



Optimización multirrespuesta de la propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* (“árbol de la quina”) mediante Superficie de Respuesta: comparación entre un Diseño Compuesto Central Retornable y un Box–Behnken

Multi-response optimization of the in vitro propagation of *Ladenbergia oblongifolia* (“cinchona tree”) using Response Surface: comparison between a Central Composite Design and a Box–Behnken Design

Luigi Italo Villena-Zapata¹*, Jeanette Baldramina González-Castro²

¹ Egresado del Doctorado en Estadística Matemática Universidad Nacional del Santa, Nuevo Chimbote, Perú.

² Docente del Doctorado en Estadística Matemática Universidad Nacional del Santa, Nuevo Chimbote, Perú.

Luigi Italo Villena-Zapata

Jeanette Baldramina González-Castro

 <https://orcid.org/0000-0001-9430-0028>

 <https://orcid.org/0000-0003-4661-7447>

Artículo Original

Recibido: 27 de febrero de 2024

Aceptado: 10 de mayo de 2024

Resumen

La propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* es clave para su conservación y uso sostenible. Este estudio aplica la Metodología de Superficie de Respuesta para modelar y optimizar, de forma multirrespuesta, el efecto del fotoperíodo (8/16, 12/12, 16/8 h), del ácido giberélico (0.25–0.75 ppm) y del ácido indolacético (0.25–0.75 ppm) sobre cuatro variables: longitud de tallo, longitud de entrenudos, número de hojas y número de raíces. Se compararon dos diseños: Compuesto Central Rotable (DCCR; N=19) y Box–Behnken (DBB; N=17). En DCCR, los modelos fueron significativos ($p < 0.001$), con buen ajuste ($R^2_{aj} = 0.745–0.840$) y sin falta de ajuste; en DBB, robustos ($R^2_{aj} = 0.740–0.919$; $p < 0.01$). La deseabilidad global favoreció a DCCR (0.988; óptimo: 16/8 h, $AG_3 = 0.75$ ppm, $AIA \approx 0.40$ ppm) frente a DBB (0.979; $\approx 14/10$ h, $AG_3 = 0.75$ ppm, $AIA \approx 0.75$ ppm). Los criterios D-, A-, G- e I-optimalidad confirmaron la superioridad del DCCR, ofreciendo un protocolo para maximizar el desempeño morfogénico y orientar su escalamiento ex situ.

Palabras Clave: *Ladenbergia oblongifolia*, quina, cultivo de tejidos, RSM, DCCR, Box–Behnken, deseabilidad, criterios de optimalidad.

Abstract

The in vitro propagation of *Ladenbergia oblongifolia* is key to its conservation and sustainable use. This study applies the Response Surface Methodology to model and optimize, in a multi-response manner, the effect of photoperiod (8/16, 12/12, 16/8 h), gibberellic acid (0.25–0.75 ppm), and indoleacetic acid (0.25–0.75 ppm) on four variables: stem length, internode length, number of leaves, and number of roots. Two designs were compared: Rotatable Central Composite (RCCR; N=19) and Box–Behnken (DBB; N=17). In RCCD, the models were significant ($p < 0.001$), with good fit ($R^2_{aj} = 0.745–0.840$) and no lack of fit; in BBD, they were robust ($R^2_{aj} = 0.740–0.919$; $p < 0.01$). Overall desirability favored DCCR (0.988; optimal: 16/8 h, $AG_3 = 0.75$ ppm, $AIA \approx 0.40$ ppm) over DBB (0.979; $\approx 14/10$ h, $AG_3 = 0.75$ ppm, $AIA \approx 0.75$ ppm). The D-, A-, G-, and I-optimality criteria confirmed the superiority of DCCR, offering a protocol to maximize morphogenic performance and guide its ex situ scaling.

Keywords: *Ladenbergia oblongifolia*, cinchona, tissue culture, RSM, DCCR, Box–Behnken, desirability, optimality criteria.

Citar como:

Villena-Zapata, L., & González-Castro, J. (2024). Optimización multirrespuesta de la propagación in vitro de *Ladenbergia oblongifolia* (“árbol de la quina”) mediante Superficie de Respuesta: comparación entre un Diseño Compuesto Central Retornable y un Box–Behnken, 2024. *REBIOL*, 44(1), 104-112.

