

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
DEPARTAMENTO DE ESTADÍSTICA E INVESTIGACIÓN
OPERATIVA APLICADAS Y CALIDAD

Máster Universitario en Ingeniería de Análisis de Datos, Mejora
de Procesos y Toma de Decisiones



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

**Estudio estadístico del crecimiento de explantos de algas
marinas en cultivos *in-vitro*.**

Trabajo de Fin de Máster

Carlos Eduardo Ulloque Niño

Tutores

Rosa María Alcover Arándiga
Vicente Chirivella González

Tutor Externo

Gloria Batista de Vega

Valencia, septiembre de 2019

RESUMEN

El desarrollo de las técnicas de micropropagación para cultivo in-vitro de macroalgas marinas genera múltiples oportunidades en el área de la biotecnología. Con el objetivo de mejorar las perspectivas económicas del cultivo de algas marinas, se plantea un estudio estadístico que permita analizar el desarrollo de explantos en cultivos *in-vitro*.

En este trabajo de fin de máster se contempla el estudio del efecto que tienen los medios de cultivo y el uso de biorregulador durante el cultivo in-vitro de algas marinas. Esta investigación incluye el desarrollo de la masa, la tasa de crecimiento y la supervivencia de explantos. Además, se propone una técnica para discriminar fácilmente entre especies de algas sin necesitar mayor conocimiento del tema.

Este trabajo plantea un diseño de experimentos realizado en el laboratorio de algas marinas en Rodman, Panamá. Para ello, se considerará el cultivo de tres especies de algas rojas, *Gracilaria blodgettii*, *Kappaphycus alvarezii* chocolate y *Kappaphycus alvarezii* verde. Estas especies, además de su importancia comercial, son utilizadas por la población local del Caribe panameño, especialmente las comunidades afroantillanas y grupos étnicos, que las utilizan para alimentación y medicina.

Palabras clave:

ANOVA, regresión, análisis discriminante, análisis logístico, Algas marinas, micropropagación celular, cultivo in-vitro, cultivo in-situ, carragena, agar-agar.

SUMMARY

The development of micropropagation techniques for in vitro culture of marine macroalgae generates multiple opportunities in the area of biotechnology. With the objective of improving the economic perspectives of seaweed culture, a statistical study is proposed to analyze the development of explants in in-vitro cultures.

In this master's thesis, the study of the effect of culture media and the use of bioregulator during in vitro culture of seaweed is contemplated. This research includes the development of mass, growth rate and survival of explants. In addition, a technique is proposed to easily discriminate between species of algae without needing greater knowledge of the subject.

This work proposes a design of experiments carried out in the seaweed laboratory in Rodman, Panama. For this, the cultivation of three species of red algae, *Gracilaria blodgettii*, *Kappaphycus alvarezii* chocolate and *Kappaphycus alvarezii* green, will be considered. These species, in addition to their commercial importance, are used by the local population of the Panamanian Caribbean, especially Afro-African communities and ethnic groups, who use them for food and medicine.

Keywords:

ANOVA, regression, discriminant analysis, logistic analysis, seaweed, cell micropropagation, in-vitro culture, in-situ culture, carragena, agar-agar.

RESUM

El desenvolupament de les tècniques de micropropagació per a cultiu *in-vitro* de macroalgues marines genera múltiples oportunitats en l'àrea de la biotecnologia. Amb l'objectiu de millorar les perspectives econòmiques del cultiu d'algues marines, es planteja un estudi estadístic que permeta analitzar el desenvolupament de "explantos" en cultius *in-vitro*.

En aquest treball de fi de màster es contempla l'estudi de l'efecte que tenen els mitjans de cultiu i l'ús de biorregulador durant el cultiu *in-vitro* d'algues marines. Aquesta investigació inclou el desenvolupament de la massa, la taxa de creixement i la supervivència de "explantos". A més, es proposa una tècnica per a discriminar fàcilment entre espècies d'algues sense necessitar major coneixement del tema.

Aquest treball planteja un disseny d'experiments realitzat en el laboratori d'algues marines en Rodman, Panamà. Per a això, es considerarà el cultiu de tres espècies d'algues roges, *Gracilaria blodgettii*, *Kappaphycus alvarezii* xocolata i *Kappaphycus alvarezii* verd. Aquestes espècies, a més de la seua importància comercial, són utilitzades per la població local del Carib panameny, especialment les comunitats afroantillanes i grups ètnics, que les utilitzen per a alimentació i medicina.

Paraules clau:

ANOVA, regressió, anàlisi discriminant, anàlisi logístic, Algues marines, micropropagació cel·lular, cultiu *in-vitro*, cultiu *in-situ*, carragena, agar-agar.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, a mi Madre Clara Inés y a mis Abuelos Zoraida y Luis Ernesto (QEPD). A mis Tutores Dra. Rosa María Alcover Arándiga y Dr. Vicente Chirivella González, a mi Cotutora Dra. Gloria Batista de Vega.

Agradezco también a aquellas empresas e instituciones que apoyaron esta investigación, Gracilarias de Panamá S.A., Global SLI, Panamá SeaFarms, Laboratory for Fluorescence Dynamics at the Department of Biomedical Engineering, University of California, Irvine y a la Fundación Cardiovascular de Colombia.

A todas las personas que me han apoyado y han hecho que el trabajo se realice con éxito en especial a aquellos que me abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos Dr. José Francisco Vega, Chris Shields, Dr Enrico Gratton, Dra. Alba Patricia Duque Guzmán, Luisa Niño Martínez, Beatriz Niño Martinez, Luisa Fernanda Moncaleano, Jeimy Góndola y Beatriz Loaiza.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma me apoyaron en la realización de este trabajo.

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN Y MOTIVACIÓN	1
1.1. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LAS ALGAS	1
1.2. REPERCUSIÓN EN LAS COMUNIDADES INDÍGENAS	4
1.3. CICLO DE CULTIVO EN GRANJAS DE ALGAS MARINAS	4
2. OBJETIVOS	7
3. MARCO CONTEXTUAL	9
3.1. ESTADO DEL ARTE	9
3.2. TÉCNICAS ESTADÍSTICAS PARA ANÁLISIS DE DATOS	11
3.2.1 ANÁLISIS DE LA VARIANZA	11
3.2.2 REGRESIÓN LINEAL	11
3.2.3 REGRESIÓN LOGÍSTICA	12
3.2.4 ANÁLISIS DISCRIMINANTE	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1. VARIABLES INDICADORAS DE LA CALIDAD DEL ALGA	13
4.2. ESPECIES UTILIZADAS	15
4.2.1 GENERO GRACILARIA	16
4.2.2 GENERO KAPPAPHYCUS	16
4.3. MEDIOS DE CULTIVO	16
4.3.1 AMPEP y AMPEP K+	17
4.3.2 ALG ₂	17
4.4. BIORREGULADORES DE CRECIMIENTO	17
4.5. ESTRUCTURA DEL TRATAMIENTO	18
4.6. REALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO	18
4.6.1 DESINFECCIÓN Y ESTERILIZADO	18
4.6.2 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	19
4.6.3 PREPARACIÓN DEL EXPERIMENTO	19
4.6.4 DESARROLLO DEL EXPERIMENTO	20
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS	22

5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO	23
5.1.1 PARÁMETROS DESCRIPTIVOS	23
5.1.2 DATOS ATÍPICOS DEL DIA 1	25
5.1.3 SUPERVIVENCIA Y EVOLUCIÓN DE LA MASA	26
5.1.4 TASA DE CRECIMIENTO	28
5.2. CLASIFICACIÓN DE LAS ESPECIES	29
5.3. EFECTO SOBRE LA MASA	32
5.3.1 ANÁLISIS DE LA VARIANZA	33
5.3.2 REGRESIÓN MÚLTIPLE	40
5.3.3 ESTUDIO DE EFECTOS SOBRE DISPERSIÓN	46
5.4. ESTUDIO DEL EFECTO SOBRE LA TASA DE CRECIMIENTO	47
5.4.1 REGRESIÓN MÚLTIPLE	48
5.4.2 ESTUDIO DE EFECTOS SOBRE DISPERSIÓN	51
5.5. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA	52
6. CONCLUSIONES	54
7. TRABAJOS FUTUROS	58
8. BIBLIOGRAFIA	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig 1. Producción de algas marinas en poblaciones naturales y Granjas de Cultivo	2
Fig 2. Producción mundial de algas marinas 2015	3
Fig 3. Mapa Geográfico de la República de Panamá	5
Fig 4. Ciclo de producción de Algas	6
Fig 5. Materiales para cultivo in-vitro	13
Fig 6. Medidas de longitud y diámetro en un explanto	14
Fig 7. Medidas de largo y ancho en un explanto	15
Fig 8 Algas Marinas Rojas	15
Fig 9. Explantos en el día 1 del experimento	19
Fig 10. Tubos de ensayo con explantos	20
Fig 11. Explantos en el día 45	21
Fig 12. Caja y bigotes masa (mg)	25
Fig 13. Caja y bigotes Longitud (mg)	26
Fig 14. Caja y bigotes diámetro (mg)	26
Fig 15. Masa promedio de los explantos	27
Fig 16. Graficas de funciones discriminantes	30
Fig 17. Prueba de rangos múltiples factor especie	35
Fig 18. Prueba de rangos múltiples factor medio de cultivo	36
Fig 19. Prueba de rangos múltiples factor día	37
Fig 20. Prueba de rangos múltiples Especie y Medio	38
Fig 21. Prueba de rangos múltiples Medio de cultivo y biorregulador	39
Fig 22. Prueba de rangos múltiples medio de cultivo y día	40
Fig 23. Valores medios esperados de la masa por especie	43
Fig 24. Gráfico de distribución normal de los residuos	44
Fig 25. Autocorrelaciones estimadas para los residuos - FAS	45
Fig 26. Autocorrelaciones parciales estimadas para los residuos – FAP	45
Fig 27. Efectos sobre dispersión - Regresión Múltiple	46
Fig 28. Efectos sobre dispersión - Análisis de varianza	46
Fig 29. Pruebas de rangos múltiples Especie–residuos ²	46

Fig 30. Pruebas de rangos múltiples Biorregulador–residuos ²	47
Fig 31. Gráfico de distribución normal de los residuos	49
Fig 32. Autocorrelaciones estimadas para los residuos de la tasa de crecimiento - FAS	50
Fig 33. Autocorrelaciones parciales para los residuos de la tasa de crecimiento - FAP	50
Fig 34. Efectos sobre dispersión en la tasa de crecimiento - Regresión Múltiple	51
Fig 35. Efectos sobre dispersión en la tasa de crecimiento - Análisis de varianza	51
Fig 36. Pruebas de rangos múltiples Especie-Medio–residuos ²	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores y niveles de los tratamientos	18
Tabla 2 Tabla de medias día 1 de longitud, diámetro y masa.....	23
Tabla 3. Parámetros de asimetría y de curtosis	24
Tabla 4 Observaciones del cultivo in-vitro	27
Tabla 5. Tasa promedio de crecimiento diario.....	28
Tabla 6 Funciones discriminantes del análisis discriminante para la variable Especie	29
Tabla 7 Coeficientes de las funciones discriminantes.....	30
Tabla 8 Centroides de los grupos de las funciones discriminante	31
Tabla 9. Coeficientes de la Función de Clasificación para la Especie	31
Tabla 10 Comprobación de la clasificación	31
Tabla 11 ANOVA Multifactorial para la masa (mg)	34
Tabla 12. ANOVA Multifactorial para la masa con factores significativos	34
Tabla 13. Regresión Múltiple con método de selección hacia adelante	42
Tabla 14. ANOVA - Regresión Multivariante	42
Tabla 15. Regresión Múltiple para la tasa de Crecimiento de la masa	48
Tabla 16. ANOVA Regresión múltiple Tasa de Crecimiento.....	48
Tabla 17. Pruebas de Razón de Verosimilitud.....	53
Tabla 18. Modelo estimado de regresión.	53

1. INTRODUCCIÓN Y MOTIVACIÓN

Las algas son uno de los tipos de organismos más diversos que existen, forman parte integral de la ecología, ciencia que estudia las relaciones entre los seres vivos y el ambiente circundante. Por lo general, suelen vivir en un medio acuático, ya sea en agua dulce o agua salada. La mayoría de las algas están emparentadas con las plantas terrestres, pues están provistas de clorofila, una molécula que le da la capacidad de realizar la fotosíntesis. Es este proceso químico, el que permite a las algas nutrirse de forma autótrofa, es decir, solo necesitan una fuente de carbono inorgánica como el dióxido de carbono CO₂ y la luz del sol.

Existen en el mundo diversas especies de algas que son investigadas mediante la ciencia llamada Ficología. Esta ciencia, es la encargada de analizar la morfología, desarrollo, ciclo vital y función que cumplen estos seres vivos dentro del ecosistema. La extensa mayoría de las algas viven en un medio acuático donde se encuentran algunas especies unicelulares y otras multicelulares llamadas macroalgas. Estas macroalgas, fueron los primeros vegetales marinos cultivados por el hombre y han sido parte fundamental del desarrollo de las zonas costeras y del mejoramiento de ingresos y calidad de vida de los habitantes de estas zonas.

Las algas marinas pueden clasificarse en tres grandes grupos: pardas, rojas y verdes. Los botánicos denominan a estos grandes grupos *FEOFÍCEAS*, *RODOFÍCEAS* Y *CLOROFÍCEAS*, respectivamente (McHugh, 2002).

El enfoque de este trabajo estará en algunas especies de algas rojas o *RODOFÍCEAS*, las cuales son un importante grupo de algas marinas que pueden servir de alimento. Sus derivados son ampliamente utilizados como agentes de gelificación, espesantes y estabilizantes en productos alimenticios, formulaciones farmacéuticas, cosméticos y en aplicaciones industriales como la minería (Johnson & Gopakumar, 2011). Como curiosidad, este grupo de algas no siempre son rojas: a veces son de color púrpura, de color rojo parduzco e incluso pueden tener tonalidades verdes, pero a pesar de ello los botánicos las clasifican como *RODOFÍCEAS* (McHugh, 2002).

1.1. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LAS ALGAS

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura en su informe del 2018, registra que en el año 2006 la producción mundial de algas marinas ascendió a 14,7 millones de toneladas, de las cuales 13,5 millones de toneladas provienen de granjas de cultivo, mientras que las cosechadas en la naturaleza o silvestres superó ligeramente los 1,2 millones de toneladas en el mismo año. Nueve años después, en el 2015 como lo evidencia la Fig 1, la producción total se había duplicado a 30,4 millones de toneladas, de las cuales 29,4 millones de toneladas provienen de granjas de cultivo y 1,1 toneladas fueron cosechadas en la naturaleza de forma silvestre (Ferdouse, Holdt, Smith, Murua, & Yang, 2018). Mientras la cantidad de algas

cultivadas de forma silvestre está estancada, la producción en granjas ha sufrido un incremento vertiginoso.

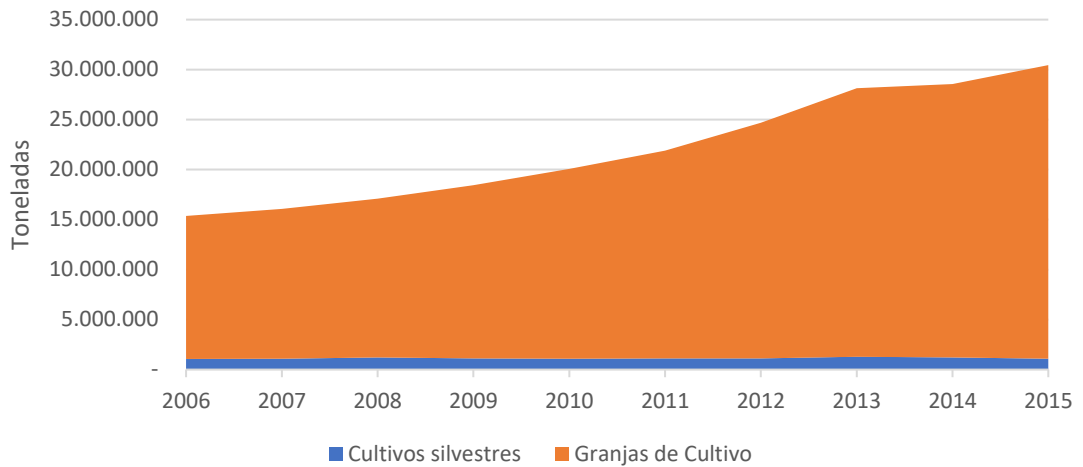


Fig 1. Producción de algas marinas en poblaciones naturales y Granjas de Cultivo
Fuente:(Ferdouse et al., 2018)

La creciente necesidad de consumo de algas marinas hace que la mayoría de la producción provenga de las granjas de cultivo, ya que la demanda de sus derivados supera el suministro de materia prima producida por las producciones naturales o silvestres. Estos cultivos en granjas evitan la sobreexplotación a la que se vería forzadas las poblaciones naturales y facilitan la selección de los rasgos deseados de la producción como el crecimiento y calidad de los hidrocoloides los cuales son sustancias que cuando se disuelven o dispersan en agua producen espesamiento o gelificación. (Reddy, Jha, Fujita, & Ohno, 2009). Con el ánimo de maximizar la producción de las granjas, los cultivadores requieren de investigaciones aplicadas que estudien los efectos de determinados factores climáticos, físicos y químicos de forma que permitan mejorar la calidad y la cantidad de biomasa, así como sus derivados, en periodos de cosechas cada vez más cortos.

Los cultivos comerciales de las algas marinas se originaron en Filipinas en el año 1960, siguiéndole entre otros países, China, Japón, Indonesia, Tanzania, donde también se han realizado cultivos a gran escala (Johnson & Gopakumar, 2011). Como se observa en la Fig 2, en el año 2015 los mayores países productores de algas marinas fueron China e Indonesia con 13,9 millones y 11,2 millones de toneladas respectivamente, seguido por Filipinas con 1,6 millones de toneladas producidas.

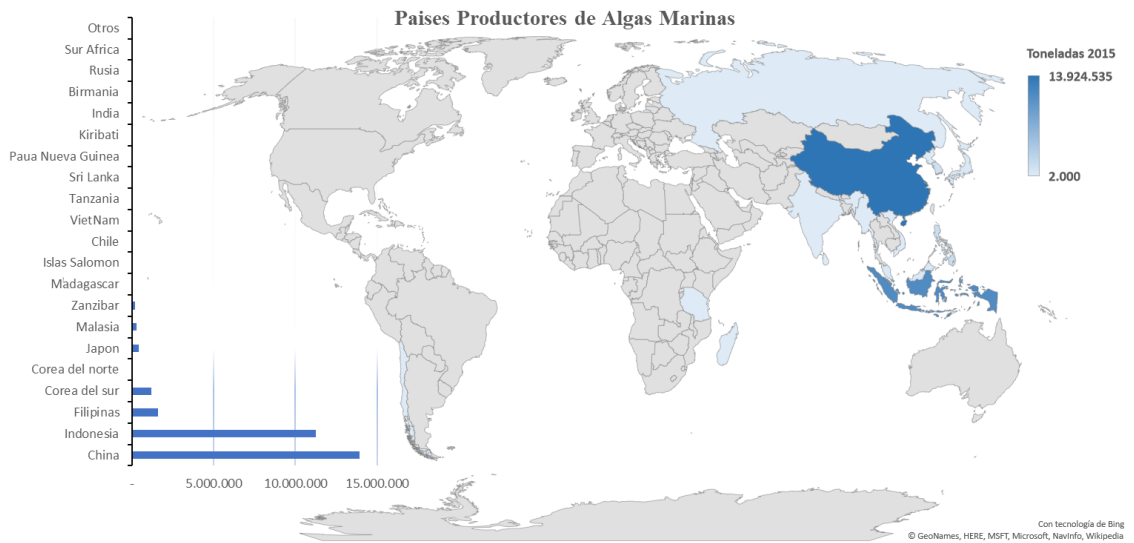


Fig 2. Producción mundial de algas marinas 2015
Fuente:(Ferdouse et al., 2018)

En un contexto más regional, y centrado en el presente trabajo, encontramos a la República de Panamá. Panamá está localizado en el istmo de Panamá al sureste de América Central, limita al norte con el mar Caribe y al sur con el océano Pacífico. Su territorio es interrumpido por la cuenca del Canal de Panamá. Su posición estratégica hace que este país cuente con una alta diversidad de fauna y flora asociadas a los arrecifes de coral en los ecosistemas marinos. Esta biodiversidad se genera por su ubicación privilegiada permitiendo que pueda explotarse el cultivo comercial de algas marinas.

Panamá es un país que se incluye dentro de los cultivadores de algas marinas, donde sus cultivos son desarrollados por ciertos grupos étnicos, comunidades indígenas y cultivadores comerciales. Estos grupos étnicos y comunidades, han establecido granjas en la zona costera del Caribe Panameño. Recientemente, tanto por el gobierno de Panamá como por empresas del sector privado, han iniciado programas innovadores respecto a la producción de algas marinas. Estos programas desarrollan cultivos eco-sostenibles de algas marinas especialmente en el Caribe panameño. Desafortunadamente, no se cuenta con datos de la producción de algas porque la Autoridad de los Recursos Acuático de Panamá - ARAP (Agencia encargada de los proyectos nacionales de pesquerías) no ha incluido la maricultura dentro de las proyecciones estadísticas nacionales.

1.2. REPERCUSIÓN EN LAS COMUNIDADES INDÍGENAS

En el año de 1850, hombres y mujeres Afrocaribeños inmigraron a Panamá, para la construcción del ferrocarril y el Canal interoceánico. Tras su llegada, estos inmigrantes según sus costumbres, introdujeron el uso de las macroalgas en la alimentación. Por otra parte, grupos étnicos panameños han utilizado tradicionalmente las algas marinas. Estos grupos étnicos, tienen un alto conocimiento en el uso de las algas, que por generaciones las han utilizado en tratamientos medicinales, principalmente en dolores localizados, trastornos psicológicos y afecciones de la piel (Smith, 1984).

Los indígenas Gunas y comunidades afroantillanas ubicados en la provincia de Colón, y los indígenas Ngäbes¹ ubicados en la provincia de Bocas del Toro, se han beneficiado del cultivo industrial de las algas marinas (Batista de Vega & Rafael, 2009). Estos colectivos indígenas han adoptado nuevas técnicas de cultivo de algas marinas, que les han permitido ampliar los ingresos, los cuales dependían inicialmente de la elaboración de artesanías. Jóvenes y mujeres de los grupos étnicos y comunidades indígenas participan en proyectos sociales promovidos tanto por el gobierno de Panamá como por empresas privadas. Dentro de estos proyectos, existen algunos relacionados con la creación y con el desarrollo de cultivos de granjas de algas marinas. Una de estas iniciativas relacionada con la promoción de proyectos de algas marinas está liderada por la empresa Gracilaria de Panamá S.A. (GRAPAM), quien ha motivado diversas investigaciones relacionadas con el cultivo eco-sostenible de algas marinas y está vinculada con el desarrollo de esta investigación.

