

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
ESCUELA DE POSGRADO
Programa de Doctorado en Estadística Matemática



UNS
ESCUELA DE
POSGRADO

Optimización multirespuesta en estudios de propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* “árbol de la quina”

**Tesis para optar el grado de
Doctor en Estadística Matemática**

Autor:

Ms. Villena Zapata, Luigi Italo
Código Orcid: 0000-0001-9430-0028
DNI. N° 43799760

Asesora:

Dra. González Castro, Jeanette Baldramina
Código ORCID: 0000-0003-4661-7447
DNI N° 17907323

Línea de Investigación
Estadística y optimización

Nuevo Chimbote - PERÚ
2025



UNS
ESCUELA DE
POSGRADO

CONSTANCIA DE ASESORAMIENTO DE TESIS

Yo, Dra. González Castro, Jeanette Baldramina, mediante la presente certifico mi asesoramiento de la Tesis Doctoral titulada: "Optimización multirespuesta en estudios de propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina", por el magister Villena Zapata, Luigi Italo, para obtener el Grado Académico de Doctor en Estadística Matemática en la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional del Santa.

Nuevo Chimbote, junio del 2025.

.....
Dra. González Castro, Jeanette Baldramina
ASESORA
CODIGO ORCID: 0000-0003-4661-7447
DNI N° 17907323



UNS
ESCUELA DE
POSGRADO

CONFORMIDAD DEL JURADO EVALUADOR

Optimización multirespuesta en estudios de propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina".

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR EN ESTADÍSTICA MATEMÁTICA

Revisado y Aprobado por el Jurado Evaluador:

DR. JULIO ANTONIO LECCA VERGARA
PRESIDENTE
CODIGO ORCID: 0000-0001-5402-8453
DNI N° 17845785

DR. LUIS ALBERTO CALDERÓN YARLEQUE
SECRETARIO
CODIGO ORCID: 0000-0002-6870-5096
DNI N° 40097132

DRA. GONZÁLEZ CASTRO, JEANETTE BALDRAMINA
VOCAL
CODIGO ORCID: 0000-0003-4661-7447
DNI N° 17907323



UNS
ESCUELA DE
POSGRADO

ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

A los veintiocho días del mes de junio del año 2025, siendo las 12:00 m. horas, en el aula P-01 de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional del Santa, se reunieron los miembros del Jurado Evaluador, designados mediante Resolución Directoral N° 344-2025-EPG-UNS de fecha 15.03.2025, conformado por los docentes: Dr. Julio Antonio Lecca Vergara (Presidente), Dr. Luis Alberto Calderón Yarleque (Secretario) y Dra. Jeanette Baldramina González Castro (Vocal); con la finalidad de evaluar la tesis titulada: "**OPTIMIZACIÓN MULTIRESPUESTA EN ESTUDIOS DE PROPAGACIÓN IN VITRO DE LADENBERGIA OBLONGIFOLIA "ÁRBOL DE LA QUINA"**"; presentado por el tesista **Luigi Italo Villena Zapata**, egresado del programa de Doctorado en Estadística Matemática.

Sustentación autorizada mediante Resolución Directoral N° 597-2025-EPG-UNS de fecha 19 de junio de 2025.

El presidente del jurado autorizó el inicio del acto académico; producido y concluido el acto de sustentación de tesis, los miembros del jurado procedieron a la evaluación respectiva, haciendo una serie de preguntas y recomendaciones al tesista, quien dio respuestas a las interrogantes y observaciones.

El jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como Aprobado, asignándole la calificación de 20 (Vente).

Siendo las 12:45 horas del mismo día se da por finalizado el acto académico, firmando la presente acta en señal de conformidad.


Dr. Julio Antonio Lecca Vergara
Presidente


Dr. Luis Alberto Calderón Yarleque
Secretario


Dra. Jeanette Baldramina González Castro
Vocal/Asesor



Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Luigi Italo Villena Zapata
Título del ejercicio: Quick Submit
Título de la entrega: Optimización multirespuesta en estudios de propagación in vi...
Nombre del archivo: Informe_final_final_Villena_Zapata,_Luigi_TUR.docx
Tamaño del archivo: 21.59M
Total páginas: 168
Total de palabras: 30,420
Total de caracteres: 176,160
Fecha de entrega: 21-jun.-2025 08:51a. m. (UTC-0500)
Identificador de la entrega: 2703377513

RESUMEN

La *Ladenbergia oblongifolia*, conocida como "árbol de la quina", es una especie de interés medicinal en las comunidades andino-amazónicas del Perú debido a sus propiedades terapéuticas contra enfermedades como la malaria y la COVID-19; sin embargo, su explotación indiscriminada ha conducido a su vulnerabilidad, lo que ha generado la necesidad de estrategias de conservación mediante técnicas biotecnológicas. En este contexto, la presente investigación tuvo como objetivo optimizar la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* a través de la metodología de superficie de respuesta, evaluando la eficiencia de dos diseños experimentales: el Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR) y el Diseño Box-Behnken (DBB). Se desarrolló un estudio experimental en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional de Trujillo, empleando un diseño completamente aleatorizado con explantes uninodales cultivados con fotoperiodo a tres niveles (8/16, 12/12 y 16/8 horas luz/oscuridad), ácido giberélico en tres niveles (0,25; 0,50 y 0,75 ppm) y ácido indolacético en tres niveles (0,25; 0,50 y 0,75 ppm), para analizar su efecto en las variables respuestas: longitud del tallo, longitud de entrenudo, número de hojas y número de raíces. Los resultados indicaron que el DCCR presentó un mejor ajuste y precisión en la predicción de respuestas óptimas en comparación con el DBB, con una deseabilidad global de 0,988. El tratamiento óptimo se obtuvo con un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad, 0,75 ppm de ácido giberélico y 0,40 ppm de ácido indolacético, maximizando las variables respuestas evaluadas. Se concluye que la metodología de superficie de respuesta, específicamente el DCCR, es una estrategia efectiva para optimizar la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia*, proporcionando una base científica para su conservación y reforestación masiva.

Palabras clave: propagación *in vitro*, *Ladenbergia oblongifolia*, metodología de superficie de respuesta, optimización experimental, biotecnología vegetal.

Optimización multirespuesta en estudios de propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"

INFORME DE ORIGINALIDAD

| | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| 16% INDICE DE SIMILITUD | 15% FUENTES DE INTERNET | 7% PUBLICACIONES | 5% TRABAJOS DEL ESTUDIANTE |
|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|

FUENTES PRIMARIAS

| | | |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 1 | dokumen.pub Fuente de Internet | 1% |
| 2 | es.scribd.com Fuente de Internet | 1% |
| 3 | dspace.unitru.edu.pe Fuente de Internet | 1% |
| 4 | revistas.unitru.edu.pe Fuente de Internet | 1% |
| 5 | hdl.handle.net Fuente de Internet | 1% |
| 6 | qdoc.tips Fuente de Internet | <1% |
| 7 | 1library.co Fuente de Internet | <1% |
| 8 | www.coursehero.com Fuente de Internet | <1% |
| 9 | Submitted to Universidad Nacional de Trujillo Trabajo del estudiante | <1% |
| 10 | Submitted to De La Salle University - Manila Trabajo del estudiante | <1% |
| 11 | repositorio.espe.edu.ec:8080 Fuente de Internet | <1% |
| 12 | docplayer.es Fuente de Internet | <1% |

DEDICATORIA

A la memoria de mi madre Lili Zapata Sarmiento, quien se encuentra gozando del Reino de los Cielos, porque confió y entregó su corazón a nuestro amado Salvador, nuestro Señor Dios. Ella fue la mujer más hermosa y amorosa que he tenido en mi vida y a quien amaré todos los días de mi existencia, y abrazo la promesa de volver a estar juntos, alabando y glorificando a nuestro Señor por la eternidad.

AGRADECIMIENTO

Primeramente, a mi amado Señor Dios, por brindarme fortaleza y entendimiento para culminar mi meta académica; así también, a mi amada familia, por su amor y aliento constante en todo el proceso para alcanzar esta etapa tan importante en mi vida académica, y de manera especial, a mi asesora, Dra. González Castro, Jeanette Baldramina, por su invaluable paciencia y sabiduría en la dirección del presente trabajo de investigación, así también, al doctor Segundo Eloy López Medina extendiendo mi sincero agradecimiento quien me brindó invaluable orientación en el área de Biotecnología. Su dedicación, conocimientos especializados y consejos constantes fueron fundamentales para superar los desafíos técnicos para la elaboración de la presente tesis doctoral.

ÍNDICE

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| CONSTANCIA DEL ASESOR..... | ii |
| CONFORMIDAD DEL JURADO EVALUADOR..... | iii |
| DEDICATORIA..... | iv |
| AGRADECIMIENTO..... | iv |
| RESUMEN | v |
| ABSTRACT | vi |
| I. INTRODUCCIÓN | 7 |
| 1.1. Planteamiento y formulación del problema de investigación..... | 7 |
| 1.1.1. Planteamiento del problema de investigación | 7 |
| 1.1.1.1. Descripción de la situación actual de la especie <i>Ladenbergia oblongifolia</i> | 7 |
| 1.1.1.2. Limitaciones en la propagación natural y en las técnicas <i>in vitro</i> existentes | 10 |
| 1.1.1.3. Justificación de la necesidad del uso de Diseños Avanzados de Superficies de Respuesta para la propagación <i>in vitro</i> del “árbol de la quina” | 14 |
| 1.1.2. Formulación del problema de investigación | 15 |
| 1.2. Objetivos de la investigación..... | 16 |
| 1.2.1. Objetivo general | 16 |
| 1.2.2. Objetivos específicos:..... | 16 |
| 1.3. Formulación de la hipótesis..... | 17 |
| 1.4. Justificación e importancia de la investigación | 17 |
| II. MARCO TEÓRICO..... | 18 |
| 2.1. Antecedentes | 18 |
| 2.2. Marco conceptual | 22 |
| 2.2.1. Cultivo de Tejidos <i>in vitro</i> | 22 |
| III. METODOLOGÍA..... | 27 |
| 3.1. Método de la investigación: | 27 |
| 3.2. Diseño de investigación..... | 28 |
| 3.3. Operacionalización de variables de estudio | 33 |
| 3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos | 34 |
| 3.5. Procedimiento de recolección de datos..... | 34 |
| 3.6. Técnicas de procesamiento y análisis de los resultados | 40 |
| 3.7. Marco metodológico y análisis estadístico | 40 |
| 3.7.1. Diseño de Experimentos | 40 |
| 3.7.2. Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) | 41 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2.1. Diseños de Superficies de Respuesta..... | 49 |
| 3.7.2.1.1. Polinomio de Primer Orden | 50 |
| 3.2.2. Diseños para ajustar Superficies de Respuesta..... | 51 |
| 3.7.2.3. Diseños Para Ajustar Modelos de Primer Orden | 51 |
| 3.7.2.3.1. Diseños Factoriales 2^k | 51 |
| 3.7.2.3.2. Fracciones de la Serie 2^k | 52 |
| 3.7.2.3.3. Diseño Simplex | 53 |
| 3.7.2.4. Diseños para Modelos de Segundo Orden..... | 53 |
| 3.7.2.4.1. Diseño de Composición Central | 54 |
| 3.7.2.4.2. Diseño de Box-Behnken..... | 58 |
| 3.7.2.5. Verificación de los Supuestos del Modelo de Superficie de Respuesta .. | 59 |
| 3.7.2.5.1. Normalidad de los residuos | 59 |
| 3.7.2.5.1.1. Pruebas estadísticas para la verificación de la normalidad univariante de los residuos | 60 |
| 3.2.5.2. Homocedasticidad de los residuos | 65 |
| 3.7.2.5.2.1. Prueba estadística para la verificación de la homocedasticidad de los residuos..... | 65 |
| 3.7.2.5.3. Independencia de los residuos | 66 |
| 3.7.2.5.3.1. Prueba estadística para la verificación de la independencia de los residuos..... | 66 |
| 3.7.2.5.4. Diagnóstico de Multicolinealidad en el Modelo de Regresión..... | 67 |
| 3.7.2.6. Gráfica de Contornos de Superficie de Respuesta | 67 |
| 3.7.3. Técnica de optimización simultánea de multirespuesta con funciones de deseabilidad para diseños óptimos | 69 |
| 3.7.4. Criterios de Optimalidad en el Diseño Experimental | 71 |
| IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 74 |
| V.CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 111 |
| 5.1. Conclusiones..... | 111 |
| 5.2. Recomendaciones..... | 112 |
| VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS..... | 113 |
| VII. ANEXOS | 133 |

RESUMEN

La *Ladenbergia oblongifolia*, conocida como "árbol de la quina", es una especie de interés medicinal en las comunidades andino-amazónicas del Perú debido a sus propiedades terapéuticas contra enfermedades como la malaria y la COVID-19; sin embargo, su explotación indiscriminada ha conducido a su vulnerabilidad, lo que ha generado la necesidad de estrategias de conservación mediante técnicas biotecnológicas. En este contexto, la presente investigación tuvo como objetivo optimizar la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* a través de la metodología de superficie de respuesta, evaluando la eficiencia de dos diseños experimentales: el Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR) y el Diseño Box-Behnken (DBB). Se desarrolló un estudio experimental en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional de Trujillo, empleando un diseño completamente aleatorizado con explantes uninodales cultivados con fotoperíodo a tres niveles (8/16, 12/12 y 16/8 horas luz/oscuridad), ácido giberélico en tres niveles (0,25; 0,50 y 0,75 ppm) y ácido indolacético en tres niveles (0,25; 0,50 y 0,75 ppm), para analizar su efecto en las variables respuestas: longitud del tallo, longitud de entrenudo, número de hojas y número de raíces. Los resultados indicaron que el DCCR presentó un mejor ajuste y precisión en la predicción de respuestas óptimas en comparación con el DBB, con una deseabilidad global de 0.988. La evaluación comparativa mediante criterios de optimalidad confirmó la superioridad del DCCR, presentando valores superiores en D-optimalidad (89,508,278.448 vs 3,514,368.000), A-optimalidad (0.5490 vs 1.4346), G-optimalidad (0.5237 vs 0.6711) e I-optimalidad (0.3289 vs 0.4559) en comparación con el DBB. El tratamiento óptimo se obtuvo con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad, 0.75 ppm de ácido giberélico y 0.40 ppm de ácido indolacético, maximizando las variables respuestas evaluadas. Se concluye que la metodología de superficie de respuesta, específicamente el DCCR, es una estrategia efectiva para optimizar la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia*, proporcionando una base científica para su conservación y reforestación masiva.

Palabras clave: propagación *in vitro*, *Ladenbergia oblongifolia*, metodología de superficie de respuesta, optimización experimental, biotecnología vegetal.

ABSTRACT

Ladenbergia oblongifolia, known as the "cinchona tree," is a species of medicinal interest in the Andean-Amazonian communities of Peru due to its therapeutic properties against diseases such as malaria and COVID-19; however, its indiscriminate exploitation has led to its vulnerability, which has generated the need for conservation strategies through biotechnological techniques. In this context, the present research aimed to optimize the *in vitro* propagation of *Ladenbergia oblongifolia* through response surface methodology, evaluating the efficiency of two experimental designs: the Central Composite Rotatable Design (CCRD) and the Box-Behnken Design (BBD). An experimental study was developed at the Biotechnology Laboratory of the National University of Trujillo, employing a completely randomized design with uninodal explants cultivated under photoperiod at three levels (8/16, 12/12, and 16/8 hours light/darkness), gibberellic acid at three levels (0.25, 0.50, and 0.75 ppm), and indoleacetic acid at three levels (0.25, 0.50, and 0.75 ppm), to analyze their effect on the response variables: stem length, internode length, number of leaves, and number of roots. The results indicated that the CCRD presented better fit and precision in predicting optimal responses compared to the BBD, with a global desirability of 0.988. The comparative evaluation through optimality criteria confirmed the superiority of the CCRD, presenting superior values in D-optimality (89,508,278.448 vs 3,514,368.000), A-optimality (0.5490 vs 1.4346), G-optimality (0.5237 vs 0.6711), and I-optimality (0.3289 vs 0.4559) compared to the BBD. The optimal treatment was obtained with a photoperiod of 16/8 hours light/darkness, 0.75 ppm gibberellic acid, and 0.40 ppm indoleacetic acid, maximizing the evaluated response variables. It is concluded that response surface methodology, specifically the CCRD, is an effective strategy to optimize the *in vitro* propagation of *Ladenbergia oblongifolia*, providing a scientific basis for its conservation and massive reforestation.

Keywords: *in vitro* propagation, *Ladenbergia oblongifolia*, response surface methodology, experimental optimization, plant biotechnology.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Planteamiento y formulación del problema de investigación

1.1.1. Planteamiento del problema de investigación

1.1.1.1. Descripción de la situación actual de la especie *Ladenbergia oblongifolia*

Desde la aparición de la vida hace aproximadamente 3000 millones de años, la biota ha demostrado una sorprendente capacidad de adaptación a los múltiples cambios evolutivos. Dentro del reino vegetal, tanto las criptógamas como las espermatófitas han desarrollado mecanismos diversos para asegurar su perpetuación, entre ellos, la capacidad de regeneración de tejidos y órganos desde novo, lo cual ha sido documentado ampliamente (Birnbaum & Sánchez, 2008; Pulianmackal et al., 2014; Ikeuchi et al., 2016; Landge et al., 2018). Esta capacidad, conocida como totipotencialidad, ha sido observada desde los primeros estudios sobre el crecimiento de brotes en árboles como el olmo (Kareem et al., 2016), y reafirmada por trabajos pioneros de Nobécourt, Gautheret y White en 1939, quienes replicaron experimentalmente los postulados de Haberlandt sobre la capacidad regenerativa de las células vegetales (Pierik, 1990; Calva & Pérez, 2005).

En ese marco de comprensión biológica, cobra particular relevancia la especie *Ladenbergia oblongifolia* (Humb. ex Mutis) L. Andersson, conocida tradicionalmente como “árbol de la quina” (Figura 1). Esta especie pertenece a la familia Rubiaceae, y es reconocida por su amplia distribución en el Perú, especialmente en regiones como Aramango (Bagua), y por ser la más representativa dentro del género *Ladenbergia*. De las 35 especies reportadas de este género, 17 se encuentran en el Perú, de las cuales 8 son endémicas, con *Ladenbergia oblongifolia* destacando como la de mayor distribución geográfica (Cuvi, 2018).

Figura 1

Árbol de Ladenbergia oblongifolia , en Aramango, Bagua



La especie crece en ecosistemas de bosque montano y nublado, entre los 180 y 3,500 m.s.n.m., ambientes que comparten condiciones ecológicas propias de la selva alta o ceja de selva. Su presencia ha sido registrada en áreas de conservación como Huaricancha (Piura), Upaypiteq y Huacapampa (Ferreñafe), y en zonas de la Amazonía como Bagua (Huamán et al., 2019; Jiménez, 2019).

Ahora bien, es importante detallar que las Clasificaciones Filogenéticas, como los Sistemas de Clasificación de Engler , Cronquist y Taktajan, encabezados por muchos investigadores, siguen siendo muy importantes y valiosos dentro de la *Scientia ambilis*; sin embargo, actualmente reconociendo el valor de estudios más acuciosos y científicos, sobre todo refiriéndose a la genética y biología molecular, el Sistema Filogenético de las Angiospermas APG IV (Stevens, 2019); viene siendo hoy por hoy el más exacto, por lo que será empleado en la presente investigación, para la ubicación taxonómica de este importante recurso del Perú para el mundo:

REINO: PLANTAE Haeckel 1894

SUB-REINO: PHANEROGAMAE

DIVISIÓN: ANGIOSPERMAE/MAGNOLIOPHYTA

CLASE: EQUISETOPSIDA C. Agardh 1825

SUPERORDEN: ASTERANAE Takht. 1967

ORDEN: GENTIANALES Juss. ex Bercht. & J. Presl 1820.

FAMILIA: Rubiaceae Juss. 1789

Género: *Ladenbergia* Klotzsch 1846

Especie: *oblongifolia*

Nombre Científico: *Ladenbergia oblongifolia* (Humb.
ex Mutis) L. Andersson 1994

Nombres Comunes: “quina”, “árbol de la quina”

Desde el punto de vista cultural, la especie tiene una profunda conexión con el conocimiento tradicional de los pueblos andino-amazónicos, quienes la utilizan indistintamente junto con otras especies como *Cinchona* y *Remijia* bajo el nombre común de “quina” o “cascarilla”. Este uso tradicional no solo evidencia un reconocimiento ancestral de sus propiedades medicinales —como el tratamiento de la malaria, la neumonía, el COVID-19, catarros crónicos, trastornos gástricos y procesos autoinflamatorios— sino también una fuerte carga simbólica, dado que el “árbol de la quina” está representado en el escudo nacional del Perú como símbolo patrio (Ruiz, 2020).

No obstante, esta identificación generalizada con el nombre “quina” ha generado confusión taxonómica, lo que, sumado a la sobreexplotación histórica y la falta de estrategias de conservación, ha contribuido al deterioro de sus poblaciones naturales. Esta situación ha despertado la preocupación de diversos sectores académicos y gubernamentales, quienes abogan por estudios que integren tanto enfoques clásicos como moleculares, a fin de clarificar su estatus taxonómico y orientar planes de conservación y uso sostenible.

Finalmente, cabe señalar que el valor ecológico de *Ladenbergia oblongifolia* no radica únicamente en su distribución o en su valor medicinal y cultural, sino también

en su rol funcional dentro del ecosistema. Como especie arbórea de hasta 15 metros de altura, con hojas pecioladas, flores pequeñas en panículas y frutos en cápsula alada (Figura 2), contribuye activamente a la estructura vegetal de los bosques montanos, facilitando procesos de regeneración ecológica y ofreciendo hábitat a diversas especies de fauna asociada (Huamán et al., 2019); reportándose particularmente para Piura (Área de Conservación Privada Huaricancha), Ferreñafe (Upaypiteq, Palpíteq, Huacapampa) y Bagua (Jiménez, 2019).

Figura 2

Frutos de Ladenbergia oblongifolia “quina”, en Aramango, Bagua.



1.1.1.2. Limitaciones en la propagación natural y en las técnicas *in vitro* existentes

Fisiológicamente, es importante recalcar que si se quiere seguir la normal secuencia ontogénica de una planta; es necesario recalcar que ella inicia con la fecundación del óvulo, y la consiguiente formación del cigoto, que desde ya es totipotente, es decir, presenta todas las características idóneas para seguir la secuencia de crecimiento y desarrollo hasta constituirse en un organismo vegetal completo; pasando por una etapa de crecimiento post embrionario que traería consigo la regeneración histológica del vegetal y a partir de allí continuar con la diferenciación en su etapa adulta. (Sugimoto et al., 2011; Kumar & Van Staden, 2017).

La propagación natural de *Ladenbergia oblongifolia* “árbol de la quina”, enfrenta diversas limitaciones relacionadas con su biología reproductiva, la degradación de su hábitat y la baja tasa de germinación de sus semillas en condiciones silvestres. Estos factores, sumados a la deforestación acelerada, han reducido drásticamente su capacidad de regeneración en ecosistemas intervenidos, comprometiendo su permanencia en el tiempo.

En respuesta a estas dificultades, se han implementado diversas estrategias de propagación vegetativa tradicionales como esquejes, injertos, rizomas, acodos o bulbos, que si bien han sido útiles en muchas especies, no han demostrado eficacia suficiente en especies silvestres con características biológicas particulares como *Ladenbergia oblongifolia*. Por ello, las técnicas de propagación *in vitro* surgen como una alternativa relevante, ya que permiten inducir la regeneración desde células o tejidos específicos en condiciones controladas. No obstante, su aplicación exitosa depende de factores múltiples, entre ellos el tipo de explante, el medio de cultivo, el balance hormonal, el fotoperíodo y las condiciones ambientales del laboratorio (Calva & Pérez, 2005; Ikeuchi et al., 2016).

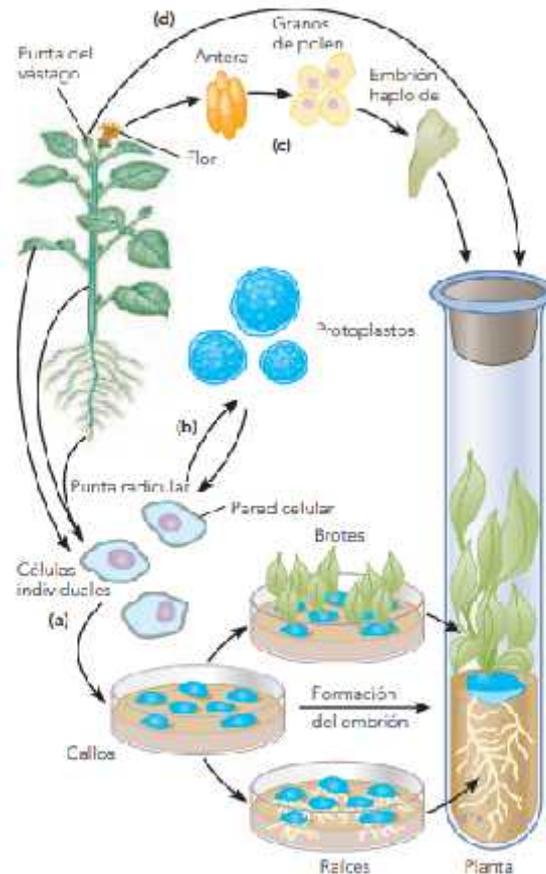
A pesar de los avances científicos que confirman la totipotencialidad celular en vegetales (Lorenzano, 2007; Sugimoto et al., 2011), desde los experimentos realizados por Haberlandt y más tarde validados por Nobécourt, Gautheret y White en 1939 (Pierik, 1990), su aplicación a especies no domesticadas sigue siendo compleja. En el caso de *Ladenbergia oblongifolia*, aún no existen protocolos estandarizados que garanticen tasas eficientes de regeneración, por lo que las investigaciones sobre medios de cultivo específicos y condiciones hormonales adecuadas siguen siendo escasas y fragmentarias.

El cultivo de tejidos *in vitro* permite obtener plantas genéticamente estables, libres de virus, bacterias y hongos, a partir de explantes desinfectados, sembrados bajo condiciones de esterilidad (Figura 3). La metodología parte desde la obtención de segmentos de plantas madre, su desinfección con alcohol e hipoclorito, y la siembra en medios de cultivo enriquecidos con sales minerales y fitohormonas (Araque et al., 2018; Gil, 2021). Entre las hormonas más utilizadas destacan las auxinas (ácido indolacético, ácido naftalenacético), giberelinas (ácido giberélico), citoquininas (bencilaminopurina), el ácido abscísico y el etileno, las cuales tienen funciones

diferenciadas y su efecto varía dependiendo de su concentración y sinergismo (Hartmann & Kester, 1994; Gonza et al., 2020).

Figura 3

Esquema de cultivo de tejidos vegetales. Fuente: Murray (2006)

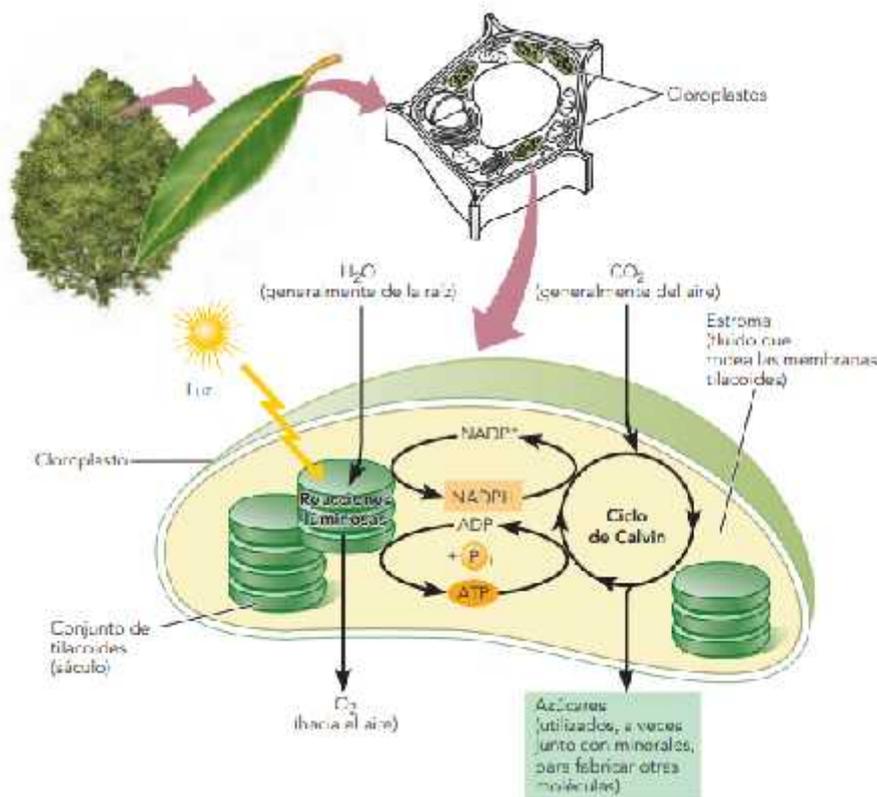


Otro factor limitante crucial es el fotoperíodo, definido como la duración del período de exposición a la luz dentro de un ciclo de 24 horas. Este elemento regula procesos fisiológicos esenciales como la morfogénesis, el crecimiento, la floración y el enraizamiento de las plántulas. La manipulación adecuada del fotoperíodo en condiciones *in vitro* puede promover o inhibir respuestas hormonales y cambios estructurales importantes durante el desarrollo vegetal (Sánchez-Olate et al., 2003; Jiménez-Ruiz et al., 2023). En especies como *Ladenbergia oblongifolia*, cuya respuesta fisiológica en condiciones de laboratorio aún no ha sido completamente caracterizada, este parámetro debe ser cuidadosamente evaluado.

Ahora bien, es importante recalcar que el proceso de fotosíntesis (Figura 4) implica la captación de luz por parte de las plantas, el cual en combinación de dióxido de carbono y agua es capaz de generar glucosa y oxígeno. Esta condición se ampara en la primera ley de la termodinámica que dice: la energía no se puede crear ni destruir solo transforma, ya que a las vitroplantas se les provee de todas las condiciones básicas y elementales que permita fotosintetizar. Por otro lado, las condiciones ambientales como la temperatura y luz son simuladas en laboratorio en los experimentos biotecnológicos al proveer de condiciones ambientales controladas al regular el fotoperíodo de horas luz y oscuridad y al regular la temperatura con aire acondicionado en verano y el empleo de calefactores en invierno. Estas condiciones se amparan en la segunda ley que sostiene: que la transferencia de calor fluye de un cuerpo caliente hacia un cuerpo frío (Segui,2013; Eras et al., 2019).

Figura 4

Esquema general del proceso de fotosíntesis. Fuente: Murray (2006)



Pese a que en otras especies vegetales se han obtenido resultados exitosos, la falta de protocolos ajustados a las necesidades específicas de *Ladenbergia*

oblongifolia constituye una limitación significativa. La carencia de estudios integrales que combinen condiciones físico-químicas (luz, temperatura, humedad), fitohormonas y tiempos de exposición adecuados impide actualmente su producción masiva con fines de reforestación, conservación y aprovechamiento sostenible (Camayd et al., 2010; Coles et al., 2010; Mayelí, 2017; Alcántara-Cortés et al., 2019; Yepes, & Buckeridge, 2011).

1.1.1.3. Justificación de la necesidad del uso de Diseños Avanzados de Superficies de Respuesta para la propagación *in vitro* del “árbol de la quina”

La propagación *in vitro* de especies nativas como *Ladenbergia oblongifolia*, de alto valor ecológico y cultural, requiere protocolos eficientes que garanticen la regeneración vegetal en condiciones controladas. Esta necesidad se ve acentuada por la complejidad fisiológica de la especie y la interacción de múltiples factores como el fotoperíodo, los reguladores de crecimiento y el tipo de explante (Lee et al., 2024). Ante este escenario, los Diseños Avanzados de Superficies de Respuesta (DSR) constituyen herramientas metodológicas fundamentales, ya que permiten analizar y optimizar simultáneamente variables de respuesta, superando el enfoque tradicional de prueba y error (Imek et al., 2024).

El uso de modelos como el Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) y el Diseño Box-Behnken (DBB) ha demostrado eficacia en la obtención de combinaciones óptimas de variables en cultivos *in vitro*. Estos modelos estadísticos permiten representar las relaciones no lineales entre factores, generar ecuaciones predictivas y aplicar funciones de deseabilidad multirespuesta (Cocirlea et al., 2024). Estudios recientes destacan cómo su implementación mejora significativamente la eficiencia en la producción de plántulas, especialmente en especies poco domesticadas o con escasa información previa (Al-Qudah et al., 2023).

Aplicar esta metodología a *Ladenbergia oblongifolia* no solo incrementará el éxito en su propagación, sino que permitirá generar un protocolo replicable con fines de conservación, reforestación y valorización cultural. Dado que esta especie representa un símbolo patrio y forma parte del conocimiento medicinal ancestral, el desarrollo de un modelo biotecnológico robusto permitirá integrar la ciencia

moderna con la recuperación ecológica del patrimonio natural del Perú (Benítez, 2005; Camayd et al., 2010).

1.1.2. Formulación del problema de investigación

En la presente investigación se pretende dar como respuesta a las siguientes interrogantes:

Problema General:

¿Cuál es la combinación de niveles de fotoperíodo, ácido giberélico y ácido indolacético que propicia la optimización multirespuesta en propagación *in vitro* de longitud del tallo, longitud de entrenudo, número de hojas y número de raíces de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"?

Problemas Específicos:

¿Cuál es la combinación de niveles de fotoperíodo, ácido giberélico y ácido indolacético que propicia la optimización multirespuesta en propagación *in vitro* de longitud del tallo, longitud de entrenudo, número de hojas y número de raíces de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina", utilizando el Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR)?

¿Cuál es la combinación de niveles de fotoperíodo, ácido giberélico y ácido indolacético que propicia la optimización multirespuesta en propagación *in vitro* de longitud del tallo, longitud de entrenudo, número de hojas y número de raíces de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina", utilizando el Diseño Box-Behnken (DBB)?

¿Cuál de los dos diseños experimentales, el Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR) o el Diseño Box-Behnken (DBB), resulta más eficiente para determinar la combinación óptima de niveles de fotoperíodo, ácido giberélico y ácido indolacético según la función de deseabilidad global ponderada?

¿Cuál de los dos diseños experimentales, el Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR) o el Diseño Box-Behnken (DBB), resulta más eficiente para determinar la combinación óptima de niveles de fotoperíodo, ácido giberélico y ácido indolacético según los criterios de optimalidad?

1.2. Objetivos de la investigación

1.2.1. Objetivo general

Determinar la combinación de niveles de fotoperíodo, ácido giberélico y ácido indolacético que propicia la optimización multirespuesta en propagación *in vitro* de longitud del tallo, longitud de entrenudo, número de hojas y número de raíces de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina".

1.2.2. Objetivos específicos:

Determinar la combinación de niveles de fotoperíodo, ácido giberélico y ácido indolacético que propicia la optimización multirespuesta en propagación *in vitro* longitud del tallo, longitud de entrenudo, número de hojas y número de raíces de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina", utilizando el Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR).

Determinar la combinación de niveles de fotoperíodo, ácido giberélico y ácido indolacético que propicia la optimización multirespuesta en propagación *in vitro* longitud del tallo, longitud de entrenudo, número de hojas y número de raíces de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina", utilizando el Diseño Box Behnken (DBB).

Comparar la eficiencia del diseño Compuesto Central Rotable (DCCR) y el Diseño Box-Behnken (DBB) a través de la función de deseabilidad global ponderada, para determinar la combinación de los niveles de fotoperíodo, ácido giberélico y ácido indolacético que propicia la optimización multirespuesta en propagación *in vitro* de longitud del tallo, longitud de entrenudo, número de hojas y número de raíces de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina".

Comparar la eficiencia del diseño Compuesto Central Rotable (DCCR) y el Diseño Box-Behnken (DBB) a través de los criterios de optimalidad, para determinar la combinación de los niveles de fotoperíodo, ácido giberélico y ácido indolacético que propicia la optimización multirespuesta en propagación *in vitro* de longitud del tallo,

longitud de entrenudo, número de hojas y número de raíces de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina".

1.3. Formulación de la hipótesis

La combinación de un fotoperíodo de 12/12 horas luz/oscuridad, 0.50 ppm de ácido giberélico y 0.50 ppm de ácido indolacético mejora significativamente la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina", en términos de longitud del tallo, entrenudo, número de hojas y raíces.

1.4. Justificación e importancia de la investigación

La presente investigación tiene como **contribución teórica** la generación de nuevo conocimiento sobre el acondicionamiento *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* ("árbol de la quina"), una especie de alto valor ecológico, cultural y simbólico en el Perú. Esta propagación se realiza en condiciones controladas, asépticas, utilizando un fotoperíodo regulado y un medio de cultivo enriquecido que propicia el crecimiento y desarrollo de plántulas, permitiendo su estudio y multiplicación en ambientes artificiales. Estudios recientes destacan que la optimización de estos factores es clave para la micropropagación de especies leñosas amenazadas (Delgado et al., 2021; Gaidamashvili & Benelli, 2021; Hu et al., 2024).

La **contribución práctica** se orienta al desarrollo de un protocolo biotecnológico optimizado, basado en la combinación adecuada de fotoperíodo y balance hormonal (ácido giberélico y ácido indolacético), que no solo permitirá su aplicación en proyectos de reforestación y conservación *in situ* y *ex situ*, sino que además abre la posibilidad de su incorporación en biotecnología farmacéutica. *Ladenbergia oblongifolia*, al igual que otras especies del género *Ladenbergia* y de la familia *Rubiaceae*, ha sido reportada como fuente potencial de alcaloides y metabolitos secundarios con propiedades medicinales, incluyendo compuestos con actividad antipirética, antiinflamatoria y antipalúdica (Martins & Nunez, 2015; Anubhav & Yatendra, 2021; Chandrika & Karunarathna, 2022; Parveen et al., 2024). Investigaciones recientes confirman que la manipulación hormonal *in vitro* puede incrementar la producción de metabolitos bioactivos en plantas medicinales (Fazili et al., 2022; Mahmoudieh et al., 2024).

En cuanto a la **contribución metodológica**, esta investigación representa un aporte novedoso para la comunidad científica y para la especie en estudio, al aplicar herramientas de optimización multirespuesta mediante superficie de respuesta, utilizando dos diseños experimentales (Diseño Compuesto Central Rotable - DCCR y Diseño Box-Behnken - DBB). Esta estrategia permite maximizar simultáneamente múltiples variables respuesta, como la longitud del tallo, longitud de entrenudo, número de hojas y número de raíces, utilizando criterios de deseabilidad global y optimalidad estadística. Este enfoque ha sido validado recientemente en la optimización de protocolos de cultivo para especies con desafíos reproductivos (Jafari et al., 2022; Cocirlea et al., 2024).

La importancia de esta investigación radica, además, en el impulso a una cultura de revaloración de *Ladenbergia oblongifolia*, como especie emblemática nacional, reconocida incluso en el Escudo Nacional del Perú. Su recuperación es urgente ante la pérdida de hábitat por deforestación y el escaso conocimiento de sus posibilidades reproductivas. Este protocolo contribuirá a programas de conservación, restauración ecológica y aprovechamiento sostenible, lo que cobra especial relevancia en un contexto de cambio climático y pérdida acelerada de biodiversidad, tal como lo advierten informes globales recientes (IPBES, 2022; Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, s.f.).

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Según Brako & Zarucchi (1993), y *The Plant List* (s.f.), *Ladenbergia oblongifolia* es una especie enmarcada dentro del género *Ladenbergia*, uno de los 13673 géneros que engloba la familia Rubiaceae, comprende 35 especies a nivel mundial. De ellas 17, se encuentran habitando en territorio peruano, de las cuales 8 son endémicas, siendo *Ladenbergia oblongifolia* “quina” la de mayor distribución y cultivo.

De hábito arbóreo, que crece hasta los 20 m de altura; con hojas opuestas, oblongo-ovadas, glabras, de estípulas libres, o parcialmente soldadas. Flores perfectas, blancas, olorosas, reunidas en inflorescencias pedunculadas tipo tirso umbeliformes terminales. Androceo constituido por estambres subsésiles. Gineceo constituido por un ovario 2-locular, con cavidades pluriovuladas. Fruto tipo cápsula

leñosa o coriácea, con semillas aladas (Brako & Zarucchi, 1993; Andersson, 1997; Gallego & Diaz, 2008; Cuvi, 2018; Remuzgo *et al.*, 2020).

Mostacero *et al.* (2009) y Mostacero (2013) señalan que la "quina" ha sido históricamente considerada una especie de importancia medicinal mágico-religiosa, rodeada de numerosas historias sobre su descubrimiento, uso y difusión internacional, como la narración amazónica peruana donde árboles de *Ladenbergia oblongifolia* caídos en fuentes de agua crearon una infusión amarga que, al ser consumida por nativos febriles, propició su recuperación, o aquella donde los nativos observaron cómo el gato montés masticaba la corteza para recuperar su vitalidad, generalizándose así su consumo entre la población nativa; evidencia de su relevancia histórica es el registro de Ricardo Palma en "Tradiciones Peruanas", donde relata cómo en la época del virreinato, la esposa del Virrey enferma de paludismo fue salvada por un macerado de quina proporcionado por nativos, experiencia que llevó a la condesa a introducir la corteza de esta planta a Europa en 1632, donde rápidamente se popularizó bajo el nombre de "polvo de la condesa". Por otro lado, ante la llegada del libertador Simón Bolívar, quien buscaba símbolos que permitan caracterizar e identificar al Perú en su bandera, en el año 1825, decidió que el árbol de quina sea incluido en el escudo nacional, por ser una especie que revolucionó la botánica farmacéutica, salvando muchas vidas a lo largo de la historia de la humanidad.

Albán *et al.* (2020) y Alfaro (2019) afirman que lo cierto es que el conocimiento ancestral de su acción medicinal, ha ocasionado que la población haya traído consigo la extinción de las especies, reduciéndolos a pequeños relictos, debido a la tala indiscriminada por parte de la población, quienes para extraer sus propiedades medicinales trozan la corteza y la maceran en agua ardiente.

López *et al.* (2020) y Remuzgo *et al.* (2020) sostienen que por ello y ante la sobreexplotación que se viene dando día a día hacia este recurso medicinal promisorio, la biotecnología y más específicamente el cultivo de tejidos *in vitro*, a través de sus múltiples técnicas, se constituye en la mejor alternativa para la conservación y el aprovechamiento sostenible de esta especie, y a partir de allí fomentar el crecimiento y desarrollo de aquellas comunidades Andino-amazónicas que las cultivan, en particular y del Perú y el mundo en general.

Huamán et al (2019), en su publicación Aspectos taxonómicos y avances en el conocimiento del estado actual del árbol de la quina (*Cinchona officinalis* L.) en el norte de Perú, sostienen que *Ladenbergia oblongifolia*, se registra en los bosques montanos, reducidos hoy en día, en pequeños relictos; y donde los integrantes de las comunidades andino-amazónicas, son los únicos encargados de velar por este recurso promisorio y a partir de allí, conservar ese legado ancestral sobre el correcto y eficaz uso de esta planta medicinal en la cura de sus enfermedades como la malaria, neumonía e incluso la COVID-19, además de su empleo en el tratamiento de múltiples inflamaciones e infecciones.

Según Alfaro & Paz (2020), en la publicación Hidroxicloroquina: Del fármaco de herencia Inca a la medicina basada en evidencias, sostienen que la acción medicinal, se debe al contenido de metabolitos secundarios como: hidroxycloroquina, cinconidina, cinconina y quinidina, presentes en hojas y corteza de esta especie; hecho que ha contribuido notoriamente el desarrollo de la medicina moderna, pero que lamentablemente ha traído un sin número de acciones antrópicas negativas como la tala indiscriminada, que viene poniendo en riesgo a las últimas poblaciones naturales de esta especie y que de no ser controladas a través de la investigación y/o programas de rescate y conservación podrían generar, la extinción de esta especie y con ello la pérdida de ese saber ancestral heredado por nuestros antepasados (Eras et al., 2019; Ruiz, 2020).

Ejemplo de ello, son las investigaciones de Armijos y Pérez (2016), en su publicación denominada *in vitro* germination and shoot proliferation of the threatened species *Cinchona officinalis* L (Rubiaceae), afirman que 3mg L⁻¹ de ácido indol-3-butírico (IBA) y 5 mg L⁻¹ de 6-bencil-aminopurina inducen la formación de callos y brotes. Mientras que Eras et al (2019), en la publicación balance hormonal para la fase de brotación y enraizamiento *in vitro* de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja, sostienen que un mayor enraizamiento de plántulas se logra empleando 2.0 mg L⁻¹ IBA.

Por otro lado, Moreno et al (2019), en la publicación Effect of culture medium on morphogenic processes *in vitro* in *Cinchona officinalis* L., sostienen que el empleo de 0,5 mg L⁻¹ ANA + 2,5 mg L⁻¹ BAP, ejercen un efecto sinérgico al promover una

mayor proliferación y desarrollo de brotes en *Cinchona officinalis*; razón por la cual se requiere un mayor conocimiento en el área, que permita generar investigaciones tendientes a solucionar la problemática de adaptabilidad que presenta la especie *Ladenbergia oblongifolia* en la fase de propagación *in vitro*.

