

Análise de Sobrevivência ao HLB - Avaliação Espacial e Temporal da Ameaça de uma Planta com HLB às Plantas Vizinhas.

(HLB Survival Analysis - A Spatiotemporal Assessment of the Threat of an HLB-positive Tree to its Neighbors.)

¹Gottwald, T., ²Irey, M and ¹Taylor, E.

¹USDA, ARS, US Horticultural Research Laboratory, Fort Pierce, Florida, USA; ²Southern Gardens Citrus, US Sugar Corp., Clewiston, Florida, USA. Corresponding author: tim.gottwald@ars.usda.gov

A disseminação do HLB (huanglongbing ou greening) é complexa e pode ser imaginada como ocorrendo em várias escalas espaciais, isto é, de uma célula infetada para células adjacentes, dentro de uma planta, entre plantas vizinhas em uma certa reboleira, entre plantas dentro de um talhão ou pomar, entre pomares dentro da citricultura e entre citriculturas nacional e internacionalmente. Vários mecanismos espaciais afetam a disseminação da doença em cada hierarquia espacial, incluindo o movimento humano de material vegetal e a transmissão por psíldeos. Psíldeos contaminados também se movimentam e transmitem a bactéria do HLB entre múltiplas hierarquias espaciais. Uma preocupação manifesta dos citricultores é a ameaça apresentada por uma planta infetada por HLB para as plantas à sua volta dentro de um talhão ou no pomar como um todo.

A análise de sobrevivência é uma classe de métodos estatísticos usada para estudar a ocorrência e intervalo de eventos, e é frequentemente aplicada no estudo de fatalidades. A análise de sobrevivência tem sido usada por muitos anos em estudos médicos pela indústria de seguros para a geração de tabelas realísticas. Entretanto, este método analítico tem sido também usado em muitas outras disciplinas, onde recebe nomes diferentes como, por exemplo, análise de eventos históricos (sociologia), análise de duração ou transição (economia), análise de confiabilidade ou análise de momento de colapso (engenharia), etc. (5,6). A análise de sobrevivência tem sido usada apenas recentemente em epidemiologia botânica para examinar epidemias de doenças de plantas e os fatores que afetam estas epidemias através do tempo, como o efeito da erradicação de plantas doentes (2,3,4,6).

O presente trabalho investiga a contribuição das transmissões a pequena distância de HLB pelos psíldeos e a influência que estas transmissões exercem no padrão espacial e temporal de expansão da doença. O objetivo é examinar a ameaça ou risco apresentado por plantas contaminadas por HLB às suas vizinhas e demais plantas no pomar.

Materiais e Métodos: Para este estudo selecionamos 11 talhões em uma grande plantação comercial no sul da Florida, cada um com 4 ha de área, com 14 linhas de 100 a 110 plantas por linha. Mapeamos a posição de cada planta em cada talhão e sua condição com relação a HLB através de 6 levantamentos durante um período de 2,5 anos. A incidência de HLB foi determinada visualmente.

Os métodos de análise de sobrevivência foram aplicados primeiramente para determinar as características gerais de sobrevivência do HLB em cada talhão utilizando-se o Modelo de Sobrevivência de Kaplan-Meier,

$$S(t) = \prod_{t_i \leq t} \left[\frac{r_i - d_i}{r_i} \right]$$

onde t = tempo em meses, \prod representa a média geométrica, r = relação de risco, e d = status da doença (0 ou 1) para a i^{th} planta individual. Em seguida, os dados foram examinados para se determinar se plantas com HLB de levantamentos anteriores poderiam ser correlacionadas com novas plantas infetadas que apareceram a diferentes distâncias da fonte de inóculo potencial (definindo a área de influência). Raios de 7,6 m, 15,2 m, 22,9 m, 30,5 m e 38,1 m ao redor de plantas infetadas foram analisados. O número de plantas positivas para HLB dentro destas áreas que existiam durante o levantamento imediatamente anterior foi registrado. Para plantas individuais próximas às margens dos talhões, os raios estudados ultrapassaram as bordaduras.

Para se ajustar o efeito das bordaduras nos dados, um cálculo de correção marginal foi realizado para cada área definida pelos diversos raios estudados. Utilizando-se estes parâmetros, a covariável testada através da análise de sobrevivência foi o número de infecções prévias dentro das áreas determinadas por cada raio.

