

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL-MG**

**LUCAS BATISTA DE SOUZA**

**ANÁLISE DA CALOGÊNESE DE PARICÁ POR MODELOS DE  
REGRESSÃO LOGÍSTICA**

**Alfenas/MG  
2015**

**LUCAS BATISTA DE SOUZA**

**ANÁLISE DA CALOGÊNESE DE PARICÁ POR MODELOS DE  
REGRESSÃO LOGÍSTICA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para  
obtenção do Título de Mestre em Ciências Ambientais  
pela Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG.  
Área de concentração: Tecnologias Ambientais Aplicadas

**Orientador:** Prof. Dr. Breno Régis Santos

**Alfenas/MG  
2015**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Souza, Lucas Batista de.

Análise de calogênese de paricá por modelo de regressão logística / Lucas  
Batista de Souza. - 2015.

26 f. -

Orientador: Breno Régis Santos.

Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal de  
Alfenas, Alfenas, MG, 2015.

Bibliografia.

1. *Schizolobium amazonicum*. 2. Análise Estatística. 3. Razão de  
Chances. 4. Indução de Calos. I. Santos, Breno Régis. II. Título.

CDD: 571.2



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG  
Programa de Pós-graduação – Ecologia e Tecnologia Ambiental

Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas - MG CEP 37130-000  
Fone: (35) 3299-1419 (Coordenação) / (35) 3299-1392 (Secretaria)  
www.unifal-mg.edu.br/ppgecoambiental/



LUCAS BATISTA DE SOUZA

“Análise da Calogênese de Paricá por Modelos de Regressão Logística”

A Banca julgadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Pesquisa: Ciências Ambientais.

Aprovado em: 23 de julho de 2015.

Prof. Dr. Breno Régis Santos  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Prof. Dr. Marcelo Polo  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Prof. Dr. Wellington Marota Barbosa  
Instituição: IFSULDEMINAS-MG

Assinatura:

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Universidade Federal de Alfenas, a CAPES e a FAPEMIG pelo fornecimento da estrutura necessária para a realização desse trabalho.

Agradeço aos Amigos presentes no dia a dia em casa, nas aulas e no BIOGEN pela convivência, respeito e reconhecimento.

Agradeço ao meu orientador por toda a confiança em mim depositada e pelas oportunidades e portas que me permitiu abrir, e também pelos passeios de bicicleta.

Agradeço, sobretudo, a minha Família: os amigos mais próximos; mãe, pai e irmão, pela força e incentivo para fazer desse sonho algo real.

## RESUMO

Neste estudo concernente ao paricá (*Schizolobium amazonicum*), objetivou-se avaliar a interação entre diferentes fontes de explantes e a concentração de fitorreguladores sobre a indução de calos, por meio da abordagem de modelos de regressão linear generalizados. Os explantes foram extraídos de plântulas germinadas *in vitro*. Foram utilizados os segmentos apical, cotiledonar, nodal e de raiz para indução com 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) de 0,0 a 2,1 mg L<sup>-1</sup> e, foi ainda testado o segmento hipocotiledonar para a indução com a combinação de ácido indol-3-butírico (AIB) e 6-benzilaminopurina (BAP), ambos de 0,0 a 1,0 mg L<sup>-1</sup>. Foi utilizado o meio *Woody Plant Medium* (WPM) acrescido de 0,3% de sacarose, 0,1% de polivinilpirrolidone (PVP) e 0,6% de ágar. Os parâmetros avaliados foram o percentual de calos, o percentual de cobertura do explante por calos e a razão da massa seca pela massa fresca. Como resultados, obteve-se 100% de calogênese nos explantes em contato com as menores concentrações aplicadas, exceto os segmentos de raiz. Também se reporta que as maiores chances de cobertura por calos foram observadas no explante nodal, tendo-se utilizado 2,4-D, e no explante cotiledonar, ao se empregar a combinação de AIB com BAP. Os modelos ajustados selecionados se mostraram uma boa alternativa de inferência por permitirem a avaliação e estudo de variáveis independentes com distribuição diferente da normal.

**Palavras-chave:** *Schizolobium amazonicum*, modelo logístico, razão de chances, indução de calos.

## ABSTRACT

In this study concerning the parica (*Schizolobium amazonicum*), it was aimed to evaluate the interaction among different explant sources and plant growth regulators concentration on callus induction, through the approach of generalized linear models. The explants were extracted from seedlings germinated *in vitro*. Apical, cotyledon, root and nodal segments were used for induction with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) from 0,0 to 2,1 mg L<sup>-1</sup> and, was still tested hypocotyledonary segments for induction with indol-3-butyric acid (IBA) and 6-benzylaminopurine (BAP) combined from 0,0 to 1,0 mg L<sup>-1</sup>. It was used Woody Plant Medium (WPM) supplemented with 0,3% sucrose, 0,1% polyvinylpyrrolidone (PVP) and 0,6% agar. It was evaluated the callus percentage, the explant coverage percentage by callus and the ratio of dry mass by fresh mass. As a result, it was obtained 100% callus formation in that explants in contact with the lower concentrations applied, except for the root segments. It also reports that the higher chances of callus coverage were observed at the nodal explant, having been used 2,4-D, and the cotyledon explants, by using the IBA with BAP combination. The adjusted models selected proved itself a good inference alternative for allowing the evaluation and study of independent variables with distribution other than normal.

**Keywords:** *Schizolobium amazonicum*, logistic model, odds ratio, callus induction.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>7</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>9</b>
2.1 Descrição do paricá.....	9
2.2 Cultura de tecidos de plantas .....	10
2.3 Modelos de regressão linear generalizados.....	12
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>15</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>23</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A espécie *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke é endêmica da Floresta Amazônica, sendo conhecida com os nomes paricá, faveira, faveira-branca, ficheiro, flexeiro, paricá-grande, pinho-cuiabano, pinhocuiabano-rosa, guapuruvu-da-amazônia e bandarria (FILHO et al., 2007). Ela tem tido crescente interesse tanto pelo setor de pesquisa quanto industrial (MARQUES et al., 2006). Ocorre naturalmente ao longo dos Estados brasileiros: Mato Grosso; Rondônia; Acre; Amazonas; e Pará (CARVALHO, 2007), e nos países Peru, Colômbia, Venezuela e Bolívia (GONDIN et al., 2015).

