

Notas Científicas

Determinación de tamaño de muestra de características del xilema de brote de aguacate mediante remuestreo

Elizabeth Meza-Castillo⁽¹⁾, Alejandro Facundo Barrientos-Priego⁽¹⁾, Juan Enrique Rodríguez-Pérez⁽¹⁾ y María Isabel Reyes-Santamaría⁽²⁾

⁽¹⁾Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia, Carretera México-Texcoco, Km 38.5, Chapingo, Estado de México, CP 56230. México. E-mail: meelyc@gmail.com, abarrien@correo.chapingo.mx, erodriguezx@yahoo.com.mx ⁽²⁾Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Rancho Universitario, Avenida Universidad, Km 1, Ex Hacienda de Aquetzalpa, AP 32, Santiago Tulantepec de Lugo Guerrero, Hidalgo, CP 43600 México. E-mail: mirs61@yahoo.com.mx

Resumen – El propósito de este trabajo fue determinar el tamaño de muestra adecuado, para detectar diferencias estadísticas en análisis de varianza de los caracteres de xilema, en brotes anuales de aguacate. Para esto, fueron registradas en tres árboles con altura contrastante las variables frecuencia, área, perímetro y diámetro de los vasos del xilema. A partir de 50 observaciones de cada árbol, se realizaron 5.000 remuestreos no paramétricos, para cada repetición de 2 a 50 campos microscópicos. A partir del tamaño de muestra de 15 repeticiones, las desviaciones en los cinco estadísticos son mínimas, por lo que se propone como el mínimo para el muestreo de dichas variables.

Términos para indexación: *Persea americana*, análisis de varianza, bootstrap, vasos del xilema.

Sample size determination of avocado shoot xylem characters by resampling

Abstract – The objective of this work was to determine the suitable sample size, to detect statistical differences in the analysis of variance of xylem characters, in annual shoots of avocado trees. For this, xylem characters of three trees with contrasting height were registered for frequency, area, perimeter and diameter of xylem vessels. Starting from 50 observations from each tree, a total of 5.000 non parametric bootstraps were done for each of the replicates from 2 to 50 microscopic fields. Starting from a sample size of 15 replicates, the deviations in the five statistical estimates are minimal, so it is proposed as the minimum for sampling the mentioned variables.

Index terms: *Persea americana*, variance analysis, bootstrap, xylem vessels.

Los sistemas de conducción de agua en las plantas se han estudiado a nivel microscópico con diversos propósitos y en diferentes especies. Sin embargo, no se cuenta con pruebas estadísticas que indiquen el número apropiado de observaciones anatómicas a realizar. En aguacate, ha sido de interés el estudio de los vasos del xilema, debido a que se ha encontrado una alta variabilidad dentro del mismo individuo y, en diferentes genotipos, se han observado diámetros de 33 a 58 μm , en plantas de dos años; y en árboles de diez años, de 95 a 115 μm ; por lo que su estudio ha requerido un alto número de observaciones (Reyes-Santamaría, 2002). Reyes-Santamaría et al. (2002) utilizaron 75 campos microscópicos por genotipo, para estimar la media del diámetro de vasos del xilema. En otros estudios, para evaluar el diámetro y la densidad de vasos del xilema, se midieron 120 campos microscópicos en

raíces adventicias, provenientes de seis estacas leñosas en plantas de *Malpighia emarginata* DC (Laskowski & Bautista, 1999); mientras que para medir el diámetro de los vasos del xilema de nueve árboles, en *Laguncularia racemosa* (L.) C.F. Gaertn., fueron observados ocho campos microscópicos por árbol, en dos brotes con diferente diámetro (Ewers et al., 2004). En razón de la gran variabilidad de las observaciones microscópicas en este tipo de estudio y al no existir criterios establecidos, es necesario determinar tamaños de muestra adecuados, que permitan una descripción de los vasos del xilema de forma confiable y, en particular, para relacionarlo con eficiencia en el transporte de agua en aguacate, para el caso de flujo de savia (Fassio et al., 2009) y conductividad hidráulica (Ayala Arreola, 2010), con el fin de la posible selección de genotipos más eficientes.