En ese sentido, La selección de los niveles experimentales para los factores fotoperíodo, ácido giberélico (AG₃) y ácido indolacético (AIA) se sustenta en antecedentes empíricos y criterios ecofisiológicos relacionados con especies del mismo género o familia. En primer lugar, se consideró el **fotoperíodo**, ya que es un regulador clave del crecimiento, desarrollo y diferenciación celular en plantas cultivadas *in vitro*. En especies Rubiaceae adaptadas a ambientes tropicales como *Cinchona micrantha*, se ha observado que la formación de estructuras reproductivas responde a variaciones del fotoperíodo, especialmente en zonas de bosque húmedo tropical donde predominan exposiciones lumínicas de 12 horas (Fernández & Huaccha, 2022). Por tanto, se establecieron tres niveles: 8, 12 y 16 horas de luz diaria, que abarcan condiciones de luz reducida, intermedia (equilibrada, propia de zonas tropicales) y prolongada, respectivamente, para identificar el régimen más favorable en la elongación del tallo, emisión foliar y rizogénesis de *Ladenbergia oblongifolia*.

Respecto al **ácido giberélico (AG₃)**, esta fitohormona ha demostrado promover significativamente la elongación celular y la germinación de semillas en múltiples especies leñosas tropicales. En *Cinchona officinalis*, otra rubiácea andino-amazónica, Ramos (2023) reportó que concentraciones cercanas a 1.0 ppm de AG₃ favorecieron la germinación y el vigor inicial. Sin embargo, en estudios de propagación *in vitro*, concentraciones excesivas de AG₃ pueden inducir un crecimiento desordenado o vitrificación (George et al., 2008), razón por la cual se seleccionaron niveles intermedios de 0.25, 0.50 y 0.75 ppm, para evaluar su efecto sin comprometer la calidad morfogénica de las plántulas.

En cuanto al **ácido indolacético (AIA)**, su rol principal en la organogénesis *in vitro* está asociado al desarrollo de raíces y, en ciertas condiciones, al estímulo de brotación adventicia. En investigaciones con *C. officinalis*, Ramos (2023) evidenció tasas de supervivencia del 100% con aplicaciones de AIA a 0.4 ppm. Considerando la sensibilidad de *Ladenbergia oblongifolia* como especie forestal nativa no

domesticada, se optó por concentraciones próximas y seguras (0.25, 0.50 y 0.75 ppm), que permiten observar un rango de respuestas sin inducir efectos fitotóxicos ni inhibitorios, en línea con lo sugerido por Adem et al. (2024) y Haque et al. (2022). En conjunto, estos niveles permiten explorar la interacción entre condiciones lumínicas y equilibrio hormonal en la optimización multirrespuesta de la propagación *in vitro*, respetando el principio de precaución en especies de difícil manejo *in vitro* y con alto valor ecológico como el “árbol de la quina”.

2.2. Marco conceptual

2.2.1. Cultivo de Tejidos *in vitro*

Dentro de la biotecnología, el cultivo de tejidos *in vitro*, constituye ser una técnica innovadora para la obtención de vitroplantas con un mejor estado fitosanitario, sobretodo de aquellas especies que tienen importancia económica, ecológica o social; permitiendo la obtención de múltiples clones en un menor tiempo y mayor estabilidad genética (Araque et al., 2018). Por otro lado en el caso de especies medicinales como la quina, es necesario investigar sobre los metabolitos secundarios, entre los identificados y caracterizados son la : quinina, quinidina, cinchonina y cinconidina; análogos a la hidroxiclороquina, fármaco usado en el tratamiento de enfermedades inmunológicas y virales, del cual se ha demostrado que inhibe la entrada del virus SARS-CoV-2 (Liu et al., 2020; Yao et al., 2020); no sólo a nivel de corteza; sino también en las hojas, a fin de al usarlas, se pueda emplear el recurso sin ponerlo en riesgo de sobreexplotación y extinción; porque el uso de la corteza obliga a destruir la planta a diferencia de las hojas (López et al, 2020).

De lo enunciado, también resulta la necesidad de emplear el cultivo *in vitro* de tejidos celulares como alternativa de producción masiva de plantones de la especie más indicada por su contenido en metabolitos secundarios de interés medicinal. En este sentido, resulta clave el uso del medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) suplementado con auxinas y citocininas en pequeñas concentraciones (Curtis et al., 2008; Vásquez y Vásquez, 2016); puesto que las investigaciones han demostrado que el empleo de 0.0 mg L⁻¹ AIA + 2.5 mg L⁻¹ BAP induce a un mayor porcentaje de brotación y al emplear 2.0 mg L⁻¹ AIB + 0.0 mg L⁻¹ BAP se induce a

un mayor porcentaje de enraizamiento (Eras et al., 2019). Por otro lado, Lima et al. (2018), sostiene que una máxima multiplicación *in vitro* se obtiene al emplear 0.2 ANA + 2.0 BAP. Mientras que Armijos y Pérez (2016), sostiene que una mayor tasa de proliferación de brotes, formación de callos y yemas adventicias se obtienen al emplear el medio de cultivo MS suplementado con 5.0 mg L⁻¹ 6-bencil-aminopurina y 3.0 mg L⁻¹ ácido indol-3-butírico (Vásquez et al., 2018; Rodríguez et al., 2020).

De lo mencionado, se desprende que es importante detallar los siguientes conceptos:

Ácido giberélico, se define como una fitohormona del tipo giberelina que estimula el alargamiento celular (López et al., 2018).

Ácido indolacético, es una fitohormona que promueve la elongación y división celular que propicia el crecimiento y desarrollo de una planta (López et al., 2018).

Análisis multivariado, son técnicas estadísticas que posibilitan el análisis paralelo de múltiples características de interés (López & Medina, 2018).

Explante, cualquier parte del vegetal separado de la planta madre (raíz, tallo, hoja, meristemas apicales, nudos, entrenudos, granos de polen, etc), que es empleado en el cultivo *in vitro* (Roca & Mroginski, 1991).

Embriogénesis somática, se refiere a la obtención de embriones completos y perfectamente capacitados para germinar y forman un individuo completo, a partir de células somáticas; es decir que no son el producto de la fusión de gametos (Von Arnold et al., 2002; Segui, 2013).

Fitohormonas, se denominan así a las sustancias producidas por las plantas, capaces de estimular, regulan y/o inhibir los procesos esenciales dentro del desarrollo normal de las plantas en respuesta a estímulos ambientales como luz, temperatura y humedad; pudiendo ser: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, poliaminas, brasinoesteroides, ácido jasmónico y el ácido salicílico (Doerner, 2000, Crozier et al., 2000).

Fotoperíodo, se define como la regulación de los procesos biológicos en base a las horas luz y oscuridad que indican sobre una planta (López et al., 2018).

Metabolitos secundarios, son aquellas moléculas (alrededor de 1200) producidas por las plantas, y que no participan directamente en los procesos metabólicos primarios como: la fotosíntesis, respiración, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos; pero que son de vital importancia para el hombre en la industria y farmacia, como es el caso de los fenoles, terpenoides y alcaloides, sobre todo. Cabe destacar que en las plantas desempeñan una serie de funciones importantes para el vegetal, relacionadas al hecho de proporcionar sostén estructural y proteger a muchos vegetales de sus depredadores naturales como es el caso de herbívoros, así como de algunas plagas y enfermedades (Ávalos, 2009; Lincoln et al., 2006; Segui, 2013; Sepúlveda et al., 2018).

Micropropagación, es la reproducción masiva *in vitro* (Roca & Mroginski, 1991).

Organogénesis, proceso caracterizado por el hecho que a partir de un explante y mediante la diferenciación del mismo, se formen órganos (raíces o brotes adventicios y tallos) (Roca & Mroginski, 1991; Segui, 2013).

Organogénesis directa, este proceso se lleva a cabo cuando a partir del explante, se forma directamente los órganos (raíces o brotes adventicios y tallos) sin formación de callo (Roca & Mroginski, 1991; Cob et al., 2010; Segui, 2013).

Organogénesis indirecta, este proceso se lleva a cabo cuando a partir del explante, se forma una masa indiferencia de células llamada callo, para luego producir los órganos (raíces o brotes adventicios y tallos), según sea el tipo y niveles de hormona que se emplee (auxinas y citoquininas, sobre todo) (Gordon et al., 2007; Atta et al., 2009; Sugimoto et al., 2011; Ikeuchi et al., 2013). En ese sentido, durante este proceso el explante es pre incubado en un medio especial inductor de callo, y posteriormente transferido a un medio inductor de brote rico en fitohormonas o fitorreguladores que permitan la formación de brotes (Che et al., 2007).

Una plántula madre, es aquella planta cultivada bajo condiciones controladas con el objetivo de servir como fuente de material vegetal para la propagación clonal (Martínez, 1994).

Propagación *in vitro*, es la reproducción asexual de plantas dentro de recipientes de vidrio, bajo condiciones controladas. Considerándose como variable

dependiente la propagación *in vitro* y como indicadores de medición son: la longitud, número de entrenudos, número de hojas, número de raíces, peso fresco y peso seco. *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina", es un recurso forestal, medicinal e histórico del Perú. Por tanto, el desarrollar experimentos como su propagación *in vitro*, permitiría obtener un protocolo que facilitaría la obtención masiva de plántulas. Las cuales podrían continuar los procesos biotecnológicos como la callogénesis o embriogénesis y obtener metabolitos secundarios, o directamente obtener una población de plátonos, los cuales prontamente facilitarían el reforestar aquellas áreas degradadas, a consecuencia de la tala indiscriminada (López et al., 2018; López, 2019).

Diseños Experimentales, son una metodología de investigación que permite manipular variables y observar sus efectos en un experimento controlado. Esta metodología se basa en la planificación y el control de una secuencia de eventos con el fin de obtener información sobre la relación entre variables (Montgomery, 2010).

Superficie de respuesta, es un modelo matemático tridimensional que ilustra la relación entre las variables independientes y la respuesta en un experimento, permitiendo visualizar cómo varía la respuesta al modificar las variables independientes, lo que facilita la identificación de condiciones ideales para optimizar la respuesta deseada (Kirk, 2008).

Diseños Factoriales 2^k , son una herramienta importante en la investigación experimental, ya que permiten evaluar la interacción entre dos factores y su efecto en la variable dependiente. Además, este tipo de diseño permite reducir el número de experimentos necesarios para evaluar los efectos de los factores independientes, lo que ahorra tiempo y recursos (Cohen et al., 2017).

Diseños Fraccionarios 2^k , son utilizados en investigaciones con más variables que experimentos posibles, permitiendo reducir la cantidad de pruebas necesarias para estudiar múltiples factores, lo que los hace eficientes y económicos. En estos diseños, se evalúa un subconjunto de combinaciones de niveles de factores en lugar de aplicar todos los tratamientos en cada repetición del experimento (Montgomery, 2017).

Diseño simplex, es una metodología de optimización multivariable que se emplea para hallar el punto óptimo de una función objetivo sujeta a restricciones. Se trata de una técnica de diseño experimental que se aplica en la investigación industrial y en la ingeniería para mejorar los procesos y los productos (Box et al.2005).

Diseño Box Behnken, es un método de diseño experimental que se utiliza para explorar el efecto de múltiples variables independientes en una respuesta continua, minimizando la cantidad de experimentos necesarios. Este diseño se caracteriza por utilizar un conjunto de puntos que forman un cuboide en el espacio de diseño, con puntos en los vértices, centros de las caras y puntos intermedios. Esta metodología permite ajustar un modelo matemático de segundo orden para predecir la respuesta en función de las variables independientes evaluadas (Montgomery, 2017).

Diseño compuesto central, se refiere a la combinación de dos o más diseños de investigación en un solo estudio, con el objetivo de mejorar la precisión y la validez de las conclusiones obtenidas. Este enfoque permite integrar diferentes métodos y perspectivas, lo que puede resultar en una comprensión más completa y rigurosa del fenómeno investigado (Krantz, 2017).

Rotabilidad, es una propiedad de los diseños experimentales en la metodología de superficie de respuesta que mantiene una varianza uniforme en las predicciones para puntos equidistantes del centro del diseño. Esta característica garantiza que la precisión de las predicciones sea independiente de la orientación del diseño en el espacio experimental (Figueroa, 2020).

Factor de inflación de la varianza (VIF), mide cuánto se infla la varianza de un coeficiente de regresión debido a la multicolinealidad entre las variables independientes, proporcionando una herramienta clave para identificar predictores redundantes en un modelo (Fhernández, 2020).

Contornos de Superficies de Respuesta, son una representación gráfica de la relación entre las variables de entrada y la respuesta en un experimento de diseño. Estos contornos permiten visualizar cómo cambia la respuesta al variar las variables de entrada y ayudan a identificar las combinaciones óptimas de variables para maximizar o minimizar la respuesta deseada (Montgomery, 2017).

Función de deseabilidad, en el diseño de experimentos se refiere a una medida que combina múltiples respuestas o variables de interés en un solo valor, lo que permite evaluar la calidad general de un producto o proceso. Esta función proporciona una forma de ponderar y combinar diferentes criterios para determinar la "deseabilidad" global de un diseño experimental. En el contexto del diseño de experimentos, la función de deseabilidad es fundamental para optimizar y seleccionar las condiciones óptimas que maximicen la calidad o eficiencia del proceso estudiado (Montgomery, 2020).

Criterios de optimalidad, en el diseño de experimentos son métodos para seleccionar diseños que mejoran la precisión de las estimaciones y predicciones. El criterio D-óptimo maximiza el determinante de la matriz de información para reducir la incertidumbre en los estimadores; el A-óptimo minimiza su varianza media; el G-óptimo disminuye la varianza máxima de la predicción en la región de diseño, y el I-óptimo minimiza la varianza promedio de la predicción en puntos específicos (Torres Roda, 2022).

III. METODOLOGÍA

3.1. Método de la investigación:

El presente estudio adoptó un enfoque cuantitativo, aplicando el método hipotético-deductivo como marco lógico para la formulación y contrastación de hipótesis relacionadas con la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia*. Como argumentan Barroga et al. (2023), la investigación cuantitativa se fundamenta en la aplicación sistemática de enfoques deductivos que permiten formular hipótesis específicas derivadas de marcos teóricos previos, las cuales deben ser sometidas a verificación experimental rigurosa mediante el análisis estadístico de datos numéricos para generar conclusiones objetivas y generalizables. En concordancia con este enfoque, se plantearon hipótesis específicas sobre la influencia del fotoperíodo, el ácido giberélico y el ácido indolacético en las variables fisiológicas de interés: longitud del tallo, longitud de entrenudos, número de hojas y número de raíces. Estas hipótesis fueron evaluadas mediante experimentación controlada, utilizando dos diseños de superficie de respuesta: el Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR) y el Diseño Box-Behnken (DBB). El contraste empírico se realizó a través de análisis estadístico de los datos obtenidos, permitiendo validar las

predicciones planteadas y alcanzar conclusiones fundamentadas sobre las condiciones óptimas para la propagación *in vitro* de la especie.

3.2. Diseño de investigación

Debido a su naturaleza, el diseño empleado fue el experimental, el cual implicó la manipulación intencional de las variables independientes: fotoperíodo a tres niveles (8/16, 12/12 y 16/8 horas luz/oscuridad), ácido giberélico en tres niveles (0,25; 0,50 y 0,75 ppm) y ácido indolacético en tres niveles (0,25; 0,50 y 0,75 ppm), para conocer su efecto en las variables dependientes: longitud del tallo (cm), longitud de entrenudos (mm), número de hojas (ud) y número de raíces (ud). Mediante la aplicación de la metodología de superficie de respuesta se logró la comprobación de las hipótesis propuestas y se respaldó la validez estadística de los resultados, siguiendo los principios del diseño experimental (Montgomery, 2017; Hernández & Mendoza, 2018). En esta investigación se aplicó la metodología de Superficie de Respuesta, empleando dos diseños experimentales: El Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR), cuya característica de rotabilidad se determina por el valor de r , donde $r = (F)^{1/4}$, siendo $F=2^k$ y F representa el número de puntos factoriales, mientras que k corresponde al número de factores. Para el presente estudio, con $k=3$ factores, se obtuvo $r=1.6818$, lo que generó un total de 08 corridas para la parte factorial, 06 corridas en la parte axial y 05 puntos centrales, es decir generando un total de 19 ensayos o corridas experimentales. Adicionalmente se aplicó el Diseño Box-Behnken (DBB), metodología aplicable para tres o más factores, que se caracteriza por no requerir tratamientos en los vértices de la región experimental, conformado por 17 ensayos en total. En ambos diseños se evaluó la combinación de tres niveles de los factores: Fotoperíodo, ácido giberélico y ácido indolacético, sobre las variables respuestas (Y1: Longitud de tallo (cm.), Y2: Longitud de entrenudos (mm.), Y3: Número de hojas (ud.) e Y4: Número de raíces (ud.)).

La población objeto en estudio está constituida por los árboles de la quina (especie en extinción), ubicados en la región Amazonas, provincia de Bagua, distrito de Aramango, en tanto que las muestras experimentales estuvieron conformadas por 19 explantes uninodales de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina", a los que se aplicó el Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR), además de 17 explantes

uninodales a los que se aplicó el Diseño Box-Behnken (DBB). Para ello se seleccionaron 10 plántulas madre (con tres a cinco explantes uninodales por plántula) procedentes de invernadero, considerándose como variable respuesta la longitud del tallo, longitud de entrenudo, número de hojas y número de raíces (Armijos & Pérez, 2016).

Las corridas experimentales fueron asignadas de forma completamente aleatoria a las unidades experimentales (explantes uninodales) para ambos diseños (DCCR y DBB), con el fin de garantizar la independencia de las observaciones y minimizar el efecto de variables extrañas no controladas. Esta aleatorización se realizó tanto para las corridas factoriales, axiales y puntos centrales en el DCCR, como para todas las corridas en el DBB.

Para el análisis de los resultados se emplearon técnicas de optimización como la función de deseabilidad (considerando criterios de optimización o especificaciones en factores y respuestas), con el fin de estimar el nivel de factores que logren maximizar la conveniencia global, cuyos valores varían de 0 a 1, donde el valor 1 es el resultado ideal. Adicionalmente, se evaluó la eficiencia de los diseños experimentales mediante los criterios de optimalidad D, A, G y I. Los criterios de optimización establecidos para los factores como las respuestas se encuentran establecidas en la siguiente tabla:

Tabla 1

Parámetros de Optimización de las variables respuestas: Longitud de tallo; Longitud entrenudos; Número de hojas y Número de raíces

| Variable respuesta | Función objetivo | L | T | r | Importancia |
|-------------------------------|-------------------------|----------|----------|----------|--------------------|
| Y1: Longitud de tallo (cm.) | Maximizar | 2.0 | 5.0 | 1.0 | 5 |
| Y2: Longitud entrenudos (mm.) | Maximizar | 0.3 | 0.9 | 1.0 | 5 |
| Y3: Número de hojas (ud.) | Maximizar | 2.0 | 7.0 | 1.0 | 4 |
| Y4: Número de raíces (ud.) | Maximizar | 1.0 | 3.0 | 1.0 | 3 |

L: Lower, es el valor mínimo o límite inferior aceptable.

T: Target, es el valor objetivo o target que se desea alcanzar.

r: es peso o exponente que determina que tan lineal o no lineal es la transición entre L y T.

Tabla 2

Variables Independientes (Factores) y sus niveles en valores naturales y codificados

| Variables Independientes (Factores) | Unidad | Niveles (Valores de la variable natural) | | | Xi (Variable codificada) | | |
|-------------------------------------|--------|------------------------------------------|-------|------|--------------------------|-------|------|
| | | Bajo | Medio | Alto | Bajo | Medio | Alto |
| F1: Fotoperíodo | Horas | 8 | 12 | 16 | -1 | 0 | 1 |
| F2: Ácido Giberélico | ppm | 0.25 | 0.50 | 0.75 | -1 | 0 | 1 |
| F3: Ácido Indolacético | ppm | 0.25 | 0.50 | 0.75 | -1 | 0 | 1 |

Nota: Los valores mostrados en la tabla en el factor F1: Fotoperíodo corresponden a las horas luz, entendiéndose que 8 horas luz corresponde a 16 horas de oscuridad

Tabla 3

Conversión de Variables Naturales a Codificadas

| Variables Independientes (Factores) | Fórmula | Xi (Variable codificada) |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| F1: Fotoperíodo | | $x_1 = \frac{F_1 - 12}{4}$ |
| F2: Ácido Giberélico | $x_i = \frac{V_i - [(V_{\max} + V_{\min})/2]}{(V_{\max} - V_{\min})/2}$ | $x_2 = \frac{F_2 - 0.50}{0.25}$ |
| F3: Ácido Indolacético | | $x_3 = \frac{F_3 - 0.50}{0.25}$ |

Nota: Xi: Variable codificada; Vi: Valor de la variable natural; Vmax: Valor máximo de la variable natural; Vmin: Valor mínimo de la variable natural

Como fase final, se realizó la comparación de los diseños experimentales los criterios de comparación según Myers (1995), como son optimalidad D y optimalidad A. Asimismo se utilizó el criterio de Optimalidad G y Optimalidad I.

Figura 5

Explante uninodal obtenido de planta madre para la optimización multirespuesta en estudios de propagación in vitro de Ladenbergia oblongifolia 'árbol de la quina'

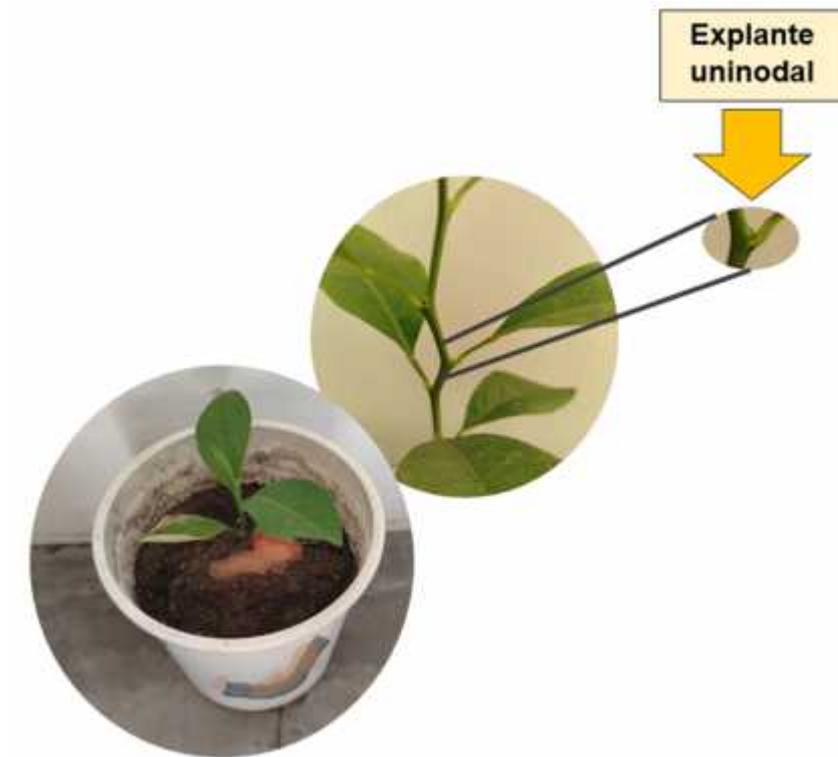


Figura 6

*Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR) para la optimización multirespuesta en estudios de propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* 'árbol de la quina', mostrando valores codificados y originales de los factores estudiados (A: Fotoperíodo, B: Ácido Giberélico y C: Ácido Indolacético)*

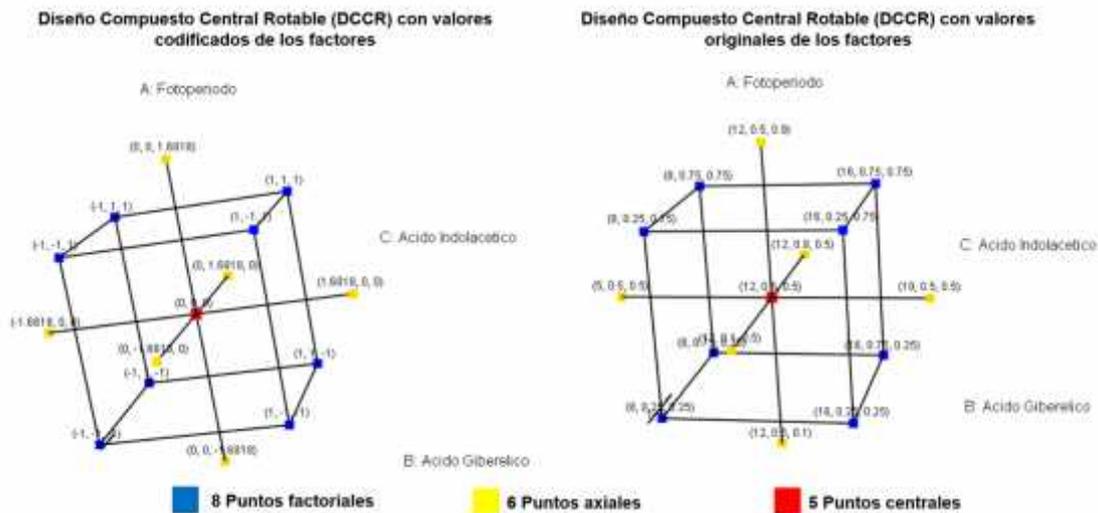
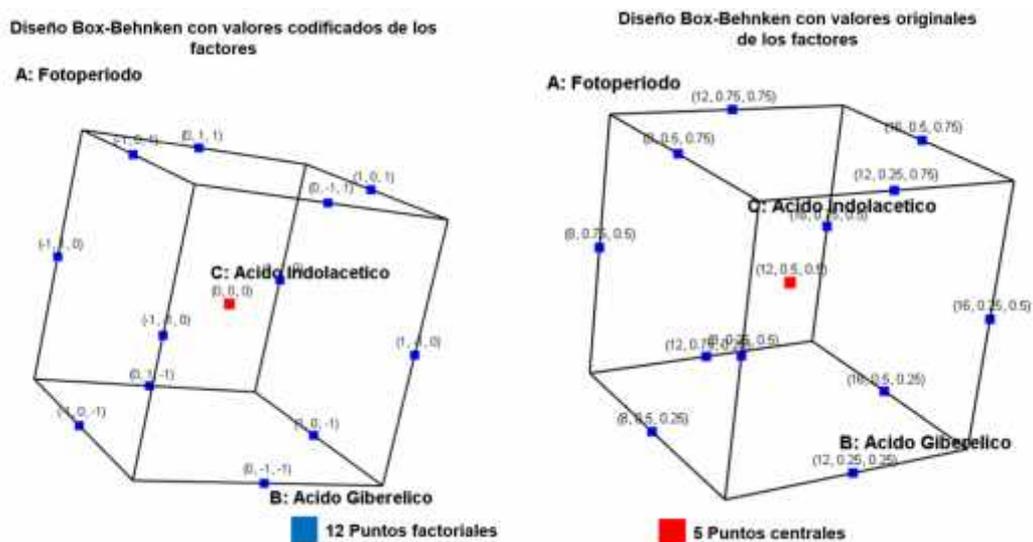


Figura 7

*Diseño Compuesto Box-Behnken (DBB) para la optimización multirespuesta en estudios de propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* 'árbol de la quina', mostrando valores codificados y originales de los factores estudiados (A: Fotoperíodo, B: Ácido Giberélico y C: Ácido Indolacético)*



3.3. Operacionalización de variables de estudio

Nota: Fotoperíodo: 8 horas luz/16 horas oscuridad, 12 horas luz/12 oscuridad y 16 horas luz/8 horas oscuridad.

| Variables Independientes (Factores) | 3.3.1 Definición conceptual | 3.3.2 Definición operacional | 3.3.3 Indicadores (Niveles) |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Fotoperíodo | Regulación de la función biológica en base a las horas luz y de oscuridad disponibles (López et al., 2018). | Crecimiento y desarrollo de las plántulas <i>in vitro</i> . | <ul style="list-style-type: none"> • 8 horas luz/16 horas oscuridad • 12 horas luz/12 oscuridad. • 16 horas luz/8 horas oscuridad. |
| Ácido giberélico | Se define como una fitohormona del tipo giberelina que estimula el alargamiento celular (López et al., 2018). | Crecimiento y desarrollo de las plántulas <i>in vitro</i> . | <ul style="list-style-type: none"> • 0.25 ppm • 0.50 ppm • 0.75 ppm |
| Ácido indolacético | Es una fitohormona que promueve la elongación y división celular que propicia el crecimiento y desarrollo de una planta (López et al., 2018). | Crecimiento y desarrollo de las plántulas <i>in vitro</i> . | <ul style="list-style-type: none"> • 0.25 ppm • 0.50 ppm • 0.75 ppm |
| Variables Dependientes | 3.3.1 Definición conceptual | Unidad de medida | |
| Longitud del tallo. | Medición del tamaño de la planta desde la base, es decir después de la raíz al ápice o extremo superior o punta de la planta (López et al., 2018). | Centímetros (cm.) | |
| Longitud de entrenudo. | Se define como la porción de tallo entre dos nudos (López et al., 2018). | Milímetros (mm.) | |
| Número de hojas. | Contabilidad del número de hojas (López et al., 2018). | Unidades (ud.) | |
| Número de raíces. | Contabilidad del número de raíces (López et al., 2018). | Unidades (ud.) | |

Acido ácido indolacético y ácido giberélico, concentraciones de: 0.25; 0,50 y 0,75 ppm

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Se empleó la experimentación como técnica y se hizo uso de una ficha de registro como instrumento de recolección de datos, esto implicó evaluar el crecimiento y desarrollo de la plántula de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina" a los 45 días de su cultivo *in vitro*. Una vez que esta información se obtuvo fue procesada para su análisis estadístico.

3.5. Procedimiento de recolección de datos

La fase experimental se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional de Trujillo, donde se consideró las normas de bioseguridad pertinentes como el uso de mandil, mascarilla, guantes y distanciamiento social.

Fase 1: Obtención de frutos y semillas de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina".

Los frutos de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina", procedieron de la región Amazonas, provincia de Bagua, distrito de Aramango, donde existen comunidades que conservan el conocimiento ancestral de consumir y preservar esta especie. Estas fueron transportadas al laboratorio, donde se seleccionaron las mejores semillas en base a su estado sanitario.

Fase 2: Siembra de semillas de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina".

Las semillas seleccionadas fueron sembradas en invernadero. Se procedió a realizar el tratamiento de semillas, empleando el fungicida Benlate, a la concentración de 1% durante 10 a 15 minutos. Luego se procedió a realizar la siembra en un sustrato conformado por una mezcla 1:1 de arena y humus (desinfectados previamente con hipoclorito de sodio por 24 horas). Los riegos se efectuaron 1 vez por semana, observando el proceso de germinación y emergencia de las plántulas madres.

Fase 3: Preparación de medio de cultivo y siembra *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina".

Cuando las plántulas cultivadas en invernadero alcanzaron los dos meses de edad, en laboratorio se procedió a preparar medio de cultivo MS (Murashige & Skoog 1962), suplementado con diferentes concentraciones de AIA y AG3, adicionalmente sacarosa al 3% y agar-agar al 0.8% (Tabla 4). Se ajustó el pH antes

de su esterilización de este medio en autoclave a 120°C y a 1 atm de presión por 20 minutos. Los materiales de vidrio (viales de vidrio de cultivo), fueron sometidos a esterilización húmeda en autoclave, complementando con esterilización en seco (horno) y secado final en estufa de temperatura controlada. Los explantes uninodales, seleccionados de las plántulas madre, los cuales fueron desinfectados en la cámara de flujo laminar mediante un tratamiento secuencial con alcohol 70° por 30 segundo, seguido de 5 enjuagues con agua destilada estéril, inmersión en legía al 2% por 2 minutos y 5 enjuagues finales con agua destilada estéril. Posteriormente, bajo condiciones asépticas, los explantes uninodales de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina", fueron inoculados en los viales de vidrio de cultivo con medio MS suplementado, sellados, etiquetados y distribuidos en dos cámaras de germinación provistas de luz fluorescente 40W-luz de día, según los diseños experimentales establecidos. Para el Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR), se aplicaron fotoperíodos de 5 a 19 horas luz (con sus respectivos complementos de horas oscuridad), empleando 8, 12 y 16 horas luz como valores principales y puntos axiales ajustados según el diseño. Por otro lado, para el Diseño Box-Behnken (DBB), se establecieron fotoperíodos de 8, 12 y 16 horas luz (con sus respectivos complementos de oscuridad). Ambas cámaras se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura ($20 \pm 5^\circ\text{C}$), y humedad relativa del 100.0%, siguiendo el orden de ejecución aleatorizado para cada diseño experimental.

Tabla 4

Composición base del medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) para la propagación in vitro de Ladenbergia oblongifolia "árbol de la quina"

| Componente | Concentración |
|-------------------|----------------------|
| Sales MS | 4.4 g/L |
| Sacarosa | 30 g/L (3%) |
| Agar-agar | 8 g/L (0.8%) |
| pH | 5.8 |
| AG3 | 0.25, 0.50, 0.75 ppm |
| AIA | 0.25, 0.50, 0.75 ppm |

Fase 4: Obtención de datos y posterior análisis

A los 45 días del cultivo *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina", se evaluó de la plántula obtenida de la siembra de entrenudos (plántula obtenida en laboratorio) la longitud del tallo, longitud de entrenudo, número de hojas y número de raíces. En el caso de la longitud se empleó un calibre de precisión (Vernier) el cual tuvo una escala de medición comprendida entre 0-150 mm. Mientras que, el número de hojas y número de raíces se contabilizó en base a la observación de resultados.

Figura 8

*Procedimiento de recolección de datos en la propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"*

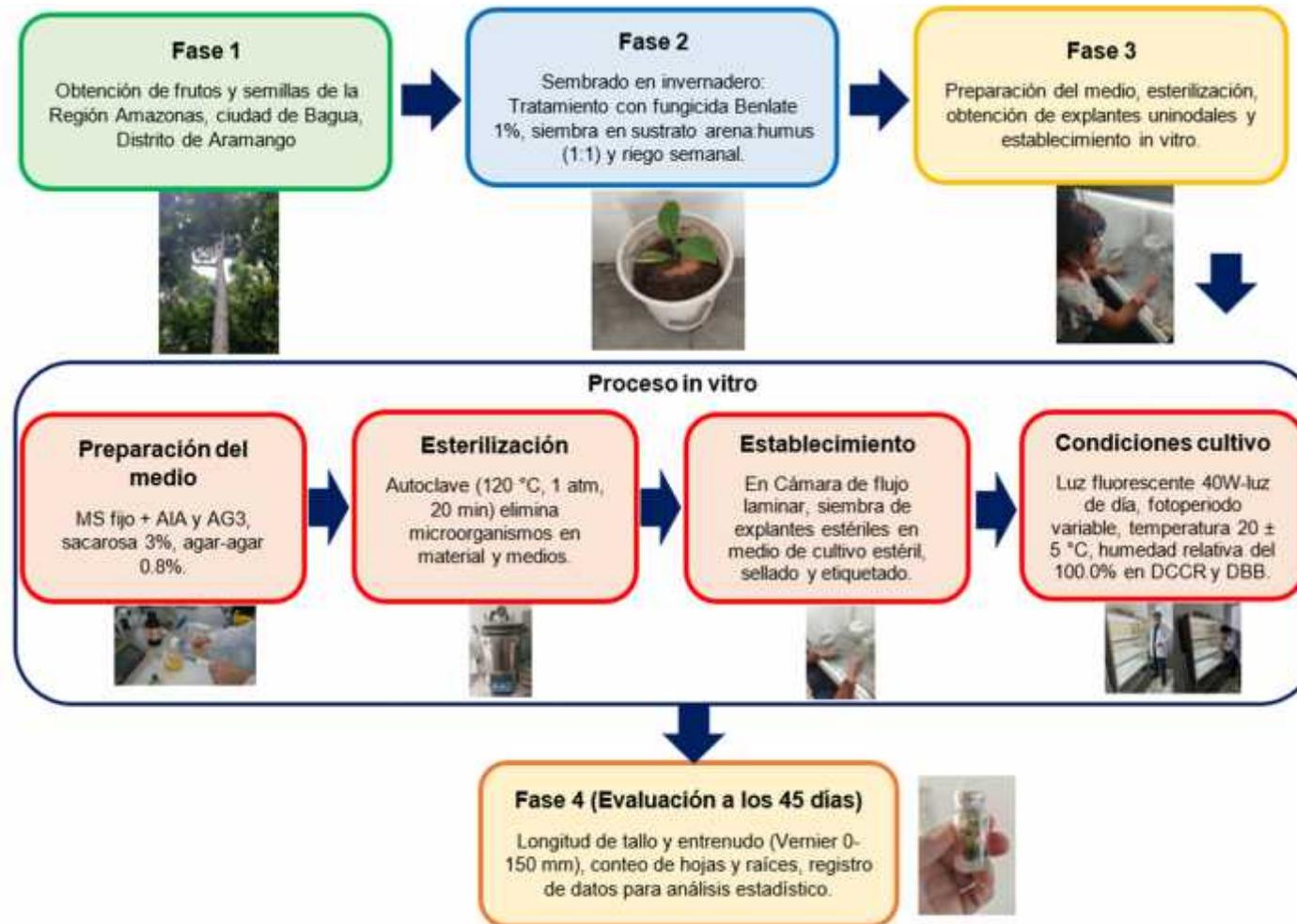


Figura 9

*Distribución de las 19 corridas experimentales del Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR) para la optimización multirespuesta en la propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* 'árbol de la quina' en cámaras de crecimiento artesanales con iluminación fluorescente 40W-luz de día y fotoperíodo controlado, mostrando los valores de los tres factores estudiados (fotoperíodo, ácido giberélico y ácido indolacético) en cada corrida*

Diseño experimental: 19 corridas (8 puntos factoriales, 6 puntos axiales ($\alpha = -1.6818$) y 5 puntos centrales)

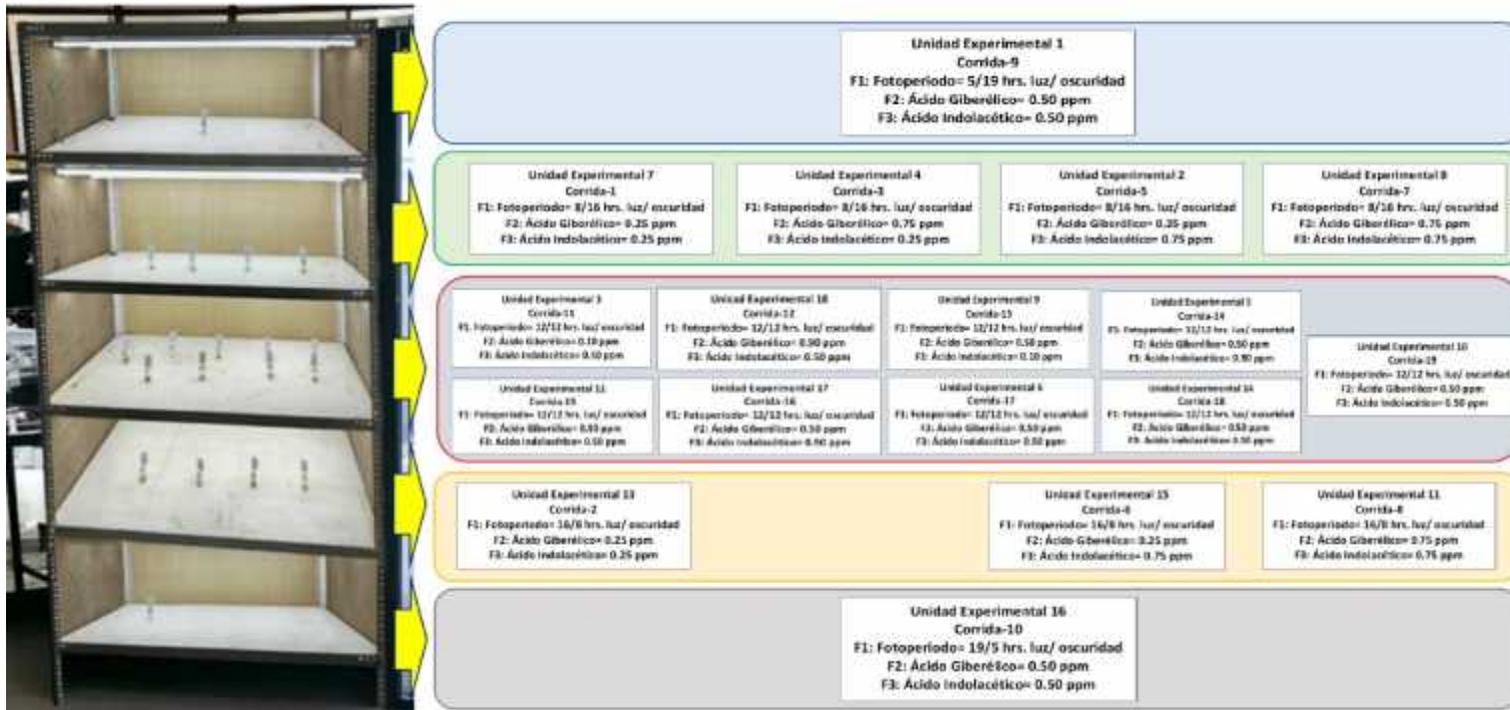
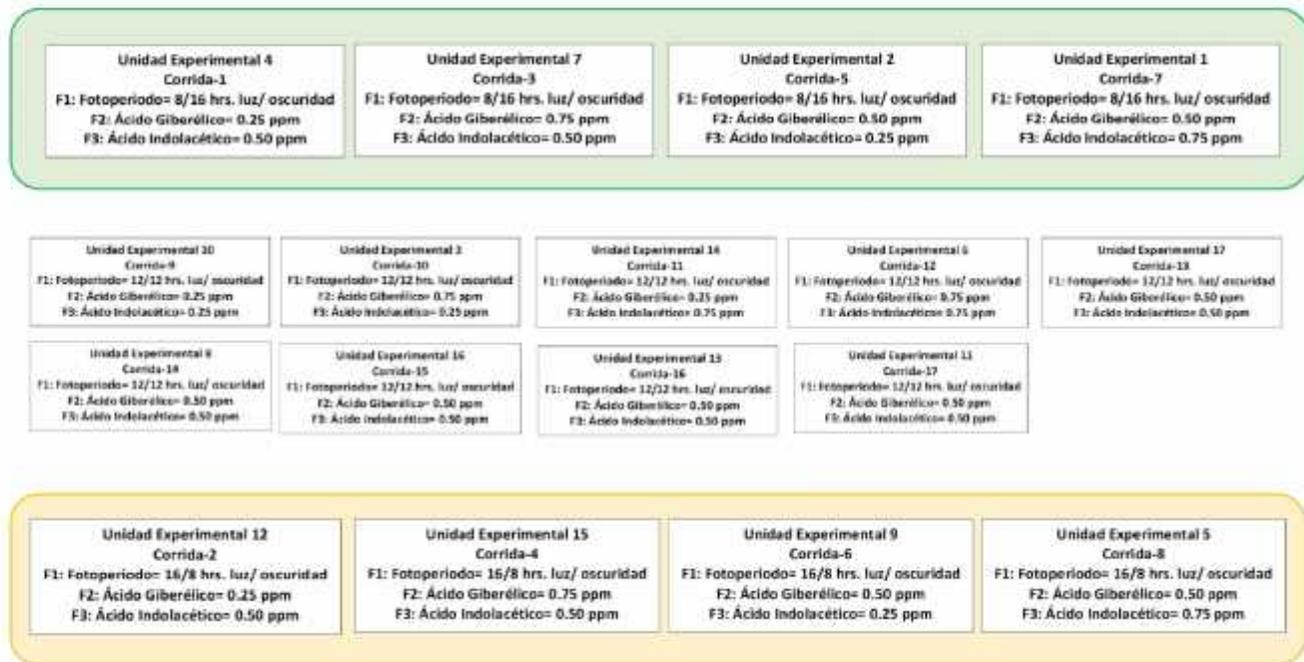


Figura 10

*Distribución de las 17 corridas experimentales del Diseño Box Behnken (DBB) para la optimización multirespuesta en la propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* 'árbol de la quina' en cámaras de crecimiento artesanales con iluminación fluorescente 40W-luz de día y fotoperíodo controlado, mostrando los valores de los tres factores estudiados (fotoperíodo, ácido giberélico y ácido indolacético) en cada corrida*



Diseño experimental: 17 corridas (12 puntos factoriales y 5 puntos centrales)



3.6. Técnicas de procesamiento y análisis de los resultados

Para el procesamiento y análisis de los resultados se empleó la metodología de superficie de respuesta mediante dos diseños experimentales: el Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR) y el Diseño Box-Behnken (DBB). Se obtuvieron las medidas estadísticas descriptivas (mínimo, máximo, promedio y desviación estándar) para cada variable respuesta según el diseño experimental. Se verificó la calidad del ajuste mediante la evaluación de supuestos estadísticos (normalidad con pruebas de Shapiro-Wilk y Anderson-Darling, homocedasticidad con prueba de Breusch-Pagan, e independencia con prueba de Durbin-Watson) y pruebas de normalidad multivariante (Mardia para asimetría y curtosis, y Royston), como la evaluación de los modelos ajustados (R^2 ajustado, prueba de falta de ajuste y diagnóstico de multicolinealidad mediante VIF), y optimización de respuestas múltiples empleando la función de deseabilidad global y criterios de optimalidad (D, A, G y I). El procesamiento se realizó utilizando el software libre RStudio versión 4.3.1 como el Software Design-Expert®, V13, presentando los resultados mediante tablas de ANOVA, gráficos de superficie de respuesta y gráficos de contorno para visualizar las interacciones entre los factores estudiados.