*Autor para correspondencia: E. mail: 2021822003@uns.edu.pe

DOI: <http://dx.doi.org/10.17268/rebiol.2024.44.01.11>



1. Introducción

El "árbol de la quina" ocupa un lugar emblemático en la historia natural y sanitaria de los Andes por sus alcaloides de interés farmacológico, pero enfrenta presiones por sobreexplotación y pérdida de hábitat, que comprometen su viabilidad poblacional (Albán et al., 2020; Brako & Zarucchi, 1993; Huamán et al., 2019; Martins & Nunez, 2015; Mostacero, 2013). En este contexto, los protocolos de micropropagación y conservación ex situ son estratégicos (Delgado et al., 2021; George et al., 2008; Gaidamashvili & Benelli, 2021; Roca & Mroginski, 1991). No obstante, el desempeño morfogénico in vitro depende de manera crítica de la regulación lumínica y del balance hormonal, que modulan elongación, organogénesis y enraizamiento (Haque et al., 2022; Lincoln & Zeiger, 2006; Pierik, 1990; Seguí, 2013).

La Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) ofrece un marco riguroso para modelar interacciones y optimizar simultáneamente múltiples respuestas biológicas mediante diseños experimentales eficientes (Anderson & Whitcomb, 2016; Davim, 2016; Montgomery, 2017, 2020; Myers & Montgomery, 1995). Entre los diseños de segundo orden, DCCR y DBB se emplean extensamente en bioprocesos y cultivo de tejidos por su economía de corridas y capacidad de identificar óptimos bajo curvatura (Al-Tayawi et al., 2023; Bhattacharya, 2021; Gutiérrez-Pulido & De la Vara-Salazar, 2012; Sanchez, 2011). Adicionalmente, la función de deseabilidad facilita la toma de decisión multiobjetivo (Derringer & Suich, 1980; Harrington, 1965), mientras que los criterios de optimalidad (D, A, G, I) permiten comparar eficiencia de diseños (JMP Statistical Software, 2024; Minitab, 2024; Torres Roda, 2022).

Este artículo integra y discute evidencia experimental y estadística sobre la optimización in vitro de *L. oblongifolia* con RSM, comparando DCCR y DBB en términos de: (a) ajuste y verificación de

supuestos, (b) deseabilidad global y condiciones óptimas, (c) eficiencia por criterios de optimalidad, y (d) traslación biológica hacia escalamiento y conservación.

2. Materiales y Métodos

Enfoque y diseños de RSM

Se adopta un enfoque cuantitativo e hipotético-deductivo (Barroga et al., 2023; Krantz, 2017; Lawson, 2014; Montgomery, 2017). Se comparan dos diseños de segundo orden (Gutiérrez-Pulido & De la Vara-Salazar, 2012; Anderson & Whitcomb, 2016; Montgomery, 2020):

- **DCCR** (rotabilidad determinada por α , con puntos factoriales, axiales y centrales), que refina la estimación de términos cuadráticos y ofrece varianza de predicción isotrópica (Agadaga, 2024; Bhattacharya, 2021; Pérez et al., 2021).
- **DBB**, cuasi-rotable, que evita combinaciones extremas de factores y reduce corridas, manteniendo buena capacidad de ajuste (Al-Tayawi et al., 2023; Contreras et al., 2023).

Factores, respuestas y codificación

Los factores incluyen fotoperíodo (8/16, 12/12, 16/8 h), AG_3 (0.25–0.75 ppm) y AIA (0.25–0.75 ppm), con codificación (–1, 0, 1). Respuestas: longitud de tallo (cm), longitud de entrenudos (mm), número de hojas (ud) y número de raíces (ud). La naturaleza fisiológica sugiere sinergias fotomorfogénicas y hormonales (Binenbaum et al., 2018; Frontiers in Plant Science, 2024; Guillén et al., 2022; Jiménez-Ruiz et al., 2023).