1.3. CICLO DE CULTIVO EN GRANJAS DE ALGAS MARINAS

Las comunidades que trabajan en la producción de algas marinas están ubicadas estratégicamente en el Caribe panameño, específicamente en la línea costera del distrito de Colón en el corregimiento de Cativá Fig 3. En estas zonas, existen hábitats naturales protegidos, se caracterizan por presentar condiciones en cuanto a climatología, parámetros físicos y accesibilidad que hacen de este sistema un nicho ecológico apropiado para el desarrollo de la maricultura. Es en estas zonas que la Autoridad Marítima de Panamá (AMP), institución que se encarga de dar el visto bueno al uso de estas áreas marítimas, definió diferentes polígonos de cultivo en el que se encuentran las granjas de algas marinas.

¹ Ngäbe-Buglé es una comarca indígena de Panamá en la provincia de Bocas del Toro, cuenta con Gobierno Autónomo representado por el/la Cacique General.



Fig 3. Mapa Geográfico de la República de Panamá
Fuente: Bing Maps

Las granjas de algas marinas que se encuentran en estas zonas protegidas se construyen en lagunas con profundidades de 1 a 2 metros. Estas lagunas están expuestas a corrientes constantes y cuyos fondos están formados por suelos arcillosos y semi-fangosos. Entre los parámetros ambientales registrados de estas lagunas, se encuentra una salinidad de entre 30 y 35 psu. También se registra el pH el cual oscila entre 7.0 y 8.5. La temperatura del agua de estas lagunas varía de entre 25 y 28 °C (Batista de Vega, 2009). Los sistemas de plantación de estas granjas consisten en cuerdas de 5 metros de largo las cuales están sujetas a estructuras semifijas sumergidas a aproximadamente 1 metro de profundidad.

Dentro de los polígonos de cultivo existentes en la zona costera de Cativá, están entre otros, el polígono No. 1 y el polígono No. 5 de Gracilarias de Panamá S.A. (GRAPAM), donde se cultiva la especie *Gracilaria blodgettii*. Cerca de estos, se encuentra el polígono No. 11 de la empresa SeaFarms quien promueve la industria del cultivo de algas marinas. En este polígono, se cultivan las variedades chocolate y verde de la especie *Kappaphycus alvarezii*.

En la Fig 4 se representa el ciclo de cultivo de algas marinas. Este ciclo inicia con la siembra y finaliza con la cosecha. En la siembra, los cultivadores atan fragmentos de algas en las cuerdas de la infraestructura. Luego estos fragmentos de alga comienzan un proceso de maduración donde se desarrollarán por 3 o 4 meses hasta llegar a su tamaño adulto. Este tiempo está relacionado a la estación del año en que se realice la siembra, siendo la estación seca en donde menor tiempo requieren (Batista de Vega, 2009). Cuando las algas llegan al final de la maduración, los cultivadores utilizando canoas se desplazan entre las granjas realizando la cosecha de las algas. Finalmente, las algas marinas maduras son retiradas de las cuerdas que las sostienen.

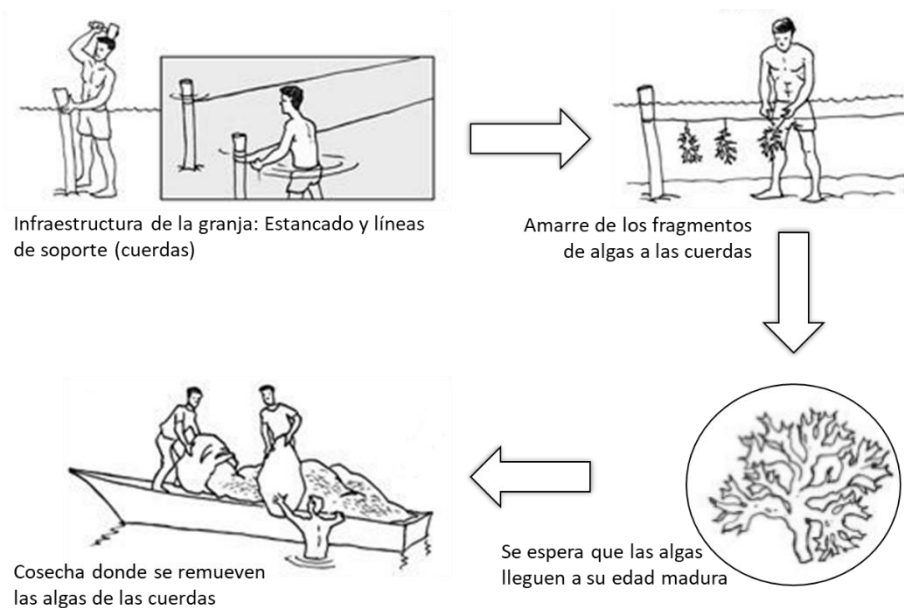


Fig 4. Ciclo de producción de Algas
Fuente (FAO, 2009)

Los fragmentos de algas utilizados durante el proceso de siembra son extraídos de algas madres. Estas algas madres pueden provenir de la producción de otras cosechas, o pueden ser recogidas de manera silvestre. Sin embargo, es posible obtener algas marinas de mejor calidad que generen mayor biomasa, reemplazando los fragmentos de algas marinas por explantos de algas marinas tratados en laboratorios con técnicas de cultivo *in-vitro*. Dentro de estas técnicas o procesos biotecnológicos la más conocida es la micropropagación celular, la cual ha sido utilizada desde los años 60. Esta técnica consiste en la multiplicación de material clonal libre de enfermedades en condiciones de laboratorio (Cañal, Rodríguez, Fernández, Sánchez-Tames, & Majada, 2001), es decir permite obtener plantas mejoradas con el uso de procedimientos asépticos o estériles (Collantes, Melo, & Candia, 1990).

El proceso de cultivo *in-vitro* se inicia con la selección de las algas marinas madres. Como ya se ha comentado, estas algas pueden provenir de cultivos en granjas marinas o pueden ser silvestres. De estas algas se seleccionan algunos fragmentos de sus ramas llamados talos, de los cuales se cortan pequeñas porciones de forma cilíndrica llamados explantos. Estos explantos son tratados bajo condiciones controladas de laboratorio, donde son dispuestos dentro de medios de cultivos y biorreguladores de crecimiento. Este proceso, que toma generalmente 45 días, constituye la primera fase del cultivo. La segunda fase consiste en trasladar los explantos ya tratados a tanques exteriores de agua salada. Esto se realiza con el fin de que los explantos se aclimaten durante algunas semanas. Finalmente, las nuevas pequeñas algas pasan a su fase final o cultivo *in-situ*, donde los cultivadores las reciben para disponerlas en las cuerdas de los sistemas de plantación de las granjas marinas.

2. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo se centra en mejorar las perspectivas económicas del cultivo de algas marinas mediante el planteamiento de un estudio estadístico que permita el desarrollo de explantos en cultivos *in-vitro*.

El objetivo general se descompone en los siguientes objetivos específicos que se detallan a continuación.

- Las ubicaciones donde se encuentran las granjas marinas, cuentan con ciertos parámetros ambientales y propiedades en el agua de mar. Estas propiedades, hacen que las algas marinas adopten particularidades durante su desarrollo incluso el cambio de color. Las algas al cambiar su color pueden inducir a confusiones al identificar visualmente una especie. Estas confusiones causan que compradores no obtengan los derivados requeridos para su negocio. Generalmente los compradores recurren a expertos en taxonomía de algas marinas para tratar de asegurarse que la especie que se quiere comprar es la indicada. Es por este motivo que se quiere buscar nuevos procedimientos que permitan a cualquier persona que carezca de estos conocimientos específicos, identificar fácilmente la especie de un alga marina. Con el fin de que quienes deseen comercializar algas marinas no dependan de la presencia de un experto se plantea:
 - **Sistematizar el procedimiento de identificación de la especie de alga marina de interés comercial mediante mediciones sencillas y baratas de características como lo son la masa, el ancho y el largo de un fragmento de alga.**
- Los fragmentos de algas son utilizados como “semillas” en los cultivos de las granjas marinas. Para mejorar la producción de las cosechas de estos cultivos, se utilizan fragmentos de algas marinas llamados explantos que son cultivados *in-vitro* en laboratorios. Estos cultivos *in-vitro* utilizan medios y biorreguladores de crecimiento con los cuales se prepara a los explantos para que se conviertan en plantas adultas que generen mayor biomasa posible. Con el fin de estudiar el efecto que tienen los tratamientos en los explantos, se plantea estudiar la evolución de la masa o bien la tasa de crecimiento de la masa durante el cultivo *in-vitro*.
 - Se quiere **estudiar el efecto que tiene sobre el promedio y la variabilidad de la masa de los explantos, en diferentes especies de algas marinas, el medio de cultivo y el biorregulador durante el cultivo *in-vitro*, para determinar la importancia y la naturaleza de dicho efecto.**
 - Alternativamente, y de la misma forma, se quiere **estudiar el efecto que tiene sobre la tasa de crecimiento de la masa de los explantos, en diferentes**

especies de algas marinas, el medio de cultivo y el biorregulador durante el cultivo in-vitro.

- Con este análisis, se pretende ***identificar el tratamiento que maximice la producción de biomasa de un explanto al finalizar el cultivo in-vitro, de forma que esté en las mejores condiciones posibles para pasarla a la segunda fase del cultivo.***
 - Por último, se plantea ***comparar el efecto que tiene sobre la masa la formulación de un nuevo medio de cultivo propuesto por GRAPAM, denominado ALG₂, con respecto a los medios AMPEP y AMPEP K⁺.***
- Es de interés buscar tratamientos que permitan, además de una mayor masa, una mayor cantidad de explantos vivos al finalizar el cultivo *in-vitro*. La supervivencia de los explantos es una característica importante para considerar. Es por esto por lo que se desea
 - ***Determinar el efecto que tienen, sobre la probabilidad de supervivencia de los explantos de algas marinas, los tratamientos escogidos de medio de cultivo y biorregulador, con el fin de encontrar los factores que permitan la producción de la mayor cantidad de explantos.***

3. MARCO CONTEXTUAL

El crecimiento de la demanda de los derivados de algas marinas ha dado lugar a la industrialización de sus cultivos, haciendo necesario plantear estrategias que permitan aumentar la productividad de los cultivos sin disminuir la calidad de sus hidrocoloides derivados.

El afán para mejorar la calidad y la cantidad de suministros a escala industrial de materia prima procedente de las algas marinas, impulsa la necesidad de la realización de investigaciones en biología y fisiología reproductiva de especies de importancia comercial. La escala e importancia de esta industria ha requerido de la formulación de nuevos estudios en relación con los entornos donde se practican diversos métodos de cultivo.

Por lo general, las investigaciones sobre métodos de cultivo *in-vitro* de algas marinas, van en aras de analizar el efecto de los tratamientos experimentados en la tasa de crecimiento. Esta tasa de crecimiento es un indicador para expresar el porcentaje diario de aumento de la masa de un alga en un rango de tiempo. No obstante, no se han encontrado referencias en la literatura en cuanto al desarrollo de la masa de las algas como tal, tampoco se han encontrado referencias del efecto que tienen los tratamientos experimentados en cuanto a la supervivencia de los explantos utilizados en los cultivos *in-vitro*.

Para un mejor entendimiento del cultivo *in-vitro*, se definen ciertos conceptos. Iniciamos con el término explanto, el cual es un fragmento vegetal de las algas que no contiene ramas y posee un alto potencial de regeneración. Otra expresión frecuente es el Medio de cultivo, que es una solución con nutrientes disueltos que permite el crecimiento y desarrollo de los explantos. Finalmente, se hace referencia a biorreguladores, que realizan el papel de reguladores de crecimiento, los cuales tienen potencial para afectar la capacidad en los procesos fisiológicos de las algas.

3.1. ESTADO DEL ARTE

En las investigaciones en técnicas de micropropagación, se estudia el efecto que tienen diferentes tratamientos en el crecimiento de las algas, buscando la producción de explantos resistentes y libres de enfermedades para su cultivo comercial en granjas marinas. Dentro de estos efectos encontramos la tasa de crecimiento de la masa, la inducción de callos (masas celulares que presentan diferentes apariencias), aparición de ápices (ramificaciones que se desarrollan en los explantos), resistencia a epífitas (microalgas que crecen sobre otras algas) y cantidad de hidrocoloides producidos.

Estas investigaciones buscan plantear tratamientos que, según el interés, utilizan diferentes tipos de medios de cultivo en combinación con biorreguladores. Dentro de los medios de cultivo más utilizados están: el AMPEP (Acadian Marine Plant Extract Powder), el Von Stosch, el

Guillard & Ryther y, el medio sintético ASP 12-NTA. Estos estudios se han ocupado de las adaptaciones necesarias y la aplicación en técnicas de cultivo *in-vitro* a las algas de importancia comercial. Como resultado, se informó un gran éxito con respecto a la inducción de callos y la regeneración de los talos para una amplia gama de algas marinas utilizando biorreguladores (Polne-Fuller & Gibor, 1987; Reddy et al., 2009).

Los biorreguladores están presentes en las algas marinas. Algunos estudios realizados en Brasil investigan las algas de los órdenes Bangiales, Gelidiales, Gracilariales, y Gigartinales, donde identifica la existencia de biorreguladores como las citoquinas (proteínas), las auxinas (hormonas vegetales), y el ácido abscísico (fitohormona) (Yokoya et al., 2010). Este estudio diferenció la proporción que se encuentran de estos biorreguladores en cada una de las especies estudiadas. La adición de biorreguladores en los cultivos *in-vitro* son útiles para mejorar el desarrollo y crecimiento de las algas, por ejemplo, al usar un biorregulador como la colchicina, se permite la inducción de callos en los explantos de algas marinas. El informe de (Hayashi, Yokoya, Kikuchi, & Oliveira, 2009), utilizó la colchicina y los fitoreguladores ácido indol-3-acético (IAA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y bencilaminopurina (BA), junto con medios de cultivo inorgánicos como el Von Stosch, el Guillard & Rytthe y el medio sintético ASP 12-NTA. Los autores afirmaron que IAA y BA estimularon el proceso de regeneración, además, la colchicina produjo explantos con un alto potencial de regeneración, mejorando así las tasas de éxito para la micropropagación.

Se ha probado la eficacia del medio de cultivo AMPEP en la tasa de crecimiento diario y la disminución en la aparición de epífitas (Hurtado et al., 2012). En esta investigación los autores realizan una comparación entre diferentes concentraciones de AMPEP, donde se demostró, que aquellas algas que fueron sumergidas en AMPEP antes del cultivo *in-vitro*, tuvieron una mayor tasa de crecimiento de aquellas que no fueron sumergidas. Estudios en Filipinas y Brasil demostraron los beneficios del uso de AMPEP en el crecimiento de las algas de la especie *Kappaphycus alvarezii* (Loureiro, Reis, Berrogain, & Critchley, 2012). Los resultados de esta investigación concluyeron que, el AMPEP es útil para aumentar la tasa de crecimiento diario y la mitigación de epífitas, y se propone a este medio de cultivo como una vacuna potencial para estas epífitas. El uso de AMPEP con o sin la adición de biorreguladores es investigada para la inducción de aparición de ápices que promueven un desarrollo más acelerado en los explantos de algas marinas. Se demostró que después de 45 días de incubación, las algas formaron ápices más largos en el menor tiempo, utilizando 3 mg L⁻¹ de AMPEP suplementado con biorregulador (Ali et al., 2017).

El medio de cultivo AMPEP también se ha probado utilizando altas concentraciones de potasio el cual es llamado AMPEP K⁺. Este medio de cultivo se ha probado en diferentes concentraciones con y sin el uso de biorreguladores (Tibubos, Hurtado, & Critchley, 2017). Este estudio indica que después de 45 días de incubación la concentración de 5 mg L⁻¹ de AMPEP K⁺ combinado con biorregulador produjo ápices más largos.

Otros estudios han identificado el efecto que tienen ciertos parámetros ambientales en los hidrocoloides producidos por las algas marinas. Un informe donde se utilizó dos especies de algas del género *Gracilarias* extraídas del mar Mediterráneo, identificó que existe una relación entre la cantidad de agar-agar producido por estas algas con relación al mes de su cosecha, determinando que las algas cosechadas durante la primavera tuvieron una mayor producción de agar-agar en comparación con las otras estaciones (Marinho-Soriano & Bourret, 2003).

Actualmente GRAPAM se encuentra estudiando una mezcla que denominan ALG₂. La composición de esta mezcla aún se mantiene en reserva, sin embargo, se pretende evaluar su capacidad como un potencial medio de cultivo para uso in-vitro en el desarrollo y crecimiento de explantos de algas marinas.

3.2. TÉCNICAS ESTADÍSTICAS PARA ANÁLISIS DE DATOS

El uso de métodos estadísticos implica elaborar un plan detallado de procedimientos que nos conduzcan a reunir datos con un propósito específico. Con este fin, para esta investigación se utiliza un diseño de experimentos, este diseño, permite adecuar la estrategia necesaria para la consecución de los datos. Para analizar los datos se utilizan métodos estadísticos multivariantes a fin de que los resultados y las conclusiones sean objetivas (Montgomery, 2005). Este estudio utiliza el Análisis Discriminante, el Análisis de la Varianza, la regresión lineal y la Regresión Logística, estos métodos y sus aplicaciones se describen a continuación.

3.2.1 ANÁLISIS DE LA VARIANZA

Para estudiar el efecto que tiene sobre la masa de un explanto, la especie, el medio de cultivo, el uso de biorregulador y el tiempo transcurrido del cultivo in-vitro, es importante determinar si cada uno de estos factores, ya sea de forma individual o como interacción con otros factores, influyen en la respuesta, la forma o la naturaleza de la relación. Una técnica importante para analizar el efecto de los factores es realizando un Análisis de la varianza ANOVA (Analysis of Variance). Este análisis, es el núcleo del diseño de experimentos y modelos de regresión, permite el estudio de los efectos de estos factores y sus interacciones sobre una variable respuesta (George E. P. Box, Hunter, & Hunter, 1993). En esta investigación, hay más de un factor presente, puesto que es conveniente considerar si existen entre ellos interacciones que sean significativas, un ANOVA multifactorial es apropiado para estimar tanto los efectos principales como las interacciones entre factores (Montgomery, 2005).

3.2.2 REGRESIÓN LINEAL

Puesto que el uso de la regresión lineal es clave para analizar las posibles relaciones entre la pauta de la variabilidad en una variable aleatoria, y los valores de las demás variables que de la primera pueda depender (Walpole, Myers, Myers, & Ye, 2012), se quiere determinar con detalle

la naturaleza de la relación entre las variables respuesta analizadas (masa y tasa de crecimiento del explanto) y los factores cuantitativos considerados. Según la naturaleza de la relación, lineal, cuadrática o cubica, el óptimo puede encontrarse al final del periodo o en algún instante intermedio, y el modelo de regresión ajustado permitiría obtenerlo.

3.2.3 REGRESIÓN LOGÍSTICA

Es de interés identificar si la especie del alga, el medio de cultivo, el biorregulador y la tasa de crecimiento de los primeros 15 días, afectan la supervivencia a los 45 días de los explantos en el cultivo in-vitro. Un modelo de regresión logística es el indicado para explicar la supervivencia de los explantos, ya que este es de utilidad para las situaciones en que se dispone de una respuesta dicotómica. Se piensa que la supervivencia puede estar influenciada o causada por niveles de alguna o algunas variables independientes. Para este estudio se define la supervivencia como una variable binaria que representa el estado vital del explanto del alga, Esta variable tomará el valor de 1 cuando se determina que el explanto está Vivo, de lo contrario tomará el valor de cero. El propósito del experimento es el de obtener el modelo adecuado que relacionará la probabilidad de supervivencia con el tratamiento, es decir con la especie del alga marina, el medio de cultivo, el uso de biorreguladores de crecimiento y la tasa de crecimiento del día 15. La regresión lineal se basa en la obtención de la probabilidad de que los datos estudiados pertenezcan a un conjunto determinado previamente (Walpole et al., 2012).

3.2.4 ANÁLISIS DISCRIMINANTE

Ciertas condiciones medioambientales en el cultivo de algas marinas pueden afectar su color, esta variación hace que puedan presentarse confusiones al momento de identificar la variedad o incluso la especie del alga. Se quiere comprobar si medidas de características sencillas, como la masa, el diámetro y el largo de un explanto, puede diferenciar la especie del alga marina a la que pertenece sin depender de su color. En este estudio se realizará un análisis factorial discriminante, AFD, que permitirá encontrar las variables explicativas que mejor diferencien las tres especies de este estudio. La utilización de esta técnica puede ser extrapolada a otras especies de algas marinas cultivadas en diferentes partes del mundo, donde sus condiciones medioambientales en el cultivo varían. De esta manera se puede eliminar la dependencia del experto utilizando un procedimiento sistemático, basado en esta técnica. El análisis discriminante tiene la capacidad de tratar múltiples grupos siendo una técnica estadística utilizada cuando la variable dependiente es categórica como lo es la especie del alga (Hair, Anderson, Tatham, & Black, 1999).

Este análisis permite obtener las funciones discriminantes o variables canónicas discriminantes, que permitirán “diferenciar” o “discriminar”, de la mejor manera posible, los individuos (algas) de las tres especies consideradas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

En el laboratorio de algas marinas de Gracilarias de Panamá en Rodman, se han dispuesto espacios dentro de sus instalaciones para el desarrollo del cultivo in-vitro de algas marinas. Este laboratorio cuenta con insumos y dispositivos idóneos Fig 5 para realizar las actividades de este experimento.



Fig 5. Materiales para cultivo in-vitro
Fotos del autor.

En la ilustración Fig 5 encontramos algunos de los materiales que se utilizaron para el desarrollo del cultivo-in-vitro, estos son: A) Autoclave, B) Balanza digital de precisión, C) Tubo de ensayo, D) Gradillas, E) Micropipeta, F) Calibrador digital de precisión y G) Probeta calibrada

4.1. VARIABLES INDICADORAS DE LA CALIDAD DEL ALGA

El explanto es la unidad experimental de esta investigación, puesto que son fragmentos de una ramificación o talo del alga marina. Al preparar los explantos estos deben tener una forma cilíndrica, su contorno debe ser contorno liso y brillante sin protuberancias o formaciones evidentes. A los explantos seleccionados para la investigación se les son medidas la masa (mg), el diámetro (mm) y el largo (mm) Fig 6. Se experimentarán explantos de tres especies de algas, dos de ellas del género *Kappaphycus alvarezii* la primera es de color verde y la segunda es de color chocolate. Una tercera especie es la *Gracilaria blodgettii*.