3.7. Marco metodológico y análisis estadístico

3.7.1. Diseño de Experimentos

El diseño experimental se refiere al proceso de planificar el experimento para que se recolecten y analicen los datos apropiados mediante métodos estadísticos, lo que resulta en conclusiones válidas y objetivas. Este enfoque estadístico del diseño experimental es necesario para obtener conclusiones significativas de los datos. Cuando un problema involucra datos sujetos a errores experimentales, los métodos estadísticos son el único enfoque objetivo para el análisis. Por lo tanto, hay dos aspectos en cualquier problema experimental: el diseño del experimento y el análisis estadístico de los datos. Estos dos temas están estrechamente relacionados porque el método de análisis depende directamente del diseño empleado (Montgomery, 2017).

El diseño experimental se define conceptualmente como una colección de experimentos o corridas que se planifican con anticipación a su ejecución real. Los experimentos particulares seleccionados en un diseño experimental dependerán

del propósito del diseño. En un diseño experimental bien planeado, el efecto de las variables latentes debería equilibrarse para no alterar la conclusión del estudio. Las variables independientes se varían intencionadamente y las corridas se realizan de manera que se equilibre el efecto de las variables de fondo que cambian, permitiendo que el cambio promedio en la respuesta se atribuya a los cambios realizados en las variables independientes (Lawson, 2014).

La optimización de respuestas es un enfoque estratégico para identificar regiones en el espacio de las variables del proceso (x_1, x_2, \dots, x_p) que merecen un estudio detallado, con el objetivo final de optimizar una o más respuestas (y). Se discuten dos estrategias: la Operación Evolutiva (EVOP), que es una estrategia conservadora para la experimentación continua en un proceso de producción en funcionamiento que busca producir un buen producto y al mismo tiempo proporcionar información para la mejora continua del proceso; y una estrategia de optimización empírica que utiliza herramientas de superficie de respuesta lineal y cuadrática. La EVOP, propuesta inicialmente por Box y Wilson, y detallada en el libro "Evolutionary Operation" por Box y Draper, implica una experimentación conservadora y continua que tiene como objetivo la mejora y evolución del proceso, mientras que la estrategia empírica de optimización se basa en el análisis de la superficie de respuesta para encontrar el óptimo de una o más respuestas (Vardeman y Jobe, 2016).

3.7.2. Metodología de Superficie de Respuesta (RSM)

La metodología de la Superficie de Respuesta (RSM, por sus siglas en inglés) se define como un conjunto de técnicas de optimización avanzadas que buscan generar un mapa de respuesta, ya sea en forma de contornos o como una representación en 3-D. Estos mapas, comparables a los utilizados en topografía geológica pero mostrando rendimientos de procesos en lugar de elevaciones, son el resultado de una fase de experimentación inicial que incluye diseños fraccionarios de dos niveles para seleccionar los factores más importantes y diseños factoriales completos para estudiar estos factores en profundidad y definir la región de interés. La finalidad de la RSM es ofrecer una visualización gráfica donde, por ejemplo, se pueda identificar un "máximo simple" como un resultado muy deseable (Anderson y Whitcomb, 2016).

La metodología de superficie de respuesta (RSM) es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas empleadas para modelar y optimizar problemas con estructura subyacente desconocida, donde la "superficie de respuesta" representa la salida de un proceso cuando varían los valores de los parámetros de entrada dentro de rangos específicos (Davim, 2016, p. 48).

La metodología de superficie de respuesta (RSM), representa un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas para modelar y analizar problemas, donde la respuesta de interés se encuentra influenciada por varias variables, cuyo objetivo es optimizar esa respuesta. La relación entre la función y con los k factores X_1, X_2, \dots, X_k

$$y = f(X_1, X_2, \dots, X_k),$$

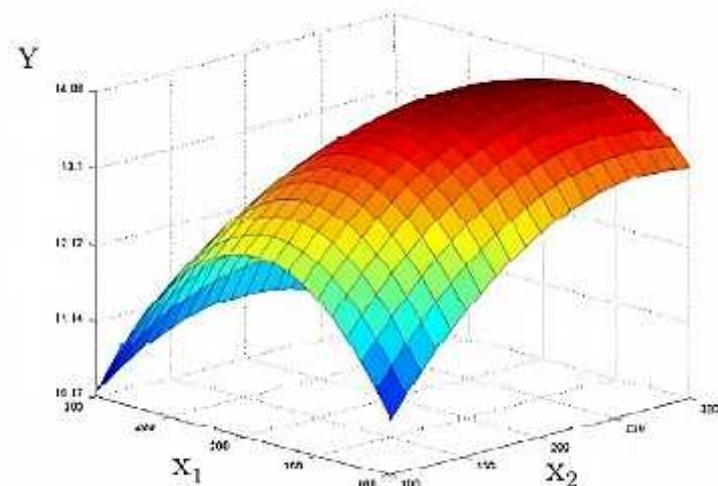
De forma que la variable respuesta Y , puede representarse por:

$$Y = y + v = f(X_1, X_2, \dots, X_k) + v$$

donde v representa el ruido o error observado en la respuesta Y . Si denotamos la respuesta esperada por $E(Y) = f(X_1, X_2, \dots, X_k) = y$, la superficie representada por $y = f(X_1, X_2, \dots, X_k)$, se denomina Superficie de Respuesta (Montgomery, 2017).

Figura 11

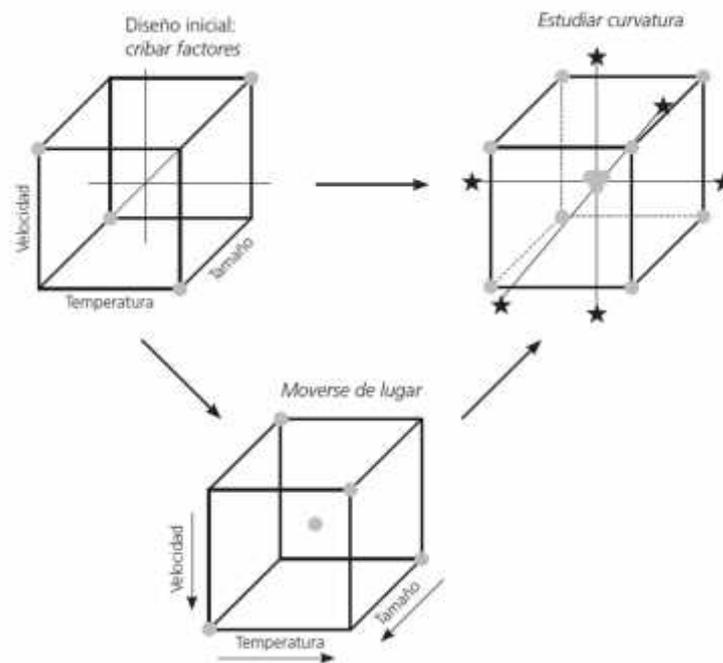
Superficie de respuesta tridimensional



La metodología de superficie de respuesta puede requerir experimentación secuencial cuando los resultados iniciales no alcanzan las mejoras deseadas. Esto puede implicar desplazar la región experimental o explorar más detalladamente la región inicial para optimizar la respuesta" (Gutiérrez y De la Vara, 2012).

Figura 12

Etapas de exploración experimental en Superficie de Respuesta (RSM). Fuente: Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar (2012)



En la metodología de superficie de respuesta (RSM), el proceso inicia estableciendo una función que modele la relación entre variables de entrada y salida. Esta puede ser de primer orden (lineal) para respuestas simples, o de segundo orden cuando se requiere modelar comportamientos más complejos. Los parámetros se estiman mediante mínimos cuadrados y la bondad de ajuste valida el modelo (Davim, 2016, p. 48).

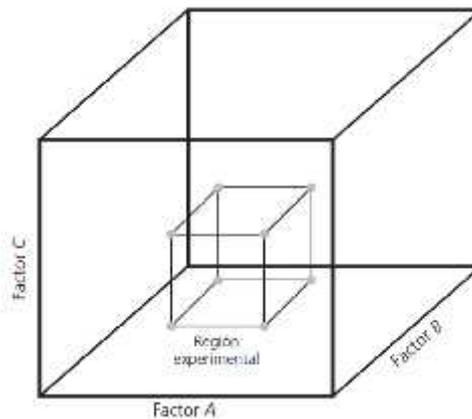
En la metodología de superficie de respuesta (RSM), la región experimental está delimitada por los rangos de experimentación de los factores, mientras que la región de operabilidad comprende todas las condiciones posibles donde el proceso puede operar. El punto óptimo puede ubicarse en cualquier lugar dentro o fuera de la región experimental inicial, siendo más probable encontrarlo cerca de las condiciones usuales en procesos establecidos, mientras que en procesos nuevos

podría requerir una estrategia de aproximación secuencial" (Gutiérrez-Pulido y de la Vara-Salazar, 2012).

Figura 13

Regiones de operabilidad y experimental para un proceso con tres factores.

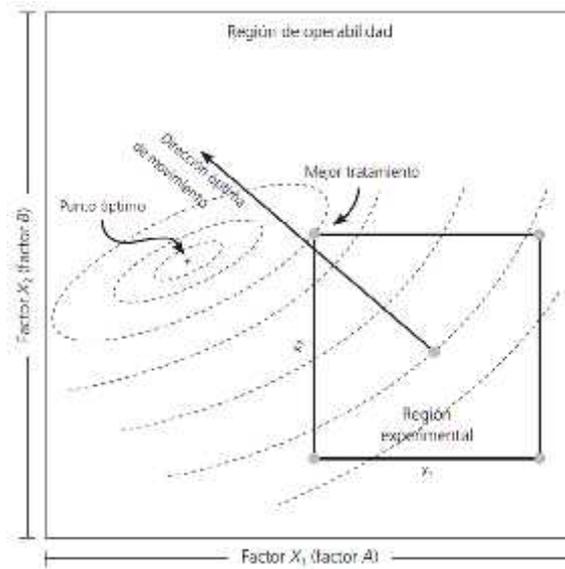
Fuente: Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar (2012)



En la metodología de superficie de respuesta existe una diferencia fundamental entre el mejor tratamiento y el punto óptimo. El mejor tratamiento representa la combinación más efectiva de los niveles de factores dentro de la región experimental, mientras que el punto óptimo constituye la combinación más favorable posible considerando toda la región de operabilidad, lo que puede requerir experimentación secuencial para su identificación (Gutiérrez-Pulido y de la Vara-Salazar, 2012).

Figura 14

Curvas de nivel y localización del punto óptimo en una superficie de respuesta con dos factores. Fuente: Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar (2012)



La metodología de superficie de respuesta (RSM) es una estrategia de optimización experimental que integra tres elementos fundamentales: diseño, modelo y técnica de optimización (Gutiérrez-Pulido & De la Vara-Salazar, 2012). El proceso se desarrolla secuencialmente mediante tres etapas:

Cribado: Se aplica cuando existen más de seis factores potencialmente influyentes, buscando identificar los más significativos.

Búsqueda de primer orden: Utiliza diseños factoriales para caracterizar superficies planas cuando hay pocos factores ($k \leq 5$).

Búsqueda de segundo orden: Se implementa al detectar curvatura, empleando diseños más complejos para modelar adecuadamente la superficie.

El proceso de optimización es iterativo, donde cada diseño actúa como una "ventana" que aproxima la realidad del proceso. La RSM utiliza análisis de regresión múltiple para ajustar modelos matemáticos que relacionan la respuesta con los factores estudiados, permitiendo encontrar condiciones óptimas de operación mediante técnicas como derivadas, multiplicadores de Lagrange y operaciones matriciales (Gutiérrez-Pulido & De la Vara-Salazar, 2012).

De acuerdo con Gutiérrez y de la Vara (2012), las superficies de respuesta utilizan modelos polinomiales para ajustarse a datos experimentales. Los autores describen dos modelos fundamentales: el modelo de primer orden y el modelo de segundo orden.

El modelo de primer orden se expresa matemáticamente como:

$$Y = S_0 + \sum_{i=1}^k S_i x_i + V$$

donde Y es la variable respuesta, S_0 es el término constante, S_i son los coeficientes de los factores, x_i son las variables del proceso y V representa el error.

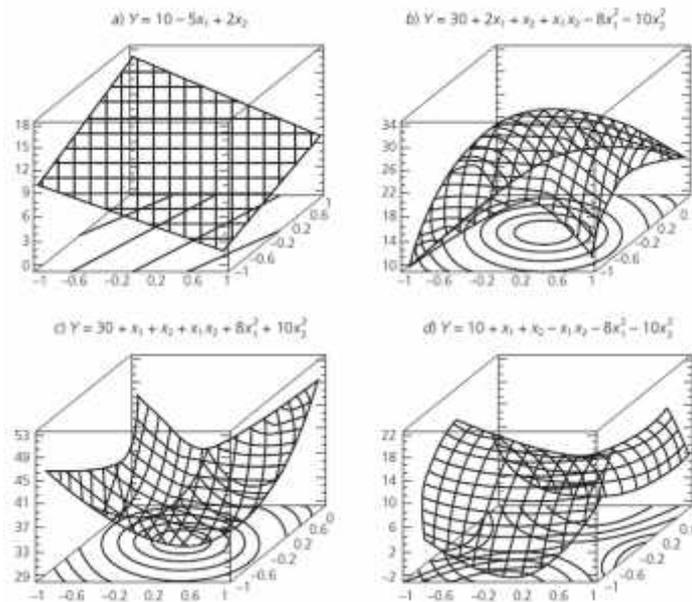
Para situaciones más complejas, se emplea el modelo de segundo orden:

$$Y = S_0 + \sum_{i=1}^k S_i x_i + \sum_{i=1}^k S_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k S_{ij} x_i x_j + V$$

Este modelo incorpora términos cuadráticos y de interacción entre variables. Al considerar dos variables de proceso (x_1 y x_2), la superficie resultante puede presentar tres formas características: máximo (montaña), mínimo (valle) o punto silla (minimax), dependiendo de los signos y magnitudes de los coeficientes.

Figura 15

Superficies de respuesta: a) primer orden (plano), b) máximo (montaña), c) mínimo (valle) y d) punto silla (minimax). Fuente: Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar (2012)



Gutiérrez y de la Vara (2012) señalan que para $k > 2$ factores, las superficies de respuesta generan un hiperplano (primer orden) o un hiperelipsoide/hiperboloide (segundo orden). Para $k = 3$, es posible visualizar la superficie mediante tres gráficas bidimensionales, manteniendo constante el tercer factor.

Gutiérrez y de la Vara (2012) describen las técnicas de optimización para superficies de respuesta, indicando que tras ajustar y validar el modelo ($R^2_{aj} > 70\%$), se procede a encontrar la combinación óptima de factores. Presentan tres métodos principales: escalamiento ascendente/descendente (para modelos de primer orden), análisis canónico y análisis de cordillera (ambos para modelos de segundo orden).

El análisis canónico permite caracterizar la superficie mediante el punto estacionario $(x_0, x_0, \dots, x_{k0})$, donde el plano tangente tiene pendiente cero. Este punto se obtiene mediante la ecuación matricial:

$$\hat{Y} = \hat{S}_0 + x'b + x'Bx$$

donde x' representa las variables codificadas, b el vector de efectos principales y B la matriz de interacciones y términos cuadráticos, de modo que:

$$b = \begin{pmatrix} \hat{S}_1 \\ \hat{S}_2 \\ \hat{S}_3 \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ \hat{S}_k \end{pmatrix}; B = \begin{pmatrix} \hat{S}_{11} & \hat{S}_{12}/2 & \hat{S}_{13}/2 & \cdot & \cdot & \cdot & \hat{S}_{1k}/2 \\ \hat{S}_{12}/2 & \hat{S}_{22} & \hat{S}_{23}/2 & \cdot & \cdot & \cdot & \hat{S}_{2k}/2 \\ \hat{S}_{13}/2 & \hat{S}_{23}/2 & \hat{S}_{33} & \cdot & \cdot & \cdot & \hat{S}_{3k}/2 \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \hat{S}_{1k}/2 & \hat{S}_{2k}/2 & \hat{S}_{3k}/2 & \cdot & \cdot & \cdot & \hat{S}_{kk} \end{pmatrix}$$

Luego derivando la ecuación matricial $\hat{Y} = \hat{S}_0 + x'b + x'Bx$ respecto al vector X e igualar a cero, se obtiene la expresión:

$$\frac{\partial \hat{Y}}{\partial x} = b + 2Bx = 0$$

El punto estacionario se calcula como:

$$x_0 = \frac{-B^{-1}b}{2}; B^{-1}, \text{ representa la matriz inversa de } B.$$

En cuanto al análisis de cordillera, se destaca como una técnica de optimización cuando el punto estacionario no es del tipo requerido. Este método busca el óptimo sobre esferas concéntricas, comenzando desde el centro del diseño con radio casi cero y expandiéndose gradualmente. Para $k=2$ factores, estas esferas se convierten en circunferencias.

Matemáticamente, el método utiliza el modelo de segundo orden en forma matricial:

$$\hat{Y} = \hat{S}_0 + x'b + x'Bx$$

Con la restricción de la esfera:

$$\sum_{i=1}^k x_i^2 = x'x = R_i$$

La función objetivo se plantea como:

$$F = \hat{S}_0 + x'b + x'Bx - \lambda(x'x - R_i)$$

Donde λ es el multiplicador de Lagrange. Al derivar e igualar a cero se obtiene:

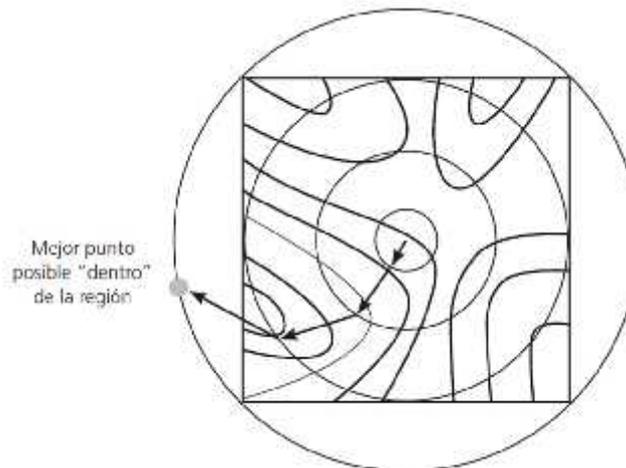
$$\frac{\partial F}{\partial x} = b + 2B - 2\lambda x = 0$$

$$(B - \lambda I)x = \frac{-b}{2}$$

El punto óptimo se encuentra al resolver este sistema con un valor de λ que no sea valor propio de la matriz B.

Figura 16

Análisis de cordillera y punto óptimo. Fuente: Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar (2012)



3.2.1. Diseños de Superficies de Respuesta

Gutiérrez y de la Vara (2012) describen los diseños de superficie de respuesta clasificándolos según el grado del modelo a utilizar. Los autores señalan cinco propiedades fundamentales: distribución satisfactoria de puntos experimentales, número mínimo de corridas, capacidad de construir diseños de orden mayor, detección de falta de ajuste y estimación pura de la varianza del error. Adicionalmente, destacan dos propiedades relevantes: la ortogonalidad, donde los coeficientes estimados no están correlacionados, facilitando la interpretación de los parámetros, y la rotabilidad, donde la varianza de $\hat{y}(x)$ solo depende de la distancia

al centro del diseño, asegurando una calidad de predicción uniforme en todas las direcciones.

3.7.2.1.1. Polinomio de Primer Orden

Debido al desconocimiento de la relación entre la respuesta y las variables independientes, se requiere un modelo que logre aproximar la relación funcional entre Y y las variables independientes. Cuando la respuesta se encuentra descrita por una función lineal de las variables independientes, el modelo se ajusta a un modelo de primero orden:

$$Y = XS + v$$

$$Y = S_0 + S_1x_1 + S_2x_2 + \dots + S_kx_k + v$$

Cuyos parámetros estimados mediante el método de mínimos cuadrados, se tendría una ecuación cuyos estimadores se sustituyen, obteniendo el siguiente modelo ajustado:

$$\hat{Y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_kx_k$$

El modelo adjunto, es utilizado cuando se desea estudiar el comportamiento de la variable de respuesta únicamente en la región, pero no se conoce la forma de la superficie.

Debido a que se desconoce la función f que establece, la relación entre los factores y la variable respuesta, el objetivo inicial de la RSM, es establecer una aproximación lógica de la función f, proponiendo una ecuación polinómica, de los k factores X_1, X_2, \dots, X_k , que junto a tratamientos para realizar las observaciones experimentales, serán utilizados para obtener estimaciones de los coeficientes en el modelo, como la estimación del error experimental, realizando entonces contrastes sobre las estimaciones de los parámetros y ajuste del modelo, de modo que de considerarse un modelo adecuado, podría usarse como función de aproximación, por tanto, en dicha situación, el estudio de la superficie de respuesta, corresponde a una superficie ajustada, debido que su análisis es semejante al del sistema real. Los modelos polinomiales con mayor frecuencia utilizados, como funciones de aproximación, corresponden al orden uno y dos:

Modelo de primer orden:

$$\hat{Y} = S_0 + \sum_{i=1}^k S_i x_i + V$$

3.2.2. Diseños para ajustar Superficies de Respuesta

La eficiencia en el ajuste y análisis de superficies de respuesta depende críticamente de la selección de un diseño experimental óptimo. Este diseño debe consistir en una combinación estratégica de niveles variables que no solo disperse adecuadamente los puntos de datos a lo largo del área de interés con la menor cantidad de pruebas posibles, sino que también proporcione predicciones ajustadas próximas a la realidad, permita identificar posibles deficiencias en el modelo y facilite la implementación de los experimentos en bloques y de manera secuencial. Además, debe ofrecer una estimación interna del error y simplificar los cálculos de los parámetros del modelo. Idealmente, el diseño será ortogonal o invariante por rotación para garantizar estimaciones precisas y desvinculadas a lo largo de todo el espectro experimental, lo cual es particularmente valioso cuando la ubicación óptima es desconocida antes de realizar el experimento (Sanchez, 2011).

3.7.2.3. Diseños para ajustar modelos de Primer Orden

Conocidos como diseños ortogonales (es decir los elementos fuera de la diagonal de la matriz $X'X$ son iguales a cero, por tanto, los productos cruzados de las columnas de la matriz X es igual también a cero), son los únicos que logran minimizar la varianza de los coeficientes de regresión $\{\hat{S}_i\}$, corresponden a los diseños factoriales 2^k , fracciones de la serie 2^k y diseños simplex.

3.7.2.3.1. Diseños Factoriales 2^k

Son valiosos en las fases iniciales de un estudio de superficie de respuesta, debido a que proporcionan un número mínimo de combinaciones factoriales.

Se establecen dos niveles por factor k_i : representado el valor máximo por +1, y por -1, el valor mínimo, luego se obtienen las posibles combinaciones de los niveles de los k factores, resultando un total de 2^k combinaciones o tratamientos, siendo el resultado un diseño ortogonal. En una combinación de factores resultantes de un diseño factorial 2^3 , tendríamos la siguiente tabla:

Tabla 5

Diseño factorial 2^3 con tres factores (A, B, C) a dos niveles (+, -)

| Run | A | B | C |
|-----|---|---|---|
| 1 | - | - | - |
| 2 | + | - | - |
| 3 | - | + | - |
| 4 | + | + | - |
| 5 | - | - | + |
| 6 | + | - | + |
| 7 | - | + | + |
| 8 | + | + | + |

Cabe mencionar que en el presente diseño no es posible la estimación del error experimental, sin embargo, puede corregirse considerando la inclusión de observaciones repetidas en el centro del diseño, sin que exista una influencia sobre las estimaciones de las estimaciones de los parámetros u ortogonalidad.

3.7.2.3.2. Fracciones de la Serie 2^k

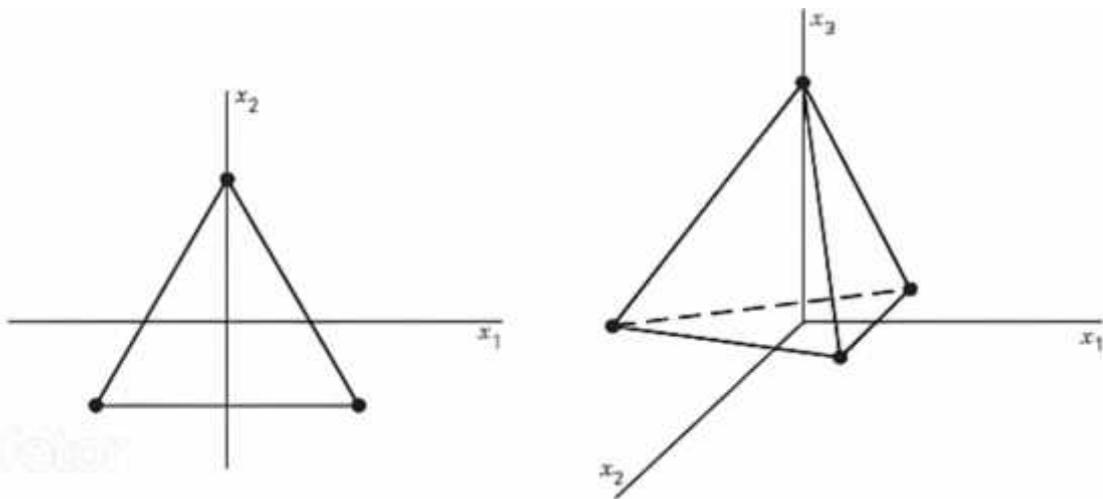
En un diseño factorial 2^k , el incremento de factores conlleva un rápido aumento en el número de combinaciones y parámetros que necesitan ser estimados. Dependiendo del costo asociado al experimento, se podría considerar la exclusión de ciertas combinaciones o puntos experimentales de dicho diseño, optando en su lugar por una selección de $2^k - m$ tratamientos, donde $K > m$. Es importante asegurar que el diseño modificado conserve al menos $K+1$ puntos, para cubrir el número de parámetros requeridos para una estimación adecuada, y que se preserve la ortogonalidad del diseño en la medida de lo posible.

3.7.2.3.3. Diseño Simplex

Una característica distintiva del diseño simplex es la necesidad de $N=K+1$ mediciones para elaborar un modelo lineal utilizando K variables. Desde una perspectiva geométrica, los puntos de este diseño forman los vértices de un polígono regular, tal como un triángulo equilátero para $K=2$, o un tetraedro cuando $K=3$.

Figura 17

Diseño simplex $K=2$ factores (izquierda) y $K=3$ factores (derecha)



3.7.2.4. Diseños para Modelos de Segundo Orden

Los diseños de segundo orden son un conjunto de técnica estadística avanzadas que facilitan la adaptación de un modelo matemático completo que incluye efectos lineales, interactivos y cuadráticos. La forma del modelo de segundo orden se encuentra representado por:

$$Y = S_0 + \sum_{i=1}^k S_i x_i + \sum_{i=1}^k S_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k S_{ij} x_i x_j + V, \quad \text{conformado por } p=(k+1)(k+2)/2$$

términos. Se utilizan para investigar espacios experimentales donde se anticipa una mayor complejidad o cuando se presume que la solución óptima ya se encuentra dentro del dominio experimental. El modelo matemático que representa estos diseños se compone de términos que reflejan la relación entre los factores y la respuesta observada, incluyendo interacciones entre los factores y sus efectos individuales y combinados. Este tipo de diseño requiere un número suficiente de

puntos experimentales para capturar la forma de la superficie de respuesta y se prefiere que sean ortogonales para minimizar la correlación para facilitar la rotabilidad del diseño, lo que mejora la interpretación de los datos. Los diseños más utilizados y recomendados son aquellos que facilitan la visualización de la relación entre los factores, como el diseño de Box-Behenken y el diseño compuesto central, mientras que los diseños 3^K pueden ser útiles, pero no son preferidos debido a su demanda de más pruebas experimentales.

3.7.2.4.1. Diseño de Composición Central

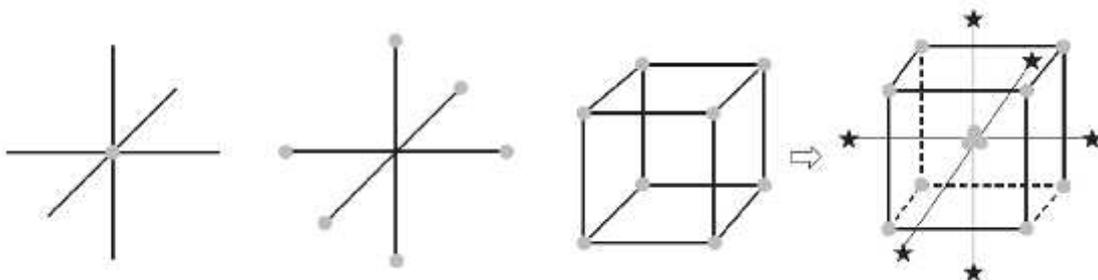
El Diseño de Composición Central (DCC), es preferido en la fase de búsqueda de modelos de segundo orden por su adaptabilidad. Este diseño se puede originar de un diseño factorial completo 2^K o un fraccionario 2^{K-P} , añadiendo puntos a lo largo de los ejes y en el centro del diseño, y se beneficia de otras características ventajosas. Consta de tres variedades de puntos:

1. Una duplicación de un diseño factorial de dos niveles, ya se completó o fraccionado, conocida como la sección factorial del DCC.
2. n_0 puntos o réplicas en el centro del diseño, donde n_0 es mayor o igual a uno.
3. Dos puntos en cada eje a una cierta distancia r del centro, denominados sección axial.

Puntos centrales + Puntos axiales + Puntos factoriales = Diseño de Composición central

Figura 18

Esquema Diseño Compuesto Central para $k=3$ factores. Fuente: Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar (2012)



En un experimento con K factores, la cantidad total de ensayos o corridas es $N=2^K+2K+n_0$, donde n_0 , representa el número de ensayos en el punto central. La elección de la distancia entre el centro y los puntos axiales se debe realizar cuidadosamente y depende de las características deseadas del Diseño Central Compuesto (DCC). Para lograr un diseño con rotabilidad, se establece el valor de r como la raíz cuarta de F , $r = (F)^{1/4}$, siendo $F=2^k$, donde F representa el número de puntos factoriales y k corresponde al número de factores (para 3 factores ($k=3$) $=1.6818$). Si se prefiere que el DCC sea ortogonal, se considera igual a:

$$r = \left(\frac{(F * N)^{1/2} - F}{2} \right)^{1/2}; \text{ donde } N \text{ corresponde al total de corridas experimentales.}$$

Según Pérez et al. (2021), los diseños experimentales de segundo orden en la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) deben poseer ciertas propiedades para garantizar precisión en la estimación de superficies de respuesta. Aunque la ortogonalidad es deseable, los diseños rotables son más utilizados, ya que requieren menos corridas experimentales y permiten que la varianza de la respuesta dependa únicamente de la distancia al centro, sin verse afectada por la dirección.

Gutiérrez y de la Vara (2012), en la selección de diseños de segundo orden en la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM), el **Diseño Compuesto Central (DCC)** es el más flexible y eficiente, ya que permite reutilizar corridas experimentales previas y ajustar el modelo con menor número de tratamientos. En contraste, el diseño **factorial completo** 3^k , aunque preciso, resulta costoso en términos de corridas, salvo en experimentos con pocos factores. Por ello, se recomienda priorizar el **DCC**, seguido del **Box-Behnken**, dejando el diseño factorial como última opción cuando sea estrictamente necesario.

Tabla 6

Comparación del número de corridas en diferentes diseños experimentales de segundo orden

| Número de factores | Número de corridas | | | |
|--------------------|----------------------|--------------------------|-------------------|-------------|
| | Número de parámetros | Factorial completo 3^k | Central compuesto | Box-Behnken |
| 2 | 6 | 9 | 13-16 | - |
| 3 | 10 | 27 | 17-23 | 15 |
| 4 | 15 | 81 | 27-36 | 27 |
| 5 | 21 | 243 | 29-36 | 46 |
| 6 | 28 | 729 | 47-59 | 54 |

Fuente: Elaborado a partir de Análisis y Diseño de Experimentos (Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, 2012, p. 373)

Figura 19

Esquema del Diseño Compuesto Central de tres factores. Fuente: Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar (2012)

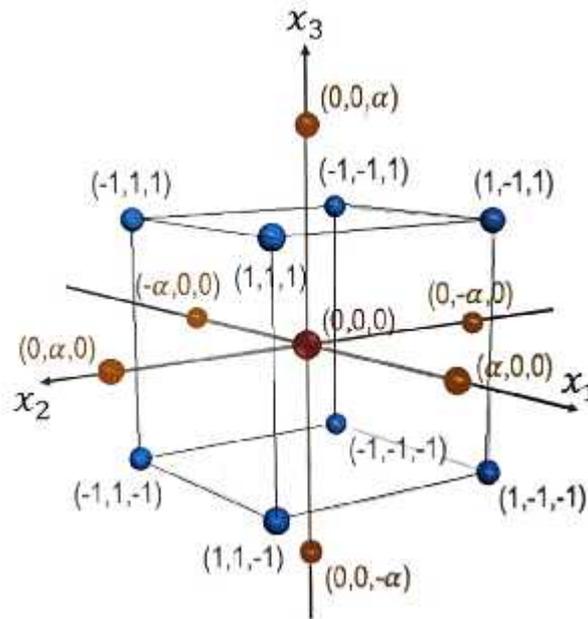
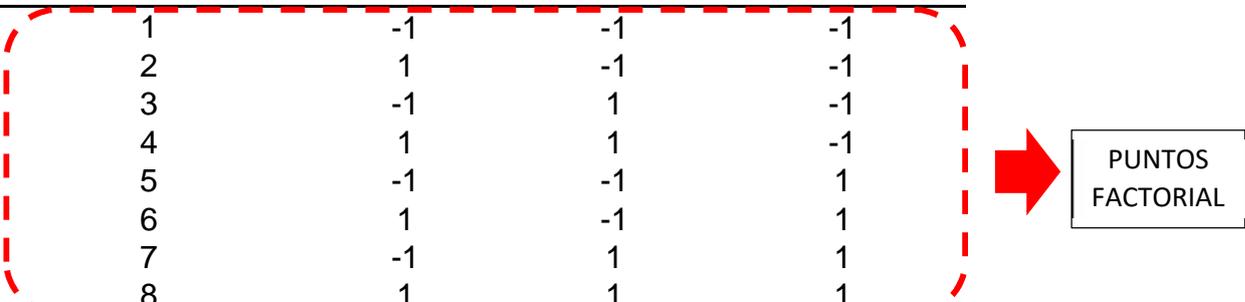
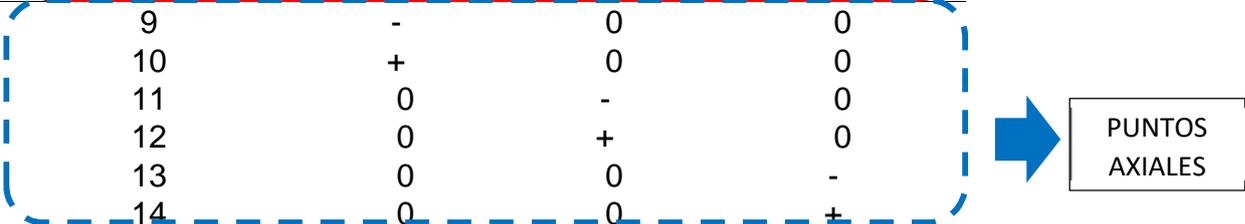
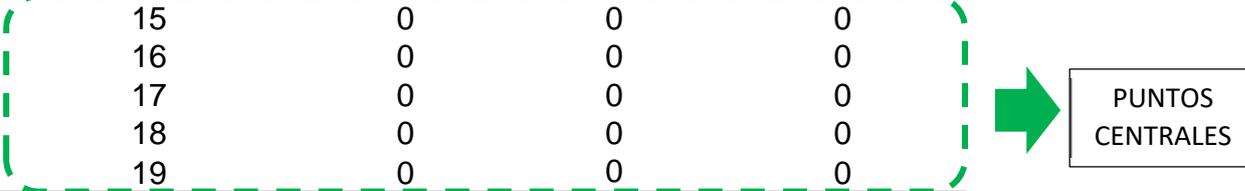


Tabla 7

Arreglo Factorial del Diseño Compuesto Central con tres factores en cinco puntos centrales

| Corridas | X1 | X2 | X3 | |
|----------|----|----|----|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | -1 | -1 | -1 |  |
| 2 | 1 | -1 | -1 | |
| 3 | -1 | 1 | -1 | |
| 4 | 1 | 1 | -1 | |
| 5 | -1 | -1 | 1 | |
| 6 | 1 | -1 | 1 | |
| 7 | -1 | 1 | 1 | |
| 8 | 1 | 1 | 1 | |
| 9 | - | 0 | 0 |  |
| 10 | + | 0 | 0 | |
| 11 | 0 | - | 0 | |
| 12 | 0 | + | 0 | |
| 13 | 0 | 0 | - | |
| 14 | 0 | 0 | + | |
| 15 | 0 | 0 | 0 |  |
| 16 | 0 | 0 | 0 | |
| 17 | 0 | 0 | 0 | |
| 18 | 0 | 0 | 0 | |
| 19 | 0 | 0 | 0 | |

El modelo de regresión del Diseño Compuesto Central con tres factores, se encuentra estructurado, según un modelo de segundo orden por:

$$Y = S_0 + S_1x_1 + S_2x_2 + S_3x_3 + S_{12}x_1x_2 + S_{13}x_1x_3 + S_{23}x_2x_3 + S_{11}x_1^2 + S_{22}x_2^2 + S_{33}x_3^2 + V$$

Intercepto

Modelo lineal
(primer orden)

Interacciones de dos
factores

Modelo cuadrático
(segundo orden)

Cuyos coeficientes a estimar, se pueden obtener mediante:

$$\hat{Y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2$$

3.7.2.4.2. Diseño de Box-Behnken

El diseño de Box-Behnken se recomienda para experimentos que incluyen tres o más variables independientes, sin considerar las combinaciones extremas como parte de las condiciones experimentales. Estos diseños son conocidos por su eficacia en cuanto a la cantidad de ensayos requeridos y se caracterizan por su capacidad de rotabilidad o cuasirotabilidad. Se diferencian por omitir los puntos extremos del espacio experimental, lo que evita las condiciones experimentales que son demasiado extremas para ser realizadas. La estructura geométrica de estos diseños se visualiza claramente en una figura que se presenta los 15 posibles tratamientos para tres factores, donde se sitúan los puntos medios entre los centros y las esquinas del espacio de diseño, evitando los vértices extremos como (1,1,1) y (-1,-1,-1) para evitar situaciones experimentales que resulten ser inviables. Esta particularidad asegura que los tratamientos se mantengan dentro de un rango operativo más seguro y controlable. A continuación, se muestra la matriz de diseño Box Behnken.

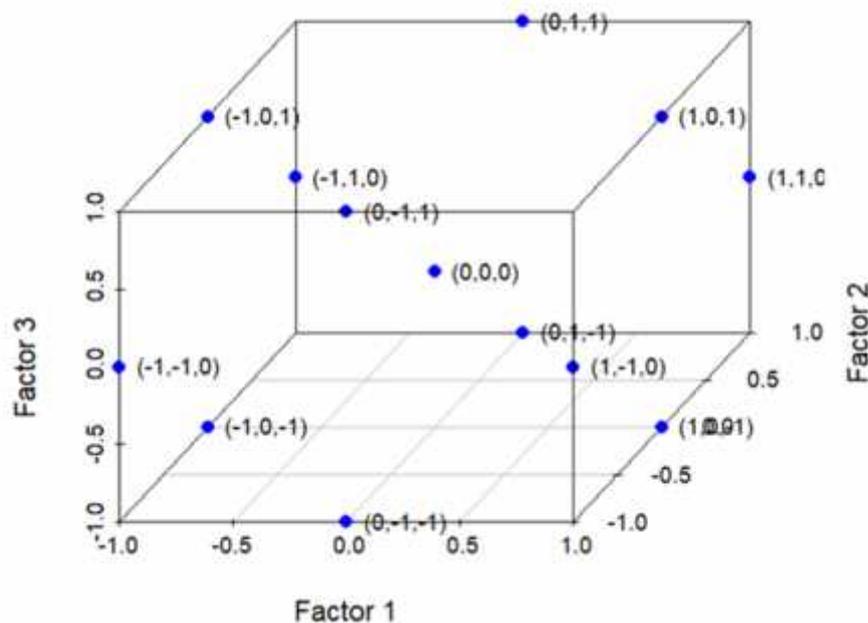
Tabla 8

Matriz del diseño Box-Behnken para tres factores (x_1 , x_2 , x_3) con 15 corridas experimentales

| Corrida | x_1 | x_2 | x_3 | Corrida | x_1 | x_2 | x_3 |
|---------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|
| 1 | -1 | -1 | 0 | 9 | -1 | 0 | -1 |
| 2 | 1 | -1 | 0 | 10 | 1 | 0 | -1 |
| 3 | -1 | 1 | 0 | 11 | -1 | 0 | 1 |
| 4 | 1 | 1 | 0 | 12 | 1 | 0 | 1 |
| 5 | 0 | -1 | -1 | 13 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 1 | -1 | 14 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | -1 | 1 | 15 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 0 | 1 | 1 | | | | |

Figura 20

Puntos experimentales en un diseño Box-Behnken de tres factores



3.7.2.5. Verificación de los Supuestos del Modelo de Superficie de Respuesta

3.7.2.5.1. Normalidad de los residuos

En el análisis de superficies de respuesta, la verificación de los supuestos del modelo es fundamental para garantizar la validez de las conclusiones estadísticas. Montgomery (2017) establece que uno de los supuestos críticos es que los errores sigan una distribución normal con media cero y varianza constante pero desconocida ². Para verificar este supuesto en modelos de superficie de respuesta, se analizan los residuales, definidos como la diferencia entre el valor observado y el valor predicho por el modelo polinomial ajustado ($e_{ij} = y_{ij} - \hat{y}_{ij}$). El cumplimiento del supuesto de normalidad puede evaluarse mediante métodos gráficos y pruebas estadísticas formales, siendo el gráfico de probabilidad normal de los residuales una de las herramientas más utilizadas en la metodología de superficie de respuesta.

3.7.2.5.1.1. Pruebas estadísticas para la verificación de la normalidad univariante de los residuos

La prueba de Shapiro-Wilk se distingue de otras pruebas de normalidad por no emplear la función de distribución acumulada empírica, siendo una de las más robustas para evaluar la normalidad de datos medidos en escala de intervalo. El procedimiento involucra el cálculo del denominador D mediante la suma de desviaciones cuadradas, el ordenamiento de observaciones, y la aplicación del estadístico W usando coeficientes específicos determinados por el tamaño muestral, donde la hipótesis nula establece que la distribución es normal (Porras, 2017).

El procedimiento para su cálculo:

Calcular el denominar D

$$D = \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2 = \sum_{i=1}^n X_i^2 - n\bar{X}^2$$

Ordenar la muestra de menor a mayor:

$X_{(1)} \leq X_{(2)} \leq \dots \leq X_{(n)}$; donde $X_{(i)}$ el i-ésimo estadístico de orden

Con la ayuda de la tabla de coeficientes de Shapiro Wilk, para el tamaño de muestra observado n, se obtienen los coeficientes a_1, a_2, \dots, a_k , donde k es aproximadamente n/2.

El estadístico de prueba es dado por:

$$W = \frac{1}{D} \left[\sum_{i=1}^k a_i (X_{(n-i+1)} - X_{(i)}) \right]^2$$

Hipótesis:

H₀: F(X) es una función de distribución normal.

H₁: F(X) no es una función de distribución normal.

La prueba de Anderson-Darling fundamenta su análisis en la comparación entre la distribución de probabilidades acumulada empírica y la distribución acumulada

teórica, requiriendo que las mediciones de los datos se encuentren al menos en una escala de intervalo (Porrás, 2017).

El estadístico de prueba está dado por A^2

$$A^2 = -n \cdot S$$

$$S = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (2i-1) [\ln F(Y_i) + \ln(1 - F(Y_{n+1-i}))] ; \text{ donde } n \text{ es el número de observaciones,}$$

mientras que $F(Y)$ es la función de distribución acumulada normal, calculada con la media y varianza determinadas a partir de la muestra. Los valores Y_i corresponden a las observaciones muestrales ordenadas de manera ascendente.

Definición de la Región crítica:

H_0 se rechaza con un nivel de significación α si A^2 es mayor que el valor crítico A_{crit}^2 . A continuación, se presenta una tabla para algunos valores de α :

| | | | | |
|--------------|-------|-------|-------|-------|
| α | 0.1 | 0.05 | 0.025 | 0.01 |
| A_{crit}^2 | 0.631 | 0.752 | 0.873 | 1.035 |

Hipótesis:

H_0 : $F(X)$ es una función de distribución normal.

H_1 : $F(X)$ no es una función de distribución normal.

