



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TEMA:

MICROPROPAGACIÓN DE DOS VARIEDADES DE NARDO (*Polianthes tuberosa*) MEDIANTE MULTIPLICACIÓN IN VITRO, UTILIZANDO DOS TIPOS DE CITOQUININAS

Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar, a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Carrera de Ingeniería Agronómica.

AUTORAS:

SHIRLEY MICHELLE CANDO QUINATO A

MARIA ISAURA MURILLO MORENO

DIRECTORA:

ING. AGR. SONIA SALAZAR RAMOS M.Sc.

GUARANDA – ECUADOR

2022

MICROPROPAGACIÓN DE DOS VARIETADES DE NARDO (*Polianthes tuberosa*) MEDIANTE MULTIPLICACIÓN IN VITRO, UTILIZANDO DOS TIPOS DE CITOQUININAS

REVISADO Y APROBADO POR:



.....
ING. AGR. SONIA SALAZAR RAMOS. MSc.

DIRECTORA



.....
ING. AGR. JOSE SANCHEZ MORALES. Mg.

BIOMETRISTA



.....
ING. AGR. RODRIGO YÁNEZ GARCÍA. MSc.

ÁREA DE REDACCIÓN TÉCNICA



CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA

Nosotras, Shirley Michelle Cando Quinatoa con cédula de identidad número 180499103-0 y María Isaura Murillo Moreno con cédula de identidad número 050398927-9 declaramos que el trabajo y los resultados presentados en este informe, no han sido previamente presentados para ningún grado o calificación profesional; y, que las referencias bibliográficas que se incluyen han sido consultadas y citadas con su respectivo autor (es).

La Universidad Estatal de Bolívar, puede hacer uso de los derechos de publicación correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, su Reglamentación y la Normativa Institucional vigente.

SHIRLEY CANDO QUINATO A
AUTORA
CI:180499103-0

MARÍA MURILLO MORENO
AUTORA
CI:050398927-9

ING. SONIA SALAZAR. MSc.
DIRECTORA
CI: 020093306-7

ING. AGR. JOSE SANCHEZ. Mg.
BIOMETRISTA
CI: 180153798-4

ING. AGR. RODRIGO YÁNEZ. MSc.
ÁREA DE REDACCIÓN TÉCNICA
CI: 020050222-7



Notaria Tercera del Cantón Guaranda
Msc. Ab. Henry Rojas Narvaez
Notario



No. ESCRITURA 20220201003P02331

DECLARACION JURAMENTADA

OTORGADA POR: MURILLO MORENO MARIA ISaura Y CANDO QUINATOA SHIRLEY MICHELLE

INDETERMINADA DI: 2 COPIAS H.R.

Factura: 001-006-000002241

En la ciudad de Guaranda, capital de la provincia Bolívar, República del Ecuador, hoy día dieciocho de octubre del dos mil veintidós, ante mí Abogado HENRY ROJAS NARVAEZ, Notario Público Tercero del Cantón Guaranda, comparecen las señoras; MURILLO MORENO MARIA ISaura, estado civil, soltera, celular 00987276083, domiciliada en la ciudad de Latacunga, y de paso por esta ciudad y, CANDO QUINATOA SHIRLEY MICHELLE, estado civil soltera, celular 0995531198, domiciliada en la ciudad de Ambato y de paso por esta ciudad, por sus propios y personales derechos, obligarse a quienes de conocerles doy fe en virtud de haberme exhibido sus documentos de identificación y con su autorización se ha procedido a verificar la información en el Sistema Nacional de Identificación Ciudadana; bien instruidos por mí el Notario con el objeto y resultado de esta escritura pública a la que procede libre y voluntariamente, advertidos de la gravedad del juramento y las penas de perjurio, me presenta su declaración Bajo Juramento declaran lo siguientes el presente trabajo de investigación titulado **"MICROPROPAGACIÓN DE DOS VARIEDADES DE NARDO (Polianthes tuberosa) MEDIANTE MULTIPLICACIÓN IN VITRO, UTILIZANDO DOS TIPOS DE CITOQUININAS"**; Es de nuestra exclusiva responsabilidad en calidad de autoras. Es todo cuanto podemos declarar en honor a la verdad, la misma que la hacemos para los fines legales pertinentes. HASTA AQUÍ LA DECLARACIÓN JURADA. La misma que elevada a escritura pública con todo su valor legal. Para el otorgamiento de la presente escritura pública se observaron todos los preceptos legales del caso, leída que les fue a los comparecientes por mí el Notario en unidad de acto, queda incomparada al protocolo de esta notaria aquella se ratifica y firma conmigo de todo lo cual doy Fe.

MURILLO MORENO MARIA ISaura
C.C. 050398927-9

CANDO QUINATOA SHIRLEY MICHELLE
C.C. 780499103-0

AB. HENRY ROJAS NARVAEZ

NOTARIO PUBLICO TERCERO DEL CANTON GUARANDA



EL NOTA....

Lista de fuentes Bloques Mmonar (mmonar@ueb.edu.ec)

Documento [MICROPROPAGACIÓN DE DOS VARIEDADES DE NARDO \(Polaris tuberosa\) MEDIANTE MULTIPLICACIÓN IN VITRO, UTILIZANDO DOS TIPOS DE CITOQUININAS.doc](#) (D146494872)

Presentado 2022-10-14 16:50 (-05:00)

Presentado por murilloisaura1993@gmail.com


Recibido mmonar.ueb@análisis.irkund.com

Mensaje Ing buenas tardes ahí le envío el documento para que me de pasando por el urkund por favor, desde an [Mostrar el mensaje completo](#)

Enl	Categoría
UNL	
UNL	
UNL	
89%	UNI
57%	Pro
100%	dec
94%	a la
89%	pro
48%	Sit.
100%	Dia

8% de estas 34 páginas, se componen de texto presente en 8 fuentes.

Advertencias Remiciar Compartir


Ing. Sonia Salazar Ramos.
Directora


Ing. Rodrigo Yáñez García
Relación Técnica.

DEDICATORIA

En primer lugar, a Dios por darme todas sus bendiciones ya que fue y sigue siendo mi fortaleza en todo el trayecto de mi vida estudiantil y gracias a El estoy donde estoy culminando esta etapa importante de mi vida.

A mis padres Marcos y Mariana que son mi pilar fundamental en mi vida, ya que con el esfuerzo de ellos me ayudaron a cumplir una meta más. Brindándome cada uno de sus mejores ánimos para no rendirme en medio camino. Gracias a ellos por todo el sacrificio que han hecho por mí siempre serán las personas que más quiero en mi vida y las que me seguirán apoyando en el resto del camino que me falta por recorrer. Gracias Padres y espero que mi Dios siga derramando bendiciones sobre ustedes los amo Mamá y Papá.

A mis hermanos y demás familiares igual mil gracias por el apoyo moral que me han brindado, me han aconsejado en todo este trayecto de mi vida.

Shirley Michelle Cando Quinatoa

DEDICATORIA

En primer lugar, doy gracias a Dios por permitirme llegar a este día, donde veo plasmado cada esfuerzo de mi madre Rosita Moreno quien con su ejemplo me ha enseñado que cada sueño se lo puede realizar con perseverancia y amor; a mis abuelitos Fidel Moreno y Delia Cela, aunque ya no estén conmigo, lo cual fueron quienes con su rectitud y consejos me han llevado por el camino del bien.

A mis hermanos, sobrinos quienes han estado en este largo camino y han sido parte de mi crecimiento tanto personal como académico. A mí tío Luis Moreno se que desde el cielo me bendice, quien me ha enseñado que no hay que desfallecer ni rendirme ante nada por más dura que este la situación, y por supuesto no podía faltar la Sra. Guadalupe Trávez quien, con su apoyo, que siempre me brindo logre cumplir mi objetivo.

Maria Isaura Murillo Moreno

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente, en especial a la Carrera de Ingeniería Agronómica y a sus docentes por haber brindado sus conocimientos para nuestra formación profesional.

De manera especial a nuestra Directora del proyecto, Ing. Sonia Salazar por brindarnos su apoyo incondicional en la realización de este proyecto de titulación.

De la misma manera a nuestros miembros del tribunal Ing. José Sánchez (Biometrista), Ing. Rodrigo Yáñez (Área de Redacción Técnica) quienes fueron designados para nuestro proyecto de investigación lo cual nos inculcaron con sus conocimientos, en la planificación, ejecución y sistematización de esta investigación.

Al laboratorio de Biotecnología agrícola, por el financiamiento otorgado para la realización del proyecto, especialmente al Ing. Víctor Hugo Cortez quien nos brindó sus conocimientos y su apoyo incondicional, para llevar a cabo nuestra investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDO	PÁG.
CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA	¡Error! Marcador no definido.
DEDICATORIA	VI
AGRADECIMIENTO	VIII
ÍNDICE DE CONTENIDOS	IX
INDICE DE CUADROS	XII
INDICE DE GRAFICOS.....	XIV
RESUMEN.....	XVI
SUMMARY	XVII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. PROBLEMA.....	3
III. MARCO TEÓRICO.....	5
3.1. Generalidades de cultivo	5
3.1.1. Origen.....	5
3.1.2. Características taxonómicas y botánicas	5
3.1.2.1 Bulbo	5
3.1.2.2. Tallo	6
3.1.2.3. Hojas	6
3.1.2.4. Flores.....	7
3.1.3. Aroma.....	7
3.2. Variedades.....	7
3.2.2. Cultivo.....	8
3.2.1.1. Requerimientos edafoclimáticos	8
3.2.2.2. Propagación del nardo.....	9
3.2.2.3. Propagación <i>in vitro</i>	9
3.3. Micropropagación	10
3.3.1. Medio de cultivo	10
3.3.2. Sales minerales Ms (Murashige y Skoog, 1962) en (mg/l).....	11
3.3.3. Micronutrientes en (mg/l)	11
3.3.4. Vitaminas en (mg/l)	12
3.3.5. Elaboración de soluciones madre del medio de cultivo Murahige y Skoog	12
3.3.6. Reguladores de crecimiento	12
3.3.7. Citoquininas	13