O modelo de riscos proporcionais semi-paramétricos Cox foi aplicado aos dados, modelo este que especifica o risco para uma determinada planta i no momento t como:

$$h_i(t) = h_0(t) \exp(\beta' X_i)$$

onde $h_0(t)$ é uma função de risco básico não especificado, X_i um vetor de valores covariáveis de tempo-constante e β' o vetor de coeficientes covariáveis que são estimados por probabilidade parcial (2,4,5). O efeito potencial de uma covariável é quantificado utilizando a taxa de risco (HR), expressa em termos de um exponencial do correspondente coeficiente β' para uma variação unitária do valor de cada variável. Um valor HR de 1 ($\beta^{\wedge} = 0$) indica um efeito não significativo da covariável testadas. A covariável explanatória testada foi o número de plantas infectadas em uma área de influência em um levantamento anterior (período). A função de risco modificada para este propósito foi:

$$h_i(t) = h_0(t) \exp(\beta' X_i(t))$$

com $X_i(t)$, o vetor de valores no momento t daquelas covariáveis dependentes do tempo como também daquelas independentes do tempo; e β' é o vetor dos coeficientes associados (6). A análise foi feita utilizando-se a Biblioteca de Sobrevivência de S-PLUS (Data Analysis Products Division, Mathsoft Inc.).

Resultados e Conclusões:

A variabilidade da expansão da doença entre os 11 talhões comerciais de citros está apresentada na Figura 1.

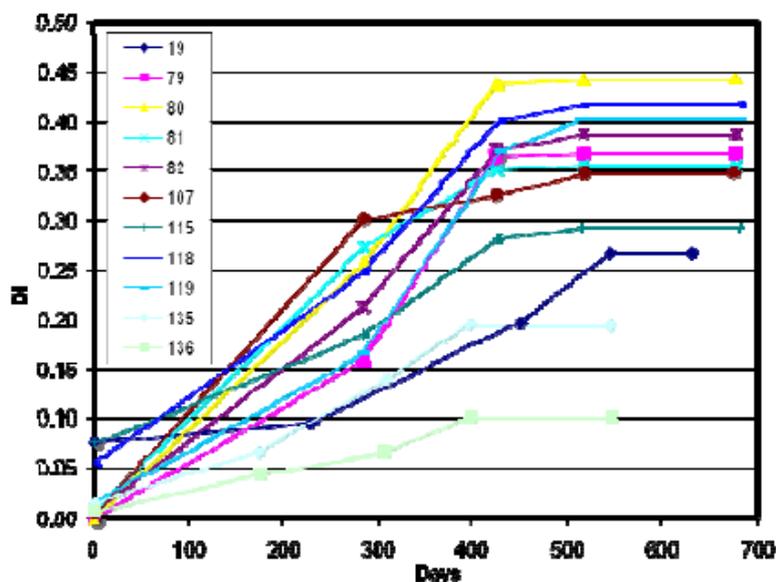


Figura 1. Expansão da doença HLB em 11 talhões comerciais de citros com 2,5 ha de área cada um.

Todos os talhões têm a incidência de HLB aumentando rapidamente e depois começam a se estabilizar após cerca de 400 dias.

Mapas de distribuição espacial de plantas doentes são mostrados na Figura 2 para dois talhões comerciais de citros de 2,5 ha cada.

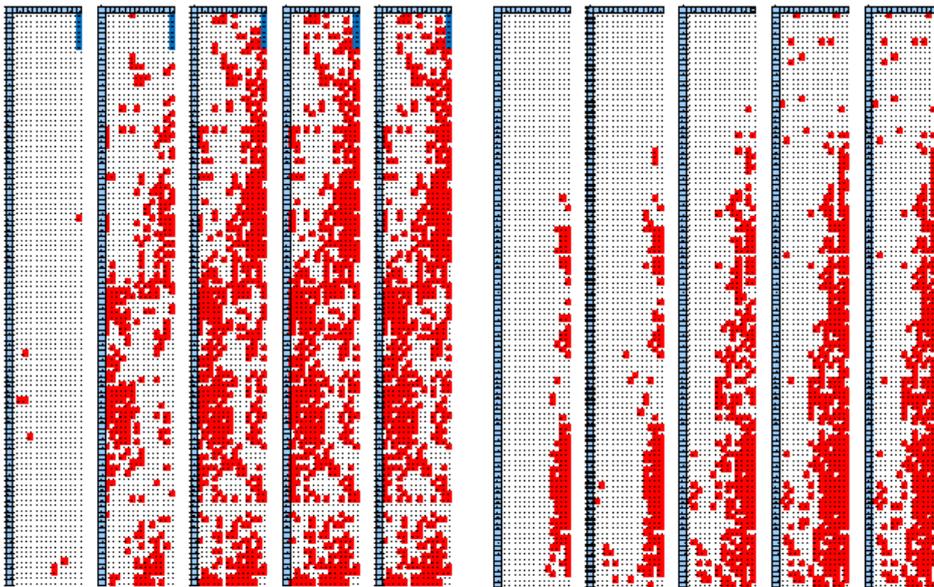


Figura 2. Mapas de distribuição espacial para dois talhões comerciais de citros mostrando os primeiros 5 levantamentos durante um período de 2 anos. As plantas foram avaliadas visualmente. Pontos vermelhos indicam a posição espacial de plantas afetadas por HLB.