3.7.2.5.1.2. Pruebas estadísticas para la verificación de la normalidad multivariante de los residuos

Prueba para la normalidad multivariada de Mardia

Según Mardia et al. (1979), da a conocer que si $X_{n \times d}$, presenta una distribución normal multivariada, la medida de asimetría (skewness) $S_{1,d} = 0$ y la medida de kurtosis $S_{2,d} = d(d+2)$, siendo los estimadores de $S_{1,d}$ y $S_{2,d}$, son respectivamente:

$$b_{1,d} = \frac{1}{n^2} \sum_{h=1}^n \sum_{i=1}^n g_{hi}^3$$

$$b_{2,d} = \frac{1}{n^2} \sum_{h=1}^n g_{ii}^2$$

Donde:

$$g_{hi} = \left(\underset{\sim}{X}_h - \underset{\sim}{\bar{X}} \right) S^{-1} \left(\underset{\sim}{X}_h - \underset{\sim}{\bar{X}} \right) = \frac{1}{n^2} \sum_{i=1}^n \sum_{i=1}^n \left[(x_i - \bar{x})' \hat{\Sigma}^{-1} (x_i - \bar{x}) \right]$$

$$S = \sum_{i=1}^n \left(\underset{\sim}{X}_i - \underset{\sim}{\bar{X}} \right) \left(\underset{\sim}{X}_i - \underset{\sim}{\bar{X}} \right)' / n$$

Además, Mardia manifiesta que bajo normalidad multivariada:

$$A = \frac{1}{6} n b_{1,d} \sim X_f^2, \text{ donde } f = \frac{1}{6} d(d+1)(d+2) \text{ y}$$

$$B = \frac{b_{2,d} - d(d+2)}{[8d(d+2)/n]^{1/2}} \sim N_1(0,1)$$

Al nivel de significancia α se prueban las siguientes hipótesis nulas:

$$a) \quad H_0 : A = \frac{1}{6} n b_{1,d} \sim X_f^2$$

$$b) \quad H_0 : B = \frac{b_{2,d} - d(d+2)}{[8d(d+2)/n]^{1/2}} \sim N_1(0,1)$$

Prueba de hipótesis de Asimetría Multivariante

Tomando en cuenta que $s_{1,d}$, representa el coeficiente de asimetría poblacional multivariante.

a) Formulación de la hipótesis nula e hipótesis alternativa:

Ho: $s_{1,d} = 0$ (Los datos presentan asimetría multivariante).

H1: $s_{1,d} \neq 0$ (Los datos no presentan asimetría multivariante).

b) Especificar el nivel de significación: $\alpha = 0.05$

c) Calcular el valor del estadístico de la prueba a partir de los datos de la muestra.

Estadístico de prueba:

$$A = \frac{1}{6}nb_{1,d} \sim X_f^2$$

Donde:

$$b_{1,d} = \frac{1}{n^2} \sum_{i=1}^n \sum_{i=1}^n \left[(x_i - \bar{x}) \hat{\Sigma}^{-1} (x_i - \bar{x}) \right]^3$$

Punto crítico (Valor tabular):

$$X_f^2 \text{ donde } f = \frac{1}{6}d(d+1)(d+2)$$

d) Toma de decisión:

Se acepta la H_0 , si $A \leq X_f^2$

Prueba de hipótesis de Kurtosis Multivariante

Identificando a $S_{2,d}$, como el coeficiente de Kurtosis poblacional multivariante.

a) Formulación de la hipótesis nula e hipótesis alternativa:

$H_0: S_{2,d} = d(d+2)$ (Los datos presentan Kurtosis multivariante).

$H_1: S_{2,d} \neq d(d+2)$ (Los datos no presentan Kurtosis multivariante).

b) Especificar el nivel de significación: $\alpha = 0.05$

c) Calcular el valor del estadístico de la prueba a partir de los datos de la muestra.

Estadístico de prueba:

$$B = \frac{b_{2,d} - d(d+2)}{[8d(d+2)/n]^{1/2}} \sim N_1(0,1)$$

Donde:

$$b_{2,d} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left[(x_i - \bar{x}) \hat{\Sigma}^{-1} (x_i - \bar{x}) \right]^2$$

Punto crítico (Valor tabular):

$$Z_0 = Z_{\frac{1+\alpha}{2}}$$

d) Toma de decisión:

Se acepta la H_0 , si $|B| \leq Z_0$

Prueba para la normalidad multivariada de Royston

La prueba de normalidad multivariada de Royston (1983) es una extensión de la prueba univariada de Shapiro-Wilk (1965). Para una muestra aleatoria de tamaño \bar{n} y dimensión \bar{k} , el estadístico se calcula de la siguiente manera:

Primero cálculo del estadístico W_j para cada variable j (donde $j=1, \dots, k$) utilizando el estadístico de Shapiro-Wilk:

$$W_j = \frac{\left(\sum_{i=1}^n a_i X_{(i)j} \right)^2}{\sum_{i=1}^n (X_{ij} - \bar{X}_j)^2}$$

Donde:

$X_{(i)j}$ son los componentes ordenados de la j -ésima variable.

$a = (a_1, \dots, a_n)$ es el vector de ponderaciones con los coeficientes lineales insesgados normalizados.

Transformación de W_j en Z_j :

$$Z_j = \frac{(1 - W_j)^{\dagger} - \sim^*}{\dagger}$$

Donde \dagger , \sim^* y \dagger se calculan según Royston:

Cálculo de T_j :

$$T_j = \left\{ w^{-1} \left[\frac{w(-Z_j)}{2} \right] \right\}^2$$

Donde $w(\cdot)$ es la función de distribución normal estándar acumulada.

Cálculo del estadístico G :

Si las variables son independientes, entonces:

$$G = \sum_{j=1}^k T_j$$

G sigue una distribución t^2 con k grados de libertad.

Ajuste para variables dependientes:

Si las variables no son independientes, se ajusta el estadístico utilizando grados de libertad equivalentes e:

$$H = eG$$

Donde:

$$\hat{e} = \frac{p}{[1 + (p-1)\bar{c}]}, \text{ donde } \bar{c} \text{ es una estimación para la correlación promedio entre las}$$

T_j .

3.2.5.2. Homocedasticidad de los residuos

La verificación de la homocedasticidad de los residuos es fundamental en la validación de modelos estadísticos. Montgomery (2017) señala que la ausencia de estructuras en los residuos y su independencia de otras variables son indicadores de un modelo apropiado. La violación de este supuesto se evidencia cuando la variabilidad de las observaciones incrementa con la magnitud de la medición, comprometiendo la validez de las inferencias estadísticas.

3.7.2.5.2.1. Prueba estadística para la verificación de la homocedasticidad de los residuos

La prueba de Breusch-Pagan, desarrollada por Breusch y Pagan (1980), es un test de multiplicador de Lagrange utilizado para detectar la heterocedasticidad en un modelo de regresión. Específicamente, la prueba evalúa si la varianza de los errores depende de las variables explicativas del modelo (Baltagi, 2008).

H_0 : Los errores presentan varianza constante (No hay heterocedasticidad).

H_1 : La varianza de los errores no es constante (Hay heteroscedasticidad).

Estadístico de la prueba:

$$LM = \left(\frac{NT}{2(T-1)} \right) \left[\left(\frac{\sum_{i=1}^N e_i^2}{\sum_{i=1}^N \sum_{t=1}^T e_{it}^2} \right) - 1 \right]^2$$

Donde:

N: Número de individuos o unidades de observación.

T: Número de períodos de tiempo.

e_{it} :Residuos estimados del modelo para el individuo i en el tiempo t.

e_i^2 :Suma de los residuos al cuadrado para el individuo i.

3.7.2.5.3. Independencia de los residuos

La verificación de la independencia de los residuos es fundamental en el análisis estadístico de diseños experimentales. Montgomery (2017) señala que la detección de correlación entre residuos mediante su representación temporal es crucial, pues los patrones consecutivos de residuos positivos y negativos indican una violación de independencia, comprometiendo la validez de las inferencias estadísticas. Por ello, la aleatorización durante el diseño experimental es esencial para garantizar la independencia de las observaciones y la robustez del análisis.

3.7.2.5.3.1. Prueba estadística para la verificación de la independencia de los residuos

La prueba de Durbin-Watson es un método estadístico diseñado específicamente para la detección de autocorrelación en los datos, un fenómeno donde los valores de la variable dependiente muestran una relación secuencial (Y_n con Y_{n-1}), situación comúnmente observada en series temporales. El estadístico D de Durbin-Watson proporciona información sobre el tipo de autocorrelación presente: valores elevados del estadístico indican una autocorrelación negativa, mientras que valores reducidos señalan una autocorrelación positiva (Álvarez Cáceres, 1994).

Ho: No hay autocorrelación en los residuos.

H1: Existe autocorrelación en los residuos.

$$D = \frac{\sum_{t=2}^N (E_t - E_{t-1})^2}{\sum_{t=1}^N E_t^2}$$

Donde:

E_t son los residuos del modelo en el tiempo t ,

N , es el número total de observaciones.

3.7.2.5.4. Diagnóstico de multicolinealidad en el modelo de regresión

En el proceso de validación de modelos de regresión múltiple, la multicolinealidad representa un problema que afecta la sensibilidad de los coeficientes de regresión, manifestándose cuando las variables independientes están altamente correlacionadas. Para su detección, uno de los métodos más efectivos es el Factor de Inflación de la Varianza (VIF), que se calcula mediante la expresión:

$VIF_i = \frac{1}{1 - r_i^2}$, donde r_i^2 es el coeficiente de determinación obtenido al regresar la i -

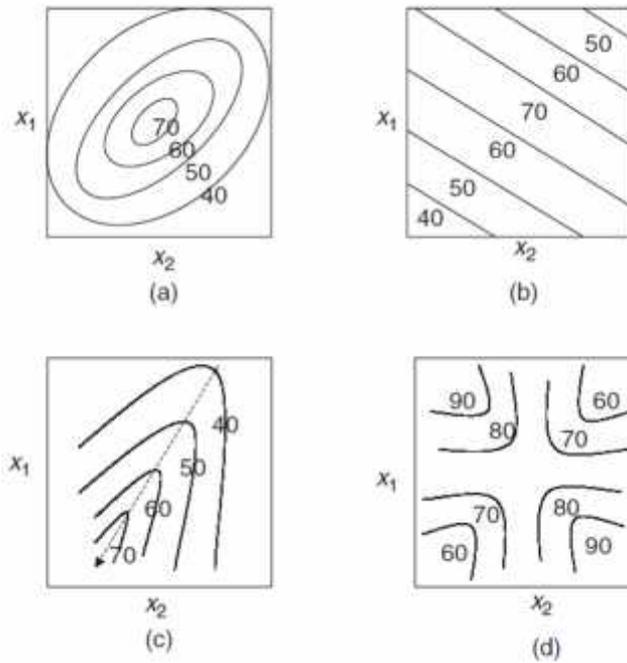
ésima variable independiente sobre las demás variables explicativas. Cuando el VIF es superior a 10, se considera que la variable contribuye significativamente a la multicolinealidad del modelo, sugiriendo su posible eliminación en el proceso de depuración (Gavilánez Luna, 2021).

3.7.2.6. Gráfica de Contornos de Superficie de Respuesta

La gráfica de contornos de superficies de respuesta es una representación visual que muestra cómo varía una función de dos variables sobre un plano al mantener constante una tercera variable. Esta representación es útil para visualizar la forma y las características de la superficie de respuesta en un estudio experimental. Según (Montgomery, 2017), la gráfica de contornos es una herramienta importante en el análisis de datos experimentales para comprender la relación entre las variables y optimizar los procesos.

Figura 21

Contornos de la superficie de respuesta en dos factores: (a) máximo "en forma de montículo", (b) cresta estacionaria, (c) cresta ascendente, y (d) silla de montar estacionario. Fuente: Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar (2012)



3.7.3. Técnica de optimización simultánea de multirespuesta con funciones de deseabilidad para diseños óptimos

El método tiene sus orígenes en los trabajos de Harrington en 1965, y posteriormente fue refinado y mejorado a través de las contribuciones de Derringer y Suich en 1980, con una actualización adicional por parte de Derringer en 1994.

La técnica se en la conversión de la variable y_i en una función denominada función de deseabilidad individual d_i , cuyo valor varía entre 0 y 1, de modo que alcance la mayor proximidad de la respuesta a un valor ambicionado o deseado.

$$0 \leq d_i \leq 1$$

Cuando y_i consigue el valor deseado, por tanto, $d_i=1$, caso contrario con la respuesta obtenida se encuentra fuera de un intervalo de tolerancia deseado, entonces $d_i=0$. Finalmente, en base de las deseabilidades individuales, se logrará obtener la deseabilidad general (D), donde cada d_i se elegirá para lograr maximizar D:

$$D = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_m)^{1/m}$$

Donde m corresponde al número de variables respuesta.

Cabe destacar que, si alguna de las funciones de la deseabilidad individual presenta un valor 0, la deseabilidad total también será cero.

Cuando el objetivo (T) es maximizar una variable respuesta, la función deseabilidad individual está determinada por:

$$d = \begin{cases} 0 & y < L \\ \left(\frac{y-L}{T-L}\right)^r & L \leq y \leq T \\ 1 & y > T \end{cases}$$

Siendo L, el límite mínimo, y r el valor de peso asociado. Si $r=1$, la función de deseabilidad corresponde a una función lineal (ver figura 2). Seleccionar $r>1$, logrará una cercanía máxima posible al valor objetivo.

Cuando el objetivo es la búsqueda de la minimización de una respuesta y, la función de deseabilidad individual estará definida como:

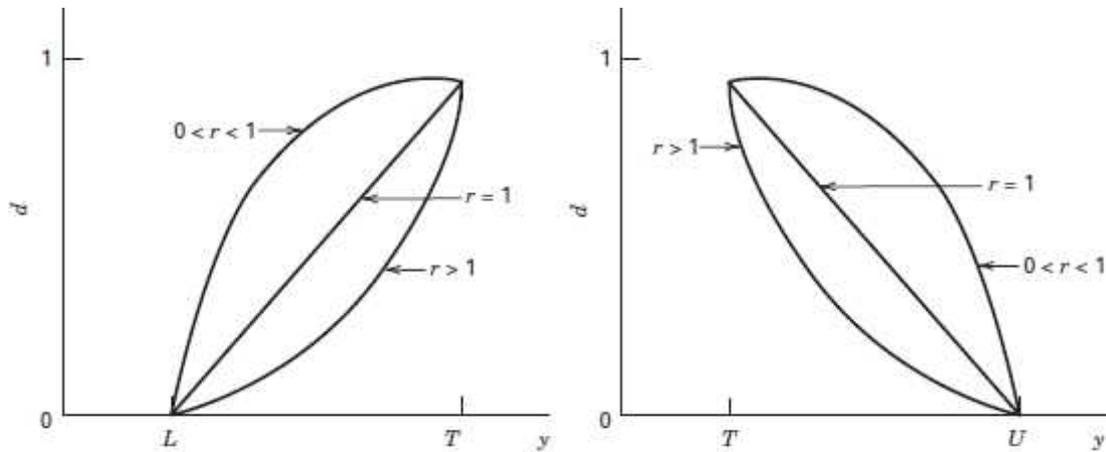
$$y < T$$

$$d = \begin{cases} 1 & T \leq y \leq U \\ \left(\frac{U-y}{U-T}\right)^r & y > U \\ 0 & y < L \end{cases}$$

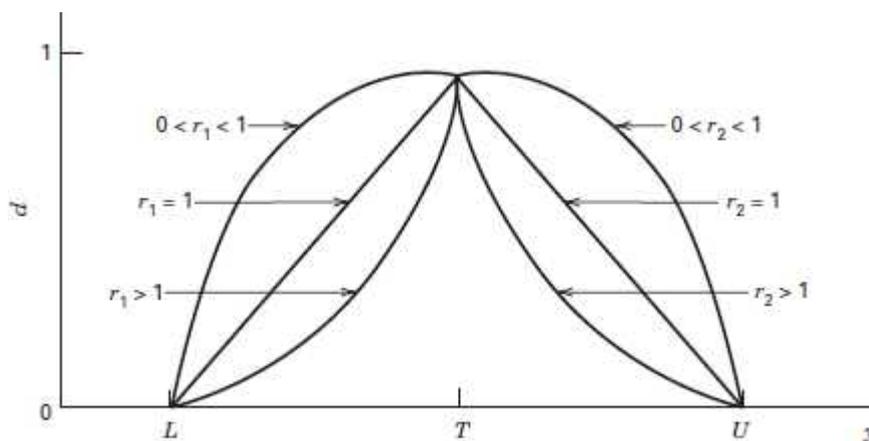
donde U, representa el límite máximo. El límite mínimo y máximo lo fija el experimentador en correspondencia de los valores que el investigador los considere oportunos.

Figura 22

Funciones de deseabilidad individual para optimización simultánea de varias respuestas.



(a) El objetivo (target) es maximizar “y” (b) El objetivo (target) es minimizar “y”



(c) El objetivo es que “y”, esté lo más cerca posible la meta.

Cuando las variables de respuesta no tienen la misma importancia en el proceso de optimización, es necesario asignar un peso específico a cada una de ellas. Este peso refleja su relevancia dentro del análisis y permite obtener una medida de deseabilidad global más representativa. En estos casos, la deseabilidad global se calcula mediante la media geométrica ponderada de las deseabilidades individuales, lo que garantiza que las respuestas más críticas tengan una mayor influencia en la optimización del sistema. Matemáticamente, la deseabilidad global ponderada se expresa como:

$$D = \left(d_1^{w_1} x d_2^{w_2} x \dots x d_k^{w_k} \right)^{1/\sum w_i}$$

Donde:

d_i : Deseabilidad individual de cada variable de respuesta.

w_i : Peso asignado a cada deseabilidad individual, reflejando su nivel de importancia en la optimización.

k : Número total de respuestas evaluadas.

$\sum w_i$: Pesos asignados a todas las variables de respuesta.

3.7.4. Criterios de Optimalidad en el Diseño Experimental

Los criterios de optimalidad en el diseño de experimentos son herramientas estadísticas fundamentales para evaluar y comparar la eficiencia de diferentes diseños experimentales. Montgomery (2017) describe cuatro criterios principales: El criterio D-optimalidad, que minimiza el determinante de la matriz de varianza-covarianza del estimador, siendo el más utilizado en la práctica; es decir:

El criterio de D-optimalidad busca maximizar: $Max|(X' X)|$.

El criterio A-optimalidad, que se enfoca en minimizar la suma de las varianzas de los coeficientes de regresión; cumpliendo que: $A = \min tr((X' X)^{-1})$, el diseño es A-óptimo si minimiza la suma de los elementos de la diagonal principal de $(X' X)^{-1}$.

El criterio G-optimalidad, que se basa en minimizar la máxima varianza de predicción en la región de diseño; así tenemos:

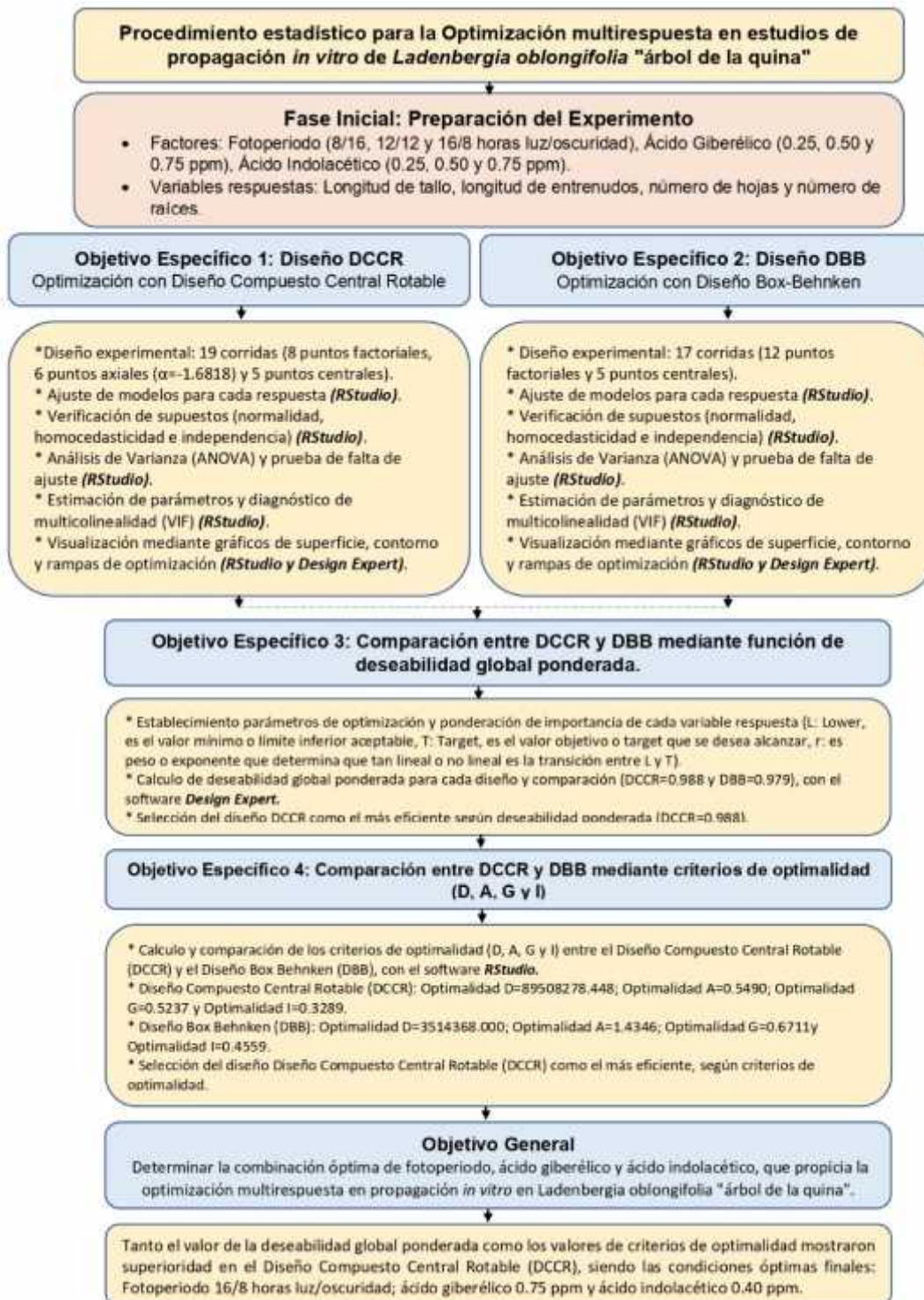
$$\min \left(\max \left(\frac{NV \left[\hat{y}(x) \right]}{\dagger^2} \right) \right)$$

El criterio I-optimalidad, es más apropiado cuando el objetivo experimental primario es predecir una respuesta y determinar condiciones óptimas de operación, donde la predicción precisa tiene precedencia sobre la estimación precisa de los parámetros" (JMP Statistical Software, 2024).

$$I = \min \int_R Var \left[\hat{y}(x) \right] dx,$$

Figura 23

Procedimiento estadístico empleado para la optimización multirespuesta en la propagación in vitro de Ladenbergia oblongifolia "árbol de la quina", integrando los diseños DCCR y DBB evaluados mediante función de deseabilidad global y criterios de optimalidad



IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 9

*Medidas estadísticas de las variables respuestas en los diseños evaluados en estudios de propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"*

| Diseño DCCR | | | | | | |
|---------------------------|---------------------|---------------|------------|------------|-----------------|-------------|
| Variable respuesta | Nombre | Unidad | Mín | Máx | Promedio | D.E. |
| Y1 | Longitud de tallo | cm. | 4.80 | 5.30 | 5.14 | 0.13 |
| Y2 | Longitud entrenudos | mm. | 0.40 | 1.00 | 0.80 | 0.17 |
| Y3 | Número de hojas | ud. | 3.00 | 8.00 | 5.21 | 1.27 |
| Y4 | Número de raíces | ud. | 2.00 | 7.00 | 5.05 | 1.22 |
| Diseño DBB | | | | | | |
| Variable respuesta | Nombre | Unidad | Mín | Máx | Promedio | D.E. |
| Y1 | Longitud de tallo | cm. | 4.40 | 5.30 | 4.90 | 0.26 |
| Y2 | Longitud entrenudos | mm. | 0.30 | 0.90 | 0.59 | 0.22 |
| Y3 | Número de hojas | ud. | 3.00 | 7.00 | 5.24 | 1.09 |
| Y4 | Número de raíces | ud. | 2.00 | 8.00 | 4.71 | 1.76 |

D.E.: Desviación estándar

DCCR: Diseño Compuesto Central Rotable; DBB: Diseño Box Behnken

La tabla 9 correspondiente a los estadísticos descriptivos para *Ladenbergia oblongifolia* revela comportamientos diferenciales entre los diseños DCCR y DBB para las variables respuesta evaluadas. En el diseño DCCR, la longitud de tallo presentó un promedio de 5.14 cm con una desviación estándar de 0.13, mientras que en el diseño DBB alcanzó 4.90 cm con una desviación de 0.26; la longitud de entrenudos mostró promedios de 0.80 mm y 0.59 mm con desviaciones de 0.17 y 0.22 para DCCR y DBB respectivamente. En cuanto al número de hojas, ambos diseños exhibieron promedios similares (5.21 y 5.24 unidades), aunque con diferentes variabilidades (D.E. de 1.27 y 1.09); finalmente, el número de raíces registró promedios de 5.05 unidades en DCCR y 4.71 en DBB, con desviaciones estándar de 1.22 y 1.76 respectivamente, evidenciando una mayor variabilidad en el diseño DBB para esta última variable. Según Saber et al (2021), el diseño DCCR permite una estimación más precisa de los coeficientes cuadráticos gracias a la inclusión de puntos axiales. No obstante, su implementación requiere un mayor número de corridas experimentales, lo que incrementa tanto el costo como el tiempo del experimento. A su favor, presenta una menor varianza en la predicción

a lo largo de toda la región experimental (Bhattacharya et al., 2020). Por otro lado, Contreras et al (2023) y Farji & Luque (2024), sostienen que el diseño DBB emplea combinaciones de niveles medios y extremos sin necesidad de un diseño factorial completo, lo que conlleva una mayor varianza en los bordes del espacio experimental. A pesar de que requiere un menor número de ensayos, destaca por su alta eficiencia, permitiendo optimizar costos, recursos y tiempo en el procesamiento de la información. En consecuencia, el uso de DBB reduce la cantidad de ensayos sin comprometer significativamente su capacidad predictiva (Rama et al., 2023).

Tabla 10

*Modelos de superficie de respuesta e indicadores de ajuste estadístico del Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR), de la propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"*

| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Longitud del tallo (Y₁) | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------|
| Estructura del modelo de regresión: Y₁ ~ FO(x₁, x₂, x₃) + TWI(x₁, x₂, x₃) + PQ(x₃) | | |
| Longitud de tallo (Y ₁) = 5.175444 + 0.041604X ₁ + 0.080878X ₂ - 0.012315X ₃ - 0.100000X ₁ X ₂ + 0.075000X ₁ X ₃ + 0.050000X ₂ X ₃ - 0.046382X ₃ ² | R-cuadrado ajustado | 0.821 |
| | p-valor* | 0.000 |
| | p-valor (Falta de ajuste)** | 0.480 |
| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Longitud de entrenudos (Y₂) | | |
| Estructura del modelo de regresión: Y₂ ~ FO(x₁, x₂, x₃) + TWI(x₁, x₂) | | |
| Longitud de entrenudos (Y ₂) = 0.800000 + 0.107837X ₁ - 0.056249X ₂ + 0.093193X ₃ + 0.100000X ₁ X ₂ | R-cuadrado ajustado | 0.745 |
| | p-valor* | 0.000 |
| | p-valor (Falta de ajuste)** | 0.540 |
| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Número de hojas (Y₃) | | |
| Estructura del modelo de regresión: Y₃ ~ FO(x₁, x₂, x₃) + TWI(x₁, x₂) + TWI(x₁, x₃) | | |
| Número de hojas (Y ₃) = 5.21053 + 0.68563X ₁ - 0.26959X ₂ + 0.53919X ₃ + 1.00000X ₁ X ₂ - 0.75000X ₁ X ₃ | R-cuadrado ajustado | 0.750 |
| | p-valor* | 0.000 |
| | p-valor (Falta de ajuste)** | 0.197 |
| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Número de raíces (Y₄) | | |
| Estructura del modelo de regresión: Y₄ ~ FO(x₁, x₂, x₃) + TWI(x₁, x₂) + TWI(x₁, x₃) | | |
| Número de raíces = 5.05263 + 0.75886X ₁ - 0.34282X ₂ + 0.61241X ₃ + 0.87500X ₁ X ₂ - 0.62500X ₁ X ₃ | R-cuadrado ajustado | 0.840 |
| | p-valor* | 0.000 |
| | p-valor (Falta de ajuste)** | 0.435 |

Nota: La ecuación final se encuentra en términos de Factores Codificados, donde X₁ representa el fotoperíodo, X₂ el ácido giberélico y X₃ el ácido indolacético. Los modelos presentados corresponden a las variables respuesta: longitud del tallo (Y₁), longitud de entrenudos (Y₂), número de hojas (Y₃) y número de raíces (Y₄), respectivamente.

* El p-valor del modelo < 0.05 indica alta significancia estadística del modelo ajustado.

** El p-valor (Falta de ajuste) o lack of fit > 0.05 indica que el modelo presenta un ajuste adecuado para describir el comportamiento de los datos experimentales.

El análisis de los modelos de superficie de respuesta exhibido en la tabla 10, para *Ladenbergia oblongifolia* demuestra ajustes estadísticamente significativos, evidenciados por valores p de 0.000 en todas las variables estudiadas. Las ecuaciones de regresión exhiben coeficientes de determinación (R² ajustado) satisfactorios, donde la variable número de raíces (Y₄) presenta el mejor ajuste con

0.840, seguida por la longitud del tallo (Y_1) con 0.821, mientras que el número de hojas (Y_3) y longitud de entrenudos (Y_2) muestran valores de 0.750 y 0.745 respectivamente. La falta de ajuste no significativa ($p>0.05$) en todos los modelos, con valores que oscilan entre 0.197 y 0.540, confirma la adecuada representación del comportamiento experimental mediante las ecuaciones polinomiales establecidas, validando así la robustez de los modelos generados en términos de factores codificados para el diseño DCCR. Según Acosta et al (2021), esta técnica es altamente flexible, ya que permite emplear diversos diseños experimentales y herramientas estadísticas para abordar problemas de optimización en procesos biológicos y químicos. Su enfoque se basa en analizar la relación entre variables independientes (factores) y una variable de respuesta. Es importante destacar que el éxito en la resolución del problema depende en gran medida de la elección adecuada del diseño experimental. Además, puede aplicarse tanto a la optimización de una única respuesta como a múltiples respuestas de manera simultánea, dependiendo de la estructura del problema y la existencia de restricciones (Cano et al., 2023).

Tabla 11

*Análisis de varianza (ANOVA) y prueba de falta de ajuste para los modelos de superficie de respuesta del Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR), de la propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"*

| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Longitud del tallo (Y₁) | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|------------------|
| Componente del modelo de regresión | Valor F | Pr(>F) |
| FO(x1, x2, x3) | 11.7958 | 0.001 |
| TWI(x1, x2, x3) | 14.8675 | 0.000 |
| PQ(x3) | 9.3860 | 0.011 |
| p-valor (Falta de ajuste) * | 1.1314 | 0.480 |
| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Longitud de entrenudos (Y₂) | | |
| Componente del modelo de regresión | Valor F | Pr(>F) |
| FO(x1, x2, x3) | 15.0577 | 0.000 |
| TWI(x1, x2) | 11.2711 | 0.005 |
| p-valor (Falta de ajuste)* | 1.0196 | 0.540 |
| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Número de hojas (Y₃) | | |
| Componente del modelo de regresión | Valor F | Pr(>F) |
| FO(x1, x2, x3) | 9.3509 | 0.001 |
| TWI(x1, x2) | 19.7157 | 0.001 |
| TWI(x1, x3) | 11.0901 | 0.005 |
| p-valor (Falta de ajuste)* | 2.4861 | 0.197 |
| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Número de raíces (Y₄) | | |
| Componente del modelo de regresión | Valor F | Pr(>F) |
| FO(x1, x2, x3) | 20.3574 | 0.000 |
| TWI(x1, x2) | 25.6361 | 0.000 |
| TWI(x1, x3) | 13.0797 | 0.003 |
| p-valor (Falta de ajuste)* | 1.2811 | 0.435 |

*El p-valor (Falta de ajuste) o lack of fit > 0.05 indica que el modelo presenta un ajuste adecuado para describir el comportamiento de los datos experimentales.

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de la tabla 11, para los modelos de superficie de respuesta del Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR) en la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* reveló la significancia estadística de todos los componentes evaluados. Los valores F elevados y los p-valores menores a 0.05 para los efectos principales FO(x1, x2, x3), las interacciones TWI y los términos cuadráticos PQ, confirman que estos factores ejercen influencias estadísticamente significativas sobre las variables respuesta, particularmente, las interacciones TWI(x1, x2, x3) en la longitud del tallo presentaron un valor F de 14.8675 ($p < 0.001$), mientras que los efectos principales para la longitud de

entrenados mostraron $F = 15.0577$ ($p < 0.001$), evidenciando relaciones robustas entre los factores experimentales y las respuestas morfogénicas evaluadas, lo cual valida la adecuación de los modelos para describir el comportamiento experimental del sistema estudiado (Marenco & Antezana, 2021). La validación estadística mediante ANOVA proporciona confianza en las predicciones del modelo y respalda su aplicabilidad para la optimización de condiciones de cultivo *in vitro* en especies forestales nativas como *Ladenbergia oblongifolia*, en concordancia con estudios recientes en optimización de cultivos de tejidos vegetales (Taneja et al., 2024).

Tabla 12

*Estimación de parámetros y factores de inflación de la varianza (VIF) para los modelos de superficie de respuesta del Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR), de la propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"*

| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Longitud del tallo (Y₁) | | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|----------------|--------------------|--------------|
| Efecto | Estimación | Valor t | Pr(> t) | V.I.F |
| (Intercepción) | 5.175444 | 304.1652 | 0.000 | - |
| x1 | 0.041604 | 2.6965 | 0.021 | 1.000 |
| x2 | 0.080878 | 5.2421 | 0.000 | 1.000 |
| x3 | -0.012315 | -0.7982 | 0.442 | 1.000 |
| x1:x2 | -0.100000 | -4.9607 | 0.000 | 1.000 |
| x1:x3 | 0.075000 | 3.7205 | 0.003 | 1.000 |
| x2:x3 | 0.050000 | 2.4803 | 0.031 | 1.000 |
| x3 ² | -0.046382 | -3.0637 | 0.011 | 1.000 |
| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Longitud de entrenudos (Y₂) | | | | |
| Efecto | Estimación | Valor t | Pr(> t) | V.I.F |
| (Intercepción) | 0.800000 | 41.3908 | 0.000 | - |
| x1 | 0.107837 | 4.7302 | 0.000 | 1.000 |
| x2 | -0.056249 | -2.4673 | 0.027 | 1.000 |
| x3 | 0.093193 | 4.0878 | 0.001 | 1.000 |
| x1:x2 | 0.100000 | 3.3572 | 0.005 | 1.000 |
| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Número de hojas (Y₃) | | | | |
| Efecto | Estimación | Valor t | Pr(> t) | V.I.F |
| (Intercepción) | 5.21053 | 35.6549 | 0.000 | - |
| x1 | 0.68563 | 3.9777 | 0.002 | 1.000 |
| x2 | -0.26959 | -1.5640 | 0.141 | 1.000 |
| x3 | 0.53919 | 3.1281 | 0.008 | 1.000 |
| x1:x2 | 1.00000 | 4.4402 | 0.001 | 1.000 |
| x1:x3 | -0.75000 | -3.3302 | 0.005 | 1.000 |
| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Número de raíces (Y₄) | | | | |
| Efecto | Estimación | Valor t | Pr(> t) | V.I.F |
| (Intercepción) | 5.05263 | 45.0576 | 0.000 | - |
| x1 | 0.75886 | 5.7373 | 0.000 | 1.000 |
| x2 | -0.34282 | -2.5919 | 0.022 | 1.000 |
| x3 | 0.61241 | 4.6301 | 0.000 | 1.000 |
| x1:x2 | 0.87500 | 5.0632 | 0.000 | 1.000 |
| x1:x3 | -0.62500 | -3.6166 | 0.003 | 1.000 |

La tabla 12, en mención a la estimación de parámetros en los modelos de superficie de respuesta de *Ladenbergia oblongifolia* revela efectos significativos ($Pr > |t| < 0.05$) para la mayoría de los términos evaluados, con factores de inflación de varianza (VIF) óptimos de 1.000 para todas las variables, indicando ausencia de multicolinealidad. Los efectos lineales y las interacciones dobles mostraron

particular relevancia estadística, destacándose en la longitud del tallo las interacciones $x_1 \cdot x_3$ y $x_2 \cdot x_3$ ($Pr>|t| = 0.003$ y 0.031 respectivamente), mientras que, para la longitud de entrenudos, todas las variables e interacciones resultaron significativas con $Pr>|t| < 0,05$. En el número de hojas, sobresalen los efectos de x_1 ($Pr>|t| = 0.002$) y la interacción $x_1 \cdot x_2$ ($Pr>|t| = 0.001$), en tanto que, para el número de raíces, los términos x_1 , x_3 y sus interacciones exhibieron alta significancia estadística ($Pr>|t| < 0.01$), respaldando la robustez y confiabilidad del modelo ajustado (Marengo & Antezana, 2021). Los valores $VIF = 1.000$ confirman que las variables independientes no presentan correlaciones problemáticas entre sí, garantizando la estabilidad de los coeficientes estimados y la validez de las inferencias estadísticas, lo cual es fundamental para la confiabilidad de las predicciones del modelo de optimización (Allison, 2023).

Tabla 13

*Análisis de los residuos para los modelos de superficie de respuesta del Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR), de la propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"*

| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Longitud del tallo (Y₁) | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|----------------|
| Prueba estadística | Estadístico de prueba | p-valor |
| Shapiro-Wilk | 0.9626 | 0.6251 |
| Anderson-Darling | 0.3366 | 0.4679 |
| Breusch-Pagan | 4.5688 | 0.7124 |
| Durbin-Watson | 1.4137 | 0.1557 |
| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Longitud de entrenudos (Y₂) | | |
| Prueba estadística | Estadístico de prueba | p-valor |
| Shapiro-Wilk | 0.9819 | 0.9624 |
| Anderson-Darling | 0.1437 | 0.9627 |
| Breusch-Pagan | 4.5712 | 0.3342 |
| Durbin-Watson | 1.9459 | 0.5467 |
| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Número de hojas (Y₃) | | |
| Prueba estadística | Estadístico de prueba | p-valor |
| Shapiro-Wilk | 0.9623 | 0.6187 |
| Anderson-Darling | 0.3736 | 0.3811 |
| Breusch-Pagan | 1.1834 | 0.9465 |
| Durbin-Watson | 1.4211 | 0.2062 |
| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Número de raíces (Y₄) | | |
| Prueba estadística | Estadístico de prueba | p-valor |
| Shapiro-Wilk | 0.9416 | 0.2814 |
| Anderson-Darling | 0.4448 | 0.2538 |
| Breusch-Pagan | 1.1200 | 0.9523 |
| Durbin-Watson | 1.7564 | 0.4707 |

El análisis de residuos de la tabla 13, para los modelos de superficie de respuesta en la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* demuestra el cumplimiento satisfactorio de los supuestos estadísticos fundamentales. Las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y Anderson-Darling exhiben p-valores superiores a 0.05 para todas las variables respuesta, oscilando entre 0.2814 y 0.9627, confirmando la distribución normal de los residuos. Rodríguez et al (2023), sostiene que en experimentos biológicos el no considerar el supuesto de normalidad es un

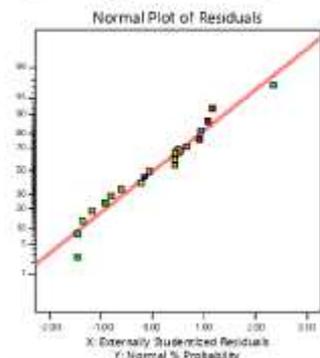
error frecuente que puede generar inconsistencias en los resultados del análisis de varianza, para prevenirlo, es recomendable emplear la prueba de Shapiro-Wilk, para demostrar si un conjunto de datos sigue una distribución normal o no, por tanto, su precisión depende de contar con un número adecuado de observaciones en la muestra (Liang et al., 2009; Monter et al., 2023). Flores & Flores (2021) sostienen que estas pruebas permiten determinar si la población de la que proviene la muestra sigue la distribución normal, identificación que resulta clave para la aplicación del procedimiento estadístico adecuado para el análisis de los datos en un determinado estudio. La homocedasticidad, evaluada mediante la prueba de Breusch-Pagan, presenta p-valores entre 0.3342 y 0.9523, validando la homogeneidad de varianzas (Li & Yao., 2019), mientras que el estadístico de Durbin-Watson, con p-valores comprendidos entre 0.1557 y 0.5467, confirma la independencia de las observaciones, cumpliendo así con todos los supuestos del análisis de regresión (Villota & Daza, 2022).

Figura 24

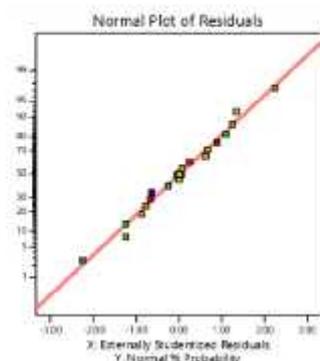
*Evaluación de normalidad de residuos mediante gráficos Q-Q y pruebas de normalidad para los modelos de superficie de respuesta del Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR), de la propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"*

Longitud del tallo (Y_1) **Longitud de entrenudos (Y_2)**

Shapiro-Wilk normality test, $W = 0.96263$, $p\text{-value} = 0.6251$
Anderson-Darling normality test, $A = 0.3366$, $p\text{-value} = 0.4679$

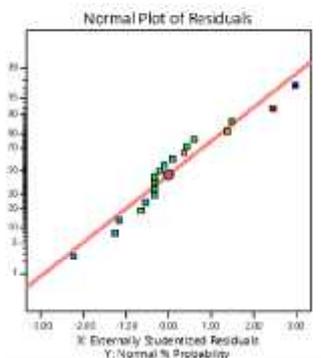


Shapiro-Wilk normality test, $W = 0.98193$, $p\text{-value} = 0.9624$
Anderson-Darling normality test, $A = 0.14372$, $p\text{-value} = 0.9627$

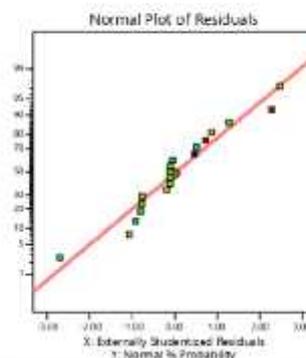


Número de hojas (Y_3) **Número de raíces (Y_4)**

Shapiro-Wilk normality test, $W = 0.96232$, $p\text{-value} = 0.6187$
Anderson-Darling normality test, $A = 0.37361$, $p\text{-value} = 0.3811$



Shapiro-Wilk normality test, $W = 0.94157$, $p\text{-value} = 0.2814$
Anderson-Darling normality test, $A = 0.44482$, $p\text{-value} = 0.2538$



Los gráficos Q-Q y las pruebas de normalidad aplicadas a los residuos de las variables respuesta en el estudio de *Ladenbergia oblongifolia* visualizado en la figura 24, confirman la adecuación del supuesto de normalidad en los modelos ajustados. Los diagramas evidencian una alineación consistente de los puntos a lo largo de la línea de referencia, respaldada por los resultados de las pruebas Shapiro-Wilk, que arrojan p-valores de 0.6251, 0.9624, 0.6187 y 0.2814 para longitud del tallo, longitud de entrenudos, número de hojas y número de raíces, respectivamente. Jaramillo et al (2023), sostiene que el gráfico Q-Q es un método

visual que contrasta los cuantiles teóricos de una distribución normal con los cuantiles de los residuos del modelo. Si los puntos se alinean con la línea diagonal, esto sugiere que los residuos siguen una distribución normal. Esta conclusión se fortalece con los resultados de la prueba Anderson-Darling, cuyos p-valores oscilan entre 0.2538 y 0.9627, superando ampliamente el nivel de significancia de 0.05, lo que permite establecer que los residuos siguen una distribución normal para todas las variables analizadas (Luzuriaga et al., 2023), cumpliendo así con todos los supuestos del análisis de regresión y proporcionando confianza en la validez de las predicciones del modelo de superficie de respuesta.

