



AJUSTE DE MODELO NÃO LINEAR PARA EM EXPERIMENTOS *IN VITRO* COM MARACUJÁ ROXO

19º Simpósio Nacional de Probabilidade e Estatística

Ana Patricia Bastos Peixoto¹, Tiago Almeida de Oliveira², Edcarlos Miranda de Souza³,
Gláucia Amorim Faria⁴, Carlos Tadeu dos Santos dias⁵

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo determinar o tamanho ótimo de parcelas em experimentos de estabelecimento *in vitro* de maracujá roxo *P. edulis* Sims f. *edulis*, *P. giberti* N. E. Brown. e *P. laurifolia* L. Para cada espécie foram conduzidos ensaios de uniformidade com duas concentrações de sais do meio de cultura (MS e ½ MS) e em cada ensaio realizaram-se avaliações aos 45, 75 e 105 dias após incubação dos explantes. Em cada avaliação e meio de cultura foram simulados diversos tamanhos de parcelas, variando de uma (1) unidade básica até 50 por parcela, sendo cada unidade básica constituída por uma planta. Para a estimação do tamanho ótimo de parcelas empregou-se o método da máxima curvatura modificado. Foram avaliadas estatisticamente as principais características do modelo não linear e as propriedades estatísticas dos estimadores do modelo, determinando bandas de confiança para as respostas esperadas, e um estudo da não linearidade do modelo. Em experimentos *in vitro* o tamanho ótimo de parcela recomendado deve ser o de 11 explantes para *P. edulis* Sims f. *edulis*.

Palavras-chaves: *P. edulis* Sims f. *edulis*, precisão experimental, não linearidade, coeficiente de variação, ensaio de uniformidade.

INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora*, essencialmente americano, é constituído por aproximadamente 630 espécies conhecidas, dessas 152 espécies são procedentes da parte Central e Norte do Brasil com cerca de 64 espécies de frutos comestíveis. No Brasil existe um grande número de plantas nativas do gênero *Passiflora*, conhecidas como maracujá, mas apenas duas delas possuem interesse comercial: *Passiflora edulis*, utilizada para suco e *Passiflora alata*,

¹ Doutoranda em Estatística e Experimentação Agronômica Esalq/USP . apbpeixoto@usp.br

² Doutorando em Estatística e Experimentação Agronômica Esalq/USP. tadolive@esalq.usp.br

³ Doutorando em Estatística e Experimentação Agropecuária pela UFLA. Professor Assistente do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da UFAC. profedcarlos@hotmail.com

⁴ Pós – Doutora, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da UFRB. glauuciaamorim@hotmail.com

⁵ Professor Titular, Doutor em Estatística, Departamento de Ciências Exatas Esalq/USP. ctsdias@esalq.usp.br

conhecida como “maracujá doce” (Doyama et al, 2005). A espécie *Passiflora edulis* Sims f. *edulis*, maracujá roxo é originário do Brasil, Paraguai e norte da Argentina, e agora cultivado comercialmente em quase todos os países tropicais e subtropicais.

O estabelecimento *in vitro* de plantas consiste em introduzir os explantes no meio para desenvolvimento, para isso é necessário conhecer o protocolo de estabelecimento adequado para cada espécie. Esse protocolo é formado pelo conjunto de procedimentos biotecnológicos que envolvem o estabelecimento *in vitro*. O estabelecimento de plantas de maracujá *in vitro* pode ser um grande aliado ao melhoramento genético de plantas, uma vez que se pode escolher genótipos superiores para retirada dos explantes.

Smith (1938) propôs um método para se determinar o tamanho de parcelas baseando-se numa relação empírica entre a variância de parcelas de diferentes tamanhos e o tamanho da parcela, sendo um dos percussores de vários outros modelos. Lessman & Atkins (1963) propuseram um método com o objetivo de eliminar a influência da escala dos eixos coordenados na determinação do ponto de máxima curvatura, ponto em que se determina o tamanho ótimo de parcela, uma alteração no método da máxima curvatura incorporando o coeficiente de heterogeneidade do solo de Smith (1938), pelo estabelecimento de uma relação entre coeficiente de variação ($CV(x)$) e o tamanho da parcela, representada por uma equação de regressão do tipo potencial $Y = aX^{-b}$, em que Y representa o coeficiente de variação, e (X) correspondente ao tamanho da parcela em unidades básicas. Essa alteração foi denominada método da máxima curvatura modificado foi utilizado e aprimorado por Meier & Lessman (1971).