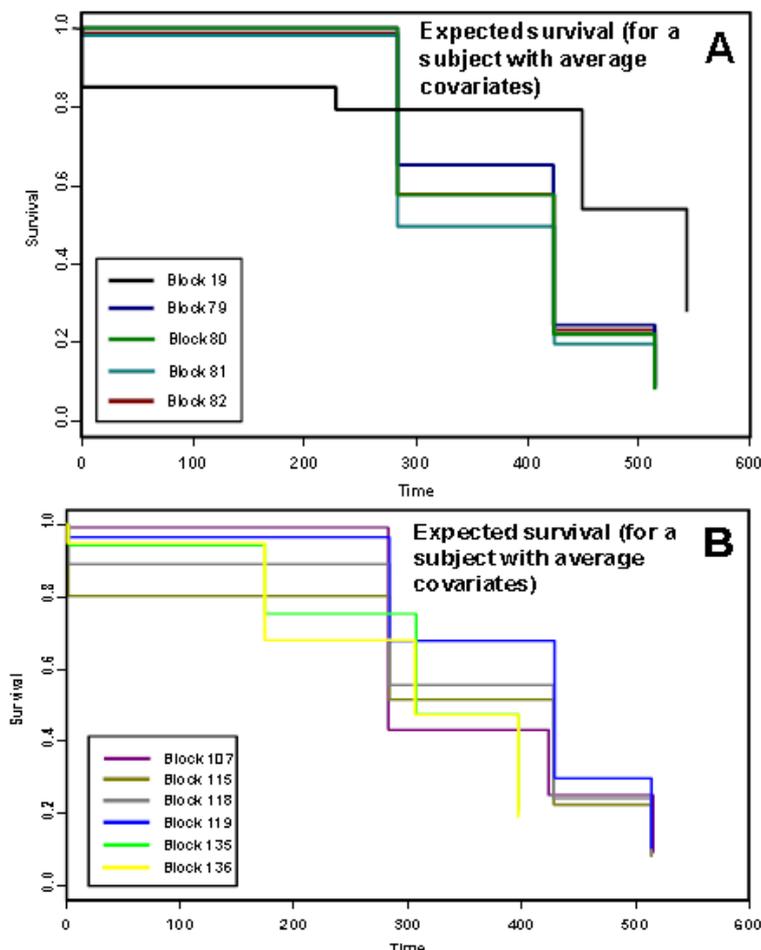


Figura 3. Gráficos de sobrevivência mostrando plantas que permanecem livres de sintomas de HLB em talhões comerciais de citros de 2,5 ha. O tempo é apresentado em dias.

A análise de sobrevivência dos talhões individualmente está em concordância com as características da expansão da doença apresentadas acima. A sobrevivência de plantas na condição de sadias estimada pelo modelo Kaplan-Meier com covariáveis médias diminuiu com o tempo, como esperado (Figura 3). Este modelo leva em consideração tanto as distâncias como o tempo na sobrevivência. O nível de sobrevivência nos talhões individuais variou como esperado e caiu abaixo de 50% entre 310 e 550 dias ($x = 420$ dias). A diferença temporal na sobrevivência corresponde bem à diferença da instalação inicial da infecção de HLB dentro de cada talhão.

O segundo objetivo deste estudo foi examinar o efeito de uma infecção anterior de HLB em uma ou mais plantas sobre a infecção subsequente nas demais plantas vizinhas. Isto foi feito primeiramente através do exame do efeito de todas as plantas com sintomas de levantamentos anteriores em determinadas áreas, na sobrevivência (manutenção do status de livre de HLB) de cada uma das plantas sem sintomas nestas áreas.

Em seguida, a sobrevivência foi analisada através do efeito de todas as plantas com sintomas de levantamentos anteriores na manutenção do status das plantas assintomáticas a determinados raios de distância das plantas doentes. Esta segunda abordagem permitiu-nos avaliar o risco apresentado pelas plantas infetadas sobre a probabilidade de plantas sadias a diversas distâncias das mesmas permanecerem sem sintomas. A análise das características de sobrevivência de plantas sem sintomas em função de diversas distâncias de plantas doentes mostrou que houve muito pouca influência do aumento destas distâncias, quer dizer, todos os gráficos são muito parecidos (Figura 4, A e B). Estes gráficos são também muito parecidos às curvas não-paramétricas individuais Kaplan-Meyer para cada Talhão (Figura 3).

