

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGIA

ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA EL  
CULTIVO *IN VITRO* DE CHUQUIRAGUA (*Chuquiraga  
jussieu*) A PARTIR DE YEMAS APICALES Y AXILARES

Previa a la obtención de grado académico o título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

GALO XAVIER ORQUERA DELGADO

SANGOLQUÍ, SEPTIEMBRE DE 2013

## **LEGALIZACIÓN DE FIRMAS**

**ELABORADO POR:**

---

Galo Xavier Orquera Delgado

**COORDINADOR DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

---

Dra. Maria Augusta Chavez

**DELEGADO UNIDAD DE ADMISIÓN Y REGISTRO**

---

Abg. Carlos Alfonso Orozco Bravo, Msc.

Lugar y fecha : \_\_\_\_\_

## CERTIFICACIÓN

MsC. Mónica Jadán

Ing. Mat. Pedro Romero Saker

### **Certifican:**

Que el trabajo titulado “Establecimiento de un protocolo para el cultivo *in vitro* de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) a partir de yemas apicales y axilares”, realizado por Galo Xavier Orquera Delgado, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido al grado y valor científico que conlleva este proyecto, además de la importancia de la Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) SI recomiendan su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat(pdf). Autorizan a Galo Xavier Orquera Delgado que lo entregue a Dra. Maria Augusta Chavez, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Sangolquí, Septiembre de 2013

---

**MsC. Mónica Jadán**  
DIRECTOR

---

**Ing. Mat. Pedro Romero Saker**  
CODIRECTOR

## DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Galo Xavier Orquera Delgado

**Declaro que:**

El proyecto de grado denominado “Establecimiento de un protocolo para el cultivo *in vitro* de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) a partir de yemas apicales y axilares”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, Septiembre de 2013

---

Galo Xavier Orquera Delgado

## AUTORIZACIÓN

Yo Galo Xavier Orquera Delgado

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “Establecimiento de un protocolo para el cultivo *in vitro* de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) a partir de yemas apicales y axilares”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, Septiembre de 2013

---

Galo Xavier Orquera Delgado

## DEDICATORIA

A mi padre, Galo Orquera, por ser el ejemplo de ser humano y enseñarme a valorar el transcurso del día a día y significado de la vida.

A mis amigos, Dayana Aguilar, Isabela Velasteguí, José Nuñez, Isaac Almendariz, Luiz Eduardo Gavilanes, Carlos Oliva, Andrés Herrera y Rainer Vazquez quienes me apoyaron durante la elaboración de mi tesis.

**Galo Xavier Orquera Delgado**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a mis abuelitas, Teresita y Luz, las cuales fueron como mi madre.

Agradezco a mi padre, por darme el apoyo incondicional durante el transcurso de mi vida.

Agradezco a mi directora de tesis, Mónica Jadán, por darme la oportunidad de elaborar mi proyecto en las instalaciones del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, que aportó con el financiamiento para la ejecución de esta investigación como tesis de grado.

De igual forma, agradezco a mi codirector, Pedro Romero Saker, por darme tantos consejos, los cuales me fortalecieron durante el periodo universitario y principalmente durante la ejecución de mi tesis, siendo el pilar fundamental durante su ejecución, de todo corazón gracias Pedrito, y cumpliré con la meta que nos trazamos aquel día durante la cita de verificación de resultados.

Agradezco a mi familia, principalmente a mi Tío Byron, Nelson y Yanira, los cuales me brindaron consejos y ayuda.

A mis amigos y amigas, principalmente Dayana Aguilar e Isabela Velasteguí, son como mis hermanas, llenan mi vida de esperanza y amor.

**Galo Xavier Orquera Delgado**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTADO DE FIGURAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTADO DE TABLAS.....</b>	<b>XV</b>
<b>LISTADO DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>XXI</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>XXII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XXIII</b>
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Formulación del problema .....	1
1.2. Justificación del problema .....	2
1.3. Objetivos .....	3
1.3.1. Objetivo principal .....	3
1.3.2. Objetivos específicos.....	4
1.4. Marco teórico .....	5
1.4.1. Características generales de la especie en estudio.....	5
1.4.1.1. Taxonomía .....	5
1.4.1.2. Descripción botánica.....	6
1.4.1.3. Distribución geográfica y origen de la especie .....	8
1.4.1.4. Propiedades y usos .....	8
1.4.1.5. Importancia de la especie .....	9
1.4.2. Cultivo <i>in vitro</i> .....	10
1.4.2.1. Etapas de la micropropagación <i>in vitro</i> .....	13
1.4.2.1.1. Etapa 0: Preparación y selección de plantas donadoras .....	13
1.4.2.1.2. Etapa 1: Establecimiento del cultivo aséptico .....	14
1.4.2.1.3. Etapa 2: Inducción de brotes .....	15
1.4.2.1.4. Etapa 3: Multiplicación de brotes .....	16

1.4.2.1.5. Etapa 4: Enraizamiento y elongación .....	17
1.4.2.1.6. Etapa 5: Aclimatación .....	18
1.4.2.2. Preservación y conservación <i>in vitro</i> de recursos fitogenéticos .....	19
1.4.2.2.1. Micropropagación <i>in vitro</i> .....	19
1.4.2.2.2. Técnicas de almacenamiento <i>in vitro</i> .....	20
1.4.2.2.3. Métodos de conservación <i>in vitro</i> .....	21
1.4.3. Factores que influyen en el cultivo <i>in vitro</i> .....	24
1.4.3.1. Material vegetal .....	24
1.4.3.1.1. Plantas donadoras del material vegetal.....	25
1.4.3.1.2. Tipo y edad de los explantes .....	26
1.4.3.2. Factores químicos .....	27
1.4.3.2.1. Sales inorgánicas .....	27
1.4.3.2.2. Carbohidratos .....	28
1.4.3.2.3. Vitaminas, aditivos y aminoácidos .....	28
1.4.3.2.4. Reguladores de crecimiento .....	29
1.4.3.2.5. Antioxidantes .....	30
1.4.3.2.6. Agente gelificante .....	30
1.4.4. Principales problemas en el cultivo <i>in vitro</i> .....	31
1.4.4.1. Control de la contaminación.....	32
1.4.4.2. Lugar de trabajo.....	32
1.4.4.3. Tamaño del explante.....	33
1.5. Hipótesis .....	34
<b>CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
2.1. Localización del ensayo .....	35
2.2. Selección, colecta y transporte del material vegetal .....	35
2.3. FASE I: Introducción y desinfección de yemas.....	38
2.3.1. Medio de cultivo para la desinfección.....	38
2.3.2. Desinfección de las muestras vegetales.....	39
2.4. FASE II: Inducción a brotes a partir de yemas .....	43

2.4.1. Medios de cultivo para la inducción de brotes .....	43
2.5. FASE III: Multiplicación de brotes .....	46
2.5.1. Medios de cultivo para la multiplicación de brotes .....	46
2.6. FASE IV: Enraizamiento de brotes .....	49
2.6.1. Medios de cultivo para el enraizamiento de brotes .....	49
<b>CAPÍTULO 3. RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
3.1. FASE I: Introducción y desinfección de yemas .....	51
3.1.1. Contaminación .....	51
3.1.2. Oxidación .....	59
3.2. FASE II: Inducción a brotes a partir de yemas .....	68
3.2.1. Aparecimiento de brotes .....	68
3.2.2. Número de brotes .....	75
3.3. FASE III: Multiplicación de brotes .....	81
3.3.1. Supervivencia .....	81
3.3.2. Número de brotes .....	88
3.4. FASE IV: Enraizamiento de brotes .....	94
3.4.1. Presencia de raíces .....	94
<b>CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN</b> .....	<b>103</b>
4.1. Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> .....	103
4.1.1. FASE I: Introducción y desinfección de yemas .....	104
4.1.2. FASE II: Inducción a brotes a partir de yemas .....	108
4.1.3. FASE III: Multiplicación de brotes .....	109
4.1.4. FASE IV: Enraizamiento de brotes .....	112
<b>CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>115</b>
<b>CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>117</b>

**CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFIA** ..... 118

**ANEXO DE RESULTADOS** ..... 123

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 2.1:	(A) Plantas de Chuquiragua en hábitat natural (B) Plantas de Chuquiragua en condiciones de invernadero sometidas a tratamiento fitosanitario (C) Yemas apicales y axilares extraídas de la planta madre. ....36
Figura 2.2:	Protocolo de desinfección. (A) Yemas apicales y axilares de Chuquiragua. (B) Lavados en agua corriente. (C) Lavados en detergente comercial 1% P/V. (D) Lavados con agua destilada estéril. (E) Tratamiento hipoclorito de sodio. ....40
Figura 2.3:	(A) Explante contaminado. (B) Explante no contaminado .....42
Figura 2.4:	(A) Explante oxidado. (B) Explante no oxidado.....42
Figura 2.5:	(A)Yema apical de Chuquiragua con brote. (B) Yema axilar de Chuquiragua con brote. (C) Ausencia de brote .....45
Figura 2.6:	(A) Yema apical con 8 brotes. (B) Yema axilar con 2 brotes. ....45
Figura 2.7:	Conteo mediante observación del número de brotes que contiene cada explante .....47
Figura 2.8:	(A) Brote transplantado a medio de multiplicación vivo. (B) Brote transplantado a medio de multiplicación muerto. ....48
Figura 2.9:	(A) Brote con presencia de raíces. (B) Brote con ausencia de raíces.....50
Figura 3.1:	Número de explantes no contaminados respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio empleados en los tratamientos de desinfección. ....53
Figura 3.2:	Número de explantes no contaminados respecto al tiempo de inmersión empleados en los tratamientos de desinfección. ....53

Figura 3.3:	Árbol de decisiones para los tratamientos de desinfección empleados para yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ) respecto a la variable contaminación. ....	58
Figura 3.4:	Número de explantes no oxidados respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio empleados en los tratamientos de desinfección. ....	61
Figura 3.5:	Número de explantes no oxidados respecto al tiempo de inmersión empleados en los tratamientos de desinfección. ....	61
Figura 3.6:	Árbol de decisiones para los tratamientos de desinfección empleados para yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ) respecto a la variable oxidación. ....	66
Figura 3.7:	Número de explantes con brotes respecto a las concentraciones de BAP empleados en fase de inducción a brotes de yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ). ....	70
Figura 3.8:	Número de explantes con brotes respecto a las concentraciones de IBA empleados en fase de inducción a brotes de yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ). ....	70
Figura 3.9:	Árbol de decisiones para los tratamientos de inducción a brotes empleados para yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ) respecto a la variable apareamiento de brotes. ....	74
Figura 3.10:	Número de brotes respecto a las concentraciones de BAP empleados en fase de inducción a brotes de yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ). ....	77
Figura 3.11:	Número de brotes respecto a las concentraciones de IBA empleados en fase de inducción a brotes de yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ). ....	77

Figura 3.12:	Supervivencia de brotes respecto a las concentraciones de BAP empleados en fase de multiplicación de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ).....	82
Figura 3.13:	Supervivencia de brotes respecto a las concentraciones de IBA empleados en fase de multiplicación de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ). .....	83
Figura 3.14:	Árbol de decisiones para los tratamientos de multiplicación de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ) respecto a la variable supervivencia de brotes. ....	87
Figura 3.15:	Número de brotes obtenidos in vitro, respecto a las concentraciones de BAP empleados en fase de multiplicación de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ).....	89
Figura 3.16:	Número de brotes obtenidos in vitro, respecto a las concentraciones de IBA empleados en fase de multiplicación de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ).....	90
Figura 3.17:	Número de brotes con raíz respecto a las concentraciones de BAP empleados en fase de enraizamiento de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ).....	96
Figura 3.18:	Número de brotes con raíz respecto a las concentraciones de IBA empleados en fase de enraizamiento de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ).....	97
Figura 3.19:	Árbol de decisiones para los tratamientos de enraizamiento de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ) respecto a la variable presencia de raíces. ....	101

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1:	Componentes del Medio Murashige&Skoog 1962, utilizado para la etapa de desinfección.....	38
Tabla 2.2:	Tratamientos de desinfección para la etapa de establecimiento de yemas de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ). .....	41
Tabla 2.3:	Tratamientos de medios de cultivo con 6-BAP en concentraciones (0,1 a 2,0 mgL-1) en combinación con IBA (0 y 0,1 mgL-1) y BRA en concentración (2 mgL-1) para la etapa de establecimiento de yemas de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ). .....	44
Tabla 2.4:	Tratamientos de medios de cultivo con 6-BAP en concentraciones (0,1 a 2,0 mgL-1) en combinación con IBA (0 y 0,1 mgL-1) y BRA en concentración (2 mgL-1) para la fase de multiplicación de brotes a partir de yemas de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ). .....	47
Tabla 2.5:	Tratamientos de medios de cultivo con IBA en concentraciones (1 a 4,0 mgL-1) y BAP en concentraciones (0 y 0,1 mgL-1) para la etapa de enraizamiento de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ). .....	49
Tabla 3.1:	Tabla de contingencia para contaminación respecto a los tratamientos de desinfección.....	52
Tabla 3.2:	Análisis de varianza (ANOVA) para los tratamientos de desinfección realizados en yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ). .....	55
Tabla 3.3:	Prueba de Duncan para la comparación de medias en los tiempos de inmersión para yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ). .....	55

Tabla 3.4:	Prueba de Duncan para la comparación de medias en las concentraciones de hipoclorito de sodio para yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ).....	56
Tabla 3.5:	Prueba de Duncan para los tratamientos de desinfección empleados para yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ).....	56
Tabla 3.6:	Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para los tratamientos de desinfección de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ).....	57
Tabla 3.7:	Regresión logística para los datos categóricos de contaminación de los tratamientos de desinfección de yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ).....	59
Tabla 3.8:	Tabla de contingencia para oxidación respecto a los tratamientos de desinfección.....	60
Tabla 3.9:	Análisis de varianza (ANOVA) para oxidación en los tratamientos de desinfección realizados en yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ).....	63
Tabla 3.10:	Prueba de Duncan para la comparación de medias en oxidación respecto a los tiempos de inmersión para yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ).....	64
Tabla 3.11:	Prueba de Duncan para la comparación de medias en oxidación de las concentraciones de hipoclorito de sodio para yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ).....	64
Tabla 3.12:	Prueba de Duncan para los tratamientos de desinfección empleados para yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ).....	65
Tabla 3.13:	Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para variable oxidación de los tratamientos de desinfección de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ) .....	65

Tabla 3.14:	Regresión logística para los datos categóricos de oxidación de los tratamientos de desinfección de yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ).....	67
Tabla 3.15:	Tabla de contingencia para aparecimiento de brotes respecto a los tratamientos de inducción a brotes de yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ).....	69
Tabla 3.16:	Análisis de varianza (ANOVA) para aparecimiento de brotes en los tratamientos de inducción a brotes realizados en yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ). ....	71
Tabla 3.17:	Prueba de Duncan para la comparación de medias en aparecimiento de brotes respecto a la concentración de BAP para inducción a brotes de yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ).....	72
Tabla 3.18:	Prueba de Duncan para la comparación de medias en aparecimiento de brotes respecto a la concentración de IBA para inducción a brotes de yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ).....	72
Tabla 3.19:	Prueba de Duncan para los tratamientos de inducción de brotes empleados para yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ).....	73
Tabla 3.20:	Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para los tratamientos de inducción a brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ).....	73
Tabla 3.21:	Regresión logística para los datos categóricos de aparecimiento de brotes en los tratamientos de inducción a brote de yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ). ....	75
Tabla 3.22:	Tabla de contingencia para número de brotes respecto a los tratamientos de inducción a brotes de yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ).....	76

Tabla 3.23:	Análisis de varianza (ANOVA) para número de brotes en los tratamientos de inducción a brotes realizados en yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ). .....	78
Tabla 3.24:	Prueba de Duncan para la comparación de medias en número de brotes de brotes respecto a la concentración de BAP para inducción a brotes de yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ).....	79
Tabla 3.25:	Prueba de Duncan para la comparación de medias en número de brotes respecto a la concentración de IBA para inducción a brotes de yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ). .....	79
Tabla 3.26:	Prueba de Duncan para los tratamientos de inducción de brotes empleados para yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ) respecto a la variable número de brotes. ....	80
Tabla 3.27:	Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para los tratamientos de inducción a brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ) para variable número de brotes. ....	80
Tabla 3.28:	Tabla de contingencia para supervivencia de brotes respecto a los tratamientos de multiplicación de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ). .....	82
Tabla 3.29:	Análisis de varianza (ANOVA) para supervivencia de brotes en los tratamientos de multiplicación de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ). .....	84
Tabla 3.30:	Prueba de Duncan para la comparación de medias en supervivencia de brotes de brotes respecto a la concentración de BAP para multiplicación de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ).....	84
Tabla 3.31:	Prueba de Duncan para la comparación de medias en supervivencia de brotes respecto a la concentración de IBA para multiplicación de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ). .....	85

Tabla 3.32:	Prueba de Duncan para los tratamientos de multiplicación de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ) respecto a la variable supervivencia de brotes. ....	85
Tabla 3.33:	Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para los tratamientos de multiplicación de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ) respecto a la variable supervivencia.....	86
Tabla 3.34:	Regresión logística para los datos categóricos de supervivencia de brotes en los tratamientos de multiplicación de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ).....	87
Tabla 3.35:	Tabla de contingencia para número de brotes respecto a los tratamientos de multiplicación de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ).....	88
Tabla 3.36:	Análisis de varianza (ANOVA) para número de brotes en los tratamientos de multiplicación de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ).....	91
Tabla 3.37:	Prueba de Duncan para la comparación de medias de número de brotes respecto a la concentración de BAP para multiplicación de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ).....	92
Tabla 3.38:	Prueba de Duncan para la comparación de medias de número de brotes respecto a la concentración de IBA para multiplicación de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ).....	92
Tabla 3.39:	Prueba de Duncan para los tratamientos de multiplicación de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ) respecto a la variable número de brotes. ....	93
Tabla 3.40:	Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para los tratamientos de multiplicación de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ) respecto a la variable número de brotes. ....	93

Tabla 3.41:	Tabla de contingencia para presencia de raíces en brotes respecto a los tratamientos de enraizamiento de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ). .....	95
Tabla 3.42:	Análisis de varianza (ANOVA) para presencia de raíces en los tratamientos de enraizamiento de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ). .....	98
Tabla 3.43:	Prueba de Duncan para la comparación de medias en presencia de raíces respecto a la concentración de IBA para enraizamiento de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ). .....	99
Tabla 3.44:	Prueba de Duncan para la comparación de medias en presencia de raíces respecto a la concentración de BAP para enraizamiento de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ). .....	99
Tabla 3.45:	Prueba de Duncan para los tratamientos de enraizamiento empleados para brotes in vitro de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ). .....	100
Tabla 3.46:	Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para los tratamientos de inducción a enraizamiento de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ). .....	100
Tabla 3.47:	Regresión logística para los datos categóricos de presencia de raíces en los tratamientos de enraizamiento de brotes de Chuquiragua ( <i>Chuquiraga jussieui</i> ). .....	102

**LISTADO DE ABREVIATURAS**

<b>ANA</b>	Ácido naftalenacético
<b>AIA</b>	Ácido indolacético
<b>BRA</b>	Brasinolida
<b>6-BAP</b>	6-Bencilaminopurina
<b>GA3</b>	Ácido giberélico
<b>IBA</b>	Ácido indol butírico
<b>MS</b>	Medio Murashige&Skoog
<b>NaClO</b>	Hipoclorito de sodio

## RESUMEN

El establecimiento de especies de plantas nativas y vulnerables empleando cultivo *in vitro* se ha convertido en un objeto importante de investigación, para la conservación de plantas a través de la estandarización de protocolos de micropropagación. Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui* JF Gmel.) un arbusto de la cordillera de los Andes, siendo un candidato ideal para el desarrollo de este tipo de técnicas. Esta especie es conocida localmente como Chuquirahua, Flor del caminante, y Flor de los Andes. A través de los años se ha visto amenazada por la mala utilización de los suelos, así como la reforestación con especies que erosionan la tierra, lo que lleva a la reducción de especímenes de Chuquiragua en su hábitat nativo. En este proyecto, los brotes de yemas apicales y axilares se indujeron en medio MS 50% (1962) en presencia de BAP (0,1 a 2,0 mg L<sup>-1</sup>), IBA (0,0-0,1 mg L<sup>-1</sup>) y BRA (2,0 mg L<sup>-1</sup>) durante 30 días. A continuación, los brotes generados se transfirieron a un medio de multiplicación MS 50%, en presencia de BAP (0,1 a 2,0 mg L<sup>-1</sup>), IBA (0,0-0,1 mg L<sup>-1</sup>) y BRA (5 mg L<sup>-1</sup>), seguido de un periodo de incubación durante 30 días. Posteriormente, los brotes obtenidos fueron inducidos a enraizamiento en medio MS 50% en presencia de IBA (2,0 a 6,0 mg L<sup>-1</sup>) y BAP (0,0 a 0,1 mg L<sup>-1</sup>). Los resultados reflejaron que el medio MS suplementado con 50%: BAP 2,0 mg L<sup>-1</sup> + BRA 2 mg L<sup>-1</sup>, permitió la inducción de brotes a partir de yemas apicales y axilares en un 92%, y también que el medio MS suplementado con 50%: BAP 2,0 mg L<sup>-1</sup> + BRA 5 mg L<sup>-1</sup> durante la fase de multiplicación, permitió obtener el mayor número de brotes. Finalmente, el 70% de los brotes presentaron raíces en el medio MS 50% suplementado con: IBA 6,0 mg L<sup>-1</sup> + BAP 0,1 mg L<sup>-1</sup>. La micropropagación de Chuquiragua es fundamental para los esfuerzos de conservación de los ecosistemas andinos, debido al importante papel ecológico que desempeña.

**Palabras claves:** Chuquiragua, BAP, IBA, BRA, MS.

## ABSTRACT

The establishment of native and vulnerable plant species using *in vitro* culture has become a major research objective. This technique is applied for conserving plants through the standardization of micropropagation protocols. Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui* J.F. Gmel.) an Andes mountains shrub genus, is an ideal candidate for the development of these techniques. This species is locally known as Chuquirahua, Walker flower, and Andes' flower. Through the years it has been threatened by poor utilization of soils, as well as reforestation with species that erode the land, leading to the reduction of Chuquiragua in its native habitat. In this project, shoots of apical and axillary buds were induced on MS 50% medium (1962) assaying different concentrations of BAP (0.1 to 2.0 mg L<sup>-1</sup>), IBA (0.0 - 0.1 mg L<sup>-1</sup>) and BRA (2.0 mg L<sup>-1</sup>) for 30 days. Then, generated shoots were transferred to a MS 50% multiplication medium, using BAP (0.1 to 2.0 mg L<sup>-1</sup>), IBA (0.0 - 0.1 mg L<sup>-1</sup>) and BRA (5 mg L<sup>-1</sup>), followed by an incubation of 30 days. Subsequently, obtained shoots were induced for rooting in MS 50% medium in the presence of IBA (2.0 - 6.0 mg L<sup>-1</sup>) and BAP (0.0 - 0.1 mg L<sup>-1</sup>). The results reflected that MS 50% medium supplemented with: BAP 2.0 mg/ L + BRA 2 mg L<sup>-1</sup>, allows the shoot induction of apical and axillary buds in a 92%, and also MS 50% medium supplemented with: BAP 2.0 mg L<sup>-1</sup> + BRA 5 mg L<sup>-1</sup> during multiplication phase, permitted to obtain more number of shoots per buds. To finish, 70% of rooted shoots were obtained with MS 50% medium supplemented with: IBA 6.0 mg L<sup>-1</sup> + BAP 0,1 mg L<sup>-1</sup>. The micropropagation of Chuquiragua is critical to conservation efforts in Andean ecosystems due to the important ecological role that it plays.

**Keywords:** Chuquiragua, BAP, IBA, BRA, MS.

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Formulación del problema

El establecimiento de cultivo *in vitro* de especies vegetales nativas y vulnerables se ha convertido hoy en día en uno de los objetivos principales de investigación, el cual busca la estandarización de un protocolo de micropropagación para la conservación y preservación de plantas endémicas de la región, como es el caso de la Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

La Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) es un ejemplar propio de los páramos, que se ha visto afectada por un desplazamiento de biomasa en las montañas debido al cambio climático. Los cultivos agrícolas ocasionan el mismo patrón, donde la agricultura ha aumentado en más de 710 km<sup>2</sup>, lo que representa un cambio total del 26% a una tasa anual de 1,2%/año del habitat original de los páramos. Gran parte de la agricultura se encuentra entre 3000 y 3200 m.s.n.m., sin embargo, el importante incremento se ha registrado para el intervalo de 3600 a 3800 m.s.n.m, donde habitan especímenes endémicos cuyo número ha disminuido por acción del hombre (Tovar, C. 2013).

Un estudio en el páramo de Ecuador demostró una reducción de casi el 50% de la producción de agua en las áreas forestadas en comparación con las áreas con pastizales naturales (Tovar, C. 2013). Los efectos de la reforestación con árboles de pino también

fueron estudiados en Colombia, donde las especies características de páramo, desaparecieron en las zonas con una mayor cobertura de pino. Sin embargo, los rápidos cambios en la pérdida de hábitat puede conducir a la extinción de especímenes de los páramos andinos, como el caso de *Chuquiraga jussieui* (Tovar, C. 2013).

No existe línea base ni estudios referentes al cultivo *in vitro* de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) en la actualidad, por lo que al ser una especie silvestre vulnerable se recurre al uso de estas técnicas de cultivo *in vitro*, donde se establece un medio de cultivo adecuado para su desarrollo, multiplicación y enraizamiento. Además, se determina un protocolo para la preservación y conservación de esta especie mediante cultivo *in vitro*.

## **1.2. Justificación del problema**

La Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) es una especie endémica de los páramos andinos, que en Ecuador se ha visto amenazada por la mala utilización de los suelos y por la reforestación con especies que erosionan las tierras donde esta habita, causando la reducción y pérdida de ejemplares en los bosques de páramo.

En especies como Chuquiragua al ser especie de páramo, la regeneración y multiplicación de plantas mediante métodos convencionales de propagación clonal son muy escasas, debido a esto, es necesario recurrir al establecimiento de protocolos para su micropropagación *in vitro*, mediante el cual, las posibilidades de propagación aumentan al emplear medios de cultivo ya que estos, brindan las condiciones y nutrientes

necesarios para la inducción a brotes a partir de yemas apicales o axilares, y siguiendo a continuación las fases de multiplicación y enraizamiento, respectivamente.

Es por ello que se plantea el cultivo de tejidos como una estrategia de micropropagación y conservación de la especie, así como una forma recomendable para la obtención de clones con calidad genética y recuperación de bosques de páramo donde la especie ha perdido terreno, lo cual ha imposibilitado el correcto desarrollo y propagación de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

El cultivo *in vitro* de Chuquiragua favorecerá a la comunidad científica para posteriores estudios en cuanto a la diversidad genética, respuestas fisiológicas y funcionales que esta presenta durante el establecimiento de protocolos de micropropagación y producción de metabolitos secundarios, los cuales están involucrados en los múltiples usos medicinales que posee.

De la misma forma, contribuirá con la preservación y conservación de una especie propia de la cordillera andina que posteriormente, una vez establecidos los protocolos de micropropagación, se podrá recurrir al cultivo de Chuquiragua en zonas de los páramos andinos, donde su número de ejemplares se ha reducido casi a su totalidad debido al mal manejo de los recursos por parte del hombre.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo principal**

Establecer un protocolo para el cultivo *in vitro* de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) a partir de yemas apicales y axilares.

### 1.3.2. Objetivos específicos

- a. Establecer un protocolo de desinfección adecuado para el cultivo *in vitro* de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).
- b. Evaluar la inducción inicial a brotes de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).
- c. Determinar la concentración adecuada de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo para la fase de multiplicación de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).
- d. Relacionar el número de brotes por explante de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) durante la fase de multiplicación de brotes con los reguladores de crecimiento.
- e. Establecer la concentración adecuada de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo para la fase de enraizamiento de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).
- f. Evaluar la inducción a formación de raíces de explantes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) durante la fase de enraizamiento.
- g. Analizar los datos estadísticamente y comparar cual de los tratamientos es el más eficaz en cada una de las fases del establecimiento de cultivo *in vitro* de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

## 1.4. Marco teórico

### 1.4.1. Características generales de la especie en estudio

#### 1.4.1.1. Taxonomía

La Chuquiragua *Chuquiraga jussieui* pertenece a la familia *Asteraceae*, subfamilia *Barnadesioideae*, también denominadas *compuestas* por la inflorescencia que poseen, en forma de *estrella*. Es la familia de las Angiospermas con mayor diversidad y riqueza biológica, llegando de esta manera a integrar hasta el 10% de la flora vernácula (Cerón, 2005).

La familia de las *Asteraceae* es cosmopolita, es decir, sus especies habitan desde zonas frías hasta los trópicos, pasando de esta manera por las zonas templadas y subtropicales (Cerón, 2005).

El género *Chuquiraga* consta de 21 especies de arbustos de hoja perenne xeromórficas del oeste de América del Sur, que van a lo largo de los Andes de más de 4000 m.s.n.m en Colombia, en el centro de Chile y sur de Argentina junto con *Dasyphyllum* HBK y *Barnadesia* Mutis, que es uno de los géneros más grandes de *Barnadesioideae*, una subfamilia actualmente considerada el grupo hermano del resto de *Asteraceae* (Ezcurra, C. 1997).

La Chuquiragua se encuentra en la siguiente clasificación taxonómica:

<b>Nombre:</b>	<i>Chuquiraga jussieui</i>
<b>Género:</b>	<i>Chuquiraga</i>
<b>Familia:</b>	Asteraceae
<b>Orden:</b>	Asterales
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida

<b>División/Phylum:</b>	Tracheophyta
<b>Reino:</b>	Plantae

#### 1.4.1.2. Descripción botánica

Es un ejemplar propio de los páramos, es un arbusto que llega a medir hasta 1,5 m de alto. Sus hojas son alternas, miden hasta 1,2 cm de largo, se caracterizan por ser duras y punzantes. La inflorescencia tiene cabezuelas vistosas de hasta 5 cm de largo, son muy compactas, con brácteas punzantes de color anaranjado. Las flores (20–45) son delgadas, de color amarillo o anaranjado, de 20 mm de largo. El fruto con una corona blanco (Cerón, 2005).

Su nombre común es Chuquirahua, es un tipo de arbusto bajo, densamente ramoso, conformado por varias matas hemisféricas de alrededor de 15 a 30 cm de altura. Sus ramas juveniles son crasamente hojosas, de característica seríceo-pubescentes (Izco, 2004).

Chuquiragua exhibe una amplia diversidad en morfología de las hojas y las diferencias en tipos de hojas dentro del género a menudo se han sugerido para estar relacionado con diferentes hábitats. Los cuatro tipos de hojas primarias del género son los siguientes: 1) plana y hipostomatous; 2) plana y anfiestomática; 3) en forma de barco, inversa dorsal-ventral y epistomática, y 4) acicular-involuta, subcentrica, con estomas confinados sólo al fondo de una estrecha ranura peluda en el lado adaxial, es decir, ericoide invertida (Ezcurra, C. 1997).

Chuquiragua puede ser considerado un género templado, ya que la mayoría de sus especies se distribuyen en las regiones del sur de América del Sur con menos de 13°C, siendo esta la temperatura media anual, y que están presentes en los Andes tropicales aparece sólo en los mayores cinturones de vegetación, con un clima más frío (Ezcurra, C. 1997).

Las hojas reducidas se han previsto para ser más eficientes en condiciones de mayor sequía, la temperatura y la irradiancia. Se ha sugerido que las hojas epistomaticas laminadas de baja conductancia estomática son sólo ventajosas en ambientes con estrés hídrico sostenible, para reducir al mínimo la pérdida de agua y evitar el calentamiento excesivo de la hoja (Ezcurra, C. 1997).

Presentan nervadura uninervada, cabezuelas discoides, solitarias en el ápice de las ramas; involucre anchamente turbinado, multiseriado con brácteas imbricadas en 5–10 series, las exteriores largas y reduciéndose hacia adentro, espinicentes café-anaranjadas; receptáculo plano, pubescente (Ezcurra, 1985).

Sus flores son perfectas, presentan de 12 a 45 corolas tubulares, 5 partidas en el ápice, densamente barbadas, amarillas o blanquecinas; 5 estambres, anteras con apéndices basales largos, apéndices apicales linear-lanceolados, agudos; ramas del estilo glabras, cortamente bifidas. Aquenios turbinados, villosos o hirsutos; vilano de cerdas plumosas, uniseriadas (Ezcurra, 1985).

#### **1.4.1.3. Distribución geográfica y origen de la especie**

El género *Chuquiraga* consta de 20 especies distribuidas en los Andes desde el suroeste de Colombia hasta el centro de Chile y en casi toda la Patagonia argentina, donde se encuentra el mayor número de especies. En el Ecuador están representadas 2 especies siempre sobre los 3000 m.s.n.m: *Chuquiraga arcuata* Harling y *Ch. jussieui* J. Gmelin (Ezcurra, 1985).

Se encuentran distribuidos al sur de Colombia, Ecuador, hasta el sur de Perú, siendo así su hábitat propiamente el páramo arbustivo de estas regiones.

#### **1.4.1.4. Propiedades y usos**

Sus usos son principalmente medicinales, por su composición química, donde se presentan compuestos como alcaloides, triterpenos, esteroides, saponinas flavonoides, entre otros. En una muestra seca su composición es mayoritariamente calcio y potasio, en un porcentaje de 4,37% y 3,22%, respectivamente. Es por ello que se la emplea en tratamientos a manera de infusión para la próstata en conjunto con otras especies de tipo medicinal como la Cashamarucha (*Xantium catharticum*) y Cuyicasha. De igual manera se la emplea para infecciones estomacales y para el tratamiento de problemas hepáticos debido a la acción diurética que posee (Cerón, 2005).

#### 1.4.1.5. Importancia de la especie

Al ser una planta nativa de la cordillera de los Andes, la importancia de la preservación y conservación de ejemplares de *Chuquiragua* es sin duda fundamental, debido a la vulnerabilidad que esta especie posee hoy en día.

Con base en los datos morfológicos y moleculares, dos grupos de especies son compatibles y se caracterizaron por la morfología y el tamaño de sus hojas y el color de capítulos y flores. Representantes del páramo andino, pertenecen al grupo de especies polinizadas por colibríes distribuidos en el Norte y Centro de la región de los Andes. Se sugiere que *Chuquiraga jussieui* es originaria de América del Sur, debido a los estudios filogenéticos, los cuales mencionan que existió una migración de sur a norte en el páramo. Las zonas templadas de los hemisferios norte y sur son las zonas de origen importantes para la flora de páramo (Sklenář1. P. 2010).

En Ecuador, el páramo está particularmente bien representada y se encuentra ubicado en 25 o más montañas, tanto en las cordilleras occidental y oriental a lo largo de un tramo de 450 km cerca de la frontera con Colombia. En el norte de la provincia de Azuay, al sur la mayoría de estas montañas de páramo se desarrolla sobre rocas volcánicas, pero en algunas montañas en la cordillera oriental se ha desarrollado en rocas metamórficas (Sklenář1. P. 2005).

Cerca de 3.500 especies de plantas vasculares se han registrado en el páramo y, posiblemente, hasta el 60% de ellas son endémicas. La alta concentración de especies endémicas se suele atribuir a los cambios de extensión horizontal y vertical del páramo durante las oscilaciones climáticas del Pleistoceno y pulsos asociados de ubicación geográfica, como es el caso de *Chuquiraga jussieui* (Sklenář1. P. 2005).

El páramo inferior desde 4100 a 4500 m.s.n.m. suele ser rico en especies, este se caracteriza por arbustos esclerófilos enanos (*Loricaria spp.*, *Chuquiraga jussieui*, *Valeriana microphylla*, *Diplostephium rupestre*, *Pentacalia spp.*) y plantas en cojín (*Plantago rigida*, *Xenophyllum humile*, *Azorella sp.*), pero gramíneas cespitosas son por lo general también importantes (*Calamagrostis intermedia*, *Festuca asplundii*). El páramo superior por encima de 4500 m.s.n.m. se caracteriza por la presencia de *Senecio nivalis*, *S. canescens*, *Dicranoides Arenaria*, y *Cerastium floccosum*. La vegetación es pobre en especies y se limita a los hábitats favorables. Hierbas del mechón y arbustos esclerófilos son en su mayoría ausentes, y las formas de crecimiento más comunes son las gramíneas enanas, subarbustos postrados y hierbas, rosetas acaulescentes y plantas en cojín. Con 388 especies de plantas vasculares, la flora del páramo de Ecuador parece ser más rica en especies de otras floras de páramo (Sklenář1. P. 2005).

La flor de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) brinda de néctar a los colibríes *Oreotrochilus chimborazo*, los cuales han ido desapareciendo poco a poco debido a la pérdida de esta especie de arbusto característica de los Andes. Además posee propiedades medicinales que aun no han sido estudiadas a profundidad, las cuales podrían ser fuente de estudio e investigación.

#### **1.4.2. Cultivo *in vitro***

El cultivo *in vitro* de plantas o tejidos vegetales se define como al conjunto de técnicas de cultivo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles de porciones de una planta madre, semillas, embriones, órganos, explantes, tejidos, células y protoplastos, cuya finalidad es el establecimiento de protocolos de micropropagación de especies vegetativas a gran escala (Pierik. R, 1990).

Se caracteriza porque todo este proceso ocurre a micro escala sobre una superficie pequeña, donde se optimizan las condiciones ambientales como condiciones físicas, nutricionales y hormonales, permitiendo de esta manera obtener resultados con mayor eficiencia y plantas libres de microorganismos y organismos patógenos o plagas (Pierik.R, 1990).

Este conjunto de técnicas constituye una herramienta biotecnológica de propagación vegetativa y al igual que los métodos convencionales de propagación, la descendencia presenta las mismas características fenotípicas y genotípicas que la planta madre de la cual se extrajo el material vegetal para su micropropagación (Roca W, Mroginski L, 1993).

A diferencia de la vía sexual de reproducción de plantas, esta técnica origina individuos únicos, los cuales son de importancia para el sector agrícola. El éxito del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales radica en la capacidad que posean las células del explante para su desdiferenciación, y posteriormente, retomar su capacidad de multiplicación y diferenciación a cualquier tipo de tejido que tenga como interés la investigación (Cubero.J, 2003).

Gracias a la totipotencialidad y plasticidad que poseen las células vegetales, hoy en día se ha logrado establecer y determinar varias técnicas de micropropagación *in vitro* en muchas especies vegetales de muy difícil propagación en campo, siendo así de esta manera, la más empleada para la obtención de plantas propicias para el hombre (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

El termino *explante* se emplea cuando no se realiza el estudio de toda la planta, sino solamente una porción de la misma, siendo un órgano o tejido vegetal el que se cultiva *in vitro*. Los problemas por los cuales se atraviesa durante el proceso de

establecimiento del cultivo *in vitro* son principalmente el reproducir las condiciones naturales a las cuales se encuentra la planta, y estas pasar a condiciones de laboratorio, donde se debe tomar en cuenta la temperatura, presión atmosférica, humedad, fotoperiodo, cantidad de luz que se suministra al explante, entre otros (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales posee una serie de ventajas en relación a los métodos de propagación convencionales, como es la obtención de miles de plantas clones a partir de una planta madre, reducción del tiempo que se requiere para la multiplicación de una planta, reducción del área de trabajo, reducción de costos, facilidades durante el transporte del material vegetal y las posibilidades de propagar especies de las cuales existan pocos individuos (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

Para la elección de una especie vegetativa para proceder a su establecimiento de cultivo *in vitro* se debe tener en cuenta que sean difíciles de propagar, especies con problemas de regeneración *in vitro*, especies que al ser propagadas aumentan su valor comercial o especies a las cuales se pretenda realizar investigaciones en el campo de biotecnología, como: Biología molecular, genética molecular, fitopatología, extracción de metabolitos secundarios, etc..

Las técnicas de cultivo *in vitro* pueden agruparse en cinco etapas claramente definidas: etapa cero, en la que se selecciona el material vegetal que se va a emplear como fuente de futuras plántulas; etapa uno, o de establecimiento, en la cual se establece un cultivo primario; etapa dos, o de multiplicación, en la que se tiene como objetivo el obtener la mayor cantidad de plántulas a partir de un explante, etapa tres, o de enraizamiento, donde se busca en devolver a la planta su capacidad de función autótrofa, siendo así capaz de sobrevivir en condiciones de campo y finalmente la etapa cuatro, o

de aclimatación, el cual comprende la transferencia de la planta de las condiciones de laboratorio en la que se encontraba al campo (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

#### **1.4.2.1. Etapas de la micropropagación *in vitro***

##### **1.4.2.1.1. Etapa 0: Preparación y selección de plantas donadoras**

Para poder establecer el cultivo *in vitro* en condiciones de asepsia, es necesario obtener una buena calidad de explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para la obtención de dicho material vegetal es recomendable realizar un control fitosanitario y mantener las condiciones óptimas de crecimiento por varias semanas en un invernadero (Roca, W. Mroginski, M. 1993). La planta donadora del material vegetal deberá ser aquella que presente las mejores características fenotípicas como: número de brotes, vigorosidad, presencia de enfermedades, número de frutos, tamaño, crecimiento, desarrollo, entre otros.

