

Modelos Lineales Generalizados: aplicación del modelo Log-lineal de Poisson, en un diseño experimental con nudos de *Rubus idaeus* L. "frambuesa"

Generalized Linear Models: Application of Log-linear Poisson model, in an experimental design with knots of *Rubus idaeus* L. "raspberry"

Generalizada de modelos lineares: aplicação do modelo de Poisson Log-lineal, em um delineamento experimental com nodos de *Rubus idaeus* L. "framboesa".

Elmis García Zare¹, Jeanette Gonzáles Castro², Eloy López Medina³

Resumen

Se realizó un estudio experimental controlado, a nivel de laboratorio, en la que se buscaba evaluar el efecto de la aplicación de bencilaminopurina (BAP) a diferentes concentraciones (0ppm, 1ppm, 3ppm y 5ppm) en nudos de frambuesa (*Rubus idaeus* L.). Las variables medidas fueron: *número de brotes* y *longitud de brote mayor*. Las respuestas en la variable *número de brote mayor*, se analizaron teniendo en cuenta un Modelo Lineal Generalizado (MLG), específicamente el modelo *Log-lineal de Poisson* (dada la naturaleza discreta de la variable); encontrándose que no existen diferencias estadísticamente significativas, aun así, en la concentración de 1ppm se observa mayor respuesta en esta variable. Las respuestas en la variable *longitud de brote mayor*, se analizaron con el método ANOVA, encontrándose diferencias estadísticamente significativas, consecuentemente el test de Tukey demostró que la concentración de 1ppm da mejores resultados.

Palabras claves: *Rubus idaeus* L., anova, modelo lineal generalizado.

Abstract

A controlled, laboratory-scale, which is sought to evaluate the effect of application of benzylaminopurine (BAP) at different concentrations (0 ppm, 1 ppm, 3 ppm and 5 ppm) in experimental study knots raspberry (*Rubus idaeus* L.) is performed. The variables measured were: *the number of outbreaks* and *the length of the largest outbreak*. The responses in the variable *the number of outbreaks*, were analyzed considering a Generalized Linear Model (GLM), specifically the *Log-linear Poisson* model (given the discrete nature of the variable), finding that there were no statistically significant differences, even Thus, higher concentration of 1 ppm is observed in the response variable. Responses in the variable *length of the largest outbreak*, were analyzed using ANOVA, with statistically significant differences, Tukey's test result showed that the concentration of 1ppm gives better results.

Keywords: *Rubus idaeus* L., anova, generalized linear model.

Resumo

Um estudo experimental controlado, laboratório, que foi avaliar o efeito da aplicação de benzylaminopurine (BAP) em diferentes concentrações (0ppm, 1 ppm, 3 ppm e 5 ppm) em knots de framboesa (*Rubus idaeus* L.). Variáveis medidas foram: número de focos e maior comprimento de atirar. O número variável de respostas de grande surto, foram analisados tendo em conta um modelo linear generalizado (GLM), especificamente o modelo *Log-lineal de Poisson* (dada a natureza discreta da variável); achando que não existem diferenças estatisticamente significativas, mesmo assim, na concentração de 1 ppm é observada uma resposta mais elevada nessa variável. Respostas do comprimento variável maior surto, foram analisados usando o método ANOVA, encontrar diferenças estatisticamente significativas, consecuentemente, o teste de Tukey mostrou que a concentração de 1 ppm produz melhores resultados.

Palavras-chave: *Rubus idaeus* L., anova, generalizada modelo linear

¹ Universidad Nacional de Trujillo, egarciazare@gmail.com

² International Statistical Institute.

³ Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Ciencias Biológicas -

Introducción

Rubus idaeus L. “frambuesa” es uno de los frutos de clima templado de mayor precio unitario en el mercado como producto fresco, y de interés para la agroindustria; pertenece a la familia de las Rosáceas, género *Rubus*; es un arbusto que forma parte del grupo de los berries o frutales menores y está compuesta por agua, calorías, proteínas, hidratos de carbono, fibra, potasio, sodio, fósforo, calcio, magnesio, hierro, zinc y sus diversas vitaminas (Manero & Cillóniz, 2014).