A análise de regressão tem o objetivo de verificar a existência de uma relação funcional significativa entre uma variável com uma ou mais variáveis, obtendo uma equação que explique a variação da variável dependente pela variação dos níveis da variável independente. Segundo Ratkowsky (1983), Bates & Watts (1988), e Draper & Smith (1998) entre outros, a definição para que um modelo seja designado não-linear é de que pelo menos uma das derivadas parciais da variável dependente com relação a algum parâmetro presente no modelo, dependa de algum parâmetro. Desse modo, os modelos de regressão foram classificados por Draper & Smith (1998) como modelos de regressão intrinsecamente lineares e não lineares, os intrinsecamente lineares são aqueles que podem parecer não lineares nos parâmetros a princípio, mas com a utilização de alguma devida transformação se tornam modelos de regressão lineares em novos parâmetros. Os modelos não lineares são aqueles que

não podem ser classificados nem como lineares nos parâmetros nem intrinsecamente lineares nos parâmetros (Draper & Smith, 1998).

No presente estudo foram avaliadas estatisticamente as principais características do modelo não linear descrito por Lessman e Atkins (1963) e foram analisadas as propriedades estatísticas dos estimadores do modelo, determinando bandas de confiança para as respostas esperadas, além disso, foi realizado um estudo da não linearidade do modelo considerando a metodologia de Bates & Watts (1980), dado que o processo de estimação não linear se utiliza de aproximações lineares e segundo estes autores, a inferência considerando essa aproximação pode ser inválida, caso a curvatura da superfície resposta seja alta.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o estabelecimento *in vitro* foram utilizados como material vegetal acessos de *P. edulis* Sims f. *edulis*. As sementes dessas espécies foram oriundas de polinização manual dos acessos do banco ativo de germoplasma de maracujá da *Embrapa Mandioca e Fruticultura*, localizada em Cruz das Almas /BA, utilizando-se da casa de vegetação local para a formação das mudas, tomando-se os devidos cuidados fitossanitários com a qualidade das sementes, preparo do substrato, semeadura e condução das mudas. Os explantes foram retirados em casa de vegetação, levados ao laboratório, onde foram desinfestados com etanol 70 % por 40 segundos e solução de hipoclorito de sódio 0,2% por 15 minutos, e lavados com água destilada esterilizada por quatro vezes. Para o estabelecimento *in vitro* optou-se pelo uso de microestacas. Essas microestacas, com aproximadamente 1 cm de comprimento, foram cultivadas em frascos com 30 mL do meios de cultura, suplementados com 30 gL⁻¹ de sacarose, gelificados com 2 gL⁻¹ de phytigel®, ajustados a um pH de 5,8, autoclavado a 121°C (1 kg cm⁻²) e sem adição de hormônio vegetal. O cultivo foi realizado sob condições de fotoperíodo de 16 h, temperatura de 27 ±1 °C e densidade de fluxo de fótons 22 μE m⁻² s⁻¹.

O tamanho ótimo de parcela foi estimado utilizando-se o método da máxima curvatura modificado, proposto por Lessman e Atkins (1963). Por esse método, a relação entre o coeficiente de variação (*CV*) e o tamanho da parcela com *X* unidades básicas é explicado pelo modelo $CV = aX^{-b}$, em que *a* e *b* são os parâmetros a serem estimados, em que o parâmetro *a* representa a variação entre as parcelas e *b* o índice de heterogeneidade do material genético. A partir da função de curvatura dada por esse modelo, determinou-se o valor da abscissa no qual ocorre o ponto de máxima curvatura, dada por: $X_0 = \exp\{[1/(2b + 2)]\log[(ab)^2(2b + 1)/(b + 2)]\}$, em que *X*₀ é o valor da abscissa no ponto de

máxima curvatura, o qual corresponde à estimativa do tamanho ótimo da parcela experimental.

Para a estimação dos parâmetros do modelo não linear foi utilizada a metodologia de estatística clássica, com o uso do método iterativo de Gauss-Newton (Bates & Watts, 1988). Com o objetivo de investigar a não linearidade do modelo foi utilizado a medida de curvatura de Bates & Watts (1980), já implementada no software R versão 2.10.0, que serve para indicar o quão distante está um modelo não linear de um modelo linear. Para a mesma considerou-se uma “boa” aproximação linear quando os valores dessas medidas não ultrapassaram 0,2, como sugerido pelos autores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O modelo não linear que relaciona o coeficiente de variação com o tamanho da parcela $CV = aX^{-b}$ se ajustou bem aos dados considerando o coeficiente de determinação R^2 e apresentou todas as estimativas significativas com *valor de p* inferior a 0,05 para as duas estimativas. Os intervalos de confiança para os parâmetros, bem como o erro padrão das estimativas foram calculados considerando um nível de confiança de 95% (Tabela 1).

TABELA 1: Estimativas dos parâmetros a e b baseadas na inferência por aproximação linear, erro padrão da estimativa (E.P.E), valor de p para o teste t , intervalo de confiança (IC) de 95% para os parâmetros, e coeficiente de determinação (R^2) para o modelo que estimará o tamanho ótimo de parcelas.

Parâmetro	Estimativa	E.P.E.	Valor-P	IC (95%)	R^2
a	87,1067	2,4709	$< 4,59.10^{-10}$	[81,4592; 92,8253]	0,9626
b	0,2992	0,0198	$< 3.70.10^{-7}$	[0,2534; 0,3447]	

Para verificar se os resultados obtidos na Tabela 1 podem ser considerados válidos pela aproximação linear realizada no processo de estimação, foram calculadas as medidas de não linearidade propostas por Bates & Watts (1980). Os resultados para estas duas medidas apresentaram valores inferiores a 0,1, indicando que os resultados inferenciais podem ser considerados válidos com uma aproximação em torno de 95%, segundo os autores (Tabela2).

TABELA 2: Medidas de curvatura quadrática média¹ (RMS) para o modelo $CV = aX^{-b}$

Curvatura intrínseca	Curvatura de efeito parâmetro
0,0257	0,0686

¹ Valores calculados segundo Bates & Watts (1980).

Com os valores estimados (Tabela 1), determinou-se o valor $X_0 = 10,69$, em que X_0 é valor da abscissa no ponto de máxima curvatura, o qual corresponde à estimativa do tamanho

ótimo da parcela experimental. Na representação gráfica da curva obtida da relação entre o coeficiente de variação plotado contra seu respectivo tamanho de parcela, observa-se que houve redução no coeficiente de variação, à medida em que o tamanho de parcela teve acréscimo. A relação não foi linear entre aumento do tamanho de parcela e diminuição do CV, sendo mais acentuado no início (menores tamanhos de parcelas) e posteriormente (maiores tamanhos de parcelas) seguindo uma tendência à estabilidade. Este fato sugere que o aumento do tamanho de parcela é bom até certo valor, a partir do qual o uso de parcelas maiores não é compensada pelos baixos ganhos na precisão experimental. O ganho em precisão, obtido com a redução no CV é expressivo quando se tem parcela pequena, mas depois que esta atinge um tamanho satisfatório pouco se ganha em precisão com o incremento da parcela. Portanto, de acordo com Bakke (1988) fazendo-se uma inspeção visual na Figura 1 observa-se que parcelas formadas por mais de seis (10) unidades básicas contribuem pouco para melhoria da qualidade experimental, no entanto provocaram aumento no tamanho do experimento.

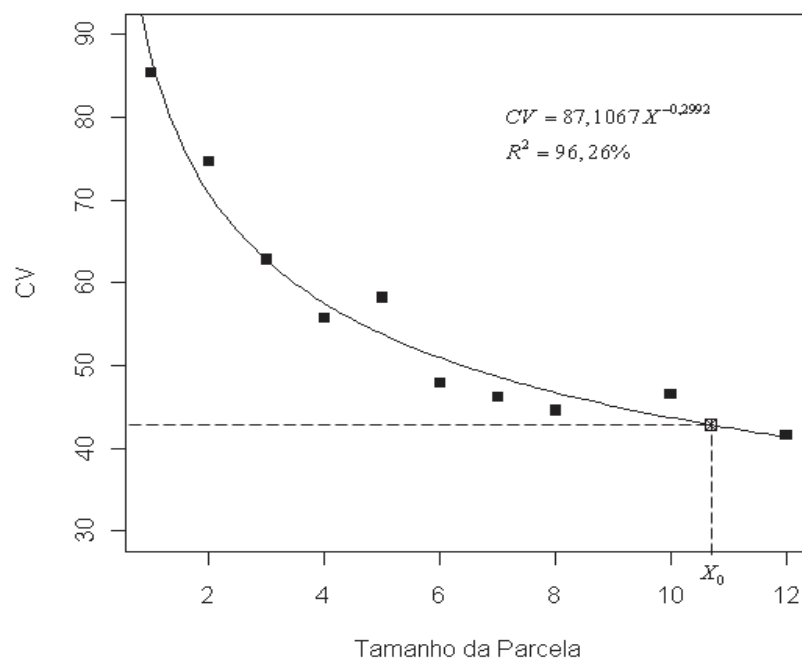


FIGURA 1: Gráfico dos dados experimentais, ajuste do modelo e abscissa que fornece o ponto de máxima curvatura X_0 .

Estes resultados estão próximos dos valores encontrados na literatura; em trabalhos de micropropagação *in vitro* tem-se observado uma variação muito grande no número de repetições e da constituição da parcela experimental. Em experimento de estabelecimento *in vitro* de maracujazeiro. Trevisan (2005), com o objetivo de avaliar a organogênese *in vitro* de maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) pela indução de gemas em discos das folhas, utilizaram delineamento experimental inteiramente casualizado, composto de 5 repetições,

sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri (100 x 15 mm), contendo 8 explantes, Faria et al (2007), usaram parcelas com uma magenta contendo um explante.

CONCLUSÃO

Em experimentos de estabelecimento *in vitro* o tamanho ótimo de parcela recomendado deve ser o de 11 explantes para *P. edulis* Sims f. *edulis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATES, D. M.; WATTS, D. G. **Nonlinear regression analysis and its applications**. New York: Wiley series in probability e mathematical statistics, 1988. 365p.
- BATES, D. M.; WATTS, D. G. Relative curvature measures of nonlinearity (with discussion). **Journal of the Royal Statistical Society**, Ser. B, v. 42, n. 1, p. 1-25, 1980.
- BAKKE, O.A. **Tamanho e forma ótimos de parcelas em delineamentos experimentais**. 1988. 142 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- DOYAMA, J. T.; RODRIGUES, H.G.;NOVELLI,E.L.B.;CEREDA, E.; VILEGAS, W. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.96, p. 371-374, 2005.
- DRAPER, N.R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. 3. ed. New York.:J.Wiley, 1998. 706p.
- FARIA, G.A.; COSTA, M.A.P.C.; LEDO, C.A.S.; JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A.S.; CUNHA, M.A.P. meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento in vitro de espécies de maracujazeiro. **Bragantia**, Campinas, v.66, n.4, p. 535-543, 2007.
- LESSMAN, K.J.; ATKINS, R.E. Optimum plot size and relative efficiency of lattice designs for grain sorghum yield test. **Crop Science**, Madison, v.3, p.477-481, 1963.
- MEIER, V.D.; LESSMAN, K.J. Estimation of optimum field plot shape and size for testing yield in *Crambe abyssinica* Hochst. **Crop Science**, Madison, v.11, n. 5, p. 648-650, Sep. 1971.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and enviroment for statistical computing**: versão 2.10.0.v. Vienna: R Foudation for Statistical Computing. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 23 Abril. 2010.
- RATKOWSKY, D.A. **Nonlinear Regression Modeling**: a Unified Practical Approach. New York: Marcel Dekker, 1983.
- SMITH, H.F. An empirical law describing heterogeneity in the yields of agricultural crops. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.28, n.1, p.1-23, Feb.1938.
- TREVISAN, F. **Transformação genética de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) para resistência ao vírus do endurecimento do fruto**. 2005. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.