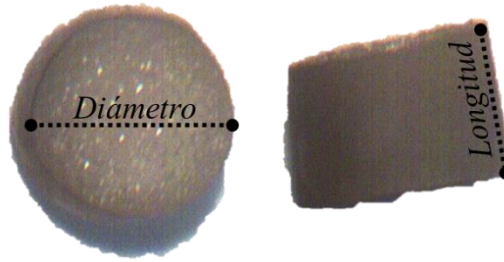


Fig 6. Medidas de longitud y diámetro en un explanto
Foto del autor.

Este trabajo plantea el estudio de la masa la cual es una propiedad intrínseca del explanto y se expresa en miligramos (mg). Donde, la medida más generalizara en los estudios de crecimiento de las algas es la Tasa de Crecimiento y se expresa como el porcentaje de aumento de la masa por día (% día⁻¹) (Hurtado et al., 2012) Para calcular la tasa de crecimiento se utiliza la fórmula propuesta por (Sokal, 1995) donde:

$$TC (\% \text{ día}^{-1}) = \frac{\ln\left(\frac{W_f}{W_i}\right)}{t} * 100$$

Teniendo en cuenta que W_f es la masa en gramos (gr) del día t , W_i es la masa inicial y t es el número de días de cultivo.

Por otra parte y puesto que al iniciar el cultivo *in-vitro* los explantos tienen una forma prácticamente cilíndrica, es posible plantear una función de densidad (ρ) a partir de la relación de la masa (m) sobre el volumen (V), donde el volumen es calculado con base al radio (r) = Diámetro/2 y la Longitud, donde:

$$V = \pi r^2 h, \rho = \frac{m}{V}$$

Desde otro punto de vista, otra variable a considerar durante el cultivo *in-vitro* es la supervivencia de un explanto. Esta variable binaria registra un valor de uno si un explanto está vivo, lo cual es su condición natural el primer día del experimento. Sin embargo, es posible que esta condición cambie en función del tiempo, por lo que cada explanto es inspeccionado en intervalos de 15 días donde se evalúa su textura para considerar su supervivencia. Para percibir la textura, el explanto es retirado del medio de cultivo sujetándolo suavemente con unas pinzas, si su textura se torna viscosa o hueca, se determina que el explanto no sobrevivió al tratamiento y se registra un valor de cero.

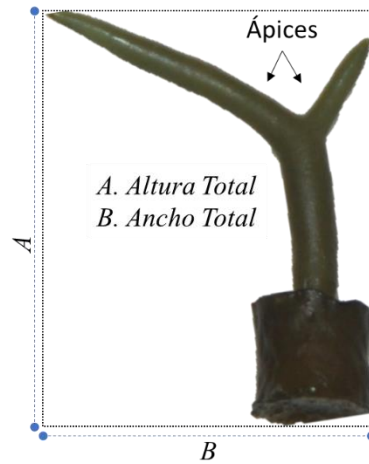


Fig 7. Medidas de largo y ancho en un explanto
Foto del autor.

Como se observa en la Fig 7, los explantos desarrollan algunas ramificaciones llamadas ápices durante el transcurso del cultivo *in-vitro*, el conteo de estos ápices será registrado en unidades en periodos de 15 días. Además, se registrarán las medidas de extremo a extremo de los explantos incluyendo los ápices, estas medidas son Ancho Total Fig 7A y Altura Total Fig 7B. Estas dos medidas se registrarán en milímetros.

4.2. ESPECIES UTILIZADAS

Con una demanda mundial en crecimiento y gran potencial económico, las algas marinas rojas son explotadas debido a la presencia de hidrocoloides (Batista de Vega, 2009) haciendo a estas fuente importante de materias primas. En esta investigación se utilizan tres especies de dos géneros diferentes de algas rojas, el género *Gracilaria* Fig 8A, y el género *Kappaphycus* Fig 8B y Fig 8C. A continuación, se presentan las especies de estas algas marinas y se justifica el motivo de su elección en el trabajo.

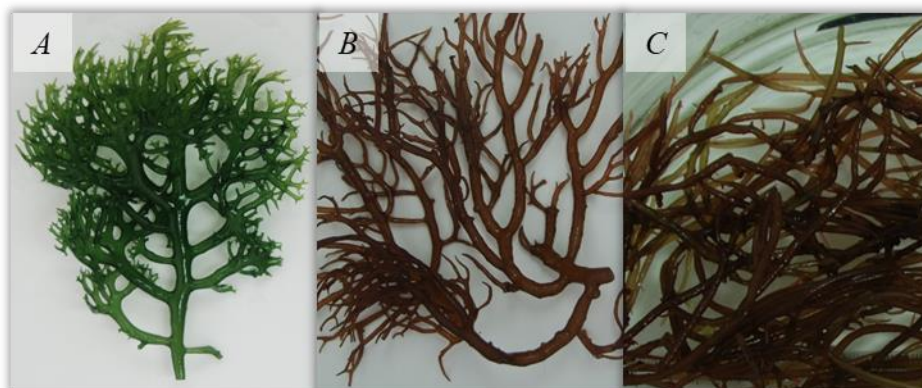


Fig 8 Algas Marinas Rojas

4.2.1 GENERO GRACILARIA

Las especies del género *Gracilaria* son algas productoras de agar-agar llamadas *agarophytas*, estas, pertenece a la división *Rodophyta* de la familia *Gracilariaceae*. Este género se considera la fuente más importante de agar-agar aportando aproximadamente el 53% de la producción mundial. (Marinho-Soriano & Bourret, 2003). Actualmente, Chile y China países donde se cultiva son los mayores productores y exportadores de agar-agar, también lo son Indonesia, Marruecos y Tailandia quienes están aumentando su producción en respuesta al aumento de la demanda mundial. China es el principal país productor de *Gracilaria* con una cosecha reportada en el 2015 de 2.7 millones de toneladas, con un total de 3.9 millones de toneladas producidas a nivel mundial (Ferdouse et al., 2018). El agar-agar es una sustancia gelatinosa, usado en la industria alimentaria como espesante, estabilizante y gelificante. Además, el agar-agar es utilizado en laboratorios como sustrato para cultivos de microorganismos en un medio sólido, siendo esta técnica la utilizada por Robert Koch para descubrir el bacilo de la tuberculosis (Koch, 1882).

De este género la especie *Gracilaria blodgettii* Fig 8C es nativa del Caribe de Panamá, y puesto que representa un papel importante en la economía mundial, es cultivada en las granjas de Gracilarias de Panamá S.A. Es por este motivo que se seleccionó esta especie para el desarrollo del experimento.

4.2.2 GENERO KAPPAPHYCUS

Las especies del género *Kappaphycus* son algas rojas productoras de carragena llamadas *carragenophytas*, siendo estas, las de mayor importancia económica mundial (Ferdouse et al., 2018). La carragena es un polisacárido que es usado como agente de gelificación, espesante y estabilizante, especialmente en productos alimenticios, formulaciones farmacéuticas, cosméticos y aplicaciones industriales como la minería (Johnson & Gopakumar, 2011). Su cultivo comercial se originó en Filipinas desde 1960 y desde entonces países como Japón, Indonesia, Tanzania, entre otros, han estado cultivando esta especie a gran escala (Johnson & Gopakumar, 2011).

La especie *Kappaphycus alvarezii* en su variedad verde Fig 8A y chocolate Fig 8B, son procedentes de la isla Semporna en Malasia. Estas algas fueron llevadas a Panamá para su cultivo con certificado de importación No 339524 del Ministerio de Desarrollo agropecuario (MIDA). La especie *Kappaphycus alvarezii* es una de las utilizadas para la producción de carragena a nivel mundial, es por esto por lo que fue seleccionada para el desarrollo del experimento.

4.3. MEDIOS DE CULTIVO

En el experimento a desarrollar, diferentes medios de cultivo serán utilizados, los cuales son soluciones que contienen múltiples nutrientes. Estas soluciones se combinan con agua de mar estéril, y se utilizan para permitir la supervivencia y el desarrollo de los explantos de algas

marinas durante el cultivo in-vitro. Diferentes Medios de Cultivo fueron seleccionados para ser utilizados en este experimento: AMPEP, AMPEP K⁺ y ALG₂.

4.3.1 AMPEP y AMPEP K⁺

AMPEP es el extracto procedente del alga *Ascophyllum nodosum*, comercializado a nivel mundial para fines de agricultura. Múltiples estudios han evaluado la eficacia de este extracto como fuente de nutrientes y también como regulador de crecimiento para aumentar la producción de la biomasa (Hurtado et al., 2012). Este extracto también es producido en una variación que es enriquecida con altos niveles de potasio, esta variación es llamada AMPEP K⁺. El AMPEP K⁺ se ha estudiado en algas marinas, se ha extrapolado el efecto que tiene el potasio en el desarrollo y crecimiento de las plantas terrestres, el cual estimula un crecimiento vegetativo temprano (Tibubos et al., 2017).

4.3.2 ALG₂

Una nueva fuente de nutrientes es el compuesto que actualmente se denomina como ALG₂. Este medio, es objeto de investigación en GRAPAM, donde se evalúa su capacidad como una nueva fuente de nutrientes. GRAPAM, investiga la combinación óptima de los compuestos de este medio de cultivo, de manera que permita un buen desarrollo y crecimiento de explantos de algas marinas. La composición de este medio aún es mantenida en reserva.

4.4. BIORREGULADORES DE CRECIMIENTO

Los biorreguladores de crecimiento son sustancias ampliamente utilizadas para mejorar el crecimiento de plantas y algas de interés comercial (Neves, Simioni, Bouzon, & Hayashi, 2015). Estos están presentes en las algas marinas, sin embargo, la adición de biorreguladores pueden afectar la capacidad en los procesos fisiológicos de las algas (Neves et al., 2015).

Se utiliza como biorregulador el ácido indolacético (IAA), el cual es una auxina natural que regula diversos procesos del desarrollo vegetal. El IAA es una hormona natural presente en la mayoría de las plantas. Usualmente el IAA es usado junto a otra hormona natural como lo es la Kenitina (K). Esta combinación es llamada IAA+K e induce la división celular, el alargamiento celular y la formación de callos en los explantos (Tibubos et al., 2017). Para complementar el biorregulador de esta investigación, se utiliza la Espermina (SPM), esta es una poliamina sintética que estimula el crecimiento y el desarrollo de la forma de las algas marinas (Batista de Vega, 2009).

Puesto que estos compuestos tienen la capacidad para mejorar y estimular el desarrollo de los explantos, hace que se hayan seleccionado para esta investigación. El IAA+K y la Espermina, se han combinado para su uso como biorregulador, utilizando una concentración de 0.5 µl L⁻¹ de IAA+K y 0.5 µl L⁻¹ de SPM.

4.5. ESTRUCTURA DEL TRATAMIENTO

En este experimento, se trabajan tres factores cualitativos como los son: la especie del alga, el medio de cultivo, y el biorregulador. Además, como factor cuantitativo y como medida de tiempo se utilizó el día. Este factor cuantitativo, permitirá identificar el efecto que tienen los demás factores sobre la masa de los explantos durante el cultivo *in-vitro*, pues, el efecto de los factores cualitativos no es inmediato. Dicho esto, se definieron 4 periodos de tiempo de 15 días cada uno, en cada periodo, se registrará la masa de cada uno de los explantos. La Tabla 1 describe los niveles específicos de cada factor.

Especie (3 niveles)	Día (4 niveles)	Medio de cultivo (3 niveles)	Biorregulador (2 niveles)
<i>Kappaphycus alvarezii</i> chocolate	Día 1	AMPEP	Con Biorregulador
<i>Kappaphycus alvarezii</i> verde	Día 15	AMPEP K ⁺	Sin Biorregulador
<i>Gracilaria blodgettii</i>	Día 30	LG ₂	
	Día 45		

Tabla 1. Factores y niveles de los tratamientos

Cada una de las combinaciones de los niveles de los factores forman un tratamiento, el cual es aplicado a las unidades experimentales. Esta investigación propone como estrategia para la recolección y para el análisis de los datos un diseño experimental completo. Este diseño permitirá estudiar todos los efectos principales y todas las interacciones sin riesgo a ninguna confusión.

4.6. REALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO

Este experimento fue realizado en el Laboratorio de algas marinas de GRAPAM, siguiendo las buenas prácticas, protocolos y recomendaciones de seguridad de esta institución. El proceso del cultivo *in-vitro* inicia con la desinfección y esterilizado de las algas madres, luego, se prepara el experimento incluyendo los medios de cultivo y los explantos, posteriormente se desarrolla el cultivo *in-vitro* de estos explantos durante 45 días. Este paso a paso se describe a continuación.

4.6.1 DESINFECCIÓN Y ESTERILIZADO

Para su uso en el laboratorio, el agua de mar que fue recolectada es filtrada con papel de filtro grado 4 cuyo tamaño de poro esta entre 20-25 μm , posteriormente esta agua pasa por un proceso de esterilización donde utilizando una autoclave Fig 5A que somete esta agua a alta presión, una vez terminado el proceso de autoclave, el agua de mar se expone por 24 horas a luz ultravioleta (UV), manteniéndola a una temperatura ambiente de aproximadamente 25 grados Celsius. Al finalizar el proceso de esterilización, y utilizando un medidor de pH se registra un valor de 7 lo cual indica que esta solución es neutral, de manera similar y con la ayuda de un salinómetro se registra una salinidad del agua de 30 psu.

Las algas madre también pasan por un proceso de desinfección, donde utilizando el agua de mar esterilizada son lavadas con una solución jabonosa que elimina microorganismos y organismos que vienen con ellas del mar. Las algas son enjuagadas para luego disponerlas en tanques con agua de mar estéril, es allí, donde inician un proceso de aclimatación, al tercer día son seleccionados los talos más saludables que se utilizarán en el experimento.

4.6.2 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Dentro del área limpia en el laboratorio, se disponen 3 recipientes estériles para la preparación de los medios de cultivo, cada recipiente tiene una capacidad de 1000 mililitros (ml). Estos recipientes son llenados con agua de mar estéril y con la ayuda de una probeta calibrada Fig 5G, se disuelven en uno de estos recipientes 5 mililitros (ml) de AMPEP, luego en otro recipiente se disuelven 5 mililitros (ml) de AMPEP K⁺, finalmente en el último recipiente se disuelven 2.6 mililitros (ml) de LG₂. Cada uno de estos recipientes son marcados para su correcta identificación. En la misma área se preparan en gradillas Fig 5D 180 tubos de ensayo Fig 5C. Estos tubos de ensayo fueron previamente esterilizados en el autoclave Fig 5A, donde cada uno de estos tubos de ensayo tienen una capacidad máxima de 15 ml. Con la ayuda de jeringas estériles calibradas, 60 tubos de ensayo son llenados con 10 mililitros (ml) del medio de cultivo AMPEP, otros 60 tubos de ensayo son llenados con 10 mililitros (ml) del medio de cultivo AMPEP K⁺ y los últimos 60 tubos de ensayo son llenados con 10 mililitros (ml) del medio de cultivo ALG₂. Cada tubo de ensayo es marcado con una etiqueta que corresponde al medio de cultivo, (A) para AMPEP, (AK) para AMPEPK y (ALG₂) para LG₂.

4.6.3 PREPARACIÓN DEL EXPERIMENTO

Los talos de las algas seleccionados para el experimento Fig 9A *Kappaphycus alvarezii* chocolate, *Kappaphycus Alvarezii* verde y Fig 9C *Gracilaria blodgettii*, son cortados con cuchillas de aluminio estériles. Dado que es complicado cortar con precisión, los valores finales de la longitud oscilan entre 3 y 4 milímetros, cada una de estas fracciones son llamados explantos y se seleccionan al azar 60 de cada especie.

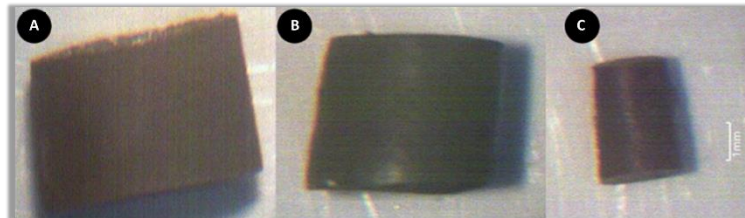


Fig 9. Explantos en el día 1 del experimento

Utilizando un calibrador digital de alta precisión Fig 5F (resolution:0.1mm Accuracy:±0.2mm), se mide y se registra el largo y ancho en milímetros (mm) de cada uno de estos explantos, luego los explantos son pesados en una balanza de precisión Fig 5B y se registra su masa en miligramos (mg), inmediatamente cada explanto se dispone en un tubo de ensayo Fig 5C con medio de

cultivo. De cada especie, 20 explantos se disponen en AMPEP, 20 explantos se disponen en AMPEP K⁺ y 20 explantos se disponen en ALG₂.

Los tubos de ensayo que contienen explantos con la especie *Gracilaria blodgettii* se marcan con la letra (G), los tubos de ensayo que contienen explantos de la especie *Kappaphycus alvarezii* de variedad verde se marcan con las letras (K.V.) y por último los tubos de ensayo que contienen explantos de la especie *Kappaphycus alvarezii* de la variedad chocolate se marcan con las letras (K.C.). Se seleccionan al azar de cada especie y de cada medio de cultivo 10 tubos de ensayo, a estos tubos de ensayo y utilizando una micropipeta se le adiciona 0.5 µl de ácido indolacético con kenitina (IAA+K) y 0.5 µl de Espermina (SPM). Estos tubos de ensayo se les agrega una marca de (+) que indica que tienen biorregulador. Posteriormente a cada tubo de ensayo es tapado con parafina, y se le asigna un numero de entre 1 a 10 el cual permitirá identificar al explanto durante todo el experimento.

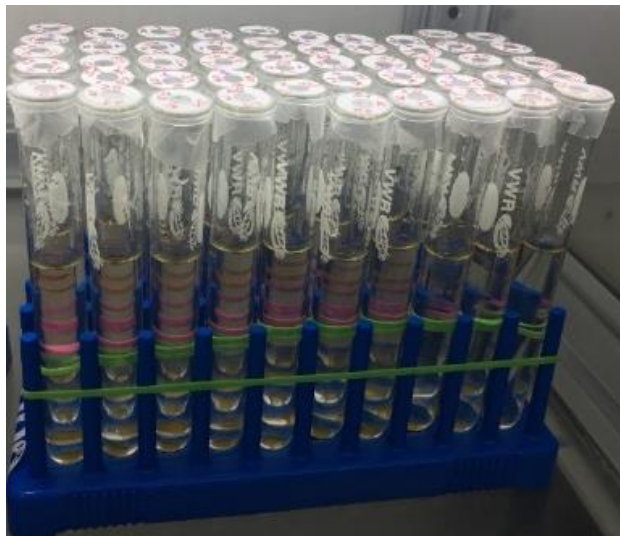


Fig 10. Tubos de ensayo con explantos

Como se observa en la Fig 10, los explantos permanecen en sus tubos de ensayo dispuestos en gradillas dentro de incubadoras con temperatura entre 25 – 30 °C, y humedad entre 60 y 75 %, Esta incubadora se mantiene iluminada por 2 tubos LED con irradiancia de 118 µmol m⁻² s⁻¹ en fotoperiodos de 13 horas de luz y 11 horas de oscuridad.

4.6.4 DESARROLLO DEL EXPERIMENTO

Los explantos que fueron dispuestos en los tubos de ensayo con su correspondiente tratamiento, permanecen en la incubadora por 45 días. Sin embargo, cada 24 horas son levemente agitados para evitar la sedimentación en el medio de cultivo. Durante el trascurso del cultivo, en los días 15, 30 y 45, se efectúa una renovación del medio de cultivo, esta renovación se realiza como fue descrito en el apartado 4.6.2, además, se utilizan nuevos tubos de ensayo esterilizados, también se incluye el biorregulador a aquellos tratamientos que corresponde. Cuando el explanto es trasladado de tubo de ensayo, se sujeta suavemente con

unas pinzas, si la textura del explanto es viscosa o hueca, se determina que el explanto no sobrevivió al tratamiento y este es retirado del experimento, de lo contrario, los explantos vivos son pesados en una balanza de precisión, se registra la masa y el número de ápices que han desarrollado, luego son depositados en un nuevo tubo de ensayos con su correspondiente tratamiento.

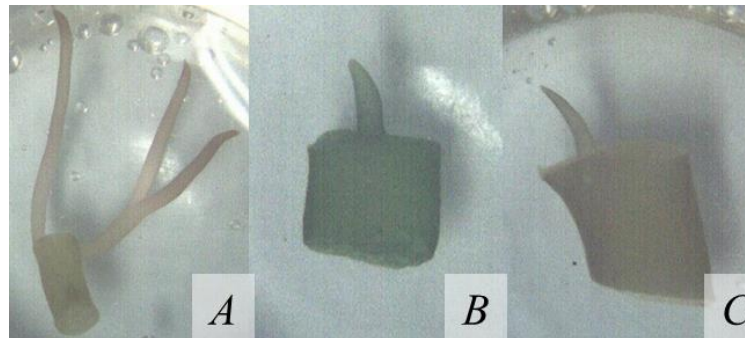


Fig 11. Explantos en el día 45

Al llegar el día 45, se finaliza la primera fase del cultivo. Posteriormente, los explantos se preparan para ser dispuestos a una segunda fase. Esta nueva fase se realiza en exteriores fuera del laboratorio, donde los explantos se preparan a condiciones ambientales naturales. En la Fig 11 se observan los explantos en el día 45 del cultivo *in-vitro*, donde la especie *Gracilaria blodgettii* Fig 11A ha desarrollado 4 ápices, la especie *Kappaphycus alvarezii* verde Fig 11B ha desarrolló un ápice y la especie *Kappaphycus alvarezii* chocolate Fig 11C también desarrolló un ápice durante el cultivo *in-vitro*.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

En primer lugar, se llevó a cabo el tratamiento descriptivo de las variables de interés (Longitud, Diámetro y Masa del explanto) correspondientes al primer día de aplicación de los tratamientos ensayados en los explantos disponibles. Este análisis busca resaltar las características más relevantes de las observaciones, sintetizándolas en un conjunto reducido de parámetros numéricos (parámetros de posición, dispersión, asimetría y curtosis) y de representaciones gráficas adecuadas.