Dentre outros, os principais motivos que exaltam a importância dos estudos acerca dessa árvore, pode-se citar: a demanda pela sua madeira (CARVALHO et al., 2013), o seu rápido crescimento e a carência tecnológica sobre a sua cultura (ROSA, 2006). Nesse sentido, a calogênese cumpre o papel de estabelecer uma fonte de material biológico asséptico para vários estudos (CARTER; GUNAWARDENA, 2011) e a aplicação de tecnologias que promovam o melhor desempenho das culturas em campo.

Diferentes fontes de explantes, bem como a interação entre estes e reguladores de crescimentos utilizados em meios de cultura afetam a indução de calos e as rotas organogênicas em tecidos vegetais *in vitro* (LAVANYA et al., 2014). Duas classes principais de fitorreguladores, as auxinas e as citocininas, estão inter-relacionadas na formação e manutenção de calos (SMITH, 2013).

Na prática da cultura de tecidos vegetais, é comum se estudar a relação entre diferentes fatores de controle e as respostas de crescimento. Para muitas variáveis, a resposta segue uma distribuição normal e pode ser adequadamente investigada por meio de análise de variância, seguida por teste de médias. Contudo, algumas não seguem tal premissa, devendo, portanto, serem explicadas com base em outras análises.

O modelo de regressão linear generalizado (*Generalized Linear Model* - GLM) é uma generalização do modelo linear, que permite a uma variável resposta com erros de distribuição, modelos que não tenham uma distribuição normal (PAULA, 2010). Essa generalização é dada por uma função de ligação que permite a transformação da variável dependente, sendo mais usuais a logística, a probito e a complemento log-log (MENDES et al., 2004). A abordagem de GLMs é facilitada através da inferência sobre a razão de chances, a qual permite a comparação entre dois grupos de tratamentos.

Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi estabelecer uma melhor correlação da interação entre diversas fontes de explante e a concentração dos fitorreguladores ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) somente e, ácido indol-3-butírico (AIB) com 6-benzilaminopurina (BAP), no desenvolvimento da calogênese de *S. amazonicum*, por meio da análise de GLMs.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Descrição do paricá

Segundo o Sistema de Classificação de Cronquist, a posição taxonômica de *S. amazonicum* obedece à seguinte hierarquia: divisão Magnoliophyta (Angiospermae); classe Magnoliopsida (Dicotyledonae); ordem Fabales; família Fabaceae (Leguminosae); gênero *Schizolobium*; espécie *Schizolobium amazonicum*; sinonímia botânica *Schizolobium excelsum* Vogel var. *amazonicum* Ducke ex Williams (AMATA, 2009).

O paricá é considerado espécie pioneira, ocorrendo naturalmente na Amazônia, em floresta primária e principalmente nas florestas secundárias de terra firme e várzea alta (LIMA et al., 2003). É uma espécie monóica, os frutos ocorrem após 18 a 20 anos e maduram de agosto a setembro, em Rondônia, e de agosto a outubro, no Pará (ROSA, 2006).

Sendo essencialmente heliófila, não tolera baixas temperaturas (AMATA, 2009). Caracteriza-se como uma árvore decídua. As maiores atingem alturas próximas de 40 m e 100 cm de diâmetro à altura do peito (DAP), medido a 1,30 m do solo (AMATA, 2009).

Essa espécie é bastante utilizada na produção de lâminas médias ou miolo de compensados, brinquedos, caixotaria leve, saltos de calçados, formas de concreto, construção de canoas, forros. Possui qualidade razoável para biomassa, promissora para a produção de pasta para celulose, destacando-se seu fácil branqueamento e as excelentes resistências obtidas com o papel branqueado e alto teor de lignina (34,70%). É indicada para plantios comerciais, sistemas agroflorestais e reflorestamento de áreas degradadas (AMATA, 2009).

Durante estudo sobre o efeito da composição de lâminas de paricá e eucalipto em compensados, registrou-se o aumento na porcentagem de paricá elevou a resistência à flexão, ao arrancamento de parafuso e à tração perpendicular (NAUMANN et al., 2008).

De modo geral, a produtividade do Paricá tem alcançado de 25 a 30 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>ano<sup>-1</sup> e pode ser aumentada com o processo de melhoramento genético aliada a outras práticas silviculturais (MARQUES et al., 2006). Porém, nos plantios comerciais os resultados obtidos não são satisfatórios e têm muito a serem melhorados (AMATA, 2009). Nesse sentido, os espaçamentos 4x3 m e 4x4 m proporcionaram maiores crescimentos em média com, respectivamente, 21,5 m e 20,0 m aos 60 meses de idade (RONDON, 2002).

A semente do paricá apresentou crescente comercialização nestes últimos anos. Em decorrência da ampliação das áreas de reflorestamento, vinha sendo comercializada,

inicialmente, a até R\$ 7,50 por quilograma em Rondônia. Em 1998, a mesma massa beneficiada foi negociada por R\$ 13,00 em Belém, alcançando os R\$ 25,00 em 2003 (ROSA, 2006). O seu valor atual chega a exceder os R\$ 120,00 por Kg. A magnificação no preço por quilograma da semente de paricá nestas últimas décadas reflete o interesse dos produtores por esta espécie e, conseqüentemente, o aumento das áreas reflorestadas (ROSA, 2006). Pouco se encontra sobre a sua produção clonal de mudas ou aplicações fora do setor florestal.

## 2.2 Cultura de tecidos de plantas

A cultura de tecidos vegetais teve suas primeiras menções em 1902 quando Gottlieb Haberlandt abordou a totipotência e a morfogênese em plantas (READ; PREECE, 2014). Hoje, ela é compreendida como o conjunto de técnicas em que são utilizados segmentos vivos (explantes) de uma planta e que, por meio de tratamentos indutivos específicos, é possível fazer uma célula totipotente e competente expressar potenciais morfogenéticos (TERMIGNONI, 2005) em condições assépticas com meio nutritivo artificial (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

O cultivo *in vitro* de plantas é baseado na totipotencialidade das células vegetais (VOGEL, 2005), o que permite que a célula sofra desdiferenciação quando colocada em meio de cultura contendo fitorreguladores específicos. Em tese, qualquer célula vegetal é capaz de originar um novo indivíduo, porém o meristema costuma apresentar melhores resultados (VERDEIL et al., 2007).