3.4. Plagas y enfermedades	13
3.4.1. Plagas	13
3.4.2. Enfermedades	14
IV. MARCO METODOLÓGICO	15
4.1 Materiales	15
4.1.1 Ubicación de la investigación: La investigación fue ejecutada en:.....	15
4.1.2 Situación geográfica y climática	15
4.1.3 Zonas de vida	15
4.1.4 Material experimental	16
4.1.5. Material de campo.....	16
4.1.6. Material de laboratorio	16
4.1.7. Material de oficina	17
4.2. Métodos.....	17
4.2.1. Factores de estudio.....	17
4.2.2. Tipo de diseño (DCA).....	18
4.2.3. Procedimiento	18
4.2.4. Tipo de análisis	18
4.3. Métodos de evaluación.....	18
4.3.1. Días a la brotación en el laboratorio (DBL).....	18
4.3.2. Número de brotes por explante (NBE)	18
4.3.3. Número de hojas por brote (NHB).....	19
4.3.4. Altura de brotes (AB).....	19
4.3.5. Tasa de velocidad de multiplicación (TVM)	19
4.3.6. Número de frasco contaminado (NCM).....	19
4.5. Manejo del experimento.....	20
4.5.1. Selección de las plantas.....	20
4.5.2. Obtención de brotes.....	20
4.5.3. Desinfección del material en el laboratorio	20
4.5.4 Preparación del medio de cultivo	20
4.5.5. Esterilización del medio de cultivo	21
4.5.6. Introducción al medio de cultivo.....	21
4.5.7. Transferencia del material vegetal	21
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
1. Días a la brotación en el laboratorio (DBL), Tasa de velocidad de multiplicación (TVM) y Número de frascos contaminados (NFC)	22
2. Número de brotes por explante (NBE).....	32

3. Número de hojas por brote (NHB).....	40
4. Altura de brotes (AB).....	49
5. Análisis de correlación y regresión lineal	57
6. Análisis económico de la relación B/C.	59
VI. COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS	60
VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	61
7.1. CONCLUSIONES	61
7.2. RECOMENDACIONES	62
BIBLIOGRAFÍA.....	63
ANEXOS	

INDICE DE CUADROS

CUADRO No.	PÁG.
1. Análisis de efecto principal para evaluar los promedios de Factor A: Variedades de Nardo en las variables DBL, TVM y NFC. Laguacoto III. 2022.....	22
2. Resultados de la Prueba de Tukey al 5% para comparar los promedios de Factor B: Tipos de Citoquininas en las variables DBL, TVM y NFC. Laguacoto III. 2022.....	25
3. Resultados de la Prueba de Tukey al 5% para comparar los promedios Tratamientos: Variedades de Nardo por Tipos de Citoquininas las variables DBL, TVM y NFC. Laguacoto III. 2022.	28
4. Análisis de efecto principal para evaluar los promedios de Factor A: Variedades de Nardo en la variable NBE a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.....	32
5. Resultados de la Prueba de Tukey al 5% para comparar los promedios de Factor B: Tipos de Citoquininas en la variable NBE a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.....	34
6. Resultados de la Prueba de Tukey al 5% para comparar los promedios Tratamientos: Variedades de Nardo por Tipos de Citoquininas en la variable NBE a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.....	37
7. Análisis de efecto principal para evaluar los promedios de Factor A: Variedades de Nardo en la variable NHB a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.	40
8. Resultados de la Prueba de Tukey al 5% para comparar los promedios de Factor B: Tipos de Citoquininas en la variable NHB a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.....	43
9. Resultados de la Prueba de Tukey al 5% para comparar los promedios Tratamientos: Variedades de Nardo por Tipos de Citoquininas en la variable NHB a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.....	46
10. Análisis de efecto principal para evaluar los promedios de Factor A: Variedades de Nardo en la variable AB a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.....	49
11. Resultados de la Prueba de Tukey al 5% para comparar los promedios de Factor B: Tipos de Citoquininas en la variable AB a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.....	52
12. Resultados de la Prueba de Tukey al 5% para comparar los promedios Tratamientos: Variedades de Nardo por Tipos de Citoquininas en la variable AB a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.....	55
13. Análisis de correlación y regresión lineal de las variables independientes (Xs) que tuvieron una estrechez y asociación significativa sobre la tasa de velocidad de multiplicación. Laguacoto III. 2022.....	57

14. Relación Beneficio Costo: De la micro propagación en dos variedades de nardo (*Polianthes tuberosa*) mediante multiplicación in vitro, utilizando dos tipos de citoquininas. Lagucoto III, 2022 59

INDICE DE GRAFICOS

GRÁFICO	PÁG
1. Variedades de Nardo en las variables días a la brotación en laboratorio, tasa de velocidad de multiplicación y número de frascos contaminados. Laguacoto III. 2022.....	23
2. Tipos de Citoquinas en las variables días a la brotación en laboratorio, tasa de velocidad de multiplicación y número de frascos contaminados. Laguacoto III. 2022.....	26
3. Tratamientos: Variedades de Nardo por Tipos de Citoquinas en las variables días a la brotación en laboratorio, tasa de velocidad de multiplicación y número de frascos contaminados. Laguacoto III. 2022.	29
4. Variedades de Nardo en la variable número de brotes por explante a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.	33
5. Tipos de Citoquinas en la variable número de brotes por explante a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.	35
6. Tratamientos: Variedades de Nardo por Tipos de Citoquinas en la variable número de brotes por explante a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.	38
7. Variedades de Nardo en la variable número de hojas por brote a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.	41
8. Tipos de Citoquinas en la variable número de hojas por brote a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.	44
9. Tratamientos: Variedades de Nardo por Tipos de Citoquinas en la variable número de hojas por brote a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.	47
10. Variedades de Nardo en la variable altura del brote a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.....	50
11. Tipos de Citoquinas en la variable altura del brote a los 30, 45 y días. Laguacoto III. 2022.....	53
12. Tratamientos: Variedades de Nardo por Tipos de Citoquinas en la variable altura del brote a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.....	56

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Mapa de ubicación del ensayo

Anexo 2. Base de datos

Anexo 3. Fotografías de la instalación, seguimiento y evaluación del ensayo

Anexo 4. Glosario de términos técnicos

RESUMEN

La investigación que realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias, en la que se evaluó la Micropropagación de dos variedades de nardo (*Polianthes tuberosa*) mediante multiplicación in vitro, utilizando dos tipos de citoquininas. Los objetivos planteados en este trabajo investigativo fueron: a) Valorar la variedad de nardo que tiene mayor propagación mediante multiplicación in vitro. b) Identificar el tipo de Citoquinina que ayuda a un mayor porcentaje de plántulas. c) Establecer la relación beneficio /costo de cada uno de los tratamientos. Se utilizó un diseño de Bloques Completos al Azar (DBCA) en arreglo factorial 2x3. El factor A correspondió a variedades de nardo: A1: Blanca y A2: Amarilla. El factor B fue dos tipos de cito quininas y un testigo: B1: (testigo absoluto); B2: Bencil adenina y B3: Kinetina. Teniendo seis tratamientos. Se hizo análisis de varianza, efecto principal para variedades de nardo, prueba de Tukey para factor B: Tipos de Citoquininas e interacción de factores Ax B. Análisis de correlación y económico de la relación Benéfico/costo e ingreso/costo. Los resultados más relevantes fueron: La variedad de nardo Amarilla alcanzó una TVM de 0,06 explantes/día; 3,33 brotes/explante; 13,17 hojas/brotes, y, una altura del brote de 4,92 cm. La citoquina Kinetina tuvo los mejores efectos en la micropropagación de nardo, al obtener la mayor TVM con 0,06 explantes/día; 3,50 brotes/explante; 14,00 hojas/brote y 5,15 cm de altura del brote. El tratamiento con los mejores resultados fue T6: Nardo amarillo + Kinetina con una TVM de 0,07 explantes/día; 4,00 brotes/explante y una altura del brote de 5,45 cm. Las variables número de brotes/explante a los 60 días; altura de brotes a los 45 y 60 días, incrementaron la tasa de velocidad de multiplicación. La mejor relación beneficio/costo e ingreso/costo; se tuvo en los tratamientos T5: Nardo amarillo + Bencil adenina y T6: Nardo amarillo + Kinetina con una B/C de 2,34 y una RI/C de 1,34.

Palabras Claves: Nardo, citoquinina; kinetina; bencil adenina; explante; brote

SUMMARY

The research carried out at the Biotechnology Laboratory of the State University of Bolívar, Faculty of Agricultural Sciences, in which the Micropropagation of two varieties of tuberose (*Polianthes tuberosa*) was evaluated by means of in vitro multiplication, using two types of cytokinins. The objectives set forth in this research work were: a) Assess the tuberose variety that has the greatest propagation through in vitro multiplication. b) Identify the type of Cytokinin that helps a higher percentage of seedlings. c) Establish the benefit/cost ratio of each of the treatments. A Randomized Complete Block Design (DBCA) in a 2x3 factorial arrangement was used. Factor A corresponded to tuberose varieties: A1: White and A2: Yellow. Factor B was two types of cytokinins and a control: B1: (absolute control); B2: Benzyl adenine and B3: Kinetin. Having six treatments. An analysis of variance, main effect for tuberose varieties, Tukey's test for factor B: Types of Cytokinins and interaction of AxB factors was performed. Correlation and economic analysis of the relationship Benefit/cost and income/cost. The most relevant results were: The Amarilla tuberose variety reached a TVM of 0.06 explants/day; 3.33 shoots/explant; 13.17 leaves/shoots, and a shoot height of 4.92 cm. The cytokine Kinetin had the best effects on the micropropagation of tuberose, obtaining the highest TVM with 0.06 explants/day; 3.50 shoots/explant; 14.00 leaves/shoot and 5.15 cm shoot height. The treatment with the best results was T6: Tuberose yellow + Kinetin with a TVM of 0.07 explants/day; 4.00 shoots/explant and a shoot height of 5.45 cm. The variables number of shoots/explant at 60 days; shoot height at 45 and 60 days increased the rate of multiplication speed. The best benefit/cost and income/cost ratio; was obtained in treatments T5: Tuberose yellow + Benzyl adenine and T6: Tuberose yellow + Kinetin with a B/C of 2.34 and an RI/C of 1.34

Keywords: Tuberose, cytokine;kinetin; benzyl adenine explant; outbreak

I. INTRODUCCIÓN

La producción mundial de flores en sus comienzos era impulsada por el desarrollo de las economías de los países, en especial se destaca el auge propagado por Europa Occidental, América del Norte, Canadá y Japón los cuales, aportan con el 50% de la comercialización de flores de corte. Se expone que los países importadores de flores la demanda, con incrementos que van desde el 10 al 15%. (Solano & García, 2013)