El análisis descriptivo multivariante presentado en esta sección se ha realizado para cada una de las tres especies de algas consideradas (*Kappaphycus alvarezii* chocolate, *Kappaphycus alvarezii* verde y *Gracilaria blodgettii*) y sobre la totalidad de los explantos disponibles (180 explantos, 60 de cada especie).

Seguidamente, en el apartado 5.1.1 se presentan diferentes tablas con los valores de los parámetros descriptivos más relevantes obtenidos a partir de los explantos de cada una de las tres especies consideradas. El apartado 5.1.2 hace una reflexión sobre la presencia de datos atípicos detectados en los explantos pertenecientes a cada una de las tres especies de alga analizadas. Los dos últimos apartados de esta sección se destinan al estudio de la evolución de la masa de los explantos y de su supervivencia (Apartado 5.1.3), y el apartado 5.1.4 describe la tasa de crecimiento de los explantos, otra de las variables respuesta de interés analizadas en este trabajo.

En segundo lugar, en el apartado 5.2. Se propone el análisis discriminante como técnica de clasificación de la especie a la cual pertenece un explanto de alga marina. Esta técnica utiliza como variables predictoras medidas sencillas como lo son la masa, el diámetro y la longitud de un explanto, estas medidas fueron tomadas en el día 1 del experimento ya que en este día los explantos aún no han sido afectados por los tratamientos aplicados.

Posteriormente, se utilizan técnicas de análisis multivariante con las cuales se busca explicar en el apartado 5.3. el efecto que tienen sobre la masa los factores experimentados, este análisis utiliza el ANOVA y la regresión múltiple, las cuales permiten modelar este efecto en función a los factores como lo son la especie del alga, los medios de cultivo, el uso o no de biorregulador y el tiempo. Luego, en el apartado 5.4. se analiza la tasa de crecimiento de la masa. La tasa de crecimiento es propuesta como indicador del efecto que tiene en la masa los tratamientos por múltiples publicaciones de diferentes autores, este análisis utiliza las mismas técnicas empleadas en el análisis de la masa.

Finalmente, en el apartado 5.5. se realiza un análisis de la supervivencia utilizando un modelo logístico. Este análisis pretende identificar el efecto que tienen los factores como lo son la tasa de crecimiento del día 15, el medio de cultivo, la especie del alga y el biorregulador, con relación a la probabilidad de supervivencia de los explantos en el cultivo *in-vitro*.

5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO

Los datos registrados el primer día del experimento, son aquellos en el que los explantos no han sido afectados por algún tratamiento, de estos datos, se realizó un análisis descriptivo. Este análisis, permite observar y representar indicadores estadísticos para entrar en materia, también permite tener una idea del orden de magnitud de las variables y posibles anomalías. Los registros de la masa, el largo y el ancho del explanto se sintetizan y representan mediante sus respectivas gráficas.

5.1.1 PARÁMETROS DESCRIPTIVOS

Se busca destacar las características más relevantes de las medidas registradas en el día 1 de los explantos. Estas medidas son la masa (mg), el diámetro y la longitud (mm). Estas medidas se sintetizarán en parámetros de posición, dispersión, asimetría y curtosis, junto con representaciones gráficas adecuadas. Para esto se disponen de los datos del primer día del cultivo in-vitro que corresponden a 180 explantos de tres especies de algas marinas (*Kappaphycus alvarezii* chocolate, *Kappaphycus alvarezii* verde y *Gracilaria blodgettii*) de los cuales hay 60 explantos de cada especie.

El primer día del cultivo in-vitro los explantos tienen una forma cilíndrica. Con el paso de los días, esta forma cilíndrica deja de ser definida, esto causa inconsistencias al tomar las medidas de el diámetro y la longitud. Estas medidas varían de acuerdo con el punto de medición, por lo que no se registran para los siguientes días del experimento.

Para tener una perspectiva global de las variables explicativas, la Tabla 2 registra para la longitud, diámetro y masa los parámetros descriptivos como lo son: la media, la mediana, la desviación estándar y el rango de cada una de las especies experimentadas.

		Kappaphycus alvarezii chocolate	Kappaphycus alvarezii verde	Gracilaria blodgettii
	Numero de explantos	60	60	60
Longitud	Media	3.9	3.94	3.73
	Mediana	3.8	3.9	3.7
	Desviación estándar	0.44	0.50	0.45
	Rango	3.0 – 5.3	2.9 – 5.1	2.8 – 4.9
Diámetro	Media	3.48	4.28	1.91
	Mediana	3.5	4.2	1.9
	Desviación estándar	0.41	0.71	0.25
	Rango	2.4 – 4.3	3.2 – 5.9	1.3 – 2.6
Masa	Media	38.9	65.57	11.63
	Mediana	39	60	11.5
	Desviación estándar	9.68	25.9	2.83
	Rango	18 - 72	35 – 144	6 – 18

Tabla 2 Tabla de medias día 1 de longitud, diámetro y masa

Se espera identificar si los conjuntos de datos del día 1 de la masa, longitud y diámetro de las especies involucradas en esta investigación tienen una distribución normal. Para esto se describen en la Tabla 3 los parámetros de asimetría y de curtosis que son evaluados mediante los estadísticos de sesgo y curtosis estandarizados.

		Kappaphycus alvarezii chocolate	Kappaphycus alvarezii verde	Gracilaria blodgettii
Longitud	Sesgo Estandarizado	1.99	0.38	0.98
	Curtosis estandarizada	0.77	-0.74	0.06
Diámetro	Sesgo Estandarizado	-1.66	2.08	-0.12
	Curtosis estandarizada	1.52	-0.57	0.37
Masa	Sesgo Estandarizado	2.32	2.84	-0.29
	Curtosis estandarizada	2.47	0.45	-0.43

Tabla 3. Parámetros de asimetría y de curtosis

5.1.1.1 Distribución de la longitud

En la Tabla 3 podemos observar que las 3 especies, *Kappaphycus alvarezii* chocolate, *Kappaphycus alvarezii* verde y *Gracilaria blodgettii* para la variable longitud tienen su coeficiente de asimetría y curtosis estandarizadas entre el rango de -2 y 2 esto indica que los datos de la longitud para las 3 especies son simétricos y se comportan como una distribución normal.

5.1.1.2 Distribución del Diámetro

Las especies, *Kappaphycus alvarezii* chocolate y *Gracilaria blodgettii* para la variable Diámetro tienen su coeficiente de asimetría y curtosis estandarizadas entre el rango de -2 y 2, esto indica que los datos de la longitud para las 2 especies son simétricos y forman una curva normal. Sin embargo, la especie *Kappaphycus alvarezii* verde tiene un coeficiente de asimetría de 2.08 el cual poco dista de 2 y puede considerarse que no es una asimetría marcada, su curtosis estandarizada $-2 < -0.57 < 2$ indica que la distribución de sus datos tendrá la curtosis de una normal.

5.1.1.3 Distribución de la masa

La Especie *Kappaphycus alvarezii* chocolate tiene en su masa un coeficiente de asimetría de $2.32 > 2$ y una curtosis estandarizada de $2.47 > 2$ es decir tiene una asimetría positiva presentando una cola alargada hacia la derecha y definiendo a este conjunto de datos como leptocúrtico. La Especie *Kappaphycus alvarezii* verde su coeficiente de asimetría es $2.84 > 2$ y una curtosis estandarizada de $-2 < 0.45 < 2$ es decir tiene una asimetría positiva presentando una cola alargada hacia la derecha sin embargo la curtosis es normal. La Especie *Gracilaria blodgettii* su coeficiente de asimetría es $-2 < -0.29 < 2$ y una curtosis estandarizada de $-2 < -0.43$

< 2 es decir, estos datos se pueden considerar normales tanto por su simetría como por su curtosis.

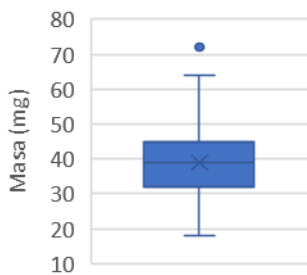
En general los datos del día 1 de la masa presenta distribuciones asimétricas positivas para las especies *Kappaphycus alvarezii* y *Gracilaria blodgettii* por lo que se necesitará para su análisis una transformación logarítmica que comprime los valores altos y expanden los pequeños.

5.1.2 DATOS ATÍPICOS DEL DIA 1

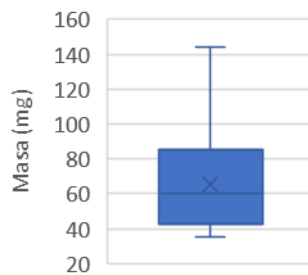
El diagrama de Caja y bigotes es una representación del conjunto de datos. La caja comprende el 50% de los valores centrales de los datos, la línea central corresponde a la mediana y los bigotes representan aquellos valores considerados “normales”. Los valores extremos que difieren cambios del cuartil más próximo en más de 1.5 veces el intervalo intercuartílico se grafican como puntos aislados por considerar que pueden corresponder a datos anómalos (Romero Villafranca & Zúnica Ramajo, 2013).

Datos atípicos de la masa

A) *Kappaphycus alvarezii* chocolate



B) *Kappaphycus alvarezii* verde



C) *Gracilaria blodgettii*

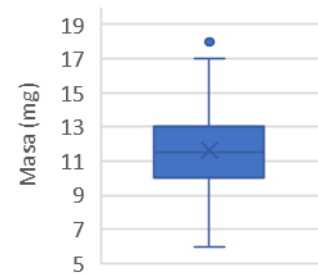
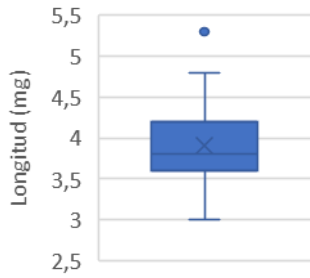


Fig 12. Caja y bigotes masa (mg)

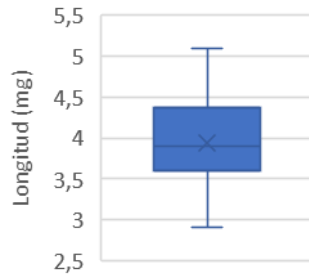
La Especie *Kappaphycus alvarezii* chocolate en la figura Fig 12A muestra un dato atípico que corresponde a la observación 34 que es un explanto de masa de 72 mg ancho 4.3 mm y largo 4.4 mm, se verifica en el registro de datos comprobando que estos son correctos, sin embargo el largo de este explanto tiene un largo y ancho inusualmente mayor a los otros explantos haciendo de este un explanto con mayor masa. En la especie *Gracilaria blodgettii* el dato atípico corresponde a la observación 124 la cual pertenece a un explanto que tiene un peso de 18 mg, un diámetro de 2.2 mm y una longitud de 3.9 mm también se verifica el registro de los datos para comprobar que estos sean correctos.

Datos atípicos de la Longitud

A) *Kappaphycus alvarezii* chocolate



B) *Kappaphycus alvarezii* verde



C) *Gracilaria blodgettii*

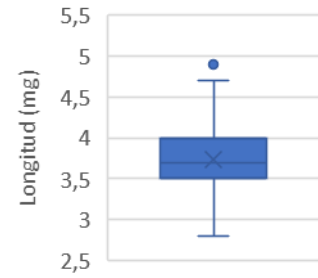
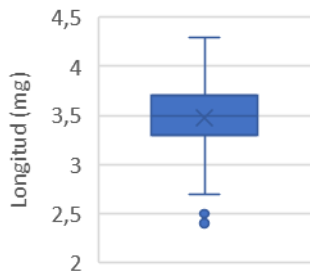


Fig 13. Caja y bigotes Longitud (mg)

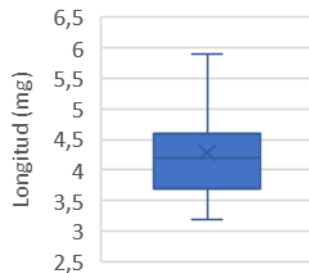
La longitud de un explanto es una variable cuyo resultado depende de la intervención del experimentador. Los datos atípicos Fig 13 corresponden a imperfecciones del corte realizado, el dato atípico en la especie *Kappaphycus alvarezii* chocolate Fig 13A corresponde a la observación 20 de un explanto cuyo largo es de 5.3 mm, el dato atípico de la especie *Gracilaria blodgettii* Fig 13C corresponde a la observación 180 de un explanto cuyo largo es de 4.9 mm.

Datos atípicos del diámetro

A) *Kappaphycus alvarezii* chocolate



B) *Kappaphycus alvarezii* verde



C) *Gracilaria blodgettii*

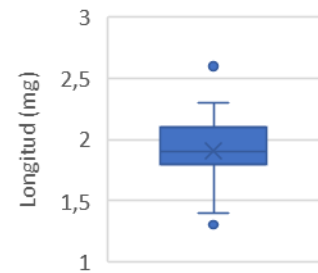


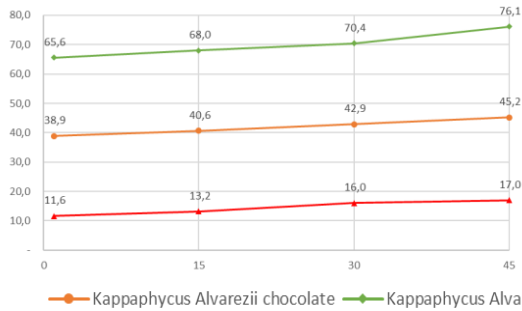
Fig 14. Caja y bigotes diámetro (mg)

La especie *Gracilaria blodgettii* Fig 14C tiene como datos atípicos la observación 169 con un valor de 1.3 mm y la observación 140 con un valor de 2.6 mm. En la especie *Kappaphycus alvarezii* chocolate Fig 14A encontramos como datos atípicos en el diámetro la observación 20 con un valor de 2.4 mm y la observación 36 con un valor de 2.5 mm. Estos datos atípicos se revisan en el set de datos verificando que su registro fue correcto y puesto que están identificados, se realizará un especial seguimiento de estos explantos en los análisis posteriores.

5.1.3 SUPERVIVENCIA Y EVOLUCIÓN DE LA MASA

Para describir la evolución de la masa en función al tiempo al igual que la supervivencia se presentan los siguientes gráficos que describen este comportamiento para cada una de las especies estudiadas.

A) Masa promedio por especie



B) Supervivencia de explantos por especie

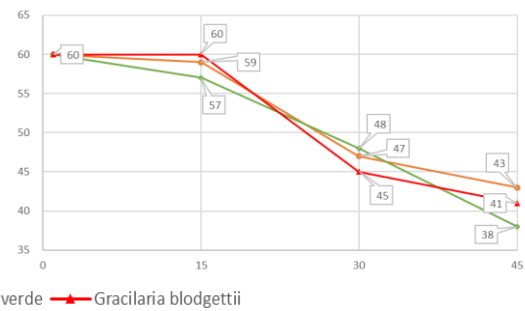


Fig 15. Masa promedio de los explantos

Se observa en la Fig 15A el promedio de la masa para cada una de las especies en función al tiempo, donde se observa una tendencia de la masa a aumentar a medida que pasan los días, incluso cuando el número de explantos que han sobrevivido a los tratamientos disminuye en función del tiempo Fig 15B. Al finalizar el cultivo in-vitro se obtuvieron en total 618 observaciones de 72 tratamientos experimentados. En la Tabla 4 se encuentra el resumen del conteo de estas observaciones discriminadas por cada uno de los factores:

DIA	Especie de alga			Medio de cultivo			Biorregulador		Total
	KaV	KaC	GB	A	AK	ALG ₂	(B+)	(B-)	
1	60	60	60	60	60	60	90	90	180
15	57	59	60	60	60	56	88	88	176
30	48	47	45	56	59	25	74	66	140
45	38	43	41	51	55	16	65	57	122
Total	203	209	206	227	234	157	317	301	618

Tabla 4 Observaciones del cultivo in-vitro

El día 1 corresponde al inicio del experimento se registran 180 observaciones, el día 15 y el día 30 se obtienen 176 y 140 observaciones respectivamente, al finalizar el experimento en el día 45 se registran 122 observaciones.

Las observaciones por especie de alga fueron las siguientes: para la especie *Kappaphycus alvarezii* chocolate (KaC) se registran 209 observaciones, la especie *Kappaphycus alvarezii* verde (KaV) registra 203 observaciones y la especie *Gracilaria Blodgettii* (GB) registra 206 observaciones. Las observaciones de los medios de cultivo fueron: para el AMPEP (A) 227 observaciones, para el AMPEP K⁺ (AK) 234 observaciones y el medio de cultivo ALG₂ (ALG₂) registro 157 observaciones. Los tratamientos que utilizaron biorregulador (B+) registran 317 observaciones y los tratamientos que no utilizaron biorregulador (B-) registran 301 observaciones.

De manera preliminar se puede identificar que las tres especies muestran una evolución positiva de la masa promedio en función al tiempo, incluso cuando ha disminuido el número de explantos

y solo han sobrevivido 178 al final del cultivo *in-vitro*. En esta investigación, los explantos sobrevivientes al cultivo *in-vitro* equivalen alrededor de un 60% del total de los explantos que iniciaron el experimento. Siendo habitual encontrar este porcentaje de supervivencia en los cultivos *in-vitro* en laboratorios.

5.1.4 TASA DE CRECIMIENTO

La Tasa de Crecimiento, TC, es evaluada generalmente por los investigadores de algas marinas, como indicador del efecto que tiene sobre la masa un tratamiento experimentado. En el contexto de esta investigación, el día 45 del cultivo *in-vitro* se calcula la tasa de crecimiento TC para los explantos que han llegado vivos a este momento. Este indicador expresa el promedio de la diferencia entre el peso inicial y el peso final del explanto en el tiempo, como un porcentaje respecto al peso del primer día. en cuanto a un porcentaje del primer valor.

Especie	Casos	TCD (%)	Medio	Casos	TCD (%)	Bio	Casos	TCD (%)
<i>Kappaphycus alvarezii</i> chocolate	43	0.15	AMPEP	20	0.37	SI	10	0.36
						NO	10	0.37
			AMPEP K ⁺	18	0.35	SI	10	0.38
						NO	8	0.33
			ALG ₂	5	-0.27	SI	2	-0.50
						NO	3	-0.05
<i>Kappaphycus alvarezii</i> verde	38	0.04	AMPEP	12	0.27	SI	6	0.28
						NO	6	0.26
			AMPEP K ⁺	19	0.10	SI	9	0.05
						NO	10	0.16
			ALG ₂	7	-0.25	SI	5	-0.31
						NO	2	-0.19
<i>Gracilaria blodgettii</i>	41	0.71	AMPEP	19	1.22	SI	10	1.22
						NO	9	1.23
			AMPEP K ⁺	18	0.48	SI	10	0.50
						NO	8	0.47
			ALG ₂	4	0.43	SI	3	0.66
						NO	1	0.19

Tabla 5. Tasa promedio de crecimiento diario

En general la TC promedio es de 0.30% es la media ponderada para el total de los 122 explantos 122, de los cuales 43 y 38 pertenecen a la especie *Kappaphycus alvarezii* chocolate y verde respectivamente y 41 de la especie *Gracilaria blodgettii*. La especie con la mayor TC promedio fue de la *Kappaphycus alvarezii* chocolate con 0.16 % y 43 explantos. También se calcula la TC promedio agrupada por especie y medio de cultivo donde la mayor tasa de crecimiento diario la encontramos en la *Gracilaria blodgettii* tratada con AMPEP con una TC de 1.22% y 19 explantos. Teniendo en cuenta la definición de la variable TC, las tasas de crecimiento diario mayores a cero indican que durante el cultivo *in-vitro* los explantos han ganado masa progresivamente, y las tasas de crecimiento diario negativas indican que estos explantos han disminuido su peso progresivamente durante el cultivo *in-vitro*.

5.2. CLASIFICACIÓN DE LAS ESPECIES

Los parámetros ambientales del agua de mar, tales como la temperatura, el pH y la salinidad, son la causa de que las algas marinas experimenten cambios o variaciones tanto en su color como en su estructura (Hayashi et al., 2011). Dado que esta variación pudiera generar confusión a una persona que carezca de considerables conocimientos en taxonomía de algas marinas, se desea proponer en este trabajo un procedimiento económico y sencillo para identificar la especie a la que pertenece un fragmento de alga o explanto. Aunque limitado a esta investigación, se plantea definir una estrategia que pueda utilizarse para clasificar la especie de un alga marina. Para esto, se han utilizado explantos de algas marinas de los que se ha registrado su longitud (mm), diámetro (mm) y masa (mg), variables sencillas de medir sin necesidad de ningún equipo especializado. Con este objetivo, se ha llevado a cabo un Análisis discriminante, utilizando como variable de clasificación la Especie a la que pertenecen los explantos. Como dato de interés a mencionar, las algas que se utilizaron como donadoras de explantos en esta investigación estuvieron cultivadas en una salinidad promedio de 30 psu.

A partir de este análisis, se obtienen las funciones discriminantes o variables canónicas discriminantes (esto es combinaciones lineales de las variables primitivas, incorrelacionadas entre sí dentro de grupos), que permitirán “diferenciar” o “discriminar”, de la mejor manera posible, los individuos (algas) de las tres especies consideradas.

Función Discriminante	GL	Porcentaje Relativo	Correlación Canónica	Lambda de Wilks	Valor-P
1	10	93.35	0.91807	0.113728	0.0000
2	4	6.65	0.52566	0.721423	0.0000

Tabla 6 Funciones discriminantes del análisis discriminante para la variable Especie

En la Tabla 6 encontramos que la primera función discriminante tiene un porcentaje de varianza relativo de 93.35% mientras que la segunda función discriminante solo es capaz de explicar el 6.65% de la varianza de los datos, sin embargo el valor-P de ambas funciones discriminantes es inferior a 0.05 ($P\text{-value} < 0.05$) con lo cual ambas funciones discriminantes son estadísticamente significativas con un 95% de confianza.

La correlación canónica de la primera función (0.91807) está más próxima a uno (1) que la segunda función (0.52566) y de manera análoga, la Lambda de Wilks de la primera función (0.113728) está más próxima a cero que la segunda función (0.723686), lo cual es indicativo que la primera función discriminante es capaz de separar mucho mejor los datos que la segunda función como se puede observar en la Fig 16.