Modelamiento, validación y optimización

Se ajustan modelos con términos de primer orden (FO), interacciones bilineales (TWI) y términos cuadráticos (PQ), evaluados mediante ANOVA, R^2 ajustado, falta de ajuste, diagnóstico de residuos (Shapiro–Wilk; Anderson–Darling; Breusch–Pagan;

Durbin–Watson) y normalidad multivariante (Mardia; Royston) (Breusch & Pagan, 1979; Mardia et al., 1979; Montgomery, 2017; Royston, 1983; Shapiro & Wilk, 1965). La multicolinealidad se juzga con VIF (Allison, 2023; Cohen et al., 2017; Hair et al., 2014). La optimización multirrespuesta se realiza con deseabilidad global (Derringer & Suich, 1980; Harrington, 1965) y se compara eficiencia por D-, A-, G- e I-optimalidad (JMP Statistical Software, 2024; Minitab, 2024; Torres Roda, 2022).

3. Resultados y Discusión

Ajuste de modelos y verificación de supuestos

Ambos diseños (DCCR y DBB) producen modelos significativos ($p < .05$) con R^2 ajustados altos y falta de ajuste no significativa, soportando el uso de polinomios de segundo orden para capturar curvatura e interacciones en sistemas *in vitro* (Montgomery, 2017; Singh & Sood, 2020; Vivanco & Nieto, 2021). La normalidad, homocedasticidad e independencia de residuos se corroboran con pruebas univariantes y multivariantes (Flores & Flores, 2021; Luzuriaga et al., 2023; Li & Yao, 2019; Villota & Daza, 2022), y la ausencia de multicolinealidad ($VIF \approx 1$) garantiza estabilidad de coeficientes e inferencias (Allison, 2023; Marengo & Antezana, 2021).

Patrones de superficie y contorno: sinergias clave

Las superficies 3D y contornos exhiben sinergias entre fotoperíodo y AG_3 para elongación (longitud de tallo y entrenudos), y efectos combinados con AIA que favorecen organogénesis y enraizamiento (número de hojas y raíces). La fotopercepción integra vías transcripcionales con giberelinas, modulando crecimiento vegetativo (Frontiers in Plant Science, 2024; Zhang et al., 2024). El AIA en rangos medios previene efectos fitotóxicos y potencia la elongación y rizogénesis (Adem et al., 2024; Khadr et al., 2020), en concordancia con experiencias en especies afines (Armijos & Pérez, 2016; Lima et al., 2018; Eras et al., 2019).

Optimización multirrespuesta y condiciones óptimas

La deseabilidad global posiciona al DCCR con una ligera ventaja (0.988) sobre DBB (0.979). Las condiciones óptimas estimadas para DCCR (16/8 h; $AG_3 = 0.75$ ppm; AIA ≈ 0.40 ppm) maximizan simultáneamente elongación y organogénesis; para DBB, el óptimo se ubica en $\approx 14/10$ h; $AG_3 = 0.75$ ppm; AIA ≈ 0.75 ppm. Estas combinaciones son coherentes con rangos reportados en leñosas y medicinales bajo RSM (Scientific Reports, 2024; BMC Plant Biology, 2024; Taneja et al., 2024) y con evidencia fisiológica de fotoperíodos largos promoviendo fotosíntesis, carbohidratos de reserva y crecimiento (Guillén et al., 2022; Hu et al., 2024; Meza et al., 2024; Sánchez-Olate et al., 2003).

Eficiencia del diseño: criterios D, A, G e I

DCCR domina en D-optimalidad (determinante de $X'XX'XX$), y minimiza A-, G- e I-optimalidad, indicando mejor precisión paramétrica y menor varianza de predicción promedio y máxima sobre la región de diseño (Argumedo & López, 2014; JMP Statistical Software, 2024; Minitab, 2024). Su rotabilidad—gracias a puntos axiales—mejora la calidad de predicción en todas las direcciones y afina términos cuadráticos (Agadaga, 2024; Bhattacharya, 2021; Gutiérrez-Pulido & De la Vara-Salazar, 2012). Si bien DBB usa menos corridas y evita extremos (útil cuando hay restricciones experimentales), su varianza de predicción crece en bordes (Al-Tayawi et al., 2023), lo que explica la ventaja observada para DCCR cuando el objetivo es optimización multirrespuesta robusta.