En la producción de flores destaca el género *Polianthes L.* endémica de México y perteneciente a la familia de Agavaceae, siendo de alta significación para la economía. Este género de planta está constituido por una variedad de 15 especies, dentro de estas especies se mencionan las siguientes: *P. densiflora*, *P. durangensis*, *P. elongata*, *P. howardii*, *P. longiflora*, *P. palustris*, *P. platyphylla*, *P. graminifolia*, *P. bicolor*, *P. geminiflora*, *P. mexicana*, *P. gracilis*, *P. tuberosa*, entre otras. (Yong, 2010)

La especie *P. Tuberosa* más conocida comúnmente como Nardo, es una flor cultivada para ornamentación desde hace más de 400 años. Se caracteriza por tener una alta concentración de sapogeninas en sus rizomas y raíces tuberosas, además tiene aceites esenciales de interés para la industria farmacéutica y del perfume. (Sangavai C; Chellapandi P. 2008)

El Ecuador al estar situado en la línea equinoccial tiene una variedad de microclimas en los cuales, se puede desarrollar la floricultura con diversos tipos de flores de corte. El sector de florícola de Ecuador es dinámico y ha crecido en los últimos años de manera rápida y rentable para los productores. (Gómez, 2014)

Por otro lado, los reguladores de crecimiento como las Citoquininas, las Auxinas y las Giberelinas cumplen un rol clave en la producción de plántulas in vitro de diferentes especies, sin los reguladores de crecimiento específicos, no sería posible lograr el incremento de la tasa de multiplicación. (Jordan, M. , 2006)

Las citoquininas son las encargadas de interrumpir la dominancia apical, promover la inducción y proliferación de las yemas axilares in vitro, siendo

importante conocer las concentraciones y el tipo de citoquinina que debe utilizarse dependiendo cada caso, estos son los factores que influyen en el éxito de la micropropagación in vitro, especialmente en el género *Polianthes tuberosa*. (Erig, A., 2006)

Se ha determinado que no existe mayor información relevante acerca del cultivo de nardos en el Ecuador y que su mayor comercialización se la realiza a nivel nacional en arreglos florales y ceremonias religiosas, esta flor necesita mucho sol y agua pero que muestra gran resistencia a temperaturas extremas. (El Comercio, 2012)

En la provincia de Bolívar no existe información sobre el cultivo siendo una limitante al momento de potenciar el cultivo con miras a futuro, por tanto, el presente estudio contribuye con información, sobre la multiplicación in vitro de plántulas de Nardo de las variedades blancas y amarillas, por ello se realizó el seguimiento de las plántulas en las primeras fases de crecimiento.

De tal modo, que esta investigación se plantea determinar la dosis adecuada para desarrollar las plántulas de nardo (*Polianthes tuberosa*) mediante una micropropagación in vitro, con la obtención de esta información se tendrá un expediente práctico para obtener flores de nardo saludables y mejoradas. Además, con la micropropagación el nivel poblacional de plántulas nace en periodos de tiempo cortos.

Los objetivos planteados dentro de esta investigación fueron:

- Valorar la variedad de nardo que tiene mayor propagación mediante multiplicación in vitro.
- Identificar el tipo de Citoquinina que ayuda a un mayor porcentaje de plántulas.
- Establecer la relación beneficio /costo de cada uno de los tratamientos.

II. PROBLEMA

Las especies de plantas que se reproducen asexualmente a través de bulbos de *Polianthes tuberosa* se caracterizan por presentar poca variabilidad genética de gran relevancia en la actualidad, ante los efectos del cambio climático, y está relacionado con la búsqueda de resistencia o tolerancia a las condiciones adversas del medio ambiente.

Otro punto a tomar en cuenta es que a pesar de que las flores contengan un alto número de semillas, muchas de las mismas no son viables, con bajas tasas de germinación en estado silvestre. Y al probar la multiplicación asexual de manera tradicional los altos índices de contaminación producidos al introducir material silvestre, hace que sea difícil su establecimiento.

Existe muy poca bibliografía en lo que respecta al uso de *Polianthes tuberosa* y es muy probable que debido a esta problemática no se aproveche el potencial medicinal y económico de estas plantas, ya que su flor es muy aromática y florece hasta el extremo de la espiga. Una sola vara puede perfumar durante semanas un ambiente.

No podemos hablar de una importancia económica, puesto que es un cultivo bastante desconocido, ya que la variedad blanca por su aroma quizá es una flor apreciada en nuestro país así se puede confirmar que no hay ningún productor específico de nardo con una producción inferior para la producción de bulbo y flor en cambio la variedad amarilla no es muy propagada en nuestro entorno.

Teniendo en cuenta que el Nardo herbáceo silvestre *Polianthes tuberosa* se adapta muy bien a zonas tropicales y sub tropicales debido a las actividades como el sobrepastoreo, la deforestación, la quema repetitiva han venido alterando la ecología natural, y considerando que por décadas se ha mantenido el monocultivo degradando así el suelo, debido a que no se ha realizado un buen manejo de prácticas agrícolas como rotación de cultivos o periodos descanso ; se podría incentivar a una diversificación de los cultivos dando así una alternativa

que pueden ayudar en estas zonas a disminuir el índice de degradación del suelo y una fuente de ingresos distintas a la que está acostumbrada el productor ya que abre nuevas plazas de mercado.

Debido a que los nardos han tenido un impacto mundial y sus precios en el mercado son muy atractivos se ha visto en la necesidad de tener una alternativa de propagación masiva dando las garantías al productor de una planta viable al establecer en el campo. Es por esto que la proliferación mediante un mecanismo in vitro tomando las debidas precauciones de asepsia que exige este protocolo se podrá lograr obtener plántulas sin problemas de contaminación y mediante el uso de los fitorreguladores un mayor número de explantes en un menor tiempo logrando así nuestros objetivos.

Si esta problemática no se resuelve en parte a los productores de la provincia de Bolívar seguirán sin obtener una ayuda para su aspecto económico el cual habrá un déficit de conocimiento ante este cultivo que se siga extinguiendo y del cual tratamos que sea reconocido por cada uno de los productores para que obtenga una mayor rentabilidad y por ende mejoren la calidad de vida.

La investigación pretende desarrollar una metodología de actualidad como es la multiplicación in vitro utilizando dos variedades de nardo con dos tipos de citoquininas y mejorar la calidad de plantas para poder ofertar a los diferentes productores de la región lo que permitirá formar viveros ornamentales con plantas de calidad lo que facilitará un mayor desarrollo en menor tiempo e igual que el inicio de su producción.

En caso de que no se realizara este tipo de investigación, la especie de *Polianthes tuberosa* conocida también como nardo seguiría en peligro de extinción, ya que los productores de la provincia de Bolívar no llegarían a conocer esta especie y no tendrían conocimiento alguno para beneficiarse de este tipo planta sobre todo por su flor que es de uso ornamental y medicinal.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Generalidades de cultivo

3.1.1. Origen

El género de las *Polianthes* se compone por 13 especies endémicas que pertenecen generalmente a México. Una de las especies más cultivadas es la *Polianthes tuberosa*. (Castell, 2017). En el Ecuador se le conoce como margarita siendo una especie exótica de uso ornamental que pertenece a la familia de las *Agavaceae*. Además, es una planta perenne que se utiliza como flor de corte. Son reducidas las fincas que se dedican al cultivo de esta flor que se ha adaptado al suelo del Ecuador debido a los microclimas y una eficiente luminosidad que brinda a la planta el desarrollo de sus tallos gruesos, largos y verticales con espigas grandes y de colores hermosos y que poseen una mayor durabilidad en los floreros. (Pando, 2018)

3.1.2. Características taxonómicas y botánicas

De acuerdo con (Castell, 2017) manifiesta la siguiente taxonomía para el nardo: Nombre científico: *Polianthes tuberosa*, nombre común: Nardo, amole, tuberosa o vara de San José, clase: monocotiledónea, familia: Amaryllidaceae, Distribución: Originaria de América Meridional en el centro sur de México, llamada popularmente "narciso" amole, nardo, tuberosa, azucena o vara de San José.

3.1.2.1 Bulbo

El bulbo del nardo es de color pardo-marrón con la presencia de escamas carnosas en donde se encuentran almacenadas las sustancias de reserva. De su parte inferior (disco basal) crecen varias raíces cortas y redondeadas. El tallo floral sale de parte central del mismo. El bulbo es el órgano reproductor del nardo que cumple con el objetivo de almacenar reservas para la reproducción. Las reservas se encuentran en las escamas bulbares que son muy carnosas. Al órgano

de reproducción se le conoce con el nombre de tubero o rizoma. El bulbo tiene forma oval cónica y provista de túnica. (Calvo, 2017)

Los calibres empleados en las plantaciones que se dedican a la producción de flores de corte son entre 10/12 y 12/14. Los bulbos que sobrepasan estos valores ya han florecido y son bulbos viejos. El peso de estos bulbos que va de una cifra tentativa de 500 a 600 bulbos en calibre de 10/12 es de 15 a 20 kg. (González, 2016). Las raíces son cortas, abundantes y redondeadas. Estas aparecen en la base del bulbo. (Castell, 2017)

3.1.2.2. Tallo

El nardo posee un tallo floral simple, de color verde brillante, recto y redondeado. Alrededor de este se encuentran pequeñas hojas hasta el extremo donde se halla una inflorescencia. El tallo posee un color verde brillante, no es hueco y la base es endurecida y compactada, no permite que ascienda el agua. La inflorescencia mide entre 30 a 60 cm de longitud y posee un número de flores entre 8 a 20. Los tallos aéreos logran una altura de 180 cm disponiéndose las flores en parejas y saliendo de una bráctea. En los tallos que han sido cortados se puede encontrar dos o tres parejas de flores abiertas. En la inflorescencia las flores de la base son de mayor tamaño y va disminuyendo a medida que llega al ápice, abriendo la base del ápice las flores. Las parejas florales en la inflorescencia es forma zigzagueante. (González, 2016)

3.1.2.3. Hojas

Las hojas del nardo son sésiles, acanaladas y lineales que varían en medida de 30 a 60 cm de largo y de ancho va entre 1 a 1,5 cm. Presenta un color verde brillante, siendo de color rojizo con verde brillante las que se acercan a la base de entre 30 a 40 cm de largo y entre 8 a 12 hojas caulinares reducidas. Las hojas, glabras dispuestas en rosetón extendido. Las hojas del tallo floral presentan una forma a modo de escamas que se doblan de igual al rosetón. (Alia & Pérez, 2016)