En este ambiente se tendrá el menor contacto con microorganismos o patógenos que alteren los resultados al momento de la desinfección del material vegetal dentro del laboratorio. Durante esta etapa se mantiene a la planta madre o donadora bajo un riguroso control sanitario, condiciones óptimas y nutricionales adecuadas, además de un riego apropiado para permitir el mejor desarrollo, crecimiento vigoroso y libre de patógenos del material vegetal a emplearse durante el establecimiento del cultivo *in vitro* (Castillo A, 2004).

### 1.4.2.1.2. Etapa 1: Establecimiento del cultivo aséptico

Para establecer el cultivo *in vitro* del material vegetal seleccionado es necesario llevar a cabo una desinfección exitosa tanto de la superficie del explante como en las partes más internas en caso de ser necesario, debido a que si existe la presencia de algún microorganismo en el explante, ya sea hongo o bacteria, estos destruirán el cultivo, ya que existe una competencia entre el explante y los contaminantes por los nutrientes que se encuentran presentes en el medio de cultivo, siendo los microorganismos los que poseen altas tasas de multiplicación y desarrollo, acabando por completo con la muestra vegetal (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

En general, el proceso de desinfección puede resumirse en los siguientes pasos (Roca, W. Mroginski, M. 1993):

- Lavado del material vegetal con agua corriente, cuya función principal es retirar restos de tierra y otras partículas que se encuentran en las partes más superficiales (opcional).
- Eliminación de las partes muertas e infectadas de la planta.
- Introducción del explante en alcohol 70% v/v durante unos segundos.
- Inmersión del explante en una solución de Hipoclorito de sodio (por ejemplo 1% v/v) con un agente tensoactivo (Tween 20 o Tween 80) durante 10 o 15 min. La fuente más empleada de Hipoclorito de sodio suele ser el Cloro comercial, éste contiene un 5% v/v de hipoclorito de sodio como agente activo para la desinfección del material vegetal.

- Enjuague del material vegetal con agua destilada estéril para la eliminación y remoción de la solución de hipoclorito de sodio. Es necesario que este enjuague sea realizado bajo condiciones de asepsia, y este es realizado tres veces sucesivamente durante 2 min.

En caso de existir una excesiva contaminación del material vegetal, es necesario el uso de otros agentes desinfectantes como es el Cloruro de mercurio, el cual se disuelve en agua a una concentración de 0,01 – 0,05 (P/V). El material debe estar en contacto durante 2 a 12 min, para ser finalmente enjuagado con agua estéril en condiciones de asepsia. Para la utilización de este producto es necesario tener todas las medidas de bioseguridad, ya que es un producto nocivo para la salud (Pierik. R, 1990).

Durante el proceso de desinfección se debe precautelar la integridad del explantes a fin de evitar la oxidación y necrosamiento del material vegetal, ya que al emplear concentraciones altas de hipoclorito de sodio se ve afectado la viabilidad del explante. No es posible establecer un mismo protocolo de desinfección para cualquier explante de cualquier especie, debido a que el mismo debe estar diseñado en función de varios factores (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

#### **1.4.2.1.3. Etapa 2: Inducción de brotes**

En esta etapa es fundamental establecer un diseño experimental en función de las concentraciones de citoquininas y auxinas que se van a emplear durante el proceso de inducción a brotes. Una correcta concentración entre citoquininas y auxinas permite

obtener una respuesta por parte del material vegetal, aunque concentraciones elevadas de citoquininas suele provocar una inhibición de la respuesta que se quiere obtener del explante.

Una vez establecido el objetivo del cultivo *in vitro* es necesario seleccionar un medio de cultivo que contenga todos los elementos necesarios para obtener la respuesta deseada (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

Un medio de cultivo debe tener una fuente de carbono, nutrimentos minerales, vitaminas, agente gelificante, reguladores de crecimiento, entre otros compuestos (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

#### **1.4.2.1.4. Etapa 3: Multiplicación de brotes**

Durante esta etapa se espera que los explantes que sobrevivan a la etapa de desinfección introducción, originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con hojas bien formadas y buen vigor. En la base de cada hoja existe una yema, la cual se desarrollará luego de estar en contacto con el medio de cultivo. Cada cierto periodo de tiempo (de 3 a 4 semanas), estos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio de cultivo mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados para inducir a la respuesta requerida en el proceso de establecimiento de cultivo *in vitro*. Este proceso se lleva a cabo en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que nos permita mantener las condiciones de asepsia. De esta manera, se llega a aumentar de forma gradual el número de plantas en cada repique o división de las plantas (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

Esto dependerá de la especie vegetal a emplearse durante el desarrollo de la fase de establecimiento del cultivo *in vitro* y de las condiciones del medio de cultivo, así como del área donde se va a llevar a cabo la incubación de los explantes (Pierik R, 1990). El número de plántulas que se obtienen por la vía de la micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando todos los factores que afectan el crecimiento del material vegetal.

La incubación y posterior multiplicación de plántulas de plantas élite se debe llevar a cabo en condiciones controladas, siendo estas, temperatura, calidad e intensidad de luz, humedad relativa, fotoperiodo e higiene (Roca, W. Mroginski, M. 1993). Estas condiciones establecidas para cada cultivo dependiendo de las necesidades que la planta requiera, se logran mediante el empleo de cámaras climatizadas, o cuartos especialmente equipados con aire acondicionado (frío-calor), una buena y uniforme circulación de aire en el interior, dotados de un sistema de alarma para interrumpir la iluminación en caso que el aire acondicionado llegue a fallar (Castillo A., 2004).

#### **1.4.2.1.5. Etapa 4: Enraizamiento y elongación**

La etapa de enraizamiento de los brotes obtenidos en las etapas anteriores requiere generalmente del transplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales, por ejemplo, el medio Murashige&Skoog en una dilución 50% permite obtener resultados positivos en diferentes especies. Así mismo, se requiere cambiar el balance hormonal, es decir, aumentar la concentración ( $\text{mgL}^{-1}$ ) de auxinas y disminuir la concentración de citoquininas exógenas. En algunas especies, es suficiente la eliminación de las citoquininas exógenas para la estimulación de la diferenciación del sistema radical (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

Los brotes obtenidos durante la etapa de multiplicación se transfieren a un medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento o que solo posea hormonas de tipo auxinas. Algunas plantas no requieren del paso por este proceso, ya que al tener auxinas endógenas, estas son las encargadas de inducir una respuesta de enraizamiento del explante, hasta obtener una plántula completa, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento ocurre de forma simultánea (Castillo A., 2004).

Las concentraciones de auxinas y citoquininas se deben establecer durante el proceso de enraizamiento, al observar el índice de enraizamiento que genera cada explante en el medio de cultivo por tratamiento efectuado (Castillo A., 2004)

#### **1.4.2.1.6. Etapa 5: Aclimatación**

Los explantes que recién han sido enraizados suelen ser muy sensibles a los cambios ambientales, de tal forma que el éxito o el fracaso del establecimiento del cultivo *in vitro* dependerá del proceso de aclimatación. A pesar de que el proceso de enraizamiento se de *in vitro* o *ex vitro*, en el momento que se extraen a los explantes de los medio de cultivo, estos están poco adaptados a crecer en un invernadero, debido a que en el medio de cultivo existe una humedad relativa elevada, además que los estomas de sus hojas no están muy bien adaptadas para responder al descenso de humedad, ocurriendo así una desecación del explante (Castillo A., 2004).

Al desarrollarse una plántula en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula cerosa bien desarrollada, la cual es una barrera para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta que esta en contacto con el medio ambiente. Para obtener excelentes resultados durante el proceso, los explantes deben ser

aclimatados en un invernadero, donde se disminuye progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz (Castillo A, 2004).

#### **1.4.2.2. Preservación y conservación *in vitro* de recursos fitogenéticos**

Los recursos fitogenéticos proporcionan la materia prima para la obtención de nuevas y mejores variedades de plantas mediante mejora vegetal clásica o moderna. Son la fuente irremplazable de características tales como resistencia a enfermedades, tolerancia a ambientes adversos, productividad, etc (Roca, W. Mroginski, M. 1993). El mantenimiento de la diversidad genética constituye, además, el mejor sistema de lucha contra la pérdida de especies vegetativas en peligro de extinción. Los recursos fitogenéticos pueden ser conservados tanto *in situ* como *ex situ* y ambos sistemas son considerados como complementarios, no contrapuestos.

La conservación *ex situ* implica la colección de muestras representativas de la variabilidad genética de una población o un cultivar y su mantenimiento en bancos de germoplasma, bien como semillas, cultivos *in vitro*, plantas completas, etc. Existen tres estrategias diferentes mediante las cuales las técnicas de cultivo *in vitro* pueden ser utilizadas en la conservación de germoplasma vegetal (Perez, C. 2008):

##### **1.4.2.2.1. Micropropagación *in vitro***

El uso de técnicas de micropropagación *in vitro* permite incrementar rápidamente el número de individuos en especies con problemas reproductivos y/o con poblaciones

extremadamente reducidas (Roca, W. Mroginski, M. 1993). El material vegetal obtenido de esta forma puede ser de gran valor para investigación, colecciones vivas, para reducir la presión de las colecciones botánicas sobre las poblaciones naturales y, si se considera apropiado, para programas de reintroducción. Mediante la micropropagación, se puede obtener una gran cantidad de plántulas completas en periodos de tiempo corto y con una mínima cantidad de material inicial y, por lo tanto, con un mínimo impacto en las poblaciones nativas (Perez, C. 2008).

Otra ventaja de las técnicas de cultivo *in vitro* es que pueden ser una alternativa a los bancos de semillas para especies de muy pocos individuos dónde la recolección de semillas en la población natural puede afectar su supervivencia de manera crucial (Perez, C. 2008).

Sin embargo, el beneficio de estas técnicas es debatida, particularmente en lo que respecta a la posible variación somaclonal y a la erosión genética producida mediante el proceso. En estas circunstancias, el control de las plantas regeneradas mediante técnicas que permitan detectar la variación somaclonal es de gran interés para eliminar las variantes no deseadas (Perez, C. 2008).

#### **1.4.2.2.2. Técnicas de almacenamiento *in vitro***

El desarrollo de técnicas de almacenamiento *in vitro* son empleados cuando no es posible la conservación de semillas. Estas técnicas permiten la conservación *ex situ* con un costo de mantenimiento muy bajo. La conservación de semillas es el método más utilizado en los bancos de germoplasma, es el más conocido y satisface muchos de los requerimientos de conservación. Sin embargo, es difícil o imposible de aplicar para un número importante de plantas, por ejemplo, plantas que no producen semillas viables,

que tienen semillas recalcitrantes, o plantas que deben multiplicarse vegetativamente para no perder caracteres de interés. En estos casos la conservación *in vitro* es la alternativa más interesante. Es un sistema más económico, sencillo y seguro que las colecciones de campo, facilita la propagación a gran escala y el intercambio de material vegetal entre distintos países evitando problemas de cuarentena (Perez, C. 2008).

Por otra parte, las nuevas biotecnologías, están produciendo distintos materiales vegetales, como protoplastos, células aisladas, callos, entre otros, a veces con nuevas e interesantes características genéticas, que sólo pueden ser conservados *in vitro* (Perez, C. 2008).

#### **1.4.2.2.3. Métodos de conservación *in vitro***

Para el almacenamiento o conservación *in vitro* de material vegetal existen tres convenciones distintas que forman una secuencia lógica para conservación genética a largo plazo:

##### **Crecimiento continuo**

El mantenimiento de los cultivos sin limitación del crecimiento se puede conseguir con cierta facilidad, esto es, cultivar el material vegetal haciendo uso de los métodos estándar de cultivo *in vitro*, en unas condiciones más o menos similares a las de un programa de micropropagación (Perez, C. 2008).

En condiciones de crecimiento continuo, el intervalo entre repiques puede ser desde unos días a varios meses, dependiendo del tipo de cultivo y de la especie. En

cualquier caso, mantener un gran número de cultivos en crecimiento continuo, que no se necesitan de forma inmediata, resulta costoso en cuanto al tiempo y recursos (Perez, C. 2008).

### **Crecimiento limitado**

Los problemas de inestabilidad y las demandas prácticas de subcultivos pueden ser evitadas reduciendo la tasa de crecimiento del material vegetal (Roca, W. Mroginski, M. 1993). Se ha evidenciado que la limitación del crecimiento del material cultivado in vitro se ha obtenido mediante sistemas muy variados:

- Reduciendo la temperatura o iluminación.
- Induciendo stress osmótico.
- Modificando el ambiente gaseoso en los recipientes de cultivo.
- Desecando los especímenes a conservar.
- Alterando el medio nutritivo mediante la reducción u omisión de componentes esenciales para el crecimiento normal de los explantes.
- Incorporando al medio de cultivo compuestos retardantes del crecimiento.

A pesar del avance de todas estas técnicas, desde un punto de vista práctico, la utilización de bajas temperaturas y la manipulación de los componentes del medio de

cultivo son los únicos métodos que pueden ser considerados por su eficacia y simplicidad (Perez, C. 2008).

### **Crioconservación**

Con el fin de evitar por completo los subcultivos y eliminar los riesgos de alteraciones genéticas o fisiológicas durante el almacenamiento de los especímenes, es necesario utilizar un método que implique la supresión de todo proceso metabólico (Roca, W. Mroginski, M. 1993). La única opción es la crioconservación, es decir, el mantenimiento del material vegetal a la temperatura del nitrógeno líquido (- 196°C) o temperaturas próximas (Perez, C. 2008).

Los protocolos de crioconservación pueden dividirse en seis etapas (Perez, C. 2008):

1. Cultivo previo
2. Tratamiento crioprotector
3. Congelación
4. Conservación en nitrógeno líquido
5. Descongelación
6. Recuperación de especímenes viables

El principal problema que conlleva la crioconservación es el desarrollo de procesos de cristalización y recristalización de hielo intracelularmente que son letales para el material vegetal. Por lo tanto, el contenido de agua de los explantes necesita ser controlado hasta llevarlo a un nivel al cual la congelación intracelular sea mínima, aplicando al material vegetal los métodos de deshidratación y crioprotección adecuados (Seguel B, I. 2002).

### **1.4.3. Factores que influyen en el cultivo *in vitro***

#### **1.4.3.1. Material vegetal**

La contaminación del material vegetal que se cultiva *in vitro* depende principalmente de la planta madre donadora, de la cual es necesario llevar a cabo un control fitosanitario y mantener las condiciones adecuadas para favorecer el crecimiento y desarrollo de yemas apicales y axilares, las cuales pueden ser empleadas como explantes durante la etapa de establecimiento del cultivo *in vitro*. De igual manera, en caso de emplear explantes cultivados en el campo, la contaminación del material vegetal es debido a la presencia de microorganismos endógenos, lo que conlleva un elevado porcentaje de aparición de bacterias o hongos, por lo que es necesario (Pierik R, 1990):

- Impedir el contacto de la planta con insectos: para ello es necesario la aplicación de insecticidas, con lo que se evita la contaminación de la planta, ya que en la mayoría de casos, los insectos son vectores de enfermedades (Pierik R, 1990).

- Uso de fungicidas y bactericidas: que pueden ser sistémicos o de contacto, los cuales permiten un control para la proliferación de hongos y bacterias a nivel superficial o interno de la planta (Pierik R, 1990).
- Conservar la humedad baja en invernadero: debido a que la humedad elevada es un ambiente propicio para el desarrollo de bacterias y hongos (Pierik R, 1990).
- No aspersar las plantas en hojas y yemas: es decir, el agua debe ser añadida directamente a la maceta donde se encuentra la planta, debido a que el agua es un elemento fundamental para la reproducción y propagación de microorganismos (Pierik R, 1990).

#### **1.4.3.1.1. Plantas donadoras del material vegetal**

La selección y cuidado de la planta madre es fundamental durante el establecimiento del cultivo *in vitro*, debido a que de ello dependerá el éxito del proceso de desarrollo, diferenciación y proliferación del material vegetal, es por ello, que se requiere que los explantes sean lo más homogéneos, es decir, con características fenotípicas adecuadas y un excelente estado fisiológico (Castillo A, 2004).

Estas plantas donadoras del material vegetal deberán poseer algunas de estas características (Roca, W. Mroginski, M. 1993):

- Edad fisiológica: en cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se emplea de preferencia plantas cuya edad no sea elevada, debido a la capacidad de desdiferenciación que poseen las células, además de la respuesta rápida y efectiva que las mismas generan durante el proceso.
- Producción de frutos: se debe establecer en campo la cantidad que se produce mensualmente de dicha fruta por planta, y de allí seleccionar cual de estas plantas presenta la mayor tasa de producción de frutos, ya sea anualmente o periódicamente.
- Características fenotípicas: estas se observan en el tamaño del fruto, tamaño de la planta, cantidad de hojas por rama, etc..
- Presencia/ausencia de patógenos

#### **1.4.3.1.2. Tipo y edad de los explantes**

En caso de que la fuente del material vegetal sea de una planta de edad adulta, existen otras variables a considerarse como: presencia de fitopatógenos, productividad agrícola así como vigorosidad, es por esto que se emplea de preferencia material vegetal juvenil, ya que la desdiferenciación y multiplicación de dichos tejidos se desarrolla de manera más acelerada y sencilla (Pierik R, 1990).

Es un aspecto de gran influencia en la morfogénesis. Como regla general se puede decir que cuando más joven e indiferenciado se encuentre el explante a cultivar, mejor será su respuesta *in vitro*. Es por ello que los meristemas apicales y axilares son

ampliamente usados en numerosas especies. En el caso de la micropropagación de plantas leñosas, la edad del explante es un factor crítico (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

Si los tejidos son jóvenes, la micropropagación tiene mayores posibilidades de ser exitosa que con tejidos maduros. Este hecho genera la necesidad de realizar tratamientos de rejuvenecimiento de las plantas donadoras de explantes (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

### **1.4.3.2. Factores químicos**

#### **1.4.3.2.1. Sales inorgánicas**

Son en general macroelementos (N, P, K, Ca, Mg, S) y microelementos (Fe, Co, Zn, Ni, B, Al, Mn, Mo, Cu, I) los cuales colaboran en las funciones metabólicas y fisiológicas de la planta. Estos deben estar en proporciones adecuadas para el explante en el medio de cultivo a emplearse durante los ensayos (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

Los micronutrientes son esenciales y se encuentran en bajas concentraciones en las plantas, la mayoría de ellos corresponden a constituyentes enzimáticos, por esto es necesario la presencia de los mismos pero en concentraciones bajas. Los macronutrientes son elementos constituyentes de biomoléculas estructurales, como es el caso de proteínas, lípidos o carbohidratos, o en algunos casos actúan como osmolitos (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

#### **1.4.3.2.2. Carbohidratos**

Se emplea en varios casos sacarosa, aunque depende de la especie a utilizarse en la investigación. Esta se emplea porque los explantes no presentan la característica de ser autótrofos y además para cubrir las necesidades fotosintéticas de la planta (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

El azúcar es un componente importante del medio de cultivo, ya que es esencial para el crecimiento y desarrollo *in vitro*. Los tejidos verdes que poseen las plántulas en desarrollo no son lo suficientemente autótrofos en condiciones *in vitro*, por lo que es necesario suplementar el medio de cultivo en una concentración que varía de 1 a 5% de sacarosa (disacárido). La elección de la concentración de azúcar dependerá del tipo y edad de crecimiento del material vegetal, generalmente el crecimiento y desarrollo de las plántulas requiere de un incremento de la concentración de azúcar, pero en concentraciones elevadas de azúcar se ha evidenciado un decrecimiento del explante (Pierik. R.L.M., 1997).

#### **1.4.3.2.3. Vitaminas, aditivos y aminoácidos**

De todas las que comúnmente se incorporan a los medios, pareciera que la tiamina es la única realmente imprescindible para el buen crecimiento de los cultivos. Estas son importantes debido a la cantidad de nitrógeno y coenzimas que estas brindan al explante, para su correcto desarrollo y multiplicación (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

Las concentraciones de vitaminas y aminoácidos depende del medio de cultivo a prepararse y de la planta a establecerse *in vitro*, ya que concentraciones elevadas de nitrógeno en el medio de cultivo inducen al necrosamiento e intoxicación del material vegetal (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

#### **1.4.3.2.4. Reguladores de crecimiento**

En la mayoría de los casos los medios de cultivo utilizados para el establecimiento del material vegetal contienen auxinas (ANA, 2,4-D, AIA, IBA, NOA, Dicamba, Picloram) y/o citocininas (BA, CIN, ZEA, 2iP, Thidiazurón). Las giberelinas (especialmente GA3) son requeridas en algunas ocasiones para el cultivo de meristemas o para la elongación de brotes. El ABA, es usado en algunos casos (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

Los reguladores de crecimiento u hormonas no son nutrientes, sino, son los encargados de generar una respuesta en el explante, ya sea producción de brotes, inducción a callogénesis, organogénesis y embriogénesis somática. Estos son productos que se encuentran naturalmente en las plantas, aunque en su interior, estos no son generados en cantidades suficientes, por ello, es necesario la adición de auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y muchas otras sustancias que son empleadas como reguladores de crecimiento (Castillo A., 2004).

Las respuestas que genera el explante van a depender de las concentraciones de los reguladores de crecimiento, así como el sinergismo entre auxinas y citoquininas. Ocasionalmente los medios de cultivo pueden inducir a que los explantes pierdan la necesidad de hormonas (Castillo A., 2004).

#### **1.4.3.2.5. Antioxidantes**

El empleo de sustancias antioxidantes (ácido ascórbico, L-cisteína, polivinilpirrolidona) pueden ser de utilidad para el cultivo de explantes con alto contenido de polifenoles, cuya oxidación produce el oscurecimiento y eventual muerte de los explantes. En este caso también es útil emplear las soluciones antioxidantes durante la preparación del explante, como también incubar los cultivos en la oscuridad o a bajas intensidades de luz. También se suele acortar el intervalo de tiempo entre subcultivos, como un medio para disminuir los efectos nocivos de la oxidación de polifenoles.

El carbón activado (0,1 – 5%), incorporado al medio, ha mostrado ser de utilidad en el cultivo de algunos explantes, ya que absorbe algunos de los metabolitos que son excretados por el explante durante el proceso de establecimiento in vitro (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

Otro de los factores para la reducción de la oxidación de los explantes es la disminución de las sales del medio de cultivo, como es el caso del medio Murashige&Skoog (MS), donde dependiendo del grado de oxidación del explante, la dilución puede llegar hasta al 75%.

#### **1.4.3.2.6. Agente gelificante**

En los medios semisólidos por lo general se adicional un agente gelificante, como es el caso del Agar, en concentraciones de 0,6 a 0,1%. Es necesario tomar en cuenta la pureza del gelificante, ya que en algunas ocasiones existe la presencia de

impurezas de naturaleza variada y de esta manera influir en los resultados finales (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

Existen varios tipos de agentes gelificantes, siendo beneficioso aquellos donde el tamaño de poro es mayor, permitiendo de esta manera una mejor absorción de los micro y macronutrientes presentes en el medio de cultivo, así como las hormonas de crecimiento. Se puede emplear Agargel (0,40-0,60%), Transfergel (2-2,60%), Phytigel (0,25- 0,40%), Agarosa (0,80-0,90%) y Gelrite (0,10-0,20%) (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

#### **1.4.4. Principales problemas en el cultivo *in vitro***

Existen varios factores involucrados en el fracaso del establecimiento del cultivo *in vitro* de especies vegetativas, donde el principal problema es la contaminación. La mayoría de ellos pueden ser controlados mediante el uso de controles fitosanitarios o un correcto protocolo de desinfección, aunque dependerá en su totalidad de la planta donadora, es por ello que la selección de la planta élite es fundamental al momento de iniciar el estudio.

Entre los principales problemas durante el establecimiento de cultivo *in vitro* se tiene:

#### **1.4.4.1. Control de la contaminación**

Para descartar la posibilidad de presencia de contaminantes en las muestras vegetales es necesario recurrir a la realización de un control fitosanitario en un invernadero de condiciones controladas, donde el uso de fungicidas, bactericidas e insecticidas es indispensable. Dependiendo de la especie se debe considerar el fungicida a emplearse, teniendo así, fungicidas de contacto, los cuales poseen agentes activos que reducen o eliminan por completo al hongo transcurridas unas semanas de su aspersión, o fungicidas sistémicos, los cuales ingresan al sistema vascular de la planta, ejerciendo su acción a lo largo de su transporte (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

Es necesario realizar una cuarentena de las especies muestreadas, para que de esta forma, se evite una posible contaminación de las plantas que ya han sido tratadas con anterioridad y que se están empleando durante el establecimiento del cultivo *in vitro* (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

#### **1.4.4.2. Lugar de trabajo**

La asepsia del lugar de trabajo es esencial durante la siembra del material vegetal desinfectado previamente, para ello se recurre a la utilización de aspersores de alcohol 70% para desinfectar el área de trabajo, alcohol 90% v/v para el flameo de pinzas, bisturí y mesón donde se realizarán los cortes de restos vegetativos que no serán empleados para los medios de cultivo.

Para la siembra del material se emplea una cámara de transferencia con aire estéril o gabinete de flujo laminar , localizada en un ambiente limpio y no expuesta a corrientes de aire. En caso de no disponer este equipamiento, se pueden sustituir con cuartos esterilizados previamente con luz ultravioleta (nunca exponerse a la luz UV en forma directa) (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

El operador también es otra fuente de contaminación, y para mantener la asepsia en el lugar de trabajo se realiza un lavado a profundidad de las manos, donde el uso de jabón antibacteriano es fundamental durante el proceso. Además el uso de ropa estéril es recomendado para el cultivo en cámara de flujo laminar, para disminuir y evitar de esta manera otra fuente de contaminación (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

#### **1.4.4.3. Tamaño del explante**

En general, cuanto más grande sea el explante mayores serán las posibilidades de inducir la proliferación de callos o la regeneración directa de órganos. Sin embargo, a mayor tamaño de explante también son mayores las probabilidades de que los cultivos se contaminen con microorganismos.

También es necesario tener en cuenta que existe un tamaño mínimo del explante, que depende de la especie y del material vegetal, por debajo del cual no es fácil lograr el establecimiento de los cultivos. Los explantes muy pequeños suelen requerir del empleo de medios más complejos o de los denominados medios acondicionados (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

### **1.5. Hipótesis**

Existe un protocolo para el cultivo *in vitro* de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) que permite, a partir de yemas apicales y axilares, obtener plántulas viables en forma significativa.

## CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Localización del ensayo

La fase de laboratorio se desarrolló en las instalaciones de los Laboratorios de Cultivo de Tejidos Vegetales perteneciente al Departamento de Ciencias de la Vida de la Escuela Politécnica del Ejército (ESPE), ubicado en el Campus Politécnico de Sangolquí, con dirección: Av. El Progreso s/n - vía Amaguaña, parroquia Sangolquí, cantón Rumiñahui, de la provincia de Pichincha, Ecuador, y cuyas coordenadas son: Latitud 0°18'53,891'' (Sur), Longitud 78°26'46,562'' (Oeste), Altura Elipsoidal 2518.640 m.

### 2.2. Selección, colecta y transporte del material vegetal

Las muestras de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) se obtuvieron de la provincia de Tungurahua, cantón Ambato (Al 3535 m.s.n.m., ubicación: 01°16, 2325, 078°45232 O) de las cuales fueron seleccionadas las que presentaron mejores características fenotípicas como: mayor número de renuevo de yemas, plantas libres de hongos o microorganismos, vigorosidad, con follaje perenne y denso.

Las plantas fueron transportadas en cubetas adecuadas con tierra del lugar de donde fueron muestreadas a fin de evitar el maltrato mecánico, para luego ser ubicadas en los invernaderos del laboratorio, manteniendo condiciones controladas de temperatura y humedad relativa.

Se escogieron ejemplares de Chuquiragua con las mejores características fenotípicas y fisiológicas, en cuanto a la presencia/ausencia de fitopatógenos y microorganismos que puedan dificultar el trabajo para la desinfección del material vegetal. A estas plantas seleccionadas se las denominaron plantas madre; que son aquellas que brindan de explantes para su introducción *in vitro*.

Las plantas donadoras tenían una altura promedio de 50 centímetros; figura 2.1, de las cuales se extrajo tanto yemas apicales como axilares, debido a la tasa de división celular que estas poseen, además de la rápida respuestas que se genera.



**Figura 2.1:** (A) Plantas de Chuquiragua en hábitat natural (B) Plantas de Chuquiragua en condiciones de invernadero sometidas a tratamiento fitosanitario (C) Yemas apicales y axilares extraídas de la planta madre.

Se realizó un control fitosanitario para eliminar contaminaciones fúngicas en el área foliar y externa de las plantas, el cual consistió en la aplicación de un fungicida de contacto (Thicarb® SC35-15) con principio activo: 2-metoxicarbamilo-bencimidazol y

bisulfuro de tetrametiltio carbamilo en una solución al 0.5% v/v durante 15 días con una aplicación cada 3 días.

Se consideró la edad del material vegetal durante el muestreo realizado, ya que mientras más joven sea se logra reducir la cantidad de fenoles excretados por la planta durante el proceso de corte y siembra, con ello se consigue la reducción de la oxidación del medio o el explante.

Las condiciones del invernadero en las que se aclimató las plantas fueron: humedad controlada mediante el uso de cubetas llenas de agua (valores entre  $50\pm 10\%$  Hr.), la temperatura controlada por medio de la ventilación del invernadero (valores entre  $20\pm 5$  °C) con la apertura y cierre de las ventanillas, el fotoperiodo varió entre 10h oscuridad y 12h luz (condiciones ambientales).

Las plantas de Chuquiragua que fueron aclimatadas y sometidas a los tratamientos fitosanitarios en el invernadero se emplearon en el proceso de micropropagación *in vitro*, donde se seccionó las yemas apicales y axilares para proceder inmediatamente a la introducción, para evitar la oxidación del material vegetal.

## 2.3. FASE I: Introducción y desinfección de yemas

### 2.3.1. Medio de cultivo para la desinfección

El medio empleado para la introducción del material vegetal fue el medio Murashige&Skoog (MS) 1962 en dilución 50%, cuyos componentes se detallan en la tabla 2.1.

**Tabla 2.1:** Componentes del Medio Murashige&Skoog 1962, utilizado para la etapa de desinfección

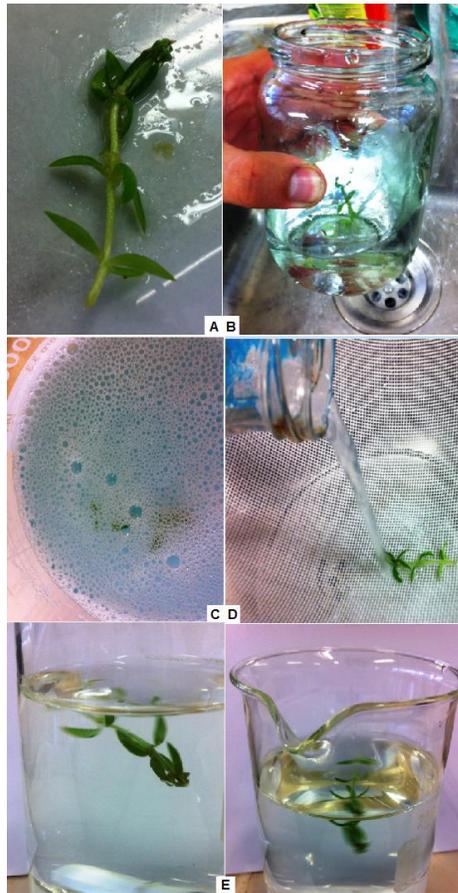
<b>Medio Murashige&amp;Skoog</b>	
<b>Componente</b>	<b>Concentración (mgL<sup>-1</sup>)</b>
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	1650
<b>KNO<sub>3</sub></b>	1900
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	370
<b>MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O</b>	16,9
<b>ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	8,6
<b>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</b>	0,025
<b>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	440
<b>KI</b>	0,83
<b>CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	0,025
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	170
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	6,2
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	0,25
<b>FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	27,84
<b>Na<sub>2</sub>EDTA</b>	37,24

Se empleó este medio a la mitad de su concentración como medida preventiva para evitar la oxidación de los explantes. En la fase de desinfección la concentración de agar fue de 6,0 gL<sup>-1</sup> y 20 gL<sup>-1</sup> de azúcar. El medio de cultivo fue esterilizado en el autoclave durante 30 min a 121°C y 15 PSI.

### **2.3.2. Desinfección de las muestras vegetales**

Realizado el tratamiento fitosanitario a las plantas donadoras de explantes se procedió a seccionar las muestras de yemas apicales y axilares en un tamaño promedio de 5 cm tratando de cuidar el material vegetal.

El protocolo de desinfección consistió en un lavado con agua corriente durante 30 seg. de cada explante, en seguida se las sumergió en una solución 1% P/V de detergente comercial mas Tween 20 al 3% por 15 min. en agitación. Inmediatamente: se realizó 3 enjuagues del material vegetal empleando agua destilada por 3 min. seguida de diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión adecuados a la concentración que se implementó para impedir el proceso de necrosamiento del explante; soluciones de cloro (0,5 – 1,5% v/v) más Tween 20 al 3% con tiempos de inmersión desde 10 a 15 min. Finalmente se realizó 3 lavados de los explantes que se introducen a la cámara de flujo laminar con agua destilada estéril, donde cada lavado tenía una duración aproximada de 5 min. Concluido el proceso de desinfección continúa la siembra de las yemas apicales y axilares de Chuquiragua; figura 2.2. La cámara de siembra previamente fue desinfectada con aspensor de alcohol 70% v/v, esterilizada con luz ultravioleta (UV) durante 30 min. seguida por flujo de aire estéril por 10 min. bajo condiciones completamente asépticas.



**Figura 2.2:** Protocolo de desinfección. (A) Yemas apicales y axilares de Chuquiragua. (B) Lavados en agua corriente. (C) Lavados en detergente comercial 1% P/V. (D) Lavados con agua destilada estéril. (E) Tratamiento hipoclorito de sodio.

Para el proceso de siembra se seccionó las partes necrosadas a causa de la desinfección con hipoclorito de sodio, tratando de evitar el maltrato del material vegetal y dejando intacto al explante.

Los parámetros a medir en esta fase fueron el número de explantes contaminados, oxidados (necrosis) o no oxidados. En la tabla 2.2 se detallan los tratamientos de desinfección empleados.

**Tabla 2.2:** Tratamientos de desinfección para la etapa de establecimiento de yemas de *Chuquiraga (Chuquiraga jussieui)*.

Tratamiento	Concentración hipoclorito de sodio (V/V)	Tiempo inmersión (min)
1	0,5	10
2	1	10
3	1,5	10
4	0,5	15
5	1	15
6	1,5	15

Se realizó 10 observaciones por tratamiento, siendo la unidad experimental un frasco con un explante (yema apical o axilar), las cuales se incubaron a temperatura  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 40 a 60% de humedad relativa, 2000 a 2500 lux y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. Las variables a ser evaluadas se describen a continuación:

- **Contaminación:** mediante observación se determinó un explante contaminado (hongo o bacteria) y se le asignó el valor de 0 y a un explante no contaminado el valor de 1.



**Figura 2.3:** (A) Explante contaminado. (B) Explante no contaminado

- **Oxidación:** mediante la observación se determinó si un explante presenta oxidación de su tejido se le asignó el valor de 0 y si el explante no presenta oxidación se le asignó el valor de 1.



**Figura 2.4:** (A) Explante oxidado. (B) Explante no oxidado

Para la evaluación de los resultados se empleó un análisis estadístico y exploratorio de datos con gráfica. Se desarrolló un análisis inferencial mediante el análisis de varianza (ANOVA) utilizando la prueba de Duncan. Todas las observaciones se realizaron al cabo de 4 semanas de iniciado el ensayo.

## **2.4. FASE II: Inducción a brotes a partir de yemas**

Una vez establecido el mejor protocolo de desinfección continua la fase del proceso *in vitro*, en el cual se induce a la formación de brotes, los cuales son capaces de regenerar plántulas completas (Roca W, Mroginski L., 1993).

En esta fase se introdujeron yemas apicales y axilales de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) de un tamaño promedio de 2 centímetros, las cuales fueron sometidas al tratamiento de desinfección que resultó ser el mejor en cuanto a la remoción y eliminación de contaminantes y viabilidad del explante.

### **2.4.1. Medios de cultivo para la inducción de brotes**

El medio de cultivo que se utilizó durante esta fase fue el medio Murashige&Skoog (M&S) en dilución 50%, enriquecido con 20 gL<sup>-1</sup> de azúcar y 6,0 gL<sup>-1</sup> de Agar, se trabajó a pH 5,7 – 5,8; suplementado con 6 – bencilaminopurina (BAP) en concentraciones de (0,1 a 2,0 mgL<sup>-1</sup>) en combinación con IBA en concentraciones (0 y 0,1 mgL<sup>-1</sup>) y BRA en concentración (2 mgL<sup>-1</sup>).

Los medios de cultivo se esterilizaron en el autoclave durante 30 minutos a 121°C de temperatura y 15 psi y posterior a la siembra se incubaron a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 40 a 60% de humedad relativa, 2000 a 2500 lux y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

Para esta etapa se planteó un diseño completamente al azar (DCA) en el que probaron 6 tratamientos más un control (Tabla 2.3) con 25 repeticiones cada uno de ellos, teniendo como unidad experimental a una yema apical o axilar inoculada en un frasco con medio de cultivo.

**Tabla 2.3:** Tratamientos de medios de cultivo con 6-BAP en concentraciones (0,1 a 2,0  $\text{mgL}^{-1}$ ) en combinación con IBA (0 y 0,1  $\text{mgL}^{-1}$ ) y BRA en concentración (2  $\text{mgL}^{-1}$ ) para la etapa de establecimiento de yemas de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Tratamiento	Concentración 6-BAP ( $\text{mgL}^{-1}$ )	Concentración IBA ( $\text{mgL}^{-1}$ )	Concentración BRA ( $\text{mgL}^{-1}$ )
0	0	0	0
1	0,1	0	2
2	1	0	2
3	2	0	2
4	0,1	0,1	2
5	1	0,1	2
6	2	0,1	2

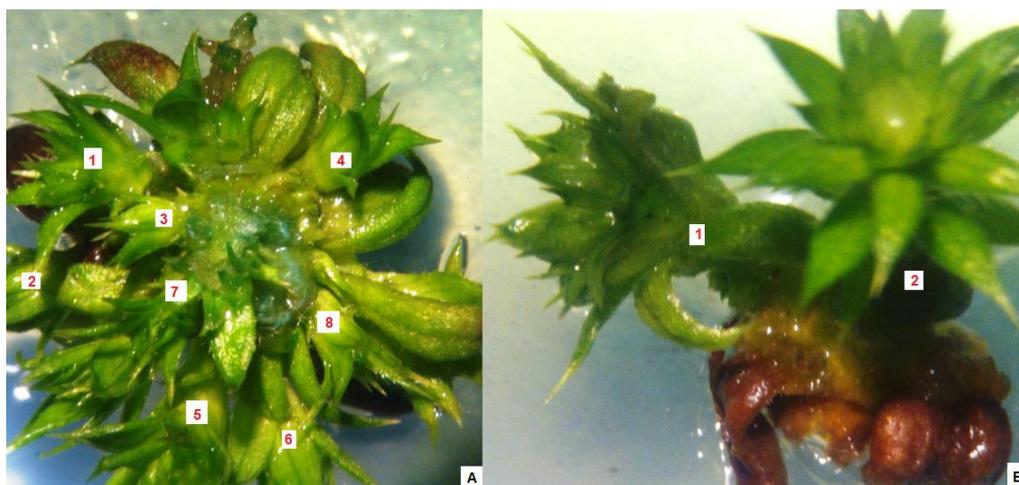
Las variables a evaluar se describen a continuación:

- **Aparecimiento de brotes:** se observó el aparecimiento de brotes en el explante, dando valores de 1 a explantes que presentaban brotes y 0 a los que no presentaban brotes. (Figura 2.5).

- **Número de brotes:** se observó el número de brotes que tengan los explantes. (Figura 2.6)



**Figura 2.5:** (A) Yema apical de Chuquiragua con brote. (B) Yema axilar de Chuquiragua con brote. (C) Ausencia de brote



**Figura 2.6:** (A) Yema apical con 8 brotes. (B) Yema axilar con 2 brotes.

La evaluación se realizó al cumplir 4 semanas el cultivo obteniéndose un análisis estadístico exploratorio de datos con gráficos y un análisis inferencial realizando análisis de varianza (ANOVA) utilizando la prueba de Duncan al 5% de IDC.

