

UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILIO VALDIZÁN

ESCUELA DE POSGRADO



**“LA TÉCNICA ESTADÍSTICA DE LA METODOLOGÍA SEIS -
SIGMA EN LA MICROPROPAGACIÓN DE ROSAS (*Rosa Sp*) IN
VITRO EN HUÁNUCO”**

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: GESTIÓN EMPRESARIAL

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR EN GESTIÓN
EMPRESARIAL**

TESISTA: JULIO CESAR DIAZ ZEGARRA

ASESOR: DR. CARLOS BUSTAMANTE OCHOA

HUÁNUCO – PERÚ

2021

DEDICATORIA

A nuestro creador.

A mis amados padres y hermanos: Julio† y Benilde†; Olivia†, Celia†, Carmela†, Emilio, Máxima†, Javier, Isabel, Marina† y Dora.

A la UNHEVAL, colegas, amigos y alumnos.

AGRADECIMIENTO

Agradecimiento a mi asesor el Dr. Carlos Bustamante Ochoa, a mis profesores del doctorado, al jurado evaluador y a todos aquellos que han contribuido en la ejecución de la presente investigación.

RESUMEN

El estudio se realizó en un laboratorio DIY en Huánuco, implementado para la presente investigación, con el objetivo de evaluar el establecimiento de la micropropagación de explantes de rosas (*Rosa sp*) *in vitro*, analizado estadísticamente con el método robusto de Taguchi, se utilizó el medio semisólido de cultivo estándar Murashige-Skoog, en un primer ensayo con 3 factores de pH, ácido α -Nattfalacético y 6-Bencil amino purina y 2 niveles (5.5 - 5.9; 1ppm – 3ppm y 5ppm - 25ppm) respectivamente. En un segundo ensayo con 5 factores, siendo los 2 adicionales el Cloruro de Metilmetionina y Nitrato de plata y 2 niveles (1 – 2 gotas y 40mg – 80mg * L⁻¹) respectivamente. Los valores Delta de los valores medios obtenidos de la longitud de los brotes del primer ensayo obtenida es de un pH de 5.5; Auxinas 3ppm y Citoquininas de 25ppm, en la obtención del mayor crecimiento longitudinal de los implantes de rosas cultivadas *in vitro*. La gráfica de los efectos principales de los valores medios indica la gran influencia de las hormonas en el crecimiento comparado con el pH, mientras que la gráfica de los efectos principales para las relaciones Señal a Ruido (S/N) muestran una gran influencia de la Hormona ANA. Los resultados Delta del segundo ensayo para valores medios, clasifican al pH de 5.5; Auxinas 1ppm; 01 gota Azul de metileno; 25 ppm de Citoquininas y 80 mg de Nitrato de Plata. Mientras que la variabilidad de las respuestas para las relaciones Señal a Ruido, al pH de 5.5, Auxinas 1ppm; 1 gota de azul de metileno 80 mg de Nitrato de Plata y 25 ppm de Citoquininas. Este estudio sirve como precedente para implementar laboratorios DIY de micropropagación de tejidos vegetales y utilizar métodos estadísticos robustos (Taguchi) en la determinación de protocolos de cultivos minimizando el tiempo y costo de las investigaciones.

Palabras claves: Micropropagación, Taguchi, Hágalo usted mismo, Señal a Ruido

ABSTRACT

The study was conducted in a DIY laboratory in Huánuco, implemented for this investigation, in order to evaluate the establishment of the micropropagation of rose explants (*Rosa* sp) *in vitro*, statistically analyzed with Taguchi's robust method, it was used the semisolid standard cultivate medium Murashige-Skoog, in a first test with 3 pH factors, ANA (α -Naphthalacetic acid) and BAP (6-Benzyl amino purine) and 2 levels (5.5 - 5.9; 1ppm - 3ppm and 5ppm - 25ppm) respectively. In a second test with 5 factors, with additional factors: Methylene Blue (Methylmethionine Chloride) and Silver Nitrate and 2 levels (1 - 2 drops and 40mg - 80mg) respectively per liter of medium. The Delta values of the average values obtained from the length of the outgrowths of the first test the configuration is a pH of 5.5; Auxins 3ppm and Cytokinins of 25ppm, in obtaining the highest longitudinal growth of the implants of roses grown *in vitro*. The graph of the main effects of the mean values indicates the great influence of hormones on growth compared to pH, while the graph of the main effects for the Signal to Noise (S/N) ratios show a great influence of the ANA hormone. The Delta results of the second test for mean values, classify at pH 5.5; Auxins 1ppm; 01 drop Methylene blue; 25 ppm of Cytokinins and 80 mg of Silver Nitrate. While the variability of the responses for the Signal to Noise relationships, at a pH of 5.5, Auxins 1ppm; 1 drop of methylene blue 80 mg of Silver Nitrate and 25 ppm of Cytokinins. This study is a precedent to implement DIY laboratories for micropropagation of plant tissues and to use robust statistical methods (Taguchi) in the determination of cultivate protocols, minimizing the time and cost of investigations.

Keywords: Micropropagation, Taguchi, Do it Yourself, Signal to Noise

RESUMO

O estudo foi realizado em um laboratório DIY em Huánuco, implementado para a presente investigação, com o objetivo de avaliar o estabelecimento da micropropagação de explantes de rosa (*Rosa sp*) in vitro, analisado estatisticamente com o método robusto de Taguchi, a cultura padrão semisólida meio Murashige-Skoog, em um primeiro teste com 3 fatores de pH, ácido α -Nafthalacético e 6-benzilamino purina e 2 níveis (5,5 - 5,9; 1ppm - 3ppm e 5ppm - 25ppm) respectivamente. Em um segundo ensaio com 5 fatores, os 2 adicionais sendo Cloreto de Metilmetionina e Nitrato de Prata e 2 níveis (1 - 2 gotas e 40mg - 80mg * L⁻¹), respectivamente. Os valores Delta dos valores médios obtidos a partir do comprimento dos rebentos do primeiro teste obtido é um pH de 5,5; Auxinas 3ppm e Citocininas de 25ppm, na obtenção do maior crescimento longitudinal dos implantes de rosas cultivadas in vitro. O gráfico dos principais efeitos dos valores médios indica a grande influência dos hormônios no crescimento em relação ao pH, enquanto o gráfico dos principais efeitos para as relações Sinal / Ruído (S/R) mostra uma grande influência do hormônio ANA . Os resultados do Delta do segundo teste para valores médios, classificam em pH 5,5; Auxinas 1ppm; 01 gota de azul de metileno; 25 ppm de citocininas e 80 mg de nitrato de prata. Em quanto a variabilidade das respostas para as relações Sinal-Ruído, a um pH de 5,5, Auxinas 1ppm; 1 gota de azul de metileno 80 mg de nitrato de prata e 25 ppm de citocininas. Este estudo serve de precedente para a implantação de laboratórios DIY para micropropagação de tecidos vegetais e para a utilização de métodos estatísticos robustos (Taguchi) na determinação de protocolos de cultura, minimizando o tempo e o custo das investigações.

Palavras-chave: Micropropagação, Taguchi, Faça você mesmo, Sinal para ruído

ÍNDICE

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
RESUMO	vii
ÍNDICE	viii
INTRODUCCIÓN	xiv
CAPÍTULO I	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	15
1.1 Fundamentación del problema	15
1.2 Justificación e importancia de la investigación	15
1.3 Viabilidad de la investigación	16
1.4 Formulación del problema	16
1.4.1 Problema general	16
1.4.2 Problemas específicos	16
1.5 Formulación de objetivos	17
1.5.1 Objetivo general	17
1.5.2 Objetivos específicos	17
CAPÍTULO II	18
MARCO TEÓRICO	18
2.1 Antecedentes de la investigación	18
2.1.1 Del cultivo in vitro de tejidos vegetales	18
2.1.2 Del cultivo <i>in vitro</i> de rosas	19
2.1.3 De la metodología Seis-Sigma	21
2.2 De las variedades de rosas	25
2.3 De la Biotecnología	26
2.4 Uso de nanopartículas de plata y otros	28
2.5 De los Biorreactores de inmersión temporal	31
CAPITULO III	33
SISTEMA DE HIPÓTESIS	33
3.1 Formulación de las hipótesis	33
3.1.1 Hipótesis general	33
3.1.2 Hipótesis específicas	33
3.2 Operacionalización de las variables	33

3.3 Definición operacional de las variables.....	34
CAPÍTULO IV.....	37
MARCO METODOLÓGICO.....	37
4.1 Ámbito de estudio.....	37
4.2 Tipo y nivel de investigación.....	37
4.3 Población y muestra.....	38
4.3.1 Descripción de la población.....	38
4.3.2 Muestra y método de muestreo.....	38
4.3.3 Criterios de inclusión y exclusión.....	38
4.4 Diseño de la investigación.....	39
4.5 Diseño estadístico.....	41
4.5 Técnicas e instrumentos.....	41
4.5.1 Técnicas.....	41
4.5.2 Instrumentos.....	50
4.6 técnica para el procesamiento y análisis de datos.....	51
4.7 Aspectos éticos.....	52
CAPÍTULO V.....	53
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
5.1 Análisis descriptivo.....	53
5.2 Análisis inferencial de los Resultados.....	59
5.2.1 Crecimiento in vitro en medio semisólido, bajo tres factores.....	59
5.2.2 Análisis de la superficie de respuesta del crecimiento longitudinal vs. El pH, Auxina y Citoquininas.....	64
5.3.3 Crecimiento in vitro en medio semisólido, bajo cinco factores y 2 niveles y 20 repeticiones.....	67
5.3 Discusión de los Resultados.....	74
5.4 Aporte científico de la investigación.....	76
CONCLUSIONES.....	77
RECOMENDACIONES.....	78
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	79
ANEXOS.....	81
NOTA BIBLIOGRÁFICA.....	85

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis de los Coeficientes Estimados para las Medias	60
Tabla 2. Análisis de Varianza de las Relaciones Señal/Ruido	61
Tabla 3. Respuestas para las Relaciones de Señal a Ruido (S/N)	61
Tabla 4. Respuestas para los Valores Medios	62
Tabla 5. Análisis de varianza del modelo	65
Tabla 6. Coeficientes del Modelo Estimado para las Relaciones Señal a Ruido (S/N).....	69
Tabla 7. Análisis de Varianza de las Relaciones Señal a Ruido (S/N)	70
Tabla 8. Análisis de Varianza de las Medias	70
Tabla 9. Respuestas para las Relaciones Señal a Ruido (S/N), Mas Grande es Mejor.....	71
Tabla 10. Respuestas para los Valores Medios	71
Tabla 11. Análisis de Varianza de la regresión de los Efectos Estandarizados.....	73
Tabla 12. Resultados de la Longitud de los Brotes Axilares Alcanzada bajo tres Factores y 2 Niveles	74
Tabla 13. Resultados de la Longitud de los Botes Axilares Alcanzada Bajo 5 Factores y 2 Niveles de Estudio	75

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Efectos Principales para Medias de datos.....	63
Gráfica 2. Efectos Principales para las Relaciones Señales a Ruido (S/N).....	64
Gráfica 3. Diagrama de Pareto para los Efectos Estandarizados	66
Gráfica 4. Análisis de la Superficie de Respuesta de la Longitud vs. El nivel de pH y Citoquininas, con un valor fijo de las Citoquininas	66
Gráfica 5. Análisis del Contorno de las Superficie de Respuesta (RMS)	67
Gráfica 6. Predicción de Respuesta Múltiple de la Longitud vs. pH, Auxinas y Citoquininas.	67
Gráfica 7. Efectos Principales para Medias.....	72
Gráfica 8. Efectos Principales para las Relaciones Señal a Ruido (S/N).....	72
Gráfica 9. Predicción de Respuesta Múltiple	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la micropropagación in vitro.....	41
Figura 2. Esquema de la micropropagación mediante el uso de meristemas o brotes apicales.....	43
Figura 3. Módulo de un biorreactor DIY de inmersión temporal.....	45
Figura 4. Módulo de un aclimatador DIY de inmersión temporal.....	46
Figura 5. Cabina de flujo laminar casera.....	48
Figura 6. Cámara de flujo laminar completamente equipada.....	49
Figura 7. Cámara de incubación.....	50

ÍNDICE DE FOTOS

Foto 1. Variedades de colores de Rosas sembradas	53
Foto 2. Tallos con más de 8 hojas listos para la desinfección.	54
Foto 3. Mezclado de los Ingredientes para la Preparación del Medio MS.) Murashige-Skoog)	55
Foto 4. Corte y Siembra de los Explantes dentro de la Cámara de Flujo Laminar	56
Foto 5. Preparación de los trozos de Explante en Longitud	56
Foto 6. Preparación del Medio Básico Murashige-Skoog (MS).	57
Foto 7. Crecimiento de los Brotes Axilares dentro de la Cámara de Incubación.	57
Foto 8. Crecimiento de Brotes Axilares dentro de la Cámara de Incubación en mayor amplitud	58
Foto 9. Medición de crecimiento de brotes post incubación durante 21 días	58
Foto 10. Hoja de trabajo del arreglo factorial generado por Minitab® con 3 Factores y 2 niveles.....	59
Foto 11. Hoja de trabajo del arreglo factorial generado por Minitab® con 5 factores y 2 niveles	68

INTRODUCCIÓN

Conociendo las praderas Huanuqueñas, un día llegué al poblado de Huandobamba en la provincia de Ambo, quedé impresionado por la presencia de invernaderos y cultivos de campo con tecnología propia de la costa, observé rosales, fresas, aguaymanto entre otros cultivares de calidad, pero algo les faltaba me dijeron, eran los plantines de variedades libres de enfermedades fitosanitarias y de calidad producidas en el Perú, principalmente las rosas que eran traídos desde Colombia o Ecuador, allí surgió la curiosidad por llenar este vacío y fue la idea para el presente trabajo de investigación, desarrollar una tecnología existente como el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* en la modalidad DIY (do it yourself-hágalo usted mismo), que mejor oportunidad que las rosas (*Rosa sp*) y darle así un valor agregado desarrollando una tecnología no muy compleja que pueda ser replicada por cualquier agricultor o asociación, para lo cual se aplicó el control de procesos de calidad, de la metodología Seis-Sigma principalmente la estadística.

Procedí a recolectar plantas de rosas injertadas de diferentes variedades de colores para así tener a disposición el material a propagar, primero en campo abierto y posteriormente bajo invernadero para un mejor control fitosanitario.

Por efectos de la pandemia los laboratorios de la universidad habían sido cerrados, por ello tuve que improvisar en casa un laboratorio con los equipos y materiales básicos, en dos ambientes uno el área de preparación de medios de cultivo y el otro el área de transferencia y cuarto de cultivo. La cámara de flujo laminar y el agitador magnético el prototipo de un biorreactor de inmersión temporal DIY, el nitrato de plata, el empleo de luz led y el control estadístico de la calidad son innovaciones de la presente tesis.

Para concluir debo señalar que todo lo que aquí este escrito es mío a excepción del marco teórico que es propio de sus autores.

CAPÍTULO I.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Fundamentación del problema

El problema que afrontan los agricultores productores de Rosas es la disponibilidad y la dependencia de los plantines de rosas de la importación de éstas de Ecuador y Colombia, lo cual encarece la inversión lo que hace inviable el acceso a nuevos productores agrícolas y la obtención de nuevas variedades, así como reduce la rentabilidad a los ya establecidos. También evaluar un método viable estadístico que facilite hallar un protocolo de implantación *in vitro* de rosas, utilizando diferentes variables y niveles así, reducir el tiempo y costo de la micropropagación. También planificar y construir un laboratorio de bajo costo y de fácil manejo para llevar a cabo esta investigación bajo el enfoque DIY y su posterior difusión a las asociaciones de agricultores productores de rosas y otros cultivos *in situ*.

¿Existe una metodología estadística y laboratorio DIY, que proporcione plantines de rosas comerciales obtenidas por micropropagación *In vitro* en Huánuco - 2020?

1.2 Justificación e importancia de la investigación

Los resultados de esta investigación se justifican porque va a satisfacer las necesidades de plantines de rosas en todo momento del año y a un precio accesible, por parte de los agricultores florales, principalmente de los del poblado de Huandobamba, toda vez que los más interesados son los que tienen instalaciones ya establecidas y requieren de estos plantines para expandir su negocio y dar cabida a otros agricultores que ven como factor limitante la adquisición de las plantas de rosas que reúnan las características adecuadas que exige el mercado consumidor (largo del tallo, color y duración).

Es importante esta investigación porque permitió obtener un protocolo eficiente de implementación de la micropropagación de Rosas, utilizando el análisis estadístico de Taguchi de la metodología Seis-Sigma, empleando simples segmentos nodales de una planta adulta y así disponer durante todo el año para su

cultivo e incremento de las utilidades de los productores al poder instalar un laboratorio DIY de apoyo a las asociaciones de productores agrícolas.

1.3 Viabilidad de la investigación

Aun cuando los laboratorios de la universidad estuvieron cerrados por la pandemia del Covid, se viabilizó la investigación por la inversión realizada en la implementación de un laboratorio de bajo costo bajo la modalidad DIY (hágalo usted mismo), adecuado en un cuarto los principales ambientes de desinfección, esterilización, siembra, implantación, incubación de explantes en un medio semi sólido y disponer de un prototipo viable de un biorreactor de inmersión temporal (BIT) bajo el sistema DIY, que hicieron posible concluir satisfactoriamente los objetivos propuestos.

1.4 Formulación del problema

1.4.1 Problema general

¿Es viable el método estadístico de Taguchi de la metodología Seis Sigma en la investigación del cultivo de Rosas *in vitro* en Huánuco en un laboratorio DIY?