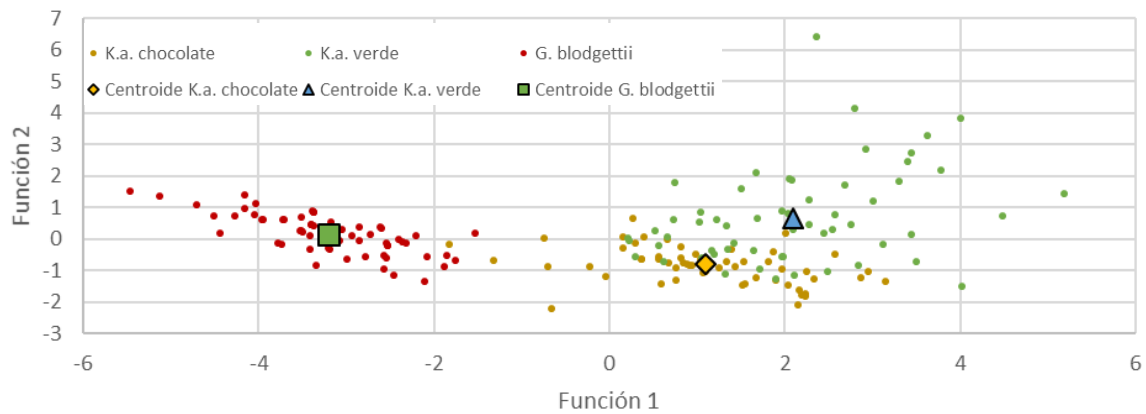


Fig 16. Graficas de funciones discriminantes

La Fig 16 nos muestra el diagrama de dispersión de las funciones discriminantes y permite la visualización de que tan bien las funciones separan los datos. Esta imagen representa la puntuación canónica discriminante de cada uno de los datos respecto a las dos funciones discriminantes. En el gráfico, las puntuaciones relativas a cada especie son representadas con un color diferente. También se ha representado los centroides de los tres grupos.

	Coeficientes Estandarizados		Coeficientes sin estandarizar	
	1	2	1	2
MASA (gr)	-1.45313	2.3648	-90.5592	147.375
DIÁMETRO (mm)	2.0859	-1.48135	4.19784	-2.98119
LARGO (mm)	0.471572	-0.807342	1.01058	-1.73013
CONSTANTE			-13.9115	10.5737

Tabla 7 Coeficientes de las funciones discriminantes

En la Tabla 7 los coeficientes estandarizados permiten identificar las variables que tienen mayor influencia en cada una de las dos funciones discriminantes. Así se puede observar que en la primera función, el ancho (mm) tiene mayor peso con un coeficiente de (2.0859), mientras que en la segunda función, la masa (gr) presenta un coeficiente de mayor magnitud (2.3648). Los coeficientes sin estandarizar se utilizan para calcular la puntuación canónica discriminante de cada uno de los datos de la muestra.

La primera función discriminante separa la especie *Gracilaria blodgettii* de las *Kappaphycus alvarezii*, y la diferencia entre ambas especies estriba en el diámetro de sus explantos, siendo los explantos de la especie *Gracilaria blodgettii* muchos más delgados que los explantos de las especies *Kappaphycus alvarezii verde y chocolate*. Dicho esto, la segunda función, con un menor poder discriminante, intenta separar entre las dos variedades de la especie *Kappaphycus alvarezii*, aunque la especie *Gracilaria* queda en una posición intermedia confundiendo algunas observaciones con valores bajos para esta función de la especie *Kappaphycus alvarezii chocolate* y otras, las que presentan valores algo más elevados, con las verdes.

La diferencia entre ambos tipos de *Kappaphycus alvarezii* estriba en que las verdes presentan valores más elevados de la masa que las chocolate y en consecuencia estas últimas presentan explantos con mayor diámetro.

Grupo	1	2
Kappaphycus alvarezii chocolate	1.10295	-0.815046
Kappaphycus alvarezii verde	2.09399	0.662381
Gracilaria blodgettii	-3.19695	0.152666

Tabla 8 Centroides de los grupos de las funciones discriminante

En la Tabla 8 podemos observar las coordenadas de cada uno de los tres centroides de los grupos. Estos centroides representan la puntuación canónica discriminante de los vectores medios de las tres variables consideradas para los explantos de cada una de las tres especies analizadas.

Las funciones de clasificación se utilizan para predecir el nivel de la especie. Estas funciones de clasificación están formadas por los coeficientes de la Tabla 9.

	Kappaphycus alvarezii chocolate	Kappaphycus alvarezii verde	Gracilaria blodgettii
Longitud	49,222	47,6673	43,2023
Diámetro	94,2479	94,0036	73,3126
Masa	-2,97372	-2,84574	-2,44171
CONSTANTE	-203,203	-202,84	-137,335

Tabla 9. Coeficientes de la Función de Clasificación para la Especie

La operatividad de estas funciones de clasificación consiste en sustituir para un explanto determinado los valores de las variables explicativas por los observados en dicho explanto en cada una las tres funciones de clasificación obtenidas. El valor resultante más elevado apuntará a la especie más probable de pertenencia del explanto. Por tanto, las funciones de clasificación se utilizan para determinar a cuál de las tres especies consideradas es más probable que pertenezca un explanto que se desea clasificar.

	Kappaphycus alvarezii chocolate	Kappaphycus alvarezii verde	Gracilaria blodgettii
Kappaphycus alvarezii chocolate	55 91.67%	3 5.00%	2 3.33%
Kappaphycus alvarezii verde	21 35.00%	39 65.00%	0 0.00%
Gracilaria blodgettii	0 0.00%	0 0.00%	60 100.00%

Tabla 10 Comprobación de la clasificación

La Tabla 10 muestra el resultado de usar la regla de clasificación para asignar los explantos analizados a determinada especie. Cada fila de la tabla muestra los resultados de la clasificación para los casos que pertenecen a un grupo en particular, mientras que las columnas muestran la

frecuencia con la que los explantos fueron clasificados como pertenecientes a cada grupo. Así, de los 60 explantos de la especie *Kappaphycus alvarezii* chocolate, 55 explantos (91.67%) fueron correctamente clasificados, 3 explantos (5.00%) fueron clasificados como *Kappaphycus alvarezii* verde y 2 explantos (3.33%) como *Gracilaria blodgettii*. De similar manera, para los 60 explantos de la especie *Kappaphycus alvarezii* verde, 39 explantos (65.00%) fueron clasificados correctamente y 21 explantos (35.00%) fueron clasificados como *Kappaphycus alvarezii* chocolate. Finalmente, todos los 60 explantos (100.00%) de la especie *Gracilaria blodgettii* fueron clasificados correctamente.

Como el tamaño de los tres grupos es el mismo (60 explantos de cada una de las tres especies), la probabilidad de que un explanto pertenezca a una especie es la misma (probabilidad de pertenencia "a priori" es 0,33). Como resultado del procedimiento utilizado, el porcentaje de explantos correctamente clasificados fue de un 85.56%.

Preliminarmente y siendo no más que una obviedad, los géneros *Gracilaria* y *Kappaphycus* son morfológicamente diferentes, donde la especie *Gracilaria blodgettii* es significativamente más delgada, sin embargo, entre las variedades de una misma especie puede existir diferencias, como se comprobó con la *Kappaphycus alvarezii* verde y chocolate, siendo la especie *Kappaphycus alvarezii* verde en general más ancha y pesada que la chocolate. Futuras investigaciones podrían cuantificar la cantidad de carragena en un explanto y comprobar si difiere entre variedades de una misma especie.

Como se había mencionado, esta clasificación está delimitada a las tres especies utilizadas en esta investigación. Sin embargo, se plantea proponer esta estrategia de clasificación para que la industria de las algas marinas tenga alternativas para clasificar las especies de interés cuando estas puedan ser similares entre sí. Esto permitiría brindar tanto a cultivadores como a compradores un método fiable y barato de conocer las especies de su interés.

En algunos casos hay algas cuyas características morfológicas no son tan definidas como las utilizadas en este experimento y por lo tanto el registro de las medidas del diámetro y longitud de los explantos no se puede obtener fácilmente. Para estos casos, se puede proponer el uso de un picómetro con el fin de obtener el volumen de los explantos. Esta nueva medida, volumen, puede ser utilizada junto con la masa, como variables para la clasificación de la especie de algas marinas.

5.3. EFECTO SOBRE LA MASA

Se estudiará el efecto que tiene la especie, el medio de cultivo, el biorregulador y el tiempo transcurrido sobre la masa y sobre la tasa de crecimiento de los explantos. Se espera determinar no solo si cada uno de los factores influye en la respuesta, sino también si hay una interacción significativa entre ellos.

5.3.1 ANÁLISIS DE LA VARIANZA

El análisis de la varianza, nos permitirá identificar la posible existencia de efectos significativos en la masa de los explantos, de los factores controlados del experimento y de sus interacciones. La masa la cual es expresada en miligramos (mg), fue obtenida utilizando una balanza de precisión en intervalos de 15 días, durante todo el cultivo *in-vitro*. Con el fin de garantizar la hipótesis de normalidad de la variable de la masa y con ello la del error, se ha realizado una transformación logarítmica para comprimir los valores altos y expandir los pequeños, esto se debe a que los datos registrados de la masa presentan una distribución asimétrica positiva. Los factores considerados en este análisis son los siguientes:

1. Especie de alga marina (A:Especie),
2. Medio de Cultivo (B:Medio),
3. Biorregulador (C:Biorregulador) y
4. Día (D:Día)

Ya que intervienen varios factores se quiere conocer si existen interacciones entre estos y si estas interacciones tienen un efecto significativo en la masa. La interacción de orden superior seleccionada es la combinación de los cuatro factores:

- A: Especie - B: Medio - C: Biorregulador - D: Día

Las demás interacciones incluidas en este estudio son:

- A: Especie -B: Medio
- A: Especie - C: Biorregulador
- A: Especie - D: Día
- B: Medio - C: Biorregulador
- B: Medio - D: Día
- C: Biorregulador - D: Día
- A: Especie - B: Medio - C: Biorregulador
- A: Especie - B: Medio - D: Día
- A: Especie - C: Biorregulador - D: Día
- B: Medio - C: Biorregulador - D: Día

Asumiendo que, a mayor masa, mayor cantidad de hidrocoloides pueden ser extraídos de las algas marinas, se espera encontrar la combinación óptima de los factores que permita realizar el cultivo *in-vitro* en el tiempo propuesto de 45 días, y que maximice la cantidad de masa en los explantos.

Para determinar el nivel de significación en el análisis de la varianza, se toma como riesgo de primera especie un 5%, donde $\alpha=0.05$. Posteriormente, se realiza un ANOVA multifactorial con todos los factores e interacciones hasta de cuarto orden. La Tabla 11 ANOVA Multifactorial descompone la variabilidad de la masa (mg) en contribuciones debidas a los factores y sus interacciones. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III, la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores.

Teniendo en cuenta que por lo general las interacciones de orden superior a dos se presentan poco en la práctica (Romero Villafranca & Zúñica Ramajo, 2013), lo cual podemos comprobar en nuestro análisis, donde las interacciones triples y cuádruple no tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la masa. Tomando esto en consideración, se retiran del ANOVA estas interacciones triples y cuádruples, además de las interacciones dobles Biorregulador-Día, Especie-Biorregulador y Especie-Día, las cuales tampoco son estadísticamente significativas. El resultado de esta simplificación se observa en la Tabla 12.

	Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES	A:Especie	198,01	2	99,0063	1007,51	0,0000
	B:Medio	1,96	2	0,9781	9,95	0,0001
	C:Biorregulador	0,20	1	0,1971	2,01	0,1573
	D:Día	1,95	3	0,6496	6,61	0,0002
INTERACCIONES	AB	1,55	4	0,3863	3,93	0,0037
	AC	0,35	2	0,1763	1,79	0,1672
	AD	0,70	6	0,1167	1,19	0,3111
	BC	0,69	2	0,3461	3,52	0,0302
	BD	1,14	6	0,1892	1,93	0,0748
	CD	0,02	3	0,0068	0,07	0,9761
	ABC	0,59	4	0,1484	1,51	0,1979
	ABD	1,02	12	0,0853	0,87	0,5802
	ACD	0,13	6	0,0225	0,23	0,9673
	BCD	0,01	6	0,0023	0,02	0,9999
	ABCD	0,17	12	0,0144	0,15	0,9997
RESIDUOS		53,65	546	0,0983		
TOTAL (CORREGIDO)		330,55	617			

Tabla 11 ANOVA Multifactorial para la masa (mg)

	Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES	A:Especie	257,63	2	128,814	1342,55	0,0000
	B:Medio	2,11	2	1,054	10,99	0,0000
	C:Biorregulador	0,19	1	0,186	1,94	0,1642
	D:Día	2,13	3	0,711	7,41	0,0001
INTERACCIONES	AB	1,56	4	0,390	4,07	0,0029
	BC	0,88	2	0,441	4,60	0,0104
	BD	1,22	6	0,204	2,12	0,0488
RESIDUOS		57,28	597	0,096		
TOTAL (CORREGIDO)		330,55	617			

Tabla 12. ANOVA Multifactorial para la masa con factores significativos

Entre los efectos principales encontramos que la Especie, el Medio y el día son estadísticamente muy significativos, sin embargo, el biorregulador no ha resultado estadísticamente significativo. Continuando con las interacciones, la interacción Especie-Medio y la Interacción medio-biorregulador son estadísticamente significativas.

Se utilizan las pruebas de rangos múltiples, para identificar dentro de un factor cuales medias son significativamente diferentes de otras, de aquellos factores que han resultado ser significativos. Se utiliza el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, para discriminar entre las medias cuales son o no significativas, con este método, hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

5.3.1.1 ANÁLISIS DE LOS EFECTOS PRINCIPALES

A continuación, se presentan los intervalos LSD para cada uno de los factores que resultaron ser significativos en el desarrollo de la masa de los explantos como lo son la especie, el medio de cultivo y el Día.

5.3.1.1.1 FACTOR ESPECIE

En el factor Especie el cual es estadísticamente muy significativo es indicador que existen diferencias en la masa de las especies utilizadas en el experimento, lo cual es casi una obviedad cuando se trata de especies tan diferentes como lo son la *Gracilaria* y *Kappaphycus alvarezii*.

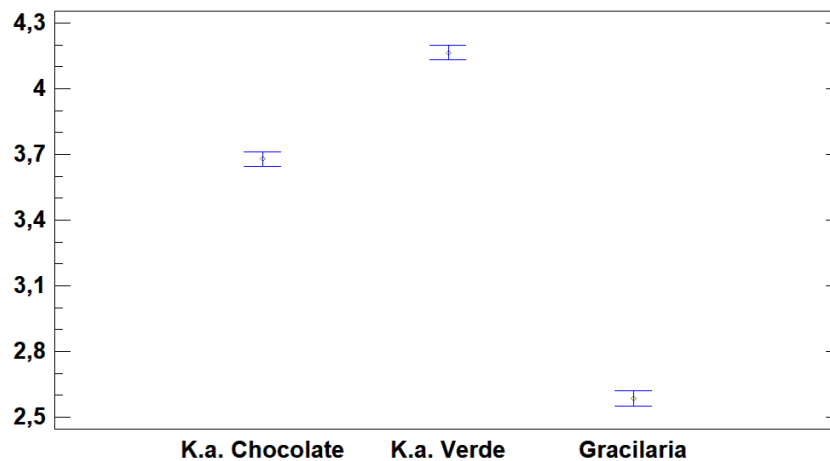


Fig 17. Prueba de rangos múltiples factor especie

En la Fig 17. se observa que la media de la masa con menor valor (2.59 ± 0.03 mg) corresponde a la especie *Gracilaria blodgettii* con 206 observaciones, seguido de la especie *Kappaphycus alvarezii* chocolate con 209 casos y una masa media de (3.68 ± 0.02 mg), finalmente y como una particularidad, se identifica que aunque perteneciendo a la misma especie de la *Kappaphycus*

alvarezii chocolate, la especie donde se observa la mayor masa media con $(4.16 \pm 0.02 \text{ mg})$ es la *Kappaphycus alvarezii* verde con 203 observaciones. En este factor ninguno de los intervalos LSD de cada una de las medias se solapan, es decir la masa en las tres especies es significativamente diferente entre ellas.

En conclusión, si se desea seleccionar una especie que aporte la mayor cantidad de masa, esta debería ser la *Kappaphycus alvarezii* verde.

5.3.1.1.2 FACTOR MEDIO DE CULTIVO

El factor Medio de cultivo el cual es estadísticamente significativo, es indicador de que existen diferencias en la masa de al utilizar diferentes medios de cultivos.

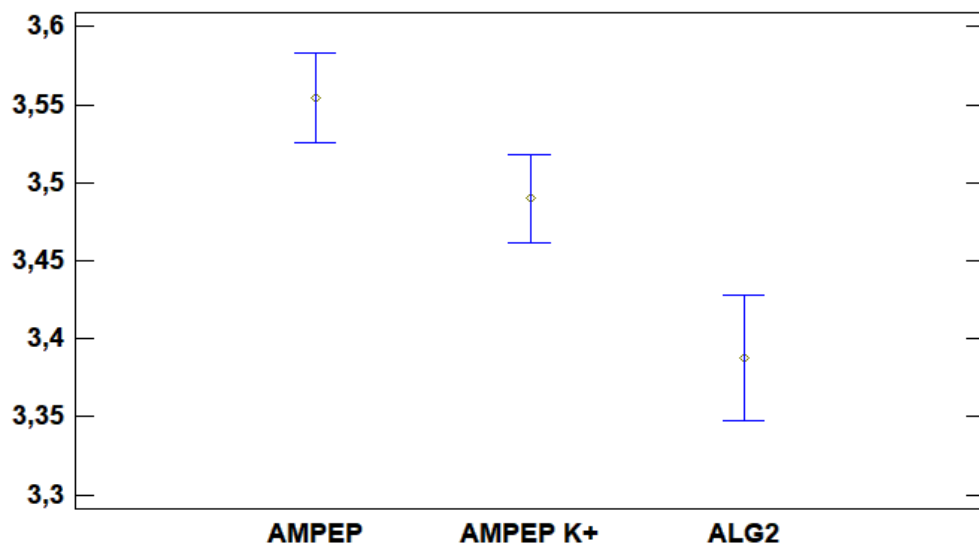


Fig 18. Prueba de rangos múltiples factor medio de cultivo

En la figura Fig 18 se observa que los tratamientos que utilizaron AMPEP tiene la mayor masa media $(3.55 \pm 0.02 \text{ mg})$ con 227 observaciones seguido por AMPEP K+ con una masa media de $(3.49 \pm 0.02 \text{ mg})$ y 234 observaciones, finalmente el LG2 con 157 observaciones y una masa media de $(3.38 \pm 0.03 \text{ mg})$. Para el factor Medio de cultivo sus intervalos LSD no se solapan, es decir la masa media de cada Medio de cultivo son diferentes unos de otros.

Se puede concluir que el medio de cultivo AMPEP desarrolla una mayor masa al finalizar el cultivo *in-vitro*. Mientras que el medio de cultivo ALG₂ es quien tiene menor efecto sobre la masa de los explantos al finalizar el cultivo *in-vitro*.

5.3.1.1.3 FACTOR DIA

El factor Día es estadísticamente significativo. En la Fig 19 que puede observar que la masa tiene un incremento en función al tiempo.

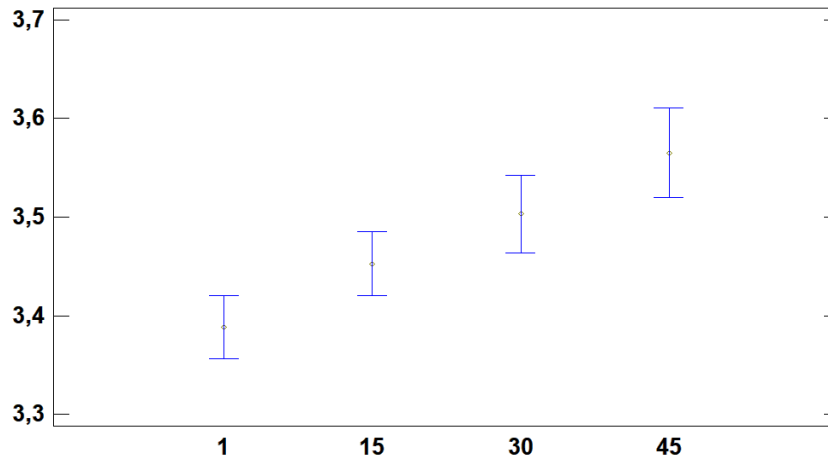


Fig 19. Prueba de rangos múltiples factor día

El hecho de que en este factor se pueda apreciar que los intervalos LSD se hagan más amplios con el tiempo nos está indicando que quedan menos individuos vivos y por lo tanto al ser el tamaño de la muestra menor, la amplitud LSD es mayor.

Al ser el factor día un factor cuantitativo se analiza la existencia de una componente lineal o una componente de mayor nivel, y puesto que el incremento es positivo y se aprecia un aumento constante, implica que la relación es lineal creciente. También es importante tener en cuenta que al ser la masa utilizada como logaritmo indica que el aumento de la masa es exponencial, con aumento lineal del exponente.

5.3.1.1.4 FACTOR BIORREGULADOR

El factor biorregulador no ha resultado ser estadísticamente significativo, es decir el biorregulador por sí solo no tiene un efecto significativo directo sobre la masa, aunque si lo tiene indirecto, pues se encuentra una interacción junto al medio de cultivo la cual si es significativa valor-P > 0.05.

5.3.1.2 ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES

A continuación, se describen cada una de las interacciones que resultaron significativas en el desarrollo en la masa de los explantos como lo son Especie-Medio, Medio-Biorregulador y Medio-Día.

5.3.1.2.1 INTERACCIÓN ESPECIE-MEDIO

La interacción Especie y Medio es estadísticamente muy significativa, esto hace referencia que para ciertas especies al menos un medio de cultivo tiene efectos significativos sobre la masa.