## **2.5. FASE III: Multiplicación de brotes**

Se emplearon como explantes para esta fase los brotes que presentaron respuesta en la fase de inducción de brotes, donde la evaluación se realizó estableciendo diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (citoquininas y auxinas) en el medio de cultivo para determinar las concentraciones óptimas para la multiplicación *in vitro* de Chuquiragua.

### **2.5.1. Medios de cultivo para la multiplicación de brotes**

Se emplearon 6 tratamientos más un control, para los cuales se operó con concentraciones de 6-Bencilaminopurina (6-BAP) (0,1 a 2,0 mgL<sup>-1</sup>) en combinación o no de Ácido indol butírico (IBA) (0 y 0,1 mgL<sup>-1</sup>) y Brasinolida (BRA) (5 mgL<sup>-1</sup>), con esto se esperó obtener una múltiple aparición de brotes. (Tabla 2.4).

**Tabla 2.4:** Tratamientos de medios de cultivo con 6-BAP en concentraciones (0,1 a 2,0 mgL<sup>-1</sup>) en combinación con IBA (0 y 0,1 mgL<sup>-1</sup>) y BRA en concentración (2 mgL<sup>-1</sup>) para la fase de multiplicación de brotes a partir de yemas de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Tratamiento	Concentración 6-BAP (mgL <sup>-1</sup> )	Concentración IBA (mgL <sup>-1</sup> )	Concentración BRA (mgL <sup>-1</sup> )
0	0	0	0
1	0,1	0	5
2	1	0	5
3	2	0	5
4	0,1	0,1	5
5	1	0,1	5
6	2	0,1	5

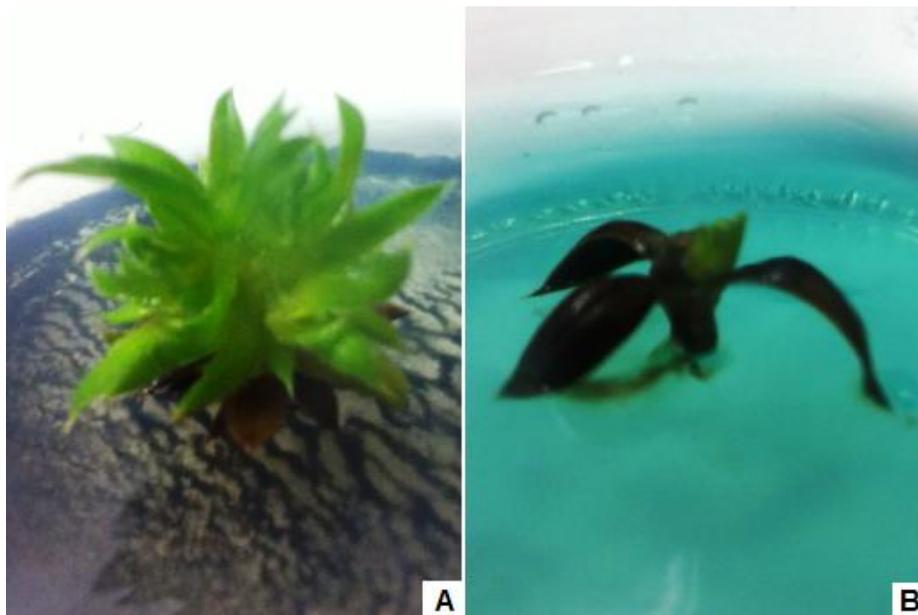
Se realizó 10 repeticiones por tratamiento, la unidad experimental fue un frasco con un brote inducido en yema y las variables a evaluar se describen a continuación:

- **Número de brotes:** se contaron los brotes que contenga cada explante (Figura 2.7).



**Figura 2.7:** Conteo mediante observación del número de brotes que contiene cada explante

- **Supervivencia de los brotes:** se observó la supervivencia de la yema dando valores de 1 al brote que sobrevivió y 0 al brote que no sobrevivió (Figura 2.8).



**Figura 2.8:** (A) Brote transplantedo a medio de multiplicación vivo. (B) Brote transplantedo a medio de multiplicación muerto.

La evaluación se realizó mediante observación durante las 4 semanas transcurrido el ensayo de multiplicación de brotes, es decir, traspaso a nuevos medios de los brotes inducidos anteriormente.

Se realizó un análisis estadístico y exploratorio de los datos mediante construcción de gráficas y de igual manera se empleó un análisis de varianza (ANOVA) con los datos del DCA y la comparación entre tratamientos mediante la prueba de Duncan al 5% de IDC.

## 2.6. FASE IV: Enraizamiento de brotes

Se emplearon como explantes para esta fase brotes de Chuquiragua provenientes de la fase de multiplicación, los cuales fueron inducidos a enraizamiento mediante la combinación o no de auxinas y citoquininas.

### 2.6.1. Medios de cultivo para el enraizamiento de brotes

Los 6 tratamientos empleados para la inducción de raíces *in vitro* incluyeron el uso de IBA en concentraciones (2,0 a 6,0 mgL<sup>-1</sup>) y BAP en concentraciones (0 y 0,1 mgL<sup>-1</sup>) más un testigo, suplementado con 45 gL<sup>-1</sup> azúcar y 5 gL<sup>-1</sup> agar, se trabajó con un pH de 5.7 a 5.8. De esta manera se obtuvieron plántulas completas de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

**Tabla 2.5:** Tratamientos de medios de cultivo con IBA en concentraciones (2 a 6,0 mgL<sup>-1</sup>) y BAP en concentraciones (0 y 0,1 mgL<sup>-1</sup>) para la etapa de enraizamiento de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Tratamiento	Concentración IBA (mgL <sup>-1</sup> )	Concentración BAP (mgL <sup>-1</sup> )
0	0	0
1	2	0
2	4	0
3	6	0
4	2	0,1
5	4	0,1
6	6	0,1

Se realizó 10 repeticiones por tratamiento, la unidad experimental fue un frasco con un brote y las variables a evaluar se describen a continuación:

- **Presencia de raíces:** se observó el apareamiento de raíces en los brotes a inducidos, dando el valor de 1 al brote con raíces y 0 al que no posee.



**Figura 2.9:** (A) Brote con presencia de raíces. (B) Brote con ausencia de raíces.

## CAPÍTULO 3. RESULTADOS

### 3.1. FASE I: Introducción y desinfección de yemas

Durante la etapa de desinfección se evaluó contaminación y oxidación de yemas axilares y apicales de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) introducidas, utilizando tratamientos con hipoclorito de sodio en distintas concentraciones y tiempos de inmersión. Los datos fueron evaluados a los 30 días de la siembra de los explantes en el medio de cultivo de establecimiento.

#### 3.1.1. Contaminación

Para la desinfección de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*), los tratamientos empleados corresponden a los descritos en la tabla 2.2. del capítulo anterior.

#### Análisis exploratorio de datos

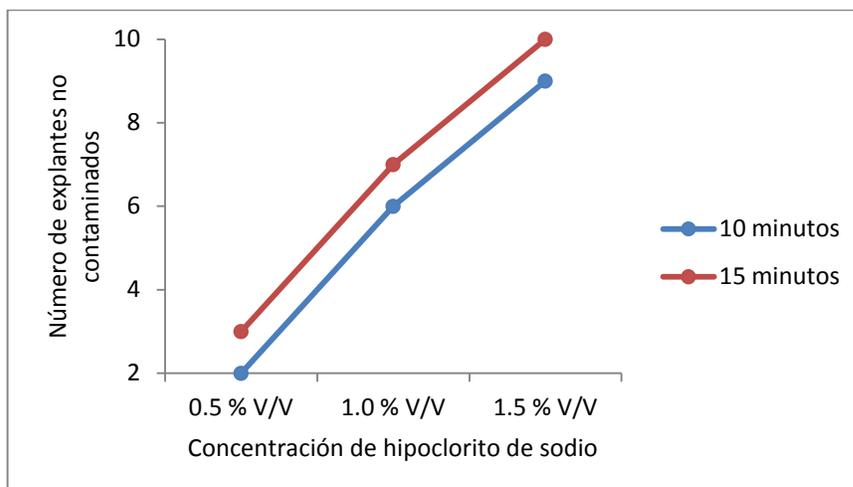
La concentración 1,5% - 10 min (Tratamiento 3) de hipoclorito de sodio permitió una desinfección efectiva del material vegetal, pero al aumentar el tiempo de inmersión se obtuvo mayor presencia de necrosis en el explante, mientras que al tener una concentración baja de hipoclorito de sodio (0,5%) se puede observar que la presencia de

contaminantes es mayor que en los tratamientos con concentraciones de hipoclorito de sodio  $>0,5\%$ . Tanto el tratamiento 2 y 5 presentan un similar nivel de contaminación, pero el mejor tratamiento de desinfección fue el tratamiento 3 en cuanto a contaminación y viabilidad del explante (concentración hipoclorito de sodio  $1,5\%$  ; tiempo de inmersión 10); ver Figura 3.1.

La tabla 3.1. exhibe el número de explantes no contaminados obtenidos mediante un análisis de contingencia de los tratamientos de desinfección de yemas apicales y axilares y la contaminación transcurridos 30 días después de la siembra. Se obtuvo la tasa más baja de contaminación en el tratamiento 6, y una elevada contaminación en el tratamiento 1 y 4.

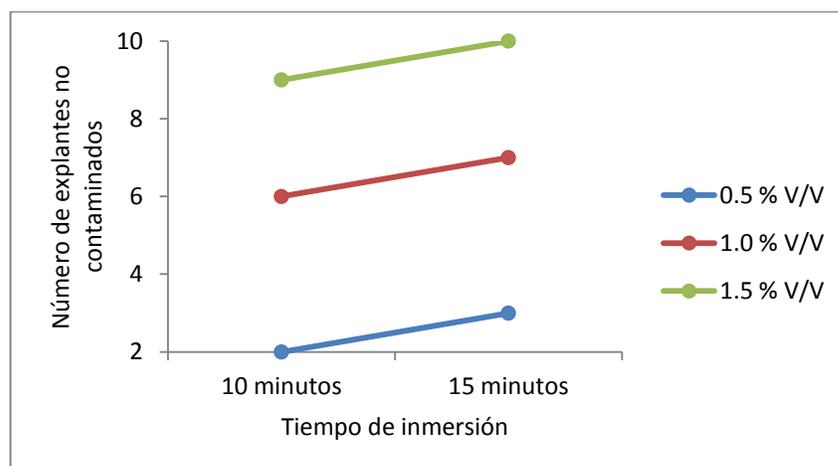
**Tabla 3.1:** Tabla de contingencia para contaminación respecto a los tratamientos de desinfección.

		Concentración de hipoclorito de sodio		
		0.5 % v/v	1.0 % v/v	1.5 % v/v
<b>Tiempo de inmersión</b>	10 minutos	2	6	9
	15 minutos	3	7	10



**Figura 3.1:** Número de explantes no contaminados respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio empleados en los tratamientos de desinfección.

En la figura 3.2 se observa que no existe interacción entre el tiempo de inmersión y la concentración de hipoclorito de sodio, por lo que la concentración de hipoclorito de sodio influye notablemente en la contaminación del explantes, donde, la mayor tasa de contaminación se observó en concentraciones de hipoclorito de sodio 0,5 % v/v.



**Figura 3.2:** Número de explantes no contaminados respecto al tiempo de inmersión empleados en los tratamientos de desinfección.

## Análisis inferencial

Para la comparación de las medias para el nivel de contaminación respecto a la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de inmersión aplicada en el protocolo de desinfección, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y para el estudio de homogeneidad de varianzas se empleó el método de comparación múltiples propuesto por Duncan (ver anexo estadístico). Aplicando el análisis de varianza de los tratamientos efectuados se obtuvo un valor  $p = 0,0002$ , por lo que se rechaza  $H_0$  (ver anexo estadístico A.1.1) concluyendo que si hay diferencia o efecto de los tratamientos de desinfección en cuanto a la variable de contaminación (ver tabla 3.2.).

El modelo para interpretar el número de explantes no contaminados en función de la concentración de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión si es adecuado debido a que mediante la tabla ANOVA se obtuvo un valor  $p$  ( $p = 0,0002$ ).

Para el caso de tiempo de inmersión de acuerdo a valor  $p$  obtenido, se afirma que los tratamientos de desinfección son estadísticamente iguales ( $p = 0,3496$ ), ver tabla 3.2.

La concentración de hipoclorito de sodio si causa un efecto en cada uno de los tratamientos, es decir, existe al menos un tratamiento diferente y efectivo para los explantes ( $p < 0,0001$ ), ver tabla 3.2.

Al combinar los niveles de concentración de hipoclorito de sodio con los distintos tiempos de inmersión, no se observaron diferencias estadísticas significativas

entre el número de explantes no contaminados obtenidos en cada tratamiento ( $p > 0,999$ ).

**Tabla 3.2:** Análisis de varianza (ANOVA) para los tratamientos de desinfección realizados en yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
<i>Modelo</i>	5,08	5	1,02	6,03	0,0002
<i>Tiempo</i>	0,15	1	0,15	0,89	0,3496
<i>Concentración Hipoclorito de sodio</i>	4,93	2	2,47	14,64	<0,0001
<i>Tiempo*Concentración hipoclorito de sodio</i>	0,00	2	0,00	0,00	>0,999
<i>Error</i>	9,10	54	0,17		
<i>Total</i>	14,18	59			

En la tabla 3.3. se observa que existe sólo un subconjunto de la variable tiempo de inmersión, lo cual indica que no existen diferencias significativas entre tiempo de inmersión 10 minutos y 15 minutos (ver anexo estadístico A.1.2).

**Tabla 3.3:** Prueba de Duncan para la comparación de medias en los tiempos de inmersión para yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Tiempo	Medias	n	E.E	Grupo
<i>10</i>	0,57	30	0,07	A
<i>15</i>	0,67	30	0,07	A

La tabla 3.4. permite evidenciar que la mejor concentración de hipoclorito de sodio en los tratamientos de desinfección es 1,5% v/v, por ello es el único que integra el subconjunto C.

**Tabla 3.4:** Prueba de Duncan para la comparación de medias en las concentraciones de hipoclorito de sodio para yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Concentración hipoclorito de sodio (% v/v)	Medias	n	E.E	Grupo
0,5	0,25	20	0,09	A
1,0	0,65	20	0,09	B
1,5	0,95	20	0,09	C

La prueba de Duncan para tiempo de inmersión y concentraciones de hipoclorito de sodio exhibe que los mejores tratamientos son aquellos que se encuentran en el subconjunto C, siendo el más destacado, de acuerdo a la media que posee (1,00), el tratamiento seis (concentración hipoclorito de sodio 1,5% v/v - tiempo de inmersión 15 min), ver tabla 3.5.

**Tabla 3.5:** Prueba de Duncan para los tratamientos de desinfección empleados para yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Tiempo de inmersión	Concentración hipoclorito de sodio (% v/v)	Medias	n	E.E	Grupo
10	0,5	0,20	10	0,13	A
15	0,5	0,30	10	0,13	A B
10	1,0	0,60	10	0,13	B C
15	1,0	0,70	10	0,13	C
10	1,5	0,90	10	0,13	C
15	1,5	1,00	10	0,13	C

De acuerdo a la figura A.1.2. (ver anexo resultados) se cumple el supuesto de normalidad para los residuos necesario en un diseño experimental paramétrico, además empleando la prueba de Shapiro-Wilks (modificado) (ver anexo estadístico A.1.4) se

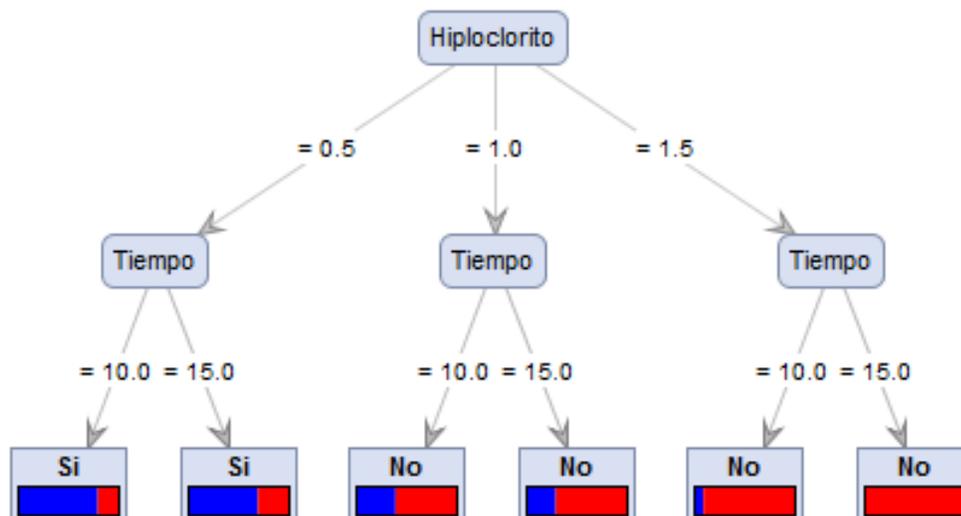
observó que la variable en estudio tiene una distribución normal, ( $p = 0,1229$ ), ver tabla 3.6.

**Tabla 3.6:** Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para los tratamientos de desinfección de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(UnilateralD)
<i>Residuos</i>	60	0,00	0,39	0,95	0,1229

Para comprobar el supuesto de homocedasticidad de varianza se empleó la prueba de Levene (ver tabla A.1.2 anexo resultados), del cual se comprobó que existen diferencias significativas entre varianzas de los tratamientos de desinfección empleados durante la fase de introducción ( $p < 0,0001$ ) (ver anexo estadístico A.1.3).

De acuerdo al árbol de decisiones (figura 3.3) se observa que para los tratamientos que emplean concentraciones 0,5% v/v de hipoclorito de sodio tanto para tiempo de inmersión 10 y 15 minutos, existe una gran prevalencia de contaminación, mientras que para los tratamientos que emplean concentraciones de hipoclorito de sodio  $\geq 1\%$  v/v la contaminación se reduce progresivamente, teniendo ausencia de contaminación en el tratamiento 6 (hipoclorito de sodio 1,5% v/v – tiempo de inmersión 15 min).



**Figura 3.3:** Árbol de decisiones para los tratamientos de desinfección empleados para yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) respecto a la variable contaminación.

Al ser efectuada la regresión logística para la variable dicotómica contaminación, se puede observar que empleando el parámetro hipoclorito de sodio existe mayor probabilidad de contaminación ( $p=0,0004$ ), al igual que con la concentración de hipoclorito de sodio (1,0% v/v) ( $p=0,0377$ ) (ver anexo estadístico A.1.5).

Los cocientes de probabilidades (O.R.) obtenidos en la regresión logística permiten evidenciar que existe mayor posibilidad de que se presente contaminación en el explante de chuquiragua al emplear concentraciones de hipoclorito de sodio 0,5% y 1,0% v/v, mientras que para el parámetro tiempo de inmersión (10 min) no existe evidencia estadística para predecir que sea una fuente de la contaminación de los explantes durante la desinfección.

**Tabla 3.7:** Regresión logística para los datos categóricos de contaminación de los tratamientos de desinfección de yemas apicales y axilares de *Chuquiraga jussieui*.

Parámetros	Est.	E.E.	O.R.	Wald LI (95%)	Wald LS (95%)	Wald CHI*	p-valor
<i>Constante</i>	3,32	1,12	27,71	3,11	247,02	8,86	0,0029
<i>Tiempo (10 min)</i>	- 0,66	0,67	0,52	0,14	1,93	0,96	0,3276
<i>Hipoclorito (0,5% v/v)</i>	- 4,12	1,16	0,02	1,7E-9	0,16	12,53	0,0004
<i>Hipoclorito (1,0% v/v)</i>	- 2,36	1,13	0,09	0,01	0,87	4,32	0,0377

### 3.1.2. Oxidación

Durante la desinfección de yemas apicales y axilares de *Chuquiraga jussieui*, la concentración de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión suelen provocar oxidación del material vegetal, por lo que es fundamental la determinación del mejor tratamiento en cuanto a oxidación del explante, los tratamientos empleados corresponden a los descritos en la tabla 2.2. del capítulo anterior.

### Análisis exploratorio de los datos

En los tratamientos de desinfección en los cuales se empleó diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y sus respectivos tiempos de inmersión, se encontró que el mejor tratamiento para evitar la oxidación de los explantes es el tratamiento 3; ver Figura 3.4.

Al contrario de la contaminación en donde se observó que el tratamiento 6 (1,5% - 15 min) mostró el más bajo nivel de contaminación (0%); en este caso muestra el mayor número de explantes necrosados por oxidación, es por ello que el tiempo de inmersión en el tratamiento 3 es más corto comparado con el tiempo de inmersión empleado en el tratamiento seis, a pesar de que la concentración de hipoclorito de sodio fuese la misma, siendo en este caso el tiempo de inmersión un factor determinante para el alto nivel de oxidación; ver Figura 3.4.

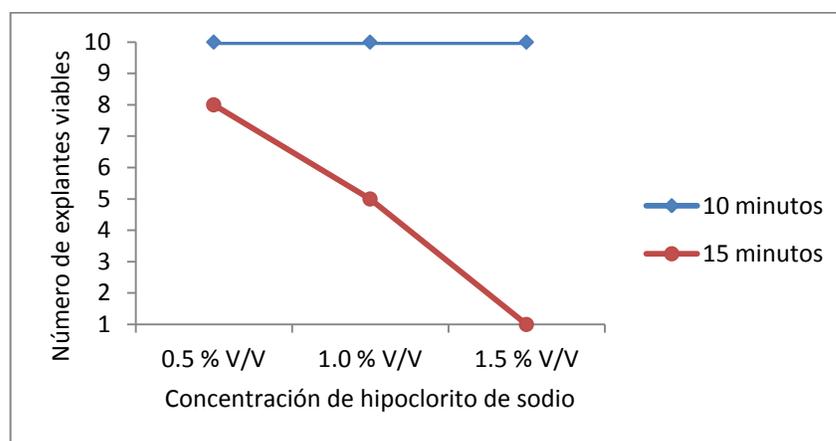
**Tabla 3.8:** Tabla de contingencia para oxidación respecto a los tratamientos de desinfección

		Concentración de hipoclorito de sodio		
		0.5 % v/v	1.0 % v/v	1.5 % v/v
Tiempo de inmersión	10 minutos	10	10	10
	15 minutos	8	5	1

El tratamiento 3 (1,5% - 10 min), muestra el nivel más bajo (0%) en cuanto al número de explantes oxidados, por ello la concentración de hipoclorito de sodio, así como el tiempo de inmersión, son los adecuados para obtener la frecuencia de oxidación deseada; ver Figura 3.5.

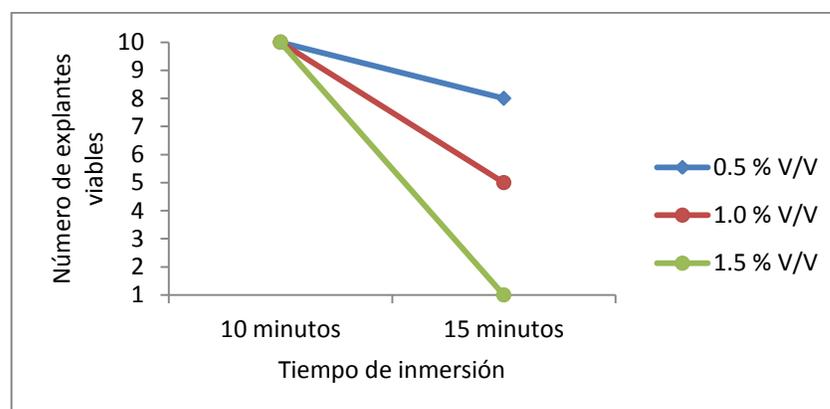
La tabla 3.8. exhibe los explantes que no presentaron oxidación obtenidos mediante un análisis de contingencia de los tratamientos de desinfección de yemas apicales y axilares y el necrosamiento transcurridos 30 días después de la siembra. Se obtuvo una tasa baja de oxidación de los explantes en tiempos de inmersión de 10

minutos, mientras que en el tratamiento 6 se obtuvo un alto grado de necrosis y muerte del material vegetal, quedando sólo un explante vivo durante el tratamiento.



**Figura 3.4:** Número de explantes no oxidados respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio empleados en los tratamientos de desinfección.

En la figura 3.5 se observa que a menor tiempo de inmersión mayor es la tasa de viabilidad de los explantes, y a medida que aumenta el tiempo de inmersión y la concentración de hipoclorito de sodio, mayor es la oxidación y muerte de los explantes.



**Figura 3.5:** Número de explantes no oxidados respecto al tiempo de inmersión empleados en los tratamientos de desinfección.

## Análisis inferencial

Para realizar este análisis se realizó un análisis de varianza (ANOVA) (Ver anexo estadístico), en donde se observó diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de desinfección para yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*). Mediante el análisis de varianza (ANOVA) se determinó que el modelo si se ajusta a las concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión empleados durante la desinfección del material vegetal ( $p < 0,0001$ ) (tabla 3.9).

El valor p obtenido para el tiempo de inmersión es menor al 5%, por lo que este también influye en la oxidación durante el proceso de desinfección. En el caso de la concentración de hipoclorito de sodio, existe una dependencia estadística entre los tratamientos empleados y la variable oxidación ( $p = 0,0014$ ).

Al combinar los niveles de concentración de hipoclorito de sodio con los distintos tiempos de inmersión, se observan diferencias estadísticas significativas entre el número de explantes no oxidados obtenidos en cada tratamiento ( $p = 0,0216$ ) (ver anexo estadístico A.2.1).

**Tabla 3.9:** Análisis de varianza (ANOVA) para oxidación en los tratamientos de desinfección realizados en yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
<b>Modelo</b>	6,28	5	1,26	11,50	<0,0001
<b>Tiempo</b>	3,75	1	3,75	34,32	<0,0001
<b>Concentración</b>	1,63	2	0,82	7,47	0,0014
<b>Hipoclorito de sodio</b>					
<b>Tiempo*Concentración</b>	0,90	2	0,45	4,12	0,0216
<b>hipoclorito de sodio</b>					
<b>Error</b>	5,90	54	0,11		
<b>Total</b>	12,18	59			

Para el estudio de homogeneidad de varianzas se empleó la prueba de Duncan, donde se obtuvieron 3 subconjuntos, siendo, de acuerdo a su media, el mejor tratamiento para evitar la oxidación del explante el tratamiento uno (concentración hipoclorito de sodio 0,5% v/v; tiempo de inmersión 10 min) (ver anexo estadístico A.2.2).

En el caso de la variable tiempo de inmersión (tabla 3.10) se observa que existen 2 subconjuntos, de los cuales el más destacado para evitar la oxidación del material vegetal es tiempo de inmersión 10 min (subconjunto B), además presenta una media mayor al subconjunto A, lo que indica que existe una alta diferencia entre los dos tiempos empleados durante el proceso de desinfección.

**Tabla 3.10:** Prueba de Duncan para la comparación de medias en oxidación respecto a los tiempos de inmersión para yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Tiempo	Medias	n	E.E	Grupo
15	0,47	30	0,06	A
10	0,97	30	0,06	B

Para la concentración de hipoclorito de sodio se observa (tabla 3.11) que existen 2 subconjuntos, de los cuales la concentración más baja empleada durante la desinfección de explantes de chuquiragua (0,5% v/v) mostró baja oxidación de explantes.

**Tabla 3.11:** Prueba de Duncan para la comparación de medias en oxidación de las concentraciones de hipoclorito de sodio para yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Concentración hipoclorito de sodio (% v/v)	Medias	n	E.E	Grupo
1,5	0,50	20	0,07	A
1,0	0,75	20	0,07	B
0,5	0,90	20	0,07	B

Mediante la prueba de Duncan que se describe en la tabla 3.12, se observa que los mejores tratamientos son aquellos que se encuentran en el subconjunto C, siendo el mejor, de acuerdo a la media que posee, el tratamiento 1 (concentración hipoclorito de sodio 0,5% v/v; tiempo de inmersión 10 min).

**Tabla 3.12:** Prueba de Duncan para los tratamientos de desinfección empleados para yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Tiempo de inmersión	Concentración hipoclorito de sodio (% v/v)	Medias	n	E.E	Grupo
15	1,5	0,10	10	0,10	A
15	1,0	0,50	10	0,10	B
15	0,5	0,80	10	0,10	C
10	1,5	0,90	10	0,10	C
10	1,0	1,00	10	0,10	C
10	0,5	1,00	10	0,10	C

De acuerdo a la figura A.2.2 (ver anexo resultados) no se cumple el supuesto de normalidad para los residuos necesario en un diseño experimental paramétrico, además empleando la prueba de Shapiro-Wilks (modificado) se observó que la variable en estudio no tiene una distribución normal, ( $p < 0,0001$ ), ver tabla 3.13 (ver anexo estadístico A.2.4).

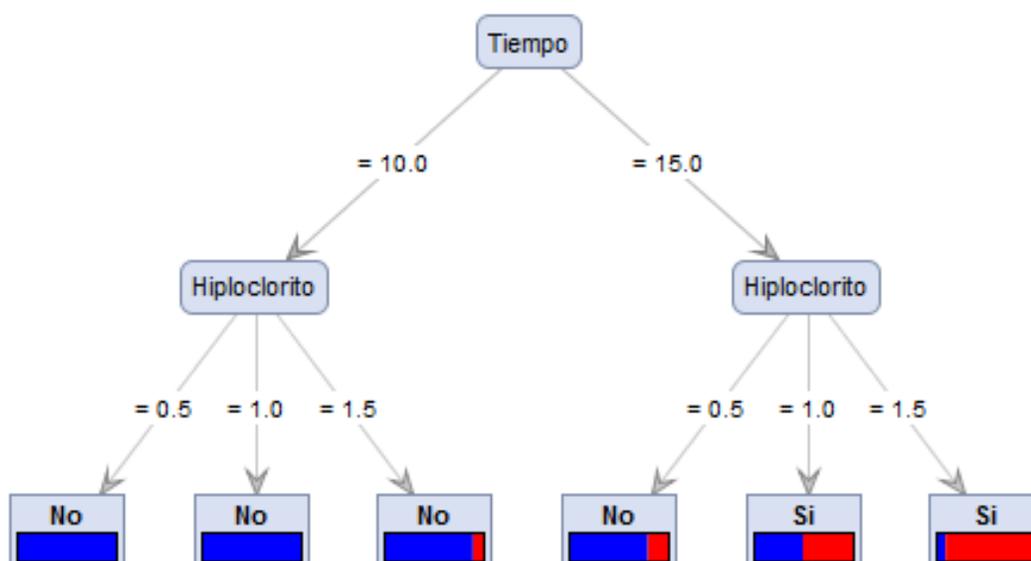
**Tabla 3.13:** Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para variable oxidación de los tratamientos de desinfección de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(UnilateralD)
Residuos	60	0,00	0,32	0,89	<0,0001

Por medio de la prueba de Levene (ver tabla A.2.2 anexo resultados) se comprobó el supuesto de homocedasticidad de varianza, del cual se obtuvo que existen diferencias significativas entre las varianzas de los tratamientos de desinfección empleados durante la fase de desinfección ( $p < 0,0001$ ) (ver anexo estadístico A.2.3).

Mediante el análisis de varianza no paramétrica de Kruskal-Wallis se obtuvo que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de desinfección empleados para yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( $p < 0,0001$ ) (ver tabla A.2.4 anexo resultados).

De acuerdo al árbol de decisiones (figura 3.6) se observa que para los tratamientos que emplean tiempo de inmersión 10 minutos la oxidación es mínima, a diferencia de tiempo de inmersión 15 minutos, donde la presencia de oxidación más elevada es en concentración de hipoclorito de sodio 1,5% v/v. Es recomendable emplear tiempo de inmersión 10 min y concentraciones bajas de hipoclorito de sodio, pero se debe tener en cuenta también la presencia de contaminación del explante.



**Figura 3.6:** Árbol de decisiones para los tratamientos de desinfección empleados para yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) respecto a la variable oxidación.

En la regresión logística para la variable dicotómica oxidación, se observó que empleando el parámetro tiempo de inmersión 10 minutos ( $p = 0,0008$ ) existe mayor probabilidad de evitar la oxidación del explante, al igual que con la concentración de hipoclorito de sodio (0,5% v/v) ( $p = 0,0042$ ), mientras que la concentración de hipoclorito de sodio (1,0% v/v) se insinúa como una posible predictora significativa para la variable oxidación (ver anexo estadístico A.2.6).

Los cocientes de probabilidades (O.R.) obtenidos en la regresión logística permiten evidenciar que existe mayor posibilidad de que se evite la oxidación en el explante de Chuquiragua al emplear concentraciones de hipoclorito de sodio 0,5% y 1,0% v/v, y tiempo de inmersión 10 min, tabla 3.14.

**Tabla 3.14:** Regresión logística para los datos categóricos de oxidación de los tratamientos de desinfección de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Parámetros	Est.	E.E.	O.R.	Wald LI (95%)	Wald LS (95%)	Wald CHI*	p-valor
<i>Constante</i>	- 2,33	1,05	0,10	0,01	0,76	4,91	0,0267
<i>Tiempo (10 min)</i>	4,66	1,40	105,72	6,85	1630,61	11,15	0,0008
<i>Hipoclorito (0,5% v/v)</i>	3,73	1,30	41,73	3,24	537,38	8,19	0,0042
<i>Hipoclorito (1,0% v/v)</i>	2,37	1,19	10,66	1,03	110,85	3,92	0,0476

### **3.2. FASE II: Inducción a brotes a partir de yemas**

En lo referente a la etapa de inducción a brotes, una vez establecido el protocolo de desinfección en la fase anterior, se procedió a introducir el material vegetal en condiciones asépticas, procurando reducir al máximo la contaminación exógena. Se emplearon 6 tratamientos para la etapa de inducción de brotes, teniendo varias concentraciones de diferentes reguladores de crecimiento que estimulen la obtención de brotes organogénicos de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) (tabla 2.3). Las variables evaluadas en esta fase corresponden a:

#### **3.2.1. Aparecimiento de brotes**

Por aparecimiento de brotes, se entiende como la presencia o ausencia de brotes inducidos mediante organogénesis directa mediante el uso de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento como bencilaminopurina (BAP), ácido indol butírico (IBA) y brasinolida (BRA) ensayos que fueron planteados en la metodología (tabla 2.3).

#### **Análisis exploratorio de datos**

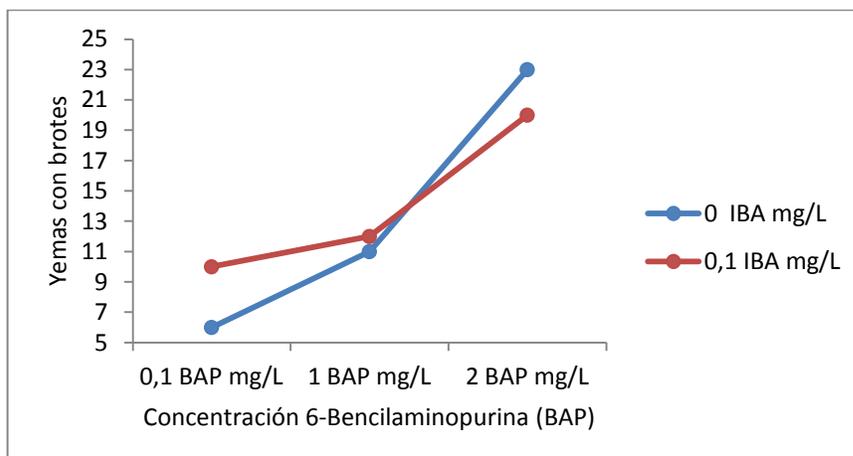
En esta etapa de inducción se utilizaron 6 tratamientos más un blanco para establecer la mejor concentración entre citoquinina y auxina con fin de inducir a brotes a partir de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

El tratamiento 3 (BAP 2,0 mgL<sup>-1</sup> – IBA 0,0 mgL<sup>-1</sup> - BRA 2,0 mgL<sup>-1</sup>); resultó el más adecuado para la inducción de brotes a partir de yemas apicales y axilares de Chuquiragua, la formación de brote comienza al aumentar la concentración de hormona, en este caso de la citoquinina BAP, aunque también se observa que el tratamiento 6 es efectivo para la formación de brotes; ver tabla 3.15.

**Tabla 3.15:** Tabla de contingencia para apareamiento de brotes respecto a los tratamientos de inducción a brotes de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

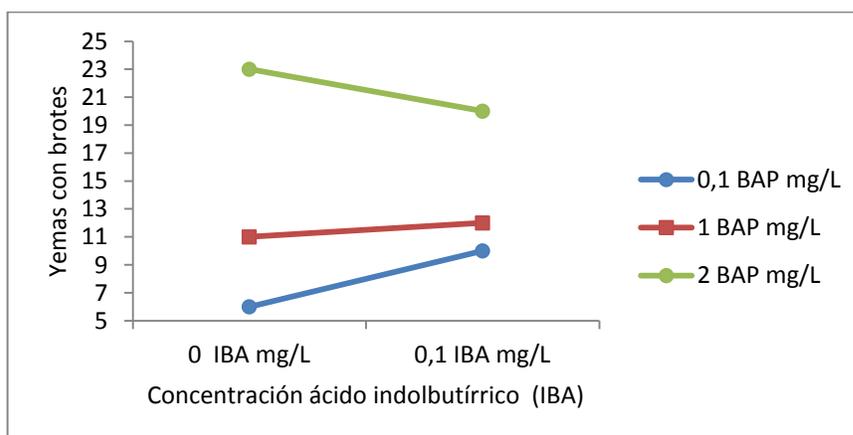
		Concentración BAP (mgL <sup>-1</sup> )		
		0,1	1	2
Concentración IBA (mgL <sup>-1</sup> )	0	6	11	23
	0,1	10	12	20

En la figura 3.7. se observa que la mayor aparición de brotes en los explantes de Chuquiragua (23) se obtuvo en una concentración de 2 mgL<sup>-1</sup> de BAP y 0 mgL<sup>-1</sup> de IBA, mientras que la menor tasa de apareamiento de brotes (6) fue en la concentración de 0,1 mgL<sup>-1</sup> de BAP y 0 mgL<sup>-1</sup> IBA.



**Figura 3.7:** Número de explantes con brotes respecto a las concentraciones de BAP empleados en fase de inducción a brotes de yemas apicales y axilares de *Chuquiraga (Chuquiraga jussieui)*.

En la figura 3.8 se observa que no existen interacciones entre las concentraciones de IBA, además que en la concentración de 0 mgL<sup>-1</sup> de IBA y 2 mgL<sup>-1</sup> de BAP se obtienen los mejores resultados de obtención de brotes (23).



**Figura 3.8:** Número de explantes con brotes respecto a las concentraciones de IBA empleados en fase de inducción a brotes de yemas apicales y axilares de *Chuquiraga (Chuquiraga jussieui)*.

## Análisis inferencial

Para analizar la relación de dependencia o independencia en la concentración de hormona BAP, IBA y la formación de brote, se realizó un análisis de varianza y para la homogeneidad de varianzas se empleó la prueba de Duncan; (ver anexo estadístico), con lo que se obtuvo que el modelo se ajusta a las concentraciones de BAP e IBA para la variable aparecimiento de brotes durante la fase de inducción ( $p < 0,0001$ ) (tabla 3.16).

Para la concentración de BAP se observa que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ( $p < 0,0001$ ), mientras que para la variable concentración IBA no existen diferencias significativas ( $p = 0,7155$ ), así como para la interacción de ambas fitohormonas ( $p = 0,2944$ ), por lo que se afirma que la fuente de variación para el aparecimiento de brotes son las concentraciones de 6 – bencilaminopurina (BAP) (ver anexo estadístico B.1.1).

**Tabla 3.16:** Análisis de varianza (ANOVA) para aparecimiento de brotes en los tratamientos de inducción a brotes realizados en yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
<i>Modelo</i>	8,37	5	1,67	8,37	<0,0001
<i>Concentración BAP</i>	7,85	2	3,93	19,63	<0,0001
<i>Concentración IBA</i>	0,03	1	0,03	0,13	0,7155
<i>CBAP*CIBA</i>	0,49	2	0,25	1,23	0,2944
<i>Error</i>	28,80	144	0,20		
<i>Total</i>	37,17	149			

En la tabla 3.17. se observan dos subconjuntos para la variable concentración de BAP, donde los mejores resultados se obtuvieron en concentración 2,0 mgL<sup>-1</sup>.