Assim, parece que há muito pouca influência na sobrevivência que pode ser atribuída a plantas vizinhas e não há diferença entre os raios testados. Da mesma forma, a mesma tendência foi observada para a influência de plantas doentes localizadas a vários raios concêntricos de plantas sem sintomas na sobrevivência destas últimas (Figura 4, C e D). Estes gráficos anelares de sobrevivência são também muito similares às curvas não-paramétricas Kaplan-Meyer individuais para cada talhão (Figura 3). Portanto, nenhuma influência adicional na sobrevivência pôde ser atribuída a plantas vizinhas doentes dentro de anéis concêntricos e não houve diferença entre os anéis concêntricos estudados.

Estes resultados diferem drasticamente daqueles observados para outros patossistemas de citros e pêsegos (2,4). Para a Tristeza dos citros (CTV) e o Plum Pox virus (PPV), ambas transmitidas por pulgões, houve uma forte influência, ou seja, um forte risco, das plantas doentes na proximidade, na manutenção do status sadio de sobrevivência de plantas sem sintomas. Para a CTV, esta influência foi acentuada a 32 m das plantas doentes e raios crescentes e anéis concêntricos mostraram contribuições significativas e diferentes. A falta de tais influências no caso de HLB sugere uma expansão espacial significativamente diferente. HLB dissemina-se regionalmente.

Em outro trabalho nos anais deste simpósio, a influência espacial e temporal das transmissões por psilídeos foi examinada pelo modelo estocástico Markov-Chain Monte Carlo (3). Naquele estudo, para HLB, a influência das infecções primárias vindas de fora dos talhões foi a mais significativa na expansão espacial e temporal da doença. Apenas raramente foi possível distinguir alguma influência da disseminação secundária da doença dentro dos talhões. Isto demonstra os aspectos regionais do aumento e disseminação do HLB, e a dificuldade de se determinar ou perceber uma influência significativa de plantas contaminadas adjacentes. Esta mesma característica de epidemias de HLB é demonstrada na Figura 4. Os gráficos de sobrevivência para a todos os raios e anéis testados não são significativamente diferentes (Figura 4 A-C). Estes gráficos de sobrevivência dos raios e anéis estudados também não são significativamente diferentes das curvas Kaplan-Meyer de sobrevivência esperada, o que demonstra a não influência das plantas infetadas por HLB na sua área vizinha. Estes gráficos também não diferem significativamente das curvas não paramétricas Kaplan-Meyer. A análise não paramétrica Kaplan-Meyer de sobrevivência não considera distância como uma variável. Assim, a influência da distância de plantas com sintomas na vizinhança das plantas ou mesmo dentro de talhões em geral não contribui significativamente para a “sobrevivência”, quer dizer, a probabilidade das plantas vizinhas ou do talhão permanecerem livres de doença. Este estudo confirma, portanto, a influência predominante da migração e transmissão do HLB através de psilídeos vindos de fora dos talhões na epidemia da doença, isto é, a influência da transmissão primária. Também indica que tentativas de controle do HLB localmente são provavelmente fúteis. Significativo controle provavelmente somente será possível através de estratégias regionais de manejo.