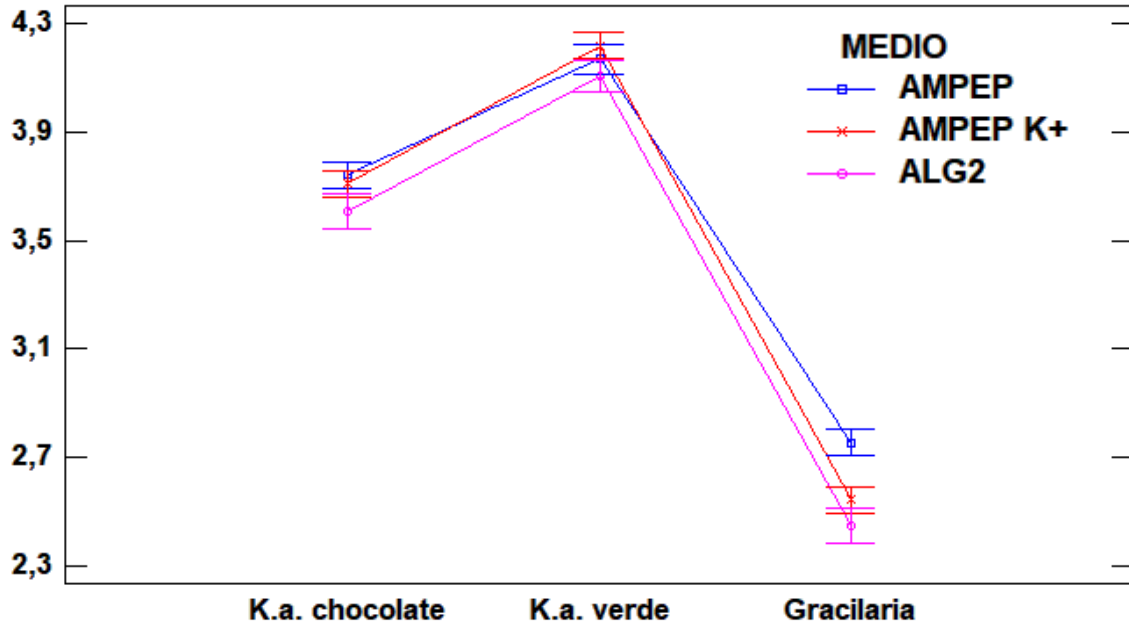


Fig 20. Prueba de rangos múltiples Especie y Medio

Al analizar los intervalos LSD en la Fig 20, se puede observar que el efecto sobre la masa para la especie *Kappaphycus alvarezii* chocolate cuando se utilizan el Medio AMPEP y AMPEP K⁺ son similares, es decir, se confunden entre sí. Y al utilizar el medio ALG₂ para la misma especie tiene un efecto menor sobre la masa. Continuando con la especie *Kappaphycus alvarezii* verde encontramos que el efecto que tienen todos los medios de cultivo sobre la masa es similar ya que los intervalos LSD se solapan entre sí, y por tanto, para esta especie ningún medio de cultivo sobresale de otro. Finalizando con la especie *Gracilaria blodgettii* encontramos que el efecto que tienen sobre la masa los tratamientos que utilizaron los medios de cultivo AMPEP K⁺ y LG₂ se confunden entre sí y son significativamente menores de los tratamientos que utilizaron el medio de cultivo AMPEP

Se puede concluir que para la especie *Gracilaria blodgettii* el medio de cultivo que mayor efecto tuvo sobre la masa de sus explantos fue el AMPEP. También es importante mencionar, que el efecto que tiene el ALG₂ sobre la masa de la especie *Kappaphycus alvarezii* chocolate es menor que al utilizar los otros medios de cultivo. Por último, no hay el efecto del medio de cultivo sobre la masa de los explantos en la especie *Kappaphycus alvarezii* verde.

5.3.1.2.2 INTERACCIÓN MEDIO-BIORREGULADOR

Aunque el Biorregulador por sí solo no tiene un efecto significativo sobre la masa, en la Fig 21 se puede observar que si hay un efecto significativo del biorregulador junto con el Medio de cultivo AMPEP.

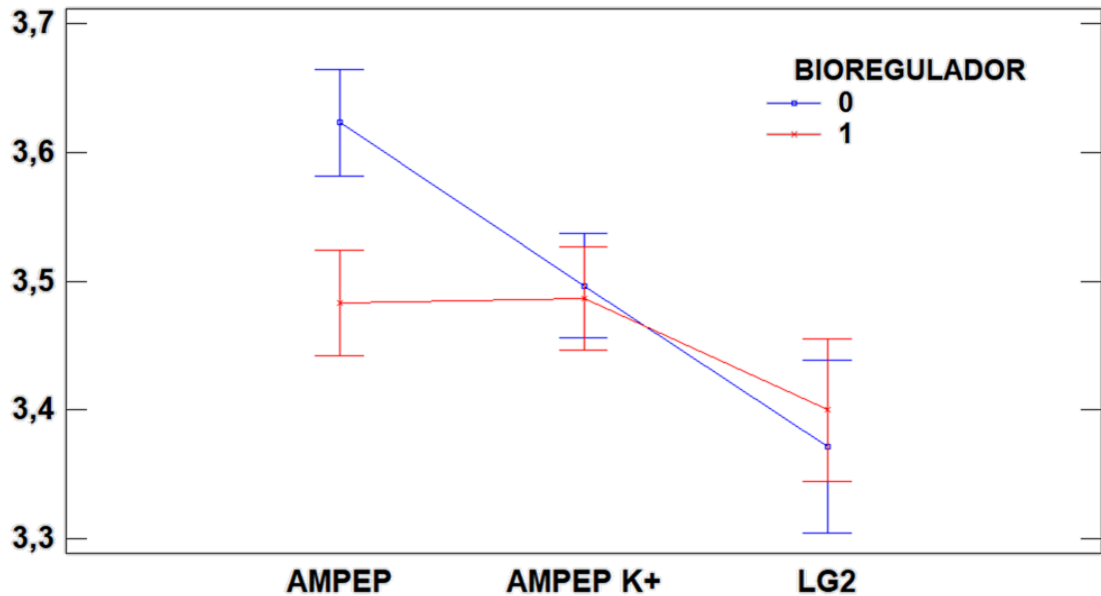


Fig 21. Prueba de rangos múltiples Medio de cultivo y biorregulador

Se puede concluir que el efecto en la masa en los explantos es mayor con el medio de cultivo AMPEP sin necesitar de biorregulador, y si este es utilizado su efecto es contrario a lo esperado. Para los medios de cultivo AMPEP K⁺ Y ALG₂ la presencia del biorregulador es indiferente.

5.3.1.2.3 INTERACCIÓN MEDIO -DIA

La interacción del tiempo con el medio de cultivo es estadísticamente significativa. En la Fig 22 se puede apreciar que utilizando el Medio de cultivo AMPEP la masa se incrementa durante el cultivo in-vitro con una tendencia de apariencia lineal y por encima de los demás medios.

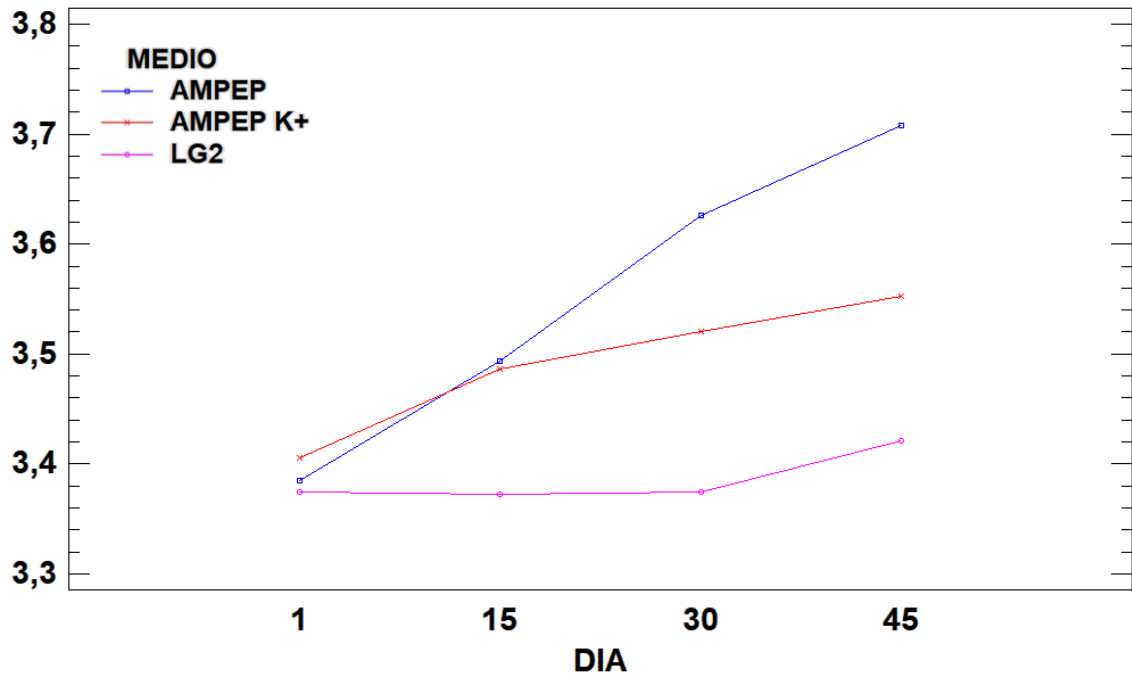


Fig 22. Prueba de rangos múltiples medio de cultivo y día

Utilizando el medio AMPEP K+, el incremento de la masa muestra un comportamiento similar al AMPEP hasta el día 15, pero este incremento se reduce conforme pasan los días, indicando la posible existencia de una componente cuadrática. El medio de cultivo ALG₂ no parece tener un efecto sobre el incremento de la masa sino hasta el día 30 y solo mejora hacia el día 45.

5.3.2 REGRESIÓN MÚLTIPLE

Se quiere analizar la relación entre la pauta de variabilidad de la masa y los valores de los factores que componen los tratamientos. Para esto, se plantea un modelo de regresión múltiple, este, convertirá las relaciones significativas observadas en el ANOVA, en un modelo que permita predecir la masa del explanto, incluyendo efectos cuadráticos y cúbicos del tiempo.

Para la realización de esta regresión múltiple se toman las siguientes consideraciones en los factores:

- La masa del explanto como variable dependiente seguirá utilizando una transformación logarítmica.
- El factor Especie que es una variable categórica, será transformada a dos variables dummy. Para esto, se escoge como referencia la especie *Kappaphycus alvarezii* chocolate, pues esta especie mostró en el ANOVA un efecto intermedio en la masa con relación a las demás especies. Se crea la primera variable de nombre ESP_GRACILARIA,

esta variable tomará el valor de uno cuando la especie a la que pertenece un explanto es *Gracilaria blodgettii*, en otros casos tomará el valor de cero. De manera similar se crea la segunda variable de nombre ESP_KAVERDE, esta variable tomara el valor de uno cuando la especie a la que pertenece un explanto es *Kappaphycus alvarezii* verde, en otros casos tomara el valor de cero.

- ESP_GRACILARIA
 - ESP_KAVERDE
- El factor Medio de cultivo, que también es una variable categórica, será transformado a dos variables dummy. Para esto se escoge como referencia el medio AMPEP K⁺, pues este medio de cultivo mostró en el ANOVA un efecto intermedio sobre la masa con relación a los demás medios de cultivo. Se crea la primera variable de nombre MED_AMPEP, esta variable tomará el valor de uno cuando el medio de cultivo utilizado sea AMPEP, en otros casos tomará el valor de cero. De manera similar se crea la segunda variable MED_ALG, esta variable tomará el valor de uno cuando el medio de cultivo utilizado sea ALG₂, en otros casos tomara el valor de cero.
 - MED_AMPEP
 - MED_ALG
 - Como la interacción Especie y Medio de cultivo son significativas en el ANOVA y se incluirá en el modelo.
 - MED_AMPEP * ESP_GRACILARIA
 - MED_ALG * ESP_GRACILARIA
 - MED_AMPEP * ESP_KAV
 - MED_ALG * ESP_KAV
 - La variable Biorregulador no tendrá ninguna transformación. Esta variable toma el valor de uno cuando se incluye biorregulador en el tratamiento, de lo contrario toma el valor cero. En el ANOVA esta variable es significativa cuando interactúa junto con el Medio de cultivo.
 - BIORREGULADOR * D_MED_AMPEP
 - BIORREGULADOR * D_MED_ALG
 - Se estudiará el componente lineal del factor Día, también se estudiará si existe una relación cuadrática (DIA²) o incluso cubica (DIA³). En el ANOVA la interacción Medio de cultivo y el día es significativa por lo que e incluirá en el modelo para las 3 componentes.
 - DIA, DIA² y DIA³
 - DIA * MED_AMPEP
 - DIA² * MED_AMPEP
 - DIA³ * MED_AMPEP
 - DIA * MED_ALG
 - DIA² * MED_ALG
 - DIA³ * MED_ALG

Para simplificar el número de factores del modelo de regresión lineal múltiple, se configura en el software como procedimiento de ajuste la selección paso a paso hacia adelante. Para esto, se utiliza como criterio de selección el valor-P, en el cual, se establece un límite menor o igual a 0.05 para agregar un factor en el modelo, y para retirar un factor del modelo se establece un valor-P mayor a 0.05.

La siguiente tabla muestra los resultados de ajustar un modelo que describe de manera simplificada la relación entre la transformación logarítmica del peso y las variables independientes seleccionadas.

Parámetro	Estimación	Estándar	T	Valor-P
CONSTANTE	3,6232	0,0273	132,44	0,0000
DIA	0,0039	0,0010	4,11	0,0000
MED_ALG*DIA	-0,0038	0,0014	-2,75	0,0059
MED_AMPEP*DIA	0,0035	0,0013	2,81	0,0050
ESP_GRACILARIA	-1,1720	0,0358	-32,71	0,0000
ESP_GRACILARIA * MED_AMPEP	0,2047	0,0508	4,03	0,0001
ESP_KAVERDE	0,4756	0,0304	15,65	0,0000
MED_AMPEP*BIOREGULADOR	-0,1441	0,0373	-3,86	0,0001

Tabla 13. Regresión Múltiple con método de selección hacia adelante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	273,35	7	39,0501	416,47	0,0000
Residuo	57,1963	610	0,0937644		
Total (Corr.)	330,547	617			

Tabla 14. ANOVA - Regresión Multivariante

En la Tabla 14 del ANOVA resume el modelo resultante de la Regresión Multivariante, este modelo está simplificando y solo incluye las variables independientes cuyo valor-P es menor o igual a 0.05. Para llegar a este modelo el proceso requirió de 7 pasos o iteraciones.

El estadístico R² ajustado indica que el modelo explica 82,19% de la variabilidad en la masa. Aunque este porcentaje es una proporción elevada no es un excelente modelo, es decir que existen otros factores que no se tuvieron en cuenta y que ayudarían a explicar el aumento de la masa.

La ecuación del modelo ajustado es la siguiente:

$$\begin{aligned} \text{LOG(Masa)} = & 3,7027 - (1,27299 * \text{ESP_GRACILARIA}) + (0,0057 * \text{ESP_GRACILARIA} \\ & * \text{DIA}) + (0,4744 * \text{ESP_KAVERDE}) - (0,08156 * \text{MED_ALG}) \\ & + (0,0048 * \text{MED_AMPEP} * \text{DIA}) + (0,1676 * \text{ESP_GRACILARIA} \\ & * \text{MED_AMPEP}) - (0,1616 * \text{MED_AMPEP} * \text{BIOREGULADOR}) \end{aligned}$$

Donde al resolver la transformación logarítmica la ecuación del peso en miligramos es:

$$Masa = e^{3,7027} * e^{-1,27299*ESP_GRACILARIA} * e^{0,0057*ESP_GRACILARIA * DIA} \\ * e^{0,4744*ESP_KAVERDE} * e^{-0,08156*MED_LG} * e^{0,0048*MED_AMPEP*DIA} \\ * e^{0,1676*ESP_GRACILARIA*D_MED_AMPEP} * e^{-0,1616*MED_AMPEP*BIOREGULADOR}$$

La constante o referencia de 3,7027, corresponde al logaritmo de la masa de la especie *Kappaphycus alvarezii* chocolate cuando utiliza medio de cultivo AMPEP K⁺ sin la adición de biorregulador en el día 0, es decir, esta referencia equivale a 40.55 mg. Con base a esta ecuación, la masa variaría según:

1. No hay un efecto cuadrático ni cúbico del tiempo, ni en solitario ni en la interacción del medio de cultivo.
2. El coeficiente para el factor ESP_GRACILARIA es -1.273, este coeficiente indica que cuando la especie cambia a *Gracilaria blodgettii* la masa disminuye en 1.273%.
3. El coeficiente para la interacción ESP_GRACILARIA * DIA es 0.0057, este coeficiente indica que cuando la especie cambia *Gracilaria blodgettii* la masa aumenta 0.006% por cada día transcurrido.
4. El coeficiente para el factor ESP_KAVERDE es 0.4744, este coeficiente indica que cuando la especie es *Kappaphycus alvarezii* verde la masa aumenta 0,47%
5. El coeficiente para el factor MED_ALG es -0,0816, este coeficiente indica que cuando el medio de cultivo cambia a ALG₂ la masa disminuye -0,08%.
6. El coeficiente para la interacción de MED_AMPEP * DIA es 0,00480311, este coeficiente indica que cuando cambia el medio de cultivo a AMPEP, la masa aumenta 0.005% por cada día transcurrido.
7. El coeficiente para la interacción ESP_GRACILARIA * MED_AMPEP es 0,167608, este coeficiente indica que cuando la especie cambia a *Gracilaria blodgettii* y el medio de cultivo utilizado cambia a AMPEP la masa aumenta 0,17%
8. El coeficiente de la interacción MED_AMPEP * BIORREGULADOR es -0,161593, este coeficiente indica que cuando se usa el Medio de cultivo es AMPEP junto con el Biorregulador la masa disminuye en 0.162%

En conclusión, al estimar los valores medio esperados de la masa para el día 45 se obtiene que las especies *Gracilaria blodgettii*, *Kappaphycus alvarezii* chocolate y *Kappaphycus alvarezii* verde desarrollaran mejor su masa utilizando el medio de cultivo AMPEP sin el uso del biorregulador. Dicho esto, los siguientes son los valores medio esperados de la masa para el día 45 con el uso del medio AMPEP sin biorregulador:

Especie	Media esperada día 0	Media esperada día 45
Gracilaria blodgettii	13.43 mg	21.54 mg
Kappaphycus alvarezii chocolate	40.56 mg	50.34 mg
Kappaphycus alvarezii verde	65.18 mg	80.90 mg

Fig 23. Valores medios esperados de la masa por especie

También se puede concluir que si se desea maximizar la masa de los explantos del cultivo in-vitro el uso del medio de cultivo LG₂ con biorregulador no es una elección para considerar.

5.3.2.1 VALIDACIÓN DEL MODELO DE REGRESIÓN

Los residuos (o errores) son la diferencia de los valores observados con respecto a los valores que predice el modelo, y para la validación del modelo se debe verificar si estos residuos cumplen con los principios de Normalidad, Autocorrelación y Homocedasticidad.

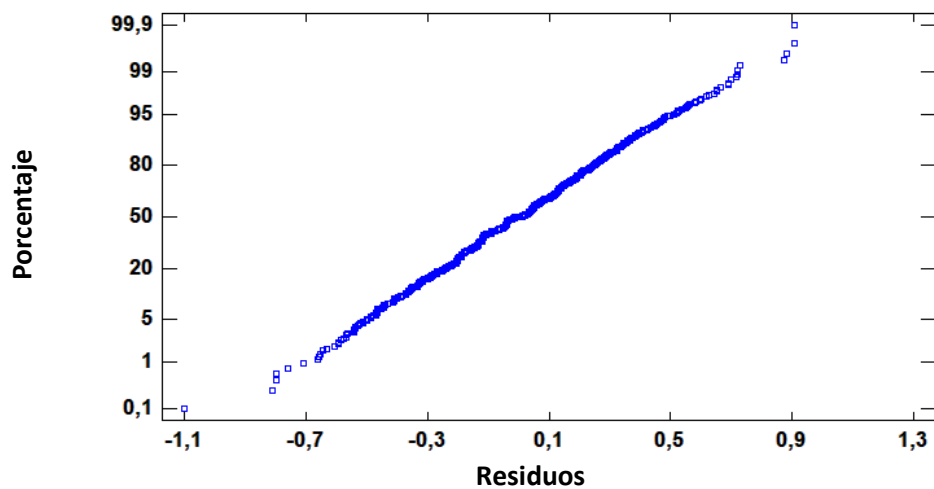


Fig 24. Gráfico de distribución normal de los residuos

Para la validación del modelo, se utiliza el gráfico probabilístico normal. Este gráfico, se utiliza para representar la distribución de los residuos y detectar observaciones atípicas. En la Fig 24, se aprecia que los residuos se alinean prácticamente en una recta, indicando que tienen un comportamiento normal.

Se dice que existe autocorrelación del error cuando éstos están relacionados linealmente entre sí. La mejor forma de comprobar la correlación en un modelo de regresión es utilizar las funciones de autocorrelación simple FAS y autocorrelación parcial FAP de los residuos.

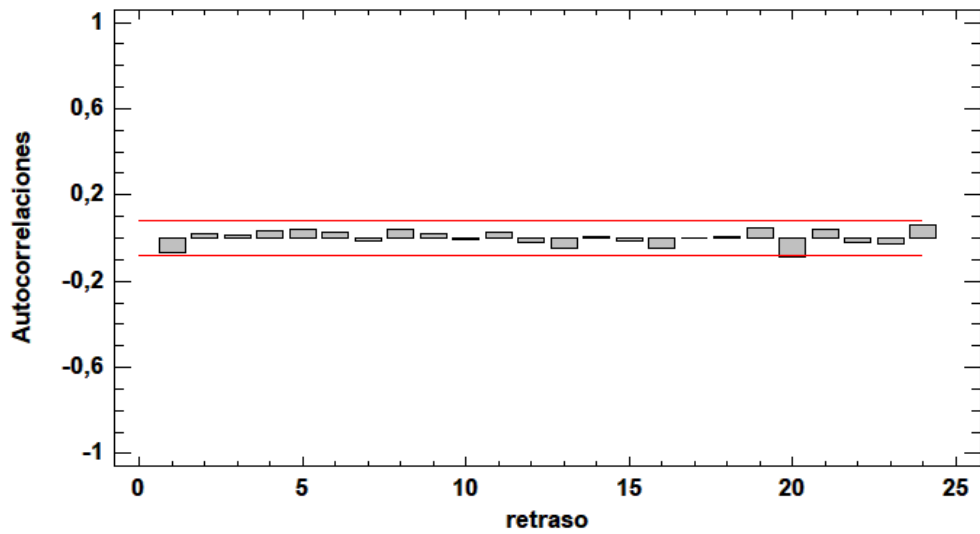


Fig 25. Autocorrelaciones estimadas para los residuos - FAS

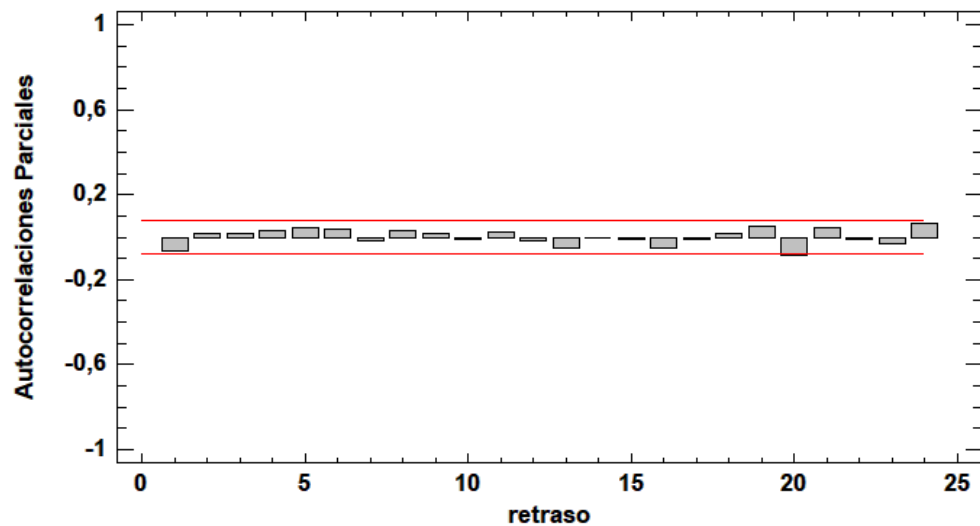


Fig 26. Autocorrelaciones parciales estimadas para los residuos - FAP

Se puede identificar en las Fig 25 y Fig 26 que ninguno de los coeficientes de correlación sobrepasa los límites de la prueba de hipótesis. En este caso se puede afirmar que ningún coeficiente de correlación poblacional no es significativo, y por lo tanto el error no está relacionado consigo mismo.