**Tabla 3.17:** Prueba de Duncan para la comparación de medias en apareamiento de brotes respecto a la concentración de BAP para inducción a brotes de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Concentración BAP (mgL <sup>-1</sup> )	Medias	n	E.E	Grupo
0,1	0,32	50	0,06	A
1,0	0,46	50	0,06	A
2,0	0,86	50	0,06	B

Para la variable concentración IBA al no existir diferencias significativas sólo existe un subconjunto, del cual se observa que de acuerdo a la media que posee, la concentración 0,1 mgL<sup>-1</sup> de IBA influye en el apareamiento de brotes en yemas apicales y axilares de Chuquiragua, ver tabla 3.18.

**Tabla 3.18:** Prueba de Duncan para la comparación de medias en apareamiento de brotes respecto a la concentración de IBA para inducción a brotes de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Concentración IBA (mgL <sup>-1</sup> )	Medias	n	E.E	Grupo
0,0	0,53	75	0,05	A
0,1	0,56	75	0,05	A

La prueba de Duncan (tabla 3.19) muestra que los mejores tratamientos son aquellos que se encuentran en el subconjunto B, siendo el mejor, de acuerdo a la media que se observa en la tabla 3.17, es el tratamiento 3 (concentración BAP 2,0 mgL<sup>-1</sup>; concentración IBA 0,0 mgL<sup>-1</sup>) (ver anexo estadístico B.1.2).

**Tabla 3.19:** Prueba de Duncan para los tratamientos de inducción de brotes empleados para yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Concentración BAP (mgL <sup>-1</sup> )	Concentración IBA (mgL <sup>-1</sup> )	Medias	n	E.E.	Grupo
0,1	0,0	0,24	25	0,09	A
0,1	0,1	0,40	25	0,09	A
1,0	0,0	0,44	25	0,09	A
1,0	0,1	0,48	25	0,09	A
2,0	0,1	0,80	25	0,09	B
2,0	0,0	0,92	25	0,09	B

De acuerdo a la figura B.1.2 (ver anexo resultados) no se cumple el supuesto de normalidad para los residuos necesario en un diseño experimental paramétrico, además empleando la prueba de Shapiro-Wilks (modificado) se observó que la variable en estudio no tiene una distribución normal, ( $p < 0,0001$ ), ver tabla 3.20.

**Tabla 3.20:** Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para los tratamientos de inducción a brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

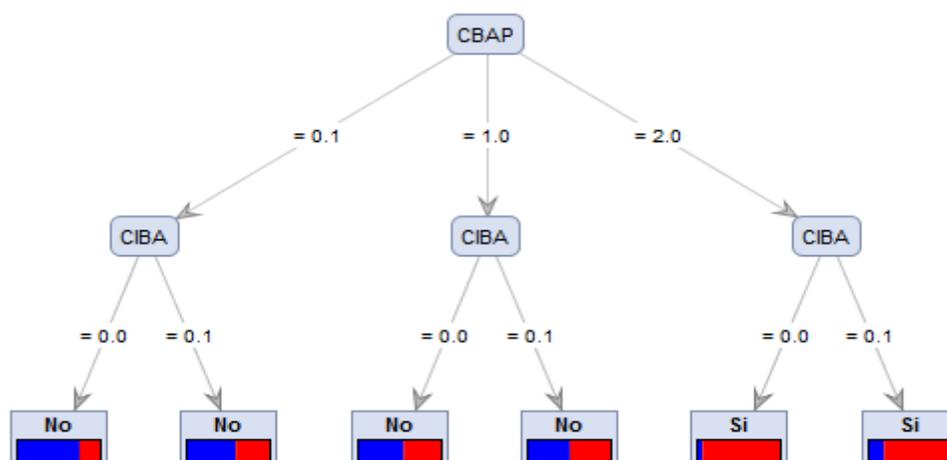
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(UnilateralD)
Residuos	150	0,00	0,44	0,91	<0,0001

Se comprobó el supuesto de homocedasticidad de varianzas con la prueba de Levene (ver tabla B.1.2 anexo resultados), del cual se obtuvo que existen diferencias

significativas entre las varianzas de los tratamientos de inducción a brote ( $p < 0,0001$ ) (ver anexo estadístico B.1.3).

Mediante el análisis de varianza no paramétrica de Kruskal-Wallis se obtuvo un valor  $p$ , el cual indica que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de inducción a brote empleados para yemas apicales y axilares de Chuquiragua ( $p < 0,0001$ ), (ver tabla B.1.4 anexo resultados).

De acuerdo al árbol de decisiones (figura 3.9) se observa que para concentraciones menores a  $2,0 \text{ mgL}^{-1}$  BAP el aparecimiento de brotes es bajo, además se observa que no influye la presencia o ausencia de IBA en el medio de cultivo. La concentración óptima para aparecimiento de brotes es  $2,0 \text{ mgL}^{-1}$  BAP en combinación o no de IBA, mientras que en concentración  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  BAP la presencia de brotes fue muy reducida.



**Figura 3.9:** Árbol de decisiones para los tratamientos de inducción a brotes empleados para yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) respecto a la variable aparecimiento de brotes.

Empleando la regresión logística para la variable dicotómica aparecimiento de brotes, se observó que empleando el parámetro concentración BAP (0,1 y 1,0 mgL<sup>-1</sup>) existe menor probabilidad de inducción a brotación, mientras que la concentración de IBA no es una posible predictora para la presencia/ausencia de brotes en explantes de Chuquiragua, tabla 3.21 (ver anexo estadístico B.1.6)

Los cocientes de probabilidades (O.R.) obtenidos en la regresión logística permiten evidenciar que existe menor posibilidad de que exista inducción a brote en el explante de chuquiragua al emplear concentraciones 0,1 y 1,0 mgL<sup>-1</sup> de BAP, ver tabla 3.21.

**Tabla 3.21:** Regresión logística para los datos categóricos de aparecimiento de brotes en los tratamientos de inducción a brote de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Parámetros	Est.	E.E.	O.R.	Wald LI (95%)	Wald LS (95%)	Wald CHI*	p-valor
<b>Constante</b>	1,89	0,45	6,59	2,72	15,96	17,44	<0,0001
<b>Concentración BAP (0,1 mgL<sup>-1</sup>)</b>	-	0,51	0,08	0,03	0,21	25,59	<0,0001
<b>Concentración BAP (1,0 mgL<sup>-1</sup>)</b>	2,57	-	0,14	0,05	0,37	15,84	0,0001
<b>Concentración IBA (0,0 mgL<sup>-1</sup>)</b>	1,98	-	0,87	0,42	1,80	0,14	0,7119
	0,14	0,37					

### 3.2.2. Número de brotes

En esta etapa de de inducción a brotes se emplearon 6 tratamientos más un testigo para evaluar la formación de brotes, para ello se utilizaron combinaciones de 6 – bencil aminopurina (BAP) con ácido indolbutírrico (IBA); ver tabla 2.3.

### Análisis exploratorio de datos

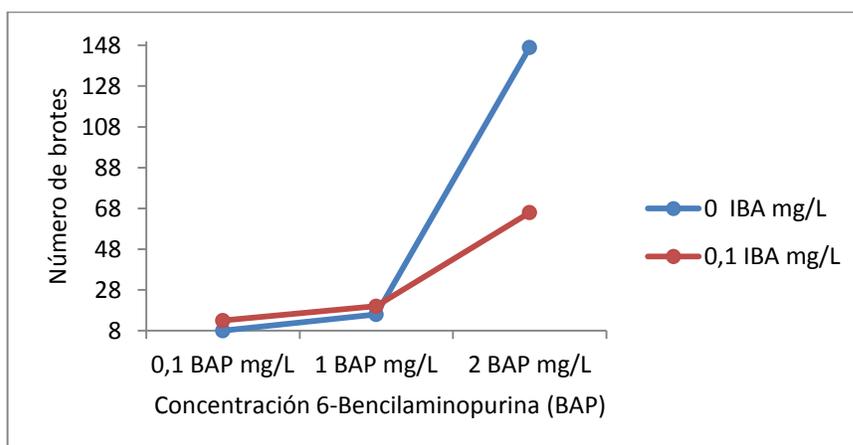
Los resultados que se obtuvieron en cuanto a la formación de brotes fueron satisfactorios, siendo el tratamiento 3 el mejor tratamiento al obtener una media de 6,39 brotes por explante, los cuales eran vigorosos y presentaban un buen tamaño debido a la presencia de Brasinolidas en el medio de cultivo; ver tabla 3.22.

El tratamiento testigo (cero) (BAP 0 mgL<sup>-1</sup> – IBA 0 mgL<sup>-1</sup> – BRA 0 mgL<sup>-1</sup>), uno (BAP 0,1 mgL<sup>-1</sup> – IBA 0 mgL<sup>-1</sup> – BRA 2 mgL<sup>-1</sup>), 2 (BAP 1 mgL<sup>-1</sup> – IBA 0 mgL<sup>-1</sup> – BRA 2 mgL<sup>-1</sup>), 4 (BAP 0,1 mgL<sup>-1</sup> – IBA 0,1 mgL<sup>-1</sup> – BRA 2 mgL<sup>-1</sup>) y 5 (BAP 1 mgL<sup>-1</sup> – IBA 0,1 mgL<sup>-1</sup> – BRA 2 mgL<sup>-1</sup>), ocasionaron apenas uno o dos brotes por explante en los tratamientos mencionados; ver figura 3.10.

**Tabla 3.22:** Tabla de contingencia para número de brotes respecto a los tratamientos de inducción a brotes de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiragua jussieui*).

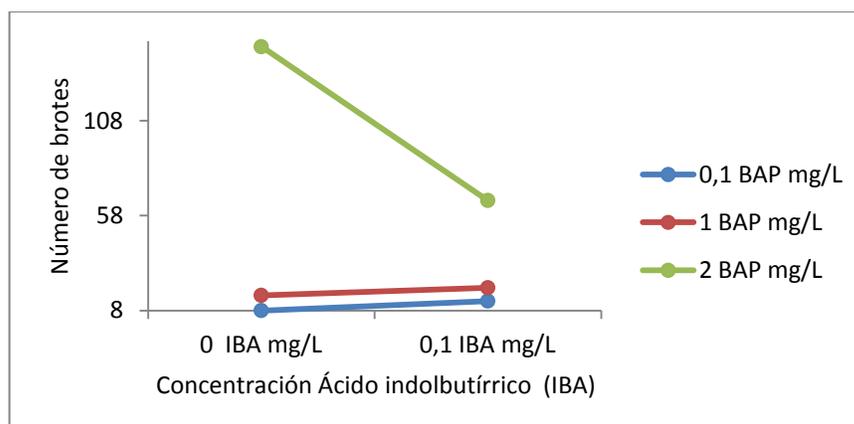
		Concentración BAP (mgL <sup>-1</sup> )		
		0,1	1	2
Concentración IBA (mgL <sup>-1</sup> )	0	8	16	147
	0,1	13	20	66

Los resultados de formación de brote que mostraron la cantidad menos elevada de brotes por explante fueron el tratamiento 1 (BAP 0,1 mgL<sup>-1</sup> – IBA 0 mgL<sup>-1</sup> – BRA 2 mgL<sup>-1</sup>), 2 (BAP 1 mgL<sup>-1</sup> – IBA 0 mgL<sup>-1</sup> – BRA 2 mgL<sup>-1</sup>), 4 (BAP 0,1 mgL<sup>-1</sup> – IBA 0,1 mgL<sup>-1</sup> – BRA 2 mgL<sup>-1</sup>) y 5 (BAP 1 mgL<sup>-1</sup> – IBA 0,1 mgL<sup>-1</sup> – BRA 2 mgL<sup>-1</sup>), ver figura 3.11.



**Figura 3.10:** Número de brotes respecto a las concentraciones de BAP empleados en fase de inducción a brotes de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

En la figura 3.11 se observa que a concentración  $0 \text{ mgL}^{-1}$  IBA y  $2 \text{ mgL}^{-1}$  BAP existe el mayor número de brotes y que disminuye a medida que aumenta la concentración de IBA a  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ .



**Figura 3.11:** Número de brotes respecto a las concentraciones de IBA empleados en fase de inducción a brotes de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

### Análisis inferencial de datos

Se realizó un análisis de la relación de dependencia o independencia en la concentración de hormona BAP, IBA y el número de brotes por explante, para ello, mediante el análisis de varianza (ANOVA); (ver anexo estadístico), se obtuvo que el modelo se ajusta a las concentraciones de BAP y IBA para los tratamientos de inducción a brotes ( $p < 0,0001$ ) (tabla 3.23). Para estudiar la homogeneidad de varianzas se empleó la prueba de Duncan, con lo que se obtuvieron 3 subconjuntos, de los cuales en el subconjunto C está conformado por el tratamiento 3 (BAP 2,0 mgL<sup>-1</sup> – IBA 0,0 mgL<sup>-1</sup> – BRA 2 mgL<sup>-1</sup>) (ver anexo estadístico B.2.1).

**Tabla 3.23:** Análisis de varianza (ANOVA) para número de brotes en los tratamientos de inducción a brotes realizados en yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
<b>Modelo</b>	352,47	5	70,49	63,40	<0,0001
<b>Concentración BAP</b>	230,53	2	115,27	103,66	<0,0001
<b>Concentración IBA</b>	15,87	1	15,87	14,28	0,0003
<b>CBAP*CI BA</b>	51,84	2	25,92	23,31	<0,0001
<b>Error</b>	84,51	76	1,11		
<b>Total</b>	436,98	81			

Para la concentración de BAP (tabla 3.24) se observa que existen 2 subconjuntos, de los cuales en subconjunto B la concentración 2,0 mgL<sup>-1</sup> es la mejor para obtener mayor número de brotes por explante.

**Tabla 3.24:** Prueba de Duncan para la comparación de medias en número de brotes de brotes respecto a la concentración de BAP para inducción a brotes de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Concentración BAP (mgL <sup>-1</sup> )	Medias	n	E.E	Grupo
0,1	1,32	16	0,27	A
1,0	1,56	23	0,22	A
2,0	4,85	43	0,16	B

La tabla 3.25. permite evidenciar que existen 2 subconjuntos para la concentración de IBA, de los cuales, en ausencia de IBA se obtiene el mayor número de brotes por explante de Chuquiragua.

**Tabla 3.25:** Prueba de Duncan para la comparación de medias en número de brotes respecto a la concentración de IBA para inducción a brotes de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Concentración IBA (mgL <sup>-1</sup> )	Medias	n	E.E	Grupo
0,1	2,09	42	0,17	A
0,0	3,06	40	0,19	B

En la prueba de Duncan de la tabla 3.26 se observa que los mejores tratamientos son aquellos que se encuentran en el subconjunto B y C, siendo el mejor tratamiento, de acuerdo a la media obtenida (6,39), el tratamiento 3 (concentración BAP 2,0 mgL<sup>-1</sup>; concentración IBA 0,0 mgL<sup>-1</sup>) (ver anexo estadístico B.2.2).

**Tabla 3.26:** Prueba de Duncan para los tratamientos de inducción de brotes empleados para yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) respecto a la variable número de brotes.

Concentración BAP (mgL <sup>-1</sup> )	Concentración IBA (mgL <sup>-1</sup> )	Medias	n	E.E.	Grupo
0,1	0,1	1,30	10	0,33	A
0,1	0,0	1,33	6	0,43	A
1,0	0,0	1,45	11	0,32	A
1,0	0,1	1,67	12	0,30	A
2,0	0,1	3,30	20	0,24	B
2,0	0,0	6,39	23	0,22	C

Mediante la figura B.2.2 (ver anexo resultados) se observa que los datos no siguen una distribución normal, además empleando la prueba de Shapiro-Wilks (modificado) se comprobó que la variable en estudio no posee una distribución normal ( $p < 0,0001$ ), ver tabla 3.27 (ver anexo estadístico B.2.4).

**Tabla 3.27:** Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para los tratamientos de inducción a brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) para variable número de brotes.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(UnilateralD)
Residuos	82	0,00	1,02	0,91	<0,0001

Se comprobó el supuesto de homocedasticidad de varianzas con la prueba de Levene (ver tabla B.2.2 anexo resultados), del cual se obtuvo que existen diferencias significativas entre las varianzas de los tratamientos de inducción a brote respecto a la variable número de brotes ( $p < 0,0001$ ).

El análisis de varianza no paramétrica de Kruskal-Wallis (ver tabla B.2.4 anexo resultados) permite evidenciar que existen diferencias estadísticas significativas, debido

al valor  $p$  que presenta el modelo ( $p < 0,0001$ ). Además de acuerdo a las medianas de cada tratamiento, se observa que el tratamiento 3 (7) es el mejor tratamiento para inducir a brotes a partir de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (ver anexo estadístico B.2.5)

### **3.3. FASE III: Multiplicación de brotes**

Para esta etapa de multiplicación a partir de brotes obtenidos en la anterior fase se utilizaron 6 tratamientos más un testigo para evaluar la supervivencia y el número de brotes que se obtienen en diferentes combinaciones de 6 – bencil aminopurina (BAP) ( $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ ,  $1 \text{ mgL}^{-1}$ ,  $2 \text{ mgL}^{-1}$ ), ácido indol butírico (IBA) ( $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ ) y brasinolida (BRA) ( $5 \text{ mgL}^{-1}$ ); ver tabla 2.4.

#### **3.3.1. Supervivencia**

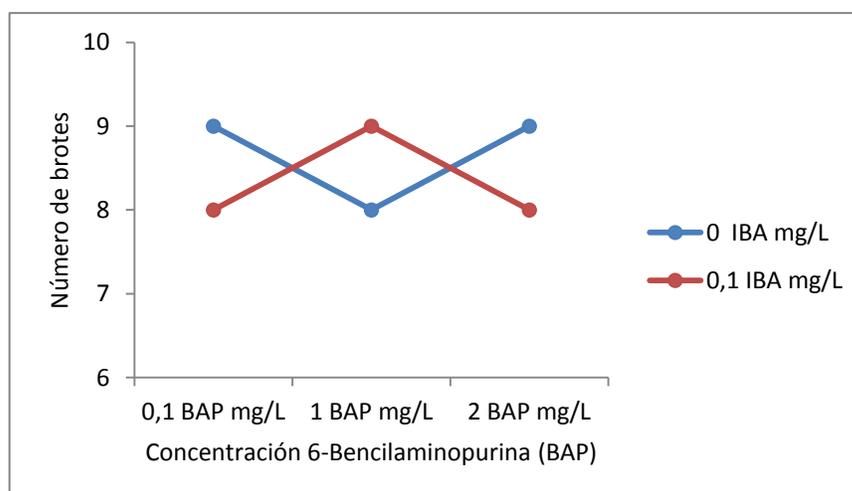
##### **Análisis exploratorio de datos**

Los resultados que se obtuvieron en cuanto a la supervivencia de los explantes obtenidos a partir de brotes inducidos en la fase anterior fueron satisfactorios, obteniéndose un 80% de supervivencia en todos los tratamientos, teniendo el valor más elevado en el tratamiento 1 y 3; ver tabla 3.28.

**Tabla 3.28:** Tabla de contingencia para supervivencia de brotes respecto a los tratamientos de multiplicación de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

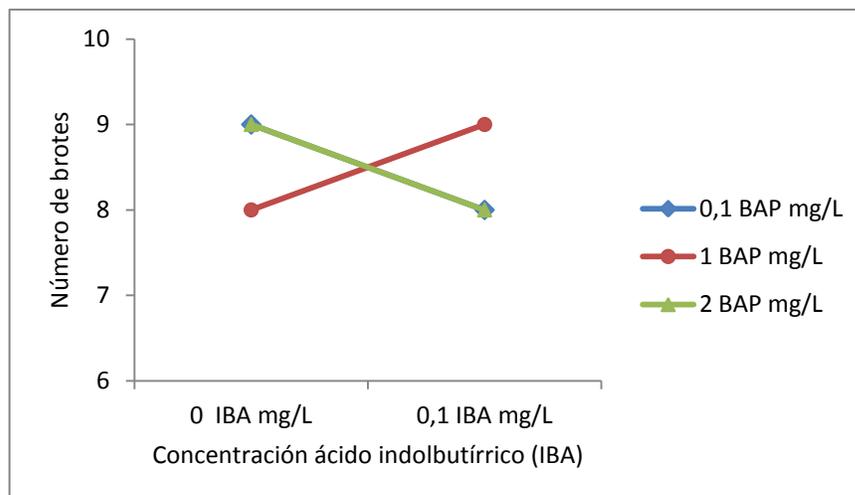
		Concentración BAP ( $\text{mgL}^{-1}$ )		
		0,1	1	2
Concentración IBA ( $\text{mgL}^{-1}$ )	0	9	8	9
	0,1	8	9	8

La figura 3.12 indica que la supervivencia de los explantes para la fase de multiplicación no es dependiente de la concentración de BAP o IBA, lo cual indica que la tasa de supervivencia es elevada en todos los tratamientos de multiplicación.



**Figura 3.12:** Supervivencia de brotes respecto a las concentraciones de BAP empleados en fase de multiplicación de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

La tasa de supervivencia en los 6 tratamientos es semejante entre estos, como se observa en la figura 3.13. al aumentar o disminuir las concentraciones de las hormonas de crecimiento, los resultados son los mismo.



**Figura 3.13:** Supervivencia de brotes respecto a las concentraciones de IBA empleados en fase de multiplicación de brotes de *Chuquiraga jussieui*.

### Análisis inferencial de datos

Para analizar la relación de dependencia o independencia en la concentración de hormona BAP, IBA y la supervivencia de brotes obtenidos en la fase de inducción para proceder a su multiplicación, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y para la homogeneidad de varianzas la prueba de Duncan; (ver anexo estadístico), con lo que se obtuvo un valor  $p$ , el cual indica que el modelo no se ajusta a las concentraciones de BAP e IBA en relación a la variable supervivencia en los tratamientos de multiplicación a brotes ( $p = 0,9542$ ) (tabla 3.29).

Tanto en la concentración de BAP e IBA, así como la interacción de los mismos, no poseen diferencias estadísticas significativas, (valor  $p > 5\%$ ), por lo que se puede afirmar que la supervivencia de brotes no es dependiente de dichos parámetros (ver anexo estadístico C.1.1).

**Tabla 3.29:** Análisis de varianza (ANOVA) para supervivencia de brotes en los tratamientos de multiplicación de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
<i>Modelo</i>	0,15	5	0,03	0,22	0,9542
<i>Concentración BAP</i>	0,00	2	0,00	0,00	>0,9999
<i>Concentración IBA</i>	0,02	1	0,02	0,12	0,7304
<i>CBAP*CIBA</i>	0,13	2	0,07	0,48	0,6214
<i>Error</i>	7,50	54	0,14		
<i>Total</i>	7,65	59			

En la tabla 3.30. se observa que sólo existe un subconjunto para la concentración de BAP, lo que concuerda con la tabla anterior, ya que no existen diferencias significativas entre las concentraciones empleadas para la fase de multiplicación de brotes.

**Tabla 3.30:** Prueba de Duncan para la comparación de medias en supervivencia de brotes de brotes respecto a la concentración de BAP para multiplicación de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Concentración BAP (mgL <sup>-1</sup> )	Medias	n	E.E	Grupo
<i>2,0</i>	0,85	20	0,08	A
<i>1,0</i>	0,85	20	0,08	A
<i>0,1</i>	0,85	20	0,08	A

Para la concentración de IBA (tabla 3.31) mediante la prueba de Duncan se observa que existe sólo un subconjunto A, donde las medias son similares entre sí, lo cual coincide con lo mencionado anteriormente, que no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos en relación a la variable supervivencia de brotes.

**Tabla 3.31:** Prueba de Duncan para la comparación de medias en supervivencia de brotes respecto a la concentración de IBA para multiplicación de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Concentración IBA (mgL <sup>-1</sup> )	Medias	n	E.E	Grupo
0,1	0,83	30	0,07	A
0,0	0,87	30	0,07	A

En la tabla 3.32 (prueba de Duncan) se observa que no existen diferencias significativas entre los tratamientos, ya que todos pertenecen al mismo subconjunto A, además sus medias poseen valores aproximados (ver anexo estadístico C.1.2).

**Tabla 3.32:** Prueba de Duncan para los tratamientos de multiplicación de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) respecto a la variable supervivencia de brotes.

Concentración BAP (mgL <sup>-1</sup> )	Concentración IBA (mgL <sup>-1</sup> )	Medias	n	E.E.	Grupo
1,0	0,0	0,80	10	0,12	A
2,0	0,1	0,80	10	0,12	A
0,1	0,1	0,80	10	0,12	A
2,0	0,0	0,90	10	0,12	A
1,0	0,1	0,90	10	0,12	A
0,1	0,0	0,90	10	0,12	A

De acuerdo a la figura C.1.2 (anexo resultados) no se cumple el supuesto de normalidad para los residuos necesario en un diseño experimental paramétrico. La prueba de Shapiro-Wilks (modificado) indica que la variable en estudio no posee una distribución normal ( $p < 0,0001$ ), ver tabla 3.33.

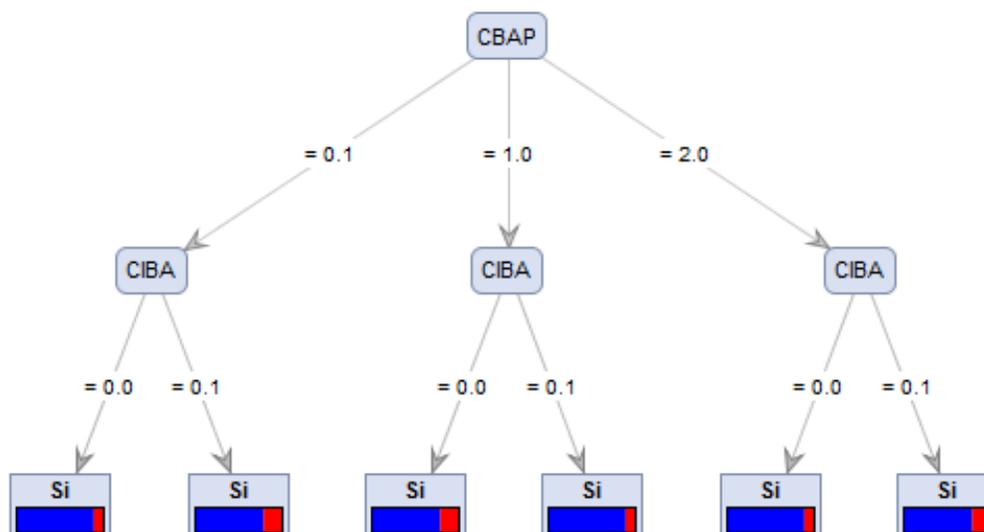
**Tabla 3.33:** Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para los tratamientos de multiplicación de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) respecto a la variable supervivencia.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(UnilateralD)
Residuos	60	0,00	0,36	0,53	<0,0001

Se comprobó el supuesto de homocedasticidad de varianzas con la prueba de Levene (ver tabla C.1.2 anexo resultados), del cual se obtuvo que no existen diferencias significativas entre las varianzas de los tratamientos de multiplicación de brotes en relación a la variable supervivencia ( $p = 0,4760$ ).

El análisis de varianza no paramétrica de Kruskal-Wallis (ver tabla C.1.3 anexo resultados) permite demostrar que no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de multiplicación de brotes, debido al valor p que presenta el modelo ( $p = 0,9489$ ).

El árbol de decisiones (figura 3.14), permite evidenciar que en todos los tratamientos empleados para la multiplicación de brotes de Chuquiragua la supervivencia de brotes es la misma, por lo que no existen diferencias significativas entre los mismos.



**Figura 3.14:** Árbol de decisiones para los tratamientos de multiplicación de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) respecto a la variable supervivencia de brotes.

Empleando la regresión logística para la variable dicotómica supervivencia de brotes, se observó que ningún parámetro es un posible predictor significativo para un nivel de significancia  $\alpha = 5\%$ . Los cocientes de probabilidades (O.R.) obtenidos en la regresión logística permiten evidenciar que no existe la posibilidad de predecir la supervivencia de brotes empleando los parámetros del modelo, ver tabla 3.34 (ver anexo estadístico C.1.6).

**Tabla 3.34:** Regresión logística para los datos categóricos de supervivencia de brotes en los tratamientos de multiplicación de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Parámetros	Est.	E.E.	O.R.	Wald LI (95%)	Wald LS (95%)	Wald CHI*	p-valor
<i>Constante</i>	1,62	0,71	5,00	1,25	20,05	5,16	0,0231
<i>Concentración BAP (0,1 mgL<sup>-1</sup>)</i>	0,00	0,89	1,00	0,18	5,68	0,00	>0,9999

<b>Concentración BAP (1,0 mgL<sup>-1</sup>)</b>	0,00	0,89	1,00	0,18	5,68	0,00	>0,9999
<b>Concentración IBA (0,0 mgL<sup>-1</sup>)</b>	0,26	0,73	1,30	0,31	5,40	0,13	0,7182

### 3.3.2. Número de brotes

En esta etapa de multiplicación de brotes se emplearon 6 tratamientos más un testigo para evaluar el número de brotes que se obtiene por explante, para ello se utilizaron combinaciones de 6 – bencilaminopurina (BAP) con ácido indolbutírico (IBA) y suplementado con brasinolida (BRA); ver tabla 2.4.

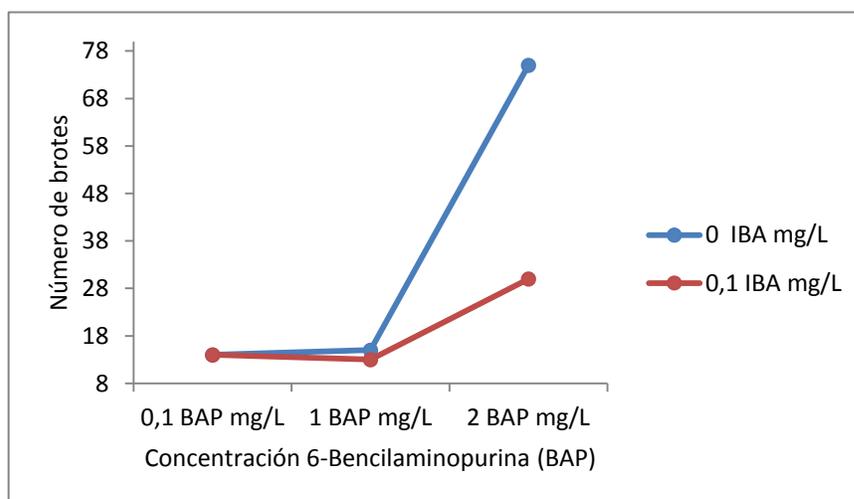
#### Análisis exploratorio de datos

Los resultados que se obtuvieron en cuanto al número brotes por tratamiento fueron aceptables, siendo el tratamiento 3 el mejor tratamiento al obtener 75 brotes en total, los cuales presentaban buenas características fisiológicas como vigor y buen tamaño debido a la presencia de brasinolida en el medio de cultivo, la cual se encuentra en mayor concentración que en la fase anterior (5 mgL<sup>-1</sup>); ver tabla 3.35.

**Tabla 3.35:** Tabla de contingencia para número de brotes respecto a los tratamientos de multiplicación de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

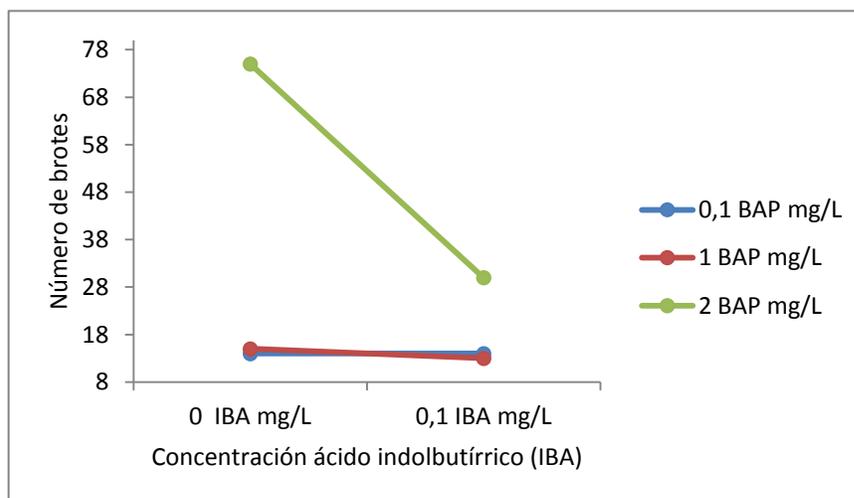
		Concentración BAP (mgL <sup>-1</sup> )		
		0,1	1	2
Concentración IBA (mgL <sup>-1</sup> )	0	14	15	75
	0,1	14	13	30

El tratamiento testigo (cero) (BAP 0 mgL<sup>-1</sup> – IBA 0 mgL<sup>-1</sup> – BRA 0 mgL<sup>-1</sup>), 1 (BAP 0,1 mgL<sup>-1</sup> – IBA 0 mgL<sup>-1</sup> – BRA 5 mgL<sup>-1</sup>), 2 (BAP 1 mgL<sup>-1</sup> – IBA 0 mgL<sup>-1</sup> – BRA 5 mgL<sup>-1</sup>), 4 (BAP 0,1 mgL<sup>-1</sup> – IBA 0,1 mgL<sup>-1</sup> – BRA 5 mgL<sup>-1</sup>) y 5 (BAP 1 mgL<sup>-1</sup> – IBA 0,1 mgL<sup>-1</sup> – BRA 5 mgL<sup>-1</sup>), ocasionaron apenas un brote y dos brotes por explante en los tratamientos mencionados; ver figura 3.15.



**Figura 3.15:** Número de brotes obtenidos *in vitro*, respecto a las concentraciones de BAP empleados en fase de multiplicación de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

En la figura 3.16 se observa que en concentración 0,0 mgL<sup>-1</sup> de IBA y 2 mgL<sup>-1</sup> de BAP se obtuvo el mayor número de brotes, y en concentraciones de 0,1 IBA el número de brotes es similar en las 3 concentraciones de BAP (0,1, 1,0 y 2,0 mgL<sup>-1</sup>).



**Figura 3.16:** Número de brotes obtenidos *in vitro*, respecto a las concentraciones de IBA empleados en fase de multiplicación de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Los resultados de multiplicación de brote que mostraron la cantidad menos elevada de brotes por explante fueron el tratamiento 1 (BAP 0,1 mgL<sup>-1</sup> – IBA 0 mgL<sup>-1</sup> – BRA 2 mgL<sup>-1</sup>), 2 (BAP 1 mgL<sup>-1</sup> – IBA 0 mgL<sup>-1</sup> – BRA 2 mgL<sup>-1</sup>), 4 (BAP 0,1 mgL<sup>-1</sup> – IBA 0,1 mgL<sup>-1</sup> – BRA 2 mgL<sup>-1</sup>) y 5 (BAP 1 mgL<sup>-1</sup> – IBA 0,1 mgL<sup>-1</sup> – BRA 2 mgL<sup>-1</sup>).

### Análisis inferencial de datos

La relación de dependencia o independencia en la concentración de hormona BAP, IBA y el número de brotes en la fase de multiplicación, se estudió mediante el análisis de varianza (ANOVA) y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Duncan; (ver anexo estadístico), con lo que se observa que el modelo se ajusta a las diferentes concentraciones de BAP e IBA ( $p < 0,0001$ ) (tabla 3.36).

La concentración de BAP indica que la variable número de brotes es dependiente de su concentración, además se evidencia que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ( $p < 0,0001$ ).

De igual manera, la concentración de IBA presenta diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos empleados para la multiplicación de brotes de Chuquiragua, a diferencia de la fase de inducción, donde la presencia o ausencia de la misma no marcaba diferencia alguna ( $p < 0,0001$ ).

Para la interacción entre concentración de BAP e IBA se observó que existen diferencias significativas entre los 6 tratamientos efectuados ( $p < 0,0001$ ) (ver anexo estadístico C.2.1).

**Tabla 3.36:** Análisis de varianza (ANOVA) para número de brotes en los tratamientos de multiplicación de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
<b>Modelo</b>	299,08	5	59,82	95,28	<0,0001
<b>Concentración BAP</b>	197,63	2	98,82	157,41	<0,0001
<b>Concentración IBA</b>	36,82	1	36,82	58,65	<0,0001
<b>CBAP*CIBA</b>	64,63	2	32,32	51,48	<0,0001
<b>Error</b>	33,90	54	0,63		
<b>Total</b>	332,98	59			

Para la concentración de BAP (tabla 3.37) mediante la prueba de Duncan, se obtuvo 2 subconjuntos representativos, de los cuales en el subconjunto B está la concentración BAP ( $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ ) presenta los mejores resultados de número de brotes por explante.

**Tabla 3.37:** Prueba de Duncan para la comparación de medias de número de brotes respecto a la concentración de BAP para multiplicación de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Concentración BAP (mgL <sup>-1</sup> )	Medias	n	E.E	Grupo
1,0	1,40	20	0,18	A
0,1	1,40	20	0,18	A
2,0	5,25	20	0,18	B

La tabla 3.38. permite evidenciar que existen 2 subconjuntos para la variable concentración de IBA, donde la mejor concentración para multiplicación de brotes es 0,0 mgL<sup>-1</sup> de IBA.

**Tabla 3.38:** Prueba de Duncan para la comparación de medias de número de brotes respecto a la concentración de IBA para multiplicación de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Concentración IBA (mgL <sup>-1</sup> )	Medias	n	E.E	Grupo
0,1	1,90	30	0,14	A
0,0	3,47	30	0,14	B

En la prueba de Dunca de la tabla 3.39 se observa que existen diferencias significativas entre los tratamientos, donde el tratamiento 3 (BAP 2,0 mgL<sup>-1</sup> – IBA 0,0 mgL<sup>-1</sup> – BRA 5,0 mgL<sup>-1</sup>) es el mejor tratamiento, debido a la media que posee y además que es el único perteneciente al subconjunto C (ver anexo estadístico C.2.2).

**Tabla 3.39:** Prueba de Duncan para los tratamientos de multiplicación de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) respecto a la variable número de brotes.

Concentración BAP (mgL <sup>-1</sup> )	Concentración IBA (mgL <sup>-1</sup> )	Medias	n	E.E.	Grupo
1,0	0,1	1,30	10	0,25	A
0,1	0,0	1,40	10	0,25	A
0,1	0,1	1,40	10	0,25	A
1,0	0,0	1,50	10	0,25	A
2,0	0,1	3,00	10	0,25	B
2,0	0,0	7,50	10	0,25	C

De acuerdo a la figura C.2.2 (ver anexo resultados) no se cumple el supuesto de normalidad para los residuos necesario en un diseño experimental paramétrico, además mediante la prueba de Shapiro-Wilks (modificado) se determinó que la variable en estudio no asume una distribución normal ( $p < 0,0001$ ) (tabla 3.40) (ver anexo estadístico C.2.4).

**Tabla 3.40:** Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para los tratamientos de multiplicación de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) respecto a la variable número de brotes.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(UnilateralD)
Residuos	60	0,00	0,76	0,91	<0,0001

Se comprobó el supuesto de homocedasticidad de varianzas con la prueba de Levene (ver tabla C.2.2 anexo resultados), del cual se obtuvo que no existen diferencias significativas entre las varianzas de los tratamientos en relación a la variable número de brotes durante la fase de multiplicación ( $p = 0,3983$ ).

Mediante el análisis de varianza no paramétrica de Kruskal-Wallis (ver tabla C.2.4), se obtuvo un valor  $p$ , lo cual permite evidenciar que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de multiplicación de brotes ( $p < 0,0001$ ) (ver anexo estadístico C.2.5).

### **3.4. FASE IV: Enraizamiento de brotes**

Una vez obtenidos varios brotes de Chuquiragua en la etapa de multiplicación, los mismos fueron empleados para la etapa de enraizamiento, con el fin de obtener plántulas completas, es decir, que posean un sistema radicular adecuado para su posterior aclimatación. Para este proceso se emplearon 6 tratamientos para la etapa de enraizamiento de brotes, teniendo varias concentraciones de diferentes reguladores de crecimiento que estimulen la formación de raíces en brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*). Las variables evaluadas en esta fase corresponden a:

#### **3.4.1. Presencia de raíces**

Por presencia de raíces, se entiende como el apareamiento o no de raíces inducidas mediante el uso de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento como ácido indol butírrico (IBA) y 6-bencilaminopurina (BAP), cuyos ensayos fueron planteados en la metodología (tabla 2.5).