Implicancias biológicas y traslación

Las combinaciones óptimas con fotoperíodos prolongados y AG_3 alto (≈ 0.75 ppm) favorecen expansión y elongación; AIA medio (≈ 0.40 – 0.75 ppm) potencia organogénesis y raíz sin toxicidad (Binenbaum et al., 2018; Alcántara-Cortes et al., 2019; Crozier et al., 2000). En el plano aplicado, esto sugiere protocolos reproducibles para conservación *ex situ*, viverización y, a futuro, escalamiento en

biorreactores de inmersión temporal (RITA/TIS) (García-Ramírez, 2023; Murthy et al., 2023), con posteriores ensayos de campo que integren bioinóculos micorrízicos para mejorar establecimiento y resiliencia (Zhou et al., 2024; Wu et al., 2025), en línea con metas de uso sostenible de biodiversidad (IPBES, 2022; Secretaría del CDB, s. f.).

4. Conclusiones

Ambos diseños de RSM (DCCR y DBB) generaron modelos estadísticamente sólidos para explicar la respuesta morfogénica de *L. oblongifolia* frente a fotoperíodo, AG₃ y AIA, con supuestos cumplidos y ausencia de multicolinealidad.

La optimización multirrespuesta favoreció a DCCR (deseabilidad = 0.988) con 16/8 h, AG₃ = 0.75 ppm y AIA ≈ 0.40 ppm; DBB alcanzó 0.979 en ≈14/10 h con AG₃ = 0.75 ppm y AIA ≈ 0.75 ppm.

En criterios de optimalidad (D, A, G, I), DCCR fue consistentemente más eficiente, debido a su rotabilidad y cobertura del espacio experimental.

Biológicamente, la integración fotoperíodo-giberelinas-auxinas sustenta las mejoras observadas en elongación y organogénesis, aportando un protocolo optimizado para conservación y producción de material élite libre de patógenos.

5. Contribución de los autores

LIVZ: Concepción y el diseño del estudio, adquisición, análisis y la interpretación de los datos. JBGC: Revisión y la aprobación definitiva de la versión que se presenta.

6. Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

7. Referencias Bibliográficas

Adem, M., Sharma, L., Shekhawat, G. S., Šafránek, M., & Jásik, J. (2024). Auxin signaling, transport, and regulation during adventitious root formation. *Current Plant Biology*, 40, 100385. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2024.100385>

Agadaga, G. O. (2024). Rotatability of second-order response surface designs. *Journal of Research in Science and Technology*, 5(2), 13–31.

Albán, J., Chilquillo, E., Melchor, B., Arakaki, M., León, B., & Suni, M. (2020). *Cinchona* L. "Árbol de la quina": Repoblamiento y reforestación en el Perú. *Revista Peruana de Biología*, 27(3), 423–426.

Alcántara-Cortes, J., Acero-Godoy, J., Alcántara-Cortés, J. D., & Sánchez-Mora, R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109–129.

Al-Tayawi, A. N., Szpisják-Gulyás, N., Horváth, Z. H., & László, Z. (2023). Methods for experimental design, central composite design and the Box–Behnken design, to optimise operational parameters: A review. *Acta Alimentaria*, 52(4), 521–536. <https://akjournals.com/view/journals/066/52/4/article-p521.xml>

Allison, P. D. (2023). *Statistical horizons: Understanding variance inflation factors in regression models*. Statistical Horizons. <https://statisticalhorizons.com/multicollinearity/>

Anderson, M. J., & Whitcomb, P. J. (2016). *RSM simplified: Optimizing processes using response surface methods for design of experiments* (2nd ed.). Productivity Press. <https://doi.org/10.1201/9781315382326>

Argumedo, S., & López, V. I. (2014). Metodología para incrementar el número de puntos experimentales en un diseño D-óptimo. *Ingeniería y Ciencia*, 20, 45–62.

Armijos, R., & Pérez, C. (2016). In vitro germination and shoot proliferation of the threatened species