3.1.2.4. Flores

Las flores del nardo se muestran reunidas en una inflorescencia en espiga. Esta inflorescencia va de 30 a 60 cm de longitud, compuesta por 8 a 20 flores que se disponen en parejas. Las flores son de color blanco muy olorosas en general por la noche. Tiene una flor pequeña simple que va en parejas con aspecto céreo. Hermafroditas y reguladoras, su perigonio corolino es de forma de embudo con un tubo largo y curvado en las cercanías de la base que se divide en seis lacinias. Los estambres inclusos y soldados de la parte central de tubo perigónico. Tiene el ovario tricarpelar y trilocular libre en el ápice, con tres estigmas. Las flores vienen en pares y son de larga duración. El ovario es ínfero, los pétalos son tepaloides y brotan de la zona superior del ovario. (Castell, 2017)

3.1.3. Aroma

El nardo posee un gran aroma por lo cual es considerado una de las flores más aromáticas. Su aroma es penetrante, singular, dulzón hasta que puede llegar a ser molesto. Esto debido a la presencia de indol como factor importante de sus aceites esenciales seguido de bencilacetato y metil-autranilato. La fragancia del nardo es fuerte, pero se debe a que necesita atraer a los insectos polinizantes. (Pando, 2018) Fruto se presenta como una cápsula provista de tres valvas que posee en general las semillas. (González, 2016)

3.2. Variedades

Variedad blanca:

Existen variedades cultivares de flores simples. En la actualidad y las que se han propagado han sido las de flores dobles. Una de las principales es la *Perla* con inflorescencia completa de flores de color blanco con perigonio doble. Sus tallos pueden llegar a los 80 y 160 cm cultivada en la Península Ibérica.

Variedad amarilla:

Conocida como la variedad Perla enana tiene su espiga compacta con flores muy llenas, dobles de gran tamaño y más resistentes con un tallo que va de 40 a 60 cm. En Sudamérica se presentan híbridos heterocigóticos de una variedad de colores entre estos el rojo, granate y rosado. (Castell, 2017)

3.2.2. Cultivo

3.2.1.1. Requerimientos edafoclimáticos

Temperatura: esta debe ser entre 20 a 30°C en la mañana y de 15 a 20 °C en la noche. La temperatura del suelo debe estar entre los 17 a 20°C. Las temperaturas que están por debajo de los 8°C tienden a paralizar las funciones de la planta, en cuanto, sí la temperatura se eleva en el suelo puede llegar a pudrir los bulbos. (Calvo, 2017)

Humedad: el rango aceptable para el cultivo de nardo oscila entre el 60 a 70%. Los valores que van por encima pueden dar como resultado pudriciones en el bulbo. Así mismo, valores bajos no permiten el desarrollo adecuado y la apertura de los botones florales. (Castell, 2017). Luz: el nardo requiere una alta radiación lumínica para florecer. En climas mediterráneos florece en los meses de junio a septiembre. La escasa luz provoca abortos florales. (Pando, 2018)

Sustrato: El suelo debe tener una profundidad de 20 a 30cm, poroso con buen drenaje y retención de agua. Además, debe ser rico en materia orgánica bien fermentada. El pH debe estar entre 6,5 a 7. El nardo no tolera la salinidad. (Castell, 2017).

Riego: El riego se realiza de manera regular hasta que logre salir las primeras hojas y la conductividad eléctrica del agua de riego será inferior a 1,5 g/l. Desde este momento el riego será más frecuente. Durante la floración debe realizarse con mayor frecuencia, de manera que se lo reduzca durante el periodo de cultivo restante.

3.2.2.2. Propagación del nardo

Parte de la propagación vegetativa consistiendo en la obtención de bulbillos para el engorde, a partir de bulbos madres, estos son los que han salido de la cosecha. La cosecha de bulbos madre se la realiza en invierno. Luego de la obtención se realiza un secado con aire caliente y se almacena a temperaturas de 20 a 25°C. Después de un mes, se los extraen y clasifican de acuerdo a su calibre. El ciclo de engorde del bulbo peque que va de 2/4 a 4/6 dura entre 1 a 4 años, mientras que los de mayor calibre están entre un año. (Carrillo *et al*, 2021)

Antes de la plantación se realiza una desinfección a los bulbos. La plantación se realiza por lo general en primavera, en surcos separados por 50 a 60cm con una densidad de 20000 a 40000 bulbillos/ha en función de su calibre. La profundidad va entre 5 a 10cm, aplicando mayor profundidad en suelos ligeros y climas calurosos. (Carrillo *et al*, 2021). Durante el periodo de engorde el riego recomendado es mediante la aspersion. En un inicio deberá ser moderado, para luego aumentar la cantidad a medida que la planta se desarrolla. (Carrillo *et al*, 2021)

3.2.2.3. Propagación *in vitro*

Cultivar *in vitro* significa que las plantas van a ser cultivadas dentro de un contenedor de vidrio en un ambiente artificial. A través de esta forma de cultivo se tiene dos características fundamentales: la asepsia que representa la ausencia de bacterias, gérmenes, etc. Y el control de los factores que afectan el crecimiento normal de la planta. Los estudios han avanzado que en la actualidad se pueden realizar experimentos a nivel celular y molecular de tal modo que se puede incidir de forma positiva en el desarrollo de la planta. (Adema & Sharry, 2015)

Reproducir en los laboratorios las condiciones adecuadas para que una planta se desarrolle en la naturaleza es complejo, por tal, solo se escoge factores que se puedan controlar. Cuando se utiliza una parte del ser vivo se utiliza el término explante para indicar el órgano o el tejido vegetal que se cultiva *in vitro*.

Con esto nace una dificultad, ya que en el laboratorio se debe suministrar aquello que recibía con un sistema completo. El cultivo in vitro de plantas es una técnica que requiere de un control específico del ambiente, tanto físico como químico en el que se dispone el explante. Por tal, es necesario conocer los principales factores que conforman y deberán ser controlados. (Castillo, 2004)

3.3. Micropropagación

La micropropagación o propagación clonal es una aplicación común del cultivo in vitro, por medio de esta técnica y a través del explante de una planta madre, se puede obtener una descendencia uniforme con plantas genéticamente idénticas a las cuales, se les denomina clones. Los explantes mayormente utilizados para esta técnica son las yemas vegetativas de las plantas. Los contenedores de vidrio donde se encuentran las plantas se las coloca bajo luz artificial dentro de una cámara de crecimiento, proponiendo temperaturas que varían entre 21 a 23°C, además se controla la cantidad de horas de luz. (Castillo, 2004)

La micropropagación permite ventajas como tener un mayor número de plantas homogéneas y de mayor calidad fitosanitaria, en cortos periodos de tiempo y espacios reducidos. El inconveniente con este método es que requiere mayores costos por motivos de montaje del laboratorio como proceso de preproducción. (Adema & Sharry, 2015)

3.3.1. Medio de cultivo

El medio de cultivo está compuesto por una combinación de sales minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento, azúcar, agua y agar. La combinación del medio de cultivo en general depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micropropagación. Los medios de cultivo son soluciones acuosas donde se van a desarrollar los microorganismos y/o animales. Este desarrollo se da por medio de los nutrientes requeridos. La composición del medio de cultivo provee los nutrientes a tejido vegetal in vitro, por tal, debe ser similar a las condiciones de nutrición que brinda el suelo a la planta en el estado natural.

No existe un medio único para todos los experimentos y especies a disposición de la investigación, a pesar de esto, se tiene un medio básico o mejor conocido como Murashige y Skoo. (Adema & Sharry, 2015)

3.3.2. Sales minerales Ms (Murashige y Skoog, 1962) en (mg/lit)

- $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ 1.650
- KNO_3 1.900
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.440
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.370
- KH_2PO_4 0.170
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0278
- $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0372
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0169
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0086
- H_3BO_3 0.0062
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.00025
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.000025
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.000025
- Mioinositol 0.100
- Tiamina HCl 0.0001
- Ácido nicotínico 0.0005
- Piridoxina HCl 0.0005
- Glicina 0.002 (Adema & Sharry, 2015)

3.3.3. Micronutrientes en (mg/lit)

- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27,8
- Na_2EDTA 37,3
- H_3BO_3 6,2
- $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 22,3
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8,6
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,25
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,025

- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,025
- KI 0,83 (Adema & Sharry, 2015)

3.3.4. Vitaminas en (mg/l)

- myo- Inositol 100
- Tiamina HCl 0,1
- Ácido nicotínico 0,5
- Glicina 2, 0
- Piridoxina HCl 0,5 (Adema & Sharry, 2015)

3.3.5. Elaboración de soluciones madre del medio de cultivo Murahige y Skoog

Para la realización del medio de cultivo “MS” se elaboran las siguientes:

- Stock de macronutrientes
- Stock de micronutrientes
- Stock de quelatos de Fe
- Soluciones Stock de vitaminas
- Soluciones Stock de Reguladores

3.3.6. Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento son los compuestos que tienen mayor importancia en el medio de cultivo. Dependiendo del objetivo del cultivo deberá seleccionarse y calcularse la dosis necesaria de hormonas que se utilizarán. Los reguladores de crecimiento se clasifican en: auxinas, citocininas, giberelinas y retardantes e inhibidores del crecimiento. Se pueden encontrar naturales que son las hormonas o sintéticas que regulan el crecimiento. (Adema & Sharry, 2015)

3.3.7. Citoquininas

Son utilizadas para estimular la división celular, especialmente al combinarlas con auxinas. A altas concentraciones inducen la formación de brotes adventicios e inhiben la formación de raíces, promueven la multiplicación de tallos y proliferación de yemas laterales, a través de la disminución de la dominancia apical. Por otra parte, las citoquininas permiten retardar el proceso de envejecimiento celular e influyen en el transporte de auxinas. Sin embargo, aunque algunos tipos de tejidos requieren esencialmente citoquininas para el fenómeno de la organogénesis, éstas no son esenciales. Para preparar soluciones stock, se deben disolver con unas gotas de una solución 1M de ácido clorhídrico (HCl). (Adema & Sharry, 2015)

Las citocininas naturales son procedentes de adenina y se localizan en las plantas como nucleósidos y nucleótidos y se reducen en tejidos jóvenes y raíces, posee la peculiaridad de estimular la síntesis de proteínas, participan en el control del ciclo celular estimulando y regulando la división celular y destruyen la latencia de las yemas axilares, en plantas completas impulsan la brotación, provocando el crecimiento de las hojas y retrasa la senescencia, las citoquininas generalmente empleadas en el cultivo de tejidos son: Benciladenina (BA), Cinetina (CIN), Isopentiladenina (2iP), el Tidiazurón (TDZ), Isoprenoides (Zeatina y sus derivados trans y Cis) (Bhojwani & Dantu).