### Análisis exploratorio de datos

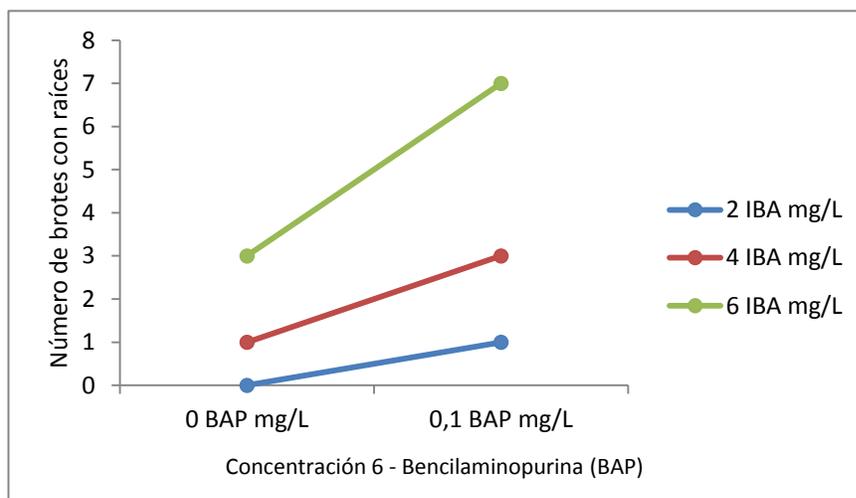
Para esta etapa de enraizamiento se emplearon 6 tratamientos para establecer la mejor concentración de auxinas con fin de obtener raíces en brotes *in vitro* de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

En la tabla 3.41 se puede apreciar que la mayor cantidad de raíces se obtuvieron en el tratamiento 6 (IBA 6 mgL<sup>-1</sup> – BAP 0,1 mgL<sup>-1</sup>), donde a continuación se encuentra el tratamiento 3 (IBA 6 mgL<sup>-1</sup> – BAP 0,0 mgL<sup>-1</sup>), y a continuación con una frecuencia muy baja los tratamientos 5 (IBA 4 mgL<sup>-1</sup> – BAP 0,1 mgL<sup>-1</sup>), 4 (IBA 2 mgL<sup>-1</sup> – BAP 0,1 mgL<sup>-1</sup>) y 2 (IBA 4 mgL<sup>-1</sup> – BAP 0,0 mgL<sup>-1</sup>).

**Tabla 3.41:** Tabla de contingencia para presencia de raíces en brotes respecto a los tratamientos de enraizamiento de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

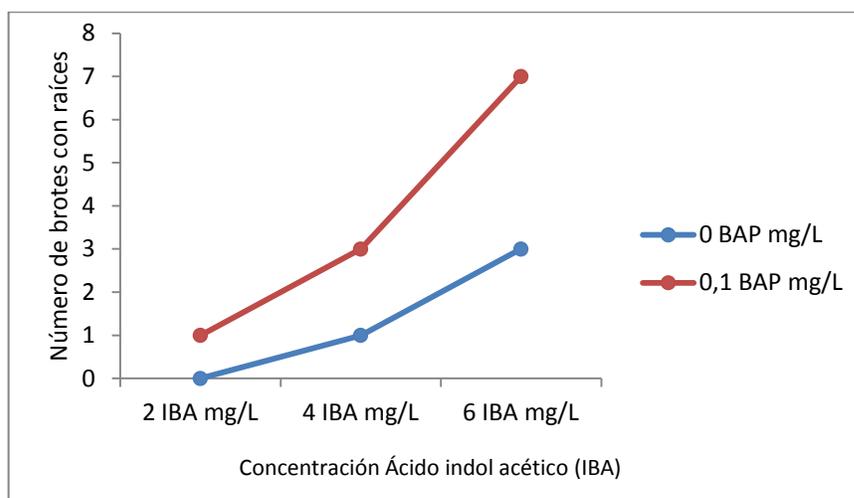
		Concentración BAP mgL <sup>-1</sup>	
		0	0,1
Concentración IBA (mgL <sup>-1</sup> )	2	0	1
	4	1	3
	6	3	7

En la figura 3.17. se observa que la mayor aparición de raíces en los explantes de Chuquiragua (7) se obtuvo en una concentración de 6 mgL<sup>-1</sup> de IBA y 0,1 mgL<sup>-1</sup> de BAP, mientras que la tasa de apareamiento de raíces fue nula fue en la concentración de 2 mgL<sup>-1</sup> de IBA y 0,0 mgL<sup>-1</sup> BAP.



**Figura 3.17:** Número de brotes con raíz respecto a las concentraciones de BAP empleados en fase de enraizamiento de brotes de Chuquiragua (*Chuquiragua jussieui*).

Empleando concentraciones de  $6 \text{ mgL}^{-1}$  de IBA se observa (figura 3.18) que en ausencia de BAP se obtuvieron 3 brotes con raíz, mientras que en concentraciones de  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP la presencia de raíces se incrementaron, siendo este el mejor tratamiento para la etapa de enraizamiento.



**Figura 3.18:** Número de brotes con raíz respecto a las concentraciones de IBA empleados en fase de enraizamiento de brotes de Chuquiragua (*Chuquiragua jussieui*).

### Análisis inferencial

Para analizar la relación de dependencia o independencia en la concentración de hormona IBA, BAP y la formación de raíces, se realizó un análisis de varianza y para la homogeneidad de varianzas se empleó la prueba de Duncan; (ver anexo estadístico), de esta manera se observa que el modelo se ajusta a las concentraciones de IBA y BAP ( $p = 0,0027$ ); ver tabla 3.42.

Mediante la tabla 3.42. se observa la dependencia de la variable presencia de raíz con la concentración de IBA lo que indica además, que existen diferencias significativas entre los tratamientos de enraizamiento de brotes ( $p = 0,0020$ ).

La presencia de raíces en brotes es dependiente de la variable concentración de BAP, con lo que también se observa que existen diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones de BAP empleadas para la inducción de enraizamiento ( $p = 0,0234$ ).

Para la interacción entre IBA y BAP no se observaron diferencias estadísticas significativas, es decir, la presencia/ausencia de raíces en brotes de Chuquiragua se ve influenciada en su mayoría por la concentración de IBA en el medio de cultivo para inducción de enraizamiento que por la interacción de auxina/citoquinina ( $p = 0,4645$ ) (ver anexo estadístico D.1.1).

**Tabla 3.42:** Análisis de varianza (ANOVA) para presencia de raíces en los tratamientos de enraizamiento de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
<b>Modelo</b>	3,15	5	0,63	4,20	0,0027
<b>Concentración IBA</b>	2,10	2	1,05	7,00	0,0020
<b>Concentración BAP</b>	0,82	1	0,82	5,44	0,0234
<b>CIBA*CBAP</b>	0,23	2	0,12	0,78	0,4645
<b>Error</b>	8,10	54	0,15		
<b>Total</b>	11,25	59			

La prueba de Duncan (tabla 3.43) indica que existen dos subconjuntos para la concentración de IBA, siendo la mejor concentración para inducir enraizamiento  $6,0 \text{ mgL}^{-1}$ .

**Tabla 3.43:** Prueba de Duncan para la comparación de medias en presencia de raíces respecto a la concentración de IBA para enraizamiento de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Concentración IBA (mgL <sup>-1</sup> )	Medias	n	E.E	Grupo
2	0,05	20	0,09	A
4	0,20	20	0,09	A
6	0,50	20	0,09	B

La tabla 3.44. permite demostrar que existen diferencias estadísticas significativas para la concentración de BAP, por lo que existen 2 subconjunto A y B, siendo la medias más alta 0,37 para la concentración de 0,1 mgL<sup>-1</sup> BAP.

**Tabla 3.44:** Prueba de Duncan para la comparación de medias en presencia de raíces respecto a la *concentración* de BAP para enraizamiento de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Concentración BAP (mgL <sup>-1</sup> )	Medias	n	E.E	Grupo
0,0	0,13	30	0,07	A
0,1	0,37	30	0,07	B

La prueba de Duncan muestra que el mejor tratamiento es aquel que se encuentra en el subconjunto B, el cual posee la media más alta que se observa en la tabla 3.45, el tratamiento seis (concentración IBA 4,0 mgL<sup>-1</sup> - BAP 0,1 mgL<sup>-1</sup>) (ver anexo estadístico D.1.2).

**Tabla 3.45:** Prueba de Duncan para los tratamientos de enraizamiento empleados para brotes *in vitro* de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Concentración IBA (mgL <sup>-1</sup> )	Concentración BAP (mgL <sup>-1</sup> )	Medias	n	E.E.	Grupo
2,0	0,0	0,00	10	0,12	A
2,0	0,1	0,10	10	0,12	A
4,0	0,0	0,10	10	0,12	A
4,0	0,1	0,30	10	0,12	A
6,0	0,0	0,30	10	0,12	A
6,0	0,1	0,70	10	0,12	B

Mediante la figura D.1.2 (ver anexo resultados) se comprobó que la variable no cumple el supuesto de normalidad para los residuos necesario en un diseño experimental paramétrico, además mediante la prueba de Shapiro-Wilks (modificado) se evidenció que la variable en estudio no tiene una distribución normal ( $p < 0,0001$ ); ver tabla 3.46 (ver anexo estadístico D.1.4).

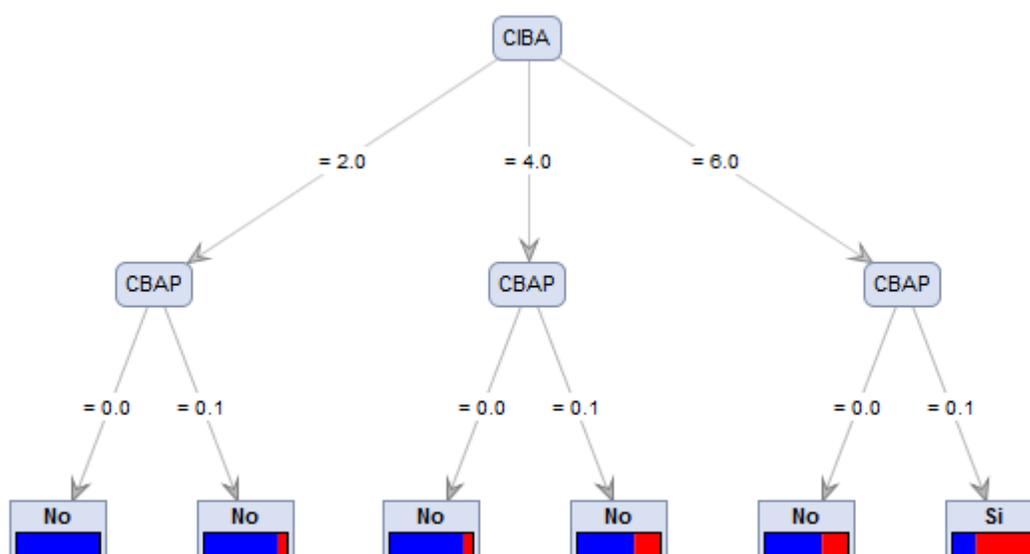
**Tabla 3.46:** Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para los tratamientos de enraizamiento de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(UnilateralD)
<i>Residuos</i>	60	0,00	0,37	0,87	<0,0001

Se demostró el supuesto de homocedasticidad de varianzas con la prueba de Levene (ver tabla D.1.2 anexo resultados), del cual se obtuvo que existen diferencias significativas entre las varianzas de los tratamientos en relación a la variable presencia de raíces en brotes durante la fase de enraizamiento ( $p < 0,0001$ ) (ver anexo estadístico D.1.3).

El análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis (ver tabla D.1.4 anexo resultados), permitió evidenciar que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de enraizamiento de brotes ( $p=0,0055$ ), además se observó que el mejor tratamiento para inducción de raíces es el tratamiento 6 (IBA 6,0 mgL<sup>-1</sup> – BAP 0,1 mgL<sup>-1</sup>) (ver anexo estadístico D.1.5).

El árbol de decisiones (figura 3.19), permite comprobar que el único tratamiento eficaz para la inducción a enraizamiento es el tratamiento 6 (IBA 6,0 mgL<sup>-1</sup> – BAP 0,1 mgL<sup>-1</sup>), a diferencia del resto de tratamientos, donde la probabilidad de obtener raíces es baja. Para el caso de concentración de IBA 2,0 mgL<sup>-1</sup> y 0,0 mgL<sup>-1</sup> BAP la probabilidad de presencia de raíces es nula.



**Figura 3.19:** Árbol de decisiones para los tratamientos de enraizamiento de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) respecto a la variable presencia de raíces.

Empleando la regresión logística para la variable dicotómica presencia de raíces, se observó que la concentración de IBA ( $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ ) es un parámetro predictor significativo de enraizamiento ( $p=0,0058$ ) para un nivel de significancia  $\alpha=5\%$ , mientras que en concentraciones de IBA  $4,0 \text{ mgL}^{-1}$  las posibilidades de evidenciar enraizamiento son bajas ( $p=0,0420$ ).

Los cocientes de probabilidades (O.R.) obtenidos en la regresión logística permiten evidenciar que la posibilidad de predecir el enraizamiento de brotes empleando los parámetros del modelo no es el adecuado, ver tabla 3.47 (ver anexo estadístico D.1.6).

**Tabla 3.47:** Regresión logística para los datos categóricos de presencia de raíces en los tratamientos de enraizamiento de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Parámetros	Est.	E.E.	O.R.	Wald LI (95%)	Wald LS (95%)	Wald CHI*	p- valor
<i>Constante</i>	0,84	0,62	2,31	0,69	7,73	1,84	0,1752
<i>Concentración IBA (<math>2,0 \text{ mgL}^{-1}</math>)</i>	-3,24	1,17	0,04	4,0 E-3	0,39	7,62	0,0058
<i>Concentración IBA (<math>4,0 \text{ mgL}^{-1}</math>)</i>	-1,59	0,78	0,20	0,04	0,94	4,14	0,0420
<i>Concentración BAP (<math>0,0 \text{ mgL}^{-1}</math>)</i>	-1,67	0,76	0,19	0,04	0,83	4,88	0,0272

## CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Establecimiento del cultivo *in vitro*.

La importancia del uso de técnicas de cultivo *in vitro* como método de conservación y preservación de especies de plantas en peligro de extinción ha ido tomando fuerza debido a que mediante esta, se puede mantener, multiplicar y desarrollar plántulas completas a partir de una planta madre, como es el caso de *Chuquiraga jussieui*, donde el uso del cultivo *in vitro* fue necesario, ya que la planta *ex situ* posee un desarrollo lento y además se evidenció que no existen especímenes juveniles, sino, arbustos de edad adulta. Además se realizó una prueba para comprobar si la semilla es viable *in vitro*, sin evidenciar ningún resultado satisfactorio, lo cual conlleva a establecer que la única fuente de material vegetal son yemas apicales y axilares.

Al ser una especie en peligro de extinción y endémica de los páramos andinos se determinó que la estandarización de un protocolo para el cultivo *in vitro* es esencial, debido a que esta técnica permitió salvaguardar esta planta, además que, a futuro, se podría realizar más investigaciones respecto a la importancia y uso de la Chuquiragua, debido a las propiedades medicinales que esta posee, ya que durante el transcurso de este proyecto, la búsqueda de información fue compleja, siendo así, la primera investigación científica a nivel de cultivo *in vitro* a desarrollarse en esta especie (Sklenář1. P. 2005).

Según Perez, C. 2008, los recursos fitogenéticos proporcionan la materia prima para la obtención de nuevas y mejores variedades de plantas mediante mejora vegetal clásica o moderna, además de ser la fuente irremplazable de características tales como resistencia a enfermedades, tolerancia a ambientes adversos, productividad y para preservación y conservación de especies en peligro de extinción.

La limpieza de las muestras vegetales (yemas apicales y axilares) empleadas para el cultivo *in vitro* de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*), se la realizó empleando un protocolo de desinfección estandarizado en experimentos elaborados previamente en esta investigación.

#### **4.1.1. FASE I: Introducción y desinfección de yemas.**

En la desinfección de las yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) realizando un procedimiento de control fitosanitario en invernadero se obtuvieron resultados de contaminación de 70% a 80% para los tratamientos en los que se empleó concentraciones bajas de hipoclorito de sodio (0,5% v/v), mientras que para los tratamientos con mayor concentración de hipoclorito de sodio (>1,0 % v/v) se obtuvo una contaminación menor al 40%, teniendo los mejores resultados (<10% de contaminación) en los tratamientos con hipoclorito de sodio 1,5% v/v. Según Abdelnour Ana, Jean Escalant, 1994, materiales vegetales que crecen en condiciones de invernadero son más limpios que los que se mantiene en el campo, las yemas, tanto apicales como axilares de Chuquiragua que se emplearon como muestras vegetales para la introducción *in vitro* se obtuvieron de plantas que se desarrollaron y controlaron en invernadero, mismas que fueron sometidas a un tratamiento fitosanitario con la

aplicación de un fungicida de contacto (Thicarb® SC35-15) con principio activo: 2-metoxicarbamilo-bencimidazol y bisulfuro de tetrametiltio carbamilo en una solución al 0.5% durante 15 días con una aplicación cada 3 días, según Novo, R., 2009 el bisulfuro de tetrametiltio inhibe la germinación de esporas y el crecimiento del micelio.

Dentro de los factores que influyen en la introducción de explantes para el cultivo *in vitro* es el tamaño del explante, según Abdelnour Ana, Jean Escalant, 1994 entre más pequeño sea el explante a introducir menor será la contaminación a ser eliminada; el tamaño promedio de los explantes de yemas apicales y axilares de Chuquiragua fue de 5 cm; el cual fue el más adecuado, permitiendo de esta manera el establecimiento del cultivo y respuestas deseadas en la investigación.

La fase de desinfección consistió en experimentar soluciones de hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones y tiempo de inmersión, las concentraciones y tiempos de inmersión fueron de: 0,5% v/v – 10 min – 15 min, 1,0% v/v - 10 min – 15 min y 1,5% v/v – 10 min – 15 min. Al ser evaluados los explantes se observó que las concentraciones de hipoclorito de sodio mayores a 1,0% fueron muy fuertes para la gran mayoría de explantes ocasionando el necrosamiento de tejido y la falta de viabilidad. Según Sánchez, M., 2004, este efecto puede tratarse por la característica de potente oxidante que posee la solución de hipoclorito de sodio, pero concentraciones altas del mismo son muy efectivas en cuanto a desinfección del explante, debido a que en concentraciones de 1,5% v/v de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión 15 min resultó muy eficaz durante la desinfección, pero la viabilidad del explante se vio afectada drásticamente, entonces la relación óptima entre las concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión fue: concentraciones altas de hipoclorito de sodio con un bajo tiempo de inmersión, evitando así la contaminación y oxidación de las

muestras vegetales, de esta manera se obtuvo la media más alta y representativa en cuanto a las variables descritas en el tratamiento tres, donde se empleó una concentración de hipoclorito de sodio de 1,5% v/v y un tiempo de inmersión de 10 minutos.

No se recurrió a la utilización de fungicidas para la desinfección de los explantes durante la fase de introducción, debido a que la prevalencia de bacterias era más notoria que hongos, los cuales empleando los tratamientos de desinfección descritos fueron eliminados casi en su totalidad.

La eliminación de restos vegetales necrosados durante el proceso de desinfección se realizó en la cámara de flujo laminar posterior a la desinfección, donde el principal propósito es no maltratar el tejido meristemático y no afectar el proceso de crecimiento y desarrollo del mismo, estos cortes fueron realizados empleando material quirúrgico nuevo y esterilizado, pues según Kyte, L., Kleyn, J., 2003 puede ser una de las causas de la oxidación de los explantes introducidos, debido al óxido que presentan las hojas de bizturí, el cual contribuye al proceso de oxidación de los explantes; además realizar demasiados cortes a las muestras vegetales también promueve a que el explante excrete fenoles, que tienen como consecuencia que los explantes no sean viables en la etapa de incubación.

Después de la determinación de la mejor combinación de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión, se optó por la utilización del tratamiento 3 para el proceso de desinfección de Chuquiragua, obteniendo la media más alta 0,90 (tabla 3.5) en cuanto a la ausencia de contaminación se refiere y la media más alta 0,90 (tabla 3.12) en cuanto a la ausencia de oxidación.

El medio de cultivo que se empleó para el proceso de desinfección fue MS 50% más  $6,0 \text{ gL}^{-1}$  agar ;  $20 \text{ gL}^{-1}$  de azúcar; ph 5.7 – 5.8. Este medio contribuyó además a disminuir la tasa de oxidación que presentaba el cultivo de las yemas apicales y axilares de Chuquiragua, según Hernández, A., 2001, la oxidación es el producto de compuestos fenólicos que normalmente son almacenados en vacuolas, peroxisomas y vesículas que son secretados como un mecanismo de defensa al existir una ruptura de las células; estos compuestos se disuelven, causando de esta manera la inactivación de las enzimas, teniendo como secuela el necrosamiento y muerte del material vegetal. Las sales presentes en el medio MS suelen ser uno de los factores para la oxidación del explante, además el uso de hipoclorito de sodio puede aumentar este proceso de muerte celular debido a su característica oxidante, es por ello que se recurrió a la disminución de las sales del medio Murashige-Skoog (MS).

Se usó  $20 \text{ gL}^{-1}$  de azúcar en el medio de cultivo como fuente de carbono con el propósito de disminuir los niveles de oxidación y necrosamiento de los explantes; Cárdenas, M., 2002 menciona que la sacarosa se convierte por hidrólisis durante la esterilización del medio de cultivo en dos monosacáridos: glucosa y frutosa; lo que provoca cambios a nivel osmótico del medio, induciendo de esta manera a que el medio sea más negativo, lo cual provoca que exista pérdida de presión por mucha concentración de soluto en el medio y por lo tanto la muerte celular, es por ello que se recurrió a la reducción de la concentración de azúcar.

#### 4.1.2. FASE II: Inducción a brotes a partir de yemas.

El objetivo en esta fase fue inducir a la formación de brotes a partir de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) utilizando diferentes concentraciones de la citoquinina 6 – bencilaminopurina BAP: 0,1 mgL<sup>-1</sup>; 1,0 mgL<sup>-1</sup>; 2,0 mgL<sup>-1</sup>, en combinación con la auxina ácido indolbutírico IBA: 0,1 mgL<sup>-1</sup>; 0,0 mgL<sup>-1</sup>, lo que se obtuvo es que la concentración de 2,0 mgL<sup>-1</sup> de BAP y 0,0 mgL<sup>-1</sup> de IBA es la más adecuada para el propósito de establecer un protocolo para el cultivo *in vitro* de Chuquiragua, siendo en esta fase fundamental la presencia de brotes y número de brotes por explante; donde se consiguió una media de 0,92 (tabla 3.19) y 6,39 (tabla 3.26), respectivamente.

Las concentraciones de 0,1 mgL<sup>-1</sup> BAP en lo que se refiere a la obtención de brotes no presentó ninguna relevancia, en contraste con la concentración de BAP de 1,0 mgL<sup>-1</sup> (tratamiento 2 y 5) que al parecer induce a la formación de brotes, mientras que la concentración de BAP de 2,0 mgL<sup>-1</sup> en combinación o no de IBA (0,1 mgL<sup>-1</sup>) induce de forma eficiente la formación de brotes (tratamiento 3 y 6), donde al parecer se debe a una compensación hormonal ocasionada por la hormona presente en el medio de cultivo en condiciones *in vitro* y la carga de hormona interna que posee la especie; en este caso citoquinina. Según Jordan, M., 2006, las citoquininas endógenas pueden inducir y fijar un tipo de expresión fisiológica de acuerdo a los niveles en que se encuentre presente; sin embargo, las células vegetales inician sus procesos de diferenciación bajo condiciones *in vitro* en presencia de la combinación de estas hormonas, lo cual justifica las respuestas obtenidas durante la fase de inducción a brotes y multiplicación de brotes, donde se observó que en presencia de la misma concentración de BAP (2,0 mgL<sup>-1</sup>) el número de brotes es aproximado, aunque la diferencia en medias se debe principalmente al aumento de la concentración de brasinolida BRA en la fase de multiplicación.

Según Salgado, R., 2008, la brasinolida (BRA) tiene como principal efecto fisiológico la estimulación de la capacidad de crecimiento en una gran variedad de sistemas en estudio; planta completa, segmentos de diferentes segmentos y tejidos vegetativos, es por ello que el aumento del número de brotes de Chuquiragua en la fase de multiplicación es evidente, además permite una mejor elongación y desarrollo de los nuevos brotes.

El propósito durante esta fase fue establecer el cultivo *in vitro* de las yemas apicales y axilares de Chuquiragua, obteniendo un buen número de brotes, sin embargo, en la siguiente fase las concentraciones de citoquininas son iguales, pero la concentración de brasinolida difiere; con el objetivo de mejorar la capacidad de multiplicación de esta especie bajo condiciones *in vitro*.

#### **4.1.3. FASE III: Multiplicación de brotes.**

Una vez obtenido un buen número de brotes durante la fase de inducción se procedió a la fase de multiplicación, donde el aumento del número de brotes por explantes es primordial, y esto se obtuvo empleando la misma concentración de BAP ( $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ ) en ausencia de IBA y aumentando la concentración de BRA ( $5,0 \text{ mgL}^{-1}$ ), consiguiendo una media del número de brotes de 7,5 (tabla 3.39) en el tratamiento mencionado. El tratamiento 6 le siguió con una media de 3,00 (tabla 3.39), lo cual hace referencia a las concentraciones empleadas de reguladores, siendo  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  IBA el elemento que al parecer inhibe la formación de brotes. Esto se debe principalmente al sinergismo que existe entre citoquininas y auxinas, según Cruz, M., 2004, la combinación de IBA, cinetina y BAP promueven la formación y número de brotes por

explantes en concentraciones adecuadas para determinada especie, lo que se contrasta con este estudio, debido a que en ausencia de IBA el apareamiento y número de brotes aumenta.

Mediante el análisis de varianza se observó que existen diferencias estadísticas significativas para las concentraciones de IBA, donde se obtuvo un valor  $p < 0,0001$ , es decir, que hay diferencias entre las concentraciones de  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  y  $0,0 \text{ mgL}^{-1}$  empleados en los tratamientos, lo cual indica que en presencia o ausencia de esta auxina en el medio de cultivo, se va a promover la formación de brotes, así como el número de brotes, lo que sugiere que al cumplir con la interacción con el BAP para el número de brotes, esta variable se ve afectada por dicha auxina, obteniéndose los mejores resultados en ausencia de la misma.

La concentración de citoquinina (BAP) en relación de auxina (IBA) usada en esta investigación fue de 20 a 1, Schmülling, T., 2004, señala que la cantidad de citoquinina en relación de auxina determina la diferenciación celular del tejido en formación de brotes o raíces; por esto dice además que a mayor concentración con respecto a auxina promueve la formación de brotes, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en la fase de inducción y multiplicación de Chuquiragua, donde en concentraciones de  $2,0 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP y  $0,0 \text{ mgL}^{-1}$  de IBA el número de brotes, así como la aparición de los mismos, se vió estimulada de forma eficiente.

Al realizar el análisis de varianza no existen diferencias estadísticas significativas para la variable supervivencia, donde se obtuvo un valor  $p = 0,9542$ , es decir, no existen diferencias entre los seis tratamientos utilizados durante la fase de multiplicación

de brotes. La supervivencia de brotes durante la etapa de multiplicación de brotes es alta y no depende del tipo de tratamiento (tabla 3.26) a ser empleado, donde la principal fuente de muerte celular y necrosamiento se debe a la manipulación que se realiza durante la extracción de nuevos brotes y cortes de yemas apicales y axilares con material quirúrgico estéril, debido a que durante el proceso, se cortan hojas, primordios foliares y tejido meristemático, lo cual provoca que no exista respuesta morfológica en el explante y finalmente su muerte.

El aumento en la tasa de multiplicación de brotes es evidente en esta fase, lo cual concuerda con lo citado por Jambhale, et al., 2000, donde menciona que a medida que un determinado material vegetal es subcultivado *in vitro*, su capacidad de absorción de las hormonas exógenas aumenta, siendo en este estudio la citoquinina BAP la fitohormona inductora de la formación de brotes, sin embargo, se debe tomar en cuenta que la proporción de los reguladores de crecimiento empleados durante la investigación debe ser escogida de forma correcta, donde se debe considerar además la síntesis propia de las plantas. Concentraciones elevadas tanto de citoquininas como de auxinas pueden causar un efecto de inhibición durante la morfogénesis *in vitro* del material vegetal.

Esta tasa de multiplicación constituye una variable muy importante a ser evaluada durante el establecimiento del cultivo *in vitro* de una determinada especie, debido a que permite diferenciar la producción de plántulas en sistemas *in vitro* con la reproducción vegetativa en campo (Roca W, Mroginski L, 1993); además es una herramienta muy importante para realizar comparaciones entre las diferentes formas de micropropagación *in vitro*. En esta investigación se obtuvo un aumento de 1,11 del número de brotes presentes por explante durante la fase de multiplicación.

#### 4.1.4. FASE IV: Enraizamiento de brotes.

Los brotes obtenidos en la fase de multiplicación fueron traspasados a un medio de cultivo con auxinas (IBA) con el fin de inducir la formación de raíces en el explante, obteniendo de esta manera una plántula completa de desarrollada a partir del cultivo *in vitro* de yemas apicales y axilares de Chuquiragua. Los tratamientos empleados para la fase de enraizamiento (tabla 2.5) se basaban en la utilización del ácido indol butírico, el cual es la auxina natural más común e importante, según Perez, J.N., 1998, el uso de auxinas en las plantas genera un efecto variable y depende del tipo de planta, tipo de auxina, momento y lugar de aplicación, entre otros factores. Gomez, Y., Zamilpa, A., 2009, mencionan que la utilización de ANA como promotor de enraizamiento es efectivo, pero concentraciones altas de esta auxina produce la oxidación del explante, a diferencia del uso de AIA e IBA, los cuales disminuyen la oxidación del explante, lo cual concuerda con el presente trabajo, donde no se observó necrosamiento u oxidación de la zona terminal de brotes inducidos a enraizamiento, además se observó que los brotes generaban callos rizogénicos; donde luego se desarrollaron raíces de buen tamaño y composición con IBA.

Mediante el análisis de varianza (tabla 3.39) se observó que existen diferencias estadísticas significativas ( $p = 0,0234$ ) para las concentraciones de BAP empleadas para la inducción a formación de raíces, es decir, la presencia o ausencia de esta citoquinina infiere en la presencia de raíces en los brotes, ya que se obtuvo una media de 0,70 (tabla 3.45) para el tratamiento 6 y una media de 0,30 (tabla 3.45) para el tratamiento 3, los cuales se encontraban en el mismo subconjunto B (tabla 3.45).

Para la formación de raíces en brotes de Chuquiragua se requirió de concentraciones altas de ácido indolbutírico, donde al emplear concentraciones de  $6,0 \text{ mgL}^{-1}$  de IBA se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a formación de raíces, siendo el tratamiento más óptimo para generar raíces el tratamiento seis (IBA  $6,0 \text{ mgL}^{-1}$  – BAP  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ ).

Según Perez, J.N., 1998, la importancia de generar una uniformidad en la calidad de la plántula que se produce *in vitro* es esencial para no generar problemas durante el proceso de aclimatación, además del rechazo que puede presentar el producto en su comercialización, además las diferencias fisiológicas pueden generar confusión sobre si el material vegetal presenta problemas con variabilidad genética.

La presencia de raíces no depende de la presencia o ausencia de la citoquinina BAP lo cual concuerda con Perez, J.N., 1998, en donde se menciona que para la inducción de enraizamiento no es necesaria la adición de citoquininas al medio de cultivo, sino, es necesario la sustitución de los mismos por algunas o una única auxina. La relación entre citoquinina/auxina fue menor a uno (0,0167), donde se produjo la mayor proliferación de raíces (tratamiento seis), además se debe tomar en cuenta que existe un efecto residual de la hormona BAP empleada durante la fase de inducción y multiplicación de brotes, lo cual suele causar un efecto inhibitorio en la formación de raíces, esto se pudo evidenciar en los tratamientos donde se empleó una concentración  $<6,0 \text{ mgL}^{-1}$  de IBA, donde la presencia de raíces no superó el 30%.

La aplicación de IBA en altas concentraciones para la inducción a enraizamiento de brotes de Chuquiragua no generó una alta formación de callo, además según Pierik,

1990, concentraciones bajas de auxinas son suficiente para la generación de raíces, lo cual no se aplica en esta especie, ya que se necesitó concentraciones mayores a  $6,0 \text{ mgL}^{-1}$  de IBA en presencia o ausencia de BAP para el desarrollo de raíces.

Durante la etapa de enraizamiento se empleó una concentración de  $45 \text{ gL}^{-1}$  de azúcar, lo cual ayudó a desarrollar un crecimiento vigoroso de la planta y de la mismo forma en las raíces, lo cual concuerda con Perez, J.N., 1998, que recomienda elevar las concentraciones de sacarosa en los medios de cultivo.

El no haber alcanzado altos niveles de enraizamiento en los distintos tratamientos, puede deberse a la incubación del material vegetal bajo temperaturas que oscilan entre los  $26\text{-}28^{\circ}\text{C}$ , además de ser almacenados bajo luz, lo cual no ayuda al desarrollo radical, debido a que la luz tiene un efecto negativo sobre la formación de raíces (Pierik, 1990). La temperatura en la que se encuentran plantas de Chuquiragua es de  $0 - 10^{\circ}\text{C}$  en los páramos andinos, por lo que el proceso de enraizamiento puede verse afectado por las condiciones que se manejan bajo laboratorio, además la humedad que presenta el suelo de estas zonas es elevado.

De esta manera, los resultados permitieron establecer que es posible el desarrollo y conservación de *Chuquiraga jussieui* mediante el cultivo *in vitro*, además se evidenció que la planta posee tolerancia al cambio de ambiente, ya que las condiciones a la cual fue incubada no eran similares a las condiciones ambiental del habitat natural de esta. Según (Roca W, Mroginski L, 1993), es necesario igualar las condiciones ambientales en las cuales la planta crece, pero durante el transcurso de este proyecto, no se presentaron problemas de crecimiento y desarrollo celular.

## CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

1. La aplicación de un tratamiento fitosanitario, Thicarb® SC35-15 con principio activo: 2-metoxicarbamilo-bencimidazol y bisulfuro de tetrametiltio carbamilo en una solución al 0.5% durante 15 días con una aplicación cada 3 días a las plantas donadoras de explantes aclimatadas en condiciones de invernadero, permitió obtener buenos resultados en el protocolo de desinfección consiguiendo un 10% de contaminación.
2. El mejor tratamiento de desinfección para las yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) fue el tratamiento 3: concentración hipoclorito de sodio 1,5% v/v - tiempo de inmersión: 10 minutos, obteniendo la media más alta en cuanto a la ausencia de contaminación (0,90) ( $p < 0,0001$ ) y oxidación (0,90) ( $p < 0,0001$ ).
3. El medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) reducido al 50% su concentración, permitió el desarrollo adecuado de explantes de Chuquiragua, evitando de esta manera la oxidación y ausencia de respuesta fisiológica.
4. La mejor concentración de 6 – bencilaminopurina (BAP) empleada en la etapa de inducción a brotes fue la de  $2,0 \text{ mgL}^{-1}$  en ausencia de ácido indol butírrico (IBA), obteniéndose una media de 6,39 brotes por explante ( $p < 0,0001$ ).

5. La adición de brasinolida en la etapa de inducción y multiplicación de brotes permitió una respuesta rápida de los explantes, obteniéndose un buen número de brotes por explante, así como un buen tamaño de los mismos.
6. La mejor combinación de citoquinina vs auxina para la fase de multiplicación de brotes de Chuquiragua fue el tratamiento 3: BAP vs IBA (BAP  $2,0 \text{ mgL}^{-1}$  – IBA  $0,0 \text{ mgL}^{-1}$ ); con una media de 7,50 brotes por explante, en comparación con tratamiento 6: BAP vs IBA (BAP  $2,0 \text{ mgL}^{-1}$  – IBA  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ ) donde se obtuvo una media de 3,0 brotes por explante ( $p < 0,0001$ ).
7. La realización de subcultivos en explantes de Chuquiragua permitió aumentar la capacidad de producción de brotes durante la fase de multiplicación.
8. El uso de una alta concentración de la auxina ácido indol butírico (IBA) durante la fase de enraizamiento de brotes de Chuquiragua permitió la formación de callo rizogénico, del cual se desarrollaron posteriormente raíces.
9. La combinación recomendable de auxinas vs citoquininas para la fase de enraizamiento fue el tratamiento 6: IBA vs BAP (IBA  $6,0 \text{ mgL}^{-1}$  – BAP  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ ) obteniéndose la media más alta (0,70) en cuanto a presencia de raíces por explante, en comparación con tratamiento 1: IBA vs BAP (IBA  $2,0 \text{ mgL}^{-1}$  – BAP  $0,0 \text{ mgL}^{-1}$ ) donde no se observó raíces en el explante ( $p = 0,0020$ ).
10. Se acepta la hipótesis planteada al inicio de este trabajo, la cual afirma que existe un protocolo para el establecimiento del cultivo *in vitro* de Chuquiragua, que permita, a partir de yemas apicales y axilar, obtener plántulas viables en forma significativa.

## CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES

1. Emplear la información generada en este estudio para el desarrollo de futuras investigaciones en Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*), con el fin de la preservación y mantenimiento de esta especie silvestre vulnerable en peligro de extinción.
2. Probar otras citoquininas vs auxinas para determinar si existe una mejor combinación que permita aumentar la producción de brotes en explantes de Chuquiragua.
3. Experimentar otros medios de cultivo que faciliten la introducción y obtención de respuestas fisiológicas de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).
4. Ensayar *in vitro* con otras auxinas para optimizar la producción de raíces en brotes de Chuquiragua, debido a que en este estudio se obtuvo un 70% de presencia de raíces.
5. Realizar un estudio de identificación de los metabolitos secundarios que se encuentran en Chuquiragua, lo cual confiere a la planta sus diversos usos medicinales.
6. Mantener las condiciones de incubación lo más uniformes posibles durante la etapa de inducción, multiplicación y enraizamiento, debido a que estas influyen de manera significativa sobre el comportamiento de los explantes.

## CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFIA

- Abdelnour, A. Escalant, J. (1994). Conceptos básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales. Biblioteca Orton IICA/CATIE. s/e. 1 – 15pp.
- Barakat & Abdel Fattah. (2010). *In vitro* culture and plant regeneration derived from ray florets of *Chrysanthemum morifolium*. Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Gomal University D.I. Khan – Pakistan.
- Castillo A. (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas.
- Cerón C. (2005). Manual de Botánica: Sistémica, etnobotánica y métodos de estudio en el Ecuador, Universidad Central del Ecuador, Editorial Universitaria, Quito – Ecuador.
- Cruz, M. (2004). Efecto de la 6-bencilaminopurina en la proliferación de brotes *in vitro* de tres variedades de caña de azúcar (*Saccharum officinarum L.*), Universidad de San Carlos de Guatemala, facultad de agronomía, instituto de investigaciones agronómicas, Guatemala.
- Cubero, J. (2003), Introducción a la mejora genética vegetal. Mundi Prensa Libros. Segunda edición. España. 353 – 364pp.
- Ezcurra, C. (1985). Revisión del género *Chuquiraga* (*Compositae-Mutisieae*). Darwiniana 26: 219–284.

- Ezcurra C. Ruggiero A. (1997) Phylogeny of Chuquiraga sect. Acanthophyllae (Asteraceae Barnadesioideae), and the Evolution of its Leaf Morphology in Relation to Climate. Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue, C.C. 1336, (8400) S. C. de Bariloche, Rio Negro, Argentina, Departamento Científico de Plantas Vasculares, Museo de La Plata, Paseo del Bosque s/n, (1900) La Plata, Buenos Aires, Argentina. Systematic Botany, 22(1): pp. 151-163.
- Gómez, Y., Zamilpa, A. (2009). Efecto de auxinas en la morfología de raíces *in vitro* de *Castilleja tenuiflora*, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Carretera Yautepec – Jojutla Km. 8.5, San Isidro, Yautepec, Morelos, México.
- Hernández, A., G. A. (2001). Establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* (Bambú amarillo). Instituto Tecnológica de Costa Rica, 24.
- Hodson de Jaramillo. (2008). *In vitro* regeneration of three Chrysanthemum (*Dendrathera grandiflora*) varieties “vía”organogenesis and somatic embryogenesis. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Cra 7 No 40 – 62, Bogotá, Colombia.
- Izco J. (2004), Botánica, segunda edición, Editorial McGraw hill Interamericana, España – Madrid.
- Jambhale, N.D. Jambhale, S.C. Patil, A.S. Jadhav, S.V. Pawar & B.D. Waghmode. (2000). Efecto de la cantidad de subcultivos en la multiplicación *in vitro* de

- cuatro clones de banano. Plant Tissue Culture, Laboratory, Department of Agricultural Botany, Mahatma Phule Krishi Vidyapeeth, Rahuri 413-722, Dist. Ahmednagar, Maharashtra, India.
- Jaramillo A. (2008). Micropropagación con miras a un proceso de recuperación poblacional de (*Polylepis microphylla*) en la provincia de Chimborazo. Laboratorio de Cultivo de tejidos Vegetales, Biotecnología, Espe.
- Jordan, M., C. J. (2006). Hormonas y reguladores del crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citoquininas. La Serena, Chile: F. A. Saqueo & L. Cardemil.
- Novo, Ricardo J. (2009). Eficiencia de fungicidas en el control de la flora fúngica transportada por semillas de zanahoria (*Daucus carota L.*) y su relación con la calidad fisiológica, Rev. bras. sementes vol.31 no.4 Londrina.
- Pérez, C. (2008). Aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* a la Conservación de recursos fitogenéticos. Dpto. de Biología Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria s/n 28040 Madrid, XXXII Jornadas nacionales de Biología, Loja, Ecuador
- Pérez, J.N., (1998). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología, Volumen 1, Instituto de Biotecnología de las plantas, Cuba.
- Pierik, R. (1990), Cultivo *in vitro* de las plantas superiores (L.M. S, Ayerbe, Trad.). España: Mundi-Prensa.
- Peña C. (2009). Establecimiento y evaluación de protocolos de desinfección, introducción y multiplicación *in vitro* de Piñón (*Jatropha curcas*) a partir de

semillas y yemas apicales obtenidas de plantas adultas con miras a una propagación masiva de plantas élite. Laboratorio de Cultivo de tejidos Vegetales, Biotecnología, Espe.