- Cinchona officinalis* L. (Rubiaceae). *Journal of Forest Research*, 27, 1229–1236.
<https://doi.org/10.1007/s11676-016-0272-8>
- Barroga, E., Matanguihan, G. J., Furuta, A., Arima, M., Tsuchiya, S., Kawahara, C., Takamiya, Y., & Izumi, M. (2023). Conducting and writing quantitative and qualitative research. *Journal of Korean Medical Science*, 38(37), e291.
<https://doi.org/10.3346/jkms.2023.38.e291>
- Bhattacharya, S. (2021). Central composite design for response surface methodology and its application in pharmacy. En *IntechOpen*.
<https://www.intechopen.com/chapters/74955>
- Binenbaum, J., Weinstain, R., & Shani, E. (2018). Gibberellin localization and transport in plants. *Trends in Plant Science*, 23(5), 410–421.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.02.005>
- BMC Plant Biology. (2024). Response surface methodology mediated optimization of phytosulfokine and plant growth regulators for enhanced protoplast division, callus induction, and somatic embryogenesis in *Angelica gigas* Nakai. *BMC Plant Biology*, 24, 527.
- Brako, L., & Zarucchi, J. (1993). *Catálogo de las angiospermas y gimnospermas del Perú*. Monographs in Systematic Botany, Missouri Botanical Garden.
- Breusch, T. S., & Pagan, A. R. (1979). A simple test for heteroscedasticity and random coefficient variation. *Econometrica*, 47(5), 1287–1294.
<https://doi.org/10.2307/1911963>
- Cohen, J., Cohen, P., West, S. G., & Aiken, L. S. (2017). *Applied multiple regression/correlation analysis for the behavioral sciences* (3rd ed.). Routledge.
- Contreras, E., Hernández, T., Jaimez, J., Pérez, J., Gutiérrez, J., & Ramírez, J. (2023). Aplicación de un diseño de experimentos Box–Behnken para la determinación de las condiciones de extracción de compuestos antioxidantes de *Decatropis bicolor*. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 8(1), 667–675.
<https://doi.org/10.29105/idcyta.v8i1.87>
- Crozier, A., Kamiya, Y., Bishop, G., & Yokota, T. (2000). Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. En B. Buchanan, W. Gruissem, & R. Jones (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of plants* (pp. 850–929). American Society of Plant Physiologists.
- Davim, J. P. (Ed.). (2016). *Design of experiments in production engineering*. Springer.
- Delgado, G., Vásquez, C., Esquerre, B., Bazán, P., & Rojas, C. (2021). In vitro tissue culture in plants propagation and germplasm conservation of economically important species in Peru. *Scientia Agropecuaria*, 12(3), 337–349.
<https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.037>
- Derringer, G., & Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*, 12(4), 214–219.
- Eras, V., Moreno, J., Yaguana, M., Poma, R., & Paredes, D. (2019). Balance hormonal para la fase de brotación y enraizamiento in vitro de explantes de *Cinchona officinalis* L., provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja. *Bosques Latitud Cero*, 9(1), 58–68.
- Flores, C., & Flores, K. (2021). Pruebas para comprobar la normalidad de datos en procesos productivos: Anderson-Darling, Ryan-Joiner, Shapiro-Wilk y Kolmogórov-Smirnov. *Revista de Ciencias Sociales y Humanidades*, 23(2), 83–106.