Los estimadores estadísticos describen los parámetros poblacionales; sin embargo, estos están sometidos a variación debido al muestreo, que deriva en una distribución muestral de un estadístico (Moore, 2005). En virtud de la variabilidad de los estimadores, es importante obtener una medida de la exactitud con las cuales las estimaciones describen al parámetro, que a su vez, depende del cálculo del error típico del estadístico. Los intervalos de confianza y las pruebas de hipótesis requieren supuestos de distribución, que normalmente se emplean con un tamaño de muestra grande. Sin embargo, si el tamaño de la muestra es pequeño, no satisface estas condiciones sobre los parámetros (Martínez Bencardino, 2005). Esto ha llevado a la utilización de técnicas de remuestreo que emplean un gran número de cálculos repetitivos para estimar la forma de la distribución muestral del estadístico (Confalonieri et al., 2007). Si se considera que el teorema central del límite establece que la media de cualquier distribución, con un alto número de muestras que se distribuye normalmente, no se requiere que la variable original tenga una distribución normal (Hesterberg et al., 2003), si se desea estimar la media poblacional.

Ante el desconocimiento total de la distribución probabilística de los estimadores, o bien sobre cualquier variable aleatoria de la población, es posible, mediante re-muestreos sucesivos, a partir de una muestra específica de la población, obtener aproximaciones a ésta (Hesterberg et al., 2003). Sin embargo, no es solamente importante presentar estimadores como la media y su desviación estándar, como se ha planteado por Confalonieri et al. (2007). Segundo Moore (2005), también es importante presentar pruebas estadísticas que reflejen la magnitud de las diferencias entre medias muestrales, como es un análisis de varianza, que indica fundamentalmente la variación de individuos dentro de la misma muestra y considera la variación de las medias muestrales con el fin de estudio de diferencias a cierta probabilidad. Las unidades experimentales a utilizar deben cumplir con cierta homogeneidad y número de repeticiones adecuadas, para haber confiabilidad en los resultados (Moore, 2005).

El objetivo de este estudio fue determinar un tamaño de muestra con respecto a características de vasos de xilema de brotes de aguacate, que permita

mayor precisión en la estimación de los parámetros poblacionales.

Fueron seleccionados tres genotipos, que contrastaron por su altura (5,75, 3,99 y 1,79 m), de una muestra de 39 árboles segregantes, de la variedad de aguacate 'Colín V-33' de nueve años de edad, derivados de polinización abierta y establecidos en el Campo Experimental "La Cruz", en la Parcela "El Filtro", pertenecientes a la Fundación Salvador Sánchez Colín - CICATMEX, S. C., a 18°55'12"N y 99°45'40"W, en Coatepec Harinas, Estado de México, México, a 2.228 m de altitud, con clima templado subhúmedo, 1.200 mm de lluvia y suelo Cambisol.

Se colectaron tres brotes del crecimiento de primavera en cada genotipo y se fijaron en FAA (50% de etanol al 96 + 5% de ácido acético glacial al 100 + 10% de formaldehído al 37 + 35% de agua), para su estudio histológico. Posteriormente, las secciones medias de los brotes se procesaron en un cambiador automático de tejidos Tissuematon (Fisher Scientific Co., Chicago, IL, EUA) con cellosolve y xileno. A seguir se transfirieron a parafina a 55°C y permanecieron 72 horas dentro de la estufa. Después de retiradas, se realizaron diez cortes transversales de 10 μ m de grosor, en la parte media de cada brote, con un micrótopo rotatorio Spencer 820 (American Optical Co., New York, NY, EUA), los cuales se montaron con adhesivo Haup y formol al 10% y se tiñeron con safranina y verde fijo.

Los vasos del xilema fueron observados con microscopio óptico Galean III (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), a 100X, con una cámara digital Moticam 480 (Motic China Group Co. Ltd., Xiamen, China) montada en el ocular y conectada a una computadora, para obtener microfotografías. El área de observación se calculó con un micrómetro objeto que también se fotografió. En cada brote, de diez cortes posibles, se seleccionaron siete al azar, en los cuales se determinaron campos de observación a cada 45° de acuerdo con Sperry y Saliendra (1994). Así, fueron evaluadas 50 microfotografías por genotipo. En los cortes transversales, se midieron las siguientes variables en los vasos del xilema: frecuencia, área, perímetro y longitud del eje mayor, obtenidos mediante el analizador de imágenes Image Tool V. 3.0 (UTHSCSA, San Antonio, TX, EUA).