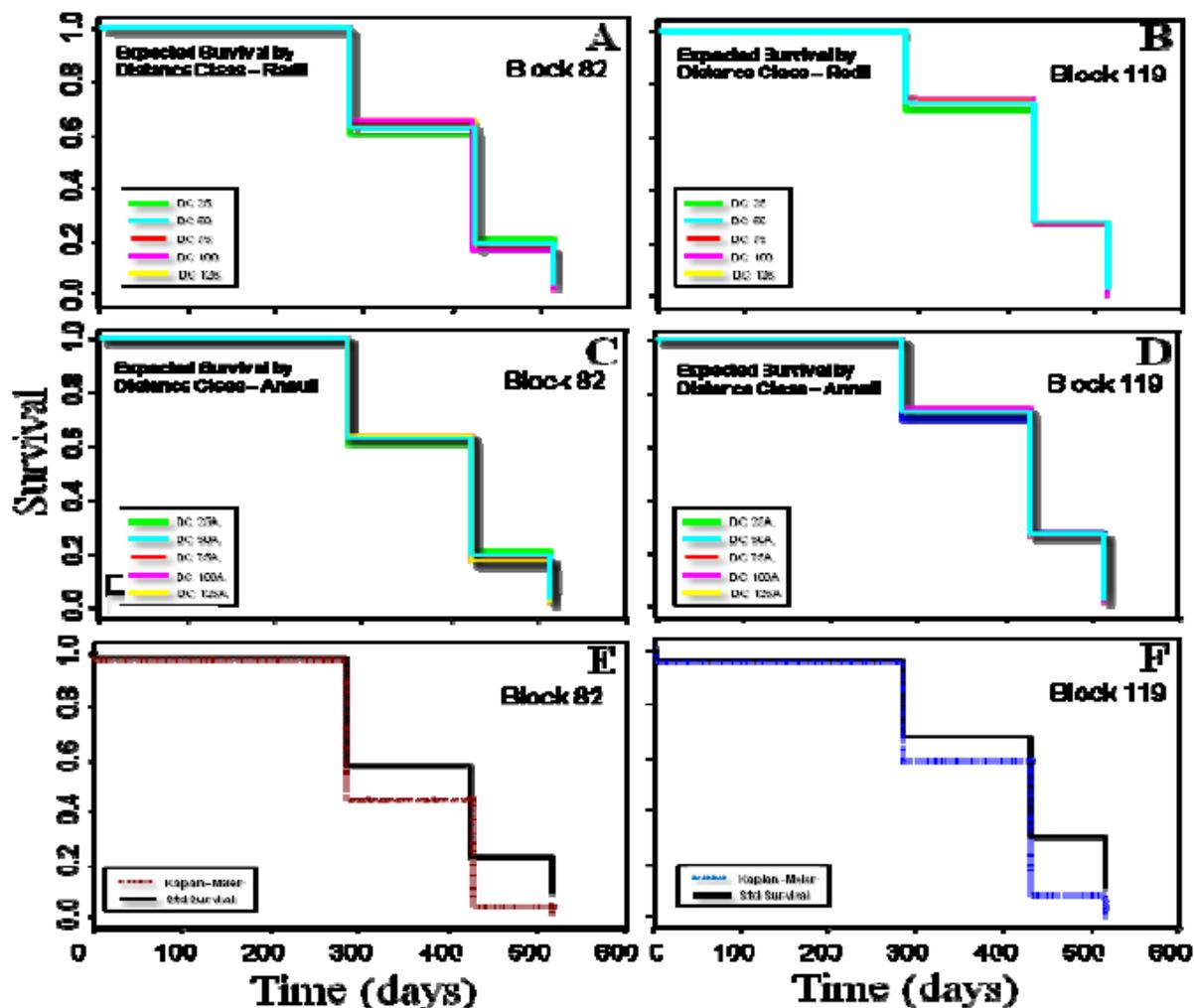


Figura 4. Gráficos de sobrevivência para dois talhões de 2,4 ha comerciais de citros mostrando a probabilidade de plantas assintomáticas permanecerem assintomáticas (isto é, sobreviver) com base na influência ou ameaça imposta por plantas contaminadas com HLB dentro de raios (A,B) ou anéis (C,D) ao redor de cada planta assintomática. E,F - Modelo básico de sobrevivência com as covariáveis de tempo e distância consideradas, e o modelo não paramétrico Kaplan-Meier com apenas tempo considerado como uma variável.

Literatura Citada:

1. Cantor, A. B. 2003. SAS Survival analysis techniques for medical research. 2nd Edition. SAS Institute, Cary, NC.
2. Dallot, S., Gottwald, T. R., Labonne, G. and Quiot, J. B. 2004. Factors affecting the Spread of Plum Pox Virus Strain M in Peach Orchards Submitted to Roguing in Southern France. *Phytopathology* 94:1390-1398.
3. Gottwald, T., Irey, M., Bergamin-Filho, A., Bassanezi, R., and Gilligan, C.A. 2008. stochastic spatiotemporal analysis of the contribution of primary versus secondary spread of HLB. *Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing*, Orlando, Florida, USA. 10.3, 6 pp.
4. Gottwald, T.R. and Taylor, E. L. 2005. Using survival analysis to predict the risk of infection in a citrus tristeza virus epidemic. *Proc. International Org. Citrus Virol.* p. 101-111.
5. Hosmer, D. W. and Lemeshow, S. 1999. *Applied survival analysis: Regression modelling of time to event data.* 386pp. John Wiley and Sons, New York, NY.
6. Scherm, H., and Ojiambo, P. 2004. Applications of survival analysis in botanical epidemiology. *Phytopathology* 94:1022-1026.