- Frontiers in Plant Science. (2024). The role of light in regulating plant growth, development and sugar metabolism: A review. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1507628.
- Gaidamashvili, M., & Benelli, C. (2021). Threatened woody plants of Georgia and micropropagation as a tool for in vitro conservation. *Agronomy*, 11, 1082.
<https://doi.org/10.3390/agronomy11061082>
- García-Ramírez, Y. (2023). Temporary immersion system for in vitro propagation via organogenesis of forest plant species. *Trees*, 37, 425–438. <https://doi.org/10.1007/s00468-022-02379-w>
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G.-J. (2008). *Plant propagation by tissue culture* (3rd ed.). Springer.
- Guillén, S., Cruz, C., Martínez, J., & Martínez, A. (2022). Efecto de N6-benciladenina y fotoperíodo en la floración de protocormos in vitro de *Bletia urbana* (Orchidaceae). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 45(4), 475–482.
<https://doi.org/10.35196/rfm.2022.4.475>
- Gutiérrez-Pulido, H., & de la Vara-Salazar, R. (2012). *Análisis y diseño de experimentos* (3.ª ed.). McGraw-Hill.
- Hair, J. F., Black, W. C., Babin, B. J., & Anderson, R. E. (2014). *Análisis de datos multivariante* (7.ª ed.). Pearson.
- Haque, M. I., Singh, P. K., Ghuge, S., Kumar, A., Rai, A. C., Kumar, A., & Modi, A. (2022). A general introduction to and background of plant tissue culture: Past, current, and future aspects. En A. C. Rai, A. Kumar, A. Modi, & M. Singh (Eds.), *Advances in plant tissue culture* (pp. 1–30).
- Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90795-8.00019-9>
- Harrington, E. C. (1965). The desirability function. *Industrial Quality Control*, 21(10), 494–498.
- Hu, G., Li, X., Yang, J., Yuan, Q., Yang, S., Fu, W., Zhang, X., Li, Y., Shen, Z., & Jiang, J. (2024). Effects of photoperiod and light quality on germination and growth of *Camellia sinensis* 'HuangKui'. *Plants*, 13, 1782.
<https://doi.org/10.3390/plants13131782>
- Huamán, L., Albán, J., & Chilquillo, E. (2019). Aspectos taxonómicos y avances en el conocimiento del estado actual del árbol de la quina (*Cinchona officinalis* L.) en el norte de Perú. *Ecología Aplicada*, 18(2), 145–153.
<http://dx.doi.org/10.21704/rea.v18i2.1333>
- Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services (IPBES). (2022). *Thematic assessment report on the sustainable use of wild species*. IPBES Secretariat.
- Jiménez-Ruiz, E., Martínez-Solís, J., Mejía-Muñoz, J., Sosa-Montes, E., & Juárez-Hernández, M. (2023). El fotoperíodo como modulador del crecimiento en *Dahlia campanulata* Saar, P. D. Sørensen & Hjert. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 46(1), 77–83.
<https://doi.org/10.35196/rfm.2023.1.77>
- JMP Statistical Software. (2024). *Optimality criteria*. En *Design of experiments guide*. SAS Institute Inc. <https://www.jmp.com/support/help>
- Khadr, A., Wang, G. L., Wang, Y. H., Zhang, R. R., Wang, X. R., Xu, Z. S., Tian, Y. S., & Xiong, A. S. (2020). Effects of auxin (indole-3-butyric acid) on growth characteristics, lignification, and expression profiles of genes involved in lignin biosynthesis in carrot taproot. *PeerJ*, 8, e10492.
<https://doi.org/10.7717/peerj.10492>

- Krantz, J. C. (2017). *Diseño de investigación en psicología: Fundamentos y aplicaciones*. Pearson.
- Lawson, J. (2014). *Design and analysis of experiments with R*. CRC Press.
- Li, Z., & Yao, J. (2019). Testing for heteroscedasticity in high-dimensional regressions. *Econometrics and Statistics*, 19, 122–139.
- Lima, N., Moreno, J., Eras, V., Minchala, J., González, D., Yaguana, M., & Valarezo, C. (2018). Propagación in vitro de *Cinchona officinalis* L. a partir de semillas. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 20(2), 169–178.
- Lincoln, T., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal* (3.^a ed., Vol. 1). Universitat Jaume I.
- Luzuriaga, H., Espinosa, C., Haro, A., & Ortiz, H. (2023). Histograma y distribución normal: Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov aplicado en SPSS. *Revista Latinoamericana de Ciencias Sociales y Humanidades*, 4(4), 596–607. <https://doi.org/10.56712/latam.v4i4.1242>
- Marengo, R., & Antezana, S. (2021). El análisis de regresión por componentes principales muestra el efecto libre de colinealidad de variables climáticas subestimadas sobre el crecimiento de los árboles en la Amazonia central. *Revista de Biología Tropical*, 69(2), 482–495.
- Mardia, K. V., Kent, J. T., & Bibby, J. M. (1979). *Multivariate analysis*. Academic Press.
- Martins, D., & Nunez, C. (2015). Secondary metabolites from Rubiaceae species. *Molecules*, 20(7), 13422–13495. <https://doi.org/10.3390/molecules200713422>
- Meza, N. M., Alvares, I., Carrera, H., Bastidas, E., & Porras, E. (2024). Efecto de la luz LED sobre el crecimiento y desarrollo de vitroplantas de cuatro variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Agroindustria, Sociedad y Ambiente*, 2(23), 49–58.
- Minitab. (2024). *Métrica de optimalidad para seleccionar diseño óptimo*. <https://support.minitab.com>
- Montgomery, D. C. (2017). *Diseño y análisis de experimentos: Principios estadísticos de diseño y análisis de la investigación* (7.^a ed.). Wiley.
- Montgomery, D. C. (2020). *Design and analysis of experiments* (9th ed.). Wiley.
- Mostacero, D. (2013). *Medicina mágica: El ayer y hoy del árbol de la quina*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Murthy, H. N., Joseph, K. S., Paek, K. Y., & Park, S. Y. (2023). Bioreactor systems for micropropagation of plants: Present scenario and future prospects. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1159588. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1159588>
- Myers, R. H., & Montgomery, D. C. (1995). *Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments*. Wiley.
- Pérez, O., Acosta Solares, A., Albornas Carvajal, Y., & Cortés Falcón, M. F. (2021). Potencialidades de la metodología de superficie de respuesta en la optimización experimental en la industria química y alimentaria. *Centro Azúcar*, 48(4), 123–138.
- Pierik, R. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Mundi-Prensa.
- Roca, W., & Mroginski, L. (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. CIAT.