Tabla 14

*Pruebas de normalidad multivariante para los residuos del Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR), de la propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"*

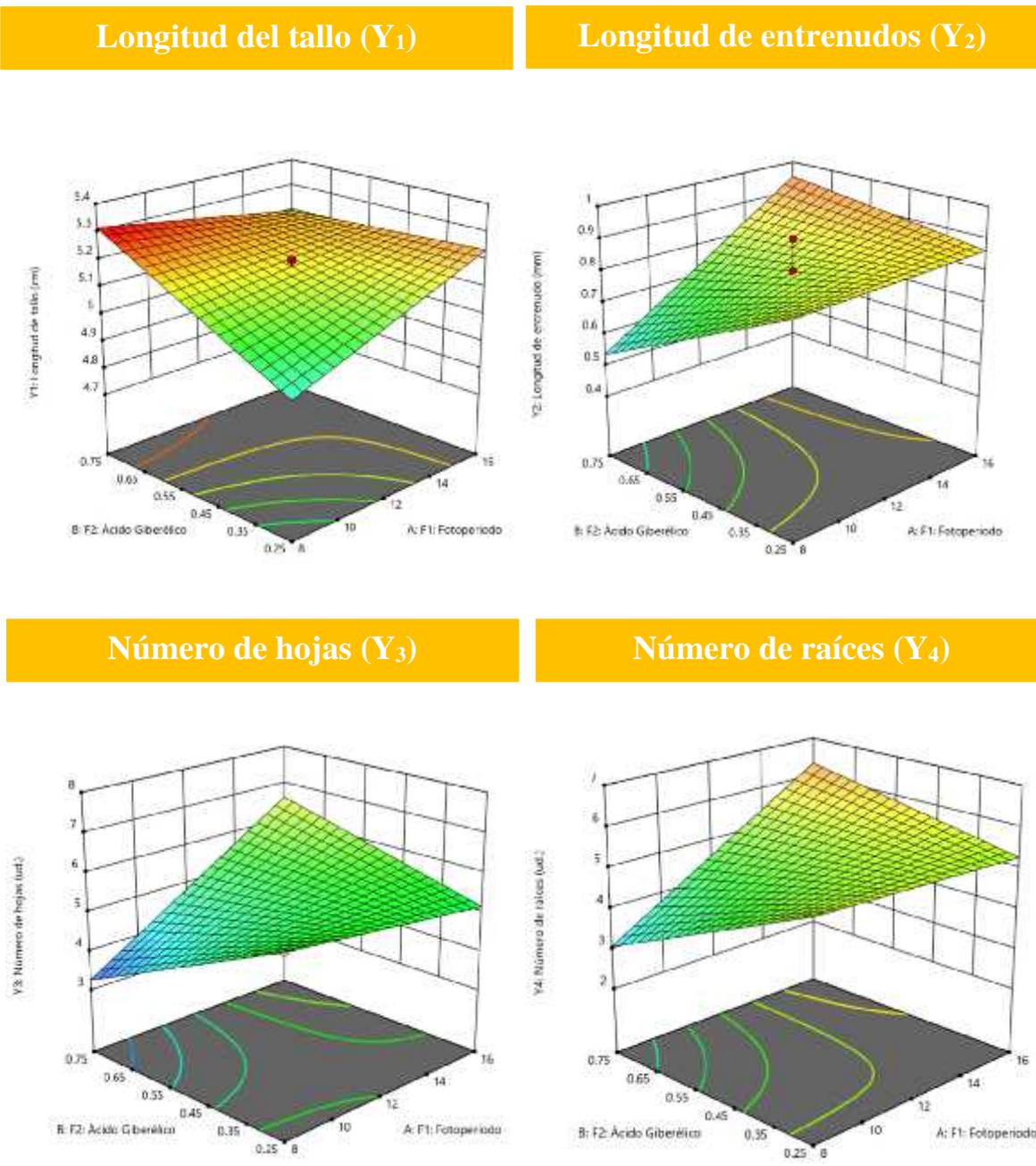
| Test de normalidad | Estadístico | p-valor |
|---------------------------|--------------------|----------------|
| Mardia Asimetría | 20.5228 | 0.4257 |
| Mardia Kurtosis | -1.2315 | 0.2181 |
| Royston | 2.3519 | 0.6549 |

Las pruebas de normalidad multivariante aplicadas a los residuos del diseño DCCR en el estudio de propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia*, según se visualiza en la tabla 14, demuestran un comportamiento normal conjunto de los datos. Los test de Mardia para asimetría y curtosis presentan p-valores de 0.4257 y 0.2181 respectivamente, mientras que la prueba de Royston exhibe un p-valor de 0.6549, todos superiores al nivel de significancia de 0.05, confirmando así que la distribución conjunta de los residuos cumple satisfactoriamente con el supuesto de normalidad multivariante necesario para la validez del análisis de superficie de respuesta. Esta verificación es esencial para seleccionar el procedimiento estadístico adecuado en el análisis de los datos de un estudio y para llevar a cabo la contrastación de hipótesis, siempre que sea necesario confirmar previamente el supuesto de normalidad (Lozano, 2024), además Henze y Jiménez-Gamero (2021) destacan que las pruebas de normalidad multivariante, como las de Mardia y Royston, constituyen herramientas indispensables para validar estos supuestos en contextos multidimensionales. Asimismo, en estudios de optimización experimental

aplicados al ámbito biotecnológico, como los desarrollados por Reji y Kumar (2023), el cumplimiento riguroso de estos supuestos fortalece significativamente la confiabilidad de las predicciones y mejora la robustez del modelo ajustado, proporcionando mayor solidez metodológica a los resultados obtenidos.

Figura 25

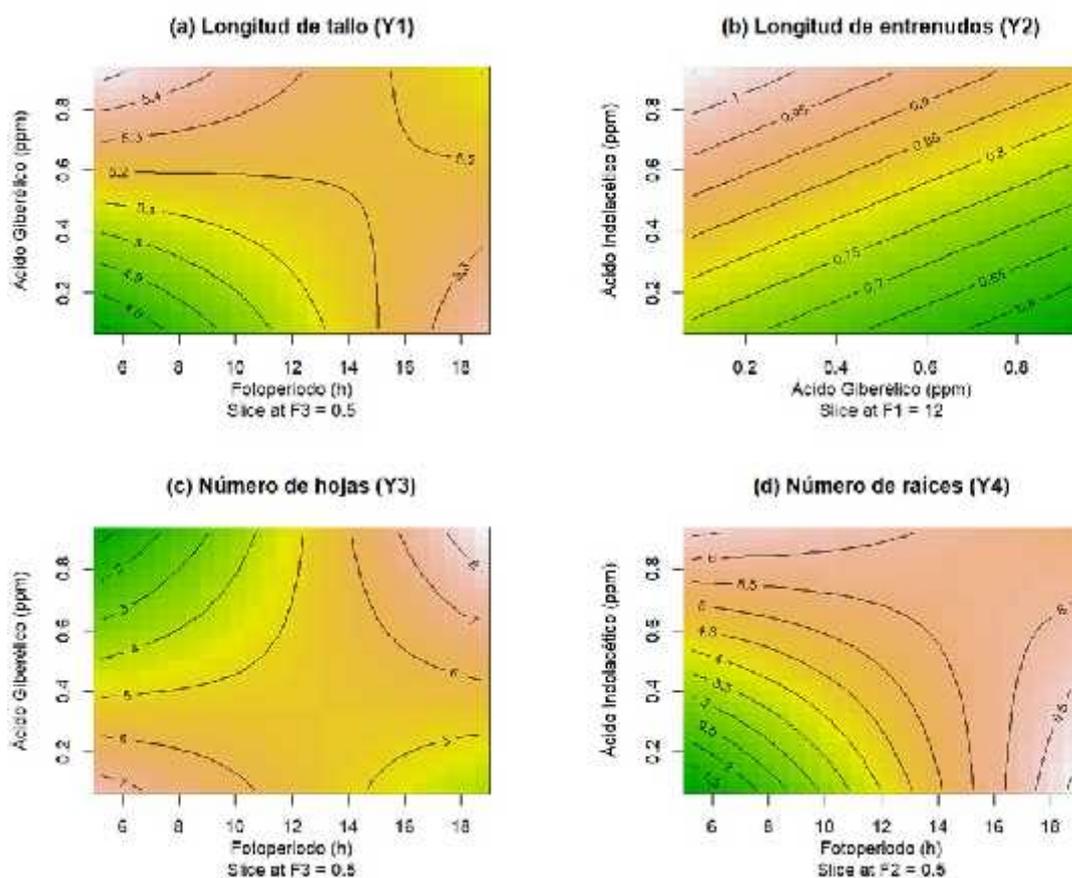
*Representación tridimensional de los modelos de superficie de respuesta del Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR), de la propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"*



De la figura 25, las superficies de respuesta tridimensionales para *Ladenbergia oblongifolia* muestran patrones de interacción distintivos entre el fotoperíodo (F1) y el ácido giberélico (F2). La longitud del tallo (Y1) exhibe una superficie con tendencia ascendente hacia los niveles máximos de ambos factores, mientras que la longitud de entrenudos (Y2) presenta una pendiente gradual con optimización en niveles intermedios-altos. El número de hojas (Y3) muestra una superficie con incremento progresivo hacia valores altos de fotoperíodo y niveles medios de ácido giberélico, en tanto que el número de raíces (Y4) evidencia una respuesta más pronunciada con una superficie que alcanza su punto óptimo en la región de mayor fotoperíodo y concentración media-alta de ácido giberélico, lo cual se refleja en las curvas de contorno correspondientes en la base de cada gráfico. Este resultado es evidencia de la interacción entre el ácido giberélico y el fotoperíodo, ambos son factores clave en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas, ya que ambos influyen sobre procesos fisiológicos como la germinación, elongación del tallo, floración y desarrollo de frutos. En el caso de la longitud del tallo y entrenudos, donde se expresa niveles máximos de ambos factores (ácido giberélico y el fotoperíodo), se debe a que ambos factores inciden en la activación de enzimas que movilizan reservas energéticas hacia zonas meristemáticas, donde hay mayor actividad metabólica y división celular. Por otro lado el número de hojas y de raíces parcialmente se ven influenciados por ambos factores (ácido giberélico y el fotoperíodo), en el caso del número de hojas el fotoperíodo es más favorecedor al promover su desarrollo, de la misma manera el número de raíces, un fotoperíodo adecuado favorece el crecimiento radical al regular el balance hormonal del ápice radical (Cervera & Castro, 2024; Torres, 2021; Sinchi, 2024).

Figura 26

Gráfico de contornos de los modelos de superficie de respuesta del Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR), de la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"

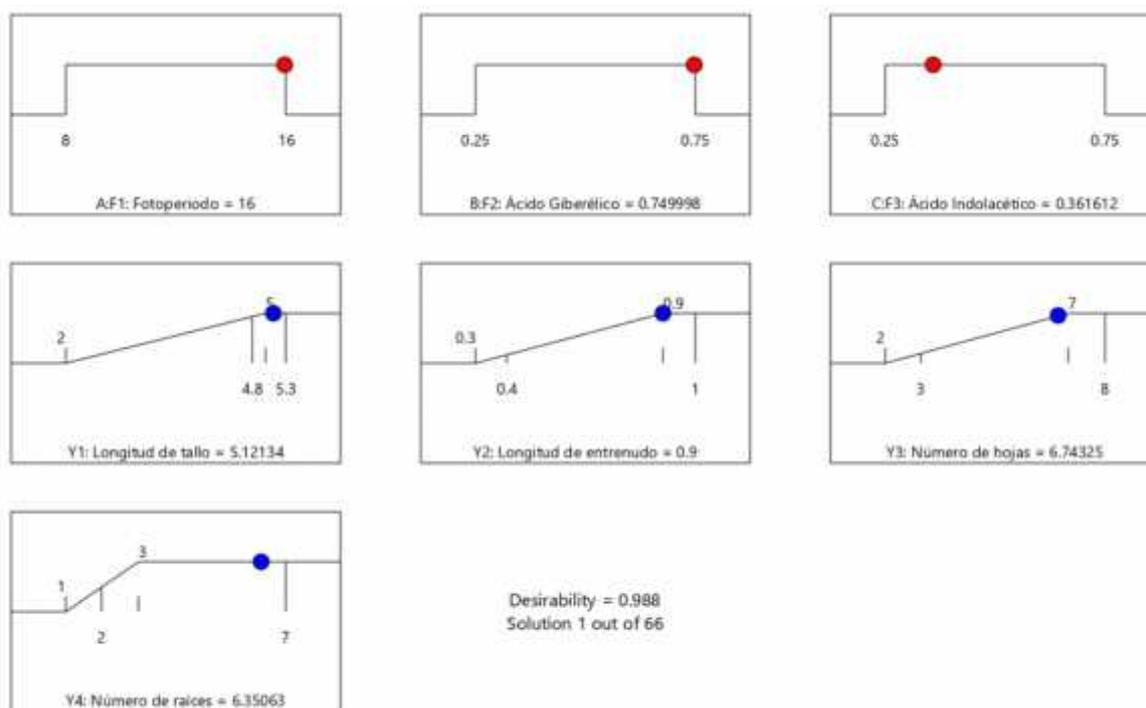


Los gráficos de contorno obtenidos a partir del Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR) para la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia*, según se visualiza en la figura 26, proporcionan una representación visual clara de las interacciones complejas entre el fotoperíodo, el ácido giberélico y el ácido indolacético sobre las variables respuesta evaluadas. El análisis de los contornos revela que el incremento del fotoperíodo y las concentraciones de reguladores de crecimiento favorece significativamente la maximización de las respuestas morfológicas, siendo particularmente evidente en la longitud del tallo (Y1) y el número de hojas (Y3), donde se observan valores óptimos cuando se combinan fotoperíodos prolongados con niveles elevados de ácido giberélico. Esta respuesta sinérgica es consistente con los hallazgos de Zhang et al. (2024), quienes demostraron que el

ácido giberélico y el fotoperíodo actúan colaborativamente para modular el crecimiento vegetal mediante la integración de cascadas transcripcionales que regulan la elongación celular y el desarrollo foliar. La interpretación de los patrones de isolíneas confirma la existencia de interacciones no lineales entre los factores estudiados, especialmente evidentes en la longitud de entrenudos (Y2) y el número de raíces (Y4), donde se observa un comportamiento ascendente a medida que aumentan las concentraciones de ácido indolacético y ácido giberélico. Según *Frontiers in Plant Science* (2024), la regulación lumínica en cultivos *in vitro* no solo afecta la fotosíntesis, sino que también modula respuestas fotomorfogénicas críticas para el desarrollo vegetal, incluyendo la proliferación celular, la expansión foliar y el desarrollo estomático. La visualización mediante contornos permite identificar regiones específicas del espacio experimental donde las respuestas alcanzan valores óptimos, proporcionando una herramienta valiosa para la toma de decisiones en la optimización de protocolos biotecnológicos. La utilización de gráficos de contorno en la metodología de superficie de respuesta representa una aproximación robusta para visualizar relaciones multifactoriales complejas en sistemas biológicos. Como señala IntechOpen (2024) en su análisis sobre la aplicación del diseño compuesto central con Design Expert, esta herramienta de visualización facilita la identificación de condiciones óptimas de proceso sin necesidad de realizar experimentos adicionales extensivos. Estos resultados reflejan que la optimización del crecimiento en esta especie depende de la adecuada combinación de los factores estudiados, destacando la importancia de maximizar las condiciones lumínicas y hormonales en el proceso de propagación. Una condición lumínica óptima en cuanto a horas luz y oscuridad estimula la fotosíntesis, a su vez la fotosíntesis permite la generación de almidón, el cual es un polisacárido de reserva que se almacena en sus tejidos. Si bien el almidón no influye directamente como una hormona de crecimiento, este carbohidrato influye en el alargamiento de brotes al ser una fuente de energía para el desarrollo de las plantas (Guillén et al., 2022; Pérez, 2021).

Figura 27

Reporte de rampas de la optimización numérica de los niveles convenientes de fotoperíodo, ácido giberélico y ácido indolacético del Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR), de la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina", obtenidos mediante la función de deseabilidad global ponderada



De la figura 27, observamos que la optimización simultánea de las variables respuesta en la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* alcanza una deseabilidad global de 0.988, que según Springer (2024), valores de deseabilidad superiores a 0.97 en diseños de composición central indican condiciones altamente optimizadas, identificando como condiciones óptimas un fotoperíodo de 16 horas luz/8 oscuridad (F1), una concentración de ácido giberélico de 0.749998 ppm (F2) y ácido indolacético de 0.361612 ppm (F3). El fotoperíodo prolongado de 16 horas es consistente con los hallazgos de NCBI (2024) en estudios de regeneración *in vitro* de *Citrus assamensis*, donde se demostró que un fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad resultó óptimo para la regeneración de brotes, mientras que la oscuridad continua favorecía únicamente la producción de callos. La concentración optimizada de ácido giberélico (0.75 ppm) en combinación con ácido indolacético (0.36 ppm) se encuentra dentro del rango reportado por Scientific Reports (2024) para la micropropagación eficiente de especies forestales

amenazadas como *Magnolia sirindhorniae*, donde combinaciones similares de reguladores de crecimiento demostraron ser efectivas para la conservación *ex situ* y comercialización sostenible de especies arbóreas de alto valor ornamental y ecológico. Bajo estas condiciones, el modelo predice valores optimizados de 5.12134 cm para longitud de tallo, 0.9 mm para longitud de entrenudos, 6.74325 unidades para número de hojas y 6.35063 unidades para número de raíces, representando la solución más favorable entre 66 combinaciones evaluadas para maximizar el desarrollo morfogénico *in vitro* de la especie. Hernández et al (2021), sostiene que para el cultivo *in vitro* , concentraciones superiores de 0.5 ppm de ácido giberélico es favorable para inducir a un máximo alargamiento de entrenudos. A su vez la presencia de dosis menores de ácido indolacético complementa el alargamiento celular , maximizandose el tamaño de la plantula(Nogueira et al., 2024).

Tabla 15

Modelos de superficie de respuesta e indicadores de ajuste estadístico del Diseño Box-Behnken (DBB), de la propagación in vitro de Ladenbergia oblongifolia "árbol de la quina"

| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Longitud del tallo (Y₁) | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------|
| Estructura del modelo de regresión: Y₁ ~ FO(x₁, x₂, x₃) + TWI(x₁, x₂) + PQ(x₁, x₂) | | |
| Longitud de tallo (Y ₁) = 4.952632 + 0.137500X ₁ + 0.125000X ₂ - 0.137500X ₃ + 0.150000X ₁ X ₂ - 0.268421X ₁ ² + 0.156579X ₂ ² | R-cuadrado ajustado | 0.769 |
| | p-valor* | 0.000 |
| | p-valor (Falta de ajuste)** | 0.085 |
| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Longitud de entrenudos (Y₂) | | |
| Estructura del modelo de regresión: Y₂ ~ FO(x₁, x₂, x₃) + TWI(x₁, x₂, x₃) + PQ(x₁) | | |
| Longitud de entrenudos (Y ₂) = 0.688889 + 0.150000X ₁ + 0.137500X ₂ - 0.087500X ₃ + 0.075000X ₁ X ₂ - 0.125000X ₁ X ₃ + 0.150000X ₂ X ₃ - 0.213889X ₁ ² | R-cuadrado ajustado | 0.919 |
| | p-valor* | 0.000 |
| | p-valor (Falta de ajuste)** | 0.167 |
| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Número de hojas (Y₃) | | |
| Estructura del modelo de regresión: Y₃ ~ FO(x₁, x₂, x₃) + TWI(x₁, x₂) + TWI(x₁, x₃) + PQ(x₁) | | |
| Número de hojas (Y ₃) = 5.55556 + 1.12500X ₁ + 0.25000X ₂ - 0.12500X ₃ + 0.50000X ₁ X ₂ + 0.75000X ₁ X ₃ - 0.68056X ₁ ² | R-cuadrado ajustado | 0.740 |
| | p-valor* | 0.002 |
| | p-valor (Falta de ajuste)** | 0.503 |
| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Número de raíces (Y₄) | | |
| Estructura del modelo de regresión: Y₄ ~ FO(x₁, x₂, x₃) + TWI(x₁, x₃) + TWI(x₂, x₃) + PQ(x₁, x₂, x₃) | | |
| Número de raíces (Y ₄) = 5.40000 + 1.37500X ₁ + 1.00000X ₂ - 0.87500X ₃ - 0.75000X ₁ X ₃ + 1.00000X ₂ X ₃ - 1.07500X ₁ ² + 0.67500X ₂ ² - 1.07500X ₃ ² | R-cuadrado ajustado | 0.901 |
| | p-valor* | 0.000 |
| | p-valor (Falta de ajuste)** | 0.485 |

Nota: La ecuación final se encuentra en términos de Factores Codificados, donde X₁ representa el fotoperíodo, X₂ el ácido giberélico y X₃ el ácido indolacético. Los modelos presentados corresponden a las variables respuesta: longitud del tallo (Y₁), longitud de entrenudos (Y₂), número de hojas (Y₃) y número de raíces (Y₄), respectivamente.

* El p-valor del modelo < 0.05 indica alta significancia estadística del modelo ajustado.

** El p-valor (Falta de ajuste) > 0.05 indica que el modelo presenta un ajuste adecuado para describir el comportamiento de los datos experimentales.

La tabla 15 muestran que los modelos de superficie de respuesta del Diseño Box-Behnken para *Ladenbergia oblongifolia* presentan ajustes estadísticamente significativos, evidenciados por p-valores menores a 0.05 en todas las variables estudiadas. Los coeficientes de determinación ajustados (R^2 ajustado) revelan una alta capacidad predictiva, destacando la longitud de entrenudos y el número de raíces con valores de 0.919 y 0.901 respectivamente, seguidos por la longitud del tallo (0.769) y el número de hojas (0.740). El modelo para la longitud del tallo (Y_1) presenta un R^2 ajustado de 0.769 con p-valor < 0.001 , indicando que el 77% de la variabilidad puede ser explicada por las variables del modelo. Para la longitud de entrenudos (Y_2), se obtuvo el mayor R^2 ajustado (0.919) con p-valor < 0.001 , sugiriendo una excelente capacidad predictiva. El número de hojas (Y_3) mostró un R^2 ajustado de 0.740 ($p = 0.002$), mientras que el número de raíces (Y_4) alcanzó 0.901 ($p < 0.001$). Estos resultados son consistentes con estudios recientes que han aplicado diseños experimentales avanzados para optimizar la micropropagación *in vitro* (Singh & Sood, 2020). La falta de ajuste no significativa en todos los modelos, con p-valores que oscilan entre 0.085 y 0.503, confirma la adecuada representación de las relaciones funcionales entre los factores experimentales y las variables respuesta mediante las ecuaciones polinomiales de segundo orden establecidas (Vivanco & Nieto, 2021).

Tabla 16

*Análisis de varianza (ANOVA) y prueba de falta de ajuste para los modelos de superficie de respuesta del Diseño Box-Behnken (DBB), de la propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"*

| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Longitud del tallo (Y₁) | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|------------------|
| Estructura del modelo: Y₁ ~ FO(x₁, x₂, x₃) + TWI(x₁, x₂) + PQ(x₁, x₂) | | |
| Componente del modelo de regresión | Valor F | Pr(>F) |
| FO(x ₁ , x ₂ , x ₃) | 9.2961 | 0.003 |
| TWI(x ₁ , x ₂) | 5.8712 | 0.036 |
| PQ(x ₁ , x ₂) | 12.6953 | 0.002 |
| p-valor (Falta de ajuste)* | 4.4430 | 0.085 |
| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Longitud de entrenudos (Y₂) | | |
| Estructura del modelo: Y₂ ~ FO(x₁, x₂, x₃) + TWI(x₁, x₂, x₃) + PQ(x₁) | | |
| Componente del modelo de regresión | Valor F | Pr(>F) |
| FO(x ₁ , x ₂ , x ₃) | 32.3588 | 0.000 |
| TWI(x ₁ , x ₂ , x ₃) | 14.4275 | 0.001 |
| PQ(x ₁) | 47.9219 | 0.000 |
| p-valor (Falta de ajuste)* | 2.8389 | 0.167 |
| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Número de hojas (Y₃) | | |
| Estructura del modelo: Y₃ ~ FO(x₁, x₂, x₃) + TWI(x₁, x₂) + TWI(x₁, x₃) + PQ(x₁) | | |
| Componente del modelo de regresión | Valor F | Pr(>F) |
| FO(x ₁ , x ₂ , x ₃) | 11.5695 | 0.001 |
| TWI(x ₁ , x ₂) | 3.2287 | 0.103 |
| TWI(x ₁ , x ₃) | 7.2646 | 0.022 |
| PQ(x ₁) | 6.3334 | 0.031 |
| p-valor (Falta de ajuste)* | 1.0540 | 0.503 |
| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Número de raíces (Y₄) | | |
| Estructura del modelo: Y₄ ~ FO(x₁, x₂, x₃) + TWI(x₁, x₃) + TWI(x₂, x₃) + PQ(x₁, x₂, x₃) | | |
| Componente del modelo de regresión | Valor F | Pr(>F) |
| FO(x ₁ , x ₂ , x ₃) | 31.8367 | 0.000 |
| TWI(x ₁ , x ₃) | 7.3469 | 0.027 |
| TWI(x ₂ , x ₃) | 13.0612 | 0.007 |
| PQ(x ₁ , x ₂ , x ₃) | 12.6034 | 0.002 |
| p-valor (Falta de ajuste)* | 1.0417 | 0.485 |

*El p-valor (Falta de ajuste) o lack of fit > 0.05 indica que el modelo presenta un ajuste adecuado para describir el comportamiento de los datos experimentales.

La tabla 16, en consideración al análisis de varianza para los modelos de superficie de respuesta del Diseño Box-Behnken en *Ladenbergia oblongifolia* revela alta significancia estadística (Pr>F) < 0.05) para la mayoría de los componentes evaluados. En la longitud del tallo, los efectos lineales y cuadráticos muestran Pr>F

de 0.003 y 0.002 respectivamente, mientras que la longitud de entrenados exhibe valores altamente significativos ($Pr > F = 0.000$) para todos sus componentes. El número de hojas presenta significancia en los efectos principales ($Pr > F = 0.001$) y en la interacción TWI(x_1, x_3) con $Pr > F = 0.022$, en tanto que el número de raíces muestra significancia en todos sus términos con $Pr > F = 0.027$. La evaluación de la falta de ajuste resulta no significativa en todas las variables ($p > 0.05$), validando la adecuación de los modelos polinomiales para describir el comportamiento experimental y garantizando la confiabilidad de las predicciones derivadas del análisis (Cocârlea et al., 2024). Por lo tanto, el uso de pruebas paramétricas facilita una visión global de la población, permitiendo realizar comparaciones y predicciones precisas. En los sistemas biológicos, una de las pruebas más utilizadas es el Análisis de Varianza (ANOVA), que evalúa las diferencias entre las medias de dos o más grupos para determinar si son estadísticamente significativas. Este método se fundamenta en el análisis de la variabilidad entre los grupos en relación con la variabilidad dentro de ellos (Mayorga et al., 2022; Villavicencio et al., 2023).

Tabla 17

*Estimación de parámetros y factores de inflación de la varianza (VIF) para los modelos de superficie de respuesta del Diseño Box-Behnken (DBB), de la propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"*

| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Longitud del tallo (Y₁) | | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|----------------|--------------------|--------------|
| Efecto | Estimación | Valor t | Pr(> t) | V.I.F |
| (Intercepción) | 4.952632 | 100.6691 | 0.000 | - |
| x1 | 0.137500 | 3.1412 | 0.010 | 1.000 |
| x2 | 0.125000 | 2.8556 | 0.017 | 1.000 |
| x3 | -0.137500 | -3.1412 | 0.010 | 1.000 |
| x1:x2 | 0.150000 | 2.4231 | 0.036 | 1.000 |
| X1^2 | -0.268421 | -4.4548 | 0.001 | 1.003 |
| X2^2 | 0.156579 | 2.5986 | 0.027 | 1.003 |
| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Longitud de entrenudos (Y₂) | | | | |
| Efecto | Estimación | Valor t | Pr(> t) | V.I.F |
| (Intercepción) | 0.688889 | 32.5018 | 0.000 | - |
| x1 | 0.150000 | 6.6723 | 0.000 | 1.000 |
| x2 | 0.137500 | 6.1162 | 0.000 | 1.000 |
| x3 | -0.087500 | -3.8922 | 0.004 | 1.000 |
| x1:x2 | 0.075000 | 2.3590 | 0.043 | 1.000 |
| x1:x3 | -0.125000 | -3.9317 | 0.003 | 1.000 |
| x2:x3 | 0.150000 | 4.7180 | 0.001 | 1.000 |
| x1^2 | -0.213889 | -6.9226 | 0.000 | 1.000 |
| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Número de hojas (Y₃) | | | | |
| Efecto | Estimación | Valor t | Pr(> t) | V.I.F |
| (Intercepción) | 5.55556 | 29.9476 | 0.000 | - |
| x1 | 1.12500 | 5.7176 | 0.000 | 1.000 |
| x2 | 0.25000 | 1.2706 | 0.233 | 1.000 |
| x3 | -0.12500 | -0.6353 | 0.540 | 1.000 |
| x1:x2 | 0.50000 | 1.7969 | 0.103 | 1.000 |
| x1:x3 | 0.75000 | 2.6953 | 0.022 | 1.000 |
| x1^2 | -0.68056 | -2.5166 | 0.031 | 1.000 |
| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Número de raíces (Y₄) | | | | |
| Efecto | Estimación | Valor t | Pr(> t) | V.I.F |
| (Intercepción) | 5.40000 | 21.8193 | 0.000 | - |
| x1 | 1.37500 | 7.0276 | 0.000 | 1.000 |
| x2 | 1.00000 | 5.1110 | 0.001 | 1.000 |
| x3 | -0.87500 | -4.4721 | 0.002 | 1.000 |
| x1:x3 | -0.75000 | -2.7105 | 0.027 | 1.000 |
| x2:x3 | 1.00000 | 3.6140 | 0.007 | 1.000 |
| x1^2 | -1.07500 | -3.9860 | 0.004 | 1.006 |
| x2^2 | 0.67500 | 2.5028 | 0.037 | 1.006 |
| x3^2 | -1.07500 | -3.9860 | 0.004 | 1.006 |

Según la tabla 17, correspondiente a la estimación de parámetros para los modelos de superficie de respuesta del Diseño Box-Behnken en *Ladenbergia oblongifolia* exhibe significancia estadística ($Pr>|t| < 0.05$) para la mayoría de los términos evaluados. La longitud de entrenudos muestra particular robustez con todos sus parámetros significativos ($Pr>|t| = 0.043$), mientras que en la longitud del tallo destacan los efectos lineales y cuadráticos ($Pr>|t|$ entre 0.001 y 0.017). Para el número de hojas, resultan significativas las interacciones $x_1 \cdot x_3$ y el término cuadrático x_1^2 ($Pr>|t| = 0.022$ y 0.031, respectivamente), en tanto que el número de raíces presenta significancia en todos sus componentes ($Pr>|t| = 0.037$), con factores de inflación de varianza (VIF) óptimos cercanos a 1.000 para todas las variables, indicando ausencia de multicolinealidad en los modelos ajustados. Los parámetros y el factor de inflación de la varianza (VIF) permiten detectar la colinealidad entre las variables independientes. La colinealidad ocurre cuando dos o más variables predictoras presentan una alta correlación. En este caso, se señala la ausencia de multicolinealidad, lo que indica que las variables independientes en este modelo de regresión no están fuertemente relacionadas entre sí. La ausencia de multicolinealidad, evidenciada por los factores de inflación de varianza (VIF) cercanos a 1.000 para todas las variables independientes, constituye un aspecto crítico para la validez del modelo estadístico. Según DataCamp (2024), valores de VIF próximos a 1.0 indican que no existe correlación problemática entre las variables predictoras, garantizando la estabilidad de los coeficientes estimados y la confiabilidad de las inferencias estadísticas. Esta característica es particularmente relevante en estudios biotecnológicos donde múltiples factores pueden interactuar de manera compleja, como lo señalan Ahmad et al. (2024) en su investigación sobre optimización de protoplastos de *Salsola laricifolia* mediante diseño Box-Behnken. Como resultado, la estabilidad de los coeficientes y la interpretación del modelo no se ven afectadas (Contreras, 2021; Marengo & Antezana, 2021).

Tabla 18

*Análisis de los residuos para los modelos de superficie de respuesta del Diseño Box-Behnken (DBB), de la propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"*

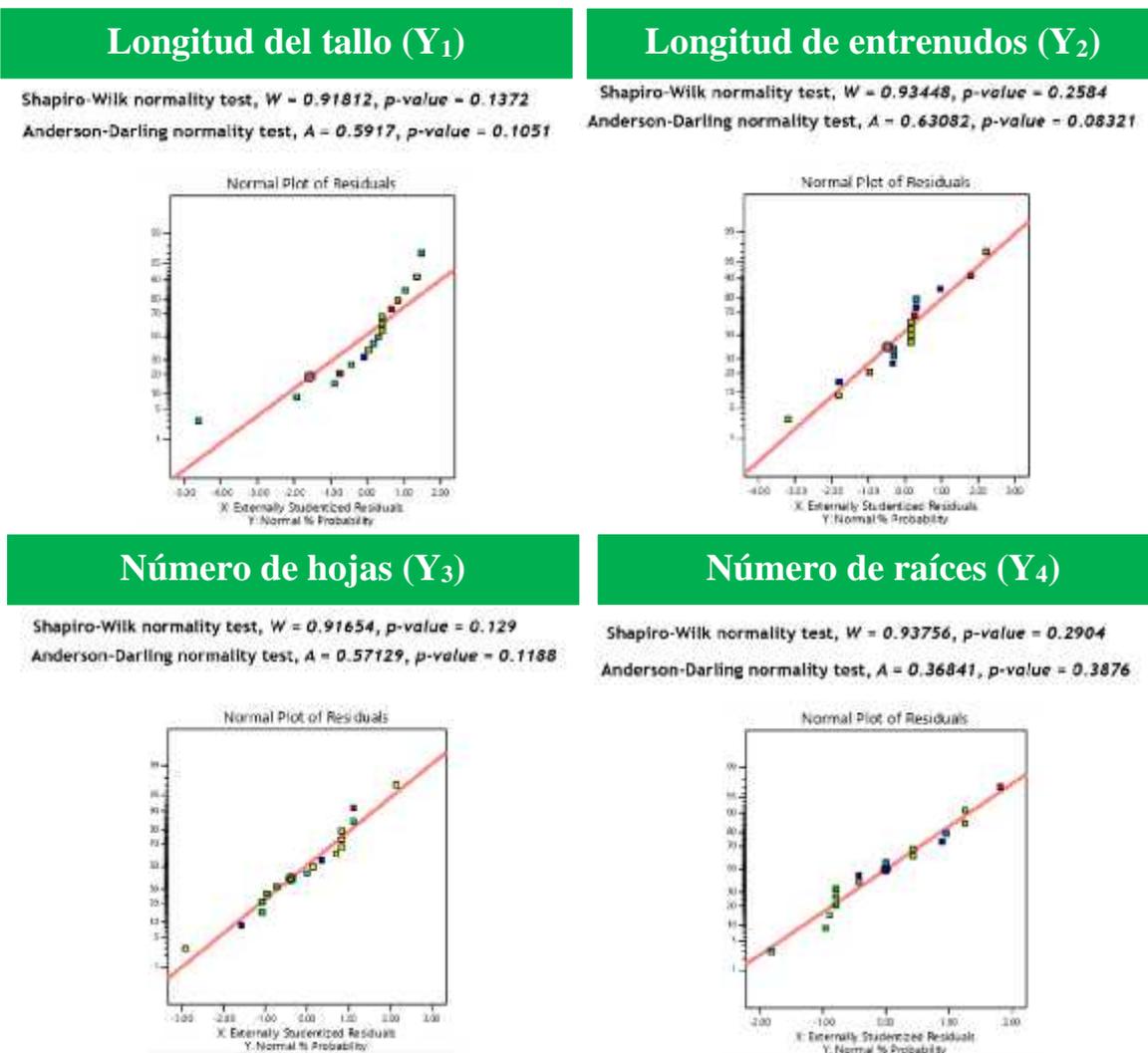
| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Longitud del tallo (Y₁) | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|----------------|
| Prueba estadística | Estadístico de prueba | p-valor |
| Shapiro-Wilk | 0.9181 | 0.1372 |
| Anderson-Darling | 0.5917 | 0.1051 |
| Breusch-Pagan | 2.7070 | 0.9514 |
| Durbin-Watson | 1.1072 | 0.0519 |
| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Longitud de entrenudos (Y₂) | | |
| Prueba estadística | Estadístico de prueba | p-valor |
| Shapiro-Wilk | 0.9345 | 0.2584 |
| Anderson-Darling | 0.6308 | 0.0832 |
| Breusch-Pagan | 7.4378 | 0.5916 |
| Durbin-Watson | 2.3061 | 0.5557 |
| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Número de hojas (Y₃) | | |
| Prueba estadística | Estadístico de prueba | p-valor |
| Shapiro-Wilk | 0.91654 | 0.1290 |
| Anderson-Darling | 0.57129 | 0.1188 |
| Breusch-Pagan | 5.3502 | 0.4997 |
| Durbin-Watson | 1.0718 | 0.1184 |
| Modelo de superficie de respuesta de la variable: Número de raíces (Y₄) | | |
| Prueba estadística | Estadístico de prueba | p-valor |
| Shapiro-Wilk | 0.9376 | 0.2904 |
| Anderson-Darling | 0.3684 | 0.3876 |
| Breusch-Pagan | 0.8528 | 0.9906 |
| Durbin-Watson | 0.9150 | 0.0618 |

La verificación de los supuestos estadísticos fundamentales en los modelos de superficie de respuesta del Diseño Box-Behnken para *Ladenbergia oblongifolia* que se evidencia en la tabla 18, demuestra un comportamiento satisfactorio de los residuos. Los p-valores de las pruebas de normalidad Shapiro-Wilk y Anderson-Darling superan el nivel de significancia ($\alpha=0.05$) en todas las variables respuesta, oscilando entre 0.0832 y 0.3876, mientras que la prueba de Breusch-Pagan presenta p-valores entre 0.4997 y 0.9906, confirmando la homocedasticidad de los

residuos. Adicionalmente, el estadístico de Durbin-Watson muestra p-valores superiores a 0.05 en todos los casos (0.0519 a 0.5557), validando la independencia de las observaciones y el cumplimiento integral de los supuestos del análisis de regresión (Villota & Daza, 2022). Estos hallazgos son consistentes con las recomendaciones de SixSigma.us (2024), que enfatiza la importancia del análisis de residuos, valores R-cuadrado y pruebas de falta de ajuste como técnicas esenciales para validar modelos en la metodología de superficie de respuesta y identificar posibles violaciones de los supuestos subyacentes. Como señala Compton (2024) en su análisis sobre métodos estadísticos en cultivo de tejidos vegetales, la verificación rigurosa de los supuestos del modelo es esencial para garantizar la objetividad y validez de las conclusiones experimentales en investigaciones biotecnológicas, especialmente cuando se emplean diseños experimentales avanzados como el Box-Behnken para la optimización de procesos biológicos complejos.

Figura 28

Evaluación de normalidad de residuos mediante gráficos Q-Q y pruebas de normalidad para los modelos de superficie de respuesta del Diseño Box-Behnken (DBB), de la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"



La figura 28, correspondiente a la evaluación gráfica y numérica de la normalidad para los residuos del Diseño Box-Behnken en *Ladenbergia oblongifolia* sustenta el cumplimiento del supuesto de normalidad. Las pruebas Shapiro-Wilk arrojan p-valores entre 0.129 y 0.2904 para las cuatro variables respuesta, mientras que Anderson-Darling confirma estos hallazgos con p-valores que oscilan entre 0.08321 y 0.3876, todos superiores al nivel de significancia de 0.05. Esta conclusión se refuerza visualmente mediante los gráficos Q-Q, donde los puntos se distribuyen consistentemente a lo largo de la línea de referencia, mostrando desviaciones

menores y aleatorias que no comprometen el supuesto de normalidad para ninguna de las variables analizadas (Luzuriaga et al., 2023).

Tabla 19

*Pruebas de normalidad multivariante para los residuos del Diseño Box-Behnken (DBB), de la propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"*

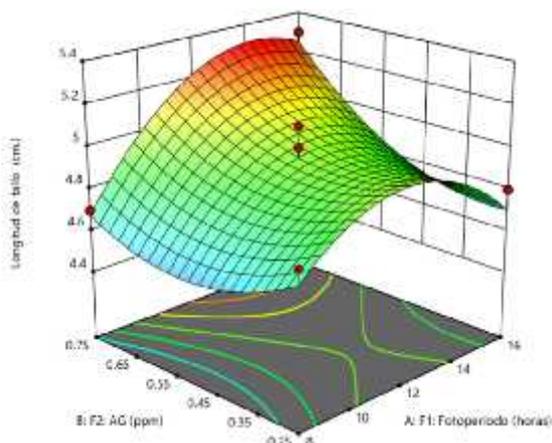
| Test de normalidad | Estadístico | p-valor |
|---------------------------|--------------------|----------------|
| Mardia Asimetría | 18.6741 | 0.5431 |
| Mardia Kurtosis | -1.0809 | 0.2797 |
| Royston | 0.8640 | 0.0512 |

Las pruebas de normalidad multivariante aplicadas a los residuos del Diseño Box-Behnken para *Ladenbergia oblongifolia* exhibidas en la tabla 19, confirman la distribución normal conjunta de los datos analizados. El test de Mardia para asimetría exhibe un p-valor de 0.5431, mientras que la prueba de curtosis del mismo autor presenta un p-valor de 0.2797, complementándose con el test de Royston que muestra un p-valor de 0.0512, todos superiores al nivel de significancia de 0.05. Este hallazgo respalda la aplicabilidad de técnicas estadísticas paramétricas avanzadas y fortalece la confiabilidad de las predicciones del modelo de superficie de respuesta para la optimización de condiciones de cultivo. Como destaca NCBI (2024) en su análisis sobre pruebas poderosas para normalidad multivariante, la verificación adecuada de estos supuestos es fundamental para garantizar la validez de las inferencias estadísticas en investigaciones biomédicas y biotecnológicas, donde la toma de decisiones basada en evidencia estadística sólida es crucial para el desarrollo de protocolos experimentales eficientes y reproducibles.

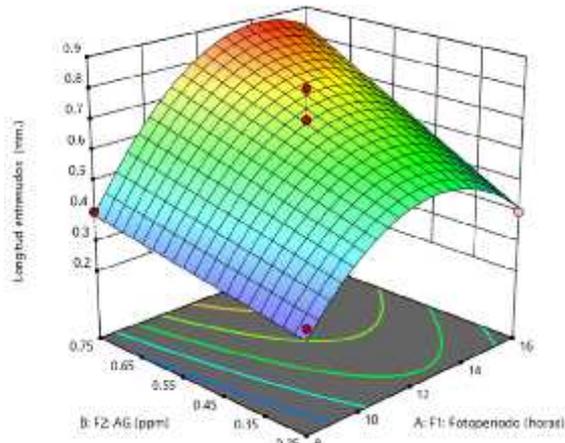
Figura 29

Representación tridimensional de los modelos de superficie de respuesta del Diseño Box-Behnken (DBB), de la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"

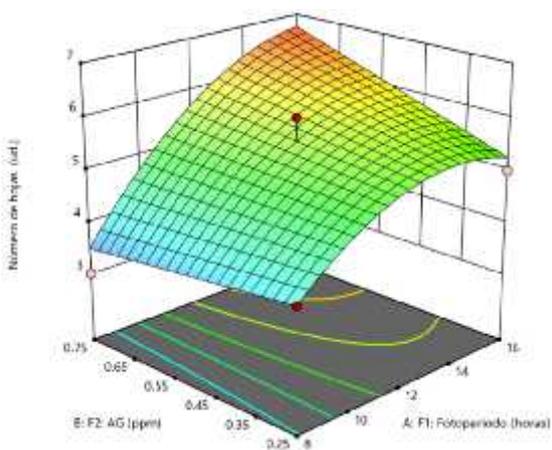
Longitud del tallo (Y₁)



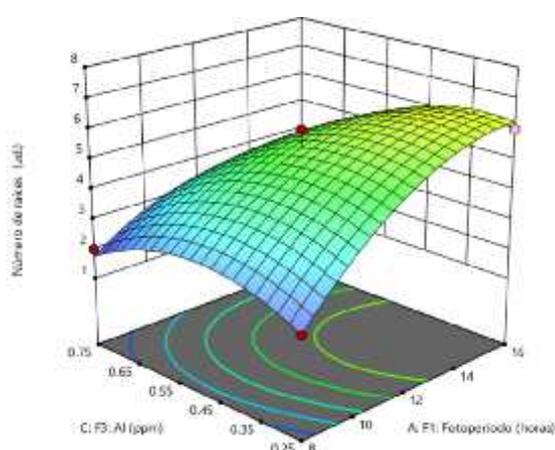
Longitud de entrenudos (Y₂)



Número de hojas (Y₃)



Número de raíces (Y₄)

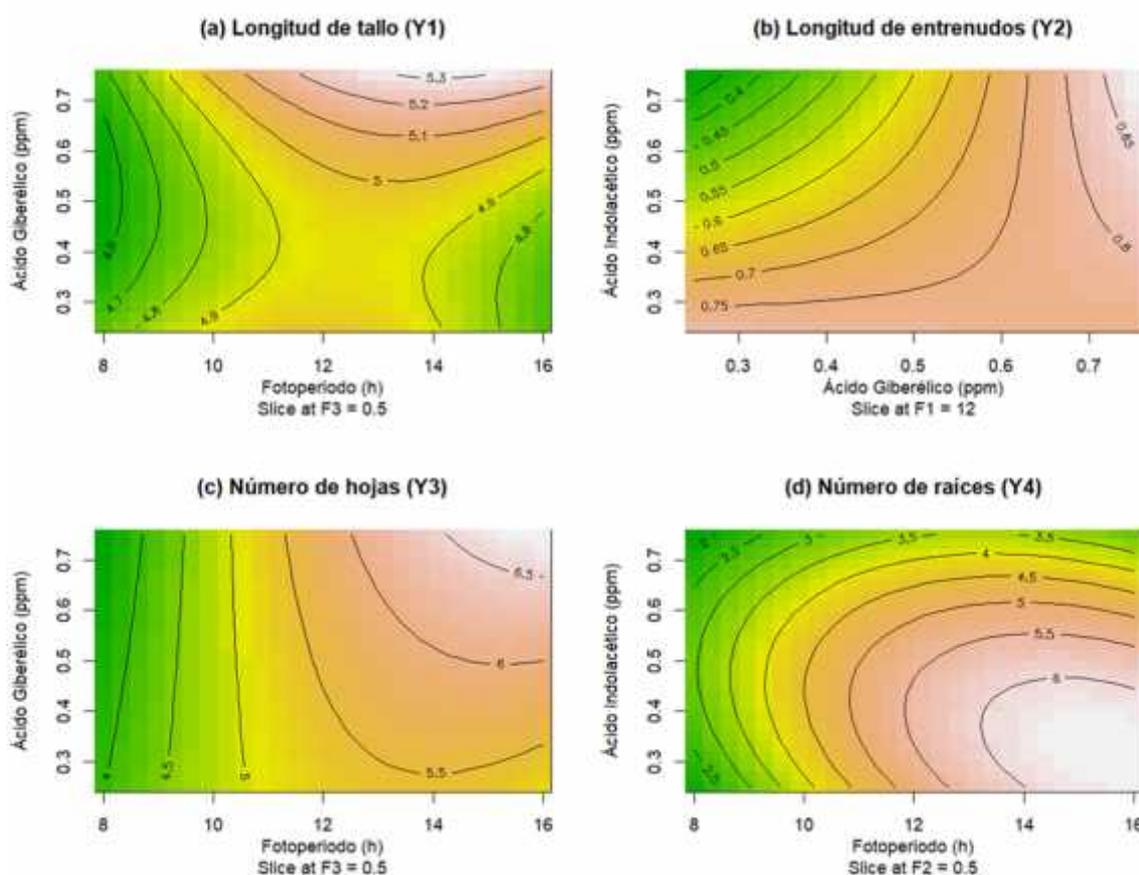


En la figura 29, según las superficies de respuesta obtenidas mediante el Diseño Box-Behnken (DBB) evidencian la influencia del fotoperíodo y las concentraciones de ácido giberélico e indolacético en la optimización del crecimiento *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia*. Se observa que la longitud del tallo (Y₁) y la longitud de entrenudos (Y₂) alcanzan sus valores máximos cuando se combinan fotoperíodos prolongados con niveles elevados de ácido giberélico, indicando una sinergia entre ambos factores. Asimismo, el número de hojas (Y₃) y el número de raíces (Y₄) muestran una tendencia creciente a medida que aumentan las concentraciones de ácido giberélico y ácido indolacético, lo que resalta el papel fundamental de la

regulación hormonal en el desarrollo de la especie. Estos resultados reflejan la existencia de combinaciones óptimas que permiten maximizar las respuestas evaluadas, proporcionando una base científica para optimizar las condiciones de propagación *in vitro* (Guillén et al., 2022).