1.4.2 Problemas específicos

- ¿Es posible conocer los mejores niveles de pH en el establecimiento de yemas axilares de rosas?
- ¿Es factible encontrar los mejores niveles de Auxinas en el establecimiento de yemas axilares de rosas?
- ¿Se puede hallar los mejores niveles de Citoquininas en el establecimiento de yemas axilares de rosas?
- ¿Se puede determinar los niveles del Azul de Metileno y Nitrato de Plata en el control de microorganismos contaminantes del medio de cultivo?
- ¿Es posible cuantificar el análisis estadístico de la metodología Seis-Sigma en la micropropagación *in vitro* de rosas?
- ¿Es posible construir un modelo de laboratorio de investigación DIY, incluido un prototipo de un biorreactor de inmersión temporal (BIT)?

1.5 Formulación de objetivos

1.5.1 Objetivo general

- Determinar la viabilidad del método estadístico de Taguchi de la metodología Seis Sigma en la investigación del cultivo de Rosas *In vitro* en Huánuco en un laboratorio DIY.

1.5.2 Objetivos específicos

- Conocer los mejores niveles de pH en el establecimiento de yemas axilares de rosas
- Encontrar los mejores niveles de Auxinas en el establecimiento de yemas axilares de rosas
- Hallar los mejores niveles de Citoquininas en el establecimiento de yemas axilares de rosas.
- Determinar los niveles del azul de metileno y Nitrato de Plata en el control de microorganismos contaminantes del medio de cultivo.
- Cuantificar el análisis estadístico de la metodología Seis-Sigma en la micropropagación *in vitro* de rosas.
- Construir un modelo de laboratorio de investigación DIY y un biorreactor de inmersión temporal (BIT)

CAPÍTULO II.

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

2.1.1 Del cultivo in vitro de tejidos vegetales

(Toledo Espinoza, 2006) señala en un cuadro la historia de los cultivos vegetales desde el año 1756 hasta 1969, transcribo lo indicado desde el año 1962 que se considera año clave en el desarrollo de esta tecnología:

1962	Murashige y Skoog	Para estudios del tabaco, propusieron una solución más concentrada a las clásicas, caracterizado por la presencia de grandes cantidades de Nitratos y sales de Amonio
1964	Morel	Propagó orquídeas a partir del cultivo de yemas
1965	Vasil y Hildebrandt	Demostraron que, de una simple célula, ésta puede dividirse y desarrollar a una planta completa (Totipotencia)
1967	Margara	Indujo la floración al incrementar en 50% los nitratos en el medio MS.
1969	Rossini	Estudios en Orquídeas (<i>Calystegia sepium</i>) logró obtener multiplicación de células en suspensión agregando 2,4-D y Benciladenina.

La composición del medio de cultivo es un factor determinante para el crecimiento in vitro, siendo el desarrollado por (Murashige & Skoog, 1962) el de mayor uso en la micropropagación de tejidos vegetales.

2.1.2 Del cultivo *in vitro* de rosas

(Mohan Jain & Ochatt, 2010) señalan que la propagación *In Vitro* de la Rosa es una importante herramienta para la multiplicación rápida y desarrollo de nuevos cultivares con características deseables. Pero es necesario comprender ciertos requisitos específicos y una manipulación precisa de varios factores. La importancia de cultivos estáticos para la proliferación de brotes y la inducción de raíces para las rosas son muy importantes. Existen otros enfoques como la organogénesis y embriogénesis importantes para el mejoramiento genético. Siendo los tipos de explantes, los medios de cultivo y la optimización de las condiciones favorables los factores importantes para la regeneración exitosa de las rosas.

(Mohan Jain & Ochatt, 2010) citando a Horn Wah (1992), indican que, aunque la propagación por métodos vegetativos es una técnica predominante en las rosas, esta no garantiza la obtención de plantas sanas y libre de enfermedades, además de depender de las estaciones y tasas lentas de multiplicación son algunos de los factores principales que limitan la propagación convencional. Mientras que (García, 1999) señala que la propagación de plantas a partir de yemas y brotes jóvenes, para la presentación de mutaciones espontáneas son mínimas, porque estos derivan de meristemas organizados y están sujetos a bajos niveles de variabilidad. Siendo la técnica del cultivo *In vitro*, un método alternativo para la propagación de plantas que además ofrecen características únicas de rápida multiplicación en cortos periodos de tiempo, produciendo plantas sanas y libres de enfermedades, además de tener la capacidad de generar propágulos durante todo el año, muchas investigaciones reportadas señalan la utilización de brotes axilares y meristemas apicales (Pati, Rath, Sharma, & Ahuja, 2006).

(Mohan Jain & Ochatt, 2010) también reportan que las etapas para la micropropagación *In vitro* de rosas implican 1) la Iniciación de los cultivos asépticos, 2) Multiplicación de los brotes, 3) Enraizamiento de los microshoots y 4) Endurecimiento y transferencia de campo de plantas cultivadas en cultivo de tejidos.

También indican que en rosas existen muchos estudios sobre la regeneración y multiplicación a través de la organogénesis mediante la formación de

callos, sin embargo pocos estudios existen sobre la regeneración directa de diferentes explantes, tal como los descritos por (Lloyd, Roberts, & Short, 1988) quienes reportaron por primera vez la regeneración directa de brotes utilizando explantes de hojas y raíces en *R. pérsica x xanthina*, *R. laevigata* y *R. wichuriana*. Así este método tiene implicancias considerables para el productor de rosas ya que facilitan el proceso de creación rápida de nuevas variedades, también esta metodología implica cambios beneficiosos en las características de crecimiento.

La fisiología del cultivo *in vitro* respecto al control ambiental (Cañal, Rodríguez, Fernández, Sánchez-Tames, & Majada, 2016) señalan que las tasas de crecimiento, desarrollo y muchas de las características fisiológicas y morfológicas de las plantas formadas *in vitro* están influenciadas por el ambiente físico, químico y gaseoso de los recipientes y ello ha permitido una evolución de las diferentes técnicas utilizadas en la micropropagación de plantas. Así cambios en la concentración de CO₂ en los recipientes, manifestándose en alteraciones o déficit en cuanto a su estructura anatómica morfológica y fisiológica, presentando un fenotipo incapaz de sobrevivir al trasplante al invernadero o al campo. Así en la actualidad se pueden utilizar diferentes métodos para controlar el ambiente en las diferentes fases de la micropropagación ya sea en cultivos heterótrofos, mixótrofos o autótrofos. La elección de la mejor estrategia va a depender de varios factores, destacando la especie, el número de trasplantes requerido y la relación calidad precio entre otros.

Entre las técnicas más utilizadas actualmente se encuentran el cultivo de yemas y brotes, callos y nodos. De manera general, los rosales modernos son los más propagados, con excepción de las rosas en miniatura, que aún representan un amplio campo a investigar (Castilla, 2005).

Las rosas generalmente se propagan por métodos tradicionales como el corte, acodo, gemación e injerto, siendo la técnica de propagación vegetativa la dominante, no permite garantizar plantas sanas libres de enfermedades, además de ser estacionales y tener bajas tasas de multiplicación los que constituyen en factores limitantes en la propagación (Mahmood et al. 2018). Mientras que (Deberg y Leer 1991) señalan que la micropropagación es un método rápido y alternativo para producir un gran número de plántulas

genéticamente uniformes y libres de patógenos durante todo el año, sin embargo, este método aun tiene limitaciones como la necrosis de la punta de los brotes, amarillamiento y abscisión de las hojas, disfuncionalidad de las estomas, etc. que reducen la calidad de los brotes y plántulas y la tasa de supervivencia dentro del vivero. Información que es ampliada por (Reid 1995 y Hughes 1981) quienes señalan además que se producen deformidades de las plántulas debido a la producción en exceso de Etileno por el tejido vegetal, impacto de la intensidad de la Luz en la eficiencia fotosintética y biosíntesis de pigmentos, concentración de CO₂, alta humedad al interior de los frascos y la muerte de la planta in vitro, se produce a una concentración baja (0.01 µl/L).

La formación de enzimas hidrolíticas como la pectinasa y la celulasa degradan a las paredes celulares de la zona de abscisión (AZ) provocando que las células se caigan, suelten, reduciendo la lignificación y al ser retenidas por las frágiles venas fácilmente son eliminadas (Phan y Letouze 1983).

En el estudio de la micropropagación in vitro de *Rosa rosa* sp. a partir de yemas axilares, utilizando Murashige y Skoog (MS) al 100%, como medio de cultivo para la fase de establecimiento, adicionado con myo-inositol 0,1 mg/L, ácido ascórbico 0,1 mg/L, tiamina 0,2 mg/L, sacarosa 30 g, benzylaminopurina (BAP) 0,4 mg/L, kinetina 0,3 mg/L, ácido naftalenoacético (ANA) 0,3 mg/L, y Agar sigma 6 g; ajustando el pH a 5,8, obtuvieron en la fase de establecimiento de 100 explantes el 16% no brotaron y 22% se contaminaron obteniendo un 62 % de brotes axilares viables. (Villa R. R. & Arbeláez L. M., 2019)

2.1.3 De la metodología Seis-Sigma

El origen de la metodología Seis Sigma se remota a 1985, cuando Bill Smith, señaló que, si un producto defectuoso era corregido durante el proceso de la producción, otros productos defectuosos no podrían ser detectados hasta que lo recibiera el cliente final. En tanto si un producto era elaborado libre de errores, el producto raramente le fallaría al cliente. (Gonzalez, 2003), también escribe en relación al Seis Sigma que a través de la metodología de DMAIC (Definir, medir, analizar mejorar y controlar) ayuda a estructurar la

aplicación de las herramientas estadísticas y estas son utilizadas ampliamente en las organizaciones por los Masters Black Belt, Black Belt y los Green Belt.

Como filosofía de trabajo, Seis Sigma significa el mejoramiento continuo de procesos y productos apoyados en la aplicación de ésta metodología, la que incluye principalmente la utilización de herramientas estadísticas y como meta , un proceso con nivel de calidad Seis Sigma significa estadísticamente obtener un nivel de clase mundial al no producir servicios o productos defectuosos (0.00189 ppm proceso centrado y hasta 3.4 ppm, con un proceso descentrado de 1.5σ) (Escalante, 2013)

(Atil & Unver, 2000) señalan que el método Taguchi de diseño de experimentos es una herramienta estadística basada en un enfoque sistemático que utiliza realizar un mínimo de experimentos en la que se emplean matrices ortogonales, tradicionalmente ha sido utilizado en la predicción de la contribución significativa de cada variable del diseño y para obtener una combinación óptima de las variables para la ejecución de un experimento en tiempo real caso contrario al realizar muchas combinaciones se requiere más tiempo y dinero cosa que se obvia con éste método.

Escalante (2005), señala que el método Taguchi se puede utilizar en un proceso para determinar los factores significativos como complemento a la técnica de los diseños experimentales. Este método diseñado por Genichi Taguchi aplica conceptos de robustez y ruido. Los factores de ruido son las causas que hacen que una característica se desvíe de su objetivo y pueden ser FR Externo cuando se presenta fuera del producto (temperatura, error humano, etc.), FR Entre productos que está relacionado con la variación inherente al producto y el FR Deterioración, que es la variación interna como por ejemplo la diferencia de vida de un producto. Mientras que la Robustez es la característica del producto cuando es insensible a los efectos de fuentes de la variación (ruido). Otros conceptos son los Factores de señal (S) que son los parámetros utilizados por el operador del producto para obtener características deseadas del mismo y Los Factores de ruido que son los parámetros que no se pueden controlar o es muy costoso realizarlo.

De igual manera Ajmal *et al.*, 2020, señalan que el diseño Taguchi como diseño experimental permite elegir un producto o proceso con una mayor

consistencia en el entorno operativo y que reconocen que no todos los factores causante de variabilidad pueden ser controlados, éstos son conocidos como factores de ruido que pueden ser controlados durante la experimentación mas no durante la producción, así se logran identificar los factores controlables se pueden minimizar los efectos de los factores de ruido. Lográndose de esta manera un producto robusto o resistente ante la variación provocada por los factores de ruido. Los diseños de Taguchi utilizan arreglos ortogonales (balanceado por tanto ponderados equitativamente) los que estiman los efectos de los factores del promedio y la variabilidad. De tal manera que los niveles de los factores se pueden evaluar sin considerar los otros factores, de tal manera que el efecto de un factor no afecta la estimación de otro de los factores. Así se reduce el tiempo y sus costos asociados al experimento comparado con experimentos fraccionados. Por tanto, los diseños con arreglos ortogonales se concentran en los prioritariamente en los efectos principales, también es posible agregar un factor de señal al diseño de Taguchi para crear un experimento de respuesta dinámica, para mejorar la relación funcional entre una señal y una respuesta de salida. *(¿Qué es la relación de señal a ruido en un diseño de Taguchi?, s. f.).*

En un estudio sobre la optimización del proceso de compostaje en recipientes a escala piloto para diversos desechos agrícolas a temperatura elevada mediante el uso de la técnica de Taguchi y la evaluación de la calidad del compost se realizaron un total de 09 experimentos con tres niveles de temperatura (55 °C, 65 °C, 75 °C) y tiempo (15 h, 18 h, 22 h) en un compostador a escala piloto equipado con sistemas de control de temperatura, aireación, agitación y humedad para el compostaje de estiércol de aves de corral (PM), desechos vegetales (VW) y paja de arroz (RS) mezclados en una proporción de 5.5: 3.5: 1 respectivamente.

La aplicación del Método de Taguchi, permitió el estudio simultáneo en un mismo experimento de los factores de influencia considerados más importantes en diferentes combinaciones y, al mismo tiempo, determinar la contribución de cada factor. considerado un método eficaz ya que permite alcanzar rápidamente entre el 70 y el 90% de la optimización deseada de los parámetros técnicos. El 10 a 30 por ciento que falta se puede obtener con

uno o dos experimentos complementarios, limitados a 2 a 4 parámetros técnicos que se consideran los más influyentes. La aplicación del Método Taguchi, permitió el estudio simultáneo en un mismo experimento de todos los factores de influencia considerados más importantes en diferentes combinaciones y, al mismo tiempo, determinar la contribución de cada factor por ello es considerado un método eficaz ya que permite alcanzar rápidamente entre el 70 y el 90% de la optimización deseada de los parámetros técnicos. El 10 a 30 por ciento que falta se puede obtener con uno o dos experimentos.(Titu *et al.*, 2018)

Utilizando el método Taguchi en el DOE, en una investigación agrícola, donde se evaluó las densidades de plantas (45*45*, 45*30, 45*22.5 cm) y diferentes niveles de fertilizante NPK (40:20:20, 50:25:25 y 60:30:30 kg/ha.) sobre el rendimiento del algodón (*Gossipium arboreum*) cultivares (PA 402 y PA225), el método Taguchi se evaluó comparándose con la técnica estadística de Fisher. El método Taguchi redujo el número de experimentos para obtener la combinación óptima de factores y sus niveles en un 50% (de 8 a 4), reduciendo así el tiempo y el costo, generando resultados similares a lo obtenido con los métodos convencionales.(Deo *et al.*, 2007)

(Silva T.V.L., 2000) señala que Taguchi en el desarrollo de sus trabajos comprobó que el uso de los experimentos factoriales completos además de resultar muy costosos, requerían mucho tiempo. Comenzó entonces a utilizar ordenamientos ortogonales, con los cuales se podían disminuir considerablemente el número de experimentos y aun obtener los beneficios que se buscan en la disminución de la variabilidad y el aumento de la productividad. Por ejemplo, si se trabaja con 7 factores y a dos niveles para cada factor, un experimento factorial completo requiere $2^7 = 128$ experimentos, mientras que con un ordenamiento factorial completo se necesitan 8. Si se trabaja con 15 factores (y dos niveles por factor) el número de experimentos será de $2^{15} = 32,768$. Mientras que con un ordenamiento ortogonal solo se necesitarían 16 experimentos.

Estimar el tamaño del experimento utilizando cálculos de potencia y tamaño de la muestra, filtrado de datos sin procesar en busca de errores obvios; utilizando el estimar el tamaño del experimento utilizando cálculos

de potencia y tamaño de la muestra, filtrado de datos sin procesar en busca de errores obvios, utilizando el estimar el tamaño del experimento utilizando cálculos de potencia y tamaño de la muestra, filtrado de datos brutos en busca de errores obvios, utilizando la prueba *t* o análisis de varianza para análisis paramétrico y diseño eficaz de datos gráficos (Festing & Altman, 2002)

Los experimentos factoriales son diseños a menudo extremadamente poderosos porque generalmente brindan más información para un tamaño determinado de experimento que la mayoría de los diseños de factor único a costa de una mayor complejidad en el análisis estadístico. Se describen en la mayoría de los textos estadísticos tal como (Montgomery D.C., 1991)

2.2 De las variedades de rosas

Las rosas en el mundo son las plantas ornamentales más importantes, que se utilizan en mayor frecuencia como adornos, medicinales y aromáticos.

Castilla (2005), en su estudio sobre la revisión bibliográfica del cultivo de rosas (*Rosa* sp) reporta que, de acuerdo con su origen, actualmente las rosas pueden clasificarse en tres grupos ***Especies silvestres de rosas***: las que originalmente crecen en la naturaleza y constituyen los ancestros de las demás rosas. La mayoría presenta flores pequeñas, solitarias, con cinco pétalos generalmente de color amarillo, rosado o blanco. ***Rosales antiguos***: híbridos de las especies silvestres, considerados hasta 1867 en que surgió el primer rosal moderno: el híbrido del té. ***Rosales modernos***: constituyen el 95 % de los rosales que se cultivan en la actualidad. Son más resistentes a las enfermedades y sus flores perduran por más tiempo. Se clasifican en ocho grupos, entre los que se destacan comercialmente las rosas arbustivas, trepadoras, tapizantes y rosas en miniatura. Estas últimas generalmente no sobrepasan una altura de 45 cm y resultan ideales para sembrar en macetas. Las distintas especies de rosas han sido sometidas durante muchos años a un proceso continuo de selección e hibridaciones, que ha traído como resultado la aparición de nuevas variedades, por lo que actualmente existen cerca de 30 000. Sin embargo, existen también otras técnicas, como las del cultivo de tejidos, que investidas de mayor actualidad y aunque menos conocidas, permiten la rápida introducción de variedades de rosas, así como la mejora por mutagénesis y selección in vitro. El cultivo de tejidos se puede definir como un conjunto de

técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales. Otras ventajas consisten en que posibilitan aumentar el coeficiente de multiplicación, producir independientemente de las condiciones ambientales y facilitar la comercialización de las especies vegetales.