- Royston, J. P. (1983). Some techniques for assessing multivariate normality based on the Shapiro–Wilk W. *Applied Statistics*, 32, 121–133.
- Sanchez, S. M. (2011). Better than a petaflop: The power of efficient experimental design. En S. Jain, R. R. Creasey, J. Himmelsbach, K. P. White, & M. Fu (Eds.), *Proceedings of the 2011 Winter Simulation Conference* (pp. 60–74). IEEE.
- Sánchez-Olate, M., Zapata, J., Ríos, D., Pereira, G., & Escobar, R. (2003). Efecto del fotoperíodo en el desarrollo de plantas de *Eucalyptus globulus* Labill. ssp. *globulus* cultivadas en vivero. *Bosque (Valdivia)*, 24(2), 23–28. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002003000200003>
- Scientific Reports. (2024). An efficient micropropagation protocol for an endangered ornamental tree species (*Magnolia sirindhorniae* Noot. & Chalermglin) and assessment of genetic uniformity through DNA markers. *Scientific Reports*, 9, 9240.
- Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica. (s. f.). *Convención sobre la Diversidad Biológica*. <https://www.cbd.int/>
- Seguí, J. (2013). *Biología y biotecnología reproductiva de las plantas* (1.ª ed.). Universitat Politècnica de València.
- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52, 591–611.
- Singh, J., & Sood, A. (2020). Modeling and optimizing culture medium mineral composition for in vitro propagation of *Actinidia arguta*. *Frontiers in Plant Science*, 11, 554905. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.554905>
- Taneja, J., Singh, A., Kumar, S., & Sharma, R. (2024). Precision in vitro propagation by integrating response surface methodology and machine learning for *Glossostigma elatinoides* (Benth) Hook. F. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. <https://doi.org/10.1007/s11627-025-10513-9>
- Torres Roda, A. (2022). *Estudio de optimalidad de diseños experimentales clásicos respecto de distintos criterios de optimización* [Tesis de posgrado, Universidad de Salamanca].
- Vivanco, D., & Nieto, D. J. (2021). Uso de la metodología de superficie de respuesta para la optimización del secado de láminas de jengibre (*Zingiber officinale*) en microondas y determinación de las condiciones de humedad de equilibrio. *Agroindustrial Science*, 11(2), 211–219. <https://doi.org/10.17268/agroind.sci.2021.02.11>
- Villota, Á., & Daza, H. (2022). Estimación de la aceleración de la gravedad mediante la aplicación de la física estadística. *Revista SIGMA*, 18(1), 30–39.
- Wu, X., Liang, Y., Zhao, W., & Pan, F. (2025). Estrategias de adquisición de nutrientes por raíces y micorrizas en la sucesión de bosques subtropicales con limitaciones de N y P. *BMC Plant Biology*, 25, 8. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-06016-1>
- Zhang, L., Liu, Y., & Wang, S. (2024). The DELLA–CONSTANS transcription factor cascade integrates gibberellic acid and photoperiod signaling to regulate flowering. *Plant Physiology*. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5074646/>

Zhou, T., Liang, G., Reich, P. B., Delgado-Baquerizo, M., Wang, C., & Zhou, Z. (2024). Promoting effect of plant diversity on soil microbial functionality is amplified over time. *One Earth*, 7(12), 2139–2148.

<https://doi.org/10.1016/j.oneear.2024.10.004>