Figura 30

Gráfico de contornos de los modelos de superficie de respuesta del Diseño Box-Behnken (DBB), de la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"

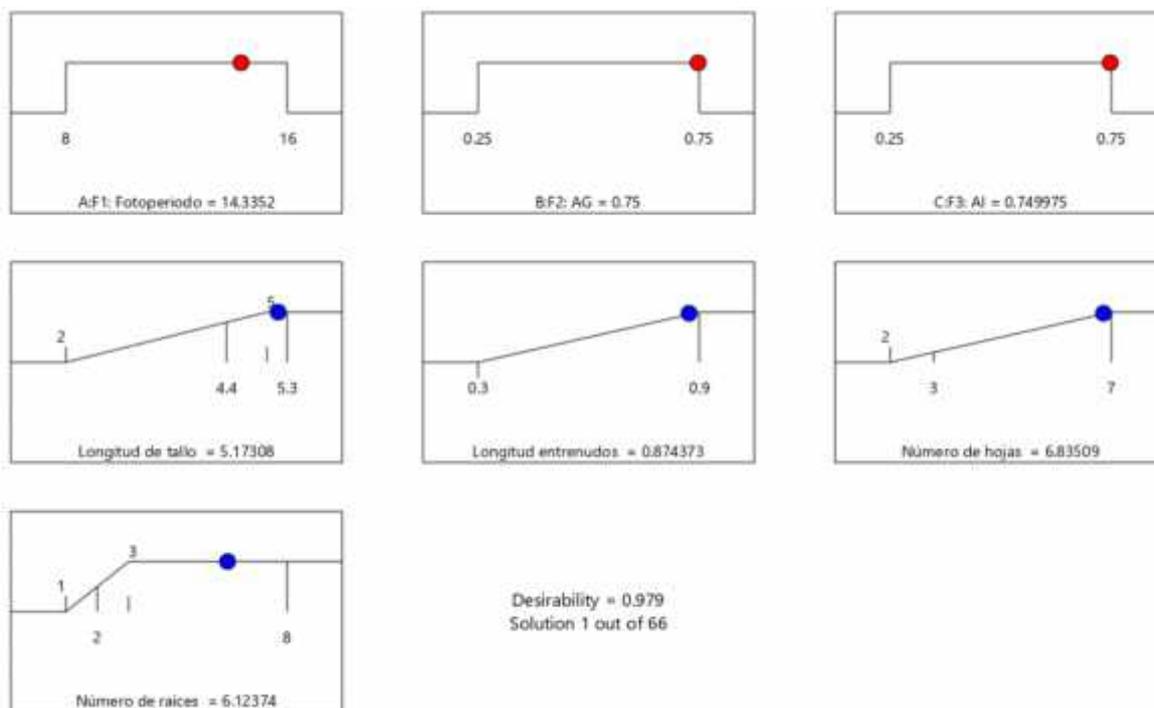


Los gráficos de contorno del Diseño Box-Behnken para *Ladenbergia oblongifolia* de la figura 30, demuestran interacciones complejas entre el fotoperíodo, ácido giberélico y ácido indolacético sobre las variables morfogénicas evaluadas. El análisis de las isolíneas revela que el incremento del fotoperíodo y las concentraciones de reguladores de crecimiento favorecen la maximización de las respuestas, siendo evidente en la longitud del tallo (Y1) y número de hojas (Y3), que alcanzan valores óptimos cuando se combinan fotoperíodos prolongados con

niveles elevados de ácido giberélico. Esta tendencia es consistente con *Frontiers in Plant Science* (2024), que demuestra cómo los mecanismos moleculares de control fotoperiódico han evolucionado para adaptar el desarrollo vegetal a los cambios en la duración del día, afectando el crecimiento vegetativo y la morfogénesis *in vitro*. La interpretación de los contornos confirma sinergias significativas entre los factores estudiados, especialmente en la longitud de entrenudos (Y2) y número de raíces (Y4), donde se observa un comportamiento ascendente progresivo conforme aumentan las concentraciones hormonales. Según *BMC Plant Biology* (2024), la metodología de superficie de respuesta mediada por diseños experimentales avanzados permite maximizar la embriogénesis somática mediante la identificación precisa de combinaciones óptimas de factores. En el contexto específico de *Ladenbergia oblongifolia*, los contornos demuestran que la optimización del desarrollo morfogénico depende críticamente de la coordinación entre la regulación lumínica y el balance hormonal, información esencial para el establecimiento de protocolos escalables destinados a la conservación *ex situ* y reforestación de esta especie emblemática del patrimonio natural peruano. Estos hallazgos resaltan la importancia de ajustar estratégicamente los factores para maximizar el desarrollo de *Ladenbergia oblongifolia* en condiciones de propagación *in vitro* (Pérez, 2021).

Figura 31

Reporte de rampas de la optimización numérica de los niveles convenientes de fotoperíodo, ácido giberélico y ácido indolacético del Diseño Box-Behnken (DBB), de la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina", obtenidos mediante la función de deseabilidad global ponderada



La optimización numérica mediante la función de deseabilidad en el Diseño Box-Behnken para *Ladenbergia oblongifolia* alcanza un valor global de 0.979, según la figura 31, estos resultados obtenidos, con una deseabilidad de 0.979, evidencian una optimización altamente satisfactoria de los parámetros evaluados (Jha et al., 2024), identificando además condiciones óptimas de cultivo con un fotoperíodo de aproximadamente 14 horas luz/10 oscuridad, concentraciones de ácido giberélico de 0.75 ppm y ácido indolacético de 0.749975 ppm. Bajo estas condiciones experimentales, el modelo predice respuestas maximizadas de 5.17308 cm para longitud de tallo, 0.874373 mm para longitud de entrenudos, 6.83509 unidades para número de hojas y 6.12374 unidades para número de raíces, representando la solución más favorable entre las 66 combinaciones evaluadas para la optimización simultánea de las variables morfológicas en el desarrollo *in vitro* de la especie (Luzuriaga et al., 2023). La función de deseabilidad global implementada facilita la toma de decisiones en sistemas multiobjetivo al transformar respuestas múltiples

en un valor único interpretable, aspecto crucial para la optimización de protocolos de micropropagación comercial (Murthy et al., 2023). Este enfoque estadístico resulta especialmente relevante para especies amenazadas como *Ladenbergia oblongifolia*, donde la sobreexplotación para extracción de alcaloides quinólicos ha comprometido su estabilidad poblacional natural. La implementación de estas técnicas optimizadas contribuye significativamente al desarrollo de protocolos reproducibles de conservación ex situ y producción sostenible de plantas élite libres de patógenos. Los avances en micropropagación automatizada y sistemas de inmersión temporal sugieren oportunidades futuras para la escalabilidad comercial de estos protocolos optimizados (García-Ramírez, 2023).

Tabla 20

Resultados de los niveles óptimos de los factores según la función de la deseabilidad global ponderada, en los diseños evaluados en estudios de propagación in vitro de Ladenbergia oblongifolia "árbol de la quina"

| Diseño | Deseabilidad global ponderada | Predicho | Punto Óptimo | | |
|--------|-------------------------------|-----------|---------------------|----------------------|------------------------|
| | | \hat{y} | F1: Fotoperíodo | F2: Ácido giberélico | F3: Ácido indolacético |
| DCCR | 0.988 | Y1: 5.12 | 16 luz/8 oscuridad | 0.75 | 0.40 |
| | | Y2: 0.90 | 16 luz/8 oscuridad | 0.75 | 0.40 |
| | | Y3: 6.74 | 16 luz/8 oscuridad | 0.75 | 0.40 |
| | | Y4: 6.35 | 16 luz/8 oscuridad | 0.75 | 0.40 |
| DBB | 0.979 | Y1: 5.17 | 14 luz/10 oscuridad | 0.75 | 0.75 |
| | | Y2: 0.88 | 14 luz/10 oscuridad | 0.75 | 0.75 |
| | | Y3: 6.79 | 14 luz/10 oscuridad | 0.75 | 0.75 |
| | | Y4: 6.14 | 14 luz/10 oscuridad | 0.75 | 0.75 |

DCCR: Diseño Compuesto Central Rotable; DBB: Diseño Box Behnken

En la tabla 20, los resultados obtenidos mediante los diseños experimentales DCCR y DBB evidencian diferencias significativas en la optimización de los factores para la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia*. La deseabilidad global

ponderada revela que el diseño DCCR (0.988) presenta una ligera ventaja sobre el DBB (0.979), lo que indica que ambas metodologías proporcionan niveles de optimización altamente satisfactorios para la micropropagación de esta especie medicinal (Gil et al., 2019; López et al., 2019). El fotoperíodo óptimo determinado fue de 16 luz/8 oscuridad para DCCR y 14 luz/10 oscuridad para DBB. Estos resultados concuerdan con investigaciones recientes que demuestran la efectividad del fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad en el cultivo *in vitro* de plantas medicinales (Meza et al., 2024; Silva et al., 2023). La diferencia de dos horas entre ambos diseños puede atribuirse a la sensibilidad específica de *Ladenbergia oblongifolia* a las variaciones en el período de oscuridad, crucial para los procesos metabólicos nocturnos de reparación celular. Las concentraciones óptimas muestran consistencia en AG₃ (0.75 mg/L) para ambos diseños, mientras que AIA presenta variaciones: 0.40 mg/L para DCCR y 0.75 mg/L para DBB. Estudios contemporáneos han validado que el efecto sinérgico entre hormonas genera mejores resultados que de manera individual en la propagación *in vitro*, siendo las concentraciones de 0.5-0.75 mg/L efectivas para diferentes especies (Gil et al., 2016; López et al., 2021). La consistencia en AG₃ sugiere su papel fundamental en la elongación celular y desarrollo de brotes, mientras que la variación en AIA podría relacionarse con diferencias en la respuesta al enraizamiento según el diseño empleado. Vásquez (2024), sostiene que concentraciones cercanas a 1 ppm son las óptimas para elongar plántulas de quina. Por otro lado, Vaca et al (2024), sostiene que el manejo de la intensidad luminosa juega un papel crucial en el crecimiento y desarrollo de las plántulas. La cantidad de luz disponible influye en la acumulación de biomasa al regular la tasa de fotosíntesis. Además, impacta indirectamente la distribución de biomasa al afectar el desarrollo de las hojas, el grosor del tallo y la longitud de la raíz. Investigaciones han demostrado que las plántulas expuestas a una iluminación insuficiente presentan una menor expansión en su diámetro en comparación con aquellas que crecen bajo un fotoperíodo óptimo.

Tabla 21

*Evaluación de la eficiencia de diseños experimentales mediante criterios de optimalidad, de la propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"*

| Diseño | Optimalidad D | Optimalidad A | Optimalidad G | Optimalidad I |
|---------------|----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| DCCR | <u>89508278.448</u> | <u>0.5490</u> | <u>0.5237</u> | <u>0.3290</u> |
| DBB | 3514368.000 | 1.4346 | 0.6711 | 0.4559 |
| Decisión | Max | Min | Min | Min |

Nota: La D-optimalidad debe maximizarse, mientras que las métricas A, G y I deben minimizarse para considerar un diseño más eficiente, según criterios estándar de selección de diseños óptimos (Minitab, 2024).

La evaluación comparativa de los criterios de optimalidad entre los diseños DCCR y DBB en la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* según la tabla 21, evidencia comportamientos diferenciados según el criterio evaluado. En D-optimalidad, el diseño DCCR presenta superioridad con un valor de 89508278.448 comparado con 3514368.000 del DBB, indicando mayor eficiencia en la estimación precisa de parámetros del modelo. La D-optimalidad maximiza el determinante de la matriz $X'X$, minimizando el volumen del elipsoide de confianza para los coeficientes de regresión (Argumedo & López, 2014; Minitab, 2024). El diseño DCCR demuestra superioridad en los criterios de minimización: A-optimalidad (0.5490 vs 1.4346), G-optimalidad (0.5237 vs 0.6711) y I-optimalidad (0.3289 vs 0.4559), indicando mejor desempeño en estos parámetros. Estos resultados confirman que el DCCR proporciona estimaciones más estables, mejor capacidad predictiva y distribución más eficiente de la información experimental. La A-optimalidad mide la varianza promedio de los coeficientes de regresión, mientras que G y I-optimalidad evalúan la distribución de varianza de predicción y apalancamiento promedio (Gil et al., 2016; López et al., 2021). La superioridad del DCCR en los cuatro criterios evaluados se debe a su configuración geométrica rotatable, que incluye puntos axiales proporcionando mejor cobertura del espacio experimental y mayor precisión en la estimación de términos cuadráticos. Si bien el DBB requiere menos experimentos, presenta limitaciones en predicción y cobertura experimental (Agadaga, 2024; Al-Tayawi et al., 2023). Los resultados sugieren que para aplicaciones de micropropagación de *Ladenbergia oblongifolia* que requieren robustez y capacidad predictiva, el DCCR constituye la metodología más eficiente,

justificando las corridas experimentales adicionales mediante ganancias sustanciales en eficiencia estadística y confiabilidad de las predicciones del modelo.

Tabla 22

Resultados de los niveles óptimos de los factores, de la propagación in vitro de Ladenbergia oblongifolia "árbol de la quina"

| Diseño | Vector Predicho | Punto óptimo | | |
|--------|----------------------------------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------------|
| | | F1: Fotoperíodo | F2: Ácido giberélico | F3: Ácido indolacético |
| DCCR | Y1: 5.12 Y2: 0.90 Y3: 6.74 Y4: 6.35 | 16 luz/8 oscuridad | 0.75 | 0.40 |

La tabla 22, en mención a la optimización simultánea para la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia*, sustentada tanto en la función de deseabilidad global ponderada, como en los criterios de optimalidad, determina que la combinación más eficiente corresponde al Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR), con un fotoperíodo de 16 luz/8 oscuridad, concentración de ácido giberélico de 0.75 mg/L y ácido indolacético de 0.40 mg/L. Bajo estas condiciones experimentales, el vector de respuestas predichas alcanza valores de 5.12 cm para longitud de tallo, 0.90 mm para longitud de entrenudos, 6.74 unidades para número de hojas y 6.35 unidades para número de raíces, constituyendo estos parámetros la configuración óptima para maximizar el desarrollo morfogénico *in vitro* de la especie, validando así la superioridad del DCCR en la exploración y optimización del espacio experimental (Chiranjeevi & Victorbabu , 2021; Jyostna et al., 2021).

El fotoperíodo optimizado de 16 horas luz/8 horas oscuridad refuerza la importancia de la regulación lumínica en el cultivo de tejidos vegetales. Esta condición favorece la fotosíntesis y la síntesis de metabolitos esenciales para el crecimiento, en concordancia con estudios recientes que demuestran cómo los fotoperíodos prolongados incrementan la acumulación de biomasa y mejoran la calidad morfogénica de las plántulas *in vitro* (Hu et al., 2024).

La combinación hormonal optimizada revela la importancia sinérgica del ácido giberélico y el ácido indolacético en la morfogénesis vegetal. La concentración de 0.75 ppm de ácido giberélico coincide con rangos reportados por investigaciones contemporáneas, donde concentraciones superiores a 0.5 ppm favorecen significativamente la elongación celular y el desarrollo de entrenudos (Binenbaum et al., 2018). Complementariamente, la concentración de 0.40 ppm de ácido indolacético se encuentra dentro del rango óptimo documentado para especies forestales, donde concentraciones entre 0.25-0.75 ppm promueven la organogénesis sin inducir efectos fitotóxicos (Khadr et al., 2020).

Asimismo, es fundamental considerar que la eficacia de los protocolos de propagación *in vitro* no garantiza por sí sola el éxito en la reintroducción de *Ladenbergia oblongifolia* en su hábitat natural. Esta fase requiere una evaluación integral de sus requerimientos ecológicos, que incluyen la compatibilidad edáfica, especialmente en suelos bien drenados, ricos en materia orgánica y con pH ligeramente ácido a neutro, típicos de bosques montanos y yungas peruanas (Cotrina et al., 2020). Además, el clima óptimo para su establecimiento comprende rangos altitudinales entre 800 y 2,500 m s.n.m., con temperaturas moderadas (15–25 °C) y alta humedad atmosférica, condiciones que deben reproducirse o al menos simularse en las zonas de reintroducción (Shi, et al., 2022).

Otro aspecto crítico es el restablecimiento de sus interacciones simbióticas, particularmente con hongos micorrízicos y microbiota rizosférica, que juegan un rol determinante en la absorción de nutrientes y adaptación al estrés abiótico (Wu et al., 2025). Por ello, se sugiere incorporar bioinóculos simbióticos durante el proceso de aclimatación para mejorar la tasa de supervivencia (Zhou et al., 2024). Finalmente, el éxito a largo plazo de las reintroducciones debe sustentarse en programas de monitoreo post-plantación, que evalúen el crecimiento, adaptación fenotípica y reproducción natural de los individuos reintroducidos, asegurando así la viabilidad poblacional y la restauración efectiva de las dinámicas ecológicas propias del ecosistema original.

V.CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Se concluye que para optimización simultánea multirespuesta de la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina", la combinación más eficiente corresponde al Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR), con un fotoperíodo de 16 luz/8 oscuridad, concentración de ácido giberélico de 0.75 ppm y ácido indolacético de 0.40 ppm.

El análisis mediante el Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR) permitió modelar y optimizar la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina", identificando que la combinación de un fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad, junto con una concentración de 0.75 ppm de ácido giberélico y 0.40 ppm de ácido indolacético, maximiza las respuestas de longitud del tallo, longitud de entrenudo, número de hojas y número de raíces.

La aplicación del Diseño Box-Behnken (DBB) permitió modelar y optimizar la propagación *in vitro* de la especie de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina", obteniendo valores óptimos con un fotoperíodo de 14 horas luz/10 horas oscuridad y concentraciones de 0.75 ppm para ácido giberélico e indolacético, maximiza las respuestas de longitud del tallo, longitud de entrenudo, número de hojas y número de raíces.

La comparación de los diseños experimentales mediante la función de deseabilidad confirmó que el DCCR presenta una mayor deseabilidad global ponderada (0.988) en comparación con el DBB (0.979), lo que indica que el primero logra una mejor optimización simultánea de las variables respuesta. Estos resultados refuerzan la idoneidad del DCCR como estrategia para mejorar la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia*, maximizando la producción de plántulas con características óptimas para su crecimiento y desarrollo.

Al evaluar la eficiencia de los modelos experimentales mediante los criterios de optimalidad (D, A, G y I), se determinó que el DCCR presenta superioridad en D-optimalidad (89 508 278.448 vs 3 514 368.000), A-optimalidad (0.5490 vs 1.4346), G-optimalidad (0.5237 vs 0.6711) e I-optimalidad (0.3289 vs 0.4559). La superioridad del DCCR en los cuatro criterios, junto con su configuración

geométrica rotatable que proporciona mejor cobertura del espacio experimental y mayor precisión en la estimación de términos cuadráticos, lo consolida definitivamente como el diseño más eficiente para la optimización multirespuesta en la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina".

5.2. Recomendaciones

Se recomienda investigar con otras fitohormonas o fitoreguladores que permitan demostrar similares o una mejor optimización multirrespuesta en la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina".

Por otro lado, se recomienda el uso de biorreactores (Sistema de inmersión temporal RITA) para optimizar, uniformizar y automatizar la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina".

Si bien el ácido giberélico y el ácido indolacético mostraron un efecto sinérgico positivo, sería interesante explorar el papel de otras hormonas vegetales en la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia*. Investigar la interacción de diferentes hormonas podría revelar nuevas estrategias para mejorar el proceso de cultivo.

Para validar los resultados obtenidos en condiciones de laboratorio, se recomienda realizar estudios de campo para evaluar el rendimiento de las plántulas propagadas *in vitro* en condiciones naturales. Esto proporcionaría una comprensión más completa del potencial de las plántulas para el establecimiento y crecimiento en el hábitat natural.

Considerando los avances en técnicas de cultivo celular y molecular, se sugiere la integración de estas herramientas en futuras investigaciones. La aplicación de técnicas como la biotecnología podría ofrecer nuevas formas de mejorar la propagación *in vitro* y la conservación de especies vegetales.

Es esencial compartir los hallazgos de la investigación con la comunidad científica a través de publicaciones en revistas especializadas y presentaciones en conferencias académicas. Esto facilitaría el intercambio de conocimientos y promovería la colaboración entre investigadores interesados en el cultivo y conservación de especies vegetales.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acosta, A., Pérez, O., Albernas, Y., Cortés, Mariano F. (2021). Potentials of response surface methodology in experimental optimization in chemical and food industry. *Centro Azúcar*, 48(4), 123-138.
- Adem, M., Sharma, L., Shekhawat, G. S., Šafranek, M., & Jásik, J. (2024). Auxin signaling, transport, and regulation during adventitious root formation. *Current Plant Biology*, 40, 100385. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2024.100385>
- Agadaga, G. O. (2024). Rotatability of Second-Order Response Surface Designs. *Journal of Research in Science and Technology*, 5(2), 13-31.
- Allison, P. D. (2023). *Statistical horizons: Understanding variance inflation factors in regression models*. Statistical Horizons. <https://statisticalhorizons.com/multicollinearity/>
- Albán, J., Chilquillo, E., Melchor, B., Arakaki, M., León, B., Suni, M. (2020). *Cinchona* L. "Árbol de la Quina": repoblamiento y reforestación en el Perú. *Revista peruana de biología*, 27(3), 423 - 426.
- Alcántara-Cortes, J., Acero-Godoy, J., Alcántara-Cortés, J.D., & Sánchez-Mora, R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109-129.
- Alfaro, P. (2019). Historia de la quina: de la lucha contra la malaria a la aparición de la tónica, España. (tesis pregrado). Universidad Complutense. <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/PATRICIA%20JIMENEZALFARO%20RTEGO.Pdf>
- Ahmad, N., Liu, Z., Chen, X., & Wang, Q. (2024). Optimization of preparation conditions for *Salsola laricifolia* protoplasts using response surface methodology and artificial neural network modeling. *Plant Methods*, 20, 63. <https://doi.org/10.1186/s13007-024-01180-9>
- Álvarez Cáceres, R. (1994). Estadística multivariante y no paramétrica con SPSS: aplicación a las ciencias de la salud. Díaz de Santos.

- Al-Tayawi, A. N., Szpisják-Gulyás, N., Horváth, Z. H., & László, Z. (2023). Methods for experimental design, central composite design and the Box-Behnken design, to optimise operational parameters: A review. *Acta Alimentaria*, 52(4), 521-536. <https://akjournals.com/view/journals/066/52/4/article-p521.xml>
- Andersson, L. (1997). Synopsis of the genus *Ladenbergia* (Rubiaceae). *Nord. J. Bot.* 17(3): 255-299. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1997.tb00316.x>
- Anderson, M. J., & Whitcomb, P. J. (2016). *RSM simplified: Optimizing processes using response surface methods for design of experiments* (2nd ed.). Productivity Press. <https://doi.org/10.1201/9781315382326>
- Anubhav, D., & Yatendra, S. (2021). Medicinal Properties of Cinchona Alkaloids - A Brief Review. *Asian Journal of Research in Pharmaceutical Sciences* 11(3):224-8. doi: [10.52711/2231-5659.2021.00036](https://doi.org/10.52711/2231-5659.2021.00036)
- Araque, E., Bohórquez, M., Pacheco, J., Correa, L., Urquijo, J., Castañeda, S. & Pacheco, J. (2018). Propagación y tuberización in vitro de dos variedades de papa. *Ciencia en Desarrollo*, 9(1), 21-31.
- Argumedo, S., & López, V. I. (2014). Metodología para incrementar el número de puntos experimentales en un diseño D-Óptimo. *Ingeniería y Ciencia*, 20, 45-62. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4785081>
- Armijos, R., Pérez, C. (2016). *In vitro* germination and shoot proliferation of the threatened species *Cinchona officinalis* L (Rubiaceae). *Journal of Forest Research*, 27, 1229-1236. <https://doi.org/10.1007/s11676-016-0272-8>
- Atta, R., Laurens, L., Boucheron-Dubuisson, E., Guivarc'h, A., Carnero, E., Giraudat-Pautot, V., Chriqui, D. (2009). Pluripotency of Arabidopsis xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown *in vitro*. *The Plant Journal*, 57(4), 626–644. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03715.x>
- Al-Qudah, T., Shibli, R., Zatimeh, A., Tahtamouni, R., & Al-Zyoud, F. (2023). A sustainable approach to *in vitro* propagation and conservation of *Salvia*

- dominica L.: A wild medicinal plant from Jordan. *Sustainability*, 15(19), 14218. <https://doi.org/10.3390/su151914218>
- Ávalos, A., Pérez, Carril. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119-45.
- Baltagi, B. H. (2008). *Econometrics*. Berlín: Springer Berlin Heidelberg.
- Barroga, E., Matanguihan, G. J., Furuta, A., Arima, M., Tsuchiya, S., Kawahara, C., Takamiya, Y., & Izumi, M. (2023). Conducting and writing quantitative and qualitative research. *Journal of Korean Medical Science*, 38(37), e291. <https://doi.org/10.3346/jkms.2023.38.e291>
- Birnbaum, K., & Sánchez, A. (2008). Slicing across Kingdoms :Regeneration in Plants and Animals. *Cell*, 132(4), 697–710. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.040.Slicing>
- Bhattacharya, S. (2021). Central Composite Design for Response Surface Methodology and Its Application in Pharmacy. <https://www.intechopen.com/chapters/74955>
- Brako, L., Zarucchi, J. (1993). *Catálogo de las Angiospermas y Gimnospermas del Perú*. Monogr. Syst. Bot. EEUU: Missouri Bot. Garden.
- Box, G. E. P., Hunter, J. S., & Hunter, W. G. (2005). *Statistics for experimenters: Design, discovery and innovation* (2nd ed.). Wiley-Interscience.
- BMC Plant Biology. (2024). Response surface methodology mediated optimization of phytosulfokine and plant growth regulators for enhanced protoplast division, callus induction, and somatic embryogenesis in *Angelica gigas* Nakai. *BMC Plant Biology*, 24, 527. <https://bmcpantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12870-024-05243-w>
- Breusch, T. S., & Pagan, A. R. (1979). A simple test for heteroscedasticity and random coefficient variation. *Econometrica*, 47(5), 1287-1294. <https://doi.org/10.2307/1911963>

- Binenbaum, J., Weinstain, R., & Shani, E. (2018). Gibberellin localization and transport in plants. *Trends in Plant Science*, 23(5), 410-421. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.02.005>
- Calva, G., & Pérez, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: Fuente de alimentos para el Futuro. *Revista Digital Universitaria*, 6(11), 1-16.
- Cano, J., Ospina, Y., Gutiérrez, J., Ríos, E. (2023). Hidrodestilación asistida por microondas de aceite esencial de *Cúrcuma longa* (rizomas): optimización mediante superficie de respuesta. *Revista de Investigación, Desarrollo e Innovación*, 13(1), 185-200. Epub September 03, 2023. <https://doi.org/10.19053/20278306.v13.n1.2023.16061>
- Cervera, J., & Castro, J. (2024). Efecto de la aplicación de tres dosis de ácido giberélico en la germinación de semillas de palto (*Persea americana*) en vivero. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú.
- Chandrika, U. G., & Karunarathna, U. (2022). Anesthetics and analgesic activities of herbal medicine: Review of the possible mechanism of action. En R. Rajendram, V. B. Patel, V. R. Preedy, & C. R. Martin (Eds.), *Features and assessments of pain, anaesthesia, and analgesia* (pp. 47–56). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818988-7.00003-0>
- Che, P., Lall, S., & Howell, S. (2007). Developmental steps in acquiring competence for shoot development in *Arabidopsis* tissue culture. *Planta*, 226(5), 1183–1194. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0565-4>
- Chiranjeevi, P. & Victorbabu, B. (2021). Construction of Second Order Slope Rotatable Designs Using Supplementary Difference Sets. *Thailand Statistician*, 19(2), 261-269.
- Cob, J., Sabja, A., Ríos, D., Lara, A., Donoso, P., Arias, L., & Escobar, B. (2010). Potencial de la organogénesis como estrategia para la masificación *in vitro* de *Persea lingue* en la zona centro-sur de Chile. *Bosque (Valdivia)*, 31(3), 202-208. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002010000300004>
- Cocîrlea, M. D., Simionescu, N., Cîlin, T., Gatea, F., Badea, G. I., Vamanu, E., & Oancea, S. (2024). Box–Behnken Design-Based Optimization of Extraction

Parameters of Phenolics, Antioxidant Activity, and *In Vitro* Bioactive and Cytotoxic Properties of *Rhus typhina* Fruits. *Applied Sciences*, 14(23), 11096. <https://doi.org/10.3390/app142311096>

Coles, N., McMullen, P., Balint-Kurti, R., & Holland, J. (2010). Genetic Control of Photoperiod Sensitivity in Maize Revealed by Joint Multiple Population Analysis. *Genetics*, 184: 799-812.

Contreras, C. (2021). Determinación de variables predictivas de deserción inicial para generar un sistema de alerta temprana. Análisis sobre una muestra de estudiantes beneficiarios de la beca de nivelación académica en una universidad pública en Chile. *Calidad en la educación*, (54), 12-45. <https://dx.doi.org/10.31619/caledu.n54.828>

Compton, M. E. (2024). Use of statistics in plant cell tissue culture. *Methods in Molecular Biology*, 2827, 15-34. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38985260/>

Contreras, E. ., Hernández, T. ., Jaimez, J. ., Pérez, J. ., Gutiérrez, J. ., & Ramírez, J. . (2023). Aplicación de un Diseño de Experimentos Box-Behnken para la determinación de las condiciones de extracción de compuestos antioxidantes de *Decatropis bicolor*. *Investigación Y Desarrollo En Ciencia Y Tecnología De Alimentos*, 8(1), 667–675. <https://doi.org/10.29105/idcyta.v8i1.87>

Cotrina, D. A., Barboza, E., Rojas, N. B., Oliva, M., Torres, C., Amasifuen, C. A., & Bandopadhyay, S. (2020). Distribution models of timber species for forest conservation and restoration in the Andean-Amazonian landscape, north of Peru. *Sustainability*, 12(19), 7945. <https://doi.org/10.3390/su12197945>

Cohen, J., Cohen, P., West, S. G., & Aiken, L. S. (2017). *Applied multiple regression/correlation analysis for the behavioral sciences* (3rd ed.). Routledge.

Crozier, A., Kamiya, Y., Bishop, G., & Yokota, T. (2000). Biosynthesis of hormones and elicitors molecules. En: Buchanan B., Grisse W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 850-929.

- Curtis, H., Barnes, N., Schnek, A., Massarini, A. (2008). *Biología. 7ma edición. Editorial Médica Panamericana. España. 1160 pp*
- Cuvi, N. 2018. "Tecnociencia y colonialismo en la historia de las Cinchona". *ASCLEPIO. 70(1): 1-13.*
- DataCamp. (2024). Variance inflation factor: How to detect multicollinearity. <https://www.datacamp.com/tutorial/variance-inflation-factor>
- Davim, J. P. (Ed.). (2016). Design of experiments in production engineering. Springer.
- Delgado, G., Vásquez, C., Esquerre, B., Bazán, P., & Rojas, C. (2021). *In vitro* tissue culture in plants propagation and germplasm conservation of economically important species in Peru. *Scientia Agropecuaria, 12(3), 337-349.* <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.037>
- Derringer, G., & Suich, R. (1980). *Simultaneous Optimization of Several Response Variables*. New York: John Wiley & Sons.
- Doerner, P. (2000). Cell division regulation. En: Buchanan B., Grissem W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists.
- Eras, V., Moreno, J., Yaguana, M., Poma, R., Paredes, D. (2019). Balance hormonal para la fase de brotación y enraizamiento *in vitro* de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja. *Bosques Latitud Cero, 9(1), 58-68.*
- Farji, C. & Luque, L. (2024). Evaluación de la bioadsorción de Cr (VI) en soluciones acuosas a partir de residuos calcáreos de *Thais chocolata* mediante su optimización con un diseño Box-Behnken. (tesis pregrado). Universidad Católica de Santa María.
- Fazili, M., Bashir, I., Ahmad, M., Yaqoob, U., & Geelani, S. (2022). *In vitro* strategies for the enhancement of secondary metabolite production in plants: a review. *Bull Natl Res Cent. 46(1), 35.* doi: 10.1186/s42269-022-00717-z.

- Fernández, A., & Huaccha, J. (2022). *Fenología reproductiva de Cinchona micrantha en el bosque montano de La Cascarilla, Jaén, Perú*. *Revista Peruana de Botánica*, 29(1), 23–31.
- Fernández, F. (2020). Modelos de regresión con R: Multicolinealidad. Recuperado de https://fhernanb.github.io/libro_regresion/multicoli.html
- Figueroa Preciado, G. (2020). Optimización de una superficie de respuesta. Recuperado de <https://semana.mat.uson.mx/Memorias/gudelia.pdf>
- Flores, C., & Flores, K. (2021). Pruebas para comprobar la normalidad de datos en procesos productivos: Anderson-Darling, Ryan-Joiner, Shapiro-Wilk y Kolmogórov-Smirnov. *Revista de Ciencias Sociales y Humanidades*, 23(2), 83-106.
- Frontiers in Plant Science. (2024). The role of light in regulating plant growth, development and sugar metabolism: A review. <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2024.1507628/full>
- Frontiers in Plant Science. (2024). Photoperiod control of plant growth: Flowering time genes beyond flowering. <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2021.805635/full>
- Gaidamashvili, M., & Benelli, C. (2021). Threatened Woody Plants of Georgia and Micropropagation as a Tool for *In Vitro* Conservation. *Agronomy* 11, 1082. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061082>
- Gavilánez Luna, F. (2021). Diseños y análisis estadísticos para experimentos agrícolas. Ediciones Díaz de Santos.
- Gallego, M., & Diaz, Y. (2008). Propagación asexual de cascarillo (*Ladenbergia oblongifolia*, mutis) en condiciones de vivero en el municipio de Popayán en el departamento del Cauca. [Tesis]. [Cauca]: Universidad de Cauca.
- García-Ramírez, Y. (2023). Temporary immersion system for *in vitro* propagation via organogenesis of forest plant species. *Trees*, 37, 425-438. <https://doi.org/10.1007/s00468-022-02379-w>

- Gil, A. E., López, S. E., & Mostacero, J. (2016). Efecto sinérgico del ácido indolacético, ácido giberélico y 6-bencilaminopurina en la propagación *in vitro* de "papaya" *Carica papaya* L. (Caricaceae). *Arnaldoa*, 23(2), 577-586. <https://journal.upao.edu.pe/Arnaldoa/article/view/673>
- Gil, A. E., López, S. E., Mostacero, J., & De la Cruz, J. (2019). Efecto sinérgico del ácido giberélico y del ácido indolacético en la propagación *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. "papa nativa de pulpa de color". *REBIOL*, 40(2), 18-26. <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/facccbiol/article/view/2733>
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G.-J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture* (3rd ed.). Springer.
- Gordon, S., Heisler, M., Reddy, G., Ohno, C., Das, P., & Meyerowitz, E. (2007). Pattern formation during de novo assembly of the Arabidopsis shoot meristem. *Development*, 134(19), 3539–3548. <https://doi.org/10.1242/dev.010298>
- Guillén, S., Cruz, C., Martínez, J., & Martínez, A. (2022). Efecto de N6-Benciladenina y fotoperíodo en la floración de protocormos *in vitro* de *Bletia urbana* (Orchidaceae). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 45(4), 475-482. <https://doi.org/10.35196/rfm.2022.4.475>
- Gutiérrez-Pulido, H., y de la Vara-Salazar, R. (2012). *Análisis y diseño de experimentos* (3a ed.). McGraw-Hill/Interamericana.
- Hartmann, H. T., & Kester, D. E. (1994). *Plant propagation: Principles and practices* (6th ed.). Prentice Hall.
- Harrington, E. C. (1965). The desirability function. *Industrial Quality Control*, 21(10), 494-498.
- Hair, J. F., Black, W. C., Babin, B. J., & Anderson, R. E. (2014). *Análisis de datos multivariante* (7ª ed.). Pearson.
- Haque, M. I., Singh, P. K., Ghuge, S., Kumar, A., Rai, A. C., Kumar, A., & Modi, A. (2022). A general introduction to and background of plant tissue culture: Past, current, and future aspects. En A. C. Rai, A. Kumar, A. Modi, & M. Singh

- (Eds.), *Advances in plant tissue culture* (pp. 1–30). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90795-8.00019-9>
- Henze, N., & Jiménez-Gamero, M. D. (2021). A new class of tests for multinormality with i.i.d. and Garch data based on the empirical moment generating function. *TEST*, 30(2), 435-456.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7243014>
- Hernández, A., Pineda, A., Rojas, J., Díaz, H. (2021). Regeneración *in vitro* de arnaucho (*Capsicum chinense* Jacq.) a partir de yemas apicales. *Manglar*, 18(1), 71-75.
- Hu, G., Li, X., Yang, J., Yuan, Q., Yang, S., Fu, W., Zhang, X., Li, Y., Shen, Z., & Jiang, J. (2024). Effects of Photoperiod and Light Quality on Germination and Growth of *Camellia sinensis* 'HuangKui'. *Plants* 13,1782.
<https://doi.org/10.3390/plants13131782>
- Huamán, L., Albán, J., Chilquillo, E. (2019). Aspectos taxonómicos y avances en el conocimiento del estado actual del árbol de la quina (*Cinchona officinalis* L.) en el norte de Perú. *Ecología Aplicada*, 18(2): 145-153. <http://dx.doi.org/10.21704/rea.v18i2.1333>
- Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A., & Sugimoto, K. (2016). Plant regeneration : cellular origins and molecular mechanisms. *The Company of Biologist*, 143, 1442–1451. <https://doi.org/10.1242/dev.134668>
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *The Plant Cell*, 25(9), 3159–3173.
<https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053>
- IPBES. (2022). *Thematic assessment report on the sustainable use of wild species of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services (IPBES)*. IPBES Secretariat.
<https://www.ipbes.net/sustainable-use-assessment>
- IntechOpen. (2024). Application of central composite design with Design Expert v13 in process optimization. <https://www.intechopen.com/chapters/85787>

- Jafari, M., Daneshvar, M. H., Jafari, S., & Hesami, M. (2022). Machine Learning-Assisted *In Vitro* Rooting Optimization in *Passiflora caerulea*. *Forests*, 13(12), 2020. <https://doi.org/10.3390/f13122020>
- Jaramillo, H. A. L., Pinos, C. A. E., Sarango, A. F. H., & Román, H. D. O. (2023). Histograma y distribución normal: Shapiro-Wilk y Kolmogorov Smirnov aplicado en SPSS: Histogram and normal distribution: Shapiro-Wilk and Kolmogorov Smirnov applied in SPSS. *LATAM Revista Latinoamericana de Ciencias Sociales y Humanidades*, 4(4), 596-607.
- Jyostna, P., Sulochana, B. & Victor Babu, B. R. E. (2021). Measure of Modified Rotatability for Second Order Response Surface Designs. *Journal of Mathematical and Computational Science*, 11(1), 494-519, <https://doi.org/10.28919/jmcs/5121>
- Jiménez, T. (2019). Especies del género *Cinchona* en el Área de Conservación Privada Huaricancha, Distrito de Sónдор- Huancabamba-Piura. Tesis pregrado. Universidad de Piura, Peru.
- Jiménez-Ruiz, E., Martínez-Solís, J., Mejía-Muñoz, J., Sosa-Montes, E., & Juárez-Hernández, M. (2023). El fotoperíodo como modulador del crecimiento en *Dahlia campanulata* Saar, P. D. Sørensen & Hjert. *Revista fitotecnia mexicana*, 46(1), 77-83. Epub 02 de abril de 2024. <https://doi.org/10.35196/rfm.2023.1.77>
- JMP Statistical Software. (2024). *Optimality criteria*. En *Design of Experiments Guide*. SAS Institute Inc. <https://www.jmp.com/support/help/en/18.1/jmp/optimalty-criteria.shtml>
- Kareem, A., Radhakrishnan, D., Wang, X., Bagavathiappan, S., Trivedi, Z., Sugimoto, K., Xu, J., Mähönen, A., & Prasad, K. (2016). Protocol: A method to study the direct reprogramming of lateral root primordia to fertile shoots. *Plant Methods*, 12(27), 1–14.
- Khadr, A., Wang, G. L., Wang, Y. H., Zhang, R. R., Wang, X. R., Xu, Z. S., Tian, Y. S., & Xiong, A. S. (2020). Effects of auxin (indole-3-butyric acid) on growth characteristics, lignification, and expression profiles of genes involved in

- lignin biosynthesis in carrot taproot. *PeerJ*, 8, e10492.
<https://doi.org/10.7717/peerj.10492>
- Krantz, J. C. (2017). *Diseño de investigación en psicología: fundamentos y aplicaciones*. Pearson
- Kirk, R. (2008). *Diseño y Análisis de Experimentos*. Publicaciones Sage.
- Kumar, V., & Van Staden, J. (2017). New insights into plant somatic embryogenesis : an epigenetic view. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(194), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2487-5>
- Landge, A., Radhakrishnan, D., Kareem, A., & Prasad, K. (2018). Intermediate Development Phases during Regeneration. Oxford University Press, (January). <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy011/4816718>
- Lawson, J. (2014). *Design and analysis of experiments with R*. CRC Press.
- Lee, H.-S., Han, J.-E., Bae, E.-K., Jie, E. Y., Kim, S. W., Kwon, H. J., Lee, H. S., Yeon, S.-H., Murthy, H. N., & Park, S.-Y. (2024). Response surface methodology mediated optimization of phytosulfokine and plant growth regulators for enhanced protoplast division, callus induction, and somatic embryogenesis in *Angelica gigas* Nakai. *BMC Plant Biology*, 24, 527. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05243-w>
- Li, Z., & Yao, J. (2019). Testing for heteroscedasticity in high-dimensional regressions. *Econometrics and Statistics* , 19, 122-139.
- Liang, J., Tang, M., Shing, P. (2009). A generalized Shapiro–Wilk W statistic for testing high-dimensional normality. *Computational Statistics and Data Analysis*, 53 , 3883-3891. <https://doi.org/10.1016/j.csda.2009.04.016>
- Lima, N., Moreno, J., Eras, V., Minchala, J., González, D., Yaguana, M., Valarezo, C. (2018). Propagación *in vitro* de *Cinchona officinalis* L a partir de semillas. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 20(2), 169-178.
- Lincoln, T., Zeiger, E. (2006). *Fisiología Vegetal* (3era ed., Vol. 1). Edit. Universitat Jaume.