Para el análisis estadístico, la unidad experimental consistió de una microfotografía de xilema, de campo

de microscopio (100X) de aproximadamente 1 mm², sobre un corte transversal de brote del año. El diseño experimental considerado fue completamente al azar; en tanto que el número de repeticiones (tamaño de muestra) fue variable: 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40 y 50.

Con el programa estadístico SAS (SAS Institute, 1999), y con el empleo de los módulos IML y STAT, se realizó un algoritmo para efectuar 5.000 remuestreos (“bootstrap”), para realizar el mismo número de análisis de varianza correspondiente.

Así, a partir de la muestra de 60 repeticiones (“seudopoblación”), se generaron 5.000 remuestras aleatorias con reemplazo, para cada uno de los tamaños de muestra, con los cuadrados medios de genotipos, del error, la F calculada, la media y el coeficiente de variación.

De acuerdo al comportamiento de las medias de las características frecuencia, área, perímetro y diámetro de vasos del xilema, en diferentes tamaños de muestra, se observó que a partir del uso de cinco repeticiones de observaciones microscópicas, el promedio de las medias es prácticamente constante, en tanto que las desviaciones estándar correspondientes disminuyen, al aumentar el número de repeticiones (Cuadro 1).

Los cuadrados medios del error, mostraron que dicho estadístico se estabilizó a partir de diez repeticiones (tamaño de muestra), y su desviación estándar disminuyó, a pesar de no tener una distribución normal, ya que se trata de varianzas (Moore, 2005). A diferencia del cuadrado medio del error (CME), los cuadrados medios de los genotipos (CMG) y sus correspondientes desviaciones estándar (Cuadro 1) mostraron incrementos al aumentar el número de repeticiones, lo que se debe a que en el CME se incrementan los grados de libertad correspondientes, mientras que en el CMG se incrementa la variabilidad, al aumentar el número de observaciones microscópicas y mantenerse constantes los grados de libertad, ya que este estimador representa la varianza acumulada debida a genotipos (Moore, 2005), lo que es deseable para detectar la variabilidad entre ellos.

La F calculada del análisis de varianza, y su desviación estándar aumentaron con el tamaño de la muestra, como consecuencia del aumento de la variabilidad debido a los genotipos (CMG), ya que la media del CME se mantuvo constante (Cuadro 1). Así, con una F mayor, habrá mayor posibilidad de rechazar la hipótesis nula de igualdad de efectos de genotipos (Moore, 2005). Al comparar las medias de

la F calculada con los valores de F tabulada ($\alpha = 0,05$), la hipótesis nula (H_0) sobre la igualdad de efectos de genotipos fue rechazada en todos los tamaños de muestra; sin embargo, al observar la dispersión de las F calculadas, la posibilidad de no rechazar H_0 es mayor en tamaños de muestra pequeños (menores que diez). El coeficiente de variación (CV) confirmó la posibilidad de disminuir su variabilidad con un mayor número de repeticiones, ya que su valor promedio se estabiliza a partir del tamaño de muestra 15, y su desviación estándar disminuye conforme se incrementa el tamaño de muestra (Cuadro 1).

La variación de la media y del CME de los vasos del xilema se estabiliza a partir de un tamaño de muestra de diez campos microscópicos. En el caso de las desviaciones estándar, los decrementos ocurridos al aumentar el tamaño de muestra hasta 15 son de importancia y, a partir de este número, son de magnitud poco apreciable. Por tal motivo, este sería un tamaño de muestra apropiado. Los resultados de la F calculada, confrontados con la F tabulada ($\alpha = 0,05$), corroboraron lo anterior, ya que además se detectó la variabilidad entre genotipos. Fueron calculados también los estimadores propios del análisis de varianza, para considerar una prueba donde se evaluaron más de dos genotipos; adicionalmente, la posibilidad de obtener el CV de estos análisis permitió la adecuada selección del tamaño para caracteres que requieren estudio mediante análisis de varianza. No es necesario utilizar más de 15 observaciones de microscopio para evaluar características del xilema, como lo hicieron Laskowski & Bautista (1999), Reyes-Santamaría et al. (2002) y Fassio et al. (2009), pero no menores a 15 campos como lo indicado por Ewers et al. (2004) y Ayala Arreola (2010). Consecuentemente, los requerimientos de trabajo y recursos serían menores al asegurar la precisión requerida para la discriminación de genotipos mediante análisis de varianza. La aplicación de este método, en comparación con otros clásicos, no requiere alto número de repeticiones, y su uso es conveniente cuando la distribución probabilística de la variable respuesta en cuestión se desconoce (Hesterberg et al., 2003), situación presente en los caracteres anatómicos estudiados (Reyes-Santamaría et al., 2002).