O meio de cultura pode ter diversas composições, dependendo do propósito final do experimento. De maneira geral, ele é composto de macro e micronutrientes, carboidratos, hormônios e vitaminas, e a variação destes componentes pode controlar o padrão de desenvolvimento do vegetal *in vitro* (QUISEN; ANGELO, 2008; TORRES et al., 1998). Na literatura é possível encontrar diversas formulações para meios de cultura, onde cada uma é mais indicada para cultivar um determinado grupo de espécies com características semelhantes ou para se utilizar técnicas da cultura de tecidos.

O meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) é amplamente usado por propiciar rápido crescimento de culturas de uma gama de espécies herbáceas, sendo reconhecido por sua elevada concentração de sais minerais (QUISEN; ANGELO, 2008). Visando otimizar o crescimento de espécies lenhosas, como arbustos e árvores, a alternativa é o meio WPM

(*Woody Plant Medium*) proposto por Lloyd e McCown (1980), o qual apresenta um quarto da concentração dos íons amônia e nitrato do meio MS (QUISEN; ANGELO, 2008).

Outras formulações derivam da mistura sistemática dos componentes de dois ou mais meios de cultura. Por exemplo, há o relato de que a junção dos sais minerais do meio MS com as vitaminas do meio B5 (GAMBORG; MILLER; OJIMA, 1968) aperfeiçoa a embriogênese somática (JU et al., 2014), e tendo maltose em vez de sacarose como fonte de carbono, controla a secreção excessiva de compostos fenólicos e aumenta a frequência de formação de calos (KUMAR et al., 2015).

Como comentado, os meios de cultura dão suporte às técnicas de cultivo *in vitro*. A micropropagação, uma das técnicas no domínio da cultura de tecidos é vantajosa quando aplicada em variedades que necessitam ser propagadas em curto espaço de tempo e em larga escala com redução de custos (XUE; KALININA; LEWANDOWSKI, 2015). A associação de outras práticas intrínsecas à micropropagação é necessária ao seu desenvolvimento, como a organogênese. Tipicamente, distinguem-se três vias organogênicas pelas quais pode se proceder a micropropagação: a direta; a indireta; e a embriogênese somática.

A organogênese é definida como a indução da formação de estruturas a partir de tecidos e células (PERIANEZ-RODRIGUEZ; MANZANO; MORENO-RISUENO, 2014), podendo ocorrer por via direta por meio da regeneração de plantas provenientes de tecidos não meristemáticos, sem passar pela fase de calo e, por via indireta, quando o processo de regeneração é precedido pela formação de calo (QUISEN; ANGELO, 2008).

A propagação vegetativa *in vitro* pode ser estabelecida a partir de explantes de diversos fragmentos vegetais, e a escolha deles define como a propagação será conduzida (READ; PREECE, 2014). Para estes mesmos autores, as condições ambientais onde são crescidas as plantas matrizes também são fatores que afetam o sucesso da micropropagação, fazendo com que o conhecimento prévio sobre o estado fisiológico da planta, e em especial do tecido alvo, não seja subestimado.

Em vários tecidos cultivados *in vitro*, a utilização de substâncias reguladoras de crescimento apresenta importância fundamental para o estabelecimento da competência e determinação, imprescindíveis para a formação de meristemas caulinares e/ou radiculares (KOTHARI et al., 2010). Os reguladores de crescimento exercem sua ação por reconhecimento de receptores específicos, presentes em células responsivas, traduzindo sinais hormonais em eventos bioquímicos e fisiológicos (SU; LIU; ZHANG, 2011).

O processo de formação de calo, também conhecido como calogênese, é uma etapa básica para o desenvolvimento de sistemas de propagação vegetativa em massa. As células dos calos também podem ser úteis quando se deseja realizar manipulações genéticas, como poliploidizações, transformações ou hibridizações, bem como obtenção de metabólitos secundários (VENTURIERI; VENTURIERI, 2004).

Quando o explante é cortado e colocado sob condições apropriadas para seu crescimento, é iniciada a formação de um tecido de cicatrização, em que as células da superfície do corte começam um processo de divisão e, então, o calo é formado. Nesta situação, o calo começará a crescer sem uma diferenciação nem organização definida, porém, quando transferido para um meio nutritivo sob condições hormonais adequadas, pode começar uma diferenciação dessa massa celular em raízes adventícias, partes aéreas ou mesmo embriões (NEUMANN; KUMAR; IMANI, 2009).

Outro aspecto relevante da cultura de calos é seu potencial uso para a obtenção de metabólitos secundários bioativos, em alternativa ao extrativismo de plantas com propriedades medicinais (KARUPPUSAMY, 2009). Além disso, extratos de massas calogênicas têm sido avaliados em diferentes sistemas biológicos a fim de se conhecer sua atividade e potencial aplicação (SÖKMEN et al., 2004). Portanto, é importante avaliar as mudanças bioquímicas e fisiológicas que ocorrem durante o crescimento *in vitro* de tecidos vegetais, pois isso pode fornecer importantes informações relacionadas ao processo de estabelecimento e, conseqüentemente, propiciar o aperfeiçoamento das condições para seu cultivo *in vitro*, conforme salienta Santos et al., (2010).

Os calos podem apresentar composição bioquímica e exigências nutricionais específicas. Nesse sentido, o conhecimento dos níveis de carboidratos, proteínas e aminoácidos, denominados metabólitos primários, contribui potencialmente para o conhecimento dos aspectos bioquímicos (SINGH, 2011) e das exigências nutricionais dos calos, bem como para a manipulação da cultura, no sentido da obtenção de células mais viáveis e/ou com maior potencial biotecnológico (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2014).

### 2.3 Modelos de regressão linear generalizados

A adequação do modelo probabilístico ao conjunto de dados que se obtém na pesquisa é uma exigência para que se possam abordar com segurança os resultados computados. Nesse sentido, adequa-se quando as pressuposições do teste estatístico são obedecidas pela distribuição dos dados – sob influência de uma ou mais covariáveis – ao longo do

experimento. Sendo assim, conhecer a natureza da variável resposta (variável dependente), bem como o seu comportamento ulterior, pode direcionar ao teste mais adequado.

O Modelo Linear Generalizado (*Generalized Linear Model* - GLM), também conhecido como modelo logístico, pressupõe uma variável com média  $\mu$ , onde  $0 \leq \mu \leq 1$ , ou seja, uma probabilidade de sucesso (PAULA, 2010). Uma das resoluções propostas pelo modelo linear é a possibilidade de assumir uma distribuição aproximadamente normal. Assim, o modelo logístico suplanta uma premissa restritiva à análise estatística, e pode ser utilizado para descrever a probabilidade de um evento estudado acontecer (MONTI, 2011).