Para identificar si los residuos cumplen con el principio de homocedasticidad se realiza un estudio de efectos sobre dispersión (Romero Villafranca & Zúnica Ramajo, 1987), el cual, se verá en el siguiente apartado.

5.3.3 ESTUDIO DE EFECTOS SOBRE DISPERSIÓN

Además de estudiar si existe un efecto de los factores considerados sobre el promedio de la masa, también es interesante analizar si estos factores afectan a la variabilidad de la masa de los explantos. Una variabilidad pequeña implica un comportamiento más homogéneo de los explantos, en cuanto a ganancia de peso a lo largo de su crecimiento.

Al realizar una nueva regresión múltiple utilizando los mismos factores y la misma referencia que en la regresión múltiple (*Kappaphycus alvarezii* chocolate junto con AMPEP K+ sin el uso de biorregulador), y como variable dependiente se utiliza los residuos al cuadrado se obtiene la siguiente tabla:

Parámetro	Estimación	Error Estándar	Estadístico T	Valor-P
CONSTANTE	0,0446761	0,0081073	5,5106	0,0000
ESP_KVERDE	0,0761885	0,0121203	6,28603	0,0000
ESP_KVERDE*LG	0,0547931	0,0200014	2,73947	0,0062
BIOREGULADOR	0,0350364	0,0101933	3,43721	0,0006

Fig 27. Efectos sobre dispersión - Regresión Múltiple

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1,45497	3	0,484991	30,27	0,0000
Residuo	9,83919	614	0,0160247		
Total (Corr.)	11,2942	617			

Fig 28. Efectos sobre dispersión - Análisis de varianza

El estadístico R^2 ajustado indica que el modelo explica 12,46% de la varianza en la masa. En este modelo el R^2 no es muy elevado, es decir que existen otros factores que no se tuvieron en cuenta y que ayudarían a explicar la variabilidad de la masa.

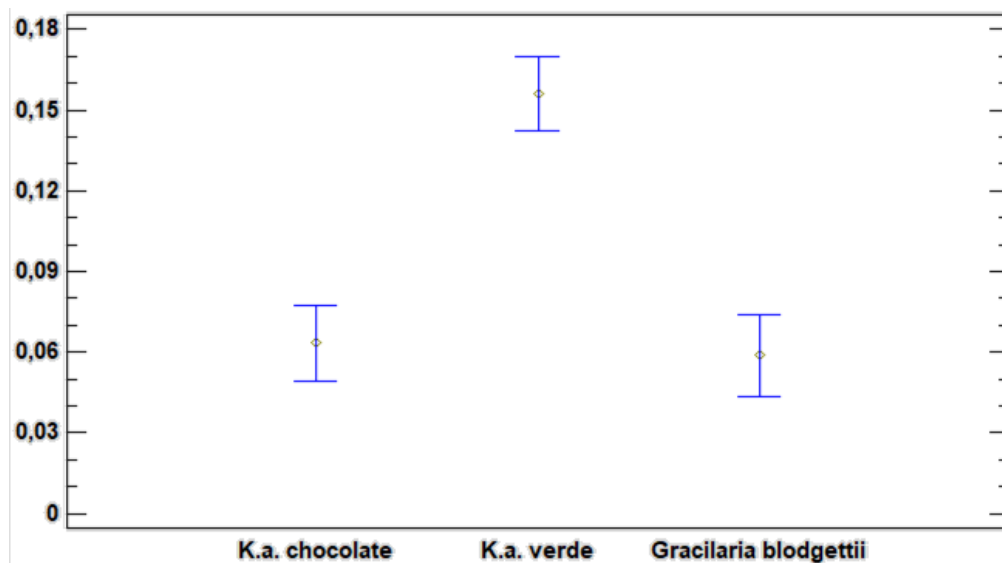


Fig 29. Pruebas de rangos múltiples Especie-residuos²

El modelo al ser significativo, indica que la especie *Kappaphycus alvarezii* verde tiene un efecto significativo en la variabilidad de la masa, es decir, con esta especie se tienen explantos de peso muy variados, algunos con mucha más masa que otros en comparación con la especie *Kappaphycus alvarezii* chocolate. Esta variabilidad es mayor cuando se utiliza en esta especie el medio de cultivo ALG₂.

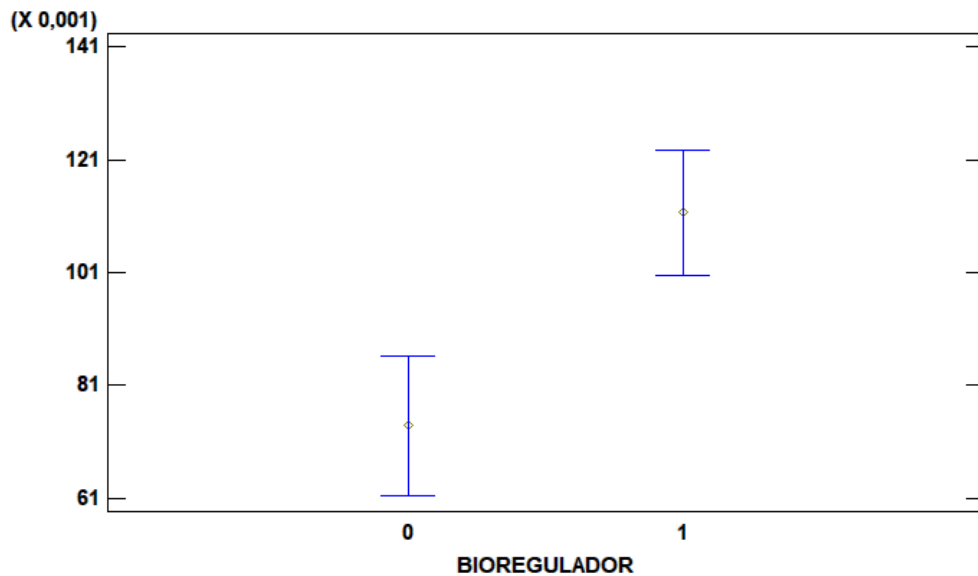


Fig 30. Pruebas de rangos múltiples Biorregulador-residuos²

Otro factor significativo es el Biorregulador, si no se utiliza biorregulador la variabilidad de la masa de los explantos es menor en comparación de cuando se utiliza biorregulador.

En conclusión, El uso de las especies *Kappaphycus alvarezii* chocolate y *Gracilaria blodgettii* generarán explantos con masa menos variable. Por el contrario, la especie *Kappaphycus alvarezii* verde es la que genera explantos con la mayor variabilidad en su masa. Adicionalmente si se quiere generar explantos con una masa menos variable lo mejor es no utilizar biorregulador.

5.4. ESTUDIO DEL EFECTO SOBRE LA TASA DE CRECIMIENTO

Se estudiará el efecto que tiene la especie, el medio de cultivo y el biorregulador, sobre la tasa de crecimiento calculada para la masa de los explantos en el último día del cultivo *in-vitro*. Se espera determinar no solo si cada uno de los factores influye en la respuesta, sino también si existe una interacción de segundo orden significativa. Para esto, se plantea un modelo de regresión múltiple que permitirá generar un modelo que permita predecir la tasa de crecimiento de la masa de un explanto.

5.4.1 REGRESIÓN MÚLTIPLE

Como el estudio de los parámetros sobre la tasa de crecimiento TC suele hacerse en los trabajos publicados de esta área, se pretende hacer un modelo que explique los efectos que tiene los factores especie del alga, medio de cultivo y biorregulador sobre la tasa de crecimiento calculada el día 45. También, se incluirán las interacciones de segundo orden para identificar si estas son significativas.

Para este modelo se selecciona como referencia la especie *Kappaphycus alvarezii* chocolate y el medio de cultivo AMPEP K⁺, estos niveles que se seleccionaron, corresponden a aquellos niveles que tienen una tasa de crecimiento intermedia en los análisis descriptivos.

Parámetro	Estimación	Error Estándar	Estadístico T	Valor-P
CONSTANTE	0,392531	0,0318748	12,3148	0,0000
ESP_KVERDE	-0,206723	0,0510506	-4,04939	0,0001
MED_AMPEP*ESP_GRACILARIA	0,830748	0,0644445	12,8909	0,0000
MED_ALG	-0,526757	0,0760689	-6,92474	0,0000
MED_ALG*ESP_GRACILARIA	0,677551	0,144066	4,70306	0,0000

Tabla 15. Regresión Múltiple para la tasa de Crecimiento de la masa

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	19,6417	4	4,91042	82,38	0,0000
Residuo	6,97375	117	0,0596047		
Total (Corr.)	26,6154	121			

Tabla 16. ANOVA Regresión múltiple Tasa de Crecimiento

En la Tabla 16 del ANOVA resume el modelo resultante de la Regresión Multivariante para la tasa de crecimiento, este modelo está simplificado y solo incluye las variables independientes cuyo valor-P es menor o igual a 0.05. Para llegar a este modelo el proceso requirió de 8 pasos o iteraciones.

El estadístico R² ajustado indica que el modelo explica 70,90% de la variabilidad en la tasa de crecimiento, lo cual indica que no es un excelente modelo, es decir que existen otros factores que no se tuvieron en cuenta y que ayudarían a explicar la tasa de crecimiento.

Dentro de los factores que se encontraron significativos en el efecto de la media de la tasa de crecimiento se encuentran:

- La Especie *Kappaphycus alvarezii* verde, esta especie tiene un efecto significativamente menor en comparación al efecto en la media de la tasa de crecimiento de la especie *Kappaphycus alvarezii* chocolate.
- El medio de cultivo ALG₂, este medio de cultivo tiene un efecto significativamente menor en comparación al efecto que tiene sobre la media el medio de cultivo AMPEP K⁺.

- Los Efectos que tiene la especie *Gracilaria blodgettii* cuando se utiliza el medio de cultivo AMPEP o el medio de cultivo ALG₂ son significativamente mayor en comparación a el efecto que tiene la especie *Kappaphycus verde chocolate* utilizando AMPEP K⁺.
- La tasa de crecimiento diario es indiferente al uso del biorregulador.

En conclusión, la especie quien desarrollo la mayor tasa de crecimiento es la *Gracilaria blodgettii* con el uso de AMPEP. También se puede indicar que el medio de cultivo ALG₂ tiene un efecto contrario a lo esperado en la tasa de crecimiento.

5.4.1.1 VALIDACIÓN DEL MODELO DE REGRESIÓN

Los residuos (o errores) son la diferencia de los valores observados con respecto a los valores que predice el modelo, para la validación del modelo se verifican si estos residuos cumplen con los principios de Normalidad, Autocorrelación y Homocedasticidad.

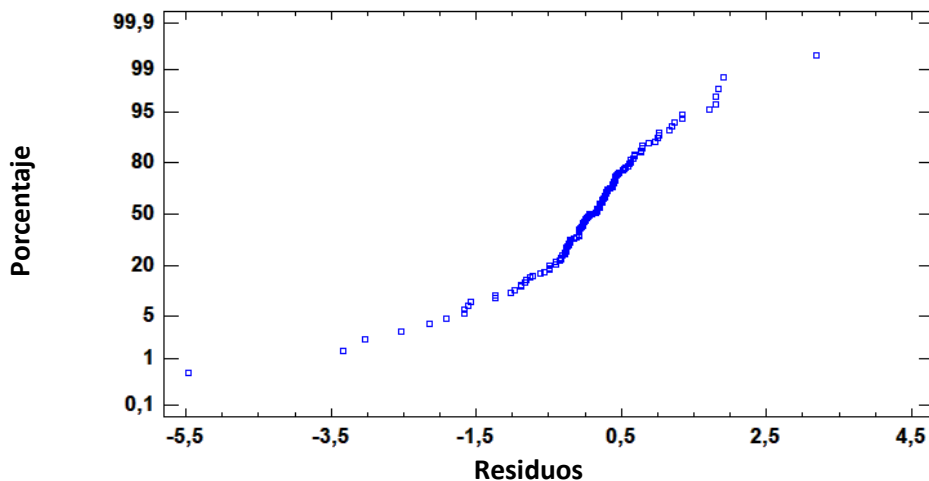


Fig 31. Gráfico de distribución normal de los residuos

Para la validación del modelo, se utiliza el gráfico probabilístico normal. Puesto que en la Fig 24 se aprecia que los residuos no se alinean en una recta, indica que no existe en ellos un comportamiento normal debido a la existencia de valores anómalos que sería necesario identificar y justificar.

Se dice que existe autocorrelación cuando los valores del error están relacionados linealmente entre sí. La mejor forma de comprobar la correlación en un modelo de regresión es utilizar las funciones de autocorrelación simple FAS y autocorrelación parcial FAP de los residuos.

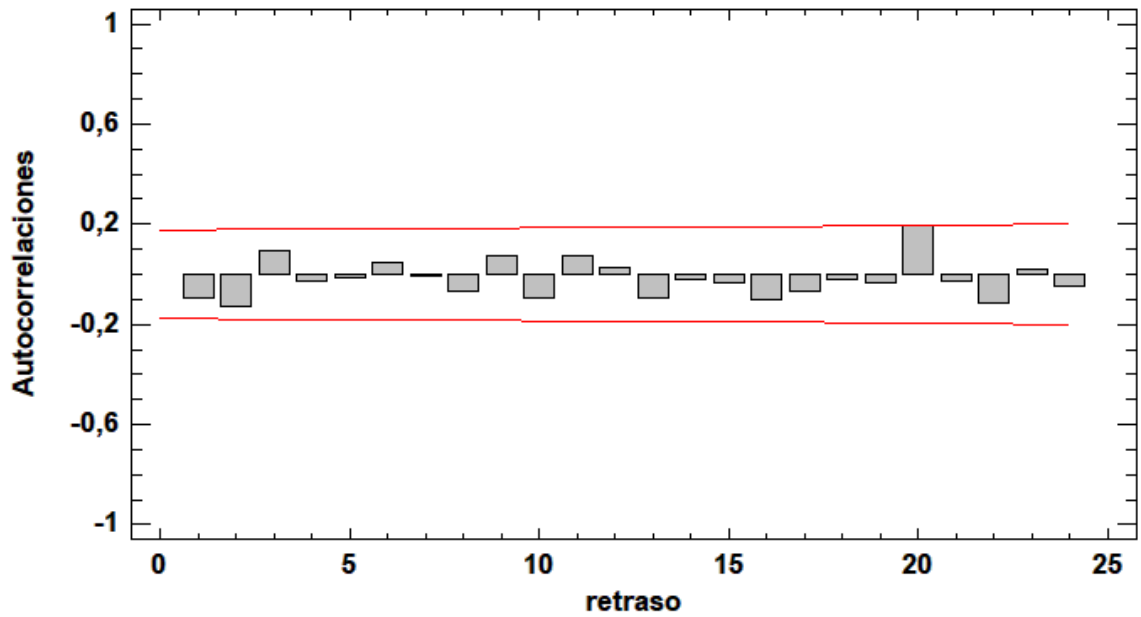


Fig 32. Autocorrelaciones estimadas para los residuos de la tasa de crecimiento - FAS

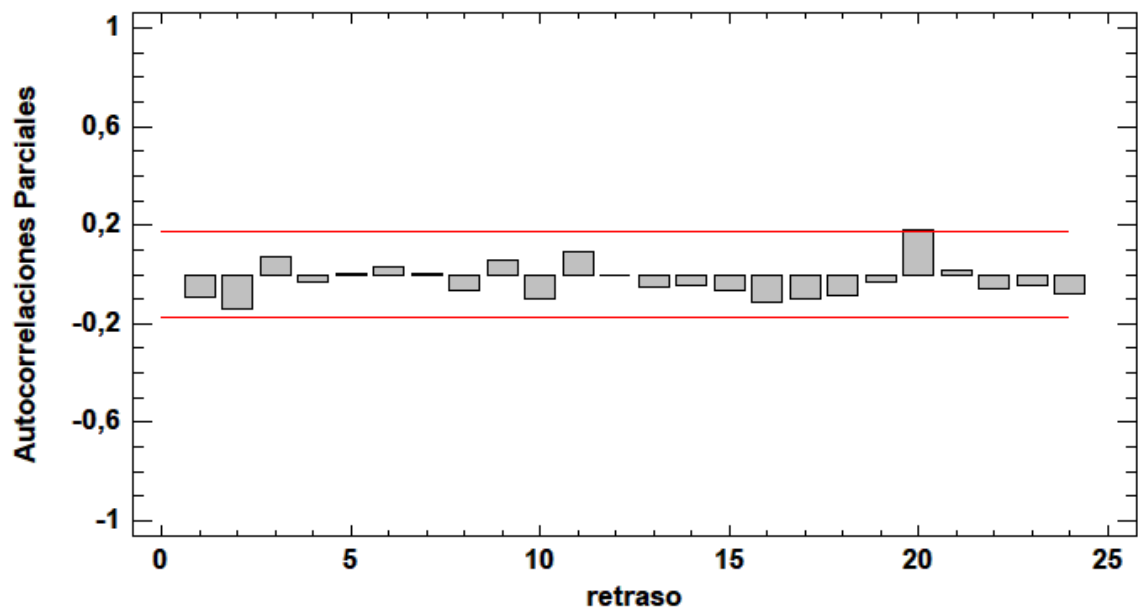


Fig 33. Autocorrelaciones parciales para los residuos de la tasa de crecimiento - FAP

Se puede identificar en las Fig 32 y Fig 33 que ninguno de los coeficientes de correlación sobrepasa los límites de la prueba de hipótesis. En este caso se puede afirmar que ningún coeficiente de correlación poblacional no es significativo, y por lo tanto el error no está relacionado consigo mismo.

Para identificar si los residuos cumplen con el principio de homocedasticidad se utiliza un estudio de efectos sobre dispersión, el cual, se verá en el siguiente apartado.

5.4.2 ESTUDIO DE EFECTOS SOBRE DISPERSIÓN

Además de estudiar si existe un efecto de los factores considerados sobre el promedio de la tasa de crecimiento de la masa, también es interesante analizar si estos factores afectan a la variabilidad de la tasa de crecimiento. De manera similar que en la variabilidad de la masa, una variabilidad pequeña en la tasa de crecimiento implica un comportamiento más homogéneo de los explantos, en cuanto a ganancia de peso a lo largo de su crecimiento aunque solo de aquellos que llegaron vivos al día 45.

Se realiza una Regresión Múltiple utilizando los factores simples e interacciones de segundo orden, y utilizando de referencia para la especie *Kappaphycus alvarezii* chocolate y para el medio de cultivo AMPEP K+, se estudia el efecto que tienen estos factores sobre la variabilidad de la tasa de crecimiento.

Parámetro	Estimación	Error Estándar	Estadístico T	Valor-P
CONSTANTE	0,535013	0,22589	2,36847	0,0195
MED_ALG	9,02963	1,17853	7,66179	0,0000
MED_ALG*BIORREGULADOR	3,9899	1,26527	3,1534	0,0021
MED_ALG*ESP_GRACILARIA	-10,8188	1,62175	-6,67106	0,0000
MED_ALG*ESP_KVERDE	-10,0792	1,41865	-7,10478	0,0000

Fig 34. Efectos sobre dispersión en la tasa de crecimiento - Regresión Múltiple

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	605,991	4	151,498	28,01	0,0000
Residuo	632,826	117	5,40877		
Total (Corr.)	1238,82	121			

Fig 35. Efectos sobre dispersión en la tasa de crecimiento - Análisis de varianza

El estadístico R^2 ajustado indica que el modelo explica 47,17% de la varianza en la masa. En este modelo el R^2 no es muy elevado, es decir que existen otros factores que no se tuvieron en cuenta y que ayudarían a explicar la variabilidad de la tasa de crecimiento.

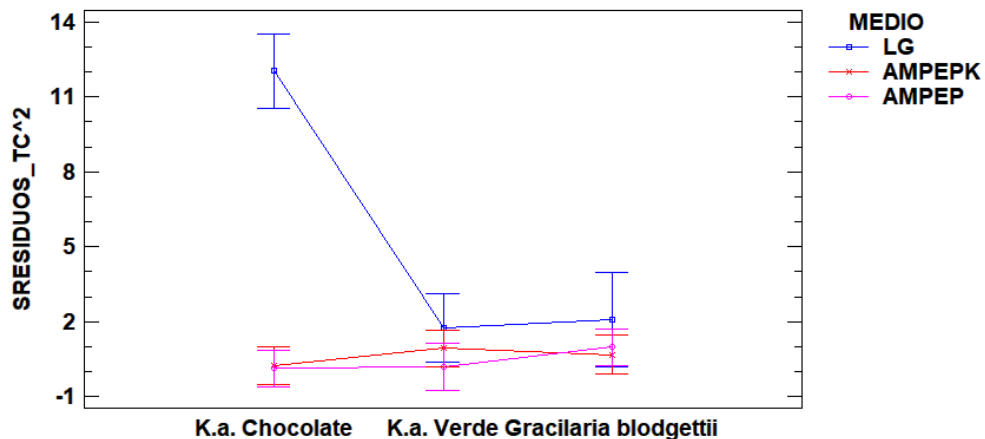


Fig 36. Pruebas de rangos múltiples Especie-Medio-residuos²

El modelo al ser significativo, indica que el medio de cultivo ALG₂ tiene un efecto significativo en la variabilidad de la tasa de crecimiento, es decir, con este medio se tienen explantos con tasas de crecimientos muy variadas, en comparación a los que utilizaron el medio de cultivo AMPEP K⁺ quienes tienen una tasa de crecimiento más uniforme. También la interacción del Biorregulador cuando se utiliza junto con el medio de cultivo ALG₂ es significativo, esta combinación genera mayor variabilidad que el uso del medio de referencia AMPEP K⁺ con biorregulador. Por otra parte, se presenta que al utilizar el medio de cultivo ALG₂ junto con las especies *Gracilaria blodgettii* y *Kappaphycus alvarezii* verde, la variabilidad de la tasa de crecimiento es menor comparado con la especie *Kappaphycus alvarezii* chocolate cuando usa el medio de cultivo ALG₂.