Se concluye que para el estudio de caracteres de xilema en brotes anuales de aguacate, con unidad experimental de 1 mm² de campo de microscopio (100X), es exigido el uso de al menos 15 observaciones microscópicas.

Cuadro 1. Estimadores estadísticos de características del brote, en vasos del xilema de tres genotipos contrastantes en altura (5,75, 3,99 y 1,79 m) segregantes de aguacate 'Colín V-33', de 5.000 remuestreos con diferentes tamaños de muestra de campos microscópicos⁽¹⁾.

Característica de los vasos de xilema	Tamaño de la muestra	Media		CME		CMG		Medias de F (Fc = CMG/CME)		CV(%)	
		Valor	DE	Valor	DE	Valor	DE	Valor	DE	Valor	DE
Diámetro (mm)	2	0,33405	0,01785	0,00191	0,00160	0,00549	0,00329	2,87435	1,80543	11,956	5,0453
	5	0,33429	0,01087	0,00195	0,00082	0,00297	0,00115	1,52308	1,07152	12,891	2,6019
	10	0,33423	0,00735	0,00195	0,00051	0,00249	0,00067	1,27692	0,47378	13,078	1,6385
	15	0,33442	0,00568	0,00195	0,00039	0,00236	0,00050	1,21026	0,33399	13,138	1,2592
	20	0,33427	0,00466	0,00195	0,00032	0,00229	0,00039	1,17436	0,25530	13,175	1,0292
	30	0,33432	0,00335	0,00195	0,00022	0,00224	0,00027	1,14872	0,16707	13,194	0,7004
	40	0,33432	0,00231	0,00195	0,00016	0,00220	0,00019	1,12821	0,11659	13,206	0,5124
	50	0,33432	0,00178	0,00195	0,00011	0,00216	0,00329	1,10769	0,08258	13,234	0,3531
Perímetro (mm)	2	0,97769	0,05116	0,01595	0,01342	0,04102	0,02612	2,57179	42,6646	11,810	5,0296
	5	0,97670	0,03209	0,01590	0,00666	0,02158	0,00951	1,35723	1,1466	12,612	2,6028
	10	0,97658	0,02126	0,01615	0,00417	0,01795	0,00520	1,11146	0,4376	12,897	1,6130
	15	0,97681	0,01902	0,01587	0,00353	0,01697	0,00453	1,06931	0,3618	12,812	1,3723
	20	0,97650	0,01333	0,01606	0,00259	0,01635	0,00305	1,01806	0,2358	12,934	1,0068
	30	0,97643	0,01317	0,01584	0,00241	0,01606	0,00299	1,01389	0,2299	12,849	0,9436
	40	0,97659	0,01130	0,01584	0,00210	0,01583	0,00255	0,99937	0,1922	12,857	0,8148
	50	0,97661	0,01048	0,01585	0,00188	0,01571	0,00232	0,99117	0,1729	12,867	0,7290
Área (mm ²)	2	0,06427	0,00705	0,000287	0,0002709	0,000590	0,000440	2,05575	53,876	23,608	10,5664
	5	0,06423	0,00428	0,000300	0,0001418	0,000293	0,000145	0,97667	0,796	26,158	5,6508
	10	0,06422	0,00290	0,000300	0,0000899	0,000238	0,000081	0,79333	0,343	26,664	3,6642
	15	0,06420	0,00224	0,000299	0,0000681	0,000222	0,000060	0,74247	0,233	26,729	2,7513
	20	0,06425	0,00183	0,000300	0,0000549	0,000215	0,000047	0,71667	0,176	26,816	2,2073
	30	0,06422	0,00127	0,000300	0,0000391	0,000208	0,000032	0,69333	0,121	26,889	1,6037
	40	0,06424	0,00157	0,000294	0,0000457	0,000207	0,000040	0,70408	0,149	26,609	1,8536
	50	0,06424	0,00057	0,000300	0,0000173	0,000202	0,000014	0,67333	0,051	26,934	0,7033
Frecuencia (vasos mm ⁻²)	2	110,09	9,7811	569,67	477,43	3,100,1	1,703,16	5,44192	140,395	19,964	8,6913
	5	110,15	5,9722	579,60	227,48	1.796,7	645,88	3,09990	2,391	21,470	4,2720
	10	110,18	4,0285	583,08	139,95	1.554,0	389,74	2,66516	1,047	21,771	2,6483
	15	110,72	3,0264	584,86	106,21	1.509,0	288,24	2,58010	0,744	21,761	2,0067
	20	110,16	2,5854	580,73	86,05	1.456,1	229,80	2,50736	0,566	21,821	1,6388
	30	110,11	2,5198	571,33	80,95	1.429,0	227,10	2,50118	0,546	21,661	1,5610
	40	110,14	1,2786	580,57	41,70	1.408,6	112,85	2,42624	0,267	21,864	0,8017
	50	110,14	0,8014	580,29	26,94	1.400,0	70,380	2,41259	0,168	21,866	0,5160