O mecanismo empregado para que se possa assumir a normalidade da distribuição é a transformação da variável resposta, a fim de estabelecer uma relação linear entre esta e as variáveis independentes (MENDES et al., 2004). As transformações podem ser feitas por uma dentre as várias funções de ligação conhecidas: probito; log-log; Box-Cox; Aranda-Ordaz; ligações canônicas (normal, binomial, Poison, Gama, Normal Inversa) (PAULA, 2010).

O logaritmo da chance de sucesso ( $p_i$ ) é definido como

$$p_i = \frac{\exp(\beta_0 + \beta_1 x_{1i} + \beta_2 x_{2i} + \dots + \beta_k x_{ki})}{1 + \exp(\beta_0 + \beta_1 x_{1i} + \beta_2 x_{2i} + \dots + \beta_k x_{ki})}, \quad (1)$$

onde  $p_i$  é a probabilidade de acontecer o evento da  $i$ -ésima observação;  $\mathbf{x}_i = (x_{1i}, x_{2i}, \dots, x_{ki})$  indica o vetor  $k$  dimensional de variáveis relativas à  $i$ -ésima observação;  $\beta' = (\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k)$  refere-se ao vetor de parâmetros a serem estimados; e  $\beta_0$  é o intercepto do modelo. Feitas as considerações, a probabilidade de chance  $p_i$  pode ser expressa pela equação:

$$p_i = \frac{\exp(\beta_0 + \mathbf{x}_i \beta')}{1 + \exp(\beta_0 + \mathbf{x}_i \beta')}, \quad (2)$$

O cálculo das chances é dado pela função  $g(X) = \beta_0 + \beta_1 x$ , enquanto a razão de chances  $\psi$  é dada pelo quociente entre as chances de os eventos almejados acontecerem. Uma consequência de  $\psi$  é que seu valor está associado ao valor do parâmetro estimado  $\beta_1$ , portanto a razão de chances calcula-se fazendo  $e^{\beta_1}$ . Outra possibilidade para avaliar  $\beta_1$  é dada pela construção de um intervalo de confiança, levando-se em conta a variância amostral.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a germinação, antes de seguirem para a inoculação, as sementes foram escarificadas com 1,5 mL de ácido sulfúrico P.A. (98%) por semente durante 90 minutos na capela de exaustão. Na bancada da capela elas foram submetidas por sucessivas lavagens com 500 mL de água destilada autoclavada. Na câmara de fluxo laminar, previamente desinfestada

com álcool a 70% e 15 minutos de luz ultravioleta, as sementes foram inoculadas em frascos de vidro 500 mL contendo 50 mL do meio WPM e mantidas por 21 dias em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 1$  °C, fotoperíodo de 12 horas e irradiância de  $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

As plântulas germinadas serviram de fonte de explante para dois experimentos de calogênese plotados em esquema fatorial entre tipo de explante e concentração de fitorregulador. No primeiro, segmentos apicais, nodais, cotiledonares e das raízes foram utilizados como explantes em diferentes concentrações de 2,4-D (0,0; 0,7; 1,4; 2,1 mg L<sup>-1</sup>). No segundo, segmentos apicais, nodais, cotiledonares, hipocotiledonares e das raízes foram utilizados como explantes em diferentes concentrações de AIB e BAP na proporção de 1:1 (0,0 - 1,0 mg L<sup>-1</sup>).

Os meios foram distribuídos em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio WPM suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1% de polivinilpirrolidone (PVP) e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar. Após a inoculação os tubos foram mantidos em sala de crescimento, com temperatura de  $25 \pm 1$  °C, fotoperíodo de 12 horas e irradiância de  $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

A avaliação foi feita após 28 dias e as variáveis analisadas foram: percentual de explantes com calos, percentual de cobertura do explante com calos e massa relativa [(massa seca) (massa fresca)<sup>-1</sup>] do calo. O experimento foi plotado em delineamento inteiramente casualizado, composto de 10 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio, totalizando 10 explantes por tratamento.

Os dados de cobertura do explante com calos foram obtidos com auxílio do software de domínio livre ImageJ<sup>®</sup> (SCHNEIDER et al., 2012), e podiam variar de zero a 100% do explante. O percentual de cobertura foi calculado pela razão das áreas. A massa seca foi obtida após a secagem do material em estufa de ar circulante (Nova Ética<sup>®</sup> modelo 400/1ND) a  $45 \pm 2$  °C por 3 dias, quando foi constatado peso constante (BRASIL, 2010).

Para analisar os dados, utilizou-se o recurso de ajuste de modelos lineares generalizados do pacote R Commander (Rcmdr), software R. Foram ajustados vários modelos, sendo quatro deles validados e com aplicabilidade para as variáveis respostas, dois para cada experimento, contendo cada um deles o ajuste de uma das respostas com base na interação entre os tipos de explantes e as concentrações de fitorreguladores. Os parâmetros usados para explicar os resultados foram: estimativa do parâmetro, erro-padrão, razão de chances (RC), p-valor, e intervalo de confiança da RC.

## 4 RESULTADOS

Houve calogênese em todas as repetições da maioria dos tratamentos nos dois experimentos. As exceções foram os tratamentos sem adição de reguladores de crescimento dos explantes provenientes de raiz, cotilédone, ápice e hipocótilo. Os segmentos nodais produziram calos em todas as repetições mesmo nos controles, e os segmentos de raiz não produziram em nenhuma concentração de 2,4-D.

O desdobramento da interação entre explante e concentração de 2,4-D sobre o percentual de cobertura por calos é mostrado na Tabela 1. Uma vez que os explantes de raiz não produziram calos quando influenciados por esse fitorregulador, os dados não foram estudados nos modelos. Observa-se que o explante apical possui 4,56 (2,407/0,528) vezes mais chance de cobertura quando a concentração de 2,4-D passa de zero para 1,4 mg L<sup>-1</sup>. Entre as maiores razões de chances de cobertura, a proporção para apical, nodal e cotiledonar seria 2,26, 4,14 e 1,00, respectivamente, onde a maior ocorreria em explante nodal com 2,1 mg L<sup>-1</sup>.

Tabela 1. Estimativa dos parâmetros, erros-padrão das estimativas, significância, razão de chances e intervalo de confiança da razão de chances, de acordo com o nível fixado da variável controle sobre a cobertura relativa por calos dos explantes nas respectivas concentrações de 2,4-D.