Roca, W. & Mroginski, L. (1993). Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones, Colombia: CIAT.

Salgado, R. (2008). Uso de brasinoesteroides y sus análogos en la agricultura, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México, Laboratorio de Biotecnología vegetal.

Sánchez, M., S. J. (2004). Control de la oxidación y ;a contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria X ananassa duch.*). UDO Agrícola, 21 – 26.

Schmülling, T. (2004). Citokinin. En Schmülling T., *In Encyclopedia of Biological Chemistry* (pág 7). Berlin: Eds. Lennarz, W., Lane, M.D.

Sklenář P., Balslev H. (2005). Superpáramo plant species diversity and phytogeography in Ecuador. Department of Botany, Charles University, Benátska´ 2, 128 01 Prague, Czech Republic. Flora 200 416–433.

Sklenář P., Dušková E., Balslev H. (2011). Tropical and Temperate: Evolutionary History of Páramo Flora, Department of Botany, Charles University, Benátská 2, 128 01 Prague, Czech Republic, Bot. Rev. 77:71–108.

Tovar C., Seijmonsbergen A. C. (2013). Monitoring land use and land cover change in mountain regions: An example in the Jalca grasslands of the Peruvian Andes. Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics, Universiteit van Amsterdam,

Amsterdam, The Netherlands Conservation Data Centre, La Molina National Agrarian University, Lima, Peru. Landscape and Urban Planning 112 40– 49.

Waseem & Saleem. (2011). Efficient in vitro regeneration of *Chrysanthemum morifolium L.* plantlets from nodal segments. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Cra 7 No 40 – 62, Bogotá, Colombia. Bot. Rev. 77:71–108

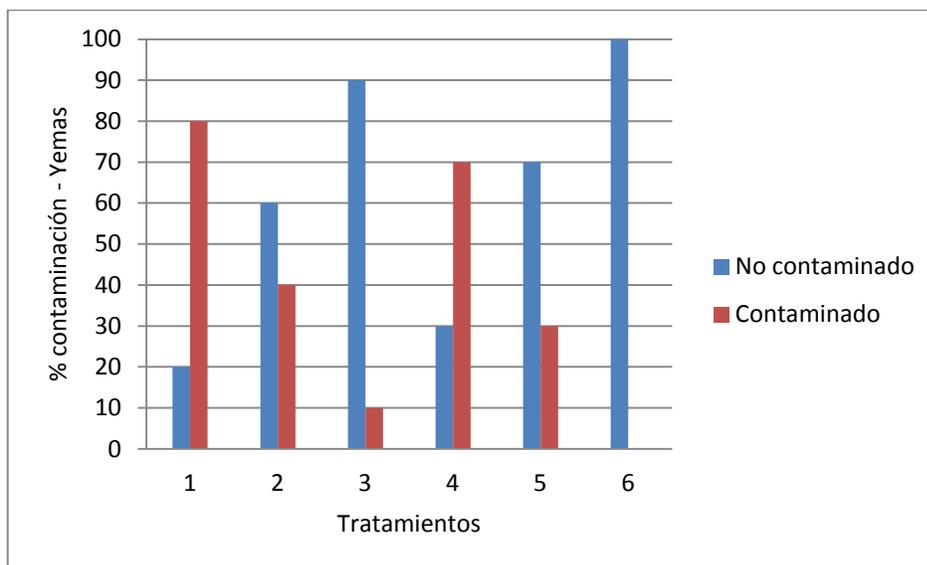
## ANEXO DE RESULTADOS

### A. FASE I: Introducción y desinfección de yemas

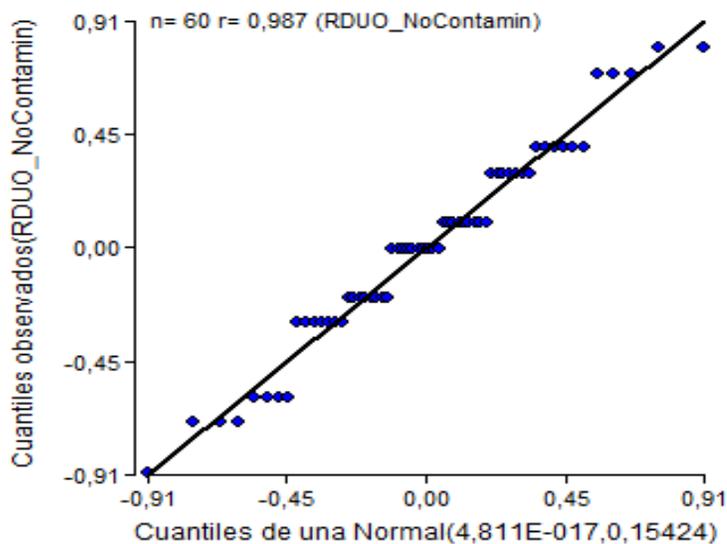
#### A.1. Contaminación

**Tabla A.1.1:** Porcentaje de explantes contaminados para los tratamientos de desinfección de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Tratamiento	No contaminado (%)	Contaminado (%)	Total (%)
1	20	80	100
2	60	40	100
3	90	10	100
4	30	70	100
5	70	30	100
6	100	0	100
	61,67	38,33	100



**Figura A.1.1:** Porcentaje de contaminación de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieu*) vs tratamientos de desinfección.



**Figura A.1.2:** Gráfica descriptiva de la normalidad de las variables de respuesta para los tratamientos de desinfección de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieu*).

**Tabla A.1.2:** Prueba de Levene para los tratamientos de desinfección de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

F.V.	SC	gl	F	p-valor
<i>Modelo</i>	1,66	5	9,33	<0,0001
<i>Tratamiento</i>	1,66	5	9,33	<0,0001
<i>Error</i>	1,92	54		
<i>Total</i>	3,18	59		

**Tabla A.1.3:** Prueba de Kruskal-Wallis para los tratamientos de desinfección de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
<i>No contaminado</i>	1	10	0,20	0,42	0,00	15,00	0,0008
<i>No contaminado</i>	2	10	0,60	0,52	1,00		
<i>No contaminado</i>	3	10	0,90	0,32	1,00		
<i>No contaminado</i>	4	10	0,30	0,48	0,00		
<i>No contaminado</i>	5	10	0,70	0,48	1,00		
<i>No contaminado</i>	6	10	1,00	0,00	1,00		

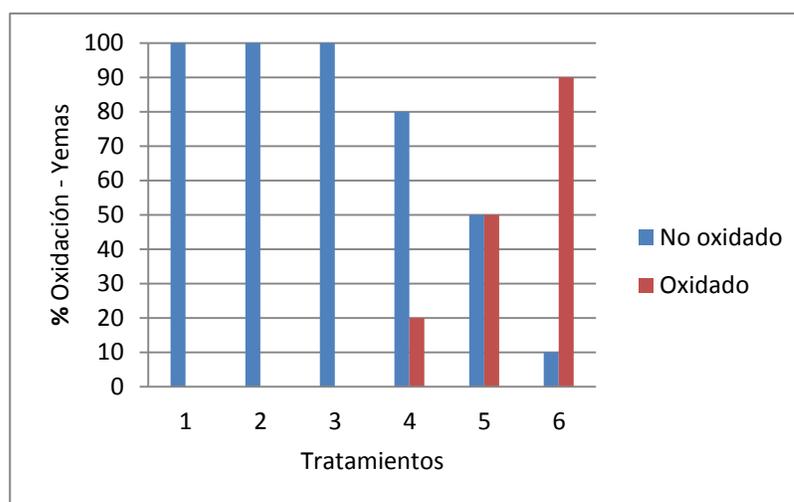
**Tabla A.1.4:** Prueba de Kruskal-Wallis para los tratamientos de desinfección de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Tratamiento	Ranks.	Grupo
1	18,00	A
2	21,00	A
3	30,00	A B
4	33,00	A B
5	39,00	B
6	42,00	B

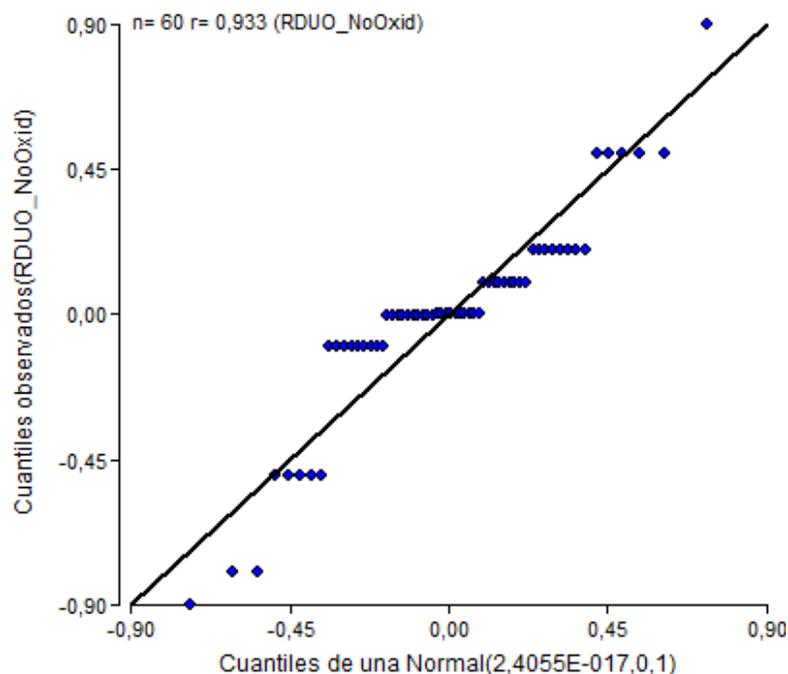
## A.2. Oxidación

**Tabla A.2.1:** Porcentaje de explantes oxidados para los tratamientos de desinfección de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Tratamiento	Oxidado (%)	No oxidado (%)	Total (%)
1	100	0	100
2	100	0	100
3	100	0	100
4	80	20	100
5	50	50	100
6	10	90	100
	73,33	26,67	100



**Figura A.2.1:** Porcentaje de oxidación de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) vs tratamientos de desinfección.



**Figura A.2.2:** Gráfica descriptiva de la normalidad de la variable oxidación para los tratamientos de desinfección de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

**Tabla A.2.2:** Prueba de Levene para los tratamientos de desinfección de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

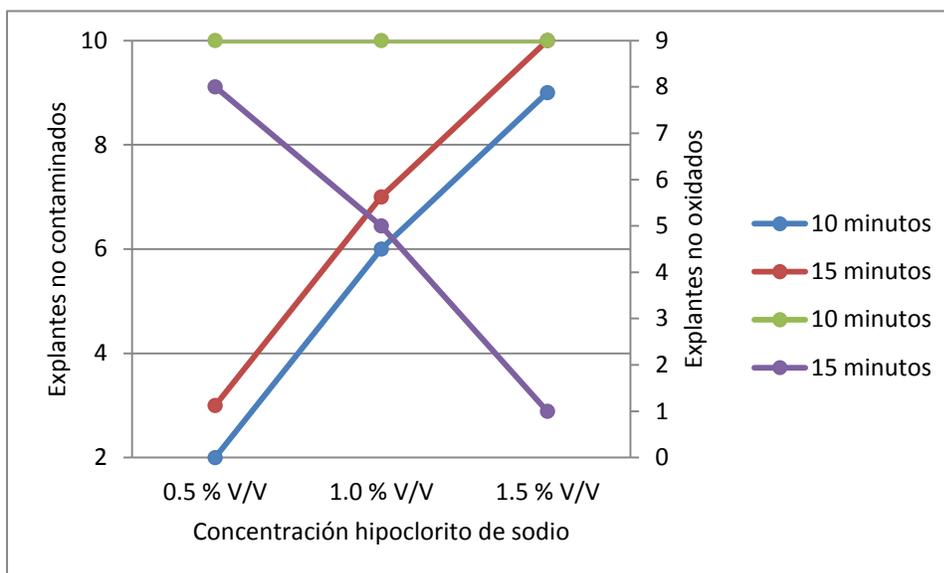
F.V.	SC	gl	F	p-valor
<i>Modelo</i>	1,85	5	11,57	<0,0001
<i>Tratamiento</i>	1,85	5	11,57	<0,0001
<i>Error</i>	1,73	54		
<i>Total</i>	3,58	59		

**Tabla A.2.3:** Prueba de Kruskal-Wallis para los tratamientos de desinfección de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) para variable oxidación.

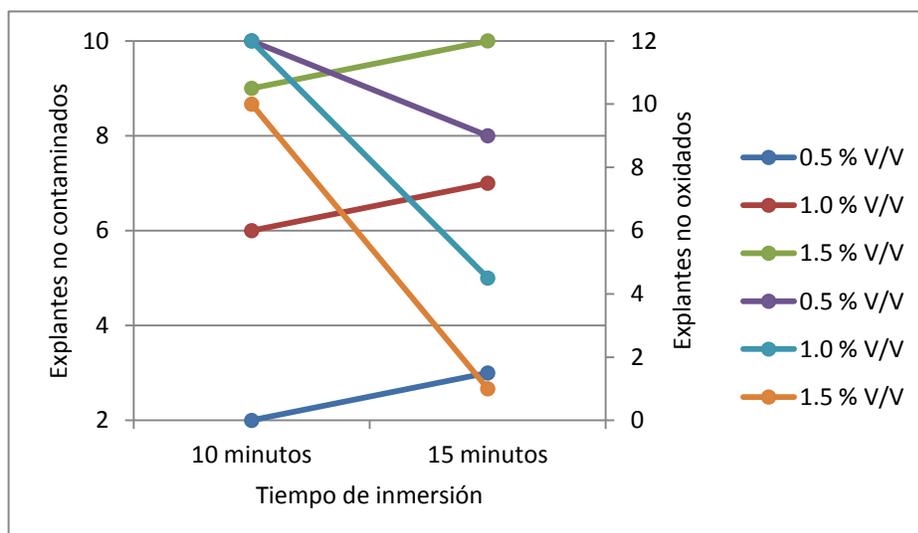
Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
<i>No oxidado</i>	1	10	1,00	0,00	1,00	18,54	<0,0001
<i>No oxidado</i>	2	10	1,00	0,00	1,00		
<i>No oxidado</i>	3	10	0,90	0,32	1,00		
<i>No oxidado</i>	4	10	0,80	0,42	1,00		
<i>No oxidado</i>	5	10	0,50	0,53	0,50		
<i>No oxidado</i>	6	10	0,10	0,32	0,00		

**Tabla A.2.4:** Prueba de Kruskal-Wallis para los tratamientos de desinfección de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Tratamiento	Ranks.	Grupo
6	12,00	A
5	24,00	A B
4	33,00	B
3	36,00	B
1	39,00	B
2	39,00	B



**Figura A.2.3:** Explantes no contaminados, explantes no oxidados de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) vs tratamientos de desinfección, concentración de hipoclorito de sodio.



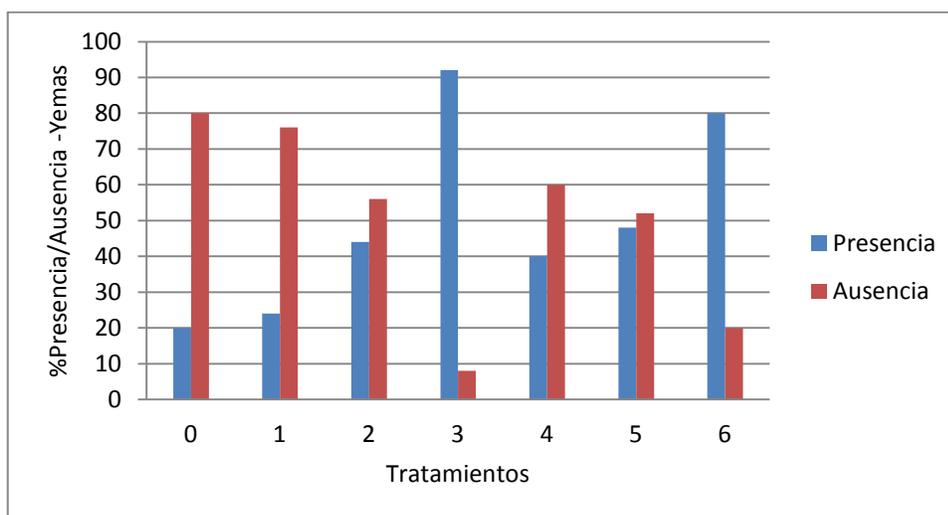
**Figura A.2.4:** Explantes no contaminados, explantes no oxidados de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) vs tratamientos de desinfección, tiempo de inmersión.

## B. FASE II: Inducción a brotes a partir de yemas

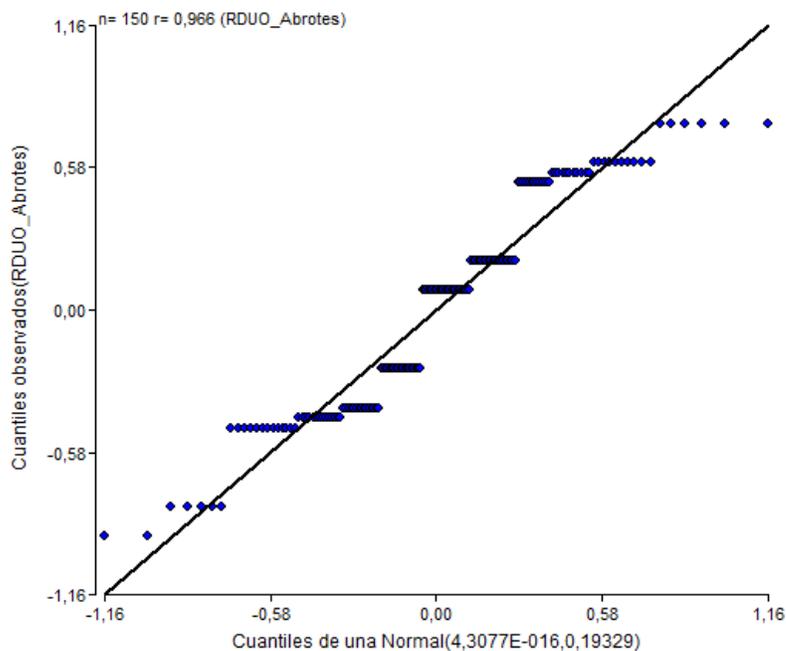
### B.1. Aparecimiento de brotes.

**Tabla B.1.1:** Porcentaje de explantes con presencia de brotes para los tratamientos de inducción a brotes de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiragua jussieui*).

Tratamiento	Presencia (%)	Ausencia (%)	Total (%)
0	20	80	100
1	24	76	100
2	44	56	100
3	92	8	100
4	40	60	100
5	48	52	100
6	80	20	100
	49,71	50,29	100



**Figura B.1.1:** Porcentaje de presencia de brotes en yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiragua jussieui*) vs tratamientos de inducción a brotes.



**Figura B.1.2:** Gráfica descriptiva de la normalidad de la variable aparecimiento de brotes para los tratamientos de inducción a brotes en yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiragua jussieui*).

**Tabla B.1.2:** Prueba de Levene para los tratamientos de inducción a brote de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiragua jussieui*).

F.V.	SC	gl	F	p-valor
<i>Modelo</i>	2,37	5	15,85	<0,0001
<i>Tratamiento</i>	2,37	5	15,85	<0,0001
<i>Error</i>	4,31	144		
<i>Total</i>	6,68	149		

**Tabla B.1.3:** Prueba de Kruskal-Wallis para los tratamientos de inducción a brote de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) para variable aparecimiento de brotes.

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
<i>ABrotes</i>	1	25	0,24	0,44	0,00	24,95	<0,0001
<i>ABrotes</i>	2	25	0,44	0,51	0,00		
<i>ABrotes</i>	3	25	0,92	0,28	1,00		
<i>ABrotes</i>	4	25	0,40	0,50	0,00		
<i>ABrotes</i>	5	25	0,48	0,51	0,00		
<i>ABrotes</i>	6	25	0,80	0,41	1,00		

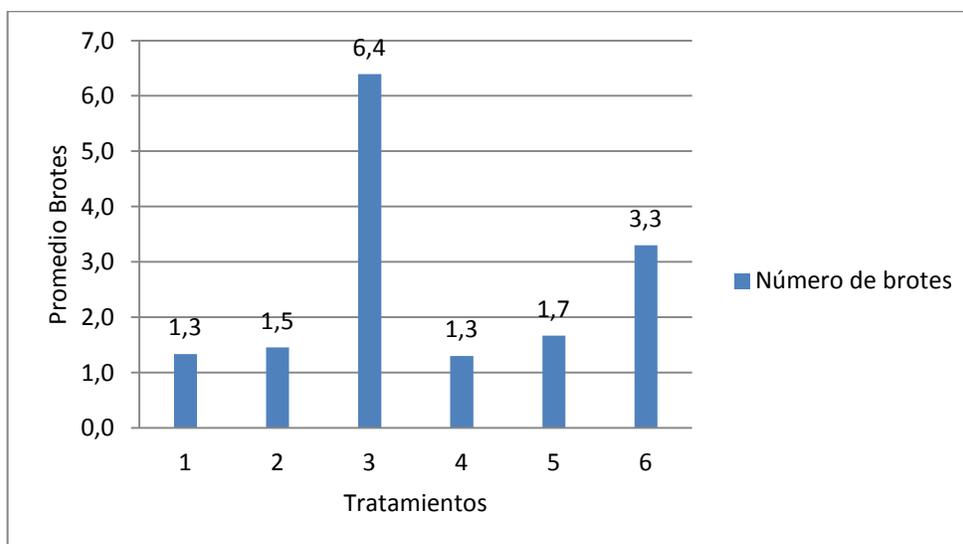
**Tabla B.1.4:** Prueba de Kruskal-Wallis para los tratamientos de inducción a brote de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Tratamiento	Ranks.	Grupo	
1	52,50	A	
4	64,50	A	
2	67,50	A	
5	70,50	A	B
6	94,50	B	C
3	103,50	C	

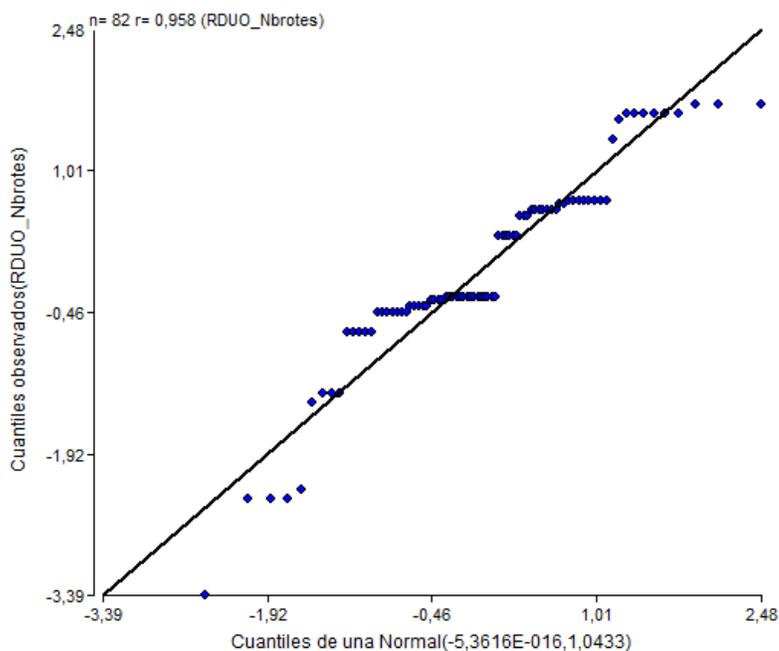
## B.2. Número de brotes

**Tabla B.2.1:** Promedio del número de brotes en los tratamientos de inducción a brotes de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Tratamiento	Promedio brote	Valor entero
1	1,3	1
2	1,5	2
3	6,4	6
4	1,3	1
5	1,7	2
6	3,3	3
	2,6	3



**Figura B.2.1:** Promedio de brotes en yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) vs tratamientos de inducción a brotes.



**Figura B.2.2:** Gráfica descriptiva de la normalidad de la variable número de brotes para los tratamientos de inducción a brotes en yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

**Tabla B.2.2:** Prueba de Levene para los tratamientos de inducción a brote de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) para variable número de brotes.

F.V.	SC	gl	F	p-valor
<i>Modelo</i>	7,39	5	4,37	<0,0001
<i>Tratamiento</i>	7,39	5	4,37	<0,0001
<i>Error</i>	25,71	76		
<i>Total</i>	33,10	81		

**Tabla B.2.3:** Prueba de Kruskal-Wallis para los tratamientos de inducción a brote de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) para variable número de brotes.

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	P
<i>NBrotos</i>	1	6	1,33	0,52	1,00	61,28	<0,0001
<i>NBrotos</i>	2	11	1,45	0,69	1,00		
<i>NBrotos</i>	3	23	6,39	1,50	7,00		
<i>NBrotos</i>	4	10	1,30	0,48	1,00		
<i>NBrotos</i>	5	12	1,67	0,65	2,00		
<i>NBrotos</i>	6	20	3,30	1,08	3,00		

**Tabla B.2.4:** Prueba de Kruskal-Wallis para los tratamientos de inducción a brote de yemas apicales y axilares de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) para variable número de brotes

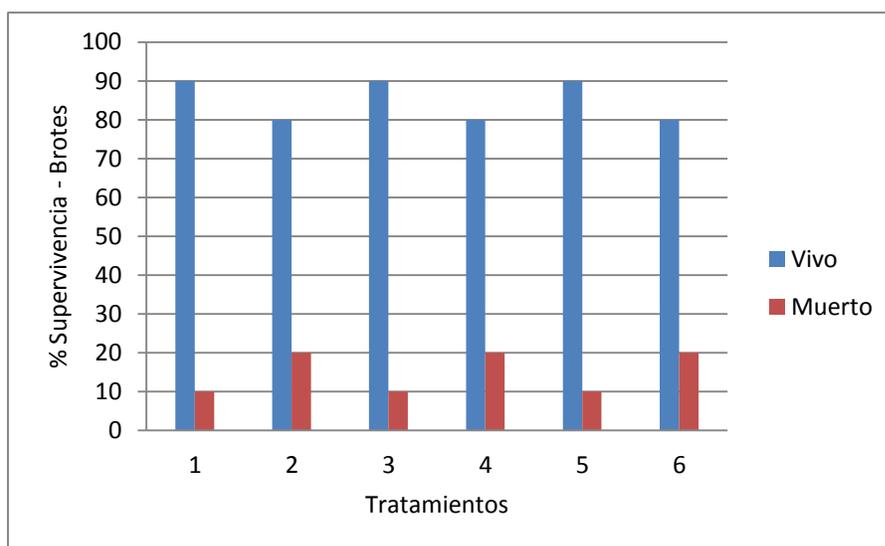
Tratamiento	Ranks.	Grupo
4	18,65	A
1	19,33	A
2	21,23	A
5	25,63	A
6	47,88	B
3	69,65	C

## C. FASE III: Multiplicación de brotes

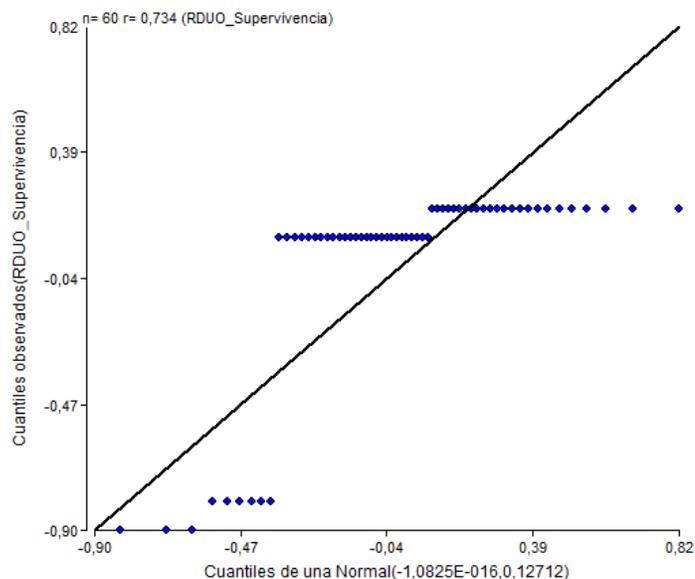
### C.1. Supervivencia brotes.

**Tabla C.1.1:** Porcentaje de explantes vivos en los tratamientos de multiplicación de brotes Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Tratamiento	Vivo (%)	Muerto (%)	Total (%)
1	90	10	100
2	80	20	100
3	90	10	100
4	80	20	100
5	90	10	100
6	80	20	100
	85,71	14,29	100



**Figura C.1.1:** Porcentaje de supervivencia de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) vs tratamientos de multiplicación de brotes.



**Figura C.1.2:** Gráfica descriptiva de la normalidad de la variable supervivencia de brotes para los tratamientos de multiplicación de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

**Tabla C.1.2:** Prueba de Levene para los tratamientos de multiplicación de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) para variable supervivencia.

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
<i>Modelo</i>	0,29	5	0,92	0,4760
<i>Tratamiento</i>	0,29	5	0,92	0,4760
<i>Error</i>	3,46	54		
<i>Total</i>	3,75	59		

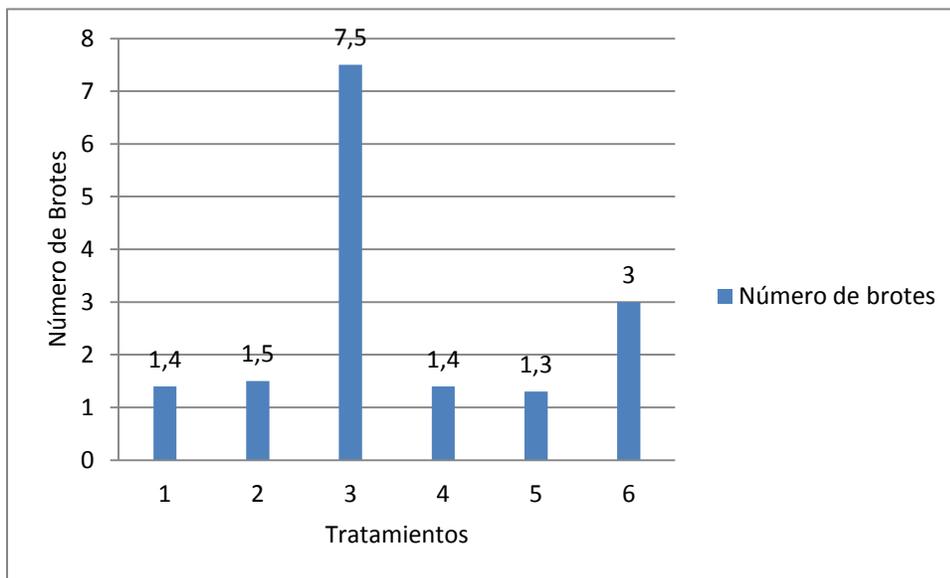
**Tabla C.1.3:** Prueba de Kruskal-Wallis para los tratamientos de multiplicación de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) para variable supervivencia.

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	P
Vivo	1	10	0,90	0,32	1,00	0,44	0,9489
Vivo	2	10	0,80	0,42	1,00		
Vivo	3	10	0,90	0,32	1,00		
Vivo	4	10	0,80	0,42	1,00		
Vivo	5	10	0,90	0,32	1,00		
Vivo	6	10	0,80	0,42	1,00		

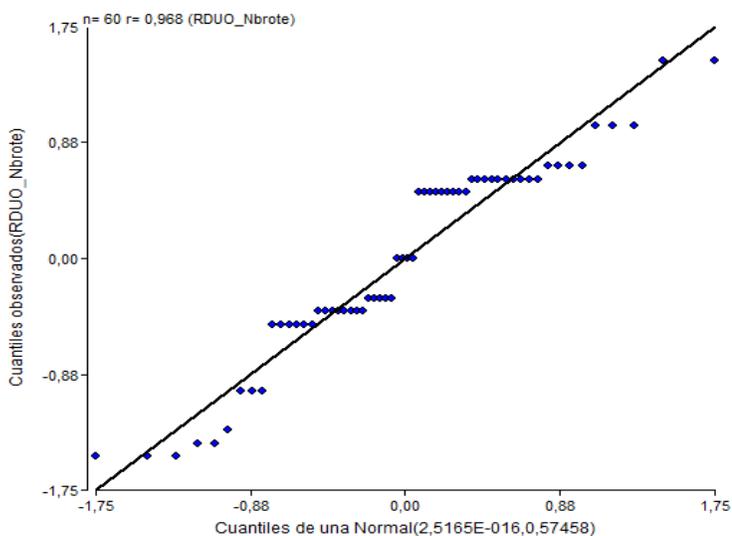
## C.2. Número de brotes

**Tabla C.2.1:** Promedio de brotes en los tratamientos de multiplicación de brotes Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

Tratamiento	Promedio brote	Valor entero
1	1,4	1
2	1,5	2
3	7,5	8
4	1,4	1
5	1,3	1
6	3	3
	2,68	3



**Figura C.2.1:** Promedio de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) vs tratamientos de multiplicación de brotes.



**Figura C.2.2:** Gráfica descriptiva de la normalidad de la variable número de brotes para los tratamientos de multiplicación de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

**Tabla C.2.2:** Prueba de Levene para los tratamientos de multiplicación de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) para variable número de brotes.

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
<i>Modelo</i>	0,80	5	1,05	0,3983
<i>Tratamiento</i>	0,80	5	1,05	0,3983
<i>Error</i>	8,26	54		
<i>Total</i>	9,07	59		

**Tabla C.2.3:** Prueba de Kruskal-Wallis para los tratamientos de multiplicación de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) para variable número de brotes

<b>Variable</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>N</b>	<b>Medias</b>	<b>D.E.</b>	<b>Medianas</b>	<b>H</b>	<b>P</b>
<i>NBrotos</i>	<i>1</i>	10	1,40	0,70	1,50	36,68	<0,0001
<i>NBrotos</i>	<i>2</i>	10	1,50	0,71	2,00		
<i>NBrotos</i>	<i>3</i>	10	7,50	1,08	7,50		
<i>NBrotos</i>	<i>4</i>	10	1,40	0,70	1,50		
<i>NBrotos</i>	<i>5</i>	10	1,30	0,67	1,00		
<i>NBrotos</i>	<i>6</i>	10	3,00	0,82	3,00		

**Tabla C.2.4:** Prueba de Kruskal-Wallis para los tratamientos de multiplicación de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) para variable número de brotes.

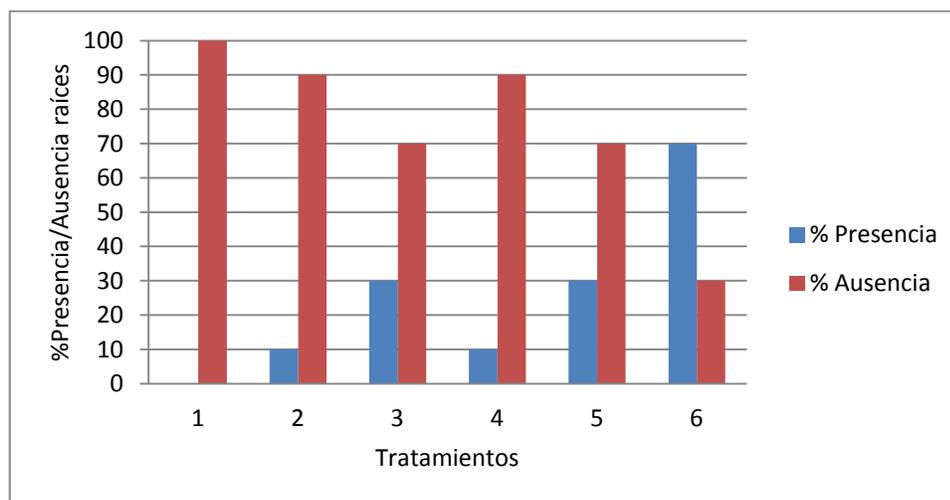
<b>Tratamiento</b>	<b>Ranks.</b>	<b>Grupo</b>
<i>5</i>	19,30	A
<i>4</i>	21,25	A
<i>1</i>	21,25	A
<i>2</i>	23,20	A
<i>6</i>	42,50	B
<i>3</i>	55,50	B

## D. FASE IV: Enraizamiento de brotes

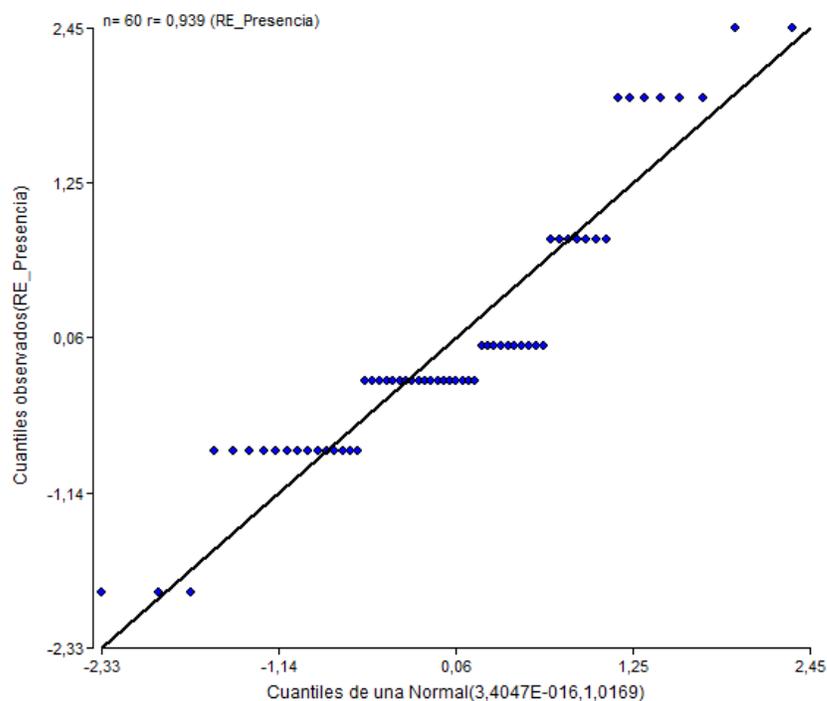
### D.1. Presencia raíces

**Tabla D.1.1:** Porcentaje de presencia de raíces en brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) en los tratamientos de enraizamiento.

Tratamiento	Presencia (%)	Ausencia (%)	Total (%)
1	0	100	100
2	10	90	100
3	30	70	100
4	10	90	100
5	30	70	100
6	70	30	100
	20	80	100



**Figura D.1.1:** Porcentaje de presencia de raíces en brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) vs tratamientos de enraizamiento.



**Figura D.1.2:** Gráfica descriptiva de la normalidad de la variable presencia de raíces para los tratamientos de enraizamiento de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*).

**Tabla D.1.2:** Prueba de Levene para los tratamientos de enraizamiento de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) para variable presencia de raíces

F.V.	SC	gl	F	p-valor
<i>Modelo</i>	1,57	5	7,83	<0,0001
<i>Tratamiento</i>	1,57	5	7,83	<0,0001
<i>Error</i>	2,16	54		
<i>Total</i>	3,73	59		

**Tabla D.1.3:** Prueba de Kruskal-Wallis para los tratamientos de enraizamiento de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) para variable presencia de raíces.

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	P
<i>Praíces</i>	1	10	0,00	0,00	0,00	9,30	0,0055
<i>Praíces</i>	2	10	0,10	0,32	0,00		
<i>Praíces</i>	3	10	0,30	0,48	0,00		
<i>Praíces</i>	4	10	0,10	0,32	0,00		
<i>Praíces</i>	5	10	0,30	0,48	0,00		
<i>Praíces</i>	6	10	0,70	0,48	1,00		

**Tabla D.1.4:** Prueba de Kruskal-Wallis para los tratamientos de enraizamiento de brotes de Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*) para variable presencia de raíces.