3.4. Plagas y enfermedades

3.4.1. Plagas

Pulgón: es una plaga que aparece en primavera y afecta a los brotes tiernos como también, a las hojas e inflorescencias. Por lo general, se manifiesta con el enrollamiento y deformación de los tejidos. (Castell, 2017).

Trips: es una plaga que concentra su daño en el tallo floral y las inflorescencias. Los síntomas que muestra la planta son manchas de color blanco de aspecto plateado-plomizo a su alrededor con motitas negras que corresponde a los excrementos de la plaga. (Castell, 2017)

Mosca blanca: se muestra esta plaga cuando las temperaturas sobrepasan los 25°C. Se manifiesta en el envés de las hojas provocando manchas amarillas y marchitamiento de las mismas. (Tapia, 2020)

Araña roja: es un ácaro que aparece cuando las condiciones de humedad son bajas <50% y temperaturas altas de 25°C en adelante. Se manifiesta con puntos amarillos en el haz de las hojas para luego tornarse marrones y se abarquillan, teniendo aspecto polvoriento. Estas hojas a la final se secan y caen. El ácaro también puede atacar la espiga floral, encontrándose en este lugar finas telarañas en el envés de las hojas afectadas. (Tapia, 2020)

3.4.2. Enfermedades

Podredumbre de raíz y cuello (*Phytophthora parasitica*): es un hongo que habita en los suelos húmedos. Las raíces y el cuello de la planta muestran necrosis provocando el marchitamiento y amarillamiento de la misma. Luego las hojas se secan y caen. (Castell, 2017)

Ramularia primulae, *Phyllosticta primulicola*, *Gloeosporium sp.* y *Colletotrichum sp.*: la *Ramularia* son hongos que provocan manchas foliares de color amarillo pálido en el haz y blanco en el envés, luego se torna rojizo. *Phyllosticta primulicola* provoca manchas circulares de color pardo con moteados negros en su interior. *Gloeosporium sp.* y *Colletotrichum sp.*, causan manchas negras (antracnosis). (Calvo, 2017)

Botrytis cinérea: es un hongo que se muestra en condiciones de humedad y temperaturas altas. Daña a los bulbos, hojas y botones florales generando manchas de color pardo de característica redondeada. (Castillo, 2004)

IV. MARCO METODOLÓGICO

4.1 Materiales

4.1.1 Ubicación de la investigación: La investigación fue ejecutada en:

Tabla 1. Ubicación de la investigación

País	:	Ecuador
Provincia	:	Bolívar
Cantón	:	Guaranda
Parroquia	:	Gabriel Ignacio Veintimilla
Sector	:	Laboratorio de biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Granja Laguacoto III

4.1.2 Situación geográfica y climática

La ubicación geo-referencial del laboratorio de biotecnología agrícola de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y del Ambiente de la UEB.

Altitud	:	2668 msnm.
Latitud	:	1° 36' 55" S
Longitud	:	78° 59' 53" O
Temperatura media	:	13.5 °C
Temperatura máxima	:	23 °C
Temperatura mínima	:	2 °C
Heliofanía	:	780 h/año
Precipitación promedio anual	:	845 mm

Fuente: (PDOT BOLÍVAR, 2012)

4.1.3 Zonas de vida

La localidad en estudio de acuerdo a las zonas de vida de HOLDRIGE, L, corresponden al bosque seco montano bajo (bs – MB).

4.1.4 Material experimental

- Brotes de dos variedades de nardo (*Polianthes tuberosa*) blanca - amarilla
- Citoquininas: Bencil adenina, Kinetina

4.1.5. Material de campo

- Cámara digital
- Libro de campo
- Esferos
- Tijeras de podar
- Navaja victorino
- Botas de caucho
- Jabón líquido
- Alcohol

4.1.6. Material de laboratorio

Tabla 2. Material de laboratorio

Cabina de flujo laminar horizontal	Refrigerador domestico
Autoclave	Vidriería
Balanza digital	Microondas
Agitador magnético	Frascos de cristal
Agua destilada	Papel absorbente
Gel desinfectante	Bandeja de plástico
Estante	Gorro, guantes
Mascarilla	Alcohol de 70 °
Gafas, pinzas	Jabón líquido
Bisturí	Mechero de Alcohol 70 °

Fuente: (Datos obtenidos en el Laboratorio de Biotecnología, 2022)

4.1.7. Material de oficina

- Resma de papel A4, Flas memory, esferos, libreta de campo, internet.
- Computadora portátil y accesorios

4.2. Métodos

4.2.1. Factores de estudio

Factor A:

Variedades de Nardo

- A1: Blanca
- A2: Amarilla

Factor B:

Tipo de Citoquininas:

- B1: (testigo absoluto)
- B2: Bencil adenina
- B3: Kinetina

Tratamientos

Combinación de factores AxB: 6 tratamientos según el detalle que se muestra en la siguiente tabla la cual fue utilizada para cada una de las variedades de nardo.

Tabla 3. Tratamientos

T1	→	A1B1	→	Nardo blanco + (testigo absoluto)
T2	→	A1B2	→	Nardo blanco + Bencil adenina
T3	→	A1B3	→	Nardo blanco + Kinetina
T4	→	A2B1	→	Nardo amarillo + (testigo absoluto)
T5	→	A2B2	→	Nardo amarillo + Bencil adenina
T6	→	A2B3	→	Nardo amarillo + Kinetina

Fuente: (Datos obtenidos en el Laboratorio de Biotecnología, 2022)

4.2.2. Tipo de diseño (DCA)

Fuentes de variación	Grados de Libertad	CME*
Factor A: Variedades (2-1)	1	$\int 2 e + 6 \theta 2$ FA
Factor B: Citoquininas (3-1)	2	$\int 2 e + 6 \theta 2$ FB
FA x FB: (A-1) (B-1)	2	$\int 2 e + 3 \theta 2$ FA x FB
Error Experimental t (r-1)	6	$\int 2 e$
Total (t x r) – 1	11	

Fuente: (Cando, 2022)

4.2.3. Procedimiento

- Número de tratamientos: 6
- Número de repeticiones: 2
- Número de unidades experimentales: 12

4.2.4. Tipo de análisis

- Análisis de efecto principal para comparar los promedios del factor A.
- Prueba de Tukey al 5% para comparar promedios de los tratamientos en las variables que sean significativas (Fisher protegido).
- Análisis de correlación y regresión lineal simple.

4.3. Métodos de evaluación

4.3.1. Días a la brotación en el laboratorio (DBL)

Los días a la brotación se tomaron en el área de incubación por observación directa a los 30, 45 y 60 días en sus respectivos medios de proliferación, se consideró un brote al presentar al menos dos hojas desarrolladas.

4.3.2. Número de brotes por explante (NBE)

El número de brotes por explante se tomó del área de incubación por observación directa a partir de los 30, 45 y 60 días del último subcultivo a sus

respectivos medios de proliferación, se consideró un brote al presentar en este, al menos, dos hojas desarrolladas.

4.3.3. Número de hojas por brote (NHB)

La variable número de hojas por brote se tomó del área de incubación por observación directa en el frasco de cristal a los 30, 45 y 60 días del subcultivo a sus respectivos medios de proliferación, se consideró hojas desarrolladas todas menos la primera y la última, la cual estaba en desarrollo.

4.3.4. Altura de brotes (AB)

En altura de brotes se tomó del área de incubación con la ayuda de una regla por la parte exterior del frasco de cristal desde la parte coronal superficial de la base del brote hasta su ápice a los 30, 45 y 60 días del subcultivo a sus respectivos medios de proliferación.

4.3.5. Tasa de velocidad de multiplicación (TVM)

Esta expresada la relación entre el número de brotes obtenidos al final del ciclo de multiplicación sobre el tiempo de duración del ciclo. Este parámetro se analizó con la siguiente fórmula:

$$TVM = \frac{N^{\circ} \text{ de brotes}}{\text{Tiempo (días)}}$$

4.3.6. Número de frasco contaminado (NCM)

El número de frascos contaminados se expresó en porcentaje, se evaluó por observación directa la presencia de agentes patógenos causados por hongos durante los 60 días que es el tiempo que transcurrió desde la siembra de los brotes. Considerando que un frasco de cristal está contaminado cuando en el medio de cultivo se observa la presencia de esporas blanquecinas o grises, las cuales con el transcurso del tiempo se diseminan formando una estructura algodonosa.

4.5. Manejo del experimento

4.5.1. Selección de las plantas

Se obtuvo los brotes de las plantas de nardo provenientes del cantón Patate, provincia Tungurahua, las cuales entraron en un proceso de ambientación en el invernadero de biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente de la “UEB”, con la finalidad de eliminar todas las plagas y enfermedades en el caso que se presentaran se aplicó Fidelity de 0.5 ml /litr

4.5.2. Obtención de brotes

Una vez que existió la presencia de brotes en las plantas se extrajeron de la parte apical los mismos que fueron recolectados de una longitud aproximada de 1 a 2,5 cm.

4.5.3. Desinfección del material en el laboratorio

Para la desinfección de los brotes se procedió a lavarlos con agua destilada y jabón líquido durante 20 min, luego se realizó enjuagues consecutivos para eliminar los residuos del jabón. Posteriormente en la cámara de flujo laminar desinfectamos los brotes con alcohol al 50% durante 2 min, de igual manera se utilizó hipoclorito de sodio (NaClO) al 60% durante 10 min, finalmente se eliminó los residuos del desinfectante con agua destilada esterilizada, luego de este proceso de desinfección se colocó los explantes en el medio de cultivo previamente preparado.

4.5.4 Preparación del medio de cultivo

En el laboratorio se procedió a la preparación del medio de cultivo según Murashige y Skoog, el mismo que será de proliferación, a fin de estimular el desarrollo de los brotes en cada explante, en el que se añadió macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, agar y reguladores de crecimiento Kinetina, Bencil adenina y respectivamente con un pH de 5.6 - 5.7.