Modelo		Estimativa dos parâmetros	Erro-padrão	Pr (> z )	Razão de Chances (RC)	Intervalo de confiança da RC (95%)
Explante	2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )					
Apical	0,0	-0,6392	0,1812	0,0007	0,528	[0,367; 0,748]
	0,7	-0,3295	0,4349	0,4509	0,719	[0,297; 1,651]
	1,4	0,8783	0,5534	0,1162	2,407	[0,811; 7,300]
	2,1	0,5221	0,5081	0,3072	1,686	[0,610; 4,569]
Nodal	0,0	0,2484	0,1700	0,1476	1,282	[0,920; 1,793]
	0,7	1,4697	0,3430	< 0,0001	4,348	[2,307; 9,012]
	1,4	1,2549	0,3751	0,0012	3,507	[1,754; 7,784]
	2,1	1,4847	0,3600	< 0,0001	4,414	[2,280; 9,567]
Cotiledonar	0,0	-1,1464	0,2267	< 0,0001	0,318	[0,199; 0,486]
	0,7	-0,3809	0,4413	0,3905	0,683	[0,279; 1,595]
	1,4	0,0638	0,4992	0,8987	1,066	[0,388; 2,784]
	2,1	-0,4612	0,4707	0,3300	0,630	[0,242; 1,553]

Fonte: Do autor.

O resultado do desdobramento da interação explante x concentração de 2,4-D sobre a massa relativa [(massa seca)/(massa fresca)<sup>-1</sup>] é mostrado na Tabela 2. Conforme abordado anteriormente, os dados do segmento de raiz não foram considerados para os modelos. Observa-se que sem a adição de 2,4-D a massa relativa entre os explantes apical, nodal e cotiledonar teve proporção semelhante, da ordem de 1,056, 1,000 e 1,008, respectivamente, em relação à razão de chances da acumulação de biomassa. Percebe-se que há uma maior chance de se conseguir a massa relativa mais elevada com a presença do fitorregulador, da ordem de 3,28 (1,230/0,375) vezes no explante apical, de 2,37 (0,840/0,355) vezes no nodal, e de 3,04 (1,090/0,358) vezes no cotiledonar.

Tabela 2. Estimativa dos parâmetros, erros-padrão das estimativas, significância, razão de chances e intervalo de confiança da razão de chances, de acordo com o nível fixado da variável controle sobre a massa relativa [(massa seca)/(massa fresca)<sup>-1</sup>] dos calos nas respectivas concentrações de 2,4-D.

Modelo		Estimativa dos parâmetros	Erro-padrão	Pr (> z )	Razão de Chances (RC)	Intervalo de confiança da RC (95%)
Explante	2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )					
Apical	0,0	-0,9807	0,0409	< 0,0001	0,375	[0,346; 0,406]
	0,7	0,2073	0,0872	0,0197	1,230	[1,037; 1,460]
	1,4	-0,0185	0,1037	0,8587	0,982	[0,801; 1,203]
	2,1	-0,0126	0,0967	0,8967	0,987	[0,817; 1,193]
Nodal	0,0	-1,0365	0,0418	< 0,0001	0,355	[0,327; 0,385]
	0,7	-0,2015	0,0619	0,0016	0,817	[0,724; 0,923]
	1,4	-0,1748	0,0717	0,01689	0,840	[0,729; 0,966]
	2,1	-0,2499	0,0647	0,0002	0,779	[0,686; 0,884]
Cotiledonar	0,0	-1,0284	0,0439	< 0,0001	0,358	[0,328; 0,389]
	0,7	0,0796	0,0867	0,3613	1,083	[0,914; 1,284]
	1,4	-0,1134	0,1076	0,2950	0,893	[0,723; 1,102]
	2,1	0,0865	0,0947	0,3638	1,090	[0,906; 1,313]

Fonte: Do autor.

O resultado do desdobramento da interação entre o tipo de explante e a concentração de AIB e BAP na cobertura por calos é mostrado na Tabela 3. Observa-se que o explante cotiledonar possui 119,66 (10,769/0,090) vezes mais chance de cobertura na concentração 0,5 mg L<sup>-1</sup> dos fitorreguladores do que em sua ausência. Por outro lado, nota-se que para o explante apical teve a chance de cobertura reduzida em até 3,65 (1,182/0,324) vezes com a adição dos fitorreguladores. O segmento de raiz formou calos na presença de AIB e BAP, contudo, a sua chance de cobertura foi 5,99 (3,674/0,613) vezes menor de que a do explante hipocotiledonar na concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> dos mesmos.

Tabela 3. Estimativa dos parâmetros, erros-padrão das estimativas, significância, razão de chances e intervalo de confiança da razão de chances, de acordo com o nível fixado da variável controle sobre a cobertura relativa por calos dos explantes nas respectivas concentrações de AIB+BAP.

Modelo		Estimativa dos parâmetros	Erro-padrão	Pr (> z )	Razão de Chances (RC)	Intervalo de confiança da RC (95%)
Explante	AIB+BAP (mg L <sup>-1</sup> )					
Apical	0,0	0,1674	0,2428	0,4916	1,182	[0,736; 1,910]
	0,5	-1,1277	0,4989	0,0253	0,324	[0,116; 0,835]
	1,0	-1,0865	0,6726	0,1084	0,337	[0,063; 1,085]
Cotiledonar	0,0	-2,4085	0,6066	0,0001	0,090	[0,015; 0,222]
	0,5	2,3767	0,7621	0,0022	10,769	[2,790; 74,948]
	1,0	1,6146	0,8749	0,0671	5,026	[0,771; 38,677]
Nodal	0,0	0,5441	0,1976	0,0067	1,723	[1,177; 2,556]
	0,5	1,2055	0,3926	0,0026	3,338	[1,623; 7,778]
	1,0	1,7784	0,5894	0,0030	5,920	[2,284; 28,870]
Hipocótilo	0,0	-0,5562	0,1674	0,0011	0,573	[0,411; 0,793]
	0,5	1,3014	0,5423	0,0177	3,674	[1,250; 10,914]
	1,0	0,7396	0,6995	0,2922	2,095	[0,381; 7,486]
Raiz	0,0	-1,5880	0,3040	< 0,0001	0,204	[0,105; 0,353]
	0,5	-0,5338	0,5426	0,3268	0,586	[0,197; 1,691]
	1,0	-0,4890	0,6899	0,4796	0,613	[0,112; 2,093]

Fonte: Do autor.