- Liu, J., Cao, R., Xu, M., Wang, X., Zhang, H., Hu, H., et al. (2020). Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection *in vitro*. *Cell Discov*, 6(1), 1-4. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0156-0>
- Luzuriaga, H., Espinosa, C., Haro-, A., & Ortiz, H. (2023). Histograma y distribución normal: Shapiro-Wilk y Kolmogorov Smirnov aplicado en SPSS. *Revista Latinoamericana De Ciencias Sociales Y Humanidades*, 4(4), 596- 607. <https://doi.org/10.56712/latam.v4i4.1242>
- López, S. E., Mostacero, J., Gil, A. E., López, A. M., & De La Cruz, A. J. (2019). Efecto del ácido giberélico y del ácido indolacético en la micropropagación *in vitro* de *Solanum tuberosum* var. Maria Reiche. *REBIOL*, 39(1), 4-9. <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/facccbiol/article/view/2472>
- López, S., Mostacero, J., Costilla, N., Gil, A., De la Cruz, A., Villena, L. (2020). Cuantificación de alcaloides de *Ladenbergia oblongifolia* (Humb. ex mutis) L. Andersson “árbol de la quina”. *Rebiol*, 40(2), 170-176.
- Lorenzano, P. (2007). Leyes fundamentales y leyes de la biología. *Scientiae Studia*, 5(2), 185-214. <https://doi.org/10.1590/S1678-31662007000200004>
- Lozano, E. (2024). Clasificación de las Pruebas de Normalidad Multivariante según su desempeño. (tesis posgrado). Universidad Nacional del Santa.
- Mahmoudieh, M., Naghavi, M. R., Sobri, Z. M., Azzeme, A. M., Abd-Aziz, N., Nik Abd Rahman, N. M. A., Alitheen, N. B., Hussin, Y., Bahmanrokh, G., & Baharum, N. A. (2024). Biotechnological approaches in the production of plant secondary metabolites for treating human viral diseases: Prospects and challenges. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 59, 103249. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103249>
- Mardia, K. V., Kent, J. T., & Bibby, J. M. (1979). *Multivariate analysis*. Academic Press.
- Martínez, F. X. (1994). Influencia del acondicionamiento de las plantas madre sobre el enraizado de esquejes foliados de plantas ornamentales. *Revista Horticultura*, 101, Nov-Dic.

- Marengo, R., Antezana, S. (2021). El análisis de regresión por componentes principales muestra el efecto libre de colinealidad de variables climáticas subestimadas sobre el crecimiento de los árboles en la Amazonia central. *Revista de Biología Tropical*, 69 (2), 482-495.
- Martins, D., & Nunez, C. (2015). Secondary metabolites from Rubiaceae species. *Molecules* 20(7):13422-95. <https://doi.org/10.3390/molecules200713422>
- Mayelí, M. (2017). Efecto de las hormonas vegetales y el fotoperíodo en la producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) *Rev. Colomb. Biotecnol.* 19(2), 25 – 34
- Mayorga, R. B., Graciano, D. C., Martínez, A., Moctezuma z, P. M., Pérez, B., & Roldan, A. (2022). Cuadro comparativo de Análisis Paramétrico y No Paramétrico. *Educación Y Salud Boletín Científico Instituto De Ciencias De La Salud Universidad Autónoma Del Estado De Hidalgo*, 10(20), 90-93. <https://doi.org/10.29057/icsa.v10i20.9143>
- Meza, N. M., Alvares, I., Carrera, H., Bastidas, E., & Porras, E. (2024). Efecto de la luz LED sobre el crecimiento y desarrollo de vitroplantas de cuatro variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Agroindustria, Sociedad y Ambiente*, 2(23), 49-58. <https://revistas.uclave.org/index.php/asa/article/view/5117>
- Minitab. (2024). Métrica de optimalidad para seleccionar diseño óptimo. <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/how-to/factorial/select-optimal-design/interpret-the-results/optimal-ity-metrics/>
- Montgomery, D. C. (2010). *Diseño de experimentos: principios estadísticos de diseño y análisis de la investigación* (7ª ed.). Wiley.
- Monter, A., González, E. (2024). On testing the skew normal distribution by using Shapiro–Wilk test. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, 440, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.cam.2023.115649>
- Montgomery, D. C. (2017). *Diseño y análisis de experimentos* (9ª ed.). John Wiley & Sons.

- Montgomery, D. C. (2020). *Design and Analysis of Experiments* (9th ed.). Wiley.
- Mostacero, D. (2013). *Medicina mágica: el ayer y hoy del árbol de la quina. Analicemos historia*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. <http://annalicemoshist8ria.blogspot.com/2013/06/medicina-magica-el-ayer-y-hoy-del-arbol.html>
- Mostacero, J., Mejía, F., Gamarra, O. (2009). *Fanerógamas del Perú: Taxonomía, utilidad y ecogeografía*. (1era ed.). Editorial CONCYTEC.
- Murray, N. (2006). *Introducción a la Botánica*. PEARSON EDUCACIÓN, S.A.
- Murthy, H. N., Joseph, K. S., Paek, K. Y., & Park, S. Y. (2023). Bioreactor systems for micropropagation of plants: present scenario and future prospects. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1159588. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1159588>
- Myers, R. H., & Montgomery, D. C. (1995). *Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments*. John Wiley & Sons.
- NCBI. (2024). A powerful test for multivariate normality. *PMC*, PMC3927875. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3927875/>
- NCBI. (2024). Optimization of culture conditions (sucrose, pH, and photoperiod) for *in vitro* regeneration and early detection of somaclonal variation in ginger lime (*Citrus assamensis*). *PMC*, PMC3995104. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3995104/>
- Nogueira, L., Silva, M., da Silva Souza, J., de Melo Souza, A., de Souza, D., Gomes, I., Da Silva, J., Brito, E., Carvalho, M. (2024). Resposta da interação entre diferentes doses de ácido indolacético e ácido giberélico no desenvolvimento de brotações e enraizamento do morango. <https://www.livrariaepamig.com.br/wp-content/uploads/2024/04/CT-400.pdf>
- Parveen, S., Maurya, N., Meena, A., & Luqman, S. (2024). Cinchonine: A Versatile Pharmacological Agent Derived from Natural Cinchona Alkaloids. *Curr Top Med Chem*. 24(4):343-363. doi: 10.2174/0115680266270796231109171808. PMID: 38031797.

- Pierik, R. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Dordrecht, Holanda: Ediciones Mundi-Prensa.
- Pérez, M. (2021). Determinación de los Parámetros en la Deshidratación Osmótica en Láminas de Mashua (*Tropaeolum tuberosum*), Mediante la Metodología de Superficie de Respuesta. (tesis pregrado). Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac. Abancay, Perú.
- Pérez, O., Acosta Solares, A., Albernas Carvajal, Y., & Cortés Falcón, M. F. (2021). Potencialidades de la metodología de superficie de respuesta en la optimización experimental en la industria química y alimentaria. *Centro Azúcar*, 48(4), 123-138. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.
- Porras, E. (2017). *Estadística aplicada a las ciencias de la salud*. Editorial Universidad de Antioquia.
- Pulianmackal, A., Kareem, A., Durgaprasad, K., Trivedi, Z., & Prasad, K. (2014). Competence and regulatory interactions during regeneration in plants. *Frontiers in Plant Science*, 5(142), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00142>
- Remuzgo, J., Alvarez, A., Sales, F., & Valdivieso, G. (2020). Caracterización Taxonómica y Fitoquímica de *Cinchona pubescens* y *Ladenbergia oblongifolia* en el Ámbito del Valle Alto Huallaga – región Huánuco. *REBIOL*. 42(2): 242-255. doi: <http://dx.doi.org/10.17268/rebiol.2020.40.02.11>
- Reji, M., & Kumar, R. (2023). Response surface methodology (RSM): An overview to analyze multivariate data. *Indian Journal of Microbiology Research*, 10(3), 152-162. <https://www.ijmronline.org/html-article/18202>
- Roca, W., & Mroginski, L. (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Cali, Colombia.
- Rodriguez, R., Barrutia, I., Marín, T. (2020). Germination of *Cinchona officinalis* L. seeds in three soils types of Cajamarca, Peru. *Revista Cubana de Ciencias Forestales*, 8(1): 75-87. <http://cfores.upr.edu.cu/index.php/cfores/article/view/488>

- Rama, T., Ayesha, D., Neeraj, K., Mohd, M., Tanveer, N., Mohammad, K., Khaled, A., Yasser, A., Rani, R., Perwez, A., Swati, M. (2023). In-vitro and ex-vivo antidiabetic, and antioxidant activities of Box-Behnken design optimized *Solanum xanthocarpum* extract loaded niosomes. *Saudi Pharmaceutical Journal* , 31(101785) , 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2023.101785>
- Royston, J. P. (1983). Some techniques for assessing multivariate normality based on the Shapiro-Wilk W. *Applied Statistics*, 32, 121–133.
- Saber, W.I.A., El-Naggar, N.EA., El-Hersh, M.S., Khateeb,A., Elsayed, A., Eldadamonía, N., Ghoniem, A. (2021). Diseño compuesto central giratorio versus red neuronal artificial para modelar la biosorción de Cr6+ por los inmovilizados *Pseudomonas alcaliphila* NEWG-2. *Scientific Reports*,11,1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81348-8>
- Sanchez-Olate, M., Zapata, J., Rios, D., Pereira, G., & Escobar, R. (2003). Efecto del fotoperíodo en el desarrollo de plantas de *Eucalyptus globulus* Labill. ssp. *globulus* cultivadas en vivero. *Bosque (Valdivia)*, 24(2), 23-28. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002003000200003>
- Sanchez, S. M. (2011). Better than a petaflop: The power of efficient experimental design. In S. Jain, R. R. Creasey, J. Himmelspace, K. P. White, & M. Fu (Eds.), *Proceedings of the 2011 Winter Simulation Conference* (pp. 60-74). IEEE.
- Salazar, J. (2023). "Anexos: (Descripción y Criterios de calidad)." Universidad Salazar Virtual. Recuperado de <https://salazarvirtual.sistemaeducativosalazar.mx/assets/6346f704b191c/tareas/13221312db2f24bc4e0e76d494ea38f6>
- Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica. (s.f.). *Convención sobre la Diversidad Biológica*. <https://www.cbd.int/>
- Seguí, J. (2013). *Biología y Biotecnología reproductiva de las plantas* (1era ed.). Editorial Universitat Politecnica de Valencia.
- İmrek, Ö., Bekerci, A. D., Isak, M. A., Bulut, F., Zgü, T., Tütüncü, M., & Dönmez, D. (2024). Optimizing micropropagation and rooting protocols for diverse lavender genotypes: A synergistic approach integrating machine learning

techniques. Horticulturae, 10(1), 52.
<https://doi.org/10.3390/horticulturae10010052>

Silva, C., Leiva, M., Sanchez, N., & del Castillo, D. (2023). Influencia de las condiciones de iluminación sobre el establecimiento *in vitro* de yemas de *Solanum tuberosum* L. var. Cecilia. *Revista Bionatura*, 8(3), 9-16.
<https://revistas.uclave.org/index.php/asa/article/view/5117>

SixSigma.us. (2024). Response surface methodology (RSM) in design of experiments. <https://www.6sigma.us/six-sigma-in-focus/response-surface-methodology-rsm/>

Sepúlveda, J., Torres, J., Sandoval, C., Martínez, J., Chan, J. (2018). La importancia de los metabolitos secundarios en el control de nematodos gastrointestinales en ovinos con énfasis en Yucatán, México. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 5(2):79-95.

Scientific Reports. (2024). An efficient micropropagation protocol for an endangered ornamental tree species (*Magnolia sirindhorniae* Noot. & Chalermglin) and assessment of genetic uniformity through DNA markers. *Nature*, 9, 9240.
<https://www.nature.com/articles/s41598-019-46050-w>

Sinchi, E. (2024). Efecto de longitudes de onda de luz y ácido giberelico en la germinación de semillas de *Hylocereus* sp. (pitahaya) cv amarilla. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María, Perú.

Singh, J., & Sood, A. (2020). Modeling and optimizing culture medium mineral composition for *in vitro* propagation of *Actinidia arguta*. *Frontiers in Plant Science*, 11, 554905. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.554905>

Stevens, P. (2019). APweb. Recuperado el 24 de setiembre de 2021 de www.mobot.org/MOBOT/research/APweb

Sugimoto, K., Gordon, S., & Meyerowitz, E. (2011). Regeneration in plants and animals: Dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends in Cell Biology*, 21(4), 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.12.004>

Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52, 591–611.

- Shi, H., Zhou, Q., He, R., Zhang, Q., & Dang, H. (2022). Climate warming will widen the lagging gap of global treeline shift relative to densification. *Agricultural and Forest Meteorology*, 318, 108917. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2022.108917>
- Springer. (2024). Central composite rotatable design for optimization of trihalomethane extraction and detection through gas chromatography: A case study. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 19(8), 7661-7672. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13762-022-04070-6>
- Taneja, J., Singh, A., Kumar, S., & Sharma, R. (2024). Precision *in vitro* propagation by integrating response surface methodology and machine learning for *Glossostigma elatinoides* (Benth) Hook. F. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. <https://doi.org/10.1007/s11627-025-10513-9>
- The Plant List. (s.f.). A working list of all plant species. Recuperado el 02 de octubre de 2021 de <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-106863>
- Torres, L. (2021). Estudio del rendimiento en la producción de caña de azúcar a partir de sus variedades, aplicando la metodología de superficie de respuesta. (tesis posgrado). Escuela Superior Politécnica Del Litoral. Guayaquil- Ecuador. <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/52180/1/T-110251.pdf>
- Torres Roda, A. (2022). Estudio de optimalidad de diseños experimentales clásicos respecto de distintos criterios de optimización. Universidad de Salamanca.
- Vaca, S., Arteaga, M., Tafur, S., Huaccha, A., & Fernández, F. (2024). Impact of light conditions on the early development of *Cinchona officinalis*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 77(1), 10659-10666. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v77n1.107836>
- Vardeman, S. B., & Jobe, J. M. (2016). *Basic engineering data collection and analysis*. Cengage Learning.
- Vásquez, A. (2024). Germinación *in vitro* de semillas de *Cinchona micrantha* Ruiz & Pav. con diferentes medios de cultivo. (tesis pregrado) Universidad Nacional del Centro del Perú. Satipo, Perú.

- Vásquez, J., Lápiz, E., Barboza, M., Vásquez, S., Quispe, L. (2018). Comparación de sustratos en la propagación sexual y asexual del árbol de la quina (*Cinchona officinalis*). *Revista de Investigación de Agroproducción Sustentable*, 2(3), 77-85.
- Vásquez, J., Lápiz, E., Barboza, M., Vásquez, S., Quispe, L. (2018). Comparación de sustratos en la propagación sexual y asexual del árbol de la quina (*Cinchona officinalis*). *Revista de Investigación de Agroproducción Sustentable*, 2(3), 77-85.
- Vásquez, R., Vásquez, R. (2016). Temas selectos de biología 2. (2da Edición). Grupo Patria S.A.
- Villavicencio, E., Lima, M., Cuenca, K., Patiño, E., & Pacheco, E. (2023). ¿Cómo escoger la prueba estadística? Manejo de datos parte 2. *Odontología Activa Revista Científica*, 8(2), 53–66. <https://doi.org/10.31984/oactiva.v8i2.885>
- Villota, Á., & Daza, H. (2022). Estimación de la aceleración de la gravedad mediante la aplicación de la física estadística. *Revista SIGMA*, 18(1), 30–39
- Vivanco, D., & Nieto, D. J. (2021). Uso de la metodología de superficie de respuesta para la optimización del secado de láminas de jengibre (*Zingiber Officinale*) en microondas y determinación de las condiciones de humedad de equilibrio. *Agroindustrial Science*, 11(2), 211-219. <https://doi.org/10.17268/agroind.sci.2021.02.11>
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., & Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 233-249.
- Wu, X., Liang, Y., Zhao, W., & Pan, F. (2025). Estrategias de adquisición de nutrientes por raíces y micorrizas en la sucesión de bosques subtropicales con limitaciones de N y P. *BMC Plant Biology*, 25, 8. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-06016-1>
- Yao, X., Ye, F., Zhang, M., Cui, C., Huang, B., Niu, P. (2020). *In Vitro* Antiviral Activity and Projection of Optimized Dosing Design of Hydroxychloroquine for the Treatment of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2

(SARS-CoV-2). *Clinical Infectious Diseases*, 71(15), 732-739.
doi:10.1093/cid/ciaa23

Yepes, A., & Buckeridge, M. (2011). Respuestas de las Plantas ante los Factores ambientales del Cambio Climático Global: Revisión. *Colombia Forestal*, 14(2), 213-232.

Zhang, L., Liu, Y., & Wang, S. (2024). The DELLA-CONSTANS transcription factor cascade integrates gibberellic acid and photoperiod signaling to regulate flowering. *PMC*, PMC5074646.
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5074646/>

Zhou, T., Liang, G., Reich, P. B., Delgado-Baquerizo, M., Wang, C., & Zhou, Z. (2024). Promoting effect of plant diversity on soil microbial functionality is amplified over time. *One Earth*, 7(12), 2139–2148.
<https://doi.org/10.1016/j.oneear.2024.10.004>

VII. ANEXOS

Anexo 1

Matriz de recolección de datos para el diseño Compuesto Central Rotable (DCCR) con puntos factoriales, axiales y centrales

| Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR) | | | | Variables respuestas | | | |
|-----------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------------|------------------|------------------|------------------|
| Corridas | X ₁ | X ₂ | X ₃ | Y ₁ | Y ₂ | Y ₃ | Y ₄ |
| 1 | -1 | -1 | -1 | Y ₁₁ | Y ₁₂ | Y ₁₃ | Y ₁₄ |
| 2 | 1 | -1 | -1 | Y ₂₁ | Y ₂₂ | Y ₂₃ | Y ₂₄ |
| 3 | -1 | 1 | -1 | Y ₃₁ | Y ₃₂ | Y ₃₃ | Y ₃₄ |
| 4 | 1 | 1 | -1 | Y ₄₁ | Y ₄₂ | Y ₄₃ | Y ₄₄ |
| 5 | -1 | -1 | 1 | Y ₅₁ | Y ₅₂ | Y ₅₃ | Y ₅₄ |
| 6 | 1 | -1 | 1 | Y ₆₁ | Y ₆₂ | Y ₆₃ | Y ₆₄ |
| 7 | -1 | 1 | 1 | Y ₇₁ | Y ₇₂ | Y ₇₃ | Y ₇₄ |
| 8 | 1 | 1 | 1 | Y ₈₁ | Y ₈₂ | Y ₈₃ | Y ₈₄ |
| 9 | - | 0 | 0 | Y ₉₁ | Y ₉₂ | Y ₉₃ | Y ₉₄ |
| 10 | | 0 | 0 | Y ₁₀₁ | Y ₁₀₂ | Y ₁₀₃ | Y ₁₀₄ |
| 11 | 0 | - | 0 | Y ₁₁₁ | Y ₁₁₂ | Y ₁₁₃ | Y ₁₁₄ |
| 12 | 0 | | 0 | Y ₁₂₁ | Y ₁₂₂ | Y ₁₂₃ | Y ₁₂₄ |
| 13 | 0 | 0 | - | Y ₁₃₁ | Y ₁₃₂ | Y ₁₃₃ | Y ₁₃₄ |
| 14 | 0 | 0 | | Y ₁₄₁ | Y ₁₄₂ | Y ₁₄₃ | Y ₁₄₄ |
| 15 | 0 | 0 | 0 | Y ₁₅₁ | Y ₁₅₂ | Y ₁₅₃ | Y ₁₅₄ |
| 16 | 0 | 0 | 0 | Y ₁₆₁ | Y ₁₆₂ | Y ₁₆₃ | Y ₁₆₄ |
| 17 | 0 | 0 | 0 | Y ₁₇₁ | Y ₁₇₂ | Y ₁₇₃ | Y ₁₇₄ |
| 18 | 0 | 0 | 0 | Y ₁₈₁ | Y ₁₈₂ | Y ₁₈₃ | Y ₁₈₄ |
| 19 | 0 | 0 | 0 | Y ₁₉₁ | Y ₁₉₂ | Y ₁₉₃ | Y ₁₉₄ |

Valores codificados (X₁, X₂ y X₃), Y1: Longitud de tallo; Y2: Longitud de entrenudos; Y3: Número de hojas; Y4: Número de raíces

Anexo 2

Matriz de recolección de datos para Diseño Box-Behnken (DBB) con puntos factoriales y centrales

| Corridas | Diseño Box-Behnken (DBB) | | | Variables respuestas | | | |
|----------|--------------------------|----------------|----------------|----------------------|------------------|------------------|------------------|
| | X ₁ | X ₂ | X ₃ | Y ₁ | Y ₂ | Y ₃ | Y ₄ |
| 1 | -1 | -1 | 0 | Y ₁₁ | Y ₁₂ | Y ₁₃ | Y ₁₄ |
| 2 | -1 | 1 | 0 | Y ₂₁ | Y ₂₂ | Y ₂₃ | Y ₂₄ |
| 3 | 1 | -1 | 0 | Y ₃₁ | Y ₃₂ | Y ₂₃ | Y ₂₄ |
| 4 | 1 | 1 | 0 | Y ₄₁ | Y ₄₂ | Y ₄₃ | Y ₄₄ |
| 5 | -1 | 0 | -1 | Y ₅₁ | Y ₅₂ | Y ₅₃ | Y ₅₄ |
| 6 | -1 | 0 | 1 | Y ₆₁ | Y ₆₂ | Y ₆₃ | Y ₆₄ |
| 7 | 1 | 0 | -1 | Y ₇₁ | Y ₇₂ | Y ₇₃ | Y ₇₄ |
| 8 | 1 | 0 | 1 | Y ₈₁ | Y ₈₂ | Y ₈₃ | Y ₈₄ |
| 9 | 0 | -1 | -1 | Y ₉₁ | Y ₉₂ | Y ₉₃ | Y ₉₄ |
| 10 | 0 | -1 | 1 | Y ₁₀₁ | Y ₁₀₂ | Y ₁₀₃ | Y ₁₀₄ |
| 11 | 0 | 1 | -1 | Y ₁₁₁ | Y ₁₁₂ | Y ₁₁₃ | Y ₁₁₄ |
| 12 | 0 | 1 | 1 | Y ₁₂₁ | Y ₁₂₂ | Y ₁₂₃ | Y ₁₂₄ |
| 13 | 0 | 0 | 0 | Y ₁₃₁ | Y ₁₃₂ | Y ₁₃₃ | Y ₁₃₄ |
| 14 | 0 | 0 | 0 | Y ₁₄₁ | Y ₁₄₂ | Y ₁₄₃ | Y ₁₄₄ |
| 15 | 0 | 0 | 0 | Y ₁₅₁ | Y ₁₅₂ | Y ₁₅₃ | Y ₁₅₄ |
| 16 | 0 | 0 | 0 | Y ₁₆₁ | Y ₁₆₂ | Y ₁₆₃ | Y ₁₆₄ |
| 17 | 0 | 0 | 0 | Y ₁₇₁ | Y ₁₇₂ | Y ₁₇₃ | Y ₁₇₄ |

Valores codificados (X₁, X₂ y X₃), Y1: Longitud de tallo; Y2: Longitud de entrenudos; Y3: Número de hojas; Y4: Número de raíces

Anexo 3

Valores codificados y valores originales de los factores y respuestas obtenidas en el Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR) para la Optimización multirespuesta en estudios de propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"

| N° de corrida | Aleatorización* | Valores codificados de los factores | | | Valores originales de los factores | | | Y ₁ : | Y ₂ : | Y ₃ : | Y ₄ : |
|---------------|-----------------|-------------------------------------|----------------|----------------|------------------------------------|----------------|----------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------|------------------------|
| | | X ₁ | X ₂ | X ₃ | F ₁ | F ₂ | F ₃ | Longitud de tallo (cm.) | Longitud entrenudos (mm.) | Número de hojas (ud.) | Número de raíces (ud.) |
| 1 | 7 | -1 | -1 | -1 | 8 | 0.25 | 0.25 | 5.0 | 0.8 | 4 | 4 |
| 2 | 13 | 1 | -1 | -1 | 16 | 0.25 | 0.25 | 5.2 | 0.9 | 6 | 6 |
| 3 | 4 | -1 | 1 | -1 | 8 | 0.75 | 0.25 | 5.3 | 0.4 | 3 | 2 |
| 4 | 19 | 1 | 1 | -1 | 16 | 0.75 | 0.25 | 5.0 | 0.9 | 7 | 6 |
| 5 | 2 | -1 | -1 | 1 | 8 | 0.25 | 0.75 | 4.8 | 1.0 | 8 | 7 |
| 6 | 15 | 1 | -1 | 1 | 16 | 0.25 | 0.75 | 5.2 | 0.9 | 5 | 5 |
| 7 | 8 | -1 | 1 | 1 | 8 | 0.75 | 0.75 | 5.2 | 0.7 | 4 | 4 |
| 8 | 11 | 1 | 1 | 1 | 16 | 0.75 | 0.75 | 5.3 | 1.0 | 7 | 7 |
| 9 | 1 | -1.6818 | 0 | 0 | 5 | 0.50 | 0.50 | 5.2 | 0.6 | 4 | 4 |
| 10 | 16 | 1.6818 | 0 | 0 | 19 | 0.50 | 0.50 | 5.3 | 1.0 | 6 | 6 |
| 11 | 3 | 0 | -1.6818 | 0 | 12 | 0.10 | 0.50 | 5.0 | 0.9 | 6 | 6 |
| 12 | 18 | 0 | 1.6818 | 0 | 12 | 0.90 | 0.50 | 5.3 | 0.8 | 5 | 5 |
| 13 | 9 | 0 | 0 | -1.6818 | 12 | 0.50 | 0.10 | 5.1 | 0.5 | 4 | 4 |
| 14 | 5 | 0 | 0 | 1.6818 | 12 | 0.50 | 0.90 | 5.0 | 0.9 | 6 | 6 |
| 15 | 12 | 0 | 0 | 0 | 12 | 0.50 | 0.50 | 5.1 | 0.7 | 5 | 5 |
| 16 | 17 | 0 | 0 | 0 | 12 | 0.50 | 0.50 | 5.1 | 0.7 | 5 | 5 |
| 17 | 6 | 0 | 0 | 0 | 12 | 0.50 | 0.50 | 5.2 | 0.8 | 5 | 5 |
| 18 | 14 | 0 | 0 | 0 | 12 | 0.50 | 0.50 | 5.2 | 0.9 | 5 | 5 |
| 19 | 10 | 0 | 0 | 0 | 12 | 0.50 | 0.50 | 5.2 | 0.8 | 4 | 4 |

Nota: Valores codificados (X₁, X₂ y X₃); valores originales de los factores (F1: Fotoperíodo; F2: Ácido Giberélico y F3: Ácido Indolacético)

Los valores teóricos de los puntos axiales (= ±1.6818) fueron ajustados por razones de precisión experimental: para el fotoperíodo los valores teóricos 5.272829 y 18.727171, fueron redondeados a 5 y 19 respectivamente.

Para el ácido giberélico y ácido indolacético, los valores teóricos de 0.07955 y 0.92045 fueron redondeados a 0.10 y 0.90 respectivamente, para facilitar la preparación de soluciones y garantizar la reproducibilidad del experimento.

Para el análisis estadístico se mantuvieron los valores teóricos de los puntos axiales.

* Números aleatorios generados para asignar aleatoriamente las corridas a los explantes uninodales.

Anexo 4

Valores codificados y valores originales de los factores y respuestas obtenidas en el Diseño Box-Behnken (DBB) para la Optimización multirespuesta en estudios de propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"

| N° de corrida | Aleatorización* | Valores codificados de los factores | | | Valores originales de los factores | | | Y ₁ : Longitud de tallo (cm.) | Y ₂ : Longitud entrenudos (mm.) | Y ₃ : Número de hojas (ud.) | Y ₄ : Número de raíces (ud.) |
|---------------|-----------------|-------------------------------------|----------------|----------------|------------------------------------|----------------|----------------|------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|
| | | X ₁ | X ₂ | X ₃ | F ₁ | F ₂ | F ₃ | | | | |
| 1 | 4 | -1 | -1 | 0 | 8 | 0.25 | 0.50 | 4.8 | 0.3 | 4 | 3 |
| 2 | 12 | 1 | -1 | 0 | 16 | 0.25 | 0.50 | 4.8 | 0.4 | 5 | 5 |
| 3 | 7 | -1 | 1 | 0 | 8 | 0.75 | 0.50 | 4.7 | 0.4 | 3 | 4 |
| 4 | 15 | 1 | 1 | 0 | 16 | 0.75 | 0.50 | 5.3 | 0.8 | 6 | 8 |
| 5 | 2 | -1 | 0 | -1 | 8 | 0.50 | 0.25 | 4.6 | 0.3 | 5 | 2 |
| 6 | 9 | 1 | 0 | -1 | 16 | 0.50 | 0.25 | 4.8 | 0.9 | 6 | 6 |
| 7 | 1 | -1 | 0 | 1 | 8 | 0.50 | 0.75 | 4.4 | 0.3 | 3 | 2 |
| 8 | 5 | 1 | 0 | 1 | 16 | 0.50 | 0.75 | 4.7 | 0.4 | 7 | 3 |
| 9 | 10 | 0 | -1 | -1 | 12 | 0.25 | 0.25 | 5.2 | 0.7 | 5 | 6 |
| 10 | 3 | 0 | 1 | -1 | 12 | 0.75 | 0.25 | 5.3 | 0.7 | 6 | 6 |
| 11 | 14 | 0 | -1 | 1 | 12 | 0.25 | 0.75 | 4.6 | 0.3 | 5 | 2 |
| 12 | 6 | 0 | 1 | 1 | 12 | 0.75 | 0.75 | 5.1 | 0.9 | 6 | 6 |
| 13 | 17 | 0 | 0 | 0 | 12 | 0.50 | 0.50 | 4.9 | 0.7 | 6 | 6 |
| 14 | 8 | 0 | 0 | 0 | 12 | 0.50 | 0.50 | 5.0 | 0.7 | 6 | 5 |
| 15 | 16 | 0 | 0 | 0 | 12 | 0.50 | 0.50 | 5.0 | 0.7 | 5 | 6 |
| 16 | 13 | 0 | 0 | 0 | 12 | 0.50 | 0.50 | 5.1 | 0.8 | 6 | 5 |
| 17 | 11 | 0 | 0 | 0 | 12 | 0.50 | 0.50 | 5.0 | 0.7 | 5 | 5 |

Nota: Valores codificados (X₁, X₂ y X₃); valores originales de los factores (F₁: Fotoperíodo; F₂: Ácido Giberélico y F₃: Ácido Indolacético)

* Números aleatorios generados para asignar aleatoriamente las corridas a los explantes uninodales.

Anexo 5

Criterios de optimalidad D, A, G e I, del diseño Compuesto Central como del Diseñor Box Behnken

| Diseño Compuesto Central Rotable | | | | |
|-----------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Criterio de optimalidad | Optimalidad D | Optimalidad A | Optimalidad G | Optimalidad I |
| Y1: Longitud del tallo | 351451316.045 | 0.7542 | 0.6529 | 0.4211 |
| Y2: Longitud de entrenudos | 387164.574 | 0.3973 | 0.3973 | 0.2632 |
| Y3: Número de hojas | 3097316.588 | 0.5223 | 0.5223 | 0.3158 |
| Y4: Número de raíces | 3097316.588 | 0.5223 | 0.5223 | 0.3158 |
| Promedio | 89508278.448 | 0.5490 | 0.5237 | 0.3290 |

| Diseño Box Behnken | | | | |
|--------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Criterio de optimalidad | Optimalidad D | Optimalidad A | Optimalidad G | Optimalidad I |
| Y1: Longitud del tallo | 622592.000 | 1.2566 | 0.6842 | 0.4118 |
| Y2: Longitud de entrenudos | 2359296.000 | 1.4722 | 0.6250 | 0.4706 |
| Y3: Número de hojas | 589824.000 | 1.2222 | 0.6250 | 0.4118 |
| Y4: Número de raíces | 10485760.000 | 1.7875 | 0.7500 | 0.5294 |
| Promedio | 3514368.000 | 1.4346 | 0.6711 | 0.4559 |

Anexo 6

*Visita al centro de cultivo de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina" ubicado región Amazonas, provincia de Bagua, distrito de Aramango*



Anexo 7

*Vista del árbol de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina" en su hábitat natural, distrito de Aramango, provincia de Bagua, región Amazonas, con aprecio de su característico tronco recto y copa frondosa.*



Anexo 8

*Cápsulas maduras dehiscentes y semillas aladas de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina" recolectadas en el distrito de Aramango, provincia de Bagua, región Amazonas*



Anexo 9

*Etapas del proceso de germinación y desarrollo inicial de plántulas madre de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"*



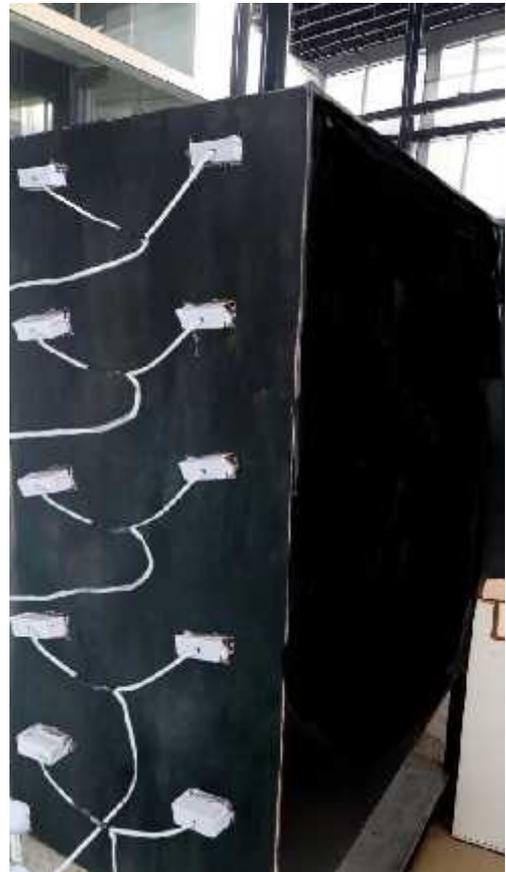
Anexo 10

Plántulas madre de Ladenbergia oblongifolia "árbol de la quina" utilizada como fuente de explantes para los ensayos de propagación in vitro.



Anexo 11

*Proceso de instalación y acondicionamiento de las cámaras de germinación artesanales con sistema de iluminación LED para el desarrollo de los ensayos de propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"*



Anexo 12

*Temporizador digital programable empleado para el control automático del fotoperíodo en la optimización de la propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"*



Anexo 13

*Componentes y reactivos principales empleados para la preparación de medios de cultivo en la propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* “árbol de la quina”*



Anexo 14

*Autoclave empleada para la esterilización húmeda del medio de cultivo y material de laboratorio en la propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"*



Anexo 15

*Horno de esterilización en seco utilizado para la desinfección del material de vidrio en la propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"*



Anexo 16

*Estufa de temperatura controlada para el secado del material de laboratorio empleado en la propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"*



Anexo 17

*Visualización de explantes uninodales de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina" previo a su introducción in vitro, mostrando yemas axilares como fuente de material meristemático*



Anexo 18

*Manipulación aséptica de explantes uninodales de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina" en cámara de flujo laminar para su establecimiento in vitro*



Anexo 19

*Inoculación de explantes uninodales de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina" en tubos de ensayo conteniendo medio de cultivo MS suplementado con reguladores de crecimiento bajo condiciones asépticas*



Anexo 20

*Cámaras de crecimiento artesanales con iluminación luz fluorescente 40w-luz de día y fotoperíodo controlado, acondicionadas para la optimización de la propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina", tanto para el diseño Compuesto Central Rotable (imagen izquierda) como para el diseño Box Behnken (imagen derecha)*



Anexo 21

Proceso de propagación in vitro de Ladenbergia oblongifolia "árbol de la quina"



Anexo 22

*Calibre de precisión (Vernier) con escala de medición 0-150 mm empleado para la evaluación morfométrica en la propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina", para medición de la longitud del tallo, longitud de entrenudo*



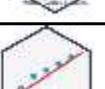
Anexo 23

*Desarrollo de explante uninodal de *Ladenbergia oblongifolia* 'árbol de la quina' en medio de cultivo in vitro: comparación entre el día inicial (izquierda) y a los 45 días de establecimiento (derecha) bajo condiciones controladas de laboratorio*



Anexo 24

Paquetes y funciones de R Studio utilizados en el análisis de superficie de respuesta para la optimización de la propagación in vitro de Ladenbergia oblongifolia "árbol de la quina"

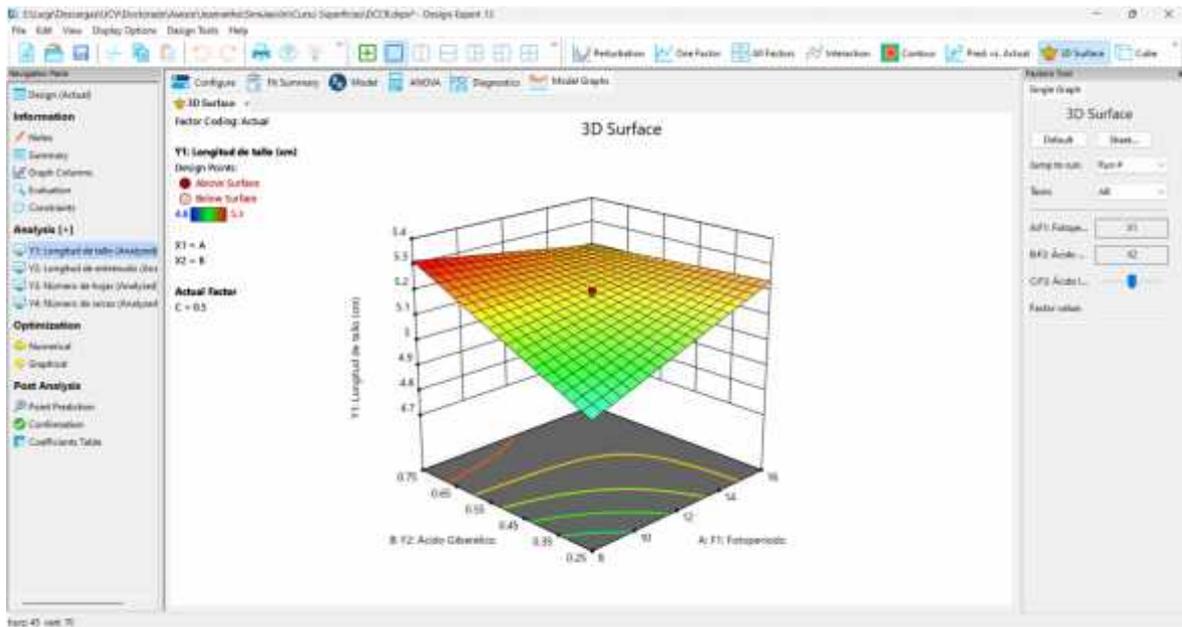
| Paquete | Logo alusivo | Funciones utilizadas | Descripción del paquete |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| rsm |  | ccd(), rsm(), FO(), TWI(), PQ(), contour() | Implementa metodología de superficie de respuesta, incluyendo diseños experimentales y análisis de datos. |
| nortest |  | ad.test() | Proporciona pruebas de normalidad, incluyendo la prueba de Anderson-Darling. |
| ggplot2 |  | ggplot(), geom_tile(), scale_fill_gradient(), labs(), theme_minimal() | Sistema para crear gráficos estadísticos elegantes y flexibles. |
| lattice |  | wireframe() | Implementa técnicas de visualización de datos multidimensionales mediante gráficos tipo Trellis. |
| MASS |  | ginv() | Contiene funciones para análisis estadístico multivariado y álgebra matricial. |
| car |  | vif() | Proporciona funciones para análisis de regresión aplicada, incluyendo diagnósticos. |
| lmtest |  | bptest(), dwtest() | Ofrece pruebas de diagnóstico para modelos de regresión lineal. |
| MVN |  | mvn() | Evalúa la normalidad multivariante y realiza pruebas relacionadas. |
| vars |  | white.test() | Implementa análisis de series de tiempo multivariadas y pruebas de diagnóstico. |
| dplyr |  | %>% (pipe)\n- group_by()\n- summarise()\n- arrange() | Implementa una gramática de manipulación de datos, facilitando la transformación y agregación de marcos de datos. |
| tidyr |  | gather()\n- spread() | Proporciona funciones para la reestructuración y limpieza sistemática de conjuntos de datos. |
| knitr |  | kable() | Ofrece herramientas para la generación de reportes dinámicos y documentación reproducible en R. |
| fields |  | image.plot()\n- set.panel() | Proporciona herramientas para el análisis espacial, interpolación y visualización de campos aleatorios. |
| stats |  | shapiro.test()\n- predict() | Implementa funciones fundamentales para análisis estadístico y modelado en R. |

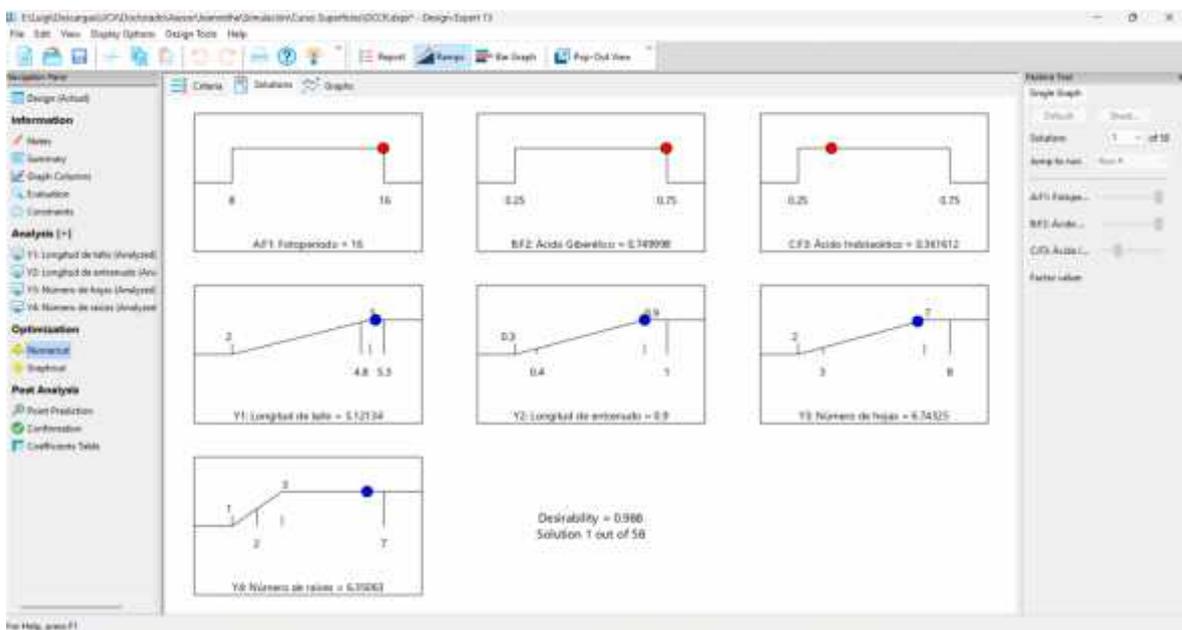
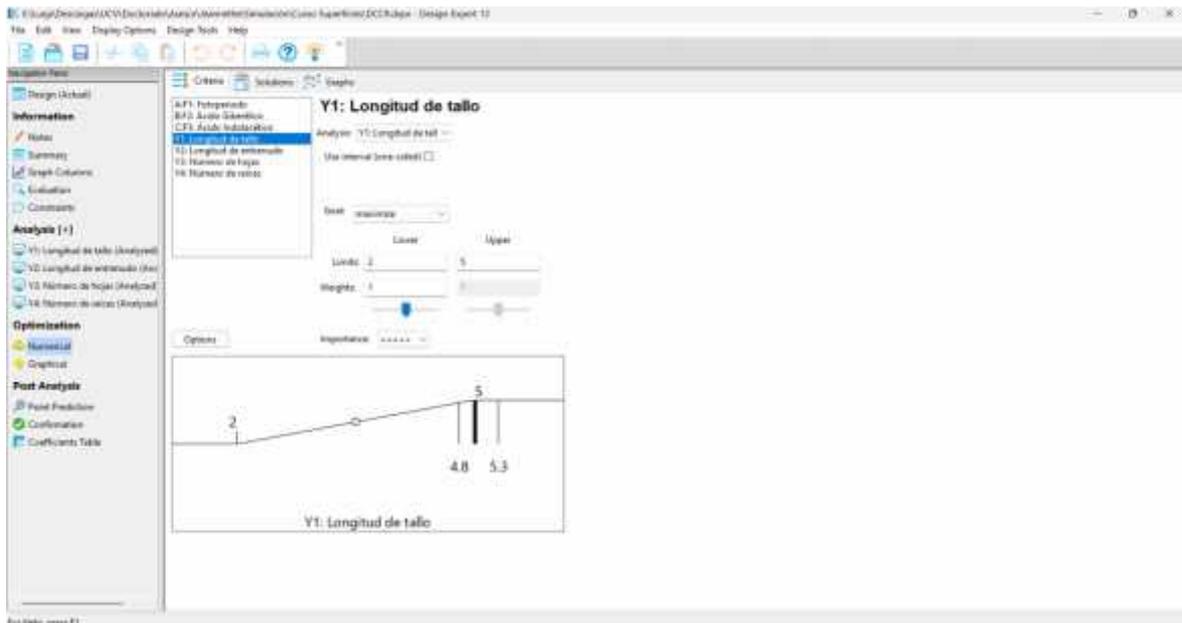
Anexo 25