Para su preparación se realizó el siguiente procedimiento:

- Se colocó en un vaso de precipitación de 1000ml agua destilada una tercera parte del volumen final a preparar.
- Se procedió a pesar 30gr de sacarosa, 7gr de agar, en estado sólido.
- La sacarosa se añadió al momento de preparar la solución y el agar se colocó en el medio cuando este a 80°C después de introducirlo al microondas.
- Seguido se añadió el stock #1, stock #2, stock #3, vitaminas y reguladores de crecimiento (Citoquininas) Kinetina, Bencil adenina para distribuir en cada medio de proliferación.

4.5.5. Esterilización del medio de cultivo

Se procedió a la distribución del medio de cultivo a los frascos de vidrio, 50cc aproximadamente en cada uno los cuales pasaron a un proceso de esterilización en el autoclave a 121°C durante 20min. Seguidamente sacamos los frascos del autoclave en una bandeja metálica y lo dejamos enfriar durante 24h en el área de transferencia.

4.5.6. Introducción al medio de cultivo

Se colocó los brotes en un medio de proliferación para su desarrollo, trasladándolos a un lugar aséptico e iluminado con luz artificial “área de incubación” para estimular sus procesos metabólicos normales.

4.5.7. Transferencia del material vegetal

Cuando alcanzó una altura de 1 a 2,5cm en el frasco de cristal se procedió a cortar con la ayuda de un bisturí los nuevos brotes y se procedió a cambiar a otro frasco con medio de cultivo para proceder a tomar las diferentes variables.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Días a la brotación en el laboratorio (DBL), Tasa de velocidad de multiplicación (TVM) y Número de frascos contaminados (NFC)

Cuadro No. 1. Análisis de efecto principal para evaluar los promedios de Factor A: Variedades de Nardo en las variables DBL, TVM y NFC. Laguacoto III. 2022.

DBL (*)		TVM (**)		NFC (**)	
Variedad de Nardo	Promedio	Variedad de Nardo	Promedio	Variedad de Nardo	Promedio
A2: Amarilla	12,33	A2: Amarilla	0,06	A1: Blanca	25,00
A1: Blanca	10,17	A1: Blanca	0,05	A2: Amarilla	8,34
Efecto Principal: A2 - A1 = 2,16 días		Efecto Principal: A2 - A1 = 0,01 explantes/día		Efecto Principal: A1 - A2 = 16,66%	

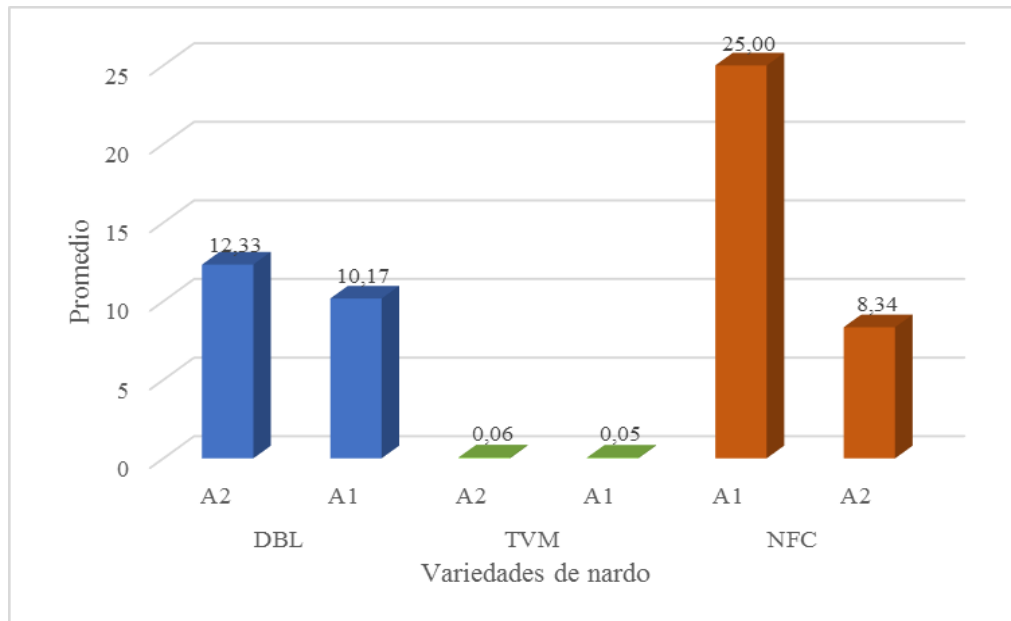
* = Altamente Significativo al 5%

** = Altamente Significativo al 1%

Fuente: (Datos obtenidos en el Laboratorio de Biotecnología, 2022)

➤ Variedades de nardo (Factor A)

Gráfico No. 1. Variedades de nardo en las variables días a la brotación en laboratorio, tasa de velocidad de multiplicación y número de frascos contaminados. Laguacoto III. 2022.



La respuesta de las variedades de Nardo en cuanto a la variable días a la brotación en laboratorio fue significativa; mientras que, para la tasa de velocidad de multiplicación y número de frascos contaminados, fue altamente significativa (Cuadro No. 1).

Con el análisis de efecto principal; en promedio general la variedad A2: Amarilla fue más tardía en brotar con 2,16 días en comparación a A1: Blanca que registró 10,17 DBL (Cuadro No. 1 y Gráfico No. 1).

Para la TVM evaluada a los 60 días, la variedad de nardo Amarilla (A2) presentó la mejor tasa de multiplicación con 0,06 explantes/día en relación a A1: Blanca que alcanzó 0,05 explantes/día (Cuadro No. 1 y Gráfico No. 1).

Los resultados obtenidos en esta investigación en relación a la TVM, son bajos en comparación a los obtenidos en su trabajo Propagación in vitro de

material seleccionado de *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. quienes reportaron por TVM fue de 0,25 explantes/día. (Schuler G., et. al. 2005)

La tasa de velocidad de multiplicación de las variedades de nardo Blanca y Amarilla, pudo estar relacionada con características fisiológicas inherentes al material vegetal utilizado en la investigación.

En cuanto al NFC evaluado en porcentaje, la variedad de nardo A1: Blanca registró 16,67% más de frascos contaminados en comparación a A2: Amarilla que tuvo 8,34% de frascos contaminados.

El índice de contaminación es baja; en relación a los 40% de contaminación reportado por Hernández-Mendoza et al., 2021, al investigar la Regeneración *in vitro* de plantas de *Polianthes tuberosa L.* a partir de tejido foliar y de botón floral. (Ocobo) y *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken (Nogal Cafetero),

Cuadro No. 2. Resultados de la Prueba de Tukey al 5% para comparar los promedios de Factor B: Tipos de Citoquininas en las variables DBL, TVM y NFC. Laguacoto III. 2022.

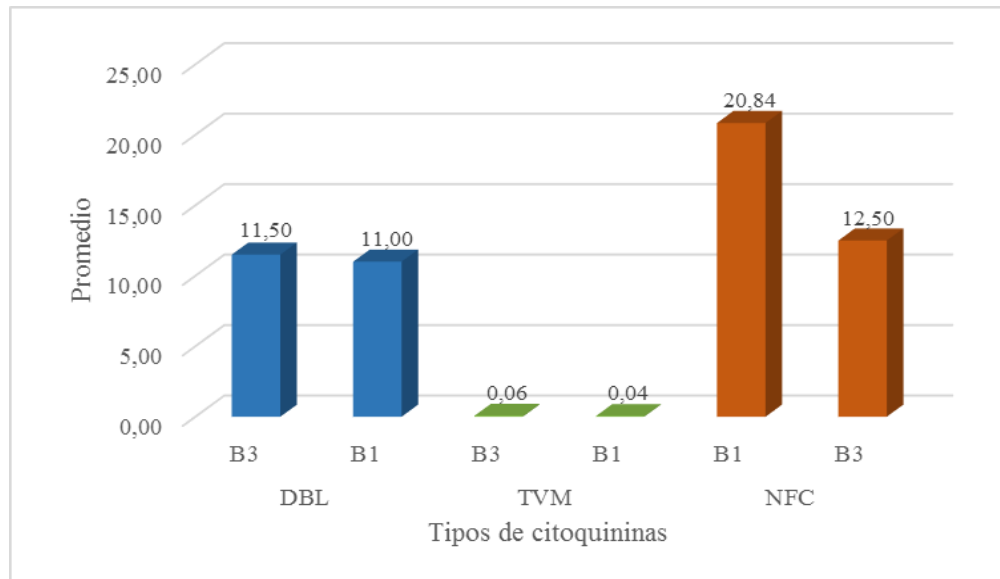
DBL (NS)			TVM (**)			NFC (**)		
Tipos de Citoquininas	Promedio	Rango	Tipos de Citoquininas	Promedio	Rango	Tipos de Citoquininas	Promedio	Rango
B3: Kinetina	11,50	A	B3: Kinetina	0,06	A	B1: (Testigo absoluto)	20,84	A
B2: Bencil adenina	11,25	A	B2: Bencil adenina	0,06	A	B2: Bencil adenina	16,67	B
B1: (Testigo absoluto)	11,00	A	B1: (Testigo absoluto)	0,04	B	B3: Kinetina	12,5	C

Promedios con distinta letra, son estadísticamente diferentes al 5%

Fuente: (Datos obtenidos en el Laboratorio de Biotecnología,2022)

➤ Tipos de citoquininas (Factor B)

Gráfico No. 2. Tipos de Citoquininas en las variables días a la brotación en laboratorio, tasa de velocidad de multiplicación y número de frascos contaminados. Laguacoto III. 2022.



Se calcularon diferencias estadísticas significativas como respuesta de los tipos de Citoquininas y el testigo absoluto en las variables tasa de velocidad de multiplicación y número de frascos contaminados evaluado en porcentaje (Cuadro No. 2).

Con la prueba de Tukey al 5%, al evaluar DBL, existió un solo rango de significancia A; mientras que para la TVM se tuvo dos rangos de significancia A y B; en forma consistente el promedio más alto de estas variables, se ubicaron en el rango A, que correspondió a B3: Kinetina con 11,50 días a la brotación y 0,06 explantes/día respectivamente. Los promedios menores de estos componentes se evaluaron en el Testigo absoluto con 11,00 DBL cuyo valor se ubicó en el rango A y 0,04 explantes/día situándose en el rango B (Cuadro No. 2 y Gráfico No. 2).