O desdobramento da interação entre explante e a concentração combinada de AIB e BAP sobre a massa relativa é mostrado na Tabela 4. Observa-se que a razão de chances para a massa relativa não chegou a  $1,0 \pm 0,2$  vezes entre as concentrações de 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup> dentre todos os explantes, sendo da ordem de 1,185 no apical, 1,002 no cotiledonar, 1,091 no nodal, 1,048 no hipocótilo e 0,883 na raiz, ou seja, as chances da massa seca ser maior pelo efeito da concentração, entre esses dois valores, não aumentam mais de que 18,5%. Ressalva-se que a chance da massa relativa ser maior se encontra no explante da raiz, sendo até 1,39 (1,767/1,268) vezes de a apresentada pelo explante cotiledonar na concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de dos fitorreguladores, o qual apresentou a maior chance de cobertura.

Tabela 4. Estimativa dos parâmetros, erros-padrão das estimativas, significância, razão de chances e intervalo de confiança da razão de chances, de acordo com o nível fixado da variável controle sobre a massa relativa [(massa seca)(massa fresca)<sup>-1</sup>] dos calos nas respectivas concentrações de AIB+BAP.

Modelo		Estimativa dos parâmetros	Erro-padrão	Pr (> z )	Razão de Chances (RC)	Intervalo de confiança da RC (95%)
Explante	AIB+BAP (mg L <sup>-1</sup> )					
Apical	0,0	-0,8620	0,0562	< 0,0001	0,422	[0,378; 0,471]
	0,5	0,3471	0,0992	0,0006	1,415	[1,165; 1,720]
	1,0	0,1772	0,1028	0,0868	1,194	[0,976; 1,461]
Cotiledonar	0,0	-0,9882	0,0457	< 0,0001	0,372	[0,335; 0,401]
	0,5	0,2372	0,0960	0,0147	1,268	[1,050; 1,531]
	1,0	0,2353	0,0985	0,0182	1,265	[1,043; 1,535]
Nodal	0,0	-0,9188	0,0443	< 0,0001	0,399	[0,366; 0,435]
	0,5	-0,3976	0,0688	< 0,0001	0,672	[0,587; 0,769]
	1,0	-0,4841	0,0708	< 0,0001	0,616	[0,536; 0,707]
Hipocótilo	0,0	-1,0121	0,0388	< 0,0001	0,363	[0,337; 0,392]
	0,5	0,0162	0,0916	0,8601	1,016	[0,849; 1,216]
	1,0	-0,0315	0,0950	0,7405	0,969	[0,804; 1,167]
Raiz	0,0	-1,0476	0,0453	< 0,0001	0,351	[0,344; 0,410]
	0,5	0,4455	0,0937	< 0,0001	1,561	[1,300; 1,877]
	1,0	0,5693	0,0948	< 0,0001	1,767	[1,468; 2,129]

Fonte: Do autor.

## 5 DISCUSSÃO

Após o período de incubação estipulado de 28 dias, o percentual de calos foi de 100% nos explantes apical, cotiledonar, hipocotiledonar e nodal, desde que houvesse a menor quantidade testada de 2,4-D ou a combinação de AIB e BAP. Essas constatações estão de acordo com aquelas feitas por Reis et al., (2007a; 2007b), onde mesmo sem a presença de regulador de crescimento e, fazendo-se uso do meio MS, ocorreram a calogênese nos explantes intercotiledonares e nodais.

Não foram encontrados trabalhos desta natureza com o paricá utilizando como fonte de explantes os segmentos de raiz e de cotilédones. Dessa forma, foi evidenciado que a raiz dessa espécie lenhosa não é eficiente para iniciar calogênese. Para outra arbórea, por exemplo, a *Premna serratifolia*, segmentos de raízes são os mais indicados para a indução de calos (SINGH, 2011).

Apenas tomar nota sobre o percentual de formação de calos em explantes diferentes não é suficiente para se determinar o mais produtivos deles. Nesse sentido, é preciso ponderar com as repostas de outras características, sendo a percentagem de cobertura do explante um bom parâmetro, uma vez que representa, de forma direta, o quanto do material respondeu ao estímulo.

Quanto ao 2,4-D, observou-se um maior aumento nas chances de cobertura, em relação aos controles, quando se utiliza o explante apical. Sendo assim, este foi o mais influenciado pela concentração em relação às demais fontes de explantes. Por outro lado, o explante com mais chances de cobertura foi o nodal na concentração de 2,1 mg L<sup>-1</sup>. Em uma análise de cobertura com atribuição de notas, Reis et al., (2007a) não puderam diferenciar entre segmentos apicais e intercotiledonares até a concentração de 4 mg L<sup>-1</sup>, quando compararam os tratamento por teste de médias.

Em se tratando da combinação de AIB e BAP, observou-se um maior aumento das chances de cobertura, em relação aos controles, no explante cotiledonar. Em estudo do perfil de citocininas endógenas nos cotilédones de *Pinus pinea* Cuesta et al., (2012) deram suporte de que, entre outros fatores, a interceptação e metabolização de fitorreguladores exógenos desempenham um maior efeito em várias respostas *in vitro*.

Concomitantemente, houve uma inesperada redução na chance de cobertura em explantes apicais na presença desses fitorreguladores. Entretanto, ainda que as chances de cobertura tenham sido reduzidas, não se pode afirmar que estas são diferentes entre si.

Quando foram utilizadas diferentes concentrações de ambos, AIB e BAP, Reis et al., (2007b) observaram maior cobertura.

As auxinas e as citocininas podem ter uma transferência de sinais antagonista entre as vias de diferenciação durante a organogênese *in vitro*, conforme Su et al., (2011). Estudos de base sobre a manutenção do meristema apical evidenciam que as citocininas cumprem esse papel e podem ser ativamente sintetizadas para esse fim, discorre Shani et al., (2006). Portanto, os explantes apicais do paricá podem ter sido mais estimulados a manter o meristema apical do que a produzir calos, quando se utilizou as mesmas concentrações de AIB e BAP.

Apesar das estimativas de cobertura terem se mostrado bons indicadores para complementar as concepções inicialmente tomadas quanto à interpretação da percentagem de calos formados por tratamento, há outro parâmetro relevante a fim de compreender respostas anteriormente observadas, a razão entre a massa seca e a massa fresca. A diminuição nessa razão foi apontada como resposta ao estresse por Kasrati et al., (2014), enquanto o seu aumento ofereceu a Simões et al., (2009) indícios de maior produtividade de calos.