Tratamiento	Ranks.	Grupo
1	23,00	A
4	26,00	A
2	26,00	A
5	32,00	A B
3	32,00	A B
6	44,00	B

## ANEXO ESTADÍSTICO

### Análisis de varianza

La hipótesis que se somete a prueba generalmente se establece con respecto a las medidas de las poblaciones en estudio o de cada uno de los tratamientos evaluados en un experimento.

$$H_o = \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_\alpha \quad \text{con } i = 1, \dots, \alpha$$

Donde:

$\alpha$  = número de poblaciones o tratamientos

### Diseño completamente aleatorizado

Se supone que las unidades experimentales son homogéneas, es decir no tienen estructura alguna. Los tratamientos se asignan completamente al azar a las unidades experimentales. El archivo de datos debe contener al menos dos columnas, una identificando al tratamiento (variable de clasificación) y otra a la variable de respuestas (variable dependiente). El número de repeticiones puede variar de un tratamiento a otro. El modelo lineal para la observación del tratamiento  $i$  en la parcela  $j$ ,  $Y_{ij}$ , es:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = observación del tratamiento  $i$  en la parcela  $j$ .

$\tau_i$  = efecto del tratamiento  $i$

$\varepsilon_{ij}$  = término del error aleatorio asociado a la observación  $Y_{ij}$

### **Método de comparaciones múltiples de Duncan (Duncan)**

Compara todos los pares de medias, estudia la homogeneidad de todas las  $k$  medias a un nivel de significación  $\alpha_k$ . El método de Duncan controla que la tasa de error por comparación no supera el valor  $\alpha$  nominal, sin embargo la tasa de error por experimento puede ser incrementada. Este incremento puede conducir a una disminución del error tipo II, razón por la cual algunos autores afirman que esta prueba es más potente.

### **Prueba de Levene para homocedasticidad de varianza**

Prueba si las varianzas entre dos grupos son iguales entre sí, donde  $H_o$  sostiene que las varianzas entre los grupos son iguales entre sí; mientras que  $H_A$  supone que las variables son diferentes entre sí. Esta prueba no exige normalidad en las distribuciones y es usada antes de una comparación entre medias.

### **Prueba de Normalidad (Shapiro-Wills modificado)**

Permite determinar si la variable en estudio tiene distribución normal, donde la  $H_o$  supone que las observaciones tienen una distribución normal; mientras que  $H_A$  supone que las observaciones no tienen una distribución normal.

### **Análisis de la varianza no paramétrica (Prueba de Kruskal-Wallis)**

Permite realizar un análisis de varianza no paramétrico a una vía de clasificación. El ANOVA propuesto por Kruskal y Wallis (1952) permite comparar las esperanzas de dos o más distribuciones sin necesidad de realizar el supuesto de que los términos de error se distribuyeron normalmente. Donde  $H_o$  establece que  $\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_\alpha$ , donde  $\mu_i$  representa la esperanza del  $i$ -ésimo tratamiento con  $i = 1, 2, \dots, \alpha$ . Esta prueba se realiza cuando se tienen muestras independientes de cada población, con observaciones de naturaleza continua y las variables poblacionales son iguales.

### **Modelo de regresión logística**

Permite modelar la relación entre una variable de respuesta de naturaleza *dicotómica* en relación a una o más variables independientes o regresoras. Los coeficientes de la combinación lineal que modela esta relación permite estimar la razón de productos cruzados (*odd ratio*) para cada variable regresora. Este modelo puede ser usado para

predecir la probabilidad ( $p_i$ ) de que la variable de respuesta asuma un valor determinado, es decir, probabilidad de éxito ( $y = 1$ ) o probabilidad de fracaso ( $y = 0$ ).

## A. FASE I: Introducción y desinfección de yemas

### A.1. Contaminación

#### A.1.1. Análisis de varianza

##### A.1.1.1. Modelo

Hipótesis nula: Los tratamientos de desinfección para el nivel de contaminación se ajustan al modelo propuesto.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de desinfección para el nivel de contaminación no se ajustan al modelo propuesto.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  los tratamientos de desinfección no se ajustan al modelo propuesto para el nivel de contaminación, caso contrario si  $p < 0,05$ , los tratamientos de desinfección se ajustan al modelo propuesto para el nivel de contaminación.

#### A.1.1.2. Variable: Hipoclorito de sodio

Hipótesis nula: Los tratamientos de hipoclorito de sodio para el nivel de contaminación son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de hipoclorito de sodio para el nivel de contaminación son diferentes.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{k=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  las concentraciones de hipoclorito de sodio no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$ , las concentraciones de hipoclorito de sodio muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

### A.1.1.3. Variable: Tiempo de inmersión

Hipótesis nula: Los tratamientos de tiempo de inmersión para el nivel de contaminación son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de tiempo de inmersión para el nivel de contaminación son diferentes.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{k=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  los tiempos de inmersión no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$ , los tiempos de inmersión muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

### A.1.1.4. Variable: interacción hipoclorito de sodio – tiempo de inmersión

Hipótesis nula: Las combinaciones de hipoclorito de sodio vs tiempo de inmersión para el nivel de contaminación son iguales.

Hipótesis alternativa: Las combinaciones de hipoclorito de sodio vs tiempo de inmersión para el nivel de contaminación son diferentes.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  las combinaciones de hipoclorito de sodio vs tiempo de inmersión no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$ , las combinaciones de hipoclorito de sodio vs tiempo de inmersión muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

#### A.1.2. Método de comparaciones múltiples de Duncan (Duncan)

Hipótesis nula: Los tratamientos de desinfección para el nivel de contaminación son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de desinfección para el nivel de contaminación son diferentes.

Estadístico de prueba: Rangos de significancia mínima  $R_p = r_\alpha = (p, l) S_{\bar{Y}_{ij}}$  donde:

$$p = 2, 3, \dots, k$$

$l =$  grados de libertad

Se compara la diferencia entre la media más grande y la más pequeña con el rango  $R_k$ . Luego, la diferencia entre la media más grande y la segunda más pequeña se compara con el rango  $R_{k-1}$ . Estas comparaciones continúan hasta que la media mayor se haya comparado con todas las demás y así sucesivamente hasta que se comparan los  $k(k-1)/2$  pares de medias posibles con el rango que les corresponda.

Región de rechazo: Comparaciones donde la diferencia observada es mayor que el rango respectivo, esas medias son significativamente diferentes. Si dos medias caen entre otras dos que no son muy diferentes, entonces esas dos medias poblacionales también se consideran estadísticamente iguales

Decisión: Si las medias están en el mismo subconjunto, los tratamientos de desinfección no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario, si las medias están en diferentes subconjuntos, los tratamientos de desinfección muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

#### A.1.2.1. Variable: Hipoclorito de sodio

Hipótesis nula: Los tratamientos de hipoclorito de sodio para el nivel de contaminación son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de hipoclorito de sodio para el nivel de contaminación son diferentes.

Estadístico de prueba: Rangos de significancia mínima  $R_p = r_\alpha = (p, l)S_{\bar{Y}_{ij}}$  donde:  
 $p = 2, 3, \dots, k$

$l =$  grados de libertad

Se compara la diferencia entre la media más grande y la más pequeña con el rango  $R_k$ . Luego, la diferencia entre la media más grande y la segunda más pequeña se compara con el rango  $R_{k-1}$ . Estas comparaciones continúan hasta que la media mayor se haya comparado con todas las demás y así sucesivamente hasta que se comparan los  $k(k-1)/2$  pares de medias posibles con el rango que les corresponda.

Región de rechazo: Comparaciones donde la diferencia observada es mayor que el rango respectivo, esas medias son significativamente diferentes. Si dos medias caen entre otras dos que no son muy diferentes, entonces esas dos medias poblacionales también se consideran estadísticamente iguales

Decisión: Si las medias están en el mismo subconjunto, las concentraciones de hipoclorito de sodio no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario, si las medias están en diferentes subconjuntos, las concentraciones de hipoclorito de sodio muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

#### A.1.2.2. Variable: Tiempo de inmersión

Hipótesis nula: Los tratamientos de tiempo de inmersión para el nivel de contaminación son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de tiempo de inmersión para el nivel de contaminación son diferentes.

Estadístico de prueba: Rangos de significancia mínima  $R_p = r_\alpha = (p, l)S_{\bar{Y}_{ij}}$  donde:  
 $p = 2, 3, \dots, k$

$l =$  grados de libertad

Se compara la diferencia entre la media más grande y la más pequeña con el rango  $R_k$ . Luego, la diferencia entre la media más grande y la segunda más pequeña se compara con el rango  $R_{k-1}$ . Estas comparaciones continúan hasta que la media mayor se haya comparado con todas las demás y así sucesivamente hasta que se comparan los  $k(k-1)/2$  pares de medias posibles con el rango que les corresponda.

Región de rechazo: Comparaciones donde la diferencia observada es mayor que el rango respectivo, esas medias son significativamente diferentes. Si dos medias caen entre otras dos que no son muy diferentes, entonces esas dos medias poblacionales también se consideran estadísticamente iguales

Decisión: Si las medias están en el mismo subconjunto, los tiempos de inmersión no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario, si las medias están en diferentes subconjuntos, los tiempos de inmersión muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

### A.1.3. Prueba de Levene para homocedasticidad de varianza

Hipótesis nula: Las varianzas de los tratamientos de desinfección para el nivel de contaminación son iguales.

Hipótesis alternativa: Las varianzas de los tratamientos de desinfección para el nivel de contaminación son diferentes.

Estadístico de prueba: 
$$L = \frac{(n-k) \sum n_i (\bar{V}_i - \bar{V})^2}{(k-1) \sum \sum (V_{ij} - \bar{V}_i)^2} \approx F_{(k-1)}$$

Donde:  $V_{ij} = |X_{ij} - \bar{X}_i|$  donde  $i = 1, 2, \dots, n$ ,  $\bar{X}_i = \text{Mediana } X_{i1}, X_{i2}, \dots, X_{in_i}$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_{(k-1)} > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  las varianzas de los tratamientos de desinfección no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$  las varianzas de los tratamientos de desinfección muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, las varianzas entre los tratamientos son diferentes.

#### A.1.4. Prueba de Normalidad (Shapiro-Wills modificado)

Hipótesis nula: Existe distribución normal en los tratamientos de desinfección para el nivel de contaminación.

Hipótesis alternativa: No existe distribución normal en los tratamientos de desinfección para el nivel de contaminación.

Estadístico de prueba:  $W = \frac{\left( \sum_{i=1}^n a_i x_{(i)} \right)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$  donde:  $x_{(i)}$  es el número que ocupa la i-ésima

posición de la muestra.

$\bar{x} = (x_1 + x_2 + \dots + x_n)$  es la media muestral.

Las constantes  $a_i$  se calculan:

$$(a_i + \dots + a_n) = \frac{m^T V^{-1}}{(m^T V^{-1} V^{-1} m)^{1/2}} \quad \text{Donde: } m = (m_1, \dots, m_n)^T \text{ siendo } m_1, \dots, m_n \text{ los}$$

valores medios del estadístico ordenado, de variables aleatorias independientes e idénticamente distribuidas, muestreadas de distribuciones normales.  $V$  es la matriz de covarianzas de ese estadístico de orden.

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $W$  es demasiado pequeño, es decir: valor  $p < \alpha$  la hipótesis nula es rechazada.

Decisión: Si  $p > 0,05$  no existe distribución normal de los tratamientos de desinfección, caso contrario si  $p < 0,05$  existe distribución normal de los tratamientos de desinfección, es decir, son paramétricos.

#### A.1.5. Modelo de regresión logística

##### A.1.5.1. Variable: hipoclorito de sodio (0,5 – 1,0 – 1,5 % V/V)

Hipótesis nula: La variable independiente hipoclorito de sodio (0,5 – 1,0 – 1,5 % V/V) no influye en la variable dependiente contaminación.

Hipótesis alternativa: La variable independiente hipoclorito de sodio (0,5 – 1,0 – 1,5 % V/V) si influye en la variable dependiente contaminación.

Estadístico de prueba: Analiza datos distribuidos binomialmente de la forma:

$$Y_i \sim B(p_i, n_i) \text{ para } i = 1, \dots, m$$

Donde:

$n_i$  = número de ensayos Bernoulli

$p_i$  = probabilidades de éxito

$$\log it(p_i) = \ln\left(\frac{p_i}{1-p_i}\right) = \beta_o + \beta_1 x_{1,i} + \dots + \beta_k x_{k,i}$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si valor  $p < \alpha$  con nivel de significancia  $\alpha = 0,05$

Decisión: Si  $p > 0,05$  la variable hipoclorito de sodio (0,5 – 1,0 – 1,5 % V/V) no influye en la variable dependiente contaminación, caso contrario si  $p < 0,05$  la variable independiente hipoclorito de sodio (0,5 – 1,0 – 1,5 % V/V) si influye en la variable dependiente contaminación.

A.1.5.2. Variable: tiempo de inmersión (10 – 15 min)

Hipótesis nula: La variable independiente tiempo de inmersión (10 – 15 min) no influye en la variable dependiente contaminación.

Hipótesis alternativa: La variable independiente tiempo de inmersión (10 – 15 min) si influye en la variable dependiente contaminación.

Estadístico de prueba: Analiza datos distribuidos binomialmente de la forma:

$$Y_i \sim B(p_i, n_i) \text{ para } i = 1, \dots, m$$

Donde:

$n_i$  = número de ensayos Bernoulli

$p_i$  = probabilidades de éxito

$$\log it(p_i) = \ln\left(\frac{p_i}{1-p_i}\right) = \beta_o + \beta_1 x_{1,i} + \dots + \beta_k x_{k,i}$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si valor  $p < \alpha$  con nivel de significancia  $\alpha = 0,05$

Decisión: Si  $p > 0,05$  la variable tiempo de inmersión (10 – 15 min) no influye en la variable dependiente contaminación, caso contrario si  $p < 0,05$  la variable independiente tiempo de inmersión (10 – 15 min) si influye en la variable dependiente contaminación.

## A.2. Oxidación

### A.2.1. Análisis de varianza

#### A.2.1.1. Modelo

Hipótesis nula: Los tratamientos de desinfección para el nivel de oxidación se ajustan al modelo propuesto.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de desinfección para el nivel de oxidación no se ajustan al modelo propuesto.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{k=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  los tratamientos de desinfección no se ajustan al modelo propuesto para el nivel de oxidación, caso contrario si  $p < 0,05$ , los tratamientos de desinfección se ajustan al modelo propuesto para el nivel de oxidación.

#### A.2.1.2. Variable: Hipoclorito de sodio

Hipótesis nula: Los tratamientos de hipoclorito de sodio para el nivel de oxidación son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de hipoclorito de sodio para el nivel de oxidación son diferentes.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{k=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  las concentraciones de hipoclorito de sodio no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$ , las concentraciones de hipoclorito de sodio muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

### A.2.1.3. Variable: Tiempo de inmersión

Hipótesis nula: Los tratamientos de tiempo de inmersión para el nivel de oxidación son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de tiempo de inmersión para el nivel de oxidación son diferentes.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{k=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  los tiempos de inmersión no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$ , los tiempos de inmersión muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

### A.2.1.4. Variable: interacción hipoclorito de sodio – tiempo de inmersión

Hipótesis nula: Las combinaciones de hipoclorito de sodio vs tiempo de inmersión para el nivel de oxidación son iguales.

Hipótesis alternativa: Las combinaciones de hipoclorito de sodio vs tiempo de inmersión para el nivel de oxidación son diferentes.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  las combinaciones de hipoclorito de sodio vs tiempo de inmersión no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$ , las combinaciones de hipoclorito de sodio vs tiempo de inmersión muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

#### A.2.2. Método de comparaciones múltiples de Duncan (Duncan)

Hipótesis nula: Los tratamientos de desinfección para el nivel de oxidación son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de desinfección para el nivel de oxidación son diferentes.

Estadístico de prueba: Rangos de significancia mínima  $R_p = r_\alpha = (p, l) S_{\bar{Y}_{ij}}$  donde:

$$p = 2, 3, \dots, k$$

$l =$  grados de libertad

Se compara la diferencia entre la media más grande y la más pequeña con el rango  $R_k$ . Luego, la diferencia entre la media más grande y la segunda más pequeña se compara con el rango  $R_{k-1}$ . Estas comparaciones continúan hasta que la media mayor se haya comparado con todas las demás y así sucesivamente hasta que se comparan los  $k(k-1)/2$  pares de medias posibles con el rango que les corresponda.

Región de rechazo: Comparaciones donde la diferencia observada es mayor que el rango respectivo, esas medias son significativamente diferentes. Si dos medias caen entre otras dos que no son muy diferentes, entonces esas dos medias poblacionales también se consideran estadísticamente iguales

Decisión: Si las medias están en el mismo subconjunto, los tratamientos de desinfección no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario, si las medias están en diferentes subconjuntos, los tratamientos de desinfección muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

#### A.2.2.1. Variable: Hipoclorito de sodio

Hipótesis nula: Los tratamientos de hipoclorito de sodio para el nivel de oxidación son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de hipoclorito de sodio para el nivel de oxidación son diferentes.

Estadístico de prueba: Rangos de significancia mínima  $R_p = r_\alpha = (p, l)S_{\bar{Y}_{ij}}$  donde:  
 $p = 2, 3, \dots, k$

$l =$  grados de libertad

Se compara la diferencia entre la media más grande y la más pequeña con el rango  $R_k$ . Luego, la diferencia entre la media más grande y la segunda más pequeña se compara con el rango  $R_{k-1}$ . Estas comparaciones continúan hasta que la media mayor se haya comparado con todas las demás y así sucesivamente hasta que se comparan los  $k(k-1)/2$  pares de medias posibles con el rango que les corresponda.

Región de rechazo: Comparaciones donde la diferencia observada es mayor que el rango respectivo, esas medias son significativamente diferentes. Si dos medias caen entre otras dos que no son muy diferentes, entonces esas dos medias poblacionales también se consideran estadísticamente iguales

Decisión: Si las medias están en el mismo subconjunto, las concentraciones de hipoclorito de sodio no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario, si las medias están en diferentes subconjuntos, las concentraciones de hipoclorito de sodio muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

#### A.2.2.2. Variable: Tiempo de inmersión

Hipótesis nula: Los tratamientos de tiempo de inmersión para el nivel de oxidación son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de tiempo de inmersión para el nivel de oxidación son diferentes.

Estadístico de prueba: Rangos de significancia mínima  $R_p = r_\alpha = (p, l)S_{\bar{y}_{ij}}$  donde:

$$p = 2, 3, \dots, k$$

$l =$  grados de libertad

Se compara la diferencia entre la media más grande y la más pequeña con el rango  $R_k$ . Luego, la diferencia entre la media más grande y la segunda más pequeña se compara con el rango  $R_{k-1}$ . Estas comparaciones continúan hasta que la media mayor se haya comparado con todas las demás y así sucesivamente hasta que se comparan los  $k(k-1)/2$  pares de medias posibles con el rango que les corresponda.

Región de rechazo: Comparaciones donde la diferencia observada es mayor que el rango respectivo, esas medias son significativamente diferentes. Si dos medias caen entre otras dos que no son muy diferentes, entonces esas dos medias poblacionales también se consideran estadísticamente iguales

Decisión: Si las medias están en el mismo subconjunto, los tiempos de inmersión no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario, si las medias están en diferentes subconjuntos, los tiempos de inmersión muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

### A.2.3. Prueba de Levene para homocedasticidad de varianza

Hipótesis nula: Las varianzas de los tratamientos de desinfección para el nivel de oxidación son iguales.

Hipótesis alternativa: Las varianzas de los tratamientos de desinfección para el nivel de oxidación son diferentes.

$$\text{Estadístico de prueba: } L = \frac{(n-k) \sum n_i (\bar{V}_i - \bar{V}^2)}{(k-1) \sum \sum (V_{ij} - \bar{V}_i^2)} \approx F_{(k-1)}$$

Donde:  $V_{ij} = |X_{ij} - \bar{X}_i|$  donde  $i = 1, 2, \dots, n$ ,  $\tilde{X}_i = \text{Mediana } X_{i1}, X_{i2}, \dots, X_{in_i}$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_{(k-1)} > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  las varianzas de los tratamientos de desinfección no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$  las varianzas de los tratamientos de desinfección muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, las varianzas entre los tratamientos son diferentes.

#### A.2.4. Prueba de Normalidad (Shapiro-Wills modificado)

Hipótesis nula: Existe distribución normal en los tratamientos de desinfección para el nivel de oxidación.

Hipótesis alternativa: No existe distribución normal en los tratamientos de desinfección para el nivel de oxidación.

$$\text{Estadístico de prueba: } W = \frac{\left( \sum_{i=1}^n a_i x_{(i)} \right)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \text{ donde: } x_{(i)} = \text{es el número que ocupa la } i\text{-ésima}$$

posición de la muestra.

$\bar{x} = (x_1 + x_2 + \dots + x_n)$  es la media muestral.

Las constantes  $a_i$  se calculan:

$$(a_i + \dots + a_n) = \frac{m^T V^{-1}}{(m^T V^{-1} V^{-1} m)^{1/2}} \quad \text{Donde: } m = (m_1, \dots, m_n)^T \text{ siendo } m_1, \dots, m_n \text{ los}$$

valores medios del estadístico ordenado, de variables aleatorias independientes e idénticamente distribuidas, muestreadas de distribuciones normales.  $V$  es la matriz de covarianzas de ese estadístico de orden.

Región de rechazo: Se rechaza  $H_0$  si  $W$  es demasiado pequeño, es decir: valor  $p < \alpha$  la hipótesis nula es rechazada.

Decisión: Si  $p > 0,05$  no existe distribución normal de los tratamientos de desinfección, caso contrario si  $p < 0,05$  existe distribución normal de los tratamientos de desinfección, es decir, son paramétricos.

#### A.2.5. Análisis de la varianza no paramétrica (Prueba de Kruskal-Wallis)

Hipótesis nula: Los tratamientos de desinfección para el nivel de oxidación son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de desinfección para el nivel de oxidación son diferentes.

Estadístico de prueba:  $K = (N - 1) \frac{\sum_{i=1}^g n_i (\bar{r}_{i\bullet} - \bar{r})^2}{\sum_{i=1}^g \sum_{j=1}^{n_i} (r_{ij} - \bar{r})^2}$  donde:

$n_i$  = número de observaciones en el grupo  $i$

$r_{ij}$  = rango entre todas las observaciones de la observación  $j$  en el grupo  $i$

$N$  = número total de observaciones entre todos los grupos

$$\bar{r}_{i\bullet} = \frac{\sum_{j=1}^{n_i} r_{ij}}{n_i}$$

$\bar{r} = (N + 1)/2$  es el promedio de  $r_{ij}$

Región de rechazo: Si el valor  $p$  es  $\Pr(X_{g-1}^2 \geq K)$ , del cual se rechaza  $H_0$  si valor  $p < \alpha$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$ , están en el mismo subconjunto, no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de desinfección para el nivel de oxidación, caso contrario si  $p < 0,05$ , están en diferentes subconjuntos, existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de desinfección para el nivel de oxidación.

#### A.2.6. Modelo de regresión logística

##### A.2.6.1. Variable: hipoclorito de sodio (0,5 – 1,0 – 1,5 % V/V)

Hipótesis nula: La variable independiente hipoclorito de sodio (0,5 – 1,0 – 1,5 % V/V) no influye en la variable dependiente oxidación.

Hipótesis alternativa: La variable independiente hipoclorito de sodio (0,5 – 1,0 – 1,5 % V/V) si influye en la variable dependiente oxidación.

Estadístico de prueba: Analiza datos distribuidos binomialmente de la forma:

$$Y_i \sim B(p_i, n_i) \text{ para } i = 1, \dots, m$$

Donde:

$n_i$  = número de ensayos Bernoulli

$p_i$  = probabilidades de éxito

$$\log it(p_i) = \ln\left(\frac{p_i}{1-p_i}\right) = \beta_0 + \beta_1 x_{1,i} + \dots + \beta_k x_{k,i}$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_0$  si valor  $p < \alpha$  con nivel de significancia  $\alpha = 0,05$

Decisión: Si  $p > 0,05$  la variable hipoclorito de sodio (0,5 – 1,0 – 1,5 % V/V) no influye en la variable dependiente oxidación, caso contrario si  $p < 0,05$  la variable independiente hipoclorito de sodio (0,5 – 1,0 – 1,5 % V/V) si influye en la variable dependiente oxidación.

#### A.2.6.2. Variable: tiempo de inmersión (10 – 15 min)

Hipótesis nula: La variable independiente tiempo de inmersión (10 – 15 min) no influye en la variable dependiente oxidación.

Hipótesis alternativa: La variable independiente tiempo de inmersión (10 – 15 min) si influye en la variable dependiente oxidación.

Estadístico de prueba: Analiza datos distribuidos binomialmente de la forma:

$$Y_i \sim B(p_i, n_i) \text{ para } i = 1, \dots, m$$

Donde:

$n_i$  = número de ensayos Bernoulli

$p_i$  = probabilidades de éxito

$$\log \text{it}(p_i) = \ln\left(\frac{p_i}{1-p_i}\right) = \beta_0 + \beta_1 x_{1,i} + \dots + \beta_k x_{k,i}$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_0$  si valor  $p < \alpha$  con nivel de significancia  $\alpha = 0,05$

Decisión: Si  $p > 0,05$  la variable tiempo de inmersión (10 – 15 min) no influye en la variable dependiente oxidación, caso contrario si  $p < 0,05$  la variable independiente tiempo de inmersión (10 – 15 min) si influye en la variable dependiente oxidación.

## B. FASE II: Inducción a brotes a partir de yemas

### B.1. Aparecimiento de brotes

#### B.1.1. Análisis de varianza

##### B.1.1.1. Modelo

Hipótesis nula: Los tratamientos de inducción a brote para el nivel de aparecimiento de brote se ajustan al modelo propuesto.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de inducción a brote para el nivel de aparecimiento de brote no se ajustan al modelo propuesto.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{k=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  los tratamientos de inducción a brote no se ajustan al modelo propuesto para el nivel de apareamiento de brote, caso contrario si  $p < 0,05$ , los tratamientos de inducción a brote se ajustan al modelo propuesto para el nivel de apareamiento de brote.

#### B.1.1.2. Variable: concentración BAP (6 - bencilaminopurina)

Hipótesis nula: Los tratamientos de concentración BAP (6 - bencilaminopurina) para el nivel de apareamiento de brote son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de concentración BAP (6 - bencilaminopurina) para el nivel de apareamiento de brote son diferentes.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{k=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  las concentraciones de BAP (6 - bencilaminopurina) no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$ , las concentraciones BAP (6 - bencilaminopurina) muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

#### B.1.1.3. Variable: concentración IBA (ácido indol butirrico)

Hipótesis nula: Los tratamientos de concentración IBA (ácido indol butirrico) para el nivel de apareamiento de brote son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de concentración IBA (ácido indol butirrico) para el nivel de apareamiento de brote son diferentes.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  las concentraciones de IBA no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$ , las concentraciones de IBA muestran

diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

#### B.1.1.4. Variable: interacción BAP – IBA.

Hipótesis nula: Las combinaciones de BAP vs IBA para el nivel de apareamiento de brote son iguales.

Hipótesis alternativa: Las combinaciones de BAP vs IBA para el nivel de apareamiento de brote son diferentes.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{k=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  las combinaciones de BAP vs IBA no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$ , las combinaciones de BAP vs IBA muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

### B.1.2. Método de comparaciones múltiples de Duncan (Duncan)

Hipótesis nula: Los tratamientos de inducción a brote para el nivel de apareamiento de brote son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de inducción a brote para el nivel de apareamiento de brote son diferentes.

Estadístico de prueba: Rangos de significancia mínima  $R_p = r_\alpha = (p, l)S_{\bar{y}_{ij}}$  donde:

$$p = 2, 3, \dots, k$$

$l =$  grados de libertad

Se compara la diferencia entre la media más grande y la más pequeña con el rango  $R_k$ . Luego, la diferencia entre la media más grande y la segunda más pequeña se compara con el rango  $R_{k-1}$ . Estas comparaciones continúan hasta que la media mayor se haya comparado con todas las demás y así sucesivamente hasta que se comparan los  $k(k-1)/2$  pares de medias posibles con el rango que les corresponda.

Región de rechazo: Comparaciones donde la diferencia observada es mayor que el rango respectivo, esas medias son significativamente diferentes. Si dos medias caen entre otras dos que no son muy diferentes, entonces esas dos medias poblacionales también se consideran estadísticamente iguales.

Decisión: Si las medias están en el mismo subconjunto, los tratamientos de inducción a brote no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si las medias están en diferentes subconjuntos, los tratamientos de inducción a brote muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

B.1.2.1. Variable: concentración de BAP (6 – bencilaminopurina)

Hipótesis nula: Los tratamientos de BAP para el nivel de apareamiento de brote son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de BAP para el nivel de apareamiento de brote son diferentes.

Estadístico de prueba: Rangos de significancia mínima  $R_p = r_\alpha = (p, l)S_{\bar{y}_{ij}}$  donde:

$$p = 2, 3, \dots, k$$

$l =$  grados de libertad

Se compara la diferencia entre la media más grande y la más pequeña con el rango  $R_k$ . Luego, la diferencia entre la media más grande y la segunda más pequeña se compara con el rango  $R_{k-1}$ . Estas comparaciones continúan hasta que la media mayor se haya comparado con todas las demás y así sucesivamente hasta que se comparan los  $k(k-1)/2$  pares de medias posibles con el rango que les corresponda.

Región de rechazo: Comparaciones donde la diferencia observada es mayor que el rango respectivo, esas medias son significativamente diferentes. Si dos medias caen entre otras dos que no son muy diferentes, entonces esas dos medias poblacionales también se consideran estadísticamente iguales.

Decisión: Si las medias están en el mismo subconjunto, las concentraciones de BAP no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario, si las medias están en diferentes subconjuntos, las concentraciones de BAP muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

### B.1.2.2. Variable: concentración IBA (ácido indol butírico)

Hipótesis nula: Los tratamientos de IBA para el nivel de apareamiento de brote son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de IBA para el nivel de apareamiento de brote son diferentes.

Estadístico de prueba: Rangos de significancia mínima  $R_p = r_\alpha = (p, l)S_{\bar{y}_j}$  donde:

$$p = 2, 3, \dots, k$$

$l =$  grados de libertad

Se compara la diferencia entre la media más grande y la más pequeña con el rango  $R_k$ . Luego, la diferencia entre la media más grande y la segunda más pequeña se compara con el rango  $R_{k-1}$ . Estas comparaciones continúan hasta que la media mayor se haya comparado con todas las demás y así sucesivamente hasta que se comparan los  $k(k-1)/2$  pares de medias posibles con el rango que les corresponda.

Región de rechazo: Comparaciones donde la diferencia observada es mayor que el rango respectivo, esas medias son significativamente diferentes. Si dos medias caen entre otras dos que no son muy diferentes, entonces esas dos medias poblacionales también se consideran estadísticamente iguales.

Decisión: Si las medias están en el mismo subconjunto, las concentraciones de IBA no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario, si las medias están en diferentes subconjuntos, las concentraciones de IBA muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

### B.1.3. Prueba de Levene para homocedasticidad de varianza

Hipótesis nula: Las varianzas de los tratamientos de inducción a brote para el nivel de apareamiento de brote son iguales.

Hipótesis alternativa: Las varianzas de los tratamientos de inducción a brote para el nivel de apareamiento de brote son diferentes.

Estadístico de prueba: 
$$L = \frac{(n-k) \sum n_i (\bar{V}_i - \bar{V})^2}{(k-1) \sum \sum (V_{ij} - \bar{V}_i)^2} \approx F_{(k-1)}$$

Donde:  $V_{ij} = |X_{ij} - \bar{X}_i|$  donde  $i = 1, 2, \dots, n$ ,  $\bar{X}_i = \text{Mediana } X_{i1}, X_{i2}, \dots, X_{in_i}$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_{(k-1)} > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  las varianzas de los tratamientos de inducción a brote no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$  las varianzas de los tratamientos de inducción a brote muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, las varianzas entre los tratamientos son diferentes.

### B.1.4. Prueba de Normalidad (Shapiro-Wills modificado)

Hipótesis nula: Existe distribución normal en los tratamientos de inducción a brote para el nivel de apareamiento de brote.

Hipótesis alternativa: No existe distribución normal en los tratamientos de inducción a brote para el nivel de apareamiento de brote.

Estadístico de prueba:  $W = \frac{\left(\sum_{i=1}^n a_i x_{(i)}\right)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$  donde:  $x_{(i)}$  = es el número que ocupa la i-ésima

posición de la muestra.

$\bar{x} = (x_1 + x_2 + \dots + x_n)$  es la media muestral.

Las constantes  $a_i$  se calculan:

$(a_1 + \dots + a_n) = \frac{m^T V^{-1}}{(m^T V^{-1} V^{-1} m)^{1/2}}$  Donde:  $m = (m_1, \dots, m_n)^T$  siendo  $m_1, \dots, m_n$  los

valores medios del estadístico ordenado, de variables aleatorias independientes e idénticamente distribuidas, muestreadas de distribuciones normales.  $V$  es la matriz de covarianzas de ese estadístico de orden.

Región de rechazo: Se rechaza  $H_0$  si  $W$  es demasiado pequeño, es decir: valor  $p < \alpha$  la hipótesis nula es rechazada.

Decisión: Si  $p > 0,05$  no existe distribución normal de los tratamientos de inducción a brote, caso contrario si  $p < 0,05$  existe distribución normal de los tratamientos de inducción a brote, es decir, son paramétricos.

#### B.1.5. Análisis de la varianza no paramétrica (Prueba de Kruskal-Wallis)

Hipótesis nula: Los tratamientos de inducción a brote para el nivel de apareamiento de brote son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de inducción a brote para el nivel de apareamiento de brote son diferentes.

Estadístico de prueba:  $K = (N - 1) \frac{\sum_{i=1}^g n_i (\bar{r}_{i\bullet} - \bar{r})^2}{\sum_{i=1}^g \sum_{j=1}^{n_i} (r_{ij} - \bar{r})^2}$  donde:

$n_i$  = número de observaciones en el grupo  $i$

$r_{ij}$  = rango entre todas las observaciones de la observación  $j$  en el grupo  $i$

$N$  = número total de observaciones entre todos los grupos

$$\bar{r}_{i\bullet} = \frac{\sum_{j=1}^{n_i} r_{ij}}{n_i}$$

$\bar{r} = (N + 1)/2$  es el promedio de  $r_{ij}$

Región de rechazo: Si el valor  $p$  es  $\Pr(X_{g-1}^2 \geq K)$ , del cual se rechaza  $H_0$  si valor  $p < \alpha$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$ , están en el mismo subconjunto, no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de inducción a brote para el nivel de apareamiento de brote, caso contrario si  $p < 0,05$ , están en diferentes subconjuntos, existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de inducción a brote para el nivel de apareamiento de brote.

### B.1.6. Modelo de regresión logística

#### B.1.6.1. Variable: concentración BAP (0,5 – 1,0 – 2,0 mgL<sup>-1</sup>)

Hipótesis nula: La variable independiente concentración BAP (0,5 – 1,0 – 2,0 mgL<sup>-1</sup>) no influye en la variable dependiente aparecimiento de brote.

Hipótesis alternativa: La variable independiente concentración BAP (0,5 – 1,0 – 2,0 mgL<sup>-1</sup>) si influye en la variable dependiente aparecimiento de brote.

Estadístico de prueba: Analiza datos distribuidos binomialmente de la forma:

$$Y_i \sim B(p_i, n_i) \text{ para } i = 1, \dots, m$$

Donde:

$n_i$  = número de ensayos Bernoulli

$p_i$  = probabilidades de éxito

$$\log it(p_i) = \ln\left(\frac{p_i}{1-p_i}\right) = \beta_0 + \beta_1 x_{1,i} + \dots + \beta_k x_{k,i}$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_0$  si valor  $p < \alpha$  con nivel de significancia  $\alpha = 0,05$

Decisión: Si  $p > 0,05$  la variable concentración BAP (0,5 – 1,0 – 2,0 mgL<sup>-1</sup>) no influye en la variable dependiente aparecimiento de brote, caso contrario si  $p < 0,05$  la variable independiente concentración BAP (0,5 – 1,0 – 2,0 mgL<sup>-1</sup>) si influye en la variable dependiente aparecimiento de brote.

B.1.6.2. Variable: concentración IBA ( $0,0 - 0,1 \text{ mgL}^{-1}$ )

Hipótesis nula: La variable independiente concentración IBA ( $0,0 - 0,1 \text{ mgL}^{-1}$ ) no influye en la variable dependiente aparecimiento de brote.

Hipótesis alternativa: La variable independiente concentración IBA ( $0,0 - 0,1 \text{ mgL}^{-1}$ ) si influye en la variable dependiente aparecimiento de brote.

Estadístico de prueba: Analiza datos distribuidos binomialmente de la forma:  
 $Y_i \sim B(p_i, n_i)$  para  $i = 1, \dots, m$

Donde:

$n_i$  = número de ensayos Bernoulli

$p_i$  = probabilidades de éxito

$$\log \text{it}(p_i) = \ln\left(\frac{p_i}{1-p_i}\right) = \beta_0 + \beta_1 x_{1,i} + \dots + \beta_k x_{k,i}$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_0$  si valor  $p < \alpha$  con nivel de significancia  $\alpha = 0,05$

Decisión: Si  $p > 0,05$  la variable concentración IBA ( $0,0 - 0,1 \text{ mgL}^{-1}$ ) no influye en la variable dependiente aparecimiento de brote, caso contrario si  $p < 0,05$  la variable independiente concentración IBA ( $0,0 - 0,1 \text{ mgL}^{-1}$ ) si influye en la variable dependiente aparecimiento de brote.

## B.2. Número de brotes

### B.2.1. Análisis de varianza

#### B.2.1.1. Modelo

Hipótesis nula: Los tratamientos de inducción a brote para el número de brotes se ajustan al modelo propuesto.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de inducción a brote para el número de brotes no se ajustan al modelo propuesto.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{k=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  los tratamientos de inducción a brote no se ajustan al modelo propuesto para el número de brotes, caso contrario si  $p < 0,05$ , los tratamientos de inducción a brote se ajustan al modelo propuesto para el número de brotes.

### B.2.1.2. Variable: concentración BAP (6 - bencilaminopurina)

Hipótesis nula: Los tratamientos de concentración BAP (6 - bencilaminopurina) para el número de brotes son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de concentración BAP (6 - bencilaminopurina) para el número de brotes son diferentes.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{k=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  las concentraciones de BAP (6 - bencilaminopurina) no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$ , las concentraciones BAP (6 - bencilaminopurina) muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

### B.2.1.3. Variable: concentración IBA (ácido indol butirrico)

Hipótesis nula: Los tratamientos de concentración IBA (ácido indol butirrico) para el número de brotes son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de concentración IBA (ácido indol butírrico) para el número de brotes son diferentes.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{k=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  las concentraciones de IBA no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$ , las concentraciones de IBA muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

#### B.2.1.4. Variable: interacción BAP – IBA.

Hipótesis nula: Las combinaciones de BAP vs IBA para el número de brotes son iguales.

Hipótesis alternativa: Las combinaciones de BAP vs IBA para el número de brotes son diferentes.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  las combinaciones de BAP vs IBA no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$ , las combinaciones de BAP vs IBA muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

### B.2.2. Método de comparaciones múltiples de Duncan (Duncan)

Hipótesis nula: Los tratamientos de inducción a brote para el número de brotes son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de inducción a brote para el número de brotes son diferentes.

Estadístico de prueba: Rangos de significancia mínima  $R_p = r_\alpha = (p, l) S_{\bar{Y}_{ij}}$  donde:

$$p = 2, 3, \dots, k$$

$l =$  grados de libertad

Se compara la diferencia entre la media más grande y la más pequeña con el rango  $R_k$ . Luego, la diferencia entre la media más grande y la segunda más pequeña se compara con el rango  $R_{k-1}$ . Estas comparaciones continúan hasta que la media mayor se haya comparado con todas las demás y así sucesivamente hasta que se comparan los  $k(k-1)/2$  pares de medias posibles con el rango que les corresponda.

Región de rechazo: Comparaciones donde la diferencia observada es mayor que el rango respectivo, esas medias son significativamente diferentes. Si dos medias caen entre otras dos que no son muy diferentes, entonces esas dos medias poblacionales también se consideran estadísticamente iguales.