Los resultados registrados en esta investigación en cuanto a los días a la brotación en laboratorio, son ligeramente menores a los alcanzados. En estudios encaminados a la obtención de plantas de *P. tuberosa* de adecuado

porte, sin reducir la calidad del tallo floral, se evaluó el efecto de los compuestos daminozido (2,5 y 5 g L⁻¹) y cloromequat (5 y 10 g L⁻¹) durante el desarrollo de los bulbos. Los resultados evidenciaron que ambos productos a la máxima concentración redujeron el período de obtención de las plantas en diez días, al ser comparadas con el tratamiento control. (Vita, M. y Pasquale, L. 2000)

Estos resultados nos confirman que estas variables son características varietales y dependen de su interacción con el medio de cultivo, mismo que está compuesto por sales minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento, azúcar, agua y agar.

Los resultados del NFC, se situaron en tres rangos de significancia A y C; el mayor porcentaje de frascos contaminados se tuvo en el B1: (Testigo absoluto) con 20,84% correspondiendo al rango A; mientras que el valor promedio más bajo se registró en la citoquinina B3: Kinetina con 12,50%, resultado que se ubicó en el rango C (Cuadro No. 2 y Gráfico No. 2).

Los resultados de la baja tasa de contaminación, influyo que los brotes de las plantas de Nardo, fueron sometidos a procesos de lavado y desinfección antes de ingresar al laboratorio así como en la cámara de flujo laminar; cumpliéndose así con toda la cadena de asepsia requerida por el laboratorio de biotecnología.

Indica que: La contaminación causada por diversos tipos de microorganismos (hongos, bacterias, virus y fitoplasmas) es uno de los principales problemas en el cultivo de tejidos vegetales, el medio de cultivo tiene las condiciones físicas de incubación favorables para el desarrollo de estos microorganismos. (Khanchana *et al.* 2019)

Cuadro No. 3. Resultados de la Prueba de Tukey al 5% para comparar los promedios Tratamientos: Variedades de Nardo por Tipos de Citoquinas las variables DBL, TVM y NFC. Laguacoto III. 2022.

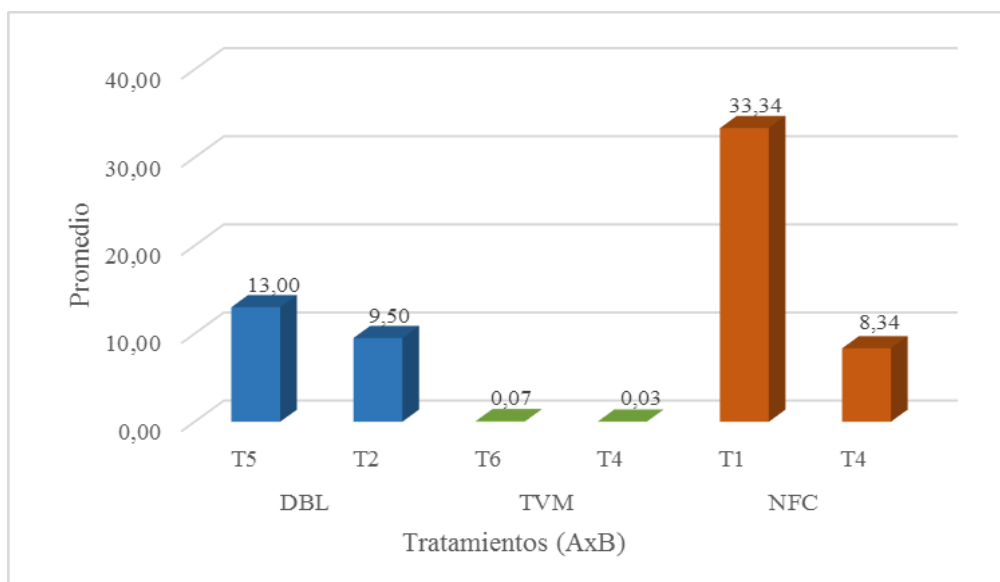
DBL (**)			TVM (**)			NFC (**)		
Tratamiento No.	Promedio	Rango	Trat. No.	Promedio	Rango	Trat. No.	Promedio	Rango
T5: Nardo amarillo + Bencil adenina	13,00	A	T6	0,07	A	T1	33,34	A
T6: Nardo amarillo + Kinetina	13,00	A	T5	0,07	A	T2	25,00	B
T1: Nardo blanco + (Testigo absoluto)	11,00	B	T3	0,05	AB	T3	16,67	C
T4: Nardo amarillo + (Testigo absoluto)	11,00	B	T2	0,05	AB	T6	8,34	D
T3: Nardo blanco + Kinetina	10,00	BC	T1	0,04	B	T5	8,34	D
T2: Nardo blanco + Bencil adenina	9,50	BC	T4	0,03	B	T4	8,34	D
Media General: 11,25 días			Media General: 0,05 explantes/día			Media General: 16,67 %		
CV = 9,25%			CV = 11,17%			CV = 9,09%		

Promedios con distinta letra, son estadísticamente diferentes al 5%

Fuente: (Datos obtenidos en el Laboratorio de Biotecnología,2022)

➤ Tratamientos (Interacción de factores AxB)

Gráfico No. 3. Tratamientos: Variedades de Nardo por Tipos de Citoquinas en las variables días a la brotación en laboratorio, tasa de velocidad de multiplicación y número de frascos contaminados. Laguacoto III. 2022.



Se determinó una dependencia de factores altamente significativa; es decir la respuesta de variedades de nardo en relación a las variables DBL; TVM y NFC, dependieron de los tipos de citoquinas (Cuadro No. 3).

En esta investigación la media general para los DBL; TVM y NFC fue de 11,25 días; 0,05 explantes/día y 16,67% de frascos contaminados (Cuadro No. 3).

Durante el proceso investigativo, el grado de contaminación estuvo en el orden del 16,67%, promedio que es inferior comparado con el 40,00% de contaminación reportado en explantes de corno obtuvieron el 100% de explantes contaminados, en yemas vegetativas en un 31 % en cultivos de yemas tratadas con solución de hipoclorito de sodio al 70 % (Hernández-Mendoza *et al.* 2014.)

Con la Prueba de Tukey al 5%, en la variable DBL existen tres rangos de significancia A y C; en el rango A se ubicaron los tratamientos más tardíos en brotar fue T5: Nardo amarillo + Bencil adenina y T6: Nardo amarillo + Kinetina con 13,00 días. El tratamiento más precoz en brotar estuvieron en el rango BC y fue el T2: Nardo blanco + Bencil adenina con 9,50 días (Cuadro No. 3 y Gráfico No. 3).

Estos resultados demuestran que la multiplicación *in vitro* depende del tipo de explante, del tipo, dosis y concentración de la citoquinina

Para la TVM se encontró dos rangos de significancia A y B; la mayor tasa de velocidad de multiplicación se tuvo en los tratamientos T6: Nardo amarillo + Kinetina y T5: Nardo amarillo + Bencil adenina con 0,07 explantes/día que correspondió al rango A. La menor TVM se evaluó en el T4: Nardo amarillo + (Testigo absoluto) con 0,03 explantes/día que se ubicó en el rango B (Cuadro No. 3 y Gráfico No. 3).

En su trabajo investigativo entre las muestras M1, y en M3 en los árboles de *T. rosea* obtuvieron a 0,9 explantes/día; valores que son mayor al promedio de 0,05 explantes/día registrados en esta investigación. (Hartmann *et al.*, 1997)

Manifiesta que el éxito de la regeneración de las plantas obtenidas en condición de cultivo *in vitro* depende de factores como el genotipo, el tipo de explante, la edad de las plantas donadoras, el número de subcultivos y la composición del medio de cultivo, especialmente del tipo de reguladores de crecimiento utilizados ya que puede existir variación en la respuesta entre especies, cultivares e incluso entre plantas del mismo cultivar (Kaviani, 2015)

Con la prueba de Tukey al 5%, al evaluar el NFC, los resultados se ubican en cuatro rango de significancia A y D; en el rango A se encuentra el tratamiento con el promedio más alto del NFC siendo el T1: Nardo blanco + (Testigo absoluto) con el 33,34% de frascos contaminados; el promedio menor del

NCF, fue de 8,34% que se registró en los tratamientos T6: A2B3; T5: A2B2 y T4: A2B1 que compartieron el rango D (Cuadro No. 3 y Gráfico No. 3).

2. Número de brotes por explante (NBE)

Cuadro No. 4. Análisis de efecto principal para evaluar los promedios de Factor A: Variedades de Nardo en la variable NBE a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.

NBE 30 días (NS)		NBE 45 días (**)		NBE 60 días (**)	
Variedad de Nardo	Promedio	Variedad	Promedio	Variedad	Promedio
A2: Amarilla	1,17	A2: Amarilla	2,67	A2: Amarilla	3,33
A1: Blanca	1,00	A1: Blanca	1,83	A1: Blanca	2,83
Efecto Principal: $A2 - A1 = 0,17$ brotes		Efecto Principal: $A2 - A1 = 0,84$ brotes		Efecto Principal: $A2 - A1 = 0,50$ brotes	

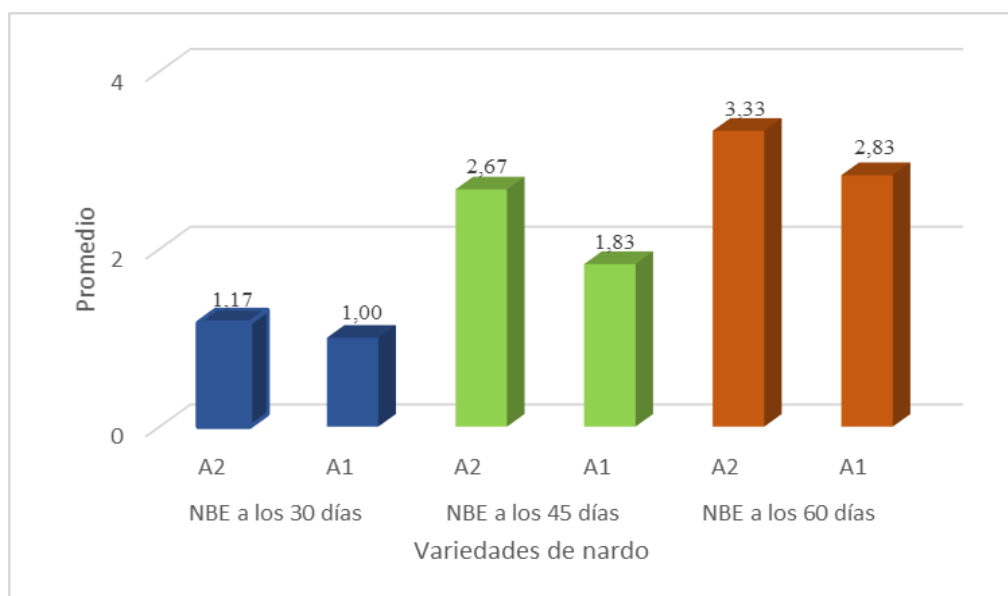
NS = No Significativo

** = Altamente Significativo al 1%

Fuente: (Datos obtenidos en el Laboratorio de Biotecnología,2022)

➤ Variedades de nardo (Factor A)

Gráfico No. 4. Variedades de Nardo en la variable número de brotes por explante a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.