⁽¹⁾CME, cuadrado medio del error; CMG, cuadrado medio de genotipos; CV, coeficiente de variación; DE, desviación estándar.

Referencias

AYALA ARREOLA, J. **Relaciones injerto-interinjerto en algunos aspectos fisiológicos y anatómicos de cuatro genotipos de aguacate.** 2010. 106p. Tesis (Doctorado) – Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo.

CONFALONIERI, R.; ACUTIS, M.; BELLOCCHI, G.; GENOVESE, G. Resampling-based software for estimating optimal sample size. **Environmental Modelling and Software**, v.22, p.1796-1800, 2007.

EWERS, F.W.; LOPÉZ-PORTILLO, J.; ANGELES, G.; FISHER, J.B. Hydraulic conductivity and embolism in the mangrove tree *Laguncularia racemosa*. **Tree Physiology**, v.24, p.1057-1062, 2004.

FASSIO, C.; HEATH, R.; ARPAIA, M.L.; CASTRO, M. Sap flow in 'Hass' avocado trees on two clonal rootstocks in relation to xylem anatomy. **Scientia Horticulturae**, v.120, p.8-13, 2009.

HESTERBERG, T.; MONAGHAN, S.; MOORE, S.D.; CLIPSON, A.; EPSTEIN, R. **Bootstrap methods and permutation tests:** companion chapter 18 to the practice of business statistics. New York: W. H. Freeman and Company, 2003. 73p.

LASKOWSKI, L.; BAUTISTA, D. Características anatómicas de raíces adventicias en estacas de semeruco (*Malpighia emarginata* DC) tratadas con ácido indolbutírico. **Bioagro**, v.11, p.88-96, 1999.

MARTÍNEZ BENCARDINO, C. **Estadística y muestreo**. 8.ed. Bogotá: ECOE, 2005. p.879.

MOORE, D.S. **Estadística aplicada básica**. 2.ed. Barcelona: Antoni Bosch, 2005. 876p.

REYES SANTAMARÍA, M.I. **Anatomía del sistema de conducción de agua y respuesta fisiológica de aguacatero (*Persea americana* Mill.) en condiciones limitantes de humedad**. 2002. 94p. Tesis (Doctorado) – Colegio de Postgraduados, Montecillos.

REYES - SANTAMARÍA, I.; TERRAZAS, T.; BARRIENTOS-PRIEGO, A.F.; TREJO, C. Xylem conductivity and vulnerability in cultivars and races of avocado. **Scientia Horticulturae**, v.92, p.97-105, 2002.

SAS INSTITUTE. **SAS/IML procedure user's guide**. Version 8. Cary: SAS Institute, 1999. 846p.

SPERRY, J.S.; SALIENDRA, N.Z. Intra and inter-plant variation in xylem cavitation in *Betula occidentalis*. **Plant Cell and Environment**, v.17, p.1233-1241, 1994.

Recebido em 27 de Junio de 2010 e aprovado em 12 de Noviembre de 2010