Resultados del Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR) para la propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina" en Design-Expert

Design-Expert (C:\Program Files\Design-Expert\Design-Expert\Design-Expert.exe) - Design Expert 13

| Run | Factor 1 A: F1: Fitosporio | Factor 2 B: F2: Ácido Glúc. | Factor 3 C: F3: Ácido málc. | Response 1 Y1: Longitud de tallo (cm) | Response 2 Y2: Longitud de raíz (cm) | Response 3 Y3: Número de tallos | Response 4 Y4: Número de raíces |
|-----|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 12 | 1 | 12 | 0.020448 | 0.0 | 5.2 | 0.0 | 3 |
| 9 | 2 | 18 | 0.23 | 0.75 | 5.2 | 0.0 | 3 |
| 16 | 3 | 12 | 0.5 | 0.5 | 5.1 | 0.7 | 3 |
| 2 | 4 | 18 | 0.25 | 0.25 | 5.2 | 0.9 | 3 |
| 3 | 5 | 8 | 0.75 | 0.25 | 5.0 | 0.4 | 3 |
| 1 | 6 | 8 | 0.25 | 0.25 | 5 | 0.8 | 4 |
| 7 | 7 | 12 | 0.070518 | 0.5 | 5 | 0.9 | 6 |
| 8 | 8 | 3.27383 | 0.5 | 0.5 | 5.2 | 0.8 | 4 |
| 7 | 9 | 8 | 0.75 | 0.75 | 5.2 | 0.7 | 4 |
| 17 | 10 | 12 | 0.5 | 0.5 | 5.1 | 0.7 | 3 |
| 10 | 11 | 18.7272 | 0.2 | 0.5 | 5.3 | 1 | 8 |
| 14 | 12 | 12 | 0.0 | 0.020448 | 5 | 0.8 | 8 |
| 8 | 13 | 18 | 0.75 | 0.75 | 5.3 | 1 | 7 |
| 18 | 14 | 12 | 0.5 | 0.0 | 5.2 | 0.8 | 3 |
| 4 | 15 | 18 | 0.75 | 0.25 | 5 | 0.8 | 7 |
| 15 | 16 | 12 | 0.0 | 0.0 | 5.2 | 0.8 | 3 |
| 18 | 17 | 12 | 0.5 | 0.0 | 5.2 | 0.8 | 4 |
| 9 | 18 | 8 | 0.25 | 0.75 | 4.8 | 1 | 8 |
| 13 | 19 | 12 | 0.5 | 0.070518 | 5.1 | 0.8 | 4 |



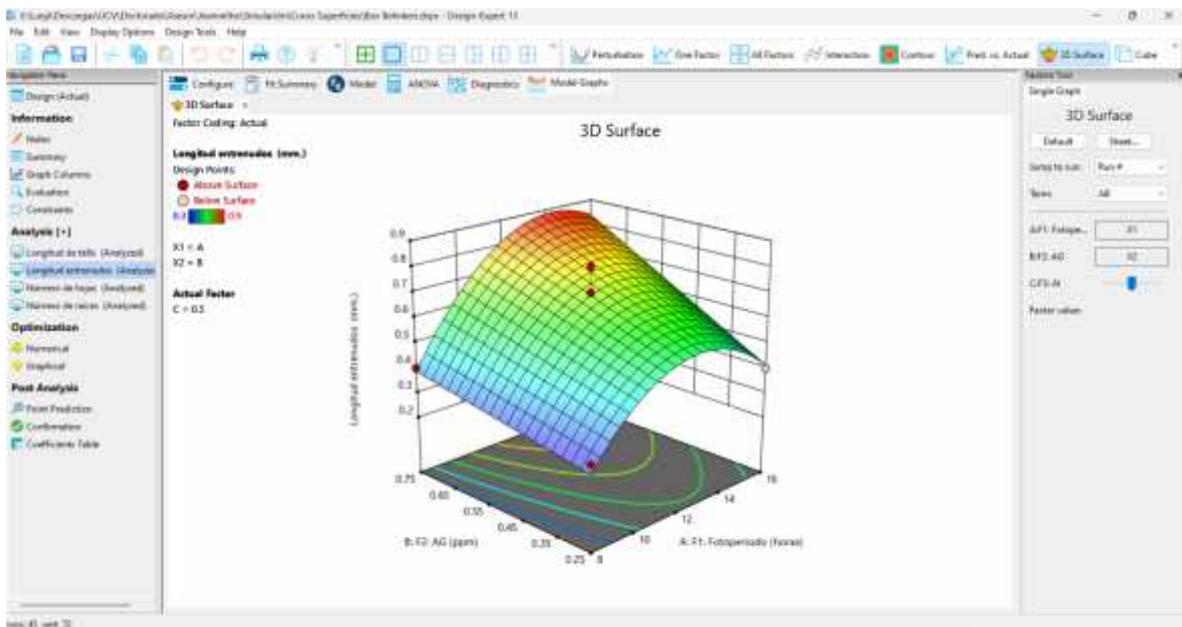


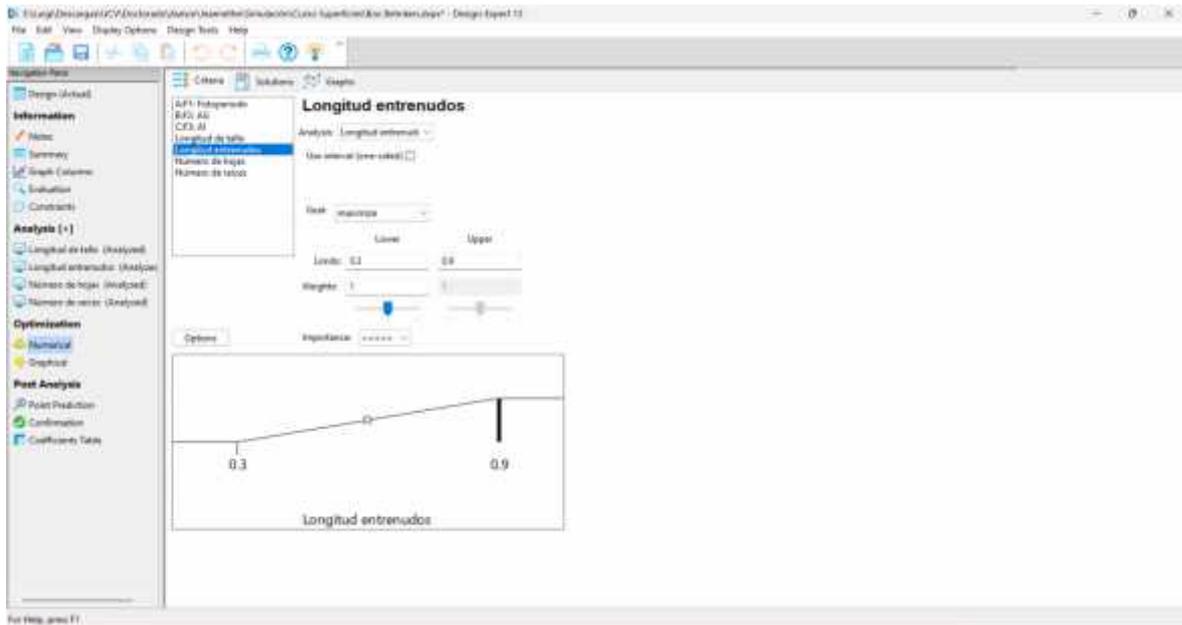
Anexo 26

Resultados del Diseño Box Behnken para la propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina", en Design-Expert

Software: Design-Expert 11

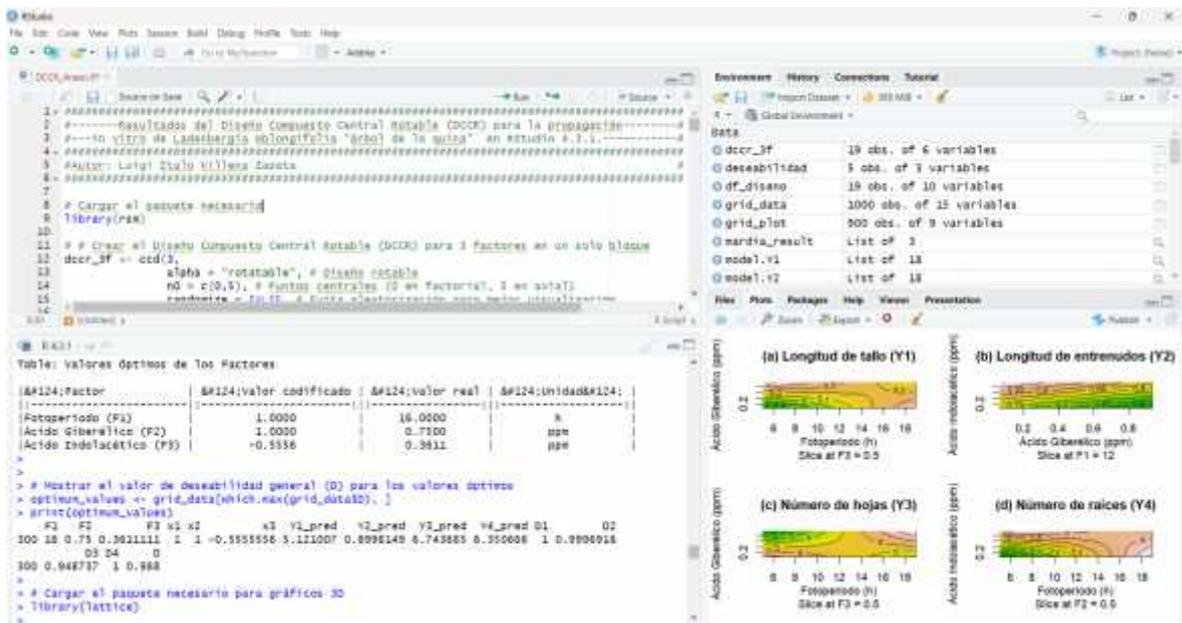
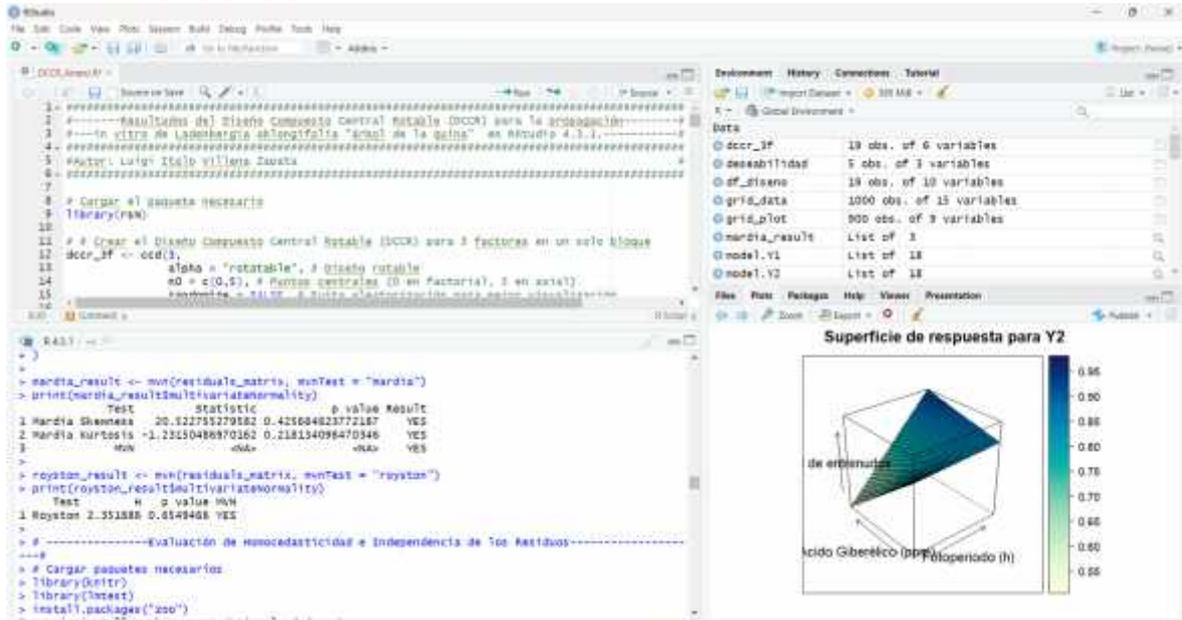
| Run | Factor 1 A-F1: Fotoperiodo (horas) | Factor 2 B-F2: AG (ppm) | Factor 3 C-F3: pH | Response 1 Longitud de tallo (cm) | Response 2 Longitud entrenudo (mm) | Response 3 Número de hojas (n.º) | Response 4 Número de raíces (n.º) |
|-----|---------------------------------------|----------------------------|----------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 11 | 1 | 12 | 0.25 | 0.75 | 4.6 | 0.0 | 1 |
| 12 | 2 | 12 | 0.75 | 0.75 | 5.1 | 0.0 | 6 |
| 13 | 3 | 12 | 0.5 | 0.5 | 4.5 | 0.7 | 6 |
| 4 | 4 | 12 | 0.25 | 0.25 | 5.2 | 0.7 | 5 |
| 15 | 5 | 12 | 0.5 | 0.5 | 5 | 0.7 | 6 |
| 6 | 6 | 8 | 0.75 | 0.5 | 4.7 | 0.4 | 4 |
| 16 | 7 | 12 | 0.75 | 0.25 | 3.8 | 0.7 | 6 |
| 8 | 8 | 16 | 0.5 | 0.75 | 4.7 | 0.4 | 7 |
| 17 | 9 | 12 | 0.5 | 0.5 | 3 | 0.7 | 5 |
| 9 | 10 | 8 | 0.5 | 0.25 | 4.4 | 0.0 | 5 |
| 1 | 11 | 8 | 0.25 | 0.2 | 4.3 | 0.3 | 4 |
| 14 | 12 | 12 | 0.5 | 0.5 | 5.1 | 0.0 | 6 |
| 4 | 13 | 16 | 0.75 | 0.5 | 3.3 | 0.0 | 6 |
| 7 | 14 | 8 | 0.5 | 0.75 | 4.4 | 0.0 | 2 |
| 2 | 15 | 16 | 0.25 | 0.5 | 4.3 | 0.4 | 3 |
| 5 | 16 | 16 | 0.5 | 0.25 | 4.0 | 0.0 | 6 |
| 18 | 17 | 12 | 0.2 | 0.2 | 5 | 0.7 | 2 |





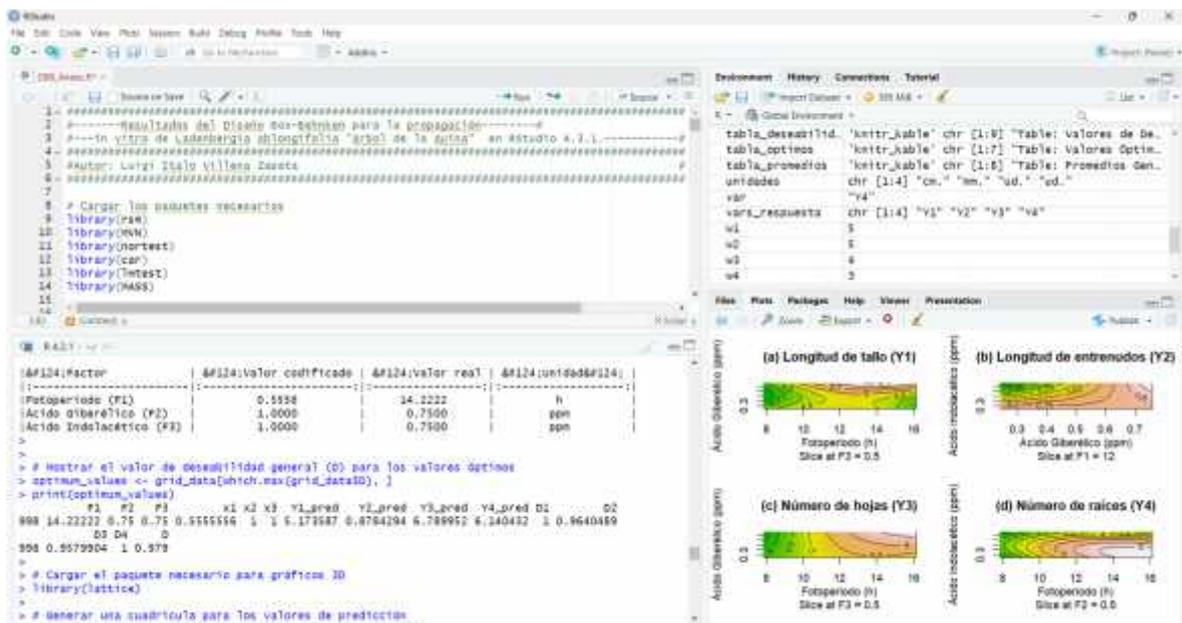
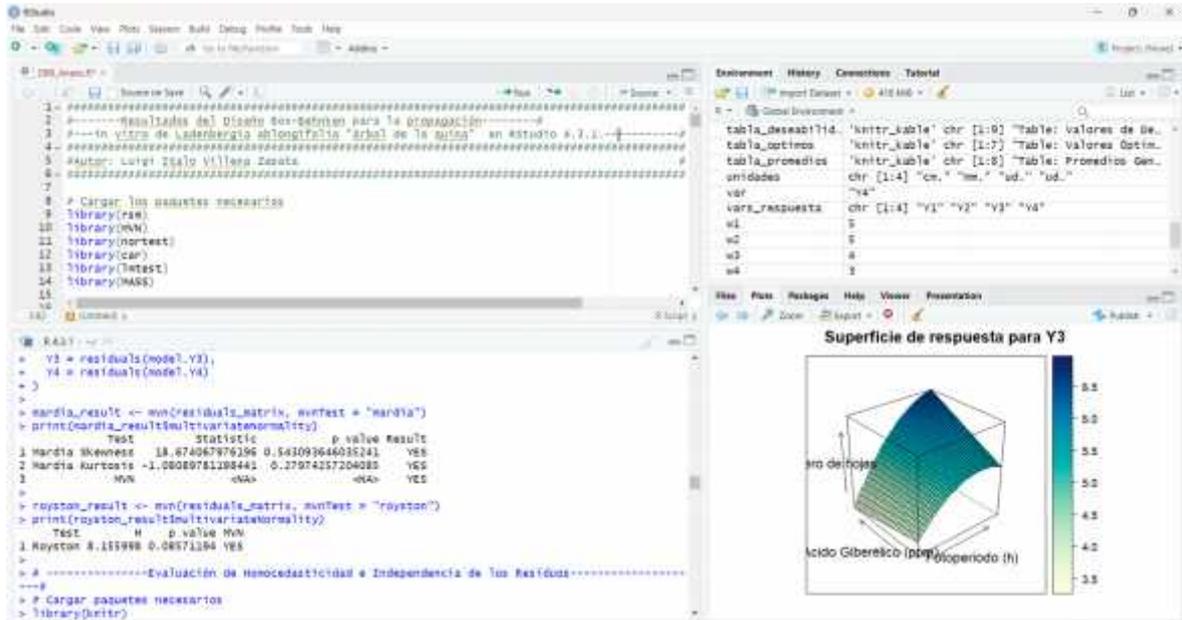
Anexo 27

Resultados del Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR) para la propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina" en RStudio 4.3.1.



Anexo 28

Resultados del Diseño Box Behnken (DBB) para la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina" en RStudio 4.3.1.



**Ficha de Validación de Expertos de la Ficha de Registro de Propagación
in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"**

**Ficha de Registro de Propagación In vitro de *Ladenbergia oblongifolia*
"árbol de la quina"**

Datos Generales

- Fecha de siembra: 18/05/2023
- Fecha de evaluación: 02/07/2023

*Esquema de registro de datos para análisis de crecimiento in vitro, para el Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR) para la Optimización multirespuesta en estudios de propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"*

| N° de corrida | Aleatorización* | Y ₁ : Longitud de tallo (cm.) | Y ₂ : Longitud entrenudos (mm.) | Y ₃ : Número de hojas (ud.) | Y ₄ : Número de raíces (ud.) |
|---------------|-----------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 1 | 7 | Y ₁₁ = | Y ₁₂ = | Y ₁₃ = | Y ₁₄ = |
| 2 | 13 | Y ₂₁ = | Y ₂₂ = | Y ₂₃ = | Y ₂₄ = |
| 3 | 4 | Y ₃₁ = | Y ₃₂ = | Y ₃₃ = | Y ₃₄ = |
| 4 | 19 | Y ₄₁ = | Y ₄₂ = | Y ₄₃ = | Y ₄₄ = |
| 5 | 2 | Y ₅₁ = | Y ₅₂ = | Y ₅₃ = | Y ₅₄ = |
| 6 | 15 | Y ₆₁ = | Y ₆₂ = | Y ₆₃ = | Y ₆₄ = |
| 7 | 8 | Y ₇₁ = | Y ₇₂ = | Y ₇₃ = | Y ₇₄ = |
| 8 | 11 | Y ₈₁ = | Y ₈₂ = | Y ₈₃ = | Y ₈₄ = |
| 9 | 1 | Y ₉₁ = | Y ₉₂ = | Y ₉₃ = | Y ₉₄ = |
| 10 | 16 | Y ₁₀₁ = | Y ₁₀₂ = | Y ₁₀₃ = | Y ₁₀₄ = |
| 11 | 3 | Y ₁₁₁ = | Y ₁₁₂ = | Y ₁₁₃ = | Y ₁₁₄ = |
| 12 | 18 | Y ₁₂₁ = | Y ₁₂₂ = | Y ₁₂₃ = | Y ₁₂₄ = |
| 13 | 9 | Y ₁₃₁ = | Y ₁₃₂ = | Y ₁₃₃ = | Y ₁₃₄ = |
| 14 | 5 | Y ₁₄₁ = | Y ₁₄₂ = | Y ₁₄₃ = | Y ₁₄₄ = |
| 15 | 12 | Y ₁₅₁ = | Y ₁₅₂ = | Y ₁₅₃ = | Y ₁₅₄ = |
| 16 | 17 | Y ₁₆₁ = | Y ₁₆₂ = | Y ₁₆₃ = | Y ₁₆₄ = |
| 17 | 6 | Y ₁₇₁ = | Y ₁₇₂ = | Y ₁₇₃ = | Y ₁₇₄ = |
| 18 | 14 | Y ₁₈₁ = | Y ₁₈₂ = | Y ₁₈₃ = | Y ₁₈₄ = |
| 19 | 10 | Y ₁₉₁ = | Y ₁₉₂ = | Y ₁₉₃ = | Y ₁₉₄ = |

*Números aleatorios generados para establecer el orden de ejecución de las corridas experimentales.

Datos Generales

- Fecha de siembra: 19/05/2023
- Fecha de evaluación: 03/07/2023

Esquema de registro de datos para análisis de crecimiento in vitro, para el Diseño Box-Behnken (DBB) para la Optimización multirespuesta en estudios de propagación in vitro de Ladenbergia oblongifolia "árbol de la quina"

| N° de corrida | Aleatorización* | Y ₁ : Longitud de tallo (cm.) | Y ₂ : Longitud entrenudos (mm.) | Y ₃ : Número de hojas (ud.) | Y ₄ : Número de raíces (ud.) |
|---------------|-----------------|------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|
| 1 | 4 | Y ₁₁ = | Y ₁₂ = | Y ₁₃ = | Y ₁₄ = |
| 2 | 12 | Y ₂₁ = | Y ₂₂ = | Y ₂₃ = | Y ₂₄ = |
| 3 | 7 | Y ₃₁ = | Y ₃₂ = | Y ₃₃ = | Y ₃₄ = |
| 4 | 15 | Y ₄₁ = | Y ₄₂ = | Y ₄₃ = | Y ₄₄ = |
| 5 | 2 | Y ₅₁ = | Y ₅₂ = | Y ₅₃ = | Y ₅₄ = |
| 6 | 9 | Y ₆₁ = | Y ₆₂ = | Y ₆₃ = | Y ₆₄ = |
| 7 | 1 | Y ₇₁ = | Y ₇₂ = | Y ₇₃ = | Y ₇₄ = |
| 8 | 5 | Y ₈₁ = | Y ₈₂ = | Y ₈₃ = | Y ₈₄ = |
| 9 | 10 | Y ₉₁ = | Y ₉₂ = | Y ₉₃ = | Y ₉₄ = |
| 10 | 3 | Y ₁₀₁ = | Y ₁₀₂ = | Y ₁₀₃ = | Y ₁₀₄ = |
| 11 | 14 | Y ₁₁₁ = | Y ₁₁₂ = | Y ₁₁₃ = | Y ₁₁₄ = |
| 12 | 6 | Y ₁₂₁ = | Y ₁₂₂ = | Y ₁₂₃ = | Y ₁₂₄ = |
| 13 | 17 | Y ₁₃₁ = | Y ₁₃₂ = | Y ₁₃₃ = | Y ₁₃₄ = |
| 14 | 8 | Y ₁₄₁ = | Y ₁₄₂ = | Y ₁₄₃ = | Y ₁₄₄ = |
| 15 | 16 | Y ₁₅₁ = | Y ₁₅₂ = | Y ₁₅₃ = | Y ₁₅₄ = |
| 16 | 13 | Y ₁₆₁ = | Y ₁₆₂ = | Y ₁₆₃ = | Y ₁₆₄ = |
| 17 | 11 | Y ₁₇₁ = | Y ₁₇₂ = | Y ₁₇₃ = | Y ₁₇₄ = |

*Números aleatorios generados para establecer el orden de ejecución de las corridas experimentales.

Datos del Evaluador

- Nombres y apellidos: Anthony Jordan de la Cruz Castillo
- Grado Académico: Doctor
- Especialidad: Biotecnología/Botánica
- Institución donde labora: Universidad Nacional de Trujillo
- Años de experiencia en Cultivo *in vitro*: 12 años
- Fecha: 02/05/2023

| Indicador | Descripción | Puntaje (1-5) | Observaciones |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------|---------------|
| Claridad | Comprensibilidad de encabezados y variables | 5 | |
| Estructura | Organización y legibilidad de la tabla | 5 | |
| Relevancia Científica | Pertinencia de variables para propagación <i>in vitro</i> | 5 | |
| Coherencia metodológica | Adecuación a diseños DCCR y DBB | 5 | |
| Precisión técnica | Unidades de medida y nomenclatura | 5 | |
| Puntaje total (suma de criterios) | | 25 | |

Nota: La escala de evaluación, tendrá la siguiente puntuación: 1: Inadecuado; 2: Requiere mejoras significativas; 3: Aceptable; 4: Muy bueno y 5: Excelente

Recomendación Final

- Aprobar sin modificaciones
- Aprobar con modificaciones menores
- Requiere revisión significativa

Firma del Experto: _____



Datos del Evaluador

- Nombres y apellidos: José Mostacero León
- Grado Académico: Doctor
- Especialidad: Botánica-Fisiología Vegetal
- Institución donde labora: Universidad Nacional de Trujillo
- Años de experiencia en Cultivo *in vitro*: 25 años
- Fecha: 02/05/2023

| Indicador | Descripción | Puntaje (1-5) | Observaciones |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------|---------------|
| Claridad | Comprensibilidad de encabezados y variables | 5 | |
| Estructura | Organización y legibilidad de la tabla | 5 | |
| Relevancia Científica | Pertinencia de variables para propagación <i>in vitro</i> | 5 | |
| Coherencia metodológica | Adecuación a diseños DCCR y DBB | 5 | |
| Precisión técnica | Unidades de medida y nomenclatura | 5 | |
| Puntaje total (suma de criterios) | | 25 | |

Nota: La escala de evaluación, tendrá la siguiente puntuación: 1: Inadecuado; 2: Requiere mejoras significativas; 3: Aceptable; 4: Muy bueno y 5: Excelente

Recomendación Final

- Aprobar sin modificaciones
- Aprobar con modificaciones menores
- Requiere revisión significativa



Firma del Experto: _____

Datos del Evaluador

- Nombres y apellidos: Segundo Eloy López Medina
- Grado Académico: Doctor
- Especialidad: Fisiología Vegetal y Ecología
- Institución donde labora: Universidad Nacional de Trujillo
- Años de experiencia en Cultivo *in vitro*: 30 años
- Fecha: 02/05/2023

| Indicador | Descripción | Puntaje (1-5) | Observaciones |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------|---------------|
| Claridad | Comprensibilidad de encabezados y variables | 5 | |
| Estructura | Organización y legibilidad de la tabla | 5 | |
| Relevancia Científica | Pertinencia de variables para propagación <i>in vitro</i> | 5 | |
| Coherencia metodológica | Adecuación a diseños DCCR y DBB | 5 | |
| Precisión técnica | Unidades de medida y nomenclatura | 5 | |
| Puntaje total (suma de criterios) | | | 25 |

Nota: La escala de evaluación, tendrá la siguiente puntuación: 1: Inadecuado; 2: Requiere mejoras significativas; 3: Aceptable; 4: Muy bueno y 5: Excelente

Recomendación Final

- Aprobar sin modificaciones
- Aprobar con modificaciones menores
- Requiere revisión significativa

Firma del Experto:  _____

FICHA DE VALIDACIÓN DE EXPERTOS

Optimización multirespuesta en estudios de propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"

I. DATOS DEL EXPERTO EVALUADOR

- Nombres y Apellidos: Armando Edwin Gil Bivar
- Grado Académico: Doctor en Ciencias Ambientales
- Especialidad: Fisiología Vegetal / Biotecnología
- Años de experiencia en cultivo *in vitro*: 15 años
- Institución donde labora: Universidad Nacional de Trujillo

II. OBJETIVO DE LA VALIDACIÓN

Validar los pesos de importancia asignados a las variables respuesta en el estudio de optimización multirespuesta para la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia*.

III. CRITERIOS DE EVALUACIÓN

Por favor, evalúe la importancia de cada variable respuesta utilizando una escala del 1 al 5, donde:

- 5 = Extremadamente importante
- 4 = Muy importante
- 3 = Importante
- 2 = Moderadamente importante
- 1 = Poco importante

| Variable respuesta | Peso propuesto | Peso asignado |
|----------------------------------|----------------|---------------|
| Y1: Longitud de tallo (cm.) | 5 | 5 |
| Y2: Longitud de entrenudos (mm.) | 5 | 5 |
| Y3: Número de hojas (ud.) | 5 | 4 |
| Y4: Número de raíces (ud.) | 5 | 3 |

V. PREGUNTAS COMPLEMENTARIAS

¿Por qué considera que la longitud de tallo y entrenudos deberían tener mayor peso que el número de hojas y raíces?
por ser un indicador fisiológico en la propagación in vitro.

VIII. FIRMA Y FECHA

Firma del experto: 

Fecha: 11/04/2015

*Nota: Esta ficha de validación será utilizada como evidencia en el proceso de investigación para la optimización multirespuesta en estudios de propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia*.*

FICHA DE VALIDACIÓN DE EXPERTOS

Optimización multirespuesta en estudios de propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"

I. DATOS DEL EXPERTO EVALUADOR

- Nombres y Apellidos: ANTHONY JORDAN DE LA CRUZ CASTILLO
- Grado Académico: DOCTOR
- Especialidad: BIOTECNOLOGÍA / BOTÁNICA
- Años de experiencia en cultivo *in vitro*: 12 AÑOS
- Institución donde labora: UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

II. OBJETIVO DE LA VALIDACIÓN

Validar los pesos de importancia asignados a las variables respuesta en el estudio de optimización multirespuesta para la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia*.

III. CRITERIOS DE EVALUACIÓN

Por favor, evalúe la importancia de cada variable respuesta utilizando una escala del 1 al 5, donde:

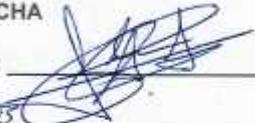
- 5 = Extremadamente importante
- 4 = Muy importante
- 3 = Importante
- 2 = Moderadamente importante
- 1 = Poco importante

| Variable respuesta | Peso propuesto | Peso asignado |
|----------------------------------|----------------|---------------|
| Y1: Longitud de tallo (cm.) | 5 | 5 |
| Y2: Longitud de entrenudos (mm.) | 5 | 5 |
| Y3: Número de hojas (ud.) | 5 | 4 |
| Y4: Número de raíces (ud.) | 5 | 3 |

V. PREGUNTAS COMPLEMENTARIAS

¿Por qué considera que la longitud de tallo y entrenudos deberían tener mayor peso que el número de hojas y raíces?
Esto debido a que ello permitirá obtener un mayor número de plantulas propagadas.

VIII. FIRMA Y FECHA

Firma del experto: 

Fecha: 11-02-2025

*Nota: Esta ficha de validación será utilizada como evidencia en el proceso de investigación para la optimización multirespuesta en estudios de propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia*.*

FICHA DE VALIDACIÓN DE EXPERTOS

Optimización multirespuesta en estudios de propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"

I. DATOS DEL EXPERTO EVALUADOR

- Nombres y Apellidos: José Matucero León
- Grado Académico: Doctor
- Especialidad: Botánica - Fisiología Vegetal
- Años de experiencia en cultivo *in vitro*: 25 años
- Institución donde labora: Universidad Nacional de Trujillo

II. OBJETIVO DE LA VALIDACIÓN

Validar los pesos de importancia asignados a las variables respuesta en el estudio de optimización multirespuesta para la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia*.

III. CRITERIOS DE EVALUACIÓN

Por favor, evalúe la importancia de cada variable respuesta utilizando una escala del 1 al 5, donde:

- 5 = Extremadamente importante
- 4 = Muy importante
- 3 = Importante
- 2 = Moderadamente importante
- 1 = Poco importante

| Variable respuesta | Peso propuesto | Peso asignado |
|----------------------------------|----------------|---------------|
| Y1: Longitud de tallo (cm.) | 5 | 5 |
| Y2: Longitud de entrenudos (mm.) | 5 | 5 |
| Y3: Número de hojas (ud.) | 5 | 4 |
| Y4: Número de raíces (ud.) | 5 | 3 |

V. PREGUNTAS COMPLEMENTARIAS

¿Por qué considera que la longitud de tallo y entrenudos deberían tener mayor peso que el número de hojas y raíces?

VIII. FIRMA Y FECHA

Firma del experto: 

Fecha: 12 de febrero del 2025

*Nota: Esta ficha de validación será utilizada como evidencia en el proceso de investigación para la optimización multirespuesta en estudios de propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia*.*

FICHA DE VALIDACIÓN DE EXPERTOS

Parámetros de Optimización de Variables Respuesta en estudios de propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"

I. Datos del Experto

- Nombres y Apellidos: Armando Edwin Gil Rivero
- Grado Académico: Doctor en Ciencias Ambientales
- Especialidad: Fisiología Vegetal / Biotecnología
- Años de experiencia en cultivo *in vitro*: 15 años
- Institución donde labora: Universidad Nacional de Trujillo

II. Objetivo del Estudio

Validar los parámetros de optimización establecidos para las variables respuesta en la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* (árbol de la quina), específicamente en la fase de multiplicación bajo condiciones controladas de laboratorio.

III. Instrucciones

Evalúe cada parámetro usando la siguiente escala:

1. Totalmente en desacuerdo
2. En desacuerdo
3. Neutral
4. De acuerdo
5. Totalmente de acuerdo

IV. Evaluación de Parámetros por Variable Respuesta:

4.1. Variable: Longitud de Tallo (L=2.0 cm, T=5.0 cm)

| Parámetros a evaluar | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Observaciones |
|----------------------------------------------|---|---|---|---|---|---------------|
| Viabilidad técnica para micropropagación | | | | | ✓ | |
| Suficiencia para desarrollo morfológico | | | | | ✓ | |
| Factibilidad en condiciones <i>in vitro</i> | | | | | ✓ | |
| Consistencia con objetivos de multiplicación | | | | | ✓ | |

4.2. Variable: Longitud entrenudos (L=0.3 mm, T=0.9 mm)

| Parámetros a evaluar | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Observaciones |
|----------------------------------------------|---|---|---|---|---|---------------|
| Viabilidad técnica para micropropagación | | | | | ✓ | |
| Suficiencia para desarrollo morfológico | | | | | ✓ | |
| Factibilidad en condiciones <i>in vitro</i> | | | | | ✓ | |
| Consistencia con objetivos de multiplicación | | | | | ✓ | |

4.3. Variable: Número de hojas (L=2.0 ud,T=7.0 ud)

| Parámetros a evaluar | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Observaciones |
|----------------------------------------------|---|---|---|---|---|---------------|
| Viabilidad técnica para micropropagación | | | | | ✓ | |
| Suficiencia para desarrollo morfológico | | | | | ✓ | |
| Factibilidad en condiciones in vitro | | | | | ✓ | |
| Consistencia con objetivos de multiplicación | | | | | ✓ | |

4.4. Variable: Número de raíces (L=1.0 ud,T=3.0 ud)

| Parámetros a evaluar | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Observaciones |
|----------------------------------------------|---|---|---|---|---|---------------|
| Viabilidad técnica para micropropagación | | | | | ✓ | |
| Suficiencia para desarrollo morfológico | | | | | ✓ | |
| Factibilidad en condiciones in vitro | | | | | ✓ | |
| Consistencia con objetivos de multiplicación | | | | | ✓ | |

V. Observaciones y Recomendaciones

Por favor, agregue cualquier comentario o sugerencia adicional para mejorar los valores establecidos:

VI. Declaración de Validación

Después de haber revisado los parámetros de optimización por variable de respuesta presentado, considero que:

- Son válidos en su totalidad
 Son válidos con las observaciones indicadas
 No son válidos (requieren modificaciones mayores)

Firma del Experto: _____



Fecha: _____

15-02-2025

*Nota: Esta validación considera los parámetros de optimización para las variables respuesta en la micropropagación de *Ladenbergia oblongifolia* bajo condiciones in vitro.*

FICHA DE VALIDACIÓN DE EXPERTOS

Parámetros de Optimización de Variables Respuesta en estudios de propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"

I. Datos del Experto

- Nombres y Apellidos: ANTHONY JORDAN DE LA CRUZ CASTILLO
- Grado Académico: DOCTOR
- Especialidad: BIOTECNOLOGÍA VEGETAL / BOYANICA
- Años de experiencia en cultivo *in vitro*: 12 AÑOS
- Institución donde labora: UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

II. Objetivo del Estudio

Validar los parámetros de optimización establecidos para las variables respuesta en la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* (árbol de la quina), específicamente en la fase de multiplicación bajo condiciones controladas de laboratorio.

III. Instrucciones

Evalúe cada parámetro usando la siguiente escala:

1. Totalmente en desacuerdo
2. En desacuerdo
3. Neutral
4. De acuerdo
5. Totalmente de acuerdo

IV. Evaluación de Parámetros por Variable Respuesta:

4.1. Variable: Longitud de Tallo (L=2.0 cm, T=5.0 cm)

| Parámetros a evaluar | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Observaciones |
|----------------------------------------------|---|---|---|---|---|---------------|
| Viabilidad técnica para micropropagación | | | | | X | |
| Suficiencia para desarrollo morfológico | | | | | X | |
| Factibilidad en condiciones <i>in vitro</i> | | | | | X | |
| Consistencia con objetivos de multiplicación | | | | | X | |

4.2. Variable: Longitud entrenudos (L=0.3 mm, T=0.9 mm)

| Parámetros a evaluar | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Observaciones |
|----------------------------------------------|---|---|---|---|---|---------------|
| Viabilidad técnica para micropropagación | | | | | X | |
| Suficiencia para desarrollo morfológico | | | | | X | |
| Factibilidad en condiciones <i>in vitro</i> | | | | | X | |
| Consistencia con objetivos de multiplicación | | | | | X | |

4.3. Variable: Número de hojas (L=2.0 ud,T=7.0 ud)

| Parámetros a evaluar | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Observaciones |
|----------------------------------------------|---|---|---|---|---|---------------|
| Viabilidad técnica para micropropagación | | | | | X | |
| Suficiencia para desarrollo morfológico | | | | | X | |
| Factibilidad en condiciones in vitro | | | | | X | |
| Consistencia con objetivos de multiplicación | | | | | X | |

4.4. Variable: Número de raíces (L=1.0 ud,T=3.0 ud)

| Parámetros a evaluar | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Observaciones |
|----------------------------------------------|---|---|---|---|---|---------------|
| Viabilidad técnica para micropropagación | | | | | X | |
| Suficiencia para desarrollo morfológico | | | | | X | |
| Factibilidad en condiciones in vitro | | | | | X | |
| Consistencia con objetivos de multiplicación | | | | | X | |

V. Observaciones y Recomendaciones

Por favor, agregue cualquier comentario o sugerencia adicional para mejorar los valores establecidos:

VI. Declaración de Validación

Después de haber revisado los parámetros de optimización por variable de respuesta presentado, considero que:

- Son válidos en su totalidad
 Son válidos con las observaciones indicadas
 No son válidos (requieren modificaciones mayores)

Firma del Experto:



Fecha: 11-02-2025

*Nota: Esta validación considera los parámetros de optimización para las variables respuesta en la micropropagación de *Ladenbergia oblongifolia* bajo condiciones in vitro.*

FICHA DE VALIDACIÓN DE EXPERTOS

Parámetros de Optimización de Variables Respuesta en estudios de propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* "árbol de la quina"

I. Datos del Experto

- Nombres y Apellidos: José Matamoros León
- Grado Académico: Doctor
- Especialidad: Botánica - Fisiología Vegetal
- Años de experiencia en cultivo *in vitro*: 25 años
- Institución donde labora: Universidad Nacional de Cuzco

II. Objetivo del Estudio

Validar los parámetros de optimización establecidos para las variables respuesta en la propagación *in vitro* de *Ladenbergia oblongifolia* (árbol de la quina), específicamente en la fase de multiplicación bajo condiciones controladas de laboratorio.

III. Instrucciones

Evalúe cada parámetro usando la siguiente escala:

1. Totalmente en desacuerdo
2. En desacuerdo
3. Neutral
4. De acuerdo
5. Totalmente de acuerdo

IV. Evaluación de Parámetros por Variable Respuesta:

4.1. Variable: Longitud de Tallo (L=2.0 cm, T=5.0 cm)

| Parámetros a evaluar | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Observaciones |
|----------------------------------------------|---|---|---|---|---|---------------|
| Viabilidad técnica para micropropagación | | | | | X | |
| Suficiencia para desarrollo morfológico | | | | | X | |
| Factibilidad en condiciones <i>in vitro</i> | | | | | X | |
| Consistencia con objetivos de multiplicación | | | | | X | |

4.2. Variable: Longitud entrenudos (L=0.3mm, T=0.9mm)

| Parámetros a evaluar | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Observaciones |
|----------------------------------------------|---|---|---|---|---|---------------|
| Viabilidad técnica para micropropagación | | | | | X | |
| Suficiencia para desarrollo morfológico | | | | | X | |
| Factibilidad en condiciones <i>in vitro</i> | | | | | X | |
| Consistencia con objetivos de multiplicación | | | | | X | |

4.3. Variable: Número de hojas (L=2.0 ud, T=7.0 ud)

| Parámetros a evaluar | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Observaciones |
|----------------------------------------------|---|---|---|---|---|---------------|
| Viabilidad técnica para micropropagación | | | | | X | |
| Suficiencia para desarrollo morfológico | | | | | X | |
| Factibilidad en condiciones in vitro | | | | | X | |
| Consistencia con objetivos de multiplicación | | | | | X | |

4.4. Variable: Número de raíces (L=1.0 ud, T=3.0 ud)

| Parámetros a evaluar | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Observaciones |
|----------------------------------------------|---|---|---|---|---|---------------|
| Viabilidad técnica para micropropagación | | | | | X | |
| Suficiencia para desarrollo morfológico | | | | | X | |
| Factibilidad en condiciones in vitro | | | | | X | |
| Consistencia con objetivos de multiplicación | | | | | X | |

V. Observaciones y Recomendaciones

Por favor, agregue cualquier comentario o sugerencia adicional para mejorar los valores establecidos:

VI. Declaración de Validación

Después de haber revisado los parámetros de optimización por variable de respuesta presentado, considero que:

- Son válidos en su totalidad
 Son válidos con las observaciones indicadas
 No son válidos (requieren modificaciones mayores)

Firma del Experto:



Fecha: 11 de febrero del 2005

*Nota: Esta validación considera los parámetros de optimización para las variables respuesta en la micropropagación de *Ladenbergia oblongifolia* bajo condiciones in vitro.*