Decisión: Si las medias están en el mismo subconjunto, los tratamientos de inducción a brote no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si las medias están en diferentes subconjuntos, los tratamientos de inducción a brote muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

#### B.2.2.1. Variable: concentración de BAP (6 – bencilaminopurina)

Hipótesis nula: Los tratamientos de BAP para el número de brotes son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de BAP para el número de brotes son diferentes.

Estadístico de prueba: Rangos de significancia mínima  $R_p = r_\alpha = (p, l)S_{\bar{Y}_{ij}}$  donde:

$$p = 2, 3, \dots, k$$

$l =$  grados de libertad

Se compara la diferencia entre la media más grande y la más pequeña con el rango  $R_k$ . Luego, la diferencia entre la media más grande y la segunda más pequeña se compara con el rango  $R_{k-1}$ . Estas comparaciones continúan hasta que la media mayor se haya comparado con todas las demás y así sucesivamente hasta que se comparan los  $k(k-1)/2$  pares de medias posibles con el rango que les corresponda.

Región de rechazo: Comparaciones donde la diferencia observada es mayor que el rango respectivo, esas medias son significativamente diferentes. Si dos medias caen entre otras

dos que no son muy diferentes, entonces esas dos medias poblacionales también se consideran estadísticamente iguales.

Decisión: Si las medias están en el mismo subconjunto, las concentraciones de BAP no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario, si las medias están en diferentes subconjuntos, las concentraciones de BAP muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

#### B.2.2.2. Variable: concentración IBA (ácido indol butírico)

Hipótesis nula: Los tratamientos de IBA para el número de brotes son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de IBA para el número de brotes son diferentes.

Estadístico de prueba: Rangos de significancia mínima  $R_p = r_\alpha = (p, l)S_{\bar{Y}_{ij}}$  donde:

$$p = 2, 3, \dots, k$$

$l =$  grados de libertad

Se compara la diferencia entre la media más grande y la más pequeña con el rango  $R_{k\cdot}$ . Luego, la diferencia entre la media más grande y la segunda más pequeña se compara con el rango  $R_{k-1}$ . Estas comparaciones continúan hasta que la media mayor se haya comparado con todas las demás y así sucesivamente hasta que se comparan los  $k(k-1)/2$  pares de medias posibles con el rango que les corresponda.

Región de rechazo: Comparaciones donde la diferencia observada es mayor que el rango respectivo, esas medias son significativamente diferentes. Si dos medias caen entre otras dos que no son muy diferentes, entonces esas dos medias poblacionales también se consideran estadísticamente iguales.

Decisión: Si las medias están en el mismo subconjunto, las concentraciones de IBA no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario, si las medias están en diferentes subconjuntos, las concentraciones de IBA muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

### B.2.3. Prueba de Levene para homocedasticidad de varianza

Hipótesis nula: Las varianzas de los tratamientos de inducción a brote para el número de brotes son iguales.

Hipótesis alternativa: Las varianzas de los tratamientos de inducción a brote para el número de brotes son diferentes.

Estadístico de prueba: 
$$L = \frac{(n-k) \sum n_i (\bar{V}_i - \bar{V})^2}{(k-1) \sum \sum (V_{ij} - \bar{V}_i)^2} \approx F_{(k-1)}$$

Donde:  $V_{ij} = |X_{ij} - \bar{X}_i|$  donde  $i = 1, 2, \dots, n$ ,  $\bar{X}_i = \text{Mediana } X_{i1}, X_{i2}, \dots, X_{in_i}$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_{(k-1)} > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  las varianzas de los tratamientos de inducción a brote no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$  las varianzas de los tratamientos de inducción a brote muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, las varianzas entre los tratamientos son diferentes.

### B.2.4. Prueba de Normalidad (Shapiro-Wills modificado)

Hipótesis nula: Existe distribución normal en los tratamientos de inducción a brote para el número de brotes.

Hipótesis alternativa: No existe distribución normal en los tratamientos de inducción a brote para el número de brotes.

Estadístico de prueba:  $W = \frac{\left(\sum_{i=1}^n a_i x_{(i)}\right)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$  donde:  $x_{(i)}$  es el número que ocupa la i-ésima

posición de la muestra.

$\bar{x} = (x_1 + x_2 + \dots + x_n)$  es la media muestral.

Las constantes  $a_i$  se calculan:

$(a_1 + \dots + a_n) = \frac{m^T V^{-1}}{(m^T V^{-1} V^{-1} m)^{1/2}}$  Donde:  $m = (m_1, \dots, m_n)^T$  siendo  $m_1, \dots, m_n$  los

valores medios del estadístico ordenado, de variables aleatorias independientes e idénticamente distribuidas, muestreadas de distribuciones normales.  $V$  es la matriz de covarianzas de ese estadístico de orden.

Región de rechazo: Se rechaza  $H_0$  si  $W$  es demasiado pequeño, es decir: valor  $p < \alpha$  la hipótesis nula es rechazada.

Decisión: Si  $p > 0,05$  no existe distribución normal de los tratamientos de inducción a brote, caso contrario si  $p < 0,05$  existe distribución normal de los tratamientos de inducción a brote, es decir, son paramétricos.

### B.2.5. Análisis de la varianza no paramétrica (Prueba de Kruskal-Wallis)

Hipótesis nula: Los tratamientos de inducción a brote para el número de brotes son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de inducción a brote para el número de brotes son diferentes.

Estadístico de prueba: 
$$K = (N - 1) \frac{\sum_{i=1}^g n_i (\bar{r}_{i\bullet} - \bar{r})^2}{\sum_{i=1}^g \sum_{j=1}^{n_i} (r_{ij} - \bar{r})^2}$$
 donde:

$n_i$  = número de observaciones en el grupo  $i$

$r_{ij}$  = rango entre todas las observaciones de la observación  $j$  en el grupo  $i$

$N$  = número total de observaciones entre todos los grupos

$$\bar{r}_{i\bullet} = \frac{\sum_{j=1}^{n_i} r_{ij}}{n_i}$$

$\bar{r} = (N + 1) / 2$  es el promedio de  $r_{ij}$

Región de rechazo: Si el valor  $p$  es  $\Pr(X_{g-1}^2 \geq K)$ , del cual se rechaza  $H_0$  si valor  $p < \alpha$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$ , están en el mismo subconjunto, no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de inducción a brote para el número de brotes, caso contrario si  $p < 0,05$ , están en diferentes subconjuntos, existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de inducción a brote para el número de brotes.

## C. FASE III: Multiplicación de brotes

### C.1. Supervivencia de brotes

#### C.1.1. Análisis de varianza

##### C.1.1.1. Modelo

Hipótesis nula: Los tratamientos de multiplicación de brotes para el nivel de supervivencia de brotes se ajustan al modelo propuesto.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de multiplicación de brotes para el nivel de supervivencia de brotes no se ajustan al modelo propuesto.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{k=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  los tratamientos de multiplicación de brotes no se ajustan al modelo propuesto para el nivel de supervivencia de brotes, caso contrario si  $p < 0,05$ , los tratamientos de multiplicación de brotes se ajustan al modelo propuesto para el nivel de supervivencia de brotes.

C.1.1.2. Variable: concentración BAP (6 - bencilaminopurina)

Hipótesis nula: Los tratamientos de concentración BAP (6 - bencilaminopurina) para el nivel de supervivencia de brotes son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de concentración BAP (6 - bencilaminopurina) para el nivel de supervivencia de brotes son diferentes.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  las concentraciones de BAP (6 - bencilaminopurina) no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$ , las concentraciones BAP (6 - bencilaminopurina) muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

C.1.1.3. Variable: concentración IBA (ácido indol butirrico)

Hipótesis nula: Los tratamientos de concentración IBA (ácido indol butirrico) para el nivel de supervivencia de brotes son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de concentración IBA (ácido indol butírrico) para el nivel de supervivencia de brotes son diferentes.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{k=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  las concentraciones de IBA no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$ , las concentraciones de IBA muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

#### C.1.1.4. Variable: interacción BAP – IBA.

Hipótesis nula: Las combinaciones de BAP vs IBA para el nivel de supervivencia de brotes son iguales.

Hipótesis alternativa: Las combinaciones de BAP vs IBA para el nivel de supervivencia de brotes son diferentes.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  las combinaciones de BAP vs IBA no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$ , las combinaciones de BAP vs IBA muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

### C.1.2. Método de comparaciones múltiples de Duncan (Duncan)

Hipótesis nula: Los tratamientos de multiplicación de brotes para el nivel de supervivencia de brotes son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de multiplicación de brotes para el nivel de supervivencia de brotes son diferentes.

Estadístico de prueba: Rangos de significancia mínima  $R_p = r_\alpha = (p, l) S_{\bar{Y}_{ij}}$  donde:

$$p = 2, 3, \dots, k$$

$l =$  grados de libertad

Se compara la diferencia entre la media más grande y la más pequeña con el rango  $R_k$ . Luego, la diferencia entre la media más grande y la segunda más pequeña se compara con el rango  $R_{k-1}$ . Estas comparaciones continúan hasta que la media mayor se haya comparado con todas las demás y así sucesivamente hasta que se comparan los  $k(k-1)/2$  pares de medias posibles con el rango que les corresponda.

Región de rechazo: Comparaciones donde la diferencia observada es mayor que el rango respectivo, esas medias son significativamente diferentes. Si dos medias caen entre otras dos que no son muy diferentes, entonces esas dos medias poblacionales también se consideran estadísticamente iguales.

Decisión: Si las medias están en el mismo subconjunto, los tratamientos de multiplicación de brotes no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si las medias están en diferentes subconjuntos, los tratamientos de multiplicación de brotes muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

#### C.1.2.1. Variable: concentración de BAP (6 – bencilaminopurina)

Hipótesis nula: Los tratamientos de BAP para el nivel de supervivencia de brotes son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de BAP para el nivel de supervivencia de brotes son diferentes.

Estadístico de prueba: Rangos de significancia mínima  $R_p = r_\alpha = (p, l)S_{\bar{Y}_{ij}}$  donde:  
 $p = 2, 3, \dots, k$

$l =$  grados de libertad

Se compara la diferencia entre la media más grande y la más pequeña con el rango  $R_k$ . Luego, la diferencia entre la media más grande y la segunda más pequeña se compara con el rango  $R_{k-1}$ . Estas comparaciones continúan hasta que la media mayor se haya comparado con todas las demás y así sucesivamente hasta que se comparan los  $k(k-1)/2$  pares de medias posibles con el rango que les corresponda.

Región de rechazo: Comparaciones donde la diferencia observada es mayor que el rango respectivo, esas medias son significativamente diferentes. Si dos medias caen entre otras dos que no son muy diferentes, entonces esas dos medias poblacionales también se consideran estadísticamente iguales.

Decisión: Si las medias están en el mismo subconjunto, las concentraciones de BAP no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario, si las medias están en diferentes subconjuntos, las concentraciones de BAP muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

#### C.1.2.2. Variable: concentración IBA (ácido indol butírico)

Hipótesis nula: Los tratamientos de IBA para el nivel de supervivencia de brotes son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de IBA para el nivel de supervivencia de brotes son diferentes.

Estadístico de prueba: Rangos de significancia mínima  $R_p = r_\alpha = (p, l)S_{\bar{Y}_{ij}}$  donde:  
 $p = 2, 3, \dots, k$

$l =$  grados de libertad

Se compara la diferencia entre la media más grande y la más pequeña con el rango  $R_k$ . Luego, la diferencia entre la media más grande y la segunda más pequeña se compara con el rango  $R_{k-1}$ . Estas comparaciones continúan hasta que la media mayor se haya comparado con todas las demás y así sucesivamente hasta que se comparan los  $k(k-1)/2$  pares de medias posibles con el rango que les corresponda.

Región de rechazo: Comparaciones donde la diferencia observada es mayor que el rango respectivo, esas medias son significativamente diferentes. Si dos medias caen entre otras dos que no son muy diferentes, entonces esas dos medias poblacionales también se consideran estadísticamente iguales.

Decisión: Si las medias están en el mismo subconjunto, las concentraciones de IBA no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario, si las medias están en diferentes subconjuntos, las concentraciones de IBA muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

### C.1.3. Prueba de Levene para homocedasticidad de varianza

Hipótesis nula: Las varianzas de los tratamientos de multiplicación de brotes para el nivel de supervivencia de brotes son iguales.

Hipótesis alternativa: Las varianzas de los tratamientos de multiplicación de brotes para el nivel de supervivencia de brotes son diferentes.

Estadístico de prueba: 
$$L = \frac{(n-k) \sum n_i (\bar{v}_i - \bar{v}^2)}{(k-1) \sum \sum (v_{ij} - \bar{v}_i^2)} \approx F_{(k-1)}$$

Donde:  $V_{ij} = |X_{ij} - \bar{X}_i|$  donde  $i = 1, 2, \dots, n$ ,  $\bar{X}_i = \text{Mediana } X_{i1}, X_{i2}, \dots, X_{in_i}$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_{(k-1)} > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  las varianzas de los tratamientos de multiplicación de brotes no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$  las varianzas de los tratamientos de multiplicación de brotes muestran diferencias

estadísticas significativas entre sí, es decir, las varianzas entre los tratamientos son diferentes.

#### C.1.4. Prueba de Normalidad (Shapiro-Wills modificado)

Hipótesis nula: Existe distribución normal en los tratamientos de multiplicación de brotes para el nivel de supervivencia de brotes.

Hipótesis alternativa: No existe distribución normal en los tratamientos de multiplicación de brotes para el nivel de supervivencia de brotes.

Estadístico de prueba:  $W = \frac{\left( \sum_{i=1}^n a_i x_{(i)} \right)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$  donde:  $x_{(i)}$  es el número que ocupa la i-ésima

posición de la muestra.

$\bar{x} = (x_1 + x_2 + \dots + x_n)$  es la media muestral.

Las constantes  $a_i$  se calculan:

$(a_1 + \dots + a_n) = \frac{m^T V^{-1}}{(m^T V^{-1} V^{-1} m)^{1/2}}$  Donde:  $m = (m_1, \dots, m_n)^T$  siendo  $m_1, \dots, m_n$  los

valores medios del estadístico ordenado, de variables aleatorias independientes e idénticamente distribuidas, muestreadas de distribuciones normales.  $V$  es la matriz de covarianzas de ese estadístico de orden.

Región de rechazo: Se rechaza  $H_0$  si  $W$  es demasiado pequeño, es decir: valor  $p < \alpha$  la hipótesis nula es rechazada.

Decisión: Si  $p > 0,05$  no existe distribución normal de los tratamientos de multiplicación de brotes, caso contrario si  $p < 0,05$  existe distribución normal de los tratamientos de multiplicación de brotes, es decir, son paramétricos.

#### C.1.5. Análisis de la varianza no paramétrica (Prueba de Kruskal-Wallis)

Hipótesis nula: Los tratamientos de multiplicación de brotes para el nivel de supervivencia de brotes son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de multiplicación de brotes para el nivel de supervivencia de brotes son diferentes.

Estadístico de prueba: 
$$K = (N - 1) \frac{\sum_{i=1}^g n_i (\bar{r}_{i\bullet} - \bar{r})^2}{\sum_{i=1}^g \sum_{j=1}^{n_i} (r_{ij} - \bar{r})^2}$$
 donde:

$n_i$  = número de observaciones en el grupo  $i$

$r_{ij}$  = rango entre todas las observaciones de la observación  $j$  en el grupo  $i$

$N$  = número total de observaciones entre todos los grupos

$$\bar{r}_{i\bullet} = \frac{\sum_{j=1}^{n_i} r_{ij}}{n_i}$$

$\bar{r} = (N + 1) / 2$  es el promedio de  $r_{ij}$

Región de rechazo: Si el valor  $p$  es  $\Pr(X_{g-1}^2 \geq K)$ , del cual se rechaza  $H_o$  si valor  $p < \alpha$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$ , están en el mismo subconjunto, no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de multiplicación de brotes para el nivel de supervivencia de brotes, caso contrario si  $p < 0,05$ , están en diferentes subconjuntos, existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de multiplicación de brotes para el nivel de supervivencia de brotes.

### C.1.6. Modelo de regresión logística

#### C.1.6.1. Variable: concentración BAP (0,5 – 1,0 – 2,0 mgL<sup>-1</sup>)

Hipótesis nula: La variable independiente concentración BAP (0,5 – 1,0 – 2,0 mgL<sup>-1</sup>) no influye en la variable dependiente supervivencia de brotes.

Hipótesis alternativa: La variable independiente concentración BAP (0,5 – 1,0 – 2,0 mgL<sup>-1</sup>) si influye en la variable dependiente supervivencia de brotes.

Estadístico de prueba: Analiza datos distribuidos binomialmente de la forma:  
 $Y_i \sim B(p_i, n_i)$  para  $i = 1, \dots, m$

Donde:

$n_i$  = número de ensayos Bernoulli

$p_i$  = probabilidades de éxito

$$\log it(p_i) = \ln\left(\frac{p_i}{1-p_i}\right) = \beta_o + \beta_1 x_{1,i} + \dots + \beta_k x_{k,i}$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si valor  $p < \alpha$  con nivel de significancia  $\alpha = 0,05$

Decisión: Si  $p > 0,05$  la variable concentración BAP (0,5 – 1,0 – 2,0 mgL<sup>-1</sup>) no influye en la variable dependiente supervivencia de brotes, caso contrario si  $p < 0,05$  la variable independiente concentración BAP (0,5 – 1,0 – 2,0 mgL<sup>-1</sup>) si influye en la variable dependiente supervivencia de brotes.

#### C.1.6.2. Variable: concentración IBA (0,0 – 0,1 mgL<sup>-1</sup>)

Hipótesis nula: La variable independiente concentración IBA (0,0 – 0,1 mgL<sup>-1</sup>) no influye en la variable dependiente supervivencia de brotes.

Hipótesis alternativa: La variable independiente concentración IBA (0,0 – 0,1 mgL<sup>-1</sup>) si influye en la variable dependiente supervivencia de brotes.

Estadístico de prueba: Analiza datos distribuidos binomialmente de la forma:

$$Y_i \sim B(p_i, n_i) \text{ para } i = 1, \dots, m$$

Donde:

$n_i$  = número de ensayos Bernoulli

$p_i$  = probabilidades de éxito

$$\log \text{it}(p_i) = \ln\left(\frac{p_i}{1-p_i}\right) = \beta_o + \beta_1 x_{1,i} + \dots + \beta_k x_{k,i}$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si valor  $p < \alpha$  con nivel de significancia  $\alpha = 0,05$

Decisión: Si  $p > 0,05$  la variable concentración IBA (0,0 – 0,1 mgL<sup>-1</sup>) no influye en la variable dependiente supervivencia de brotes, caso contrario si  $p < 0,05$  la variable

independiente concentración IBA ( $0,0 - 0,1 \text{ mgL}^{-1}$ ) si influye en la variable dependiente supervivencia de brotes.

## C.2. Número de brotes.

### C.2.1. Análisis de varianza

#### C.2.1.1. Modelo

Hipótesis nula: Los tratamientos de multiplicación de brotes para el número de brotes se ajustan al modelo propuesto.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de multiplicación de brotes para el número de brotes no se ajustan al modelo propuesto.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{k=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  los tratamientos de multiplicación de brotes no se ajustan al modelo propuesto para el número de brotes, caso contrario si  $p < 0,05$ , los tratamientos de multiplicación de brotes se ajustan al modelo propuesto para el número de brotes.

### C.2.1.2. Variable: concentración BAP (6 - bencilaminopurina)

Hipótesis nula: Los tratamientos de concentración BAP (6 - bencilaminopurina) para el número de brotes son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de concentración BAP (6 - bencilaminopurina) para el número de brotes son diferentes.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{k=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  las concentraciones de BAP (6 - bencilaminopurina) no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$ , las concentraciones BAP (6 - bencilaminopurina) muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

### C.2.1.3. Variable: concentración IBA (ácido indol butirrico)

Hipótesis nula: Los tratamientos de concentración IBA (ácido indol butirrico) para el número de brotes son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de concentración IBA (ácido indol butírrico) para el número de brotes son diferentes.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{k=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  las concentraciones de IBA no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$ , las concentraciones de IBA muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

#### C.2.1.4. Variable: interacción BAP – IBA.

Hipótesis nula: Las combinaciones de BAP vs IBA para el número de brotes son iguales.

Hipótesis alternativa: Las combinaciones de BAP vs IBA para el número de brotes son diferentes.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  las combinaciones de BAP vs IBA no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$ , las combinaciones de BAP vs IBA muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

### C.2.2. Método de comparaciones múltiples de Duncan (Duncan)

Hipótesis nula: Los tratamientos de multiplicación de brotes para el número de brotes son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de multiplicación de brotes para el número de brotes son diferentes.

Estadístico de prueba: Rangos de significancia mínima  $R_p = r_\alpha = (p, l) S_{\bar{Y}_{ij}}$  donde:

$$p = 2, 3, \dots, k$$

$l =$  grados de libertad

Se compara la diferencia entre la media más grande y la más pequeña con el rango  $R_k$ . Luego, la diferencia entre la media más grande y la segunda más pequeña se compara con el rango  $R_{k-1}$ . Estas comparaciones continúan hasta que la media mayor se haya comparado con todas las demás y así sucesivamente hasta que se comparan los  $k(k-1)/2$  pares de medias posibles con el rango que les corresponda.

Región de rechazo: Comparaciones donde la diferencia observada es mayor que el rango respectivo, esas medias son significativamente diferentes. Si dos medias caen entre otras dos que no son muy diferentes, entonces esas dos medias poblacionales también se consideran estadísticamente iguales.

Decisión: Si las medias están en el mismo subconjunto, los tratamientos de multiplicación de brotes no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si las medias están en diferentes subconjuntos, los tratamientos de multiplicación de brotes muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

#### C.2.2.1. Variable: concentración de BAP (6 – bencilaminopurina)

Hipótesis nula: Los tratamientos de BAP para el número de brotes son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de BAP para el número de brotes son diferentes.

Estadístico de prueba: Rangos de significancia mínima  $R_p = r_\alpha = (p, l)S_{\bar{Y}_{ij}}$  donde:

$$p = 2, 3, \dots, k$$

$l =$  grados de libertad

Se compara la diferencia entre la media más grande y la más pequeña con el rango  $R_k$ . Luego, la diferencia entre la media más grande y la segunda más pequeña se compara con el rango  $R_{k-1}$ . Estas comparaciones continúan hasta que la media mayor se haya comparado con todas las demás y así sucesivamente hasta que se comparan los  $k(k-1)/2$  pares de medias posibles con el rango que les corresponda.

Región de rechazo: Comparaciones donde la diferencia observada es mayor que el rango respectivo, esas medias son significativamente diferentes. Si dos medias caen entre otras

dos que no son muy diferentes, entonces esas dos medias poblacionales también se consideran estadísticamente iguales.

Decisión: Si las medias están en el mismo subconjunto, las concentraciones de BAP no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario, si las medias están en diferentes subconjuntos, las concentraciones de BAP muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

#### C.2.2.2. Variable: concentración IBA (ácido indol butírico)

Hipótesis nula: Los tratamientos de IBA para el número de brotes son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de IBA para el número de brotes son diferentes.

Estadístico de prueba: Rangos de significancia mínima  $R_p = r_\alpha = (p, l)S_{\bar{Y}_{ij}}$  donde:

$$p = 2, 3, \dots, k$$

$l =$  grados de libertad

Se compara la diferencia entre la media más grande y la más pequeña con el rango  $R_{k\cdot}$ . Luego, la diferencia entre la media más grande y la segunda más pequeña se compara con el rango  $R_{k-1}$ . Estas comparaciones continúan hasta que la media mayor se haya comparado con todas las demás y así sucesivamente hasta que se comparan los  $k(k-1)/2$  pares de medias posibles con el rango que les corresponda.

Región de rechazo: Comparaciones donde la diferencia observada es mayor que el rango respectivo, esas medias son significativamente diferentes. Si dos medias caen entre otras dos que no son muy diferentes, entonces esas dos medias poblacionales también se consideran estadísticamente iguales.

Decisión: Si las medias están en el mismo subconjunto, las concentraciones de IBA no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario, si las medias están en diferentes subconjuntos, las concentraciones de IBA muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

### C.2.3. Prueba de Levene para homocedasticidad de varianza

Hipótesis nula: Las varianzas de los tratamientos de multiplicación de brotes para el número de brotes son iguales.

Hipótesis alternativa: Las varianzas de los tratamientos de multiplicación de brotes para el número de brotes son diferentes.

Estadístico de prueba: 
$$L = \frac{(n-k) \sum n_i (\bar{V}_i - \bar{V})^2}{(k-1) \sum \sum (V_{ij} - \bar{V}_i)^2} \approx F_{(k-1)}$$

Donde:  $V_{ij} = |X_{ij} - \bar{X}_i|$  donde  $i = 1, 2, \dots, n$ ,  $\bar{X}_i = \text{Mediana } X_{i1}, X_{i2}, \dots, X_{in_i}$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_{(k-1)} > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  las varianzas de los tratamientos de multiplicación de brotes no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$  las varianzas de los tratamientos de multiplicación de brotes muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, las varianzas entre los tratamientos son diferentes.

#### C.2.4. Prueba de Normalidad (Shapiro-Wills modificado)

Hipótesis nula: Existe distribución normal en los tratamientos de multiplicación de brotes para el número de brotes.

Hipótesis alternativa: No existe distribución normal en los tratamientos de multiplicación de brotes para el número de brotes.

Estadístico de prueba:  $W = \frac{\left( \sum_{i=1}^n a_i x_{(i)} \right)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$  donde:  $x_{(i)}$  es el número que ocupa la i-ésima

posición de la muestra.

$\bar{x} = (x_1 + x_2 + \dots + x_n)$  es la media muestral.

Las constantes  $a_i$  se calculan:

$(a_i + \dots + a_n) = \frac{m^T V^{-1}}{(m^T V^{-1} V^{-1} m)^{1/2}}$  Donde:  $m = (m_1, \dots, m_n)^T$  siendo  $m_1, \dots, m_n$  los

valores medios del estadístico ordenado, de variables aleatorias independientes e idénticamente distribuidas, muestreadas de distribuciones normales.  $V$  es la matriz de covarianzas de ese estadístico de orden.

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $W$  es demasiado pequeño, es decir: valor  $p < \alpha$  la hipótesis nula es rechazada.

Decisión: Si  $p > 0,05$  no existe distribución normal de los tratamientos de multiplicación de brotes, caso contrario si  $p < 0,05$  existe distribución normal de los tratamientos de multiplicación de brotes, es decir, son paramétricos.

### C.2.5. Análisis de la varianza no paramétrica (Prueba de Kruskal-Wallis)

Hipótesis nula: Los tratamientos de multiplicación de brotes para el número de brotes son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de multiplicación de brotes para el número de brotes son diferentes.

Estadístico de prueba: 
$$K = (N - 1) \frac{\sum_{i=1}^g n_i (\bar{r}_{i\bullet} - \bar{r})^2}{\sum_{i=1}^g \sum_{j=1}^{n_i} (r_{ij} - \bar{r})^2}$$
 donde:

$n_i$  = número de observaciones en el grupo  $i$

$r_{ij}$  = rango entre todas las observaciones de la observación  $j$  en el grupo  $i$

$N$  = número total de observaciones entre todos los grupos

$$\bar{r}_{i\bullet} = \frac{\sum_{j=1}^{n_i} r_{ij}}{n_i}$$

$\bar{r} = (N + 1) / 2$  es el promedio de  $r_{ij}$

Región de rechazo: Si el valor  $p$  es  $\Pr(X_{g-1}^2 \geq K)$ , del cual se rechaza  $H_0$  si valor  $p < \alpha$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$ , están en el mismo subconjunto, no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de multiplicación de brotes para el número de brotes, caso contrario si  $p < 0,05$ , están en diferentes subconjuntos, existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de multiplicación de brotes para el número de brotes.

## D. FASE IV: Enraizamiento de brotes

### D.1. Presencia de raíces

#### D.1.1. Análisis de varianza

##### D.1.1.1. Modelo

Hipótesis nula: Los tratamientos de enraizamiento de brotes para el nivel de presencia de raíces se ajustan al modelo propuesto.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de enraizamiento de brotes para el nivel de presencia de raíces no se ajustan al modelo propuesto.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{k=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1-\alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  los tratamientos de enraizamiento de brotes no se ajustan al modelo propuesto para el nivel de presencia de raíces, caso contrario si  $p < 0,05$ , los tratamientos de enraizamiento de brotes se ajustan al modelo propuesto para el nivel de presencia de raíces.

D.1.1.2. Variable: concentración IBA (ácido indol butírrico)

Hipótesis nula: Los tratamientos de concentración IBA (ácido indol butírrico) para el nivel de presencia de raíces son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de concentración IBA (ácido indol butírrico) para el nivel de presencia de raíces son diferentes.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{k=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  las concentraciones de IBA (ácido indol butírrico) no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$ , las concentraciones IBA (ácido indol butírrico) muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

D.1.1.3. Variable: concentración BAP (6 - bencilaminopurina)

Hipótesis nula: Los tratamientos de concentración BAP (6 - bencilaminopurina) para el nivel de presencia de raíces son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de concentración BAP (6 - bencilaminopurina) para el nivel de presencia de raíces son diferentes.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{k=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  las concentraciones de BAP no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$ , las concentraciones de BAP muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

#### D.1.1.4. Variable: interacción IBA – BAP.

Hipótesis nula: Las combinaciones de IBA vs BAP para el nivel de presencia de raíces son iguales.

Hipótesis alternativa: Las combinaciones de IBA vs BAP para el nivel de presencia de raíces son diferentes.

Estadístico de prueba:  $F_o = \frac{CM_{Trat}}{CM_E}$  donde:  $CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k-1}$  y  $CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$  y

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$CM_E = \frac{SC_E}{N-k} \text{ y } SC_E = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_o > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  las combinaciones de IBA vs BAP no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$ , las combinaciones de IBA vs BAP muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

#### D.1.2. Método de comparaciones múltiples de Duncan (Duncan)

Hipótesis nula: Los tratamientos de enraizamiento de brotes para el nivel de presencia de raíces son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de enraizamiento de brotes para el nivel de presencia de raíces son diferentes.

Estadístico de prueba: Rangos de significancia mínima  $R_p = r_\alpha = (p, l) S_{\bar{Y}_{ij}}$  donde:

$$p = 2, 3, \dots, k$$

$l =$  grados de libertad

Se compara la diferencia entre la media más grande y la más pequeña con el rango  $R_{k\cdot}$ . Luego, la diferencia entre la media más grande y la segunda más pequeña se compara con el rango  $R_{k-1}$ . Estas comparaciones continúan hasta que la media mayor se haya comparado con todas las demás y así sucesivamente hasta que se comparan los  $k(k-1)/2$  pares de medias posibles con el rango que les corresponda.

Región de rechazo: Comparaciones donde la diferencia observada es mayor que el rango respectivo, esas medias son significativamente diferentes. Si dos medias caen entre otras dos que no son muy diferentes, entonces esas dos medias poblacionales también se consideran estadísticamente iguales.

Decisión: Si las medias están en el mismo subconjunto, los tratamientos de enraizamiento de brotes no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si las medias están en diferentes subconjuntos, los tratamientos de enraizamiento de brotes muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

#### D.1.2.1. Variable: concentración de IBA (ácido indol butírrico)

Hipótesis nula: Los tratamientos de IBA para el nivel de presencia de raíces son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de IBA para el nivel de presencia de raíces son diferentes.

Estadístico de prueba: Rangos de significancia mínima  $R_p = r_\alpha = (p, l)S_{\bar{y}_{ij}}$  donde:

$$p = 2, 3, \dots, k$$

$l =$  grados de libertad

Se compara la diferencia entre la media más grande y la más pequeña con el rango  $R_k$ . Luego, la diferencia entre la media más grande y la segunda más pequeña se compara con el rango  $R_{k-1}$ . Estas comparaciones continúan hasta que la media mayor se haya comparado con todas las demás y así sucesivamente hasta que se comparan los  $k(k-1)/2$  pares de medias posibles con el rango que les corresponda.

Región de rechazo: Comparaciones donde la diferencia observada es mayor que el rango respectivo, esas medias son significativamente diferentes. Si dos medias caen entre otras dos que no son muy diferentes, entonces esas dos medias poblacionales también se consideran estadísticamente iguales.

Decisión: Si las medias están en el mismo subconjunto, las concentraciones de IBA no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario, si las medias están en diferentes subconjuntos, las concentraciones de IBA muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

#### D.1.2.2. Variable: concentración BAP (6 - bencilaminopurina)

Hipótesis nula: Los tratamientos de BAP para el nivel de presencia de raíces son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de BAP para el nivel de presencia de raíces son diferentes.

Estadístico de prueba: Rangos de significancia mínima  $R_p = r_\alpha = (p, l)S_{\bar{y}_{ij}}$  donde:

$$p = 2, 3, \dots, k$$

$l =$  grados de libertad

Se compara la diferencia entre la media más grande y la más pequeña con el rango  $R_k$ . Luego, la diferencia entre la media más grande y la segunda más pequeña se compara con el rango  $R_{k-1}$ . Estas comparaciones continúan hasta que la media mayor se haya comparado con todas las demás y así sucesivamente hasta que se comparan los  $k(k-1)/2$  pares de medias posibles con el rango que les corresponda.

Región de rechazo: Comparaciones donde la diferencia observada es mayor que el rango respectivo, esas medias son significativamente diferentes. Si dos medias caen entre otras dos que no son muy diferentes, entonces esas dos medias poblacionales también se consideran estadísticamente iguales.

Decisión: Si las medias están en el mismo subconjunto, las concentraciones de BAP no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario, si las medias están en diferentes subconjuntos, las concentraciones de BAP muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, al menos un tratamiento aplicado es diferente.

#### D.1.3. Prueba de Levene para homocedasticidad de varianza

Hipótesis nula: Las varianzas de los tratamientos de enraizamiento de brotes para el nivel de presencia de raíces son iguales.

Hipótesis alternativa: Las varianzas de los tratamientos de enraizamiento de brotes para el nivel de presencia de raíces son diferentes.

Estadístico de prueba: 
$$L = \frac{(n-k) \sum n_i (\bar{v}_i - \bar{v}^2)}{(k-1) \sum \sum (v_{ij} - \bar{v}_i^2)} \approx F_{(k-1)}$$

Donde:  $V_{ij} = |X_{ij} - \bar{X}_i|$  donde  $i = 1, 2, \dots, n$ ,  $\bar{X}_i = \text{Mediana } X_{i1}, X_{i2}, \dots, X_{in_i}$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_o$  si  $p = \Pr(F_{(k-1)} > F_{\alpha, (k-1), (N-k)})$ , donde  $F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$  es el percentil  $(1 - \alpha) \times 100$  de la distribución  $F$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$  las varianzas de los tratamientos de enraizamiento de brotes no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, caso contrario si  $p < 0,05$  las varianzas de los tratamientos de enraizamiento de brotes muestran diferencias

estadísticas significativas entre sí, es decir, las varianzas entre los tratamientos son diferentes.

#### D.1.4. Prueba de Normalidad (Shapiro-Wills modificado)

Hipótesis nula: Existe distribución normal en los tratamientos de enraizamiento de brotes para el nivel de presencia de raíces.

Hipótesis alternativa: No existe distribución normal en los tratamientos de enraizamiento de brotes para el nivel de presencia de raíces.

Estadístico de prueba:  $W = \frac{\left(\sum_{i=1}^n a_i x_{(i)}\right)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$  donde:  $x_{(i)}$  es el número que ocupa la i-ésima

posición de la muestra.

$\bar{x} = (x_1 + x_2 + \dots + x_n)$  es la media muestral.

Las constantes  $a_i$  se calculan:

$(a_1 + \dots + a_n) = \frac{m^T V^{-1}}{(m^T V^{-1} V^{-1} m)^{1/2}}$  Donde:  $m = (m_1, \dots, m_n)^T$  siendo  $m_1, \dots, m_n$  los

valores medios del estadístico ordenado, de variables aleatorias independientes e idénticamente distribuidas, muestreadas de distribuciones normales.  $V$  es la matriz de covarianzas de ese estadístico de orden.

Región de rechazo: Se rechaza  $H_0$  si  $W$  es demasiado pequeño, es decir: valor  $p < \alpha$  la hipótesis nula es rechazada.

Decisión: Si  $p > 0,05$  no existe distribución normal de los tratamientos de enraizamiento de brotes, caso contrario si  $p < 0,05$  existe distribución normal de los tratamientos de enraizamiento de brotes, es decir, son paramétricos.

#### D.1.5. Análisis de la varianza no paramétrica (Prueba de Kruskal-Wallis)

Hipótesis nula: Los tratamientos de enraizamiento de brotes para el nivel de presencia de raíces son iguales.

Hipótesis alternativa: Los tratamientos de enraizamiento de brotes para el nivel de presencia de raíces son diferentes.

Estadístico de prueba: 
$$K = (N - 1) \frac{\sum_{i=1}^g n_i (\bar{r}_{i\bullet} - \bar{r})^2}{\sum_{i=1}^g \sum_{j=1}^{n_i} (r_{ij} - \bar{r})^2}$$
 donde:

$n_i$  = número de observaciones en el grupo  $i$

$r_{ij}$  = rango entre todas las observaciones de la observación  $j$  en el grupo  $i$

$N$  = número total de observaciones entre todos los grupos

$$\bar{r}_{i\bullet} = \frac{\sum_{j=1}^{n_i} r_{ij}}{n_i}$$

$\bar{r} = (N + 1) / 2$  es el promedio de  $r_{ij}$

Región de rechazo: Si el valor  $p$  es  $\Pr(X_{g-1}^2 \geq K)$ , del cual se rechaza  $H_0$  si valor  $p < \alpha$ .

Decisión: Si  $p > 0,05$ , están en el mismo subconjunto, no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de enraizamiento de brotes para el nivel

de presencia de raíces, caso contrario si  $p < 0,05$ , están en diferentes subconjuntos, existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de enraizamiento de brotes para el nivel de presencia de raíces.

#### D.1.6. Modelo de regresión logística

##### D.1.6.1. Variable: concentración IBA (2,0 – 4,0 – 6,0 mgL<sup>-1</sup>)

Hipótesis nula: La variable independiente concentración IBA (2,0 – 4,0 – 6,0 mgL<sup>-1</sup>) no influye en la variable dependiente presencia de raíces.

Hipótesis alternativa: La variable independiente concentración IBA (2,0 – 4,0 – 6,0 mgL<sup>-1</sup>) si influye en la variable dependiente presencia de raíces.

Estadístico de prueba: Analiza datos distribuidos binomialmente de la forma:

$$Y_i \sim B(p_i, n_i) \text{ para } i = 1, \dots, m$$

Donde:

$n_i$  = número de ensayos Bernoulli

$p_i$  = probabilidades de éxito

$$\log \text{it}(p_i) = \ln\left(\frac{p_i}{1-p_i}\right) = \beta_0 + \beta_1 x_{1,i} + \dots + \beta_k x_{k,i}$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_0$  si valor  $p < \alpha$  con nivel de significancia  $\alpha = 0,05$

Decisión: Si  $p > 0,05$  la variable concentración IBA (2,0 – 4,0 – 6,0 mgL<sup>-1</sup>) no influye en la variable dependiente presencia de raíces, caso contrario si  $p < 0,05$  la variable

independiente concentración IBA (2,0 – 4,0 – 6,0 mgL<sup>-1</sup>) si influye en la variable dependiente presencia de raíces.

D.1.6.2. Variable: concentración BAP (0,0 – 0,1 mgL<sup>-1</sup>)

Hipótesis nula: La variable independiente concentración BAP (0,0 – 0,1 mgL<sup>-1</sup>) no influye en la variable dependiente presencia de raíces.

Hipótesis alternativa: La variable independiente concentración BAP (0,0 – 0,1 mgL<sup>-1</sup>) si influye en la variable dependiente presencia de raíces.

Estadístico de prueba: Analiza datos distribuidos binomialmente de la forma:  
 $Y_i \sim B(p_i, n_i)$  para  $i = 1, \dots, m$

Donde:  $n_i$  = número de ensayos Bernoulli

$p_i$  = probabilidades de éxito

$$\log it(p_i) = \ln\left(\frac{p_i}{1-p_i}\right) = \beta_0 + \beta_1 x_{1,i} + \dots + \beta_k x_{k,i}$$

Región de rechazo: Se rechaza  $H_0$  si valor  $p < \alpha$  con nivel de significancia  $\alpha = 0,05$

Decisión: Si  $p > 0,05$  la variable concentración BAP (0,0 – 0,1 mgL<sup>-1</sup>) no influye en la variable dependiente presencia de raíces, caso contrario si  $p < 0,05$  la variable independiente concentración BAP (0,0 – 0,1 mgL<sup>-1</sup>) si influye en la variable dependiente presencia de raíces.