La respuesta de las variedades de Nardo en relación a la variable número de brotes por explante a los 30 días, fue no significativa; mientras que para NBE evaluado a los 45 y 60 días fue altamente significativa (Cuadro No. 4).

Con el análisis de efecto principal, en promedio general la variedad A2: Amarilla tuvo 0,84 (1,00) brote/explante más en comparación a la variedad A1: Blanca que presentó 1,83 (2,00) brotes/explante a los 45 días y 2,83 (3,00) brotes a los 60 días (Cuadro No. 4 y Gráfico No. 4).

El NBE a los 45 y 60 días registrados en esta investigación, son mayores a los obtenidos por donde se reportó 3 brotes/explante. (Naz *et al.*, 2012,)

Cuadro No. 5. Resultados de la Prueba de Tukey al 5% para comparar los promedios de Factor B: Tipos de Citoquininas en la variable NBE a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.

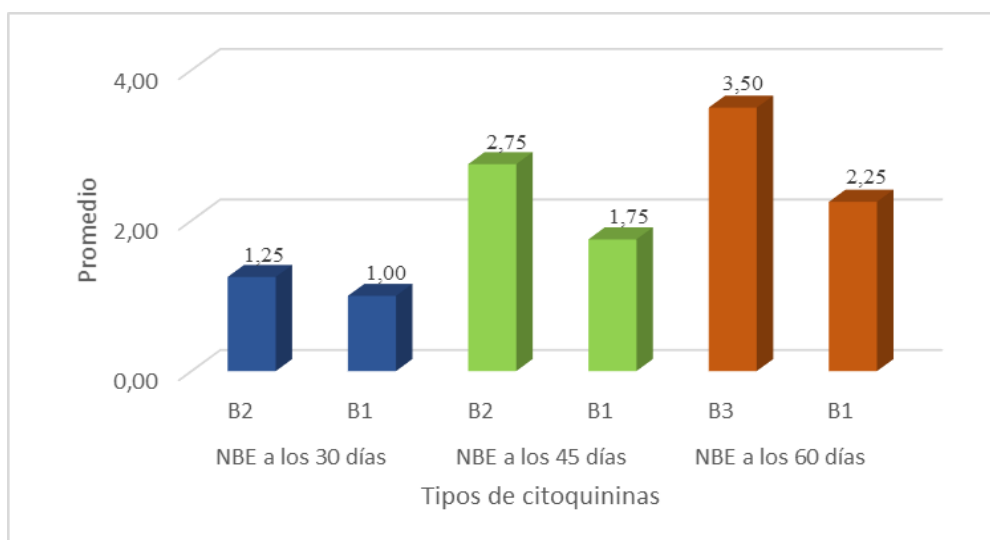
NBE 30 días (NS)			NBE 45 días (**)			NBE 60 días (**)		
Tipos de Citoquininas	Promedio	Rango	Tipos de Citoquininas	Promedio	Rango	Dosis	Promedio	Rango
B3: Kinetina	1,25	A	B2: Bencil adenina	2,75	A	B3: Kinetina	3,50	A
B2: Bencil adenina	1,00	A	B3: Kinetina	2,25	A	B2: Bencil adenina	3,50	A
B1: (Testigo absoluto)	1,00	A	B1: (Testigo absoluto)	1,75	B	B1: (Testigo absoluto)	2,25	B

Promedios con distinta letra, son estadísticamente diferentes al 5%

Fuente: (Datos obtenidos en el Laboratorio de Biotecnología,2022)

➤ Tipos de citoquininas (Factor B)

Gráfico No. 5. Tipos de Citoquininas en la variable número de brotes por explante a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.



Los tipos de citoquininas, no tuvieron un efecto significativo sobre la variable NBE a los 30 días; mientras que a los 45 y 60 días, la respuesta de los tipos de citoquininas fue altamente significativa (Cuadro No. 5).

Los resultados de la Prueba de Tukey al 5%, muestran dos rangos de significancia A y B, el mayor NBE a los 45 días, se ubicó en el rango A; que se dio al aplicar Bencil adenina (B2) con 2,75 (3,00) brotes/explante. El menor NBE se registró en B1: (Testigo absoluto) con 1,75 brotes/explante, valor que se situó en el rango B (Cuadro No. 5 y Gráfico No. 5).

El NBE a los 60 días, se calculó dos rangos de significancia A y B; el promedio más alto del NBE, se evaluó al aplicar las citoquininas Kinetina (B3) y Bencil adenina (B2) con 3,50 (4,00) brotes/explante que correspondió al rango A; el promedio más bajo del NBE, se tuvo en el Testigo absoluto (B1) con 2,25 brotes/explante, situándose en el rango B (Cuadro No. 5 y Gráfico No. 5)

Los resultados obtenidos para el NBE a los 60 días son mayores a los alcanzados en su investigación *In vitro* Propagation of a Tuberos Plant

(*Polianthes tuberosa L.*), quienes alcanzaron una regeneración de explantes y diferenciación de brotes de 2.2 ± 1.2 brotes/explante aplicar 1.5 mg L^{-1} en medio MS, utilizando meristemas de cormo. (Sangavai & Chellapandi, 2008)

Con estos resultados se confirma lo señalado entre los principales efectos fisiológicos de las citocininas está que inducen la división celular, inducen la formación de órganos en cultivo de tejidos (morfogénesis), activan el crecimiento de yemas laterales, retardan la senescencia en las hojas, estimulan la movilización de nutrientes y la pérdida de agua por transpiración, el rompimiento de la dormancia, etc. (Hernández-Mendoza, et. al. 2014,)

Cuadro No. 6. Resultados de la Prueba de Tukey al 5% para comparar los promedios Tratamientos: Variedades de Nardo por Tipos de Citoquinas en la variable NBE a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.

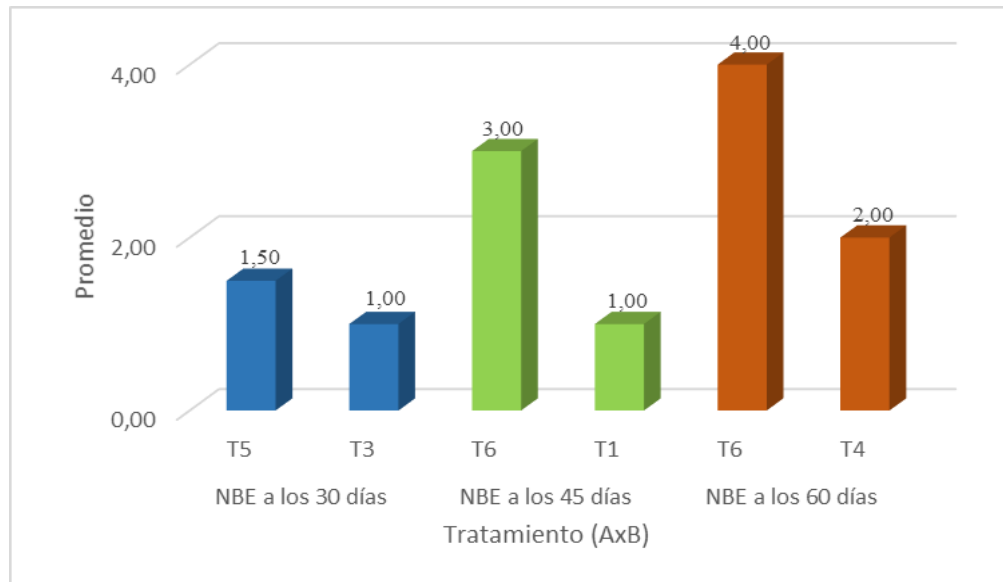
NBE 30 días (NS)			NBE 45 días (**)			NBE 60 días (**)		
Tratamiento No.	Promedio	Rango	Tratamiento. No.	Promedio	Rango	Tratamiento No.	Promedio	Rango
T5: Nardo amarillo + Bencil adenina	1,50	A	T5	3,00	A	T6	4,00	A
T6: Nardo amarillo + Kinetina	1,00	A	T4	2,50	AB	T5	4,00	A
T4: Nardo amarillo + (Testigo absoluto)	1,00	A	T2	2,50	AB	T3	3,00	AB
T1: Nardo blanco + (Testigo absoluto)	1,00	A	T6	2,50	AB	T2	3,00	AB
T2: Nardo blanco + Bencil adenina	1,00	A	T3	2,00	AB	T1	2,50	B
T3: Nardo blanco + Kinetina	1,00	A	T1	1,00	B	T4	2,00	B
Media General: 1,08 brotes			Media General: 2,25 brotes			Media General: 3,08 brotes		
CV = 6,65%			CV = 10,94%			CV = 9,36%		

Promedios con distinta letra, son estadísticamente diferentes al 5%

Fuente: (Datos obtenidos en el Laboratorio de Biotecnología,2022)

➤ Tratamientos (Interacción de factores AxB)

Gráfico No. Tratamientos: Variedades de Nardo por Tipos de Citoquininas en la variable número de brotes por explante a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.



La respuesta de las variedades de nardo, en relación a la variable NBE a los 30 días; no dependió de los tipos de citoquininas; sin embargo en a los 45 y 60 días se determinó una dependencia de factores altamente significativa; es decir la respuesta de las variedades de nardo dependieron de los tipos de citoquininas (Cuadro No. 6).

Al evaluar el NBE a través del tiempo, se calculó una media general de 1,08 brotes a los 30 días; 2,25 brotes a los 45 días y 3,08 brotes a los 60 días (Cuadro No. 6).

Con la prueba de Tukey al 5%, al comparar los promedios de NBE a los 30 días, se obtuvo un rango de significancia A. Estadísticamente todos los resultados de esta variable se ubicó en rango A; el mayor NBE se registró en el T5: Nardo amarillo + Bencil con 1,50 brotes