“Los rosales son plantas muy antiguas, que se difundieron como silvestres en el hemisferio norte a través de dos corrientes fundamentales: la oriental y la occidental. Éstas se desarrollaron al principio en forma separada, produciéndose luego la hibridación entre el grupo europeo-mediterráneo y el grupo oriental de especies”, citado por (Oviedo & Rodríguez, 2009), también señala que el rosal es un arbusto erguido, de ramas leñosas, delgadas, flexibles y nudosas. Sus flores suelen ser grandes y vistosas, se multiplican por estacas, acodos, injertos y semillas.

(Linares, 2020), menciona la clasificación taxonómica y morfología, así como los tipos de rosal. Actualmente, se comercializan híbridos de especies de rosa desaparecidas, que ha conformado un gran portafolio de variedades, entre las que sobresalen: Freedom, Limbo, Gold Strike y Mush, entre otras.

En el anexo 5 se aprecia la clasificación botánica de Las rosas, en el anexo 6 el tipo de rosales y sus características y finalmente en el anexo 7 la clasificación de las flores por el número de pétalos, color, forma y longitud del tallo.

2.3 De la Biotecnología

Actualmente la biotecnología ofrece la oportunidad de controlar la naturaleza y acceder a mejores condiciones de vida, pero también el peligro de ser atacados nuestros derechos cuando se atentan contra la dignidad humana, criterio que está en la base de dichos derechos. como resultado de esto surge una variedad de problemas éticos y jurídicos planteados por los constantes avances en las ciencias biológicas y médicas que han favorecido el nacimiento de dos nuevas ciencias cuyo papel es evitar los excesos de estas tecnologías; la Bioética y la Biojurídica. (Martinez Torremocha, 2004)

La biotecnología le da al hombre un nuevo poder, pero acompañado siempre por dilemas éticos. Se puede considerar la biotecnología o la ingeniería genética aplicada a las plantas como una herramienta más, utilizada por el hombre, que puede aportar beneficios, pero también riesgos. Sin embargo, no hay que olvidar

que lo mismo ocurre con otras tecnologías actuales como la telefonía móvil, Internet o determinados medicamentos. Tienen sus riesgos, pero el hombre no renuncia a ellas. Ahora, una vez que las conoce y que las utiliza, no podría renunciar (Caamaño M., 2007)

Muchas especies amenazadas tiene una potencialidad económica importante como futuros cultivos o como donantes de genes, por ello es de gran importancia que los investigadores que trabajan en ellas sean respetuosos con los códigos de ética desarrollados sobre biotecnología y con los convenios internacionales que regulan el acceso a estas especies (Fay & Clemente, 1997)

En América Latina, el espacio biotecnológico es una gran fuente de ambigüedades cuando de valores se trata que termina como aliado de los poderes dominantes, principalmente cuando se trata de la ingeniería genética para la transformación de semillas ya que resulta valiosa para la ciencia, pero dañina no solo en lo relativo a la conservación de la vida con toda su biodiversidad, sino en lo económico, social, cultural y antropológico e incluso médico, por ende es necesario establecer límites éticos al mismo. (Pfeiffer, 2015)

Otras técnicas que están relacionadas con los cultivos in vitro como la transformación genética de las plantas, que consiste en la transferencia de genes exógenos al interior del genoma vegetal, previamente modificados en cultivos in vitro para permitir su expresión genética. Así, (Firoozabady, Moey, Curtney-Guterson, & Robinson, 1994) realizaron investigaciones con tejidos friables embriogénicos (TFE) de cultivos de filamentos de rosa (*R. hybrida* cv. Royalty) fueron obtenidos y cocultivados con *Agrobacterium tumefaciens* o *A. rhizogenes*, portando un vector con los genes neomicina fosfotransferasa II (npt II), glucuronidasa (GUS) o luciérnaga luciferasa (LUC). Las colonias supuestamente transformadas fueron seleccionadas en kanamicina. Se obtuvieron entre 50 a 60 líneas de callos embriogénicos transformados, obtenidos de cada gramo de TFE inoculado con *Agrobacterium*. Los callos embriogénicos transformados fueron transferidos a medio de maduración para formar embriones somáticos, que luego produjeron plantas. La naturaleza transgénica de estas fue confirmada por ensayos enzimáticos, PCR e hibridación Southern. Aproximadamente 100 plantas transgénicas fueron establecidas en el suelo y florecieron en el invernadero. Este procedimiento facilita la introducción de genes deseables, especialmente los que controlan el color de la flor en cultivares comerciales de rosa. Es así como la

manipulación genética de los cultivos vegetales en la obtención de colores de rosas (azul, verdes o negras) con fines comerciales rebasan las consideraciones éticas de la manipulación de la naturaleza consideradas como natural.

2.4 Uso de nanopartículas de plata y otros

La abscisión foliar de rosa (*Rosa hybrida* L. 'Baby Love') cultivada *in vitro* debido a la acumulación de gas etileno y enzimática, la actividad hidrolítica, son fenómenos anormales que afectan la calidad de los brotes, el empleo de nanopartículas de plata (AgNP) y nanopartículas de cobalto (CoNP) para superar la abscisión de las hojas y el efecto de la propagación masiva de brotes, enraizamiento y aclimatación en la etapa de vivero, mostraron que los brotes cultivados en MS suplementado con 2 mg / L de AgNP dio el mayor coeficiente de multiplicación de brotes, altura de brotes, peso fresco, peso seco e índice de clorofila (5.33 brotes; 3,06 cm; 451,00 mg; 58,33 mg; 32,28; respectivamente) que con CoNPs y medio MS basal. Mientras tanto, en la etapa de enraizamiento, el medio MS agregado de 4.65 μg / L CoNPs fue el más óptimo con una proporción de masa seca (10.28%), número de raíces (5.67 raíces), longitud de raíz (2.17 cm) y SPAD (41.07 nmol / cm²) así como redujo el contenido de gas etileno (0,11 ppm) y actividad enzimática como pectinasa (0,07 UI / ml) y celulasa (0,25 UI / ml) en comparación con las otras tratamientos después de 4 semanas de cultivo. Las plántulas derivadas del cultivo *in vitro* en medio a las que se añadieron 4,65 μg /L de CoNP dieron la mayor tasa de supervivencia (96,67%), así como crecimiento y desarrollo en la etapa de vivero. (Ha *et al.*, 2020)

La micropropagación de rosas utilizadas para la producción de plántulas clonales y libres de enfermedades y con fines de reproducción, muestran trastornos fisiológicos como hojas con tempranas senescencia y tasa de multiplicación muy baja en condiciones *in vitro*. Estos síntomas se asociaron con alta sensibilidad de estos cultivares a la acumulación de etileno en ambiente *in vitro*. La rosa *cv.* Sena cultivada *in vitro* bajo diferentes concentraciones de AgNO₃ y dos fuentes de luz, LED y lámparas fluorescentes, para determinar síntomas de la acumulación de etileno al utilizar AgNO₃ a 1.0-2.0 mg L⁻¹ resolvió los principales desórdenes fisiológicos *in vitro* observados en esta rosa. Además, el AgNO₃ estimuló la inducción del 50% de los brotes de rosa a la floración *in vitro* a 2.0 mg L⁻¹. Las

concentraciones más altas también resultó en la inducción de la floración, pero con un desarrollo floral imperfecto (Matos et al., 2020)

Las rosas generalmente se propagan por métodos tradicionales como corte, acodo, gemación e injerto. Aunque la propagación vegetativa es una técnica dominante en la rosa, no garantiza plantas sanas y libres de enfermedades. Además, la estacionalidad y bajas tasas de multiplicación son algunas de los factores limitantes en la propagación (Mahmood *et al.* 2018). También señalan que la micropropagación se considera un método rápido y alternativo para producir un gran número de plántulas genéticamente uniformes y libres de patógenos durante todo el año. Sin embargo, este método todavía tiene limitaciones como como necrosis de la punta de los brotes, amarillamiento y abscisión de las hojas, estomas disfuncionales, etc. que reducen la calidad del brote y plántulas, además de la tasa de supervivencia en el vivero (Debergh y Leer 1991).

La micropropagación de la rosa a menudo provoca que las hojas se pongan amarillentas y se observan fenómenos de abscisión, plántulas que no crecen completamente, deformidad debido a la producción excesiva de etileno por el tejido vegetal, impacto de la intensidad de la luz en la eficiencia fotosintética y biosíntesis de pigmentos, concentración de CO₂, alta humedad al interior de los frascos de cultivos ($\geq 95\%$), temperatura del aire, condiciones de cultivo, etc. El desprendimiento de órganos, especialmente la abscisión se asocia a menudo con el efecto del gas etileno, celulasa y enzimas hidrolíticas de pectinasa. El etileno es un gas que afecta el crecimiento, diferenciación, envejecimiento y muerte de plantas *in vitro* a baja concentración (0,01 $\mu\text{L/L}$). Además, el etileno que se produce *in vitro* durante el proceso de cultivo su contenido depende de la etapa de crecimiento, tipo de explante y la concentración de reguladores del crecimiento de las plantas (Reid 1995; Hughes 1981).

La formación de enzimas hidrolíticas como la pectinasa y la celulasa degradan las paredes celulares de la zona de abscisión (AZ), provocando que las células se desarticulan, se caigan, reduciéndose la lignificación y las hojas solo son retenidas por las frágiles venas fácilmente eliminado (Phan y Letouze 1983).

La nanotecnología, una revolución industrial del siglo XXI, puede aplicarse en diversos campos de la ciencia y la tecnología. En micropropagación vegetal, las nanopartículas de cobalto (CoNP) y nanopartículas de plata (AgNP) se utilizan ampliamente como factores para mejorar la absorción de nutrientes de las plantas,

que afectan la germinación de las semillas, la regeneración y el crecimiento de los explantes, el cobalto (Co), un mineral nutritivo en el medio de cultivo, es uno de los factores exógenos, esenciales para las plantas y presentes en casi todos sus órganos ayuda a activar la enzima de la glucólisis la fosfoglucomutasa, las enolasas y quinasas en el metabolismo del ácido pirúvico y en los procesos de oxidación (Talankova-Sereda *et al.* 2016). Además, el Co también juega un papel importante en la inhibición de la formación y actividad del gas etileno. Inhibiéndolo a partir del ácido l-aminociclopropano-1-carboxílico (enzima ACC), enzima importante en la conversión de ACC en etileno (Thao *et al.* 2015; Kumar *et al.* 2009).

Estudios recientes sobre la aplicación de la nanotecnología en la micropropagación de plantas han demostrado que los CoNP pueden ser una fuente potencial de micronutrientes para reemplazar las sales inorgánicas en los medios de cultivo (Fouad y Hafez 2018). Además, la plata (Ag) no se agrega de forma rutinaria al medio de cultivo como elemento nutritivo pero añadido suele prevenir agentes microbiológicos y evitar fenómenos anormales de micropropagación en forma de iones Ag^+ en sal de nitrato de plata ($AgNO_3$), tiosulfato de plata (Ag_2SO_4). El receptor de etileno (ETR1) contiene un sitio que se une al etileno con un ion de cobre (Cu^{2+}). El reemplazo del cofactor Cu^{2+} por Ag^+ bloqueará el receptor y evitará la inhibición señales de etileno en plantas (Kumar *et al.* 2009). En la micropropagación de plantas, la Ag en tamaño nanométrico (AgNP) ha sido utilizado para controlar a microorganismos resistentes (hongos, bacterias, etc.) (Arab *et al.* 2014; Spinoso-Castillo *et al.* 2017) e inhibir la actividad del gas etileno, mejorando el crecimiento, desarrollo y calidad de las plántulas (Thao *et al.* 2015). Sin embargo, los resultados de la investigación sobre CoNP y AgNP todavía son muy limitados, especialmente en la superación de fenómenos anómalos de la rosa cultivada *in vitro*. Pero se aprecian un buen crecimiento y desarrollo de brotes *in vitro*, limitando la biosíntesis de etileno, superando el amarillamiento y la abscisión de las hojas mediante la inhibición de hidrolizaciones enzimáticas como la celulasa y pectinasa, así como aumentando la tasa de supervivencia en la etapa de adaptación.

(Spinoso-Castillo *et al.*, 2017), al estudiar el efecto antimicrobial y hormético de las nanopartículas de plata en sistemas de inmersión temporal encontró que a una

mayor cantidad hubo una menor contaminación mientras que a un menor nivel observaron una estimulación del crecimiento.

2.5 De los Biorreactores de inmersión temporal

El cultivo *in vitro* convencional utiliza recipientes cerrados y medio gelificado con suplementos de azúcar. El cultivo del biorreactor utiliza un medio líquido y normalmente incorpora aireación aséptica. Permitiendo una mayor absorción de nutrientes a través del medio líquido junto con la renovación del aire dentro de los biorreactores mejorando el estado fisiológico de los explantes (Vidal & Sánchez, 2019). Estos investigadores trabajaron sobre la viabilidad de usar biorreactores para superar la resistencia de muchos árboles a la micropropagación y/o disminuir el costo de la propagación a gran escala. Se centraron en el uso de biorreactores durante la multiplicación, enraizamiento (conversión de plantas en el caso de embriones somáticos), y etapas de aclimatación de la micropropagación de brotes axilares y embriones somáticos de árboles forestales (incluyendo algunos arbustos de interés comercial), tanto en sistemas de inmersión temporal como continua.

Los biorreactores son recipientes diseñados para cultivos de células, tejidos u órganos a gran escala en medios líquidos. Funcionalmente, los biorreactores de cultivo de plantas se pueden dividir en dos tipos amplios: aquellos en los que los cultivos se sumergen parcial o temporalmente en el medio, y aquellos en los que los cultivos están continuamente sumergidos. Los biorreactores proporcionan un control más preciso del intercambio gaseoso del crecimiento de las plantas, iluminación, agitación media, temperatura y pH que los recipientes de cultivo convencionales. La propagación de plantas basada en biorreactores puede aumentar la tasa de multiplicación y crecimiento de cultivos y reducir los requerimientos de espacio, energía y mano de obra en micropropagación comercial. Por tanto, pueden ser atractivo para los países en desarrollo en lo que respecta a instalaciones de cultivo de plantas nuevas o en expansión, en combinación con un laboratorio convencional. Sin embargo, para ser rentable, el uso de biorreactores requiere un índice de cultivos de plantas y atención a los procedimientos asépticos durante la manipulación de material vegetal. Por lo tanto, la integración de biorreactores en los sistemas de producción solo debe ser intentada por personas con experiencia y propagadores experimentados (Levin, R., G.Tanny, 2004)

Los cultivos de órganos y tejidos vegetales *in vitro* suelen afrontar desafíos tecnológicos. Cuando se desea el cultivo sumergido de células vegetales en un entorno controlado, la morfología y fisiología del crecimiento características de los cultivos de órganos diferenciados presentan un problema en la ampliación del proceso. Los sistemas de inmersión temporal se desarrollaron hace varias décadas. Estos sistemas proporcionan el entorno más natural para el cultivo *in vitro* de brotes de plantas y plántulas. En los últimos años, los sistemas de inmersión temporal han sido reconocidos como una tecnología en perspectiva para la micropropagación de plantas, la producción de metabolitos secundarios derivados de plantas, la expresión de proteínas extrañas y posibles soluciones en fitorremediación. Hoy en día, varios sistemas de inmersión temporal, que operan sobre principios tecnológicos similares o divergentes, se han desarrollado y aplicado con éxito en el cultivo de varios sistemas de plantas *in vitro*, incluidos embriones somáticos y cultivos de raíces transformadas (Georgiev *et al.*, 2014)

Los principios básicos en el que se basa el trabajo de los biorreactores son las Leyes de Boyle-Mariotte: para un gas a una temperatura constante, el volumen es inversamente proporcional a la presión sobre éste: $p_1 v_1 = p_2 v_2$ («Ley de Boyle-Mariotte», 2021). Los gases al ser elásticos se pueden comprimir, al contrario de los líquidos, los gases cuando están encerrados tienden a ocupar el mayor espacio posible y ejercen una presión sobre el recipiente que ocupan. Esta ley es fundamental en la neumática, pues nos va a indicar el rendimiento que tendrá la instalación de un biorreactor.

La hidrostática que es una rama de la física en donde se estudian los fluidos en estado de reposo. Existen dos principios básicos que la tratan:

El principio de Arquímedes, que afirma que un cuerpo total o parcialmente sumergido en un fluido estático e incomprensible, será empujado con una fuerza igual al peso del volumen del líquido desplazado por dicho objeto, así cuando un cuerpo se encuentra sumergido en el fluido se efectúa un empuje hidrostático resultante de las presiones sobre la superficie del cuerpo que actúa siempre hacia arriba mediante el centro de gravedad del cuerpo y de valor igual al peso del fluido desplazado: $E = p_x V = \rho f g V$ («Principio de Arquímedes», 2021)

El principio de Pascal, que nos señala que el incremento de presión aplicado a una superficie de un fluido incomprensible, contenido en un recipiente indeformable, se transmite con el mismo valor a cada una de las partes del mismo. («Principio de Pascal», 2021)

CAPITULO III.

SISTEMA DE HIPÓTESIS

3.1 Formulación de las hipótesis

3.1.1 Hipótesis general

Es el método estadístico de Taguchi de la metodología Seis-Sigma, viable en las investigaciones de la micropropagación de *tejidos in vitro* de rosas en Huánuco

3.1.2 Hipótesis específicas

- Se puede reducir el costo y tiempo de la micropropagación de rosas *in vitro*, utilizando el estadístico de Taguchi
- Se puede implementar un laboratorio DIY para el establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*
- Se puede implementar un sistema de biorreactores DIY, para la fase de multiplicación y enraizamiento de tejidos cultivados *in vitro*

3.2 Operacionalización de las variables

VARIABLES	INDICADORES	VALORES FINALES	TIPO DE VARIABLES
DEPENDIENTE:			
Viabilidad de la producción de rosas en Huánuco.	Tamaño de los brotes producidos en el medio de cultivo	Longitud de brotes producidos <i>in vitro</i>	Cuantitativa continua Resultado del análisis estadístico método de Taguchi del Seis-Sigma
INDEPENDIENTE:			
Cultivo de rosas <i>In vitro</i>	Medios de cultivo con 5	Producción de brotes viables	Cuantitativa continua Resultado del análisis

	factores y 2 niveles		estadístico método de Taguchi del Seis -Sigma
INTERVINIENTES:			
Laboratorio utilizado	Fase de establecimiento en un laboratorio DIY	Elaboración de un modelo de laboratorio y un biorreactor de bajo costo auto ejecutable	Cuantitativa continua Resultado del análisis estadístico método de Taguchi del Seis -Sigma
MÉTODO: Medio base MS, Murashige Skoog (1962), Ph, Auxinas, Citoquininas, Azul de metileno y Nitrato de plata	Cultivo eficiente y aséptico de explantes	Plantas de gran crecimiento viables y axénicas	Cuantitativa continua Resultado del análisis estadístico método de Taguchi del Seis -Sigma

3.3 Definición operacional de las variables

- **Rosa:** el género *Rosa* está compuesto por un conocido grupo de arbustos espinosos y floridos representantes principales de la familia de las rosáceas. Se denomina rosa a la flor de los miembros de este género y rosal a la planta.
- ***In vitro*:** (latín: 'dentro del vidrio') se refiere a una técnica para realizar un determinado experimento en un tubo de ensayo, o generalmente en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.
- **Selección in vitro o hibridación somática:** técnica utilizada para la introducción de nuevas características en las plantas mediante la ingeniería genética y para la propagación masiva de plantas.
- **Micropropagación:** es el conjunto de técnicas y métodos de cultivo de tejidos utilizados para multiplicar plantas asexualmente de forma rápida, eficiente y en grandes cantidades.

- **Enraizamiento**, el proceso de enraizamiento de los cultivos in vitro es caracterizado por la inducción de las raíces adventicias en brotes alargados, los que se encuentran en un medio de cultivo enriquecido con auxinas para así obtener plántulas completas listas para su aclimatación.
- **Yema**, es el rudimento de un vástago que se forma en las axilas de las hojas estando protegidas por una serie de hoja.
- **Brote**, es el vástago en estado de desarrollo a partir de la yema hasta que ha terminado su crecimiento
- **Cultivo de nodos**, son los segmentos de tallo la planta donde se encuentran las hojas generalmente cubriendo a las yemas axilares, los que constituyen puntos de ramificación y crecimiento
- **Cultivo de callos**, obtenido a partir de cualquier planta u órgano, en un medio conocido, conteniendo auxina y/ o citoquininas. Este tipo de cultivo puede mantenerse indefinidamente, trasplantando periódicamente secciones de callo a un nuevo medio fresco
- **Cultivo de células**, se obtiene pasando los callos cultivados a un medio líquido
- **Cultivo de protoplastos**, de las células en suspensión separadas mediante enzimas que las liberan de la pared celular de cultivos en suspensión, se utiliza cuando se desea aumentar la diversidad genética de los cultivos.
- **Cultivo de ápices de tallo**, se realiza cuando se desea obtener plantas libres de virus, consta del meristemo y de 2 a 3 primordios de hoja.
- **Cultivo de meristemos**, son grupos de células que mantienen su actividad embrionaria durante toda la vida de la planta
- **Auxinas**, son sustancias que regulan el crecimiento de las plantas
- **Citoquininas**, son sustancias químicas que pueden estimular principalmente la división celular o citocinesis.
- **WPM**, Woody plant medium, método desarrollado por (LLoyd & McCown, 1981)
- **MS**, método desarrollado por (Murashige & Skoog, 1962)
- **SEIS-SIGMA**, es una metodología de trabajo, filosofía que significa mejoramiento continuo de procesos y productos, que incluye principalmente la utilización de herramientas estadísticas.
- **BIORREACTORES**, son recipientes diseñados para la producción a gran escala de células, tejidos u órganos cultivados en un medio líquido.

- **SISTEMA DE IMMERSION TEMPORAL**, es el cultivo de células, tejidos u órganos expuestos temporalmente a un medio de cultivo líquido, en biorreactores semiautomatizados, bajo condiciones controladas.
- **AZUL DE METILENO**, o cloruro de metiltionina, es un colorante orgánico que se usa para tratar una enfermedad llamada metahemoglobinemia. Es un compuesto químico heterocíclico aromático con fórmula molecular:
 $C_{16}H_{18}ClN_3S$
- **NITRATO DE PLATA**, es una sal inorgánica mixta, diluido en aceite reacciona con el cobre formando nitrato de cobre, si se filtra lo que queda es plata.

CAPÍTULO IV. MARCO METODOLÓGICO

4.1 **Ámbito de estudio**

El presente trabajo de investigación se realizó en un laboratorio implementado en casa del investigador debido a la inviabilidad de acceso a los laboratorios de la Universidad debido a la Pandemia del Covid-19, la fase experimental, se realizó dentro de un ambiente acondicionado por el ejecutor de la tesis, bajo el enfoque de la metodología DIY (Do it yourself – hágalo usted mismo), bajo supervisión online y presencial del asesor docente.

La zona de impacto de la investigación es el poblado de Huandobamba distrito de Ambo – Huánuco.

Las muestras de variedades de rosas fueron recolectadas de los cultivos sembrados en el jardín de la casa que fueron adquiridos en viveros comerciales, así como de los jardines de Rosas de la Unheval.

4.2 **Tipo y nivel de investigación**

El estudio planteado fue una investigación experimental, prospectivo, longitudinal y comparativo.

El tipo de estudio fue **Experimental**, porque modificamos algunas variables de estudio, asignando aleatoriamente diferentes factores como el Ph, Las hormonas BAP (6-Bencil amino purina) y ANA (ácido α -Nafthalacético) bajo 2 niveles uno mínimo y otro máximo durante el estudio. Fue **Prospectivo**, porque recogimos la información del cultivo *in vitro* de acuerdo a intervalos de tiempo programado, siendo en todos los casos a los 21 días de sembrados en el medio de cultivo. Fue **Longitudinal**, porque realizamos un seguimiento hasta obtener los brotes de rosas aptos para su posterior multiplicación. Fue **Comparativo**, porque dentro del cultivo *in vitro* comparamos los diferentes factores que tuvieron diferentes niveles de pH, hormonas y también con 2 factores considerados de ruido como el Azul de Metileno y el Nitrato de Plata como anti microbianos para contrastar las hipótesis centrales de causa – efecto.

El nivel de la investigación es **Exploratoria**, porque realizamos un primer acercamiento científico al problema, que es el de proveer plantines de Rosas con características propias de las plantas provenientes de cultivos *in vitro*, el de encontrar un método estadístico que permita analizar los protocolos óptimos en un menor tiempo y menor costo que ofrece el método de Taguchi en los procesos de manufactura y producto de calidad en la industria, pero que no ha sido aplicado en la micropropagación de cultivo de tejidos vegetales, en este caso en el cultivo *in vitro* de Rosas y que se pueda implementar un laboratorio de bajo costo bajo el enfoque DIY (hágalo usted mismo), que pueda ser de fácil construcción e implementación por cualquier usuario (agricultor).

4.3 Población y muestra

4.3.1 Descripción de la población

La población de donde se extrajeron los explantes para el estudio fueron de las variedades de rosas injertadas, cultivadas en casa y de los jardines de rosas de la Unheval de la ciudad de Huánuco.

4.3.2 Muestra y método de muestreo

Se ha considerado un muestreo pseudoaleatorio intencional, al no disponer un marco muestral de fácil construcción, debido a la necesidad de plantas sanas libres de enfermedades, dependiendo la selección de la muestra a la arbitrariedad del investigador (*Metodología y técnicas cuantitativas de investigacin_6060.pdf*, s. f.)

Así, debido a las características propias del estudio el número de muestras requeridas mínimo fue de 8, por tanto, el tamaño de la muestra tomadas de la población fue pseudoaleatoria por conveniencia propia de la metodología de la investigación realizada. Para darle una mayor consistencia en los resultados se utilizaron 160 muestras. Las muestras fueron debidamente seleccionadas de plantas fisiológicamente sanas, tomando tallos con yemas florales en latencia, tomadas al azar las cuales se escogieron tallos con un mínimo de 6 brotes axilares.

4.3.3 Criterios de inclusión y exclusión

Las muestras seleccionadas debían tener los siguientes criterios de inclusión:

1. Provenir de plantas fisiológicamente vigorosas y sanas

2. Tener un diámetro promedio de los tallos de 4 ± 0.5 mm
3. Tener brotes axilares intactos
4. Las ramas debían tener un mínimo de 8 hojas

Criterios de exclusión:

1. Plantas débiles
2. Plantas muy espinosas
3. Explantes con cortes imprecisos

4.4 Diseño de la investigación

El diseño fue realizado utilizando el software Minitab-19® siguiente: columnas del arreglo de $L8(2^7)$: 1 2 4

Reduciéndose a 8 tratamientos experimentales de un posible diseño experimental factorial con 128 combinaciones.

Relación de Señal a Ruido (S/R) para el diseño estático

La S/R, es la medida de robustez utilizada para identificar la configuración del factor de control que minimiza el efecto del ruido sobre la respuesta, separada para cada combinación de los diferentes niveles del factor control. Se utilizó la relación S/R más grande es mejor, la cual se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$S/R = -10 \log_{10}(\Sigma(1/Y^2) / n)$$

Donde:

Y = son las variables respuestas para la combinación de los niveles de los diferentes factores

n = Es el número de respuestas de la combinación de los niveles de los factores

Los factores y niveles son los siguientes:

A: pH (5.5 – 5.9)

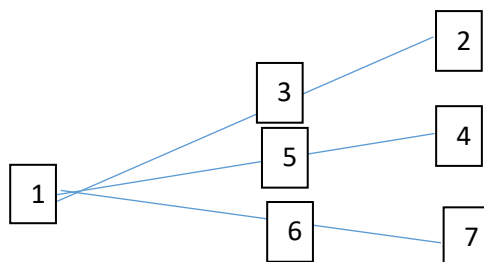
B: Auxinas ($1 - 3\text{ppm} \cdot \text{l}^{-1}$)

C: Citoquinas ($5 - 25\text{ppm} \cdot \text{l}^{-1}$)

D: Azul de metileno ($1 - 2\text{gotas l}^{-1} *$)

E: Nitrato de plata ($40 - 80\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)

De acuerdo al número de factores e interacciones, se requieren 6 columnas de un Arreglo factorial (AO) de dos niveles, siendo el adecuado el $L8(2^7)$, la gráfica lineal es la siguiente:



La hoja de trabajo generada por Minitab se muestra a continuación:

	Columna							
Prueba	1	2	3	4	5	6	7	VR
1	1	1	1	1	1	1	1	
2	1	1	1	2	2	2	2	
3	1	2	2	1	1	2	2	
4	1	2	2	2	2	1	1	
5	2	1	2	1	2	1	2	
6	2	1	2	2	1	2	1	
7	2	2	1	1	2	2	1	
8	2	2	1	2	1	1	2	

Y el cuadro de acomodo del diseño de experimentos generado por Minitab®

C1	C2	C3	C4	C5	C6
CH	Auxinas	Citoquinas	Azul de metileno	Nitrato de Plata	Crecimiento (cm)
5.5	0.1	0.5	1	0.125	
5.5	0.1	0.5	2	0.250	
5.5	0.3	2.5	1	0.125	
5.5	0.3	2.5	2	0.250	
5.9	0.1	2.5	1	0.250	
5.9	0.1	2.5	2	0.125	
5.9	0.2	0.5	1	0.250	
5.9	0.3	0.5	2	0.125	

4.5 Diseño estadístico

El modelo matemático aditivo lineal para las medias y S/N es el siguiente:

$$Y_{ijklmn} = \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \theta_l + \omega_m + \varepsilon_{ijklmn}$$

Donde:

Y_{ijklm} : Crecimiento (mm) del explante

α_i : Efecto del i-ésimo nivel de pH

β_j : Efecto del j-ésimo nivel de la hormona auxina

γ_k : Efecto del k-ésimo nivel de la hormona Citoquina

θ_l : Efecto del l-ésimo nivel de gotas de Azul de metileno

ω_m : Efecto de la m-ésima cantidad de Nitrato de Plata (mg)

ε_{ijklm} : Efecto del error experimental

4.5 Técnicas e instrumentos

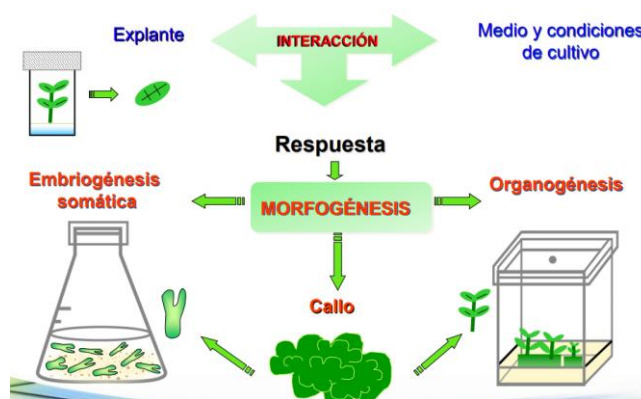
4.5.1 Técnicas

Micropropagación.

La propagación asexual de las plantas utilizando las técnicas de cultivos vegetales, utiliza las vías de regeneración en el cultivo de tejidos vegetales tal como se muestra en la figura 1.

Figura 1

*Esquema de la micropropagación *in vitro**



Fuente: Taller internacional de biorreactores y biofábricas (2021)

Etapas de la micropropagación

Para un desarrollo adecuado de la micropropagación es necesario la optimización de cada uno de los 5 estadios señalados por (Debergh & Maene, 1981). Siendo los estadios del I al III los que transcurren propiamente *in vitro* definidos por (Murashigue, 1974), en tanto que los estadios 0 y IV se desarrollan en el invernadero.

Los estadios de la micropropagación propuesto por (Debergh & Read, 1991) son señalados a continuación:

Estadio 0: Preparación de los explantes

Etapa indispensable e importante en un esquema de micropropagación confiable y repetible. La planta a propagar, se realiza bajo condiciones altamente higiénicas.

En este estadio, se previenen los problemas de contaminación, reduciendo los microorganismos como las bacterias y hongos presentes en las superficies de las plantas, así se logra una mayor tasa de supervivencia y calidad de los explantes que pasan al estadio I.

Para el presente experimento, los tallos con más de 8 hojas en cuya axila se aprecian los brotes fueron seleccionados teniendo en cuenta la hora, el grosor y la observación de las características fenotípicas de ser una planta sana. Llevada al área de desinfección en donde se aplicó el proceso de desinfección estándar que consiste en el lavado con detergente líquido antibacterial de uso comercial durante 5 minutos con agitación constante posteriormente se aplicó el protocolo siguiente:

1. Remojo en alcohol de 70° durante 30 segundos, agitado suavemente
2. Remojo en legía al 1.5% por un tiempo de 15 minutos con agitación suave
3. Desenguaje con agua estéril por tres veces consecutivas.

Esquema de micropropagación utilizado en el experimento mediante el brote de yemas axilares de rosas.

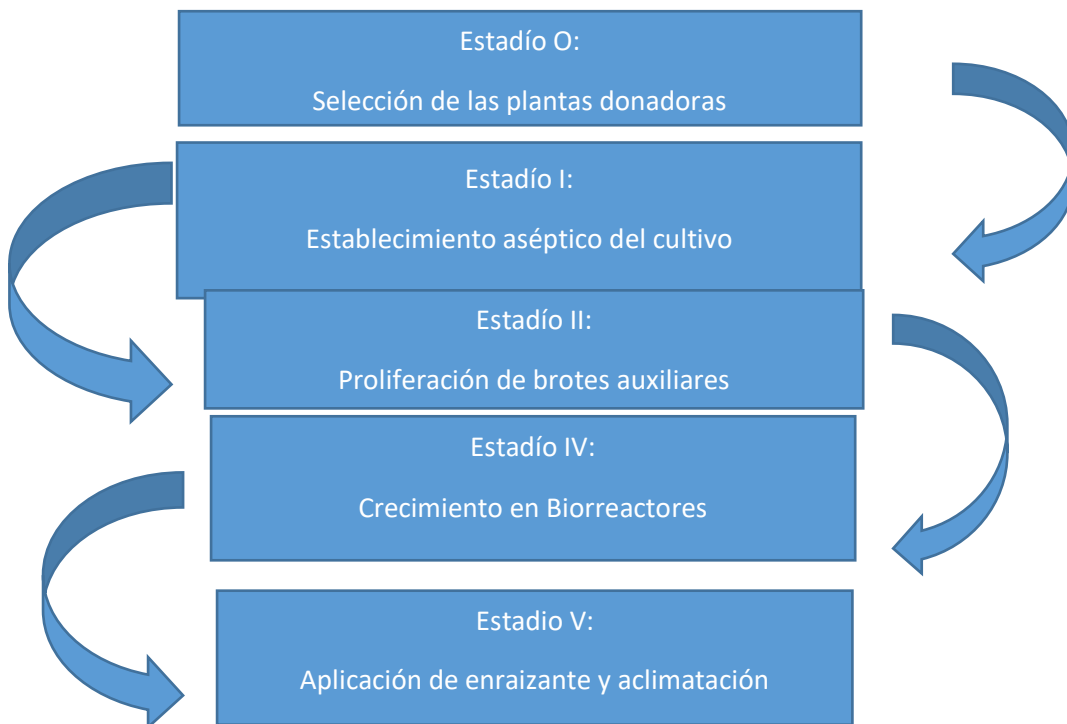
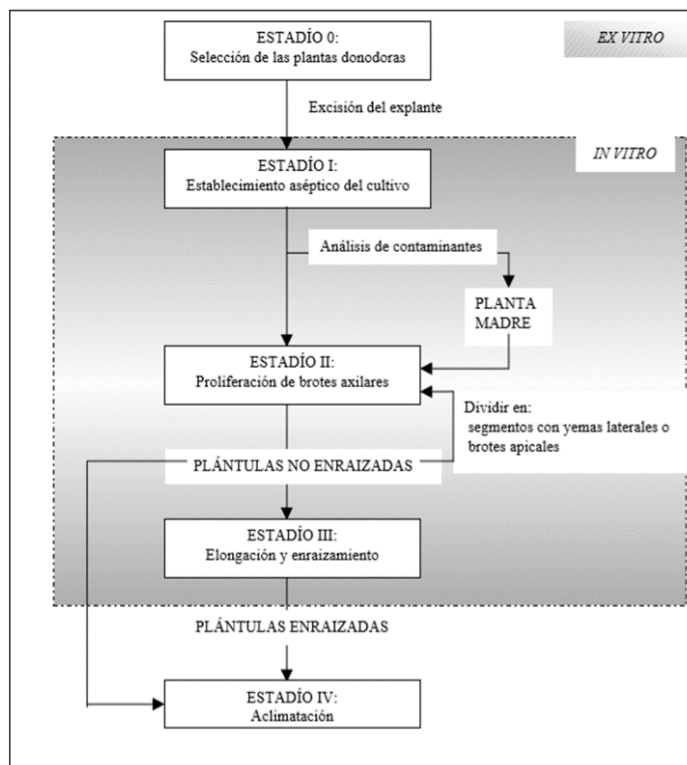


Figura 2.

Esquema de la micropropagación mediante el uso de meristemas o brotes apicales. (Alonso, 2002)



A las plantas o a los explantes en el estadio I, se les puede acondicionar mediante la aplicación de reguladores de crecimiento, con citoquininas como el BAP o giberelinas como el AG3, inyectado o por inmersión o también por pulsos de hormonas a los explantes primarios.

Estadio I: Iniciación del cultivo

El objetivo en este estadio es la de tener cultivos axénicos (un cultivo axénico está formado por una única especie, cepa o variedad de organismo, y por lo tanto está desprovisto de otros organismos contaminantes) y viables. Va a depender del tamaño del explante y de su estado de desarrollo, edad de la planta madre y de su estado fisiológico.

Para el experimento los explantes esterilizados antes de introducirlas *in vitro*, fueron colocados en la cámara de flujo laminar casera, el cual previamente fue limpiado con detergente de vidrios, luego con lejía y prendida el aparato proveedor de ozono durante 15 minutos previos a la siembra en el medio de cultivo.

A los tallos de rosas desinfectadas ya dentro de la cámara de flujo laminar se procedió a extraer los peciolos y las vainas de los tallos y fueron cortadas en tamaños de 2 a 3 cm. Como innovación de la técnica fueron sumergidos en una solución de un anti fúngico (Benzomil[®] 500) y un anti viral (Virkon[®] S), conteniendo un brote cada uno de ellos. Posteriormente fueron introducidos en una máquina de rayos ultravioleta (UVCQBOX[®]) durante 5 minutos. Así aseguramos los principales problemas que aparecen en esta etapa, que son las contaminaciones tanto endógenas como exógenas y la oxidación fenólica. El cultivo se considera establecido cuando se ha determinado que está aparentemente libre de patógenos y de microorganismos contaminantes.

Estadio II: Multiplicación

La multiplicación es la fase de proliferación, para obtener brotes para subsecuentes cultivos, así como también obtener el material necesario para mantener el stock.

Para el experimento se combinaron la metodología tradicional de cultivo en un medio semisólido y en un medio líquido utilizando biorreactores de inmersión temporal construidos para tal efecto tal como se muestra en la figura 3.

Figura 3

Módulo de un biorreactor DIY de inmersión temporal



Nota. *Diseño y construcción propio

Las plántulas que brotaron de los cultivos en el medio semisólido fueron multiplicadas en los reactores de inmersión temporal fabricados con envases de polipropileno, y puestos en funcionamiento con una bomba de aire y controlados con un timer para tener inmersiones temporales de 2 minutos cada 6 horas al día. Así evitar los principales problemas que pueden aparecer en esta etapa como la hiperhidricidad, fenolización, cristalización o de contaminaciones, enmascaradas en el estadio 1, o por mal manejo del material cultivado.

Estadíos III y IV: Inducción de raíces y aclimatación.

En este estadio se utilizó la técnica de enraizamiento *ex vitro*, los plantines obtenidos por multiplicación fueron sumergidos en un enraizante comercial Root-Hor[®], antes de ser plantados en una bandeja con sustrato y colocadas en un recipiente plástico en los cuales se tuvo controlado la humedad, temperatura, radiación de luz y pH, este sistema de enraizamiento *ex vitro* funciona bien con las rosas antes de ser trasplantados en el terreno definitivo. Se ha estimado que el coste del enraizamiento supone entre un 35 y un 75% del coste total de la micropropagación (Debergh & Maene, 1981), esto nos indica que es necesario la optimización del enraizamiento, cuando se realiza *ex vitro* los brotes enraizados se observa un mayor

crecimiento que los del in vitro. Se diseñó el aclimatador casero DIY tal como se muestra en la figura 4.

Figura 4

Módulo de un aclimatador DIY de inmersión temporal



Nota. * Se adaptó un instrumento que medía la luminosidad, humedad, pH y temperatura

La aclimatación o endurecimiento proceso mediante el cual las plantas de van adaptando gradualmente desde el medio in vitro a ex vitro. Cabe resaltar que este estadio de la aclimatación en invernadero de los plantines obtenidos en el laboratorio, no está incluido en la investigación.

Preparación de los medios de cultivo.

El medio base Murashige & Skoog, compuesto de 13 insumos químicos HIMEDIA[®], las hormonas de Phyto Technology Laboratories[®] y el Agar gelatina comercial Sofit[®], fueron preparados siguiendo el siguiente protocolo:

STOCK A		Peso
KNO ₃	Nitrato de potasio	9 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Cloruro de calcio dihidrato	0.4 g/L
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio monobásico	0.7 g/L
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	6.5 g/L
Stock A2		10 ml
Stock A3		0.2 ml
Completar a 1000 ml con agua destilada		

STOCK A2		Peso
KI	Ioduro de potasio	0.083g
H3BO3	Ácido bórico	0.62g
MnSO4.4H2O	Sulfato de manganeso 4 aguas	1.68g
ZnSO4.7H2O	Sulfato de Zinc heptahidrato	0.86g
NaMoO4.2H2O	Molibdato de sodio. 2 aguas	0.025g
Completar a 1000 ml con agua destilada		

STOCK A3		Peso
CuSO4.5H2O	Sulfato de cobre 5 aguas	0.15g
CaCl,6H2O	Cloruro de cobalto hexahidrato	0.15g
Completar a 100 ml con agua desionizada		

Preparación de un litro de medio de cultivo

En 500ml de agua destilada agregar:

Stock A	100ml
Stock B	10ml
Stock C	5ml
Azúcar	25g
Adicionar Vitaminas y hormonas según la fórmula	
Completar a 1 litro con agua destilada	

Reguladores de pH

Se utilizaron Bicarbonato de sodio para subir el pH, y ácido cítrico para bajar el pH, el cual fue medido utilizando un peachímetro COM-300 HMdigital®

Para el pesado se utilizó una balanza digital CAMRY® de 200 g y d = 0.02
La esterilización fue realizada en una autoclave digital de 18 litros de capacidad de origen chino, durante 25 minutos a una temperatura de 125°C y 15 libras de presión.

La cámara de flujo laminar, fue construida según el modelo mostrado en la figura 5, mientras que la cámara debidamente implementada se muestra en la figura 6.

Dentro de ella se colocó un equipo de Ozono y uno de luz ultravioleta, con una lámpara Led, un mechero Bunsen y una desinfectadora de alcohol gel portátil táctil.

Figura 5.

Cabina de flujo laminar casera



Nota. Material de aluminio con vidrio, alturas:0.80m y 0.20m; ancho: 0.80m y 0.30m

Materiales de laboratorio.

- Agitador magnético
- Algodón hidrófilo
- Balanza de precisión MIRAY® de 0.1 a 200 g
- Frascos estériles de orina
- Hojas de bisturí
- Jeringas descartables de 1, 5,10 y 20 ml
- Mangos de bisturí
- Peachímetro digital COM-300 HM Digital®
- Pinzas
- Probetas de 100, 500 y 1000 ml
- Tijeras
- Tubos de ensayo con tapa rosca

- Tubos de extracción con tapa de goma descartados
- Vasos de vidrio de 500 y 1000 ml

Reguladores de crecimiento.

Auxina:

ANA (1-Naphtaleneacetic acid) $C_{12}H_{10}O_2$, CAS* 86-87-3

Citoquininas:

BAP (6-Benzylaminopurine) $C_{12}H_{11}N_5$, CAS 1214-39-7

Antimicrobianos:

Azul de metileno (Cloruro de metiltionina) $C_{16}H_{18}ClN_3S$, CAS 61-73-4

Nitrato de plata $AgNO_3$, CAS 7761-88-8

*Chemical Abstracts Service

Figura 6

Cámara de flujo laminar completamente equipada



Figura 7*Cámara de incubación*

Nota. Material de madera y vidrio de 2.10 X 0.68 X 0.68 m

4.5.2 Instrumentos**4.5.2.1 Validación de los instrumentos para la recolección de datos**

Para la validación de los datos de este estudio, fueron recolectados utilizándose una hoja de cálculo, mostrados en el **anexo**, el cual fue debidamente constatado por el asesor de tesis el cultivo in vitro y mediante los biorreactores el crecimiento de los explantes de rosas, mediante visitas periódicas al laboratorio experimental

4.5.2.2 Confiabilidad de los instrumentos para la recolección de datos

Para poder determinar si el instrumento del Software Minitab®, es confiable, se realizaron comparaciones de análisis de resultados utilizando el software SAS® Universitario Edition (hoy conocido como SAS® On Demand para académicos) y en Excel, los cuales arrojaron los mismos valores básicos conservando su respectiva interfaz.

La confiabilidad de los siguientes instrumentos de medición son los siguientes:

1. Balanza de precisión marca Miray de 0.01 a 200 g. posee un sensor de alta precisión, pantalla digital de 0.4", indicador de sobre peso con botones Cero y tara, con garantía de uso de un año.
2. Peachímetro digital COM-300 HM Digital®, es un medidor de pH/EC/TDS de nivel profesional que mide el potencial de hidrógeno, la conductividad eléctrica y los sólidos disueltos totales y temperatura (compensación automática utilizando 3 temperaturas). Calibrado con soluciones tampón de pH 4 y 7
3. Productos utilizados en el medio de cultivo Murashige- Skoog, hormonas y desinfectantes fueron de las marcas:
 - HIMEDIA® (Certificado de la oficina de normas Indias IS/ISO 9001:2015)
 - CDH Fine Chemical (ISO 9001:2008)
 - Phyto Technology Laboratories®, (ISO 9001)
 - VIRKON®S (ISO 13688:2013)
 - BENZOMIL® 500 Autorización SENASA PQUA N° 700
4. Ozonizador Zelema® (ya no se encuentra en el mercado)
5. Equipo Ultravioleta UVCQBOX®, Elimina hasta el 99% de MRSA (Estafilococos y H1N1 de la gripe porcina)
6. Temporizador digital BOECO®, con 4 grupos de tiempo, calibrado en un laboratorio ISO/IEC 17025
7. Calibrador Electronic Digital Caliper®, resolución: 0.1 mm/0.1", precisión: ± 0.2 mm/0.01"
8. Micrómetro Plastic Digital Thickness Gauge®, Rango:0 12mm/.5", resolución: 0.01/.0005"

4.6 técnica para el procesamiento y análisis de datos

La técnica utilizada para el procesamiento y análisis de los datos es el Método Taguchi, que es un método robusto que aplica primero la función de pérdida, segundo es la filosofía de calidad fuera de línea y tercero son las innovaciones en el diseño de experimentos. Se siguen los siguientes pasos:

1. Crear el diseño Taguchi adecuado introduciendo los factores y niveles de estudio al programa (5 factores y 2 niveles)
2. Escoger el diseño adecuado (L8)

3. Nombrar los factores y los valores reales de los niveles de estudio
4. El programa nos arroja el arreglo L8 en detalle (Design Summary)
5. Introducir las variables respuestas de cada una de las corridas en estudio
6. Analizar el diseño Taguchi en el Software
7. Escoger las relaciones de Ruido y Señal para el modelo lineal
8. Elegir el más grande es mejor (Larger is better)
9. Interpretar los resultados de la Señal/Ruido de resultados y las gráficas de salida
10. Determinar la ecuación de regresión que se ajusta a los resultados obtenidos.

4.7 Aspectos éticos

Básicamente las investigaciones que involucran a humanos y animales están sujetos al análisis ético, en el caso de la manipulación de los tejidos vegetales aun no existen consideraciones éticas menos aun con el experimento de la presente investigación en la cual no hay manipulación genética, solamente técnicas de propagación que ayudan a un mejor desarrollo e incremento de la producción y productividad de las rosas, aun así debemos tener en cuenta lo que nos indica Stocklin tomado de (*Las plantas también tienen dignidad*, s. f.) “Las plantas no poseen un sistema nervioso como el nuestro, considerados como organismos autónomos y pasivos. Pero en realidad disponen de una capacidad perceptiva ultrasensible e interactúan de manera compleja con las señales exteriores, reacciona ante la luz, las estimulaciones mecánicas y sufren stress”

CAPÍTULO V.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Análisis descriptivo

Para la realización del presente trabajo de investigación se realizaron las siguientes operaciones:

Compra y siembra de plantas de rosas comerciales para obtener el material vegetativo de donde se iban a extraer los explantes de rosas, tal como se muestra en la foto 1, se sembraron 20 plantas para hacerles el seguimiento sanitario para tomar las muestras de aquellas plantas morfológicamente sanas, de diámetro y brotes axilares viables tal como se muestra en la foto 2.

Foto 1. Variedades de colores de Rosas sembradas



Foto 2

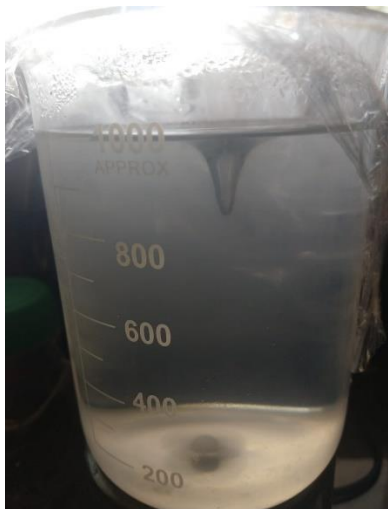
Tallos con más de 8 hojas listos para la desinfección.



La preparación de los medios de cultivo según el protocolo de Murashige – Skoog, primero se pesaron los ingredientes según la formulación mostrada en el anexo XYZ, introducidos en un vaso de 1 l. en agitación constante, utilizando un agitador magnético tal como se aprecia en la Foto 3.

Foto 3

Mezclado de los Ingredientes para la Preparación del Medio MS.) Murashige-Skoog)



Los explantes luego de realizado el lavado con detergente, y con alcohol de 70° fueron cortados en segmentos conteniendo un brote axilar y dentro de la cámara de flujo laminar se introdujeron en los medios de cultivo en agar semisólido previamente esterilizados en la autoclave y dejados enfriar. Los que son mostrados en las Fotos 4, 5 y 6

Foto 4

Corte y Siembra de los Explantes dentro de la Cámara de Flujo Laminar

**Foto 5**

Preparación de los trozos de Explante en Longitud



La preparación del medio Murashige Skoog básico y la suplementación de los factores de estudio, son mostrados en la Foto 6 en la cual como ejemplo se visualiza el pesado del Sulfato de Zinc Heptahidrato (0.86g)

Foto 6

Preparación del Medio Básico Murashige-Skoog (MS).



En las Foto 7 y 8 se aprecian el crecimiento de los cultivos in vitro de las rosas dentro de la cámara de incubación cerrada con luz Led durante 16 horas y 8 horas de oscuridad controlada por un Timer programable.

Foto 7

Crecimiento de los Brotes Axilares dentro de la Cámara de Incubación.



Foto 8

Crecimiento de Brotes Axilares dentro de la Cámara de Incubación en mayor amplitud



La medición del crecimiento de las yemas axilares de los explantes después de la fase de incubación se muestra en la Foto 9, utilizando un Vernier digital.

Foto 9

Medición de crecimiento de brotes post incubación durante 21 días.



5.2 Análisis inferencial de los Resultados

5.2.1 Crecimiento *in vitro* en medio semisólido, bajo tres factores

Bajo las condiciones del laboratorio DIY (do it yourself), en los que fueron llevados a cabo el experimento, los resultados obtenidos del crecimiento de los explantes de rosas *in vitro cultivados* en el medio semisólido MS (Murashige-Skoog) como base y con tres factores de estudio con el coeficiente de acidez o basicidad (pH) y dos hormonas ANA(ácido α -Nafthalacético) y BAP (6-Bencil amino purina), bajo 2 niveles de estudio con un valor mínimo y máximo (5.5-5.9; 0.1-0.3 y 0.5-2.5) respectivamente.

El resumen del diseño Taguchi creado por Minitab es el siguiente:

Resumen del diseño

Arreglo de Taguchi : L8(2³)

Factores : 3

Corridas : 8

Columnas del arreglo de L8(2⁷): 1 2 4

En la captura de pantalla de la Foto 10 se muestra el arreglo ortogonal de Taguchi generado por el software Minitab® L8, para tres factores y 2 niveles de estudio.

Foto 10.

Hoja de trabajo del Arreglo Ortogonal de Taguchi generado por Minitab® con 3 Factores y 2 Niveles

↓	C1	C2	C3
	pH	Auxinas	Citoquininas
1	5.5	0.1	0.5
2	5.5	0.1	0.5
3	5.5	0.3	2.5
4	5.5	0.3	2.5
5	5.9	0.1	2.5
6	5.9	0.1	2.5
7	5.9	0.3	0.5
8	5.9	0.3	0.5

En donde 0.1 me indica que la hormona corresponde a 1 parte por millón (1ppm) y 2.5 corresponde a 25 ppm L⁻¹ de medio de cultivo MS.

Analizados con el software Minitab® los resultados de los coeficientes promedios del crecimiento de los brotes son mostrados a continuación en las tablas 1 y 2. Los cuales nos muestran que al análisis de varianza no encuentra diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las fuentes de variación analizadas.

Tabla 1

Análisis de los Coeficientes Estimados para las Medias

Término	Coeficiente	EE del Coeficiente	T	Pr > F
Constante	10.1750	0.7864	12.9	0.0000
			39	
pH 5.5	0.00000	0.7864	0.00	1.000
			00	
Auxinas 0.1	0.2000	0.7864	0.25	0.812
			4	
Citoquininas	-0.1250	0.7864	-	0.881
0.5			0.159	

$Pr \leq 0.05$ indica significancia

La ecuación de regresión en base a los resultados de la Tabla 1, es el siguiente:

$$Y = 10.1750 + 0.00 \text{ pH} + 0.2000 \text{ Auxinas} - 0.1250 \text{ Citoquininas}$$

Así tomando en cuenta esta ecuación de regresión, manteniendo fijo el nivel de pH (5.5), ante un aumento de 0.2 veces el nivel de auxinas y reduciendo en 0.125 veces el nivel de Citoquininas obtendríamos el incremento de la longitud de los brotes en una unidad (mm).

Tabla 2*Análisis de Varianza de las Relaciones Señal/Ruido*

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Suma de Cuadrados Ajustados	F	Pr > F
pH	1	0.0001	0.000	0.00008	0.000	0.996
Auxinas	1	0.0797	0.0797	0.07966	0.002	0.887
Citoquininas	1	0.1309	0.13093	0.13093	0.040	0.856
Error	4	14.0267	3.50669	3.50669		
Residual						
Total	7	14.2374				

Pr ≤ 0.05 indica significancia

Mientras que los resultados de salida del Análisis de Taguchi: R1; R2; R3; R4; R5; R6; R7; R8 vs. pH; Auxinas y Citoquinas mostrados en la Tabla 3, nos indica la clasificación de influencia en primer lugar de las Auxinas, seguido de el pH y finalmente de las citoquinas, en sus 2 niveles de estudio.

En las Tablas 3 y 4 se muestran las respuestas para las relaciones de señal a ruido y para los valores medios, los números resaltados en negrita nos indican los valores mayores para los factores, el valor Delta

Tabla 3*Respuestas para las Relaciones de Señal a Ruido (S/N)*

Nivel	pH	Auxinas	Citoquininas
1	20.05	20.15	19.92
2	20.04	19.95	20.17
Delta	0.01	0.20	0.26
Clasificación	3	1	2

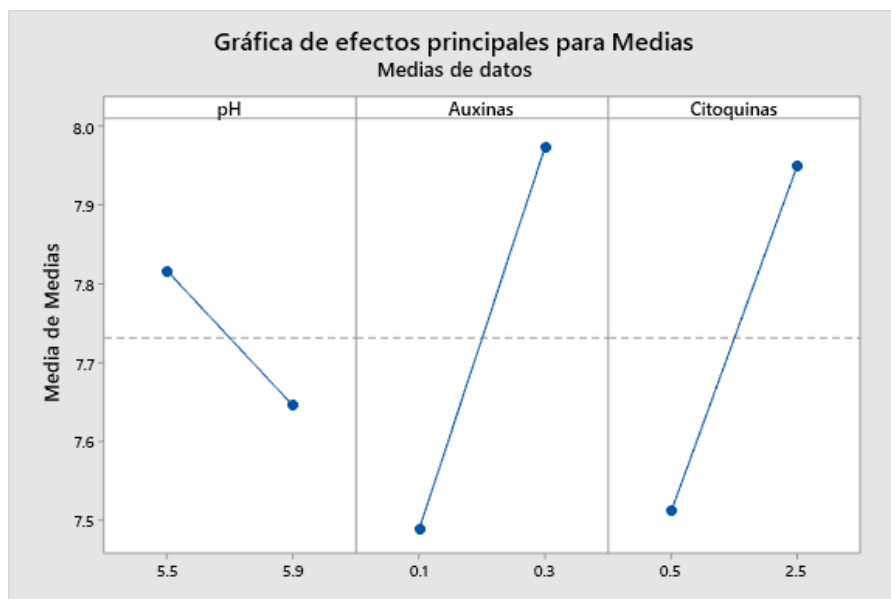
Tabla 4*Respuestas para los Valores Medios*

Nivel	pH	Auxinas	Citoquininas
1	10.175	10.375	10.050
2	10.175	9.975	10.300
Delta	0.01	0.400	0.250
Clasificación	3	1	2

que es la diferencia entre los valores respuesta más altos y más bajos para cada factor, así apreciamos que el valor Delta más alto es para las Auxinas, seguido de las Citoquininas y finalmente el pH. Este análisis nos muestra la relación de señal a ruido (relación S/N) que nos permite identificar la configuración de los factores que minimizan la variabilidad causada por los factores de ruido, esta medida de robustez que se utiliza para identificar los factores de control que reducen la variabilidad de un producto o proceso al minimizar los efectos que no se pueden controlar durante la producción, pero si durante la experimentación (factores de ruido), en la Grafica 1 se aprecian los efectos principales de los valores medios de los datos, apreciándose que los que mayor portan en el crecimiento de los brotes son las dos hormona comparados con el nivel de pH. Los valores para el pH de 5.5; el de Auxinas de 0.3 y para las Citoquininas de 2.5 son los mejores valores obtenidos en el crecimiento longitudinal de los implantes de rosas cultivadas *in vitro*.

Grafica 1

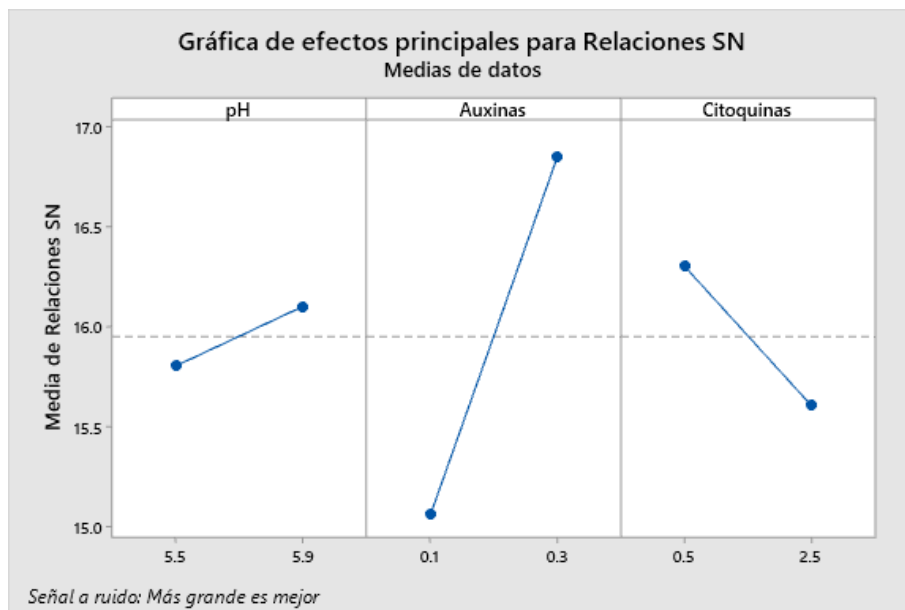
Efectos Principales para Medias de datos



A continuación, en la Grafica 2 se muestran los resultados de las respuestas para las relaciones señal a ruido (S/N), siendo el factor S/N que más influye en el crecimiento de los brotes las Auxinas, bajo el criterio de más grande es mejor, en donde apreciamos que el nivel de pH es de 5.9; el nivel de Auxinas 0.3 y para el nivel de Citoquininas el nivel es de 0.5, resultados que mejor explican el crecimiento de los cultivos in vitro porque incluye factores de ruido que no los detecta cuando se analiza los valores promedios (el nivel de Citoquininas considerado es de 0.5)

Gráfica 2

Efectos Principales para las Relaciones Señales a Ruido (S/N)



5.2.2 Análisis de la superficie de respuesta del crecimiento longitudinal vs. El pH, Auxina y Citoquininas

El análisis de la superficie de respuesta también es parte del análisis de los diseños de experimentos (DOE) que sirve para determinar las condiciones óptimas del crecimiento de los cultivos de tejidos. Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 5, cuyo modelo lineal estudia el efecto de los factores individuales y sus interacciones, habiéndose encontrado que no existen diferencias ($p < 0.05$) para ninguna de las fuentes de variación tanto de los factores individuales como de las interacciones entre los factores de pH, Auxinas y Citoquininas.

Tabla 5*Análisis de varianza del modelo*

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados Ajustados	Cuadrados Medios ajustados	Valor F	Pr > F
Modelo	6	15.5900	2.7650	0.76	0.705
Lineal	3	0.4450	0.1483	0.04	0.974
pH	1	0.0000	0.0000	0.00	1.000
Auxinas	1	0.3200	0.3200	0.09	0.817
Citoquininas	1	0.1250	0.1250	0.03	0.883
Interacción de 2 factores	3	16.1450	5.3817	1.48	0.529
pH*Auxinas	1	0.8450	0.8450	0.23	0.714
pH*Citoquininas	1	14.5800	14.5800	4.00	0.295
Auxinas*Citoquininas	1	0.7200	0.7200	0.20	0.734
Error	1	3.6450	3.6450		
Total	7	20.6450			

Pr \leq 0.05 indica que existe significancia.

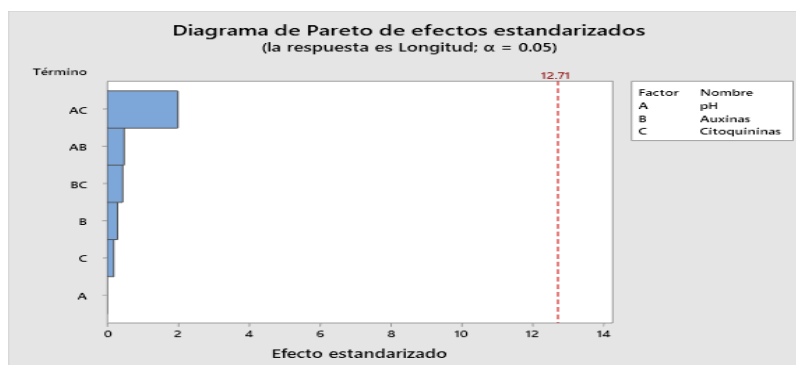
La ecuación de regresión múltiple es la siguiente:

$$\begin{aligned} \text{Longitud} = & - 60.6 + 12.56 \text{ pH} + 43.1 \text{ Auxinas} + 38.2 \text{ Citoquininas} \\ & - 8.1 \text{ pH} * \text{Auxinas} \quad - 6.75 \text{ pH} * \text{Citoquininas} \\ & + 1.50 \text{ Auxinas} * \text{Citoquininas} \end{aligned}$$

En la Gráfica 3, se muestra el diagrama de Pareto de los efectos estandarizados ($\alpha= 0.05$) los cuales nos indica en concordancia con en ANVA analizado que no se encontraron factores que sobrepasen el 20 % de las causas en el resultado. No hay ninguna variable simple ni de las interacciones que afecten al modelo por encontrarse los valores debajo del nivel mínimo crítico de 12.71

Gráfica 3

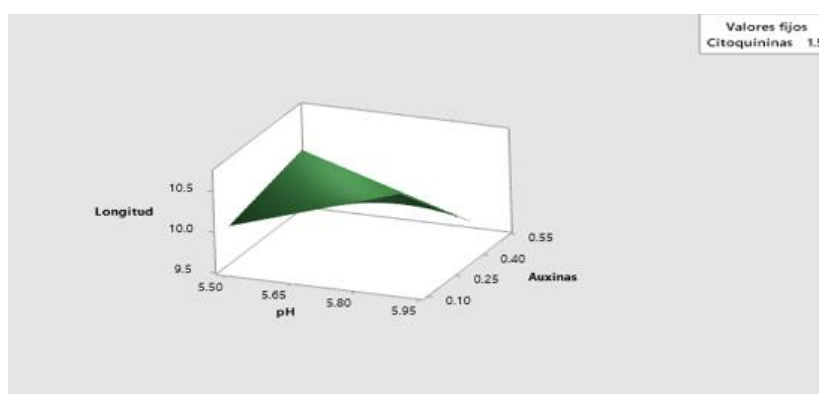
Diagrama de Pareto para los Efectos Estandarizados



El análisis de la superficie de respuesta es mostrado en la gráfica 4 en la cual se ha graficado la longitud vs. el pH y las Auxinas Teniendo como valor fijo el nivel de las Citoquininas (1.5), cuyas curvaturas de los factores en el nivel máximo nos indica el mejor crecimiento del tejido vegetal, para el estudio cuando el pH es cercano a 5.70 y el nivel de Auxinas en 0.30 se obtiene la longitud máxima del explante.

Gráfica 4

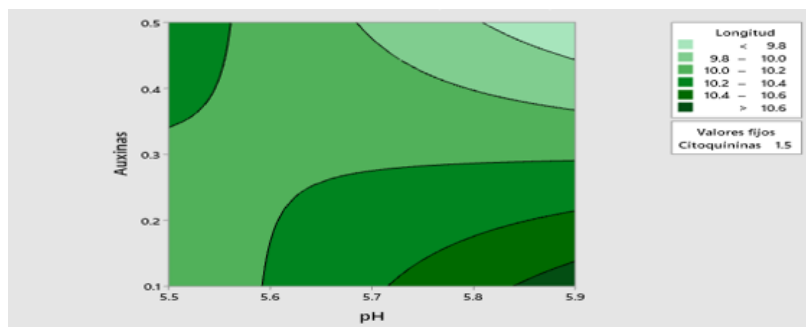
Análisis de la Superficie de Respuesta de la Longitud vs. El nivel de pH y Citoquininas, con un valor fijo de las Citoquininas



Cuando se realiza el análisis de contorno. La gráfica de la superficie de respuesta, el cual se analiza en forma similar a los análisis topográficos, dentro del recuadro podemos ver los intervalos de crecimiento en longitud de los cultivos in vitro respecto a los diferentes valores de Auxinas y pH asumiendo un valor fijo de las Citoquininas, tal como se muestra en el Gráfico 5.

Gráfica 5

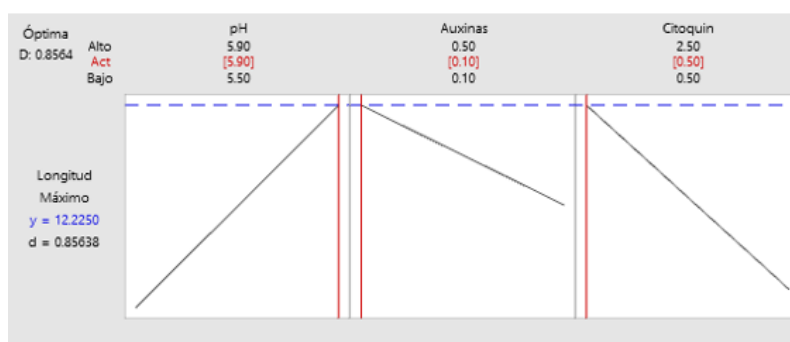
Análisis del Contorno de las Superficie de Respuesta (RMS)



La predicción del crecimiento óptimo del tejido vegetal in vitro cuando se analiza se le compara con los diferentes niveles de Auxinas y Giberelinas que son mostradas en el Gráfica 6, en el cual se encontró la longitud de los brotes (mm) máxima de predicción objetivo de 12.2250 es posible obtenerla con un nivel de pH de 5.9; la hormona Auxina de 0.1 y 0.5 de Citoquininas

Gráfica 6

Predicción de Respuesta Múltiple de la Longitud vs. pH, Auxinas y Citoquininas.



5.3.3 Crecimiento in vitro en medio semisólido, bajo cinco factores y 2 niveles y 20 repeticiones.

A consecuencia de la facilidad de la contaminación por microorganismos como bacterias y hongos, del medio ambiente que contaminan el medio de cultivo se probaron 2 factores adicionales de inhibición, el Azul de Metileno (Cloruro de Metilmetionina) y el Nitrato de Plata, se trabajó con el Arreglo de Taguchi L8(2⁵), con 5 factores, 8 corridas y un arreglo de Columnas L8 \wedge 7): 1 2 3 4 5, la hoja de trabajo N° 1 se muestra en los anexos.

Resumen del diseño

Arreglo de Taguchi : $L8(2^5)$

Factores : 5

Corridas : 8

Columnas del arreglo de $L8(2^7)$: 1 2 3 4 5

La captura de pantalla mostrada en la Foto 11 muestra la hoja de trabajo del arreglo ortogonal de Taguchi $L8$ conteniendo 5 factores y 2 niveles de estudio.

Foto 11

Hoja de Trabajo del Arreglo Ortogonal de Taguchi $L8$ con 5 Factores y 2 Niveles

↓	C1	C2	C3	C4	C5
	pH	Auxinas	Citoquininas	Azul de metileno	Nitrato de plata
1	5.5	0.1	0.5	1	40
2	5.5	0.1	0.5	2	80
3	5.5	0.3	2.5	1	40
4	5.5	0.3	2.5	2	80
5	5.9	0.1	2.5	1	80
6	5.9	0.1	2.5	2	40
7	5.9	0.3	0.5	1	80
8	5.9	0.3	0.5	2	40

En donde 0.1 me indica que la hormona corresponde a 1 parte por millón (1ppm) y 2.5 corresponde a 25 ppm L^{-1} de medio de cultivo MS. el 1 y 2 del Azul de metileno me indica el número de gotas (L^{-1}) y 40mg L^{-1} y 80mg L^{-1} de Nitrato de Plata adicionados al medio MS (Murashige-Skoog).

Los resultados de los coeficientes del modelo estimado, tomando en cuenta las relaciones de señal a ruido (S/N) se muestra en la Tabla 6, el cual nos indica que existen diferencias significativas para los niveles 5.5 de pH, y 0.1 de Auxinas mas no en los factores de la hormona Citoquinina (0.5), azul de Metileno y Nitrato de Plata (40)

Tabla 6*Coefficientes del Modelo Estimado para las Relaciones Señal a Ruido (S/N)*

Término	Coefficiente	EE del Coefficiente	T	Pr > F
Constante	13.1554	0.2176	60.460	0.000
pH 5.5	2.1132	0.2176	9.712	0.010
Auxinas 0.1	1.0698	0.2176	4.916	0.039
Citoquininas 0.5	-0.2839	0.2176	-1.305	0.322
Azul de Metileno	0.3595	0.2176	1.652	0.240
Nitrato de Plata 40	-0.3027	0.2176	-1.391	0.299

Pr \leq 0.05 indica significancia

El valor de R-cuadrado es de 98.42% y para el R-cuadrado ajustado es de 94.48% lo cual nos reflejan que el modelo obtenido se ajusta bien y está bien representado.

El análisis de varianza de las relaciones señal a ruido (S/N) mostrado en la Tabla 7 nos indica el efecto significativo de los factores de pH y de las Auxinas ($p < 0.05$), el cual coincide estadísticamente con el análisis de varianza de los valores medios mostrados en la Tabla 11.

Tabla 7*Análisis de Varianza de las Relaciones Señal a Ruido (S/N)*

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Suma de Cuadrados Ajustado	Cuadrados Medios Ajustados	F	Pr > F
Ph	1	35.7255	35.7266	35.7266	94.33	0.010
Auxinas	1	9.1552	9.1552	9.1552	24.17	0.039
Citoquininas	1	0.6450	0.6450	0.6450	1.70	0.322
Azul de Metileno	1	1.0341	1.0341	1.0341	2.73	0.240
Nitrato de Plata	1	0.7331	0.7331	0.7331	1.94	0.299
Error residual	2	0.7575	0.7575	0.3788		
Total	7	48.0414				

$Pr \leq 0.05$ indica que existe significancia.

El análisis de varianza de las Medias de la Tabla 8 al igual que el ANVA de las relaciones de Señal a Ruido, indican una significancia para el pH y el nivel de Auxinas.

Tabla 8*Análisis de Varianza de las Medias*

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Suma de Cuadrados Ajustado	Cuadrados Medios Ajustados	F	Pr > F
pH	1	9.8108	9.81077	9.811077	289.61	0.003
Auxinas	1	1.8210	1.82098	1.82098	53.76	0.018
Citoquininas	1	0.0626	0.06260	0.06260	1.85	0.307
Azul de Metileno	1	0.3052	0.30522	0.30522	9.01	0.095
Nitrato de Plata	1	0.0426	0.04256	0.04256	126	0.379
Error Residual	2	0.0678	0.0675	0.03388		
Total	7	12.1099				

$Pr \leq 0.05$ indica que existe significancia.

Las respuestas para las relaciones señal a ruido (S/N), mostrado en la Tabla 9, al evaluar la longitud más grande el orden de la clasificación es 1) Ph, 2) Auxinas, 3) Azul de Metileno 4) Nitrato de Plata y 5) las Citoquininas

basado en los valores Delta, el análisis de las respuestas para los valores medios que se detallan en la Tabla 10 los que arrojan los mismos resultados de la señal a ruido.

Tabla 9

Respuestas para las Relaciones Señal a Ruido (S/N), Mas Grande es Mejor

Nivel	pH	Auxinas	Citoquininas	Azul de Metileno	Nitrato de Plata
1	15.27	14.23	12.87	13.51	12.85
2	11.04	12.09	13.44	12.80	13.46
Delta	4.23	2.14	0.57	0.72	0.61
Clasificación	1	2	5	3	4

Tabla 10

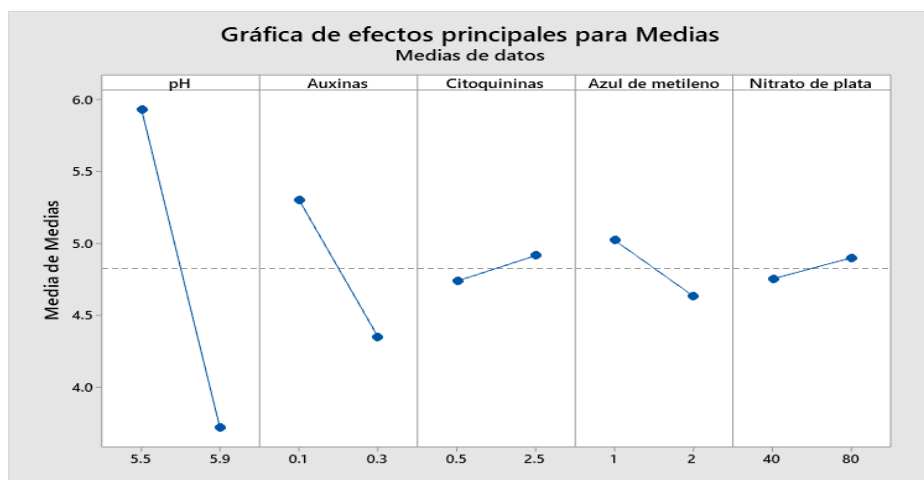
Respuestas para los Valores Medios

Nivel	pH	Auxinas	Citoquininas	Azul de Metileno	Nitrato de Plata
1	5.934	5.304	4.738	5.022	4.754
2	3.719	4.349	4.915	4.631	4.899
Delta	2.215	0.954	0.177	0.391	0.146
Clasificación	1	2	4	3	5

Los detalles de estos análisis son mostrados en las gráficas 7 y 8 para los efectos principales para medias y las relaciones señal a ruido respectivamente los cuales coinciden en los resultados de pH, Auxinas, Azul de Metileno, Citoquininas y Nitrato de Plata con valores de 5.5; 0.1; 1; 2.5 y 80 de Nitrato de Plata respectivamente., mostrado un mayor efecto el pH y las Auxinas.

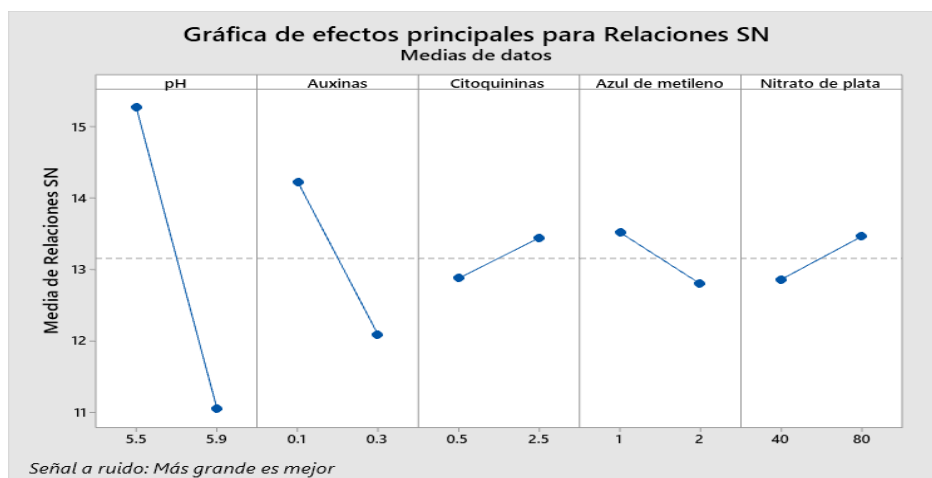
Gráfica 7

Efectos Principales para Medias



Gráfica 8

Efectos Principales para las Relaciones Señal a Ruido (S/N)



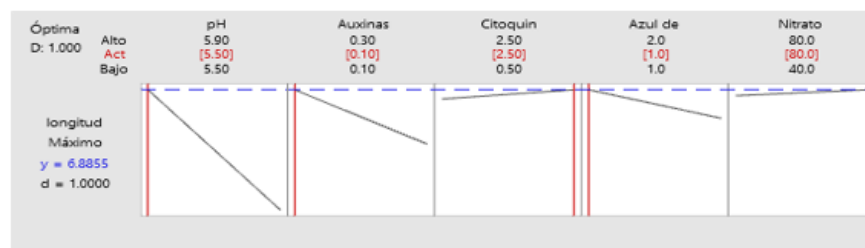
Obteniéndose una ecuación de regresión en unidades no codificadas siguiente:

$$\text{Longitud} = 39.42 - 5.757 \text{ pH} - 7.760 \text{ Auxinas} + 0.08843 \text{ Citoquininas} \\ - 0.6931 \text{ Azul de metileno} + 0.001496 \text{ Nitrato de plata} + \\ 1.467 \text{ Auxinas} * \text{Azul de metileno} + 0.01351 \text{ Auxinas} * \text{Nitrato de plata}$$

La optimización de respuesta a la longitud de los brotes de los tallos cultivados in vitro, mostrado en la gráfica 9, en donde la longitud máxima (6.8855 mm) se obtiene con un pH de 5.5, un nivel de 1 ppm del Ácido 1-Naphthaleneacetic, un nivel de 25 ppm de 6 Benzilaminopurina, 01 gota de Azul de metileno y 80 mg de Nitrato de Plata.

Gráfica 9

Predicción de Respuesta Múltiple



El análisis de varianza de la regresión de la longitud comparado con el nivel de pH, Auxinas, Citoquininas, Azul de Metileno y Nitrato de Plata se muestran en la Tabla 14, cuya ecuación de regresión es la siguiente y cuyo modelo nos muestra una Desviación estándar de 0.156336, un R-cuadrado del 99.62% y el R-cuadrado ajustado de 98.67% y un R-cuadrado de la predicción de 93.94, resultados nos indican un buen modelo.

$$\text{Longitud} = 38.82 - 5.757 \text{ pH} - 4.749 \text{ Auxinas} + 0.0884 \text{ Citoquininas} \\ - 0.400 \text{ Azul de metileno} + 0.00420 \text{ Nitrato de plata}$$

Tabla 11

Análisis de Varianza de la regresión de los Efectos Estandarizados

Fuente de Variación	GL	Suma de Cuadrados Ajustados	Cuadrados Medios Ajustados	Valor F	Pr > F
Regresión	5	12.8501	2.5700	105.15	0.009
pH	1	10.6074	10.6074	434.00	0.002
Auxinas	1	1.8043	1.8043	73.82	0.013
Citoquininas	1	0.0623	0.0623	2.56	0.251
Azul de Metileno	1	0.3195	0.3195	13.09	0.069
Nitrato de Plata	1	0.0564	0.0564	2.31	0.268
Error	2	0.0489	0.0244		
Total	7	12.8990			

Pr \leq 0.05 indica que existe significancia.

Realizado el diagrama de Pareto de los efectos estandarizados, encontramos que los factores A y B influyen en el 80% de la longitud de crecimiento del cultivo in vitro al sobrepasar el valor límite de 4.30, seguido de cerca por el factor Azul de Metileno y de lejós por los otros factores como las Citoquininas y el Nitrato de Plata.

5.3 Discusión de los Resultados

En base a los resultados observados en la Tabla 12 que nos muestran un resumen del crecimiento de los cultivos in vitro de los experimentos conducidos en la presente investigación, podemos apreciar que el crecimiento obtenido en la fase de establecimiento es suficiente para continuar con las siguientes fases de la micropropagación, así, los resultados obtenidos son menores a lo obtenido por (Villa R. R. & Arbeláez L. M., 2019) quienes con la misma concentración de hormonas (1-3ppm L⁻¹) obtuvieron crecimientos entre 1 y 1.2 cm, posiblemente debido a un menor pH utilizado (5.8) y a que agregaron suplementos vitamínicos como el myo-inositol 0,1 mg/L, ácido ascórbico 0,1 mg/L, tiamina 0,2 mg/L, con lo que enriquecieron mejor el medio de cultivo, pero es de notar que ellos obtuvieron una alta tasa de mortalidad aduciendo a contaminación endógena (22%) y 16% debido a factores fisiológicos., mientras que en la investigación realizada obtuvimos 18% de contaminación y 2.5% de explantes que no brotaron debido posiblemente a factores fisiológicos propio de las plantas.

Tabla 12

Resultados de la Longitud de los Brotes Axilares Alcanzada bajo tres Factores y 2 Niveles

N°	pH	Auxinas	Citoquininas	Longitud promedio
1	5.5	0.1	0.5	4.47
2	5.5	0.1	2.5	8.13
3	5.5	0.5	0.5	5.48
4	5.5	0.5	2.5	5.90
5	5.9	0.1	0.5	6.65
6	5.9	0.1	2.5	3.78
7	5.9	0.5	0.5	5.87
8	5.9	0.5	2.5	5.00

Nota: 21 días de crecimiento

Estos resultados propiciaron la realización de un experimento adicionando factores inhibidores de contaminación principalmente por hongos y bacterias, tal como se muestra en la Tabla 13, en las cuales, al haberse utilizado los factores de inhibición de crecimiento de microorganismos, el Azul de Metileno y el Nitrato de plata los cuales redujeron al 5% la contaminación, valor aceptable. Mientras que el porcentaje de yemas que no brotaron fue del 42.5% porcentaje que según (Spinoso-Castillo et al., 2017), a una mayor cantidad de nanopartículas de plata se produce el efecto hormético de disminución del crecimiento de los brotes pero a la vez un mejor control de los contaminantes.

Tabla 13

Resultados de la Longitud de los Botes Axilares Alcanzada Bajo 5 Factores y 2 Niveles de Estudio

pH	Auxinas	Citoquininas	Azul de metileno	Nitrato de plata	Longitud promedio
5.5	0.1	0.5	1	40	6.30
5.5	0.1	0.5	2	80	6.10
5.5	0.3	2.5	1	40	5.30
5.5	0.3	2.5	2	80	5.80
5.9	0.1	2.5	1	80	4.35
5.9	0.1	2.5	2	40	3.50
5.9	0.3	0.5	1	80	3.20
5.9	0.3	0.5	2	40	3.00

Nota: 21 días de crecimiento

Los resultados que se encuentran en el Anexo 1, muestran el arreglo factorial AOL8, reduciendo el número de corridas a 8 y en las 7 columnas los factores en sus diferentes niveles y combinaciones de estudio, coincidente con lo manifestado por Antil & Unver (2000), Escalante (2005, 2013) quienes señalan la metodología de Taguchi permite identificar mejor el nivel de cada uno de los factores principales (controlables) y factores de ruido (no controlable) y así identificar la mejor configuración que minimiza la variabilidad causante por los factores en sus diferentes niveles de estudio.

Al ser el trabajo de investigación investigado un estudio inédito no permite realizar una mayor discusión de los resultados obtenidos, porque básicamente el método Taguchi se realiza en la gestión de procesos y productos industriales

mientras que en el sector agrícola hay algunos trabajos como el realizado por (Deo et al., 2007) empleando el diseño de experimentos, utilizando el método de Taguchi en estudios de fertilización de plantas indicando que se redujeron el número de experimentos y aun así obtuvieron óptimas combinaciones de los factores en sus diferentes niveles generando resultados similares a los obtenidos por métodos convencionales que son más costosos y requieren mayor tiempo

5.4 Aporte científico de la investigación

El aporte científico de la investigación llevada a cabo bajo las condiciones descritas y llevadas a cabo es la siguiente:

1. Abre un nuevo sistema de análisis estadístico en la que se pueden realizar investigaciones con muchos factores controlables y no controlables (factores de ruido) en forma reducida ya que si se hubiese realizado un análisis factorial 2^7 se hubiese requerido 128 corridas simples y 256 con 2 repeticiones y así sucesivamente, la cual demanda tiempo y dinero, mientras que con el DOE (Desing of experiments) utilizando la metodología de arreglo factorial de Taguchi esta se ve reducida a 8 corridas por repetición, obteniéndose resultados altamente confiables y de predicción.
2. Es factible la construcción e implementación de un laboratorio de cultivos vegetales DIY (do it yourself) en un ambiente pequeño y económico utilizando equipos y materiales de bajo costo, fácilmente transmitible a agricultores que requieran tecnología avanzada, como plántulas libres de enfermedades y suministro de material vegetal durante todo el año, dejando de lado la dependencia de las importaciones.
3. La construcción de biorreactores caseros de bajo costo que reemplazan en parte al cultivo de tejidos vegetales en medio semi sólido ya que utilizan el mismo medio, pero sin el agente gelificante y que hace más eficiente la micropropagación hasta en un 60 %
4. Este tipo de investigación permite realizar un bioemprendimiento para la obtención de plántulas de muchas especies con las ventajas que ofrecen los cultivos *in vitro*. (papa, café, orquídeas, etc.)

CONCLUSIONES

1. El método estadístico de Taguchi en la investigación del cultivo de Rosas *in vitro*, en un laboratorio DIY, permite analizar los factores principales controlables y no controlables (ruido) que afectan el crecimiento de los brotes, en un menor costo y tiempo.
2. Al análisis de tres factores (pH, Auxinas y Citoquininas) la respuesta del crecimiento de los explantes en relación a los valores promedio y en la relación señal a ruido (S/N) clasifican en primer lugar la influencia de la hormona α – Naftalacético (ANA), seguido de la hormona 6-Benziladenina (BAP) y finalmente el nivel de pH. Siendo el mayor crecimiento con los niveles de pH de 5.5; las Auxinas (ANA) de 1 ppm y 25 ppm de la hormona BAP (Citoquinina).
3. El análisis de crecimiento *in vitro* en un medio semisólido bajo 5 factores de estudio con 2 niveles y 20 repeticiones, la respuesta para las relaciones de señal a ruido (S/N) donde el más grande es mejor clasifican en primer lugar al pH de 5.5; Auxinas a 1 ppm; 01 gota de Cloruro de Metiltionina (Azul de Metileno) y 80 mg de Nitrato de Plata y 25 ppm de 6-Benziladenina (Citoquininas)
4. El análisis de los valores promedio muestran un resultado 5.9 de pH, 3ppm de α – Naftalacético (ANA), 1 gota por litro de Cloruro de Metiltionina (Azul de Metileno), 25 ppm de 6-Benziladenina (Citoquininas) y 80 mg. De Nitrato de Plata.
5. Se demostró la factibilidad de construir un laboratorio de investigación y un Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT), como innovación y transferencia de tecnología hacia la comunidad.

RECOMENDACIONES

1. Realizar investigaciones utilizando nano partículas de plata (Ag-NP'S) sintetizadas a partir del Nitrato de Plata
2. Difundir y promover el uso de laboratorios DIY a productores agrícolas y en la enseñanza universitaria.
3. Emplear el uso de Biorreactores para el cultivo de tejidos bajo inmersión temporal conjuntamente con los cultivos de tejidos en medios semi sólidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Alonso, G. M. (2002). Biotecnología aplicada a mejora de Pelargonium. *Tesis doctoral*. Madrid, España.
- Caamaño M., L. G. (2007). Biotecnología, ética y sociedad. *En Varia biológica: Filosofía, ciencia y tecnología*, 97-108.
- Cañal, M. J., Rodríguez, R., Fernández, B., Sánchez-Tames, R., & Majada, J. P. (2016). Fisiología del cultivo in vitro. *Fisiología vegetal*, 1.
- Castilla, Y. (2005). Cultivo de tejidos de rosas (Rosa sp): Un acercamiento a Investigaciones recientes. *Cultivos tropicales*, 43-47.
- Debergh, H., & Maene, L. (1981). A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae*, 335-345.
- Debergh, P., & Read, P. (1991). Micropropagation . *Micropropagation; Technology and application*, 1-13.
- Fay, M., & Clemente, M. (1997). Aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos en lapropagación y conservación de especies amenazadas. *Monograf. Jard. Bot*, 50.
- Firoozabady, E., Moey, Y., Curtney-Guteterson, N., & Robinson, K. (1994). Regeneration of transgenic rose (Rosa híbrida)plants from embriogenic tissues. *Bio/Tecnology*, 609-613.
- García, M. (1999). Metodología para la propagación masiva in vitro de Eucaliptus saligna Sm. *Tesis de Maestría*. La Habana, Cuba.
- <https://es.wikipedia.org/wiki/Rosa>. (2020).
- Linares, O. H. (2020, Agosto 15). *El cultivo del rosal*. Retrieved from http://www.sra.gob.mx/internet/informacio_general/programas/fondo-tierras/manuaes/cultivo_rosal.pdf.
- Lloyd, D., Roberts, A. V., & Short, K. C. (1988). The induction in vitro of adventitious shoots in Rosa. *Euphytica* 37, 31-36.
- LLOYD, G., & McCown, B. (1981). Woody plant medium (WPM): A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. *HortScience*, 453.
- Maene, L., & Debergh, P. (1985). Liquid medium addition to established tissue cultures to improve elongation and rooting in vitro. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 123-133.
- Martinez Torremocha, O. (2004). *Aspectos éticos y jurídicos de la biotecnología*. España.
- Mohan Jain, S., & Ochatt, S. J. (2010). *Protocols for in Vitro Propagation of Ornamental Plants*. London: Humana Press.

- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 473-497.
- Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue culture. *Annu Rev Plant Physiol*, 135-166.
- Oliveira, L. S., Días, P. C., & Brondani, G. E. (2013). Micropropagação de espécies florestais brasileiras. *Pesq. Flor. Bras*, 33: 439-453.
- Oviedo, L. A., & Rodriguez, N. V. (2009). Caracterización de la cadena de abastecimiento de rosas en Colombia. *Tesis de grado*. Bogotá, Colombia.
- Pati, P. K., Rath, S. P., Sharma, M., & Ahuja, P. S. (2006). In vitro Micropropagation of rose . *Biotechnol Adv* 24, 94-114.
- Pfeiffer, M. (2015). La relación entre biotecnología y progreso como "valores indiscutidos": sus implicancias éticas y políticas. *Revista Grafía*, 24- 49.
- Sanabria, M. A. (2004). *Establecimiento y producción de rosas de corte en la sabana de Bogotá*. Bogotá: ADN.
- Toledo Espinoza, J. V. (2006). *Biotecnología aplicada a la producción agrícola*. Lima: Propia.
- Wikipedia. (2020, 01). Retrieved 01 02, 2020, from <https://es.wikipedia.org/wiki/Rosa>

ANEXOS

Anexo 1

Matriz de consistencia

" Metodología Seis - Sigma en la micropropagación de rosas <i>in vitro</i> en Huánuco"							
PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES, DIMENSIONES E INDICADORES			TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE ANÁLISIS DE DATOS
GENERAL:	GENERAL:	GENERAL:	VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	TIPO DE INVESTIGACIÓN	TÉCNICAS
¿Existe disponibilidad inmediata de plantines de rosas comerciales obtenidas por micropropagación <i>In vitro</i> en Huánuco analizada bajo el enfoque de la metodología Seis-Sigma?	Determinar la viabilidad de la producción de Rosas <i>In vitro</i> en Huánuco, analizada bajo el enfoque de la metodología Seis-Sigma	Es económicamente rentable y viable la producción de plantines de rosas comerciales mediante la técnica de la micropropagación <i>In vitro</i> en Huánuco.	Variable independiente: Cultivo de rosas <i>in vitro</i>	* Variación de los componentes de la fórmula std. del Agar Murashime	* Número de plantas por área foliar cultivada <i>In vitro</i>	* Experimental * Exploratoria * Prospectiva * Longitudinal * Comparativa	* Análisis de varianza del cultivo Murashime std. con diferentes concentraciones de los compuestos del medio de cultivo. * Metodología Seis-Sigma
ESPECÍFICOS:	ESPECÍFICOS:	ESPECÍFICOS:			* Formación de callos * Formación de plántulas * Vigor de la plántulas		INSTRUMENTOS:
PE1. ¿Cuáles son las variedades e híbridos de rosas comerciales disponibles en el país?	OE1. Enumerar las variedades de híbridos de Rosas comerciales adaptables a Huánuco	HpE1. Se puede enumerar las variedades de híbridos de rosas comerciales adaptadas en Huánuco	Variable dependiente: Cantidad de plantines viables producidas en cultivos <i>in vitro</i>	* Alto * Medio * Bajo	* Soportan el cambio del medio de cultivo <i>In vitro</i> a otro medio de laboratorio en condiciones idénticas a su hábitat natural (adaptación del explante)		* Micropropagación <i>in vitro</i> propuesto por Debergh / Read (1991) * Agar base propuesto por Murashike / Skoog (1962) * Flujograma de la metodología Seis-Sigma
PE2. ¿De qué manera la UNHEVAL dispone con laboratorios, reactivos y material humano para el cultivo de tejidos <i>In vitro</i> ?	OE2. Verificar la disponibilidad de laboratorios, reactivos y material humano para la micropropagación <i>In vitro</i> en la UNHEVAL.	HpE2. Se puede identificar la disponibilidad de equipos, reactivos y material humano para la micropropagación <i>In vitro</i> en la Unheval.					INSTRUMENTOS DE ANÁLISIS DE DATOS:
PE3. ¿La rentabilidad de los cultivos de rosas <i>In vitro</i> <i>In situ</i> es mayor que su importación?	OE3. Medir la rentabilidad económica de la producción de plantines de Rosas <i>In vitro</i> .	HpE3. Se puede medir la rentabilidad económica de la producción de plantas de rosas cultivadas <i>In vitro</i> .	Variables intervinientes: - Disponibilidad de laboratorios debidamente equipados en la Unheval. - Disponibilidad de híbridos comerciales de rosas - Costos de los materiales (reactivos) y equipos				Diagrama de flujo - Plantillas recogida de datos - Muestreo estadístico - Histograma - Gráfico de Pareto - Diagrama de causa-efecto - Diagrama de dispersión - Análisis de regresión - Pruebas de hipótesis - Gráficos de control - Estudios de capacidad y nivel Sigma - Diseño de experimentos: Factorial 2X2 en bloques completamente randomizados - Gráficos de control - Análisis de capacidad - Determinación del nivel Sigma del proceso - Potencia y Poder estadístico de los datos - Softwares: Excel®, SAS Universitario®, Pasw Statistics® y G-Power®.
PE4. ¿De qué manera se puede cuantificar la metodología Seis-Sigma en la micropropagación <i>in vitro</i> de rosas?	OE. Cuantificar la metodología Seis-Sigma en la micropropagación de rosas <i>in vitro</i>	HpE4. Es posible cuantificar la metodología Seis-Sigma en la micropropagación de rosas <i>in vitro</i>					

Anexo 3

Instrumentos

1. Balanza de precisión marca Miray de 0.01 a 200 g. posee un sensor de alta precisión, pantalla digital de 0.4”, indicador de sobre peso con botones Cero y tara, con garantía de uso de un año.
2. Peachímetro digital COM-300 HM Digital®, es un medidor de pH/EC/TDS de nivel profesional que mide el potencial de hidrógeno, la conductividad eléctrica y los sólidos disueltos totales y temperatura (compensación automática utilizando 3 temperaturas). Calibrado con soluciones tampón de pH 4 y 7
3. Productos utilizados en el medio de cultivo Murashige- Skoog, hormonas y desinfectantes fueron de las marcas:
 - HIMEDIA® (Certificado de la oficina de normas Indias IS/ISO 9001:2015)
 - CDH Fine Chemical (ISO 9001:2008)
 - Phyto Technology Laboratories®, (ISO 9001)
 - VIRKON®S (ISO 13688:2013)
 - BENZOMIL® 500 Autorización SENASA PQUA N° 700
4. Ozonizador Zelema® (ya no se encuentra en el mercado)
5. Equipo Ultravioleta UVCQBOX®, Elimina hasta el 99% de MRSA (Estafilococos y H1N1 de la gripe porcina)
6. Temporizador digital BOECO®, con 4 grupos de tiempo, calibrado en un laboratorio ISO/IEC 17025
7. Calibrador Electronic Digital Caliper®, resolución: 0.1 mm/0.1”, precisión: ± 0.2 mm/0.01”
8. Micrómetro Plastic Digital Thickness Gauge®, Rango:0 12mm/.5”, resolución: 0.01/.0005”

NOTA BIOGRÁFICA



Ingeniero Zootecnista, graduado en la universidad nacional Agraria La Molina, con estudios de Maestría en la misma universidad con el grado académico de M. Sc. en Producción Animal, con un MBA en Dirección de proyectos en la Universidad Francisco de Vitoria en España. Diplomado en

Gestión de proyectos de Investigación en la Universidad Católica del Perú, ex director de la Escuela de Posgrado de la Unheval, ex director de Investigación de la Unheval, docente principal con más de 32 años en la Unheval, titular de los cursos de Producción de Vacunos de Leche, Administración y Planificación Estratégica, Bioestadística y diseños experimentales, en la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Unheval.

UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILO VALDIZÁN

LICENCIADA CON RESOLUCIÓN DEL CONSEJO DIRECTIVO N° 099-2019-SUNEDU/CD



Huánuco – Perú

ESCUELA DE POSGRADO

Campus Universitario, Pabellón V "A" 2do. Piso – Cayhuayna
Teléfono 514760 -Pág. Web www.posgrado.unheval.edu.pe

ACTA DE DEFENSA DE TESIS DE DOCTOR

En la Plataforma Microsoft Teams de la Escuela de Posgrado; siendo las **19:30h**, del día **jueves 25 DE NOVIEMBRE DE 2021**; el aspirante al **Grado de Doctor Gestión Empresarial**, **Don Julio César DÍAZ ZEGARRA**, procedió al acto de Defensa de su Tesis titulado: **"LA TÉCNICA ESTADÍSTICA DE LA METODOLOGÍA SEIS - SIGMA EN LA MICROPROPAGACIÓN DE ROSAS (Rosa Sp) IN VITRO EN HUÁNUCO"**, ante los miembros del Jurado de Tesis señores:

Dr. Amancio Ricardo ROJAS COTRINA	Presidente
Dra. Nerida del Carmen PASTRANA DIAZ	Secretaria
Dr. Italo Wile ALEJOS PATIÑO	Vocal
Dr. Pio TRUJILLO ATAPOMA	Vocal
Dra. Ernestina ARIZA AVILA	Vocal

Asesor de tesis: Dr. Carlos BUSTAMANTE OCHOA (Resolución N° 01618-2020-UNHEVAL/EPG-D)

Respondiendo las preguntas formuladas por los miembros del Jurado y público asistente.

Concluido el acto de defensa, cada miembro del Jurado procedió a la evaluación del aspirante a Doctor, teniendo presente los criterios siguientes:

- Presentación personal.
- Exposición: el problema a resolver, hipótesis, objetivos, resultados, conclusiones, los aportes, contribución a la ciencia y solución a un problema social y recomendaciones.
- Grado de convicción y sustento bibliográfico utilizados para las respuestas a las interrogantes del Jurado y público asistente.
- Dicción y dominio de escenario.

Así mismo, el Jurado planteó a la tesis **las observaciones** siguientes:

.....

Obteniendo en consecuencia el Doctorando la Nota de diecinueve (19)

Equivalente a Excelente, por lo que se declara Aprobado
 (Aprobado ó desaprobado)

Los miembros del Jurado firman la presente **ACTA** en señal de conformidad, en Huánuco, siendo las 21:19 horas del 25 de noviembre de 2021.

.....
 PRESIDENTE
 DNI N° 07020628

.....
 SECRETARIO
 DNI N° 22459224

.....
 VOCAL
 DNI N° 35974627

.....
 VOCAL
 DNI N° 21732324

.....
 VOCAL
 DNI N° 22493412

Leyenda:

19 a 20: Excelente
 17 a 18: Muy Bueno
 14 a 16: Bueno

(Resolución N° 03130-2021-UNHEVAL/EPG-D)



UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILIO VALDIZÁN

ESCUELA DE POSGRADO



CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD

El que suscribe:

Dr. Amancio Ricardo Rojas Cotrina

HACE CONSTAR:

Que, la tesis titulada: **“LA TÉCNICA ESTADÍSTICA DE LA METODOLOGÍA SEIS - SIGMA EN LA MICROPROPAGACIÓN DE ROSAS (ROSA SP) IN VITRO EN HUÁNUCO”**, realizado por el Doctorando en Gestión Empresarial **Julio César DIAZ ZEGARRA**, cuenta con un **índice de similitud del 18%**, verificable en el Reporte de Originalidad del software **Turnitin**. Luego del análisis se concluye que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio; por lo expuesto, la Tesis cumple con todas las normas para el uso de citas y referencias, además de presentar un índice de similitud menor al 20% establecido en el Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Nacional Hermilio Valdizán.

Cayhuayna, 22 de noviembre de 2021.



Dr. Amancio Ricardo Rojas Cotrina
DIRECTOR DE LA ESCUELA DE POSGRADO

AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN DE TESIS ELECTRÓNICA DE POSGRADO

1. IDENTIFICACIÓN PERSONAL

Apellidos y Nombres: DIÁZ ZEGARRA JULIO CESAR

DNI: 08201754

Correo electrónico: scdiaz33@unheval.edu.pe

Teléfono de casa:

Celular: 973204181 Oficina:

2. IDENTIFICACIÓN DE LA TESIS

POSGRADO
Doctorado: <u>GESTIÓN EMPRESARIAL</u>
Mención:

Grado Académico obtenido:

DOCTOR EN GESTIÓN EMPRESARIAL

Título de la tesis:

La técnica estadística de la metodología Seis-Sigma en la micropropagación de rosas (Rosa sp) in vitro en Huancayo

Tipo de acceso que autoriza el autor:

Marcar "X"	Categoría de acceso	Descripción de acceso
<input type="checkbox"/>	PÚBLICO	Es público y accesible el documento a texto completo por cualquier tipo de usuario que consulta el repositorio.
<input checked="" type="checkbox"/>	RESTRINGIDO	Solo permite el acceso al registro del metadato con información básica, mas no al texto completo.

Al elegir la opción "Público" a través de la presente autorizo de manera gratuita al Repositorio Institucional – UNHEVAL, a publicar la versión electrónica de esta tesis en el Portal Web repositorio.unheval.edu.pe, por un plazo indefinido, consintiendo que dicha autorización cualquier tercero podrá acceder a dichas páginas de manera gratuita, pudiendo revisarla, imprimirla o grabarla, siempre y cuando se respete la autoría y sea citada correctamente.

En caso haya marcado la opción "Restringido", por favor detallar las razones por las que se eligió este tipo de acceso:

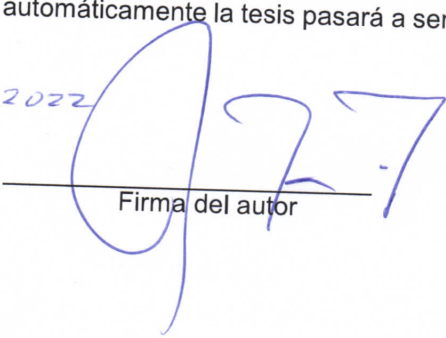
Gestionar ante Indecopi la patente del biorreactor

Asimismo, pedimos indicar el periodo de tiempo en que la tesis tendría el tipo de acceso restringido:

1 año () 2 años () 3 años () 4 años

Luego del periodo señalado por usted(es), automáticamente la tesis pasará a ser de acceso público.

Fecha de firma: Huancayo, 19 enero 2022


 Firma del autor