En conclusión, si se quiere generar explantos con una tasa de crecimiento más uniforme lo mejor es utilizar los medios de cultivo AMPEP y AMPEP K⁺.

5.5. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

Es importante que al finalizar el cultivo *in-vitro* los explantos utilizados lleguen vivos al día 45, con el fin de que la mayor cantidad de explantos puedan entregarse a los cultivadores de las granjas marinas. En este análisis, se desea estudiar si los factores como lo son el medio de cultivo, la especie y el biorregulador tienen un efecto en la probabilidad de supervivencia de los explantos. También se plantea incluir si observando el crecimiento hasta el día 15 se puede predecir lo que ocurrirá en el día 45, en cuanto a supervivencia.

Para este estudio se toma como referencia la especie *Gracilaria blodgettii* y el medio de cultivo AMPEP. Esta referencia es seleccionada porque tanto la especie como el medio de cultivo tuvieron los conteos intermedios en el número de explantos en el día 45. La variable dependiente de este estudio es la supervivencia la cual toma un valor de uno cuando el explanto llegó vivo al día 45, de lo contrario, toma valor de cero.

Se utilizaron como factores cualitativos:

- Especie del alga
- Medio de cultivo
- Biorregulador

Se utilizaron como factores cuantitativos:

- Tasa de Crecimiento del día 15

El resultado de este análisis se muestra a continuación.

La Tabla 17 nos muestra las pruebas de Razón de Verosimilitud, en esta tabla se observa que la tasa de crecimiento del día 15 y el medio de cultivo tienen un efecto significativo en la supervivencia de los explantos.

Factor	Chi-Cuadrada	GI	Valor-P
TasaCrecimiento	5,15201	1	0,0232
MEDIO	38,1977	2	0,0000

Tabla 17. Pruebas de Razón de Verosimilitud

De las variables que se consideraron, aquellas que resultaron significativas en el análisis de la supervivencia son: la tasa de crecimiento calculada en el día 15 y el medio de cultivo.

Parámetro	Estimado	Error Estándar
CONSTANTE	0,774165	0,232855
TasaCrecimiento	0,431922	0,20093
MEDIO=ALG	-1,33905	0,292534
MEDIO=AMPEPK	0,372587	0,308746

Tabla 18. Modelo estimado de regresión.

En el modelo estimado de regresión, Tabla 18, encontramos aquellos niveles de los factores que influyen significativamente en la supervivencia de los explantos. Dentro de estos factores, se encuentra la tasa de crecimiento, este factor, tiene un coeficiente positivo que indica que cuando la tasa de crecimiento aumenta, hay mayor probabilidad de que un explanto llegue vivo al día 45 del cultivo in-vitro. Siguiendo con el medio de cultivo, encontramos que cuando se utiliza el AMPEP K⁺, hay mayor probabilidad de sobrevivir de los explantos, en comparación al utilizar AMPEP. Sin embargo, si se utiliza el medio de cultivo ALG₂, el efecto en la supervivencia es inverso en comparación al uso del medio de cultivo AMPEP.

El modelo, aunque significativo valor-P < 0.05, explica únicamente un porcentaje ajustado de 28.58%, esto quiere decir, que existen otros factores que no se han tenido en cuenta y que pueden afectar la supervivencia de los explantos.

Como posibles cuestiones que ayudarán a explicar la supervivencia del explanto, se plantea incluir la posición que ocupa el tubo de ensayo dentro de la gradilla, esta propuesta, se debe a que se cree que estas posiciones afecten la intensidad de la luz recibida por el explanto. Otro factor planteado, son los valores de la temperatura y humedad durante el cultivo in-vitro. Como última sugerencia, y debido a que los explantos durante el cultivo in-vitro son manipulados cada cierto periodo, se propone registrar este tiempo de manipulación, y si hubo o no inconvenientes en su manipulación, por ejemplo, caídas, fuerte presión de las pinzas, impurezas en la balanza entre otras.

6. CONCLUSIONES

Después de haber realizado los análisis, se presentan a continuación las conclusiones obtenidas a partir de los resultados.

- I. En el problema de identificar la especie del alga marina de un explanto utilizando medidas sencillas y económicas, se puede concluir:
 - a. Dentro del marco de esta investigación y las especies que se utilizaron, las variables seleccionadas de la masa, el largo y el ancho, tienen potencial para diferenciar el alga a la que pertenece un explanto.
 - b. La primera función discriminante separa la especie *Gracilaria blodgettii* de las *Kappaphycus alvarezii*, y la diferencia entre ambas especies estriba en el diámetro de sus explantos, siendo los explantos de la especie *Gracilaria blodgettii* muchos más delgados que los explantos de las especies *Kappaphycus alvarezii* verde y chocolate.
 - c. Los explantos de la especie *Kappaphycus alvarezii* verde tienden a ser más anchos, pesados y con mayor diámetro que los explantos de las especies *Kappaphycus alvarezii* chocolate.
 - d. Es necesario buscar otras variables de medidas sencillas que permitan mejorar el poder discriminante del modelo, para diferenciar de manera más acertada las variedades de la especie *Kappaphycus alvarezii*.
- II. Sobre el estudio del efecto que tiene en la masa de explantos de diferentes especies de algas marinas, el medio de cultivo, y el biorregulador durante el cultivo in-vitro, se puede concluir:
 - a. Los efectos principales de la Especie, el Medio y el día son estadísticamente significativos en el desarrollo de la masa de los explantos, sin embargo, el biorregulador no ha resultado estadísticamente significativo. Y dentro de las interacciones la Especie Medio y medio biorregulador son estadísticamente significativas.
 - b. Si se desea seleccionar una especie que aporte la mayor cantidad de masa, esta debería ser la *Kappaphycus alvarezii* verde.
 - c. El medio de cultivo AMPEP desarrolla una mayor masa al finalizar el cultivo in-vitro. Mientras que el medio de cultivo ALG₂ es quien tiene menor efecto sobre la masa de los explantos al finalizar el cultivo in vitro.
 - d. Al ser el factor día un factor cuantitativo se analiza la existencia de una componente lineal o una componente de mayor nivel, y puesto que el incremento es positivo y se aprecia un aumento constante, implica que la relación es lineal creciente. También es importante tener en cuenta que al ser la masa utilizada como logaritmo indica que el aumento de la masa es exponencial, con aumento lineal del exponente.
 - e. El factor biorregulador no ha resultado ser estadísticamente significativo, es decir el biorregulador por sí solo no tiene un efecto significativo directo sobre la

masa, aunque si lo tiene indirecto, pues se encuentra una interacción junto al medio de cultivo la cual si es significativa.

- f. Para la especie *Gracilaria blodgettii* el medio de cultivo que mayor efecto tuvo sobre la masa de sus explantos fue el AMPEP.
 - g. El efecto que tiene el ALG₂ sobre la masa de la especie *Kappaphycus alvarezii* chocolate es menor que al utilizar los otros medios de cultivo.
 - h. No hay el efecto del medio de cultivo sobre la masa de los explantos en la especie *Kappaphycus alvarezii* verde.
 - i. El efecto en la masa en los explantos es mayor con el medio de cultivo AMPEP sin necesitar de biorregulador, y si este es utilizado su efecto es contrario a lo esperado. Para los medios de cultivo AMPEP K⁺ Y ALG₂ la presencia del biorregulador es indiferente.
 - j. Utilizando el Medio de cultivo AMPEP la masa se incrementa durante el cultivo in-vitro con una tendencia de apariencia lineal y por encima de los demás medios. Utilizando el medio AMPEP K⁺, el incremento de la masa muestra un comportamiento similar al AMPEP hasta el día 15, pero este incremento se reduce conforme pasan los días, indicando la posible existencia de una componente cuadrática. El medio de cultivo ALG₂ no parece tener un efecto sobre el incremento de la masa sino hasta el día 30 y solo mejora hacia el día 45.
 - k. Al estimar los valores medio esperados de la masa para el día 45 se obtiene que las especies *Gracilaria blodgettii*, *Kappaphycus alvarezii* chocolate y *Kappaphycus alvarezii* verde desarrollaran mejor su masa utilizando el medio de cultivo AMPEP sin el uso del biorregulador.
 - l. Si se desea maximizar la masa de los explantos del cultivo in-vitro el uso del medio de cultivo LG2 con biorregulador no es una elección para considerar.
- III. Sobre el efecto que tiene la especie del alga, los medios de cultivo y el biorregulador en la variabilidad de la masa de los explantos durante el cultivo in-vitro, se puede concluir:
- a. Las especies *Kappaphycus alvarezii* chocolate y *Gracilaria blodgettii* generarán explantos con masa más uniforme. Caso contrario sucede con la especie *Kappaphycus alvarezii* verde quien es la que genera explantos con la mayor variabilidad en su masa.
 - b. Si se quiere generar explantos con masa más uniforme lo mejor es no utilizar biorregulador.
- IV. Sobre el estudio del efecto que tiene en la tasa de crecimiento la especie del alga, el medio de cultivo, y el biorregulador al finalizar el cultivo in-vitro, se puede concluir:
- a. La especie que desarrolla la mayor tasa de crecimiento es la *Gracilaria blodgettii* con el uso de AMPEP.
 - b. El efecto que tiene en la tasa de crecimiento la especie *Gracilaria blodgettii* cuando se utiliza el medio de cultivo AMPEP o el medio de cultivo ALG₂ son significativamente mayores en comparación al efecto que tiene la especie *Kappaphycus* verde chocolate utilizando AMPEP K⁺.

- c. El efecto que tiene la especie *Kappaphycus alvarezii* verde en la tasa de crecimiento es significativamente menor a la de la especie *Kappaphycus alvarezii* chocolate.
 - d. La tasa de crecimiento diario es indiferente al uso del biorregulador.
- V. Sobre el estudio del efecto que tiene en la variabilidad de la tasa de crecimiento la especie de alga marina, el medio de cultivo, y el biorregulador al finalizar el cultivo in-vitro, se puede concluir:
 - a. El medio de cultivo ALG₂ tiene un efecto significativo en la variabilidad de la tasa de crecimiento, es decir, con este medio se tienen explantos con tasas de crecimientos muy variadas, en comparación a los que utilizaron los medios de cultivo AMPEP y AMPEP K⁺ quienes tienen una tasa de crecimiento más uniforme.
 - b. La variabilidad de la tasa de crecimiento es mayor cuando se utiliza el Biorregulador junto con el medio de cultivo ALG₂.
 - c. Al utilizar el medio de cultivo ALG₂ con las especies *Gracilaria blodgettii* y *Kappaphycus alvarezii* verde, la variabilidad de la tasa de crecimiento es menor comparado con la especie *Kappaphycus alvarezii* chocolate cuando usa el medio de cultivo ALG₂.
- VI. Sobre el tratamiento que maximice la producción de biomasa en los explantos al finalizar el cultivo in-vitro, se puede concluir:
 - a. Todas las especies desarrollarán su mayor masa en el día 45 con el medio de cultivo AMPEP y sin el uso de biorregulador.
- VII. Sobre la comparación del efecto que tiene sobre la masa la formulación de un nuevo medio de cultivo propuesto por GRAPAM, denominado ALG₂, con respecto a los medios AMPEP y AMPEP K⁺ se puede concluir:
 - a. Los explantos tratados con ALG₂ son los que menor biomasa obtuvieron.
 - b. El medio de cultivo ALG₂ tiene un efecto contrario a lo esperado en la tasa de crecimiento.
- VIII. Sobre el efecto que tiene en la probabilidad de supervivencia de los explantos de algas marinas, los medios de cultivos y Biorregulador se puede concluir:
 - a. Hay un efecto de la tasa de crecimiento en la supervivencia, donde si la tasa de crecimiento aumenta, hay mayor probabilidad de que un explanto llegue vivo al día 45 del cultivo in-vitro.
 - b. Cuando se utiliza el AMPEP K⁺, los explantos tienen mayor probabilidad de sobrevivir, en comparación de cuando se usa el AMPEP. Caso contrario que cuando es utilizado el medio de cultivo ALG₂.

Es natural, que los explantos desarrollen la masa en función al tiempo, pero es claro que cuando se utiliza el medio de cultivo AMPEP la masa se desarrolla mejor. Es decir si se desea aumentar la masa de las algas de esta investigación el AMPEP sería el medio de cultivo idóneo para utilizar. Y si se desea seleccionar la especie que mayor masa produce es la *Kappaphycus alvarezii* Verde la elección a considerar. Sin embargo, aún no se conoce el efecto de estos tratamientos en los

hidrocoloides de estas especies, ya que con respecto al biorregulador no se observa un efecto significativo en la masa de los explantos, sin embargo, es importante referir los estudios realizados que han descrito que el efecto de los biorreguladores se observa en un nivel celular, haciendo preciso realizar estudios microscópicos para identificarlos. Estos nuevos estudios podrán también cuantificar la cantidad de los derivados que se pueda extraer de las algas marinas como lo son la carragena y el agar-agar.

Sobre el medio de cultivo ALG₂, no es el medio idóneo para que los explantos desarrollen su masa ni aumente la supervivencia. Estos resultados se compartieron con GRAPAM quienes seguirán trabajando en esta fórmula.

7. TRABAJOS FUTUROS

En este trabajo se estudia el efecto que tiene la especie de un alga, los medios de cultivo, el uso de biorregulador durante el cultivo in-vitro para el desarrollo de la masa, la tasa de crecimiento y la supervivencia de explantos. Además se propone como técnica el análisis discriminante para identificar fácilmente una especie de alga y clasificar nuevos explantos sin necesitar de un conocimiento profundo. Este trabajo es sólo un primer paso en el estudio que las algas marinas pudieran demandar.

Uno de los interrogantes que se deja abierto en esta investigación es el análisis de la cantidad y calidad de los hidrocoloides que las algas experimentadas puedan o no producir. Se han propuesto técnicas con el uso de microscopios confocales laser para identificar la existencia de carragenina en las algas marinas. Un microscopio confocal genera imágenes hiper-espectrales las cuales permiten identificar en una determinada longitud de onda los compuestos que se encuentran en una fracción de alga marina.

Algunos de los explantos tratados en esta investigación fueron llevados al “Laboratory for Fluorecence Dynamics” de la Universidad de California en Irvine, CA, USA, donde se tomaron imágenes confocales generadas por el microscopio LSM710. El análisis de los resultados de estas imágenes hiper-espectrales será abordado para próximas investigaciones. Para extraer los datos de estas imágenes se ha trabajado con Python, un lenguaje de programación, mediante el cual ya se han programado algoritmos de recuperación que permiten extraer los datos contenidos en estas imágenes y de esta manera poder analizarlos estadísticamente. Hemos observado, que la cantidad de información generada por estas imágenes es bastante grande, y pudiera clasificarse en un proyecto Big Data. Este tipo de proyectos requieren estrategias más sofisticadas para su procesamiento. Aunque aún no se ha definido estas estrategias, preliminarmente se podría utilizar métodos que involucren inteligencia artificial y aprendizaje automático, como redes neuronales, o modelos naive Bayes, capaces de clasificar y generar un modelo para la identificación de los hidrocoloides.

Otra cuestión relevante para tratar en profundidad en futuras investigaciones es la inclusión de nuevas variables explicativas que permitan mejorar el modelo de supervivencia de los explantos a los cultivos in-vitro. Estas variables estarían relacionadas con características como la temperatura, la humedad, la estación del año donde transcurre el cultivo, la posición de un tubo de ensayo en la gradilla, e incluso el tiempo y la forma de manipulación de los explantos en los procesos de medición de la masa. Estas variables podrían aportar información clave que contribuyan a explicar mejor los modelos planteados en este trabajo.

8. BIBLIOGRAFIA

- Ali, M. M., Sani, M. Z. Bin, Hi, K. K., Yasir, S. M., Critchley, A. T., & Hurtado, A. Q. (2017). The comparative efficiency of a brown algal-derived biostimulant extract (AMPEP), with and without supplemented PGRs: the induction of direct, axis shoots as applied to the propagation of vegetative seedlings for the successful mass cultivation of three commercial strains of *Kappaphycus* in Sabah, Malaysia. *Journal of Applied Phycology*. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1366-1>
- Batista de Vega, G. (2009). Cultivo ecosostenible de *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P. C. Silva en Panama. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10553/2874>
- Batista de Vega, G., & Rafael, R. R. (2009). Cultivo Ecosostenible de Macroalgas Marinas y Aplicaciones.
- Cañal, M. J., Rodríguez, R., Fernández, B., Sánchez-Tames, R., & Majada, J. P. (2001). Fisiología del cultivo in vitro. *Instituto de Biotecnología de Las Plantas*.
- Collantes, G. E., Melo, C. A., & Candia, A. I. (1990). Micropropagación clonal, una alternativa biotecnológica en el cultivo de macroalgas marinas chilenas de importancia económica. *Arch. Biol. Med. Exp*, 23, 131–140.
- FAO. (2009). *Eucheuma* spp. In Cultured aquatic species fact sheets.
- Ferdouse, F., Holdt, S. L., Smith, R., Murua, P., & Yang, Z. (2018). The global status of seaweed production, trade and utilization.
- George E. P. Box, Hunter, J. S., & Hunter, W. G. (1993). *Estadística Para Investigadores*. Reverté.
- Hair, J. F., Anderson, R. E., Tatham, R. L., & Black, W. C. (1999). *Análisis multivariante* (Vol. 491). Prentice Hall Madrid.
- Hayashi, L., S. M. Faria, G., G. Nunes, B., Zitta, C., A. Scariot, L., Rover, T., ... Bouzon, Z. (2011). *Effects of salinity on the growth rate, carrageenan yield, and cellular structure of Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) cultured in vitro. *Journal of Applied Phycology* (Vol. 23). <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9595-6>
- Hayashi, L., Yokoya, N. S., Kikuchi, D. M., & Oliveira, E. C. (2009). Callus induction and micropropagation improved by colchicine and phyto regulators in *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) BT - Nineteenth International Seaweed Symposium: Proceedings of the 19th International Seaweed Symposium, held in Kobe, J. In M. A. Borowitzka, A. T. Critchley, S. Kraan, A. Peters, K. Sjøtun, & M. Notoya (Eds.) (pp. 203–209). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9619-8_25
- Hurtado, A. Q., Joe, M., Sanares, R. C., Fan, D., Prithviraj, B., & Critchley, A. T. (2012).

- Investigation of the application of Acadian Marine Plant Extract Powder (AMPEP) to enhance the growth, phenolic content, free radical scavenging, and iron chelating activities of *Kappaphycus* Doty (Solieriaceae, Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 24(3), 601–611. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9785-x>
- Johnson, B., & Gopakumar, G. (2011). Farming of the seaweed *Kappaphycus alvarezii* in Tamil Nadu coast-status and constraints. *Marine Fisheries Information Service*, (208), 1–5.
- Koch, R. (1882). The aetiology of tuberculosis, 221–230. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/4e07/b840b7eca19a692a57493bd6eb5c8c820bcd.pdf>
- Loureiro, R. R., Reis, R. P., Berrogain, F. D., & Critchley, A. T. (2012). Extract powder from the brown alga *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis (AMPEP): A “vaccine-like” effect on *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C. Silva. *Journal of Applied Phycology*, 24(3), 427–432. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9735-7>
- Marinho-Soriano, E., & Bourret, E. (2003). Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Bioresource Technology*, 90(3), 329–333. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00112-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00112-3)
- McHugh, D. J. (2002). PERSPECTIVAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ALGAS MARINAS EN LOS PAÍSES EN DESARROLLO. Retrieved from <http://www.fao.org/3/y3550s/Y3550S00.htm>
- Montgomery, D. C. (2005). *Análisis y Diseño de Experimentos*. LIMUSA S.A. de C.V.
- Neves, F. A. S., Simioni, C., Bouzon, Z. L., & Hayashi, L. (2015). Effects of spindle inhibitors and phyto regulators on the micropropagation of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales). *Journal of Applied Phycology*, 27(1), 437–445. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0309-3>
- Polne-Fuller, M., & Gibor, A. (1987). Calluses and callus-like growth in seaweeds: Induction and culture BT - Twelfth International Seaweed Symposium. In M. A. Ragan & C. J. Bird (Eds.) (pp. 131–138). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Reddy, C. R. K., Jha, B., Fujita, Y., & Ohno, M. (2009). Seaweed micropropagation techniques and their potentials: an overview BT - Nineteenth International Seaweed Symposium: Proceedings of the 19th International Seaweed Symposium, held in Kobe, Japan, 26-31 March, 2007. In M. A. Borowitzka, A. T. Critchley, S. Kraan, A. Peters, K. Sjøtun, & M. Notoya (Eds.) (pp. 159–167). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9619-8_21
- Romero Villafranca, R., & Zúñica Ramajo, L. R. (1987). Modelos para el estudio de efectos sobre la dispersión en ausencia de replicaciones. *Estadística Española*.
- Romero Villafranca, R., & Zúñica Ramajo, L. R. (2013). *Métodos Estadísticos para Ingenieros*. Valencia: Editorial Universitat Politècnica de València.

- Smith, S. (1984). *Panpites for power, panpites for play: the social management of cultural expression of Kuna society*. University of California, Berkeley.
- Sokal, R. (1995). *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. W.H. Freeman, NY.
- Tibubos, K. R., Hurtado, A. Q., & Critchley, A. T. (2017). Direct formation of axes in new plantlets of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty, as influenced by the use of AMPEP K+, spindle inhibitors, and plant growth hormones. In *Journal of Applied Phycology* (Vol. 29, pp. 2345–2349). <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0988-z>
- Walpole, R. E., Myers, R. H., Myers, S. L., & Ye, K. (2012). *Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias* (9^o). México: PEARSON EDUCACIÓN.
- Yokoya, N. S., Stirk, W. A., van Staden, J., Novák, O., Turečková, V., Pěnčí k, A., & Strnad, M. (2010). ENDOGENOUS CYTOKININS, AUXINS, AND ABSCISIC ACID IN RED ALGAE FROM BRAZIL1. *Journal of Phycology*, 46(6), 1198–1205. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00898.x>