No presente estudo, a razão das massas fresca e seca revelou que sem a adição de 2,4-D as chances de produção efetiva de biomassa são menores do que com a sua influência exógena. Portanto, as maiores chances de cobertura apresentadas nas suas concentrações mais elevadas não representam sinais de perda produtividade.

Efeitos significativos do aumento da concentração de 2,4-D com BAP sobre as massas de calos de *Zingiber officinale* foram reportados sem a produção de metabólitos secundários específicos dessa espécie (EL-NABARAWY et al., 2015). Esse fato corrobora com a noção de que o aumento da biomassa induzido por esse fitorregulador não induziu resposta de estresse nos tecidos vegetais estudados, uma vez que a síntese de metabólitos secundários de natureza complexa representa, entre outros fatores, resposta a condições adversas no meio, como explica Gonçalves e Romano (2013).

Quando se duplica quantidade fornecida de AIB e BAP, foi reportado que a razão de chances da massa relativa não variou mais de que 18,5%. Nesse sentido, percebe-se que, ainda assim, a concentração crítica não foi superada como aconteceu para Jayaraman et al., (2014) ao utilizarem concentrações crescentes de BAP ou cinetina (KIN), mantendo-se a de ácido naftaleno acético (ANA) constante.

Por fim, enfatizou-se que a maior chance de se obter massa relativa maior com AIB e BAP foi registrada no explante de raiz. Atrelado a isso, os tecidos da raiz também foram os

que tiveram as menores chances de cobertura, ou seja, tendem a apresentar menor desdiferenciação.

Tecidos jovens e pouco diferenciados podem conter células com parede celular pouco espessa, a qual será mais ou menos espessada dependendo dos estímulos ambientais (DERBYSHIRE et al., 2007), fazendo com que a massa seca varie consideravelmente. Portanto, quando os explantes de raiz se revelaram com maior massa seca, foi reflexo de terem mais células com processo de diferenciação avançado.

Quanto aos modelos lineares generalizados utilizados para estudar as respostas de cobertura de explante por calos e massa relativa, observou-se que este método de análise representa uma técnica robusta para identificar diferenças significativas entre tratamentos. É comum serem reportados resultados de tratamentos considerados iguais, estatisticamente, em estudos de calogênese, como os ocorrem nos trabalhos de Ghorbanpour e Hadian (2015) quanto ao crescimento da cultura, Warchoń et al., (2015) quanto à indução de calos embriogênicos, e Botau et al., (2015) quanto à produção de calos.

Portanto, ainda que sejam mais amplamente utilizados nas abordagens de estudos com variáveis discretas (PAUL; SAHA, 2007), como é frequente nos estudos de caso clínico das áreas da saúde humana e animal, também podem ser adequados para estudos da área vegetal.

## 6 CONCLUSÃO

Em conclusão, os modelos lineares generalizados selecionados esclareceram as diferenças e interações entre as variáveis independentes dos tratamentos, ao passo que resolveram as limitações dos dados quanto às premissas da análise estatística. Assim sendo, são indicados para o estudo de indução de calos em termos de percentual de cobertura do explante, massa relativa, e outras respostas com valores de média compreendidos entre 0 e 1.

Também se observou que a calogênese só não ocorreu nos explantes de raiz sob influência de 2,4-D, sendo de 100% nos demais tratamentos, inclusive aqueles com combinação de AIB com BAP, desde que a concentração mínima em estudo fosse utilizada. O explante nodal tem as maiores chances de cobertura por calos quando se utiliza 2,1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, enquanto os segmentos cotiledonares são os prováveis com mais chances ao se aplicar 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB e BAP.

## REFERÊNCIAS

- AMATA. Revisão sobre paricá: *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke. 2009. Disponível em: < <http://www.amatabrasil.com.br/conteudo/biblioteca?id=1028> >. Acesso em: mar. 2014.
- BOTAU, D. et al. The influence of growth regulators on callus culture at *Vaccinium myrtillus* and *Momordica charantia*. **Journal of Biotechnology**, v. 208, Supplement, p. S114, 2015.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 5 ed. v. 1, 546 p. 2010.
- CARTER, J.; GUNAWARDENA, A. H. L. A. N. Regeneration of the aquatic monocot *Aponogeton madagascariensis* (lace plant) through callus induction. **Aquatic Botany**, v. 94, n. 3, p. 143-149, 2011.
- CARVALHO, M. et al. Avaliação da composição e distribuição mineral em componentes foliares de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke). **Agrotrópica**, v. 25, n. 1, p. 53-60, 2013.
- CARVALHO, P. E. R. Paricá - *Schizolobium amazonicum*. **Embrapa Florestas - Circular Técnica**. Colombo, PR, 8 p. 2007.
- CUESTA, C. et al. Endogenous cytokinin profiles and their relationships to between-family differences during adventitious caulogenesis in *Pinus pinea* cotyledons. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 18, p. 1830-1837, 2012.
- DERBYSHIRE, P. et al. Cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyls involves dynamic changes in cell wall thickness. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 8, p. 2079-2089, 2007.
- EL-NABARAWY, M. A. et al. The effect of some factors on stimulating the growth and production of active substances in *Zingiber officinale* callus cultures. **Annals of Agricultural Sciences**, dx.doi.org/10.1016/j.aogas.2014.11.020, 2015.
- FILHO, A. B. G. et al. Produção de biomassa em quatro procedências de paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby no estágio de muda. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 1047-1049, 2007.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, n. 1, p. 151-158, 1968.
- GHORBANPOUR, M.; HADIAN, J. Multi-walled carbon nanotubes stimulate callus induction, secondary metabolites biosynthesis and antioxidant capacity in medicinal plant *Satureja khuzestanica* grown *in vitro*. **Carbon**, v. 94, p. 749-759, 2015.
- GONÇALVES, S.; ROMANO, A. In vitro culture of lavenders (*Lavandula spp.*) and the production of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 2, p. 166-174, 2013.

GONDIN, J. C. et al. Emergência de plântulas de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (CAESALPINACEAE) em diferentes substratos e sombreamento1. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, p. 329-338, 2015.

JAYARAMAN, S. et al. Effects of plant growth regulators, carbon sources and pH values on callus induction in *Aquilaria malaccensis* leaf explants and characteristics of the resultant calli. **Journal of Forestry Research**, v. 25, n. 3, p. 535-540, 2014.