Recientemente, se han identificado propiedades medicinales, por ejemplo, evita enfermedades degenerativas, como el cáncer, además su alto contenido en vitamina A lo convierte en el alimento ideal para conservar la vista en buen estado e incrementa la agudeza visual, también es aconsejado este alimento en las dietas saludables, dado su riqueza en vitaminas, minerales y antioxidantes, por su elevada proporción de agua, sus bajas calorías y su riqueza en potasio y fibra (Botanical-online SL, 2012). Todas estas propiedades han influido en su demanda en el mercado, principalmente europeo; siendo los mayores exportadores, España, EE.UU., Chile y Canadá, que aportan entre los cuatro el 76% de las exportaciones (Ciravegna et al., 2004).

La expresión cultivo in vitro de plantas, significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes, enfermedades, etc.), y el control de los factores como *fitohormonas* y los *micro y macro nutrientes* que afectan el crecimiento (Abdelnour & Vincent, 1994).

La propagación de plantas frutales mediante cultivo in vitro, hoy en día, es muy utilizada, así por ejemplo, en Costa Rica se hizo un estudio para el establecimiento in vitro y pruebas preliminares de micropropagación en medio semisólido y líquido de frambuesa con miras a competitividad internacional (Castro & Mora, 2007).

La micropropagación es el conjunto de técnicas y métodos de cultivo de tejidos utilizados para multiplicar plantas asexualmente en forma rápida, eficiente y en grandes cantidades, se utiliza para multiplicar o propagar plantas nuevas, tales como aquéllas creadas por ingeniería genética, mutagénesis o mejoramiento genético, así como también para obtener plantas libres de enfermedades (tales como virosis) u obtener grandes cantidades de plantas que no se propagan eficientemente. (Abdelnour & Vincent, 1994).

Los micronutrientes y macronutrientes, son un conjunto de soluciones nutritivas que contiene los nutrientes necesarios para el desarrollo de la planta, su composición conforma el denominado *medio de cultivo M&S* (Murashige & Skoog, 1962). Esta sustancia es suplementada con fitohormonas, motivo de diversas investigaciones en cultivo in vitro.

Las fitohormonas o también llamadas hormonas vegetales son sustancias químicas producidas por algunas células vegetales en sitios estratégicos de la planta y estas hormonas vegetales son capaces de regular de manera predominante los fenómenos fisiológicos de las plantas, es decir, controlan un gran número de sucesos, entre ellos el crecimiento de las plantas, la caída de las hojas, la floración, la formación del fruto y la germinación, es decir una fitohormona interviene en varios procesos, y del mismo modo todo proceso está regulado por la acción de varias fitohormonas. (Abdelnour & Vincent, 1994; Gutiérrez, 2003).

Una de las fitohormonas frecuentemente utilizadas es la bencilaminopurina (BAP), por dar favorables resultados en la búsqueda de mejores respuestas de

rendimiento en diversas características de una planta en estudio, así, Vélchez en el 2009 utilizó 6-BAP para la multiplicación in vitro de ocumo criollo, obteniéndose buenos resultados en la inducción de brotes; Cárdenas, en el 2010, usó BAP en el desarrollo de yemas en injertos de cacao para lograr la renovación de cultivos de cacao y por ende mejorar su rendimiento en Colombia; en Guatemala, García, en el 2004 realizó una tesis donde muestra la importancia de la aplicación de BAP (entre otras fitohormonas) para la micropropagación de mora; por otro lado, Jones y Flores, investigadores chilenos, en el 2007, hicieron pruebas con BAP y AG3 (ácido giberílico) y ácido ascórbico, cuyo objetivo fue evaluar la micropropagación de frambuesa pero además, dando especial interés a los métodos de desinfección para reducir la mortandad de unidades experimentales que demanda el experimento.

En Perú, se está impulsando la producción de frambuesas, con el objetivo de desarrollar un fruto con alta calidad genética en zonas andinas para generar riqueza en las localidades de exclusión social de nuestro país. Sin embargo las plántulas in vitro de este fruto, son provenientes de Chile (Manero & Cillóniz, 2011). Chico (2007), realizó estudios de regeneración de plántulas de fresa haciendo uso de BAP.

El uso de BAP en investigaciones peruanas ha tenido muchas aplicaciones, como en Influencia de Bencilaminopurina (BAP) en la proliferación de yemas axilares in vitro de *Ananas comosus* L. Merr. “piña” (S. López, 1998); se investigó con BAP, la regeneración de *Solanum pimpinellifolium* “tomate pasa” y en el desarrollo in vitro de *Encyclia microtos* (Rchb.F.) “orquídeas” (Chico, 2007).

El objetivo de la investigación es determinar el nivel de bencilaminopurina que tiene mayor efecto en el establecimiento in vitro a partir de nudos de *Rubus idaeus* L. frambuesa), cuyas variables fueron: *número de brotes* y *longitud de brote mayor (cm)*, dado que la mayor respuesta en estas variables (así como en otras variables), permite un mejor aprovechamiento de la luz y por lo tanto tiene mayor eficiencia fotosintética (Pérez, 1998).

Material y métodos

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiología y Cultivo de Tejidos Vegetales de la Escuela de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo.

El diseño experimental es unifactorial, que representa a diferentes concentraciones en partes por millón (ppm) de BAP, los niveles del tratamiento son 0ppm, 1ppm, 3ppm y 5ppm. La población está constituida por explantos de nudos de frambuesa de la localidad de Huanchaco, Trujillo; la muestra original constituye 68 explantos (unidades experimentales), es decir, de 17 repeticiones por cada uno de los cuatro niveles de tratamiento experimental, sin embargo en el transcurso del experimento, solo se cuenta con 57 unidades experimentales, debido a la muerte temprana por contaminación u oxidación de dichos explantos (Jones & Flores, 2007). Las variables respuesta son *número de brotes* y *longitud de brote mayor* (en cm).

El análisis de las variables respuesta se hicieron por separado con un método distinto en cada una; para el *número de brotes* (variable discreta), se utilizó el Modelo Lineal Generalizado (MLG): Log.lineal de Poisson; mientras que para la variable *longitud de brote mayor*, se usó el modelo lineal general. Los cálculos respectivos se hicieron en el software estadístico R, usando la librería MASS (Venables & Ripley, 2002).

La hipótesis estadística a contrastar es:

$$H_0 : \tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \tau_4 = 0$$

H_1 : al menos un τ_i produce efecto diferente

Métodos estadísticos usados para la variable “número de brotes”.

Modelo Log-lineal de Poisson: $\ln(\mu_i) = \sum_{j=1}^p \beta_j x_{ij} \quad ; \quad i = 1, 2, \dots, N$

Donde: $\ln(\mu_i)$ es la función de enlace canónica, $E(Y)=\mu$ es la esperanza matemática de Y que es una variable aleatoria que representa datos del tipo conteo y sigue una distribución de Poisson.

Ajuste del modelo:

$$Pseudo R^2 = \left(\frac{\text{devianza.modelo.nulo} - \text{devianza.modelo.residual}}{\text{devianza.modelo.nulo}} \right) \times 100$$

Donde: modelo nulo es $\exp(\beta_0)$ y

modelo residual es modelo log-lineal de Poisson

Devianza:

$$D = -2 \sum_{i=1}^{m_i} \left[y_i \ln \left(\frac{m_i}{y_i} \right) + (y_i - m_i) \right] \quad \text{Donde: } m_i, \text{ es el valor estimado}$$

y_i es el valor observado.

Tabla de Análisis de Devianza:

	Grados de libertad	Devianza	Devianza Media
Modelo Nulo	$k - 1$	$D(\mu(\hat{\beta}); \hat{\mu}_{nulo})$	$\frac{D(\mu(\hat{\beta}); \hat{\mu}_{nulo})}{k - 1}$
Modelo Residual	$N - k$	$D(y; \mu(\hat{\beta}))$	$\frac{D(y; \mu(\hat{\beta}))}{N - k}$
Total Corregido	$N - 1$	$D(y; \hat{\mu}_{nulo})$	

Métodos estadísticos usados para la variable “longitud de brote mayor”.

Modelo Lineal General:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad \begin{cases} i = 1, 2, \dots, k \\ j = 1, 2, \dots, n \end{cases}$$

Donde: Y_{ij} : es la ij-esima respuesta, con el i-esimo tratamiento en la ij-esima repeticion.

μ : media global de tratamientos.

τ_i : efecto del i-esimo tratamiento.

ε_{ij} : componente aleatoria del error.

Análisis de Varianza:

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad
Tratamientos	$SS_{Tratamiento} = \sum_{i=1}^k \frac{y_{i.}^2}{n_i} - \frac{y_{..}^2}{N}$	$k - 1$
Residual	$SS_{Error} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_{i.})^2$	$N - k$
Total corregido por la media	$SST = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} y_{ij}^2 - \frac{y_{..}^2}{N}$	$N - 1$

Estadístico de prueba:

$$F_0 = \frac{SS_{Tratamiento} / (k - 1)}{SS_{Error} / (N - k)} = \frac{MS_{Tratamiento}}{MS_{Error}} \sim F_{(k-1, N-k)}$$

Si se cumple que $F_0 > F_{\alpha, (k-1), (N-k)}$, entonces se rechaza H_0 .

Para la validación del modelo se tuvieron en cuenta la comprobación de los principales supuestos estadísticos.

Resultados

Tabla 1. Estadísticos descriptivos para las variables Número de brotes y Longitud de brote mayor.

	0ppm	1ppm	3ppm	5ppm
Variable: Número de brotes				
Media	6.75	6.941	6.625	5.688
Desviación Estándar	1.28	1.144	1.088	1.493
Número de datos	8	17	16	16
Variable: Longitud de brote mayor				
Media	2.13	2.56	1.9	1.96
Desviación Estándar	0.175	0.227	0.178	0.136
Número de datos	8	17	16	16

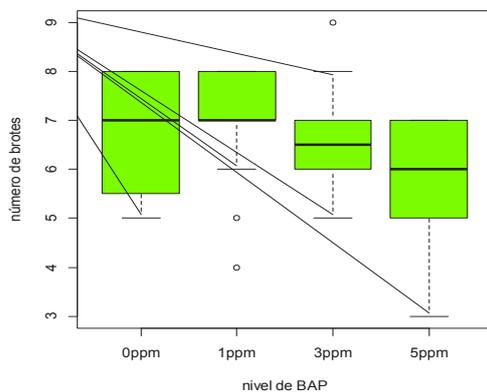


Figura 1. Número de brotes según niveles de bencilaminopurina (BAP).

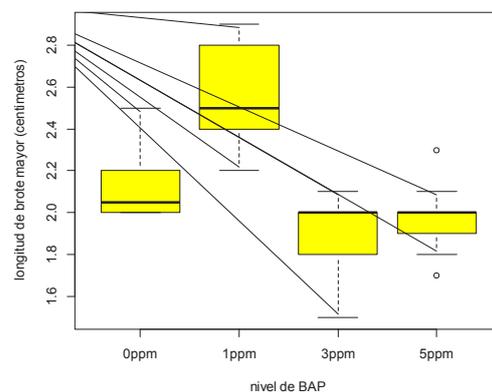


Figura 2. Longitud de brote mayor según niveles de bencilaminopurina

Tabla 1. Análisis de Devianza para la variable *número de brotes*.

	Grados de libertad	Devianza	Devianza Media
Modelo Nulo	3	16.532	5.511
Modelo Residual	53	14.229	0.268
Total Corregido	56		

Pseudo R²: 0.139 (bondad de ajuste); p-valor = 0.511

Tabla 2. Análisis de Varianza para la variable respuesta *longitud de brote mayor*.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medios	Valor F	Valor P
Tratamientos	4.418	3	1.473	43.599	0.000
Residual	1.790	53	0.034		
Total corregido por la media	6.208	56			

R²: 0.712 (bondad de ajuste)

Tabla 3. Prueba Post-Anova (Test de Tukey).

Tratamiento	Diferencias de medias	Intervalo inferior	Intervalo superior	Significancia
1ppm-0ppm	0.434	0.225	0.643	0.000 **
3ppm-0ppm	-0.226	-0.437	-0.015	0.031
5ppm-0ppm	-0.163	-0.374	0.049	0.186
3ppm-1ppm	-0.660	-0.830	-0.490	0.000 **
5ppm-1ppm	-0.596	-0.766	-0.427	0.000 **
5ppm-3ppm	0.064	-0.109	0.236	0.761

Tabla 4. Prueba de Normalidad de los residuos del modelo propuesto para la variable *longitud de brote mayor*.

Supuestos / Test	Estadístico	p. valor
Normalidad de errores		
Test Shapiro-Wilks	0.9735	0.2426
Homogeneidad de Varianzas		
Test Bartlett	3.7875	0.2853

Discusión

En términos generales, el nivel de 1ppm de BAP da mayor efecto en el establecimiento in vitro de frambuesa, lo cual se observa en las variables número de brotes y longitud de brote mayor. Con relación al número de brotes, hubo presencia de 7 y 8 brotes concentrados en el 75% (Figura 1) de los datos correspondientes al efecto de 1ppm de BAP, mostrando cierta uniformidad en la generación de brotes, sin embargo se observa casos atípicos de explantos con generación de 4 y 5 brotes, lo que hace que su número medio de brotes se equipare con los demás niveles de tratamientos, incluido el tratamiento testigo. Respecto a la variable longitud de brote mayor, se aprecia que el tratamiento con 1ppm de BAP presenta mayores longitudes con respecto a los otros tratamientos, ello debido a que dicha concentración de fitohormona estimula la división celular de manera óptima para este experimento (Figura 2).

Jones & Flores (2007), indicaron que en un medio de cultivo M&S con 1.5ppm de BAP permite un buen desarrollo de yemas axilares de frambuesa, sin embargo aclaran

que se han usado otras sustancias adicionales: 1ppm de ácido giberélico y 100ppm de ácido ascórbico; el primero, como fitohormona estimulante del rápido crecimiento celular, complementando la actividad del BAP; el segundo, evitando la oxidación de los explantos, y con ello, la muerte del tejido. Esto explicaría el por qué en los tratamientos de 3ppm y 5ppm de BAP, presentan bajas respuestas tanto en el número de brotes como en la longitud de brote mayor, respondiendo además, la elevada tasa de pérdida de explantos en el tratamiento testigo y en menor cantidad para los tratamientos de 3ppm y 5ppm de BAP.

El análisis estadístico de la variable número de brotes, se hace mediante el Análisis de la Devianza, que es una generalización del ANOVA para los modelos lineales generalizados que permiten utilizar distribuciones no normales de los errores (binomial, Poisson, gamma, etc) y varianzas no constantes; dicha variable no cumple con el supuesto de normalidad, dado que sigue una distribución de Poisson.

En la Tabla 1 los resultados del análisis de devianza, reportan que no existen diferencias estadísticamente significativas en ningún par de niveles de tratamientos de BAP (p-valor: 0.5119), esto se analiza gráficamente en la Figura 3, además se observa que el ajuste del modelo utilizado es del 13,9%, lo cual es un valor común en investigaciones experimentales; sin embargo tiene validez para encontrar diferencias significativas entre tratamientos (Kraenau, 2013).

Para el análisis estadístico de la variable longitud de brote mayor, se realiza un ANOVA, mostrado en la Tabla 2, comprobándose el supuesto de normalidad de errores y la homogeneidad de varianzas mostrado en la Tabla 4, el ajuste del modelo es de 71,2%, lo cual se considera aceptable; luego, el ANOVA muestra que existen diferencias altamente significativas de la longitud de brote mayor obtenido con los cuatro niveles de BAP, existiendo por tanto al menos uno de los niveles que es mejor que los demás, para lo cual la prueba de Tukey (Tabla 3.) determina que el tratamiento con nivel 1ppm de BAP presenta diferencias altamente significativas con los demás tratamientos, por lo que se tiene que el nivel de 1ppm es altamente significativa respecto a los niveles 0ppm, 3ppm y 5ppm; siendo entonces el nivel de 1ppm el mejor tratamiento que produce las mayores longitudes de brote mayor.

Conclusiones

En la variable respuesta número de brotes, el efecto de la bencilaminopurina no existe diferencias estadísticamente significativas en el número de brotes promedio obtenidos con los tratamientos 0ppm, 1ppm, 3ppm y 5ppm de BAP, sin embargo, se resalta que a una concentración de 1ppm de esta fitohormona, el 75% de las respuestas están entre 7 y 8 brotes por planta, siendo el mayor número comparado con las respuestas de los demás niveles.

En la variable respuesta longitud de brote mayor, el efecto de la bencilaminopurina es adecuado al aplicarse a una concentración de 1ppm.

La bencilaminopurina a una concentración de 1ppm suplementada al medio de cultivo, permite mayor efecto en el establecimiento in vitro de frambuesa.

Referencias bibliográficas

Abdelnour, A. & Vincent, J. (1994). *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales*. Costa Rica: Cidia.

- Botanical-online SL. (2012). Propiedades alimentarias de la frambuesa. Recuperado de <http://www.botanical-online.com/propiedadesframbuesas.htm>
- Cárdenas, J., Álvarez, J., Barragán, E. & Rivera, C. (2010). Effect of gibberellic acid and 6-bencilaminopurine on bud development of cacao grafts (*Theobroma cacao* L.). *Agronomía Colombiana* 28(1), 19-27. Recuperado en [http://www.agronomia.unal.edu.co/adjuntos/investigacion/revista/28-1/28\(1\)%20cacao%20FIN.pdf](http://www.agronomia.unal.edu.co/adjuntos/investigacion/revista/28-1/28(1)%20cacao%20FIN.pdf)
- Castro, F., & Mora, D. (2007). Establecimiento in vitro y pruebas preliminares de micropropagación en medio semisólido y líquido de frambuesa (*Rubus idaeus* L.). *Tecnología en Marcha*, 20(3), 46-54.
- Ciravegna, J. (2004). *Frutas Finas*. Universidad Nacional de Cuyo. Argentina.
- Condemarin, C., Chico, J. & Vargas, C. (2007). Efecto del ácido indolbutírico (IBA) y 6-bencilaminopurina (BAP) en el desarrollo in vitro de yemas axilares de encyclia microtos (Rchb.f.) hoehne (orchidaceae). *Lankesteriana*, 7(1-2), 247-254.
- Gutiérrez, M. (2003). *Mejoramiento genético vegetal in vitro*. e-Gnosis: Guadalajara. Recuperado de <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/730/73000104.pdf>
- Julca, M. (2010). *Efecto de la luz y hormona ag3 en el brotamiento de tubérculo-semilla variedad UNICA en condiciones de laboratorio*. Tesis para obtener título. Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Kraenau, E. (2013). Modelos Lineales Generalizados para respuestas discretas utilizando R: Una Introducción R. Lima: Coespe - Región Lima.
- López, S. (1998). *Influencia de Bencilaminopurina (BAP), en la proliferación de yemas axilares in vitro de Ananas comosus L. Merr. "piña"*. IV Jornadas de Investigación en Ciencias Biológicas. Libro de Resúmenes. p. 14.
- Manero, A., & Cillóniz, F. (2011). Recuperado de agraria.pe: <http://agraria.pe>
- Mok, D., & Mok, M. (2001). Cytokinin Metabolism and Action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52. ISSN, 89-118.
- Montgomery, D. (2006). *Diseño y Análisis de Experimentos*. México: Iberoamérica.
- Pérez, J. (1998.). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Cuba. pp. 297-326.
- Ramírez, R. (2012). *La frambuesa peruana: Una oportunidad prometedora*. Universidad de Lima. http://fresno.ulima.edu.pe/sf%5Csf_bdfde.nsf/imagenes
- R Core Team (2013). R: *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Valderrama, S., Chico, J., Tejada, P. & Vega, A. (2008). *Regeneración de plántulas, vía embriogénesis somática, a partir de hojas de fresa, Fragaria virginiana, utilizando ANA y BAP*. *Rebiol*, 28, 2-12.
- Venables, W. & Ripley, B. (2002) *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0
- Vilchez, J., Rivas, Y., Albany, N., Molina, M. & Martínez, L. (2009). Effect of the N6-benzylaminopurine on in vitro multiplication of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott). *Revista de la Facultad de Agronomía*. 26(2), 212-222.