e com o fungicida tradicional, aos dez dias após a infecção (análise de contrastes usando o CONTRAST Statement do PROC CATMOD, do software SAS[®]/STAT). Foi utilizado um modelo saturado para obtenção de estimativas das porcentagens de infecção em cada tratamento. Para contrastes entre tratamentos foi usado o teste de Wald. O efeito dos tratamentos sobre o diâmetro médio de lesão (média dos diâmetros transversal e longitudinal) foi avaliado via MLGM, com distribuição Normal e função de ligação identidade, utilizando o PROC GLIMMIX do SAS[®]/STAT. O fruto (unidade experimental) foi tratado como fator aleatório. Os valores preditos condicionais dos diâmetros médio de lesão para os bioagentes foram comparados com os respectivos diâmetros dos tratamentos com fungicida tradicional e controle absoluto por meio de testes F para contrastes.

3. Resultados & Discussão

3.1. Análise descritiva dos perfis temporais de infecção por *Fusarium*

Foram identificados quatro grupos de tratamentos em relação à similaridade dos perfis de evolução temporal da doença, mensurada pela porcentagem de frutos infectados (PFI) (Figura 1). No grupo I (SB, BL, TEST), a PFI já era elevada aos 8 dias evoluindo para valores superiores a 90% até o final do período de avaliação (14 dias). Nos grupos 2 (IMZ, L-21, L-62) e 3 (BS, BS+BL, L-17, L-41) a PFI era inicialmente baixa mas atingiu valores elevados ao final da avaliação. A rapidez de evolução foi mais acentuada no grupo 3. No grupo 4, a PFI permaneceu estável ao longo do tempo, com valores em torno de 50% (Figura 2). A análise gráfica preliminar indica que o grupo 2 é mais eficiente para controle da doença aos 10 dias; nesse grupo, os bioagentes *Pichia membranifaciens* e

Debaryomyces hansenii apresentaram eficiência similar ao fungicida convencional (Imazalil).

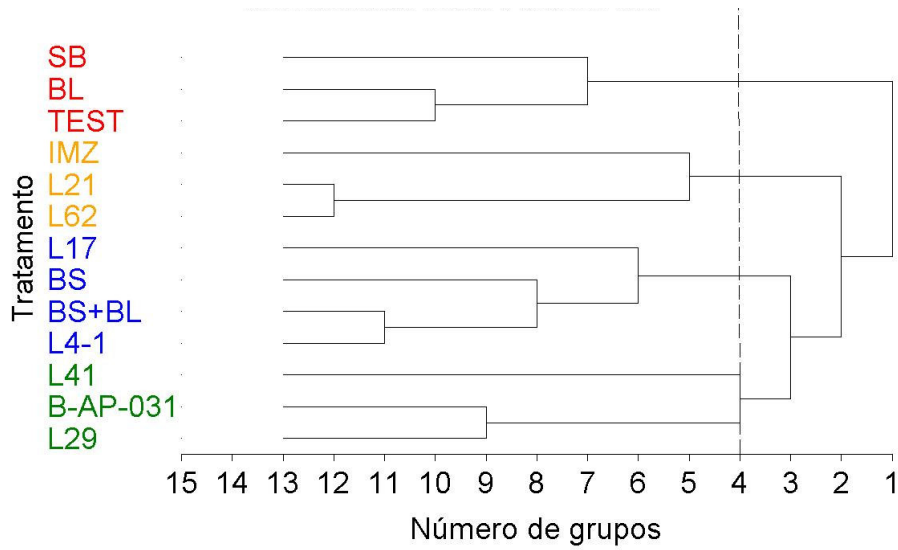


Figura 1. Agrupamento dos tratamentos com relação à similaridade entre perfis de evolução temporal de infecção de 8 a 14 dias após inoculação do agente causal da podridão de fusarium, (*Fusarium pallidoroseum*).

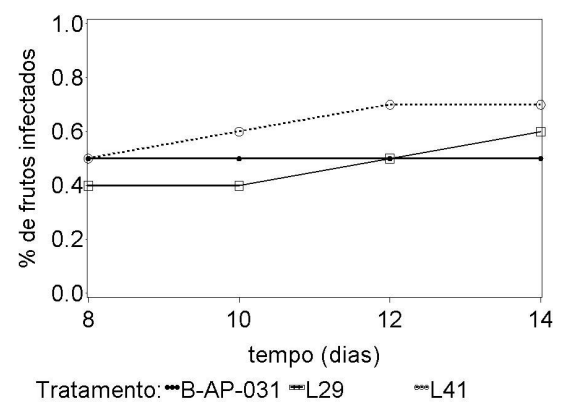
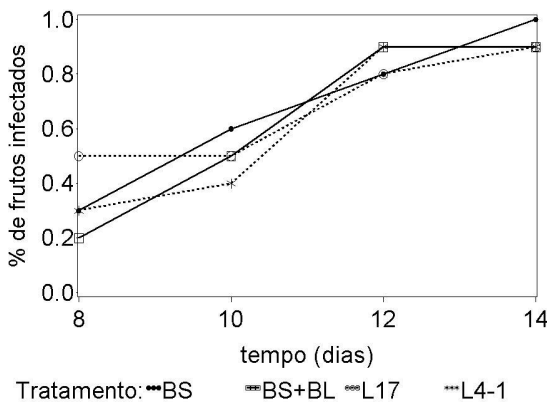
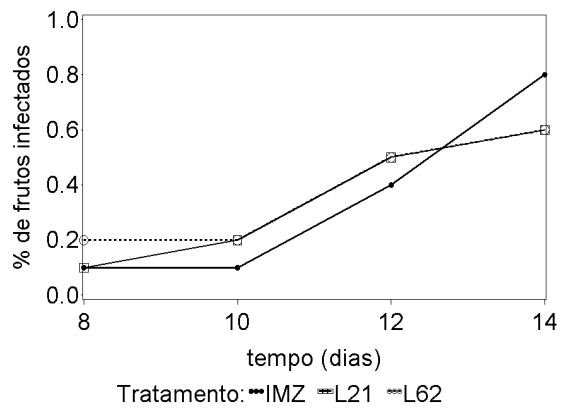
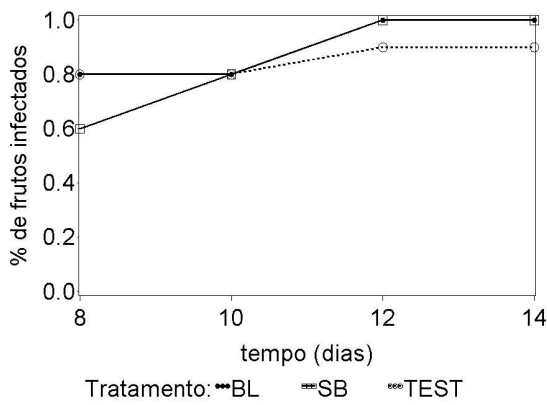


Figura 2. Evolução temporal da infecção período de 8 a 14 dias após inoculação do agente causal da podridão de fusarium (*Fusarium pallidoroseum*).

Tabela 1. Comparação da porcentagem de frutos infectados para os diversos bioagentes em contraste com o fungicida tradicional e o controle absoluto, aos 10 dias após a inoculação.

| Tratamento | % de frutos infectados | Erro-padrão | p ₁ * | p ₂ ** |
|--|------------------------|-------------|-------------------|-------------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> , isolado 2 – B-AP-031 | 0,5 | 0,16 | 0,1384 | 0,0301 |
| <i>Bacillus licheniformis</i> (BL) | 0,8 | 0,13 | 1,0000 | <0,0001 |
| <i>Bacillus subtilis</i> , isolado 1 - BS | 0,6 | 0,15 | 0,3173 | 0,0059 |
| <i>B. subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i> (BS+BL) | 0,5 | 0,16 | 0,1384 | 0,0301 |
| <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> (L17) | 0,5 | 0,16 | 0,1384 | 0,0301 |
| <i>Pichia membranifaciens</i> (L21) | 0,2 | 0,13 | 0,0008 | 0,5271 |
| <i>Pichia guilliermondii</i> (L29) | 0,4 | 0,15 | 0,0455 | 0,0986 |
| <i>Pichia sp</i> (L4-1) | 0,4 | 0,15 | 0,0455 | 0,0986 |
| <i>Sporobolomyces roseus</i> (L41) | 0,6 | 0,15 | 0,3173 | 0,0059 |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> (L62) | 0,2 | 0,13 | 0,0008 | 0,5271 |
| <i>Sporodiobolus pararoseus</i> (SB) | 0,8 | 0,13 | 1,0000 | <0,0001 |
| Fungicida convencional, Imazalil | 0,1 | 0,09 | <0,0001 | - |
| Controle absoluto, água (TEST) | 0,8 | 0,13 | - | <0,0001 |

*** Nível de significância nominal do teste Qui-quadrado de Wald para contraste dos bioagentes com a testemunha (*) e com o fungicida tradicional (**).

A análise de contrastes confirma a maior eficiência dos bioagentes *Pichia membranifaciens* e *Debaryomyces hansenii*, resultado consistente com o obtido na análise de agrupamentos.

3.2. Diâmetro médio de lesão

Três dos bioagentes avaliados não diferiram do controle absoluto (água); os demais apresentaram algum nível de eficiência na redução do tamanho das lesões. Apenas o agente *R. mucilagenosa* causou redução no tamanho das lesões; a estimativa do diâmetro médio de lesão foi cerca de metade ($p=0,0053$) da obtida para o fungicida tradicional (**Tabela 2**), o que indica um alto potencial de controle da podridão de Fusarium. Esse bioagente não havia se destacado no biensaio anterior onde foi mensurada apenas a porcentagem de frutos infectados sem considerar o tamanho das lesões (**Tabela 1**). Os demais bioagentes não diferiram do fungicida tradicional ($p > 0,11$), exceto *B. subtilis* que apresentou menor eficiência no controle da doença, com lesões superiores a 24mm de diâmetro ($p=0,0028$).

Neste trabalho, com propósito ilustrativo, apresentamos a análise para apenas uma data de avaliação. A análise completa, considerando a natureza longitudinal dos dados será objeto de trabalho futuro onde serão avaliadas diferentes estruturas de correlação temporal entre os tamanhos de lesão avaliados num mesmo fruto em diferentes datas.

Tabela 2. Comparação do diâmetro médio de lesão para os diversos bioagentes em contraste com o fungicida tradicional e o controle absoluto, aos 11 dias após a inoculação.

| Tratamento | Diâmetro médio de lesão (mm) | Intervalo de confiança | | p_1^* | p_2^{**} |
|--|------------------------------|------------------------|---------|-------------------|---------------|
| | | LI (mm) | LS (mm) | | |
| <i>Bacillus licheniformis</i> (BL) | 19,46 | 15,11 | 23,81 | 0,1285 | 0,1581 |
| <i>Bacillus subtilis</i> , isolado 1 - BS | 24,46 | 20,11 | 28,81 | 0,9126 | 0,0028 |
| <i>B. subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i> (BS+BL) | 19,27 | 14,93 | 23,62 | 0,1142 | 0,1765 |
| <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> L17) | 6,46 | 2,12 | 10,81 | <0,0001 | 0,0053 |
| <i>Pichia membranifaciens</i> (L21) | 15,26 | 10,91 | 19,60 | 0,0044 | 0,9668 |
| <i>Pichia guilliermondii</i> (L29) | 10,41 | 6,07 | 14,76 | <0,0001 | 0,1241 |
| <i>Pichia sp</i> (L4-1) | 12,51 | 8,16 | 16,85 | 0,0002 | 0,3903 |
| <i>Sporobolomyces roseus</i> (L41) | 16,84 | 12,50 | 21,19 | 0,0185 | 0,5758 |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> (L62) | 13,99 | 9,64 | 18,34 | 0,0012 | 0,7083 |
| <i>Sporodiobolus pararoseus</i> (SB) | 10,29 | 5,94 | 14,63 | <0,0001 | 0,1144 |
| Fungicida convencional | 15,13 | 10,79 | 19,48 | - | 0,0039 |
| Controle absoluto, (TEST) | 24,12 | 19,78 | 28,47 | 0,0039 | - |

*** Nível de significância nominal do teste F para contrastes, utilizado para comparar os bioagentes com a testemunha (*) e com o fungicida tradicional (**).

4. Considerações finais

Apesar da disponibilidade de métodos mais adequados para a análise de variáveis não Normais, seu uso é ainda restrito na análise de dados biológicos onde prevalecem abordagens mais tradicionais que utilizam transformações de dados. A divulgação de novas abordagens é importante para o uso mais eficiente das informações geradas em ensaios biológicos.

Novos ensaios serão realizados utilizando um grupo de frutos como unidade experimental. Dados dessa natureza serão modelados via MLGM, considerando a distribuição Binomial, com função de ligação logito e o fruto considerado efeito aleatório. Quando é utilizado apenas um fruto como unidade experimental, não é possível investigar a presença de sub/sobredispersão.

Neste trabalho, as variáveis porcentagem de frutos infectados e diâmetro médio de lesão foram obtidas em diferentes ensaios. A sua mensuração simultânea permite uma melhor exploração da natureza multivariada das avaliações para uso na seleção de bioagentes promissores.

Optamos por apresentar análise inferenciais para apenas uma data de avaliação, com o objetivo de introduzir o uso de modelos mais adequados para modelagem de variáveis não Normais (porcentagem de frutos infectados) e a introdução de efeitos aleatórios (para diâmetro de lesão). Em trabalhos subsequentes será considerada a natureza longitudinal dos dados, de fundamental importância nesse tipo de problema, onde a evolução temporal

da doença é informação crítica para o planejamento de processos de transporte e armazenamento de frutos.

5. Referências Bibliográficas

McCULLAGH, P.; NELDER, J. A. Generalized linear models, 2nd. ed. London: Chapman & Hall, 511 p., 1989.

SAS INSTITUTE INC. SAS/STAT user's guide/ Version 9.2. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2008.

STOKES, M.E.; DAVIS, C.S.; KOCH, G.G. Categorical data analysis using the SAS system. 2.ed. Cary, NC: SAS Institute Inc, 2000. 629p.