JU, H.-J. et al. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyl and leaf explants of gherkin (*Cucumis anguria* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 169, p. 161-168, 2014.

KARUPPUSAMY, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 13, p. 1222-1239, 2009.

KASRATI, A. et al. Plant growth, mineral nutrition and volatile oil composition of *Mentha suaveolens* subsp. *timija* (Briq.) Harley cultivated under salt stress conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 80-84, 2014.

KOTHARI, S. L. et al. Chilli peppers — A review on tissue culture and transgenesis. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 1, p. 35-48, 2010.

KUMAR, G. P. et al. Evaluation of different carbon sources for high frequency callus culture with reduced phenolic secretion in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cv. SVPR-2. **Biotechnology Reports**, v. 7, p. 72-80, 2015.

LAVANYA, A. R. et al. Indirect organogenesis from various explants of *Hildegardia populifolia* (Roxb.) Schott & Endl. – A threatened tree species from Eastern Ghats of Tamil Nadu, India. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 95-101, 2014.

LIMA, S. F. D. et al. Comportamento do paricá (*Schizolobium amazonicum* Herb.) submetido à aplicação de doses de boro. **CERNE**, v. 9, n. 2, p. 192-204, 2003.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron spp.* **HortScience**, v. 15, p. 416 p, 1980.

MARQUES, L. C. T.; YARED, J. A. G.; SIVIERO, M. A. A Evolução do conhecimento sobre o paricá para reflorestamento no Estado do Pará. **Embrapa Amazônia Oriental - Comunicado Técnico**. Belém, PA, 5 p. 2006.

MENDES, P. R. et al. Análise de dados de gastroenterite hemorrágica canina para identificar fatores de risco por regressão logística. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, p. 372-380, 2004.

MONTI, M. M. Statistical Analysis of fMRI Time-Series: a critical review of the glm approach. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 5, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAUMANN, R. B. et al. Propriedades de chapas fabricadas com partículas de madeira de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake e de *Schizolobium amazonicum* Herb. **Revista Árvore**, v. 32, p. 1143-1150, 2008.

NEUMANN, K.-H.; KUMAR, A.; IMANI, J. **Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology: Basics and Application (Principles and Practice)**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009.

PAULA, G. A. **Modelos de regressão com apoio computacional**. Instituto de Matemática e Estatística - Universidade de São Paulo: 2010.

PAUL, S.; SAHA, K. K. The generalized linear model and extensions: a review and some biological and environmental applications. **Environmetrics**, v. 18, n. 4, p. 421-443, 2007.

PÉREZ-JIMÉNEZ, M. et al. Relationship between endogenous hormonal content and somatic organogenesis in callus of peach (*Prunus persica* L. Batsch) cultivars and *Prunus persica* x *Prunus dulcis* rootstocks. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 8, p. 619-624, 2014.

PERIANEZ-RODRIGUEZ, J.; MANZANO, C.; MORENO-RISUENO, M. A. Postembryonic organogenesis and plant regeneration from tissues: two sides of the same coin? **Frontiers in Plant Science**, v. 5, 2014.

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. D. S. Manual de procedimentos do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental. **Embrapa Amazônia Ocidental - Documentos**. Manaus, 44 p. 2008

READ, P. E.; PREECE, J. E. Cloning: Plants – Micropropagation/Tissue Culture. In: ALFEN, N. K. V. (Ed.). **Encyclopedia of Agriculture and Food Systems**. Oxford: Academic Press, p.317-336. 2014.

REIS, I. N. R. D. S.; LAMEIRA, O. A.; CORDEIRO, I. M. C. C. Efeito do 2,4-D na indução de calos *in vitro* de paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 498-500, 2007a.

\_\_\_\_\_. Indução da calogênese em paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby) através da adição de AIB e BAP. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 501-503, 2007b.

RONDON, E. V. Produção de biomassa e crescimento de árvores de *Schizolobium amazonicum* (Huber) Ducke sob diferentes espaçamentos na região de mata. **Revista Árvore**, v. 26, p. 573-576, 2002.

ROSA, L. D. S. Características botânicas, anatômicas e tecnológicas do paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke). **Revista de Ciências Agrárias**, v. 46, p. 63-79, 2006.

- SANTOS, D. N. D. et al. Análise bioquímica de calos de pinhão-manso. **Ciência Rural**, v. 40, p. 2268-2273, 2010.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671-675, 2012.
- SHANI, E.; YANAI, O.; ORI, N. The role of hormones in shoot apical meristem function. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 5, p. 484-489, 2006.
- SIMÕES, C. et al. Anthocyanin production in callus cultures of *Cleome rosea*: modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC-DAD/ESIMS. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 10, p. 895-903, 2009.
- SINGH, C. R. Antimicrobial effect of callus and natural plant extracts of *Premna serratifolia* L. **International Journal on Pharmaceutical and Biomedical Research**, v. 2, n. 1, p. 17-20, 2011.
- SMITH, R. H. Chapter 6 - Callus Induction. In: SMITH, R. H. (Ed.). **Plant Tissue Culture (Third Edition)**. San Diego: Academic Press, p.63-79. 2013.
- SÖKMEN, M. et al. *In vitro* antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3309-3312, 2004.
- SU, Y.-H.; LIU, Y.-B.; ZHANG, X.-S. Auxin–cytokinin interaction regulates meristem development. **Molecular Plant**, v. 4, n. 4, p. 616-625, 2011.
- TERMIGNONI, R. R. **Cultura de Tecidos Vegetais**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2005.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa, v. 1, 1998.
- VENTURIERI, G. A.; VENTURIERI, G. C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* (Sterculiaceae). **Acta Amazonica**, v. 34, p. 507-511, 2004.
- VERDEIL, J.-L. et al. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 6, p. 245-252, 2007.
- VOGEL, G. How does a single somatic cell become a whole plant? **Science**, v. 309, n. 5731, p. 86, 2005.
- WARCHOŁ, M. et al. Induction of somatic embryogenesis and biochemical characterization of *Cordyline australis* (G. Forst.) Endl. ‘Red Star’ callus. **Scientia Horticulturae**, v. 192, p. 338-345, 2015.
- XUE, S.; KALININA, O.; LEWANDOWSKI, I. Present and future options for *Miscanthus* propagation and establishment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 49, p. 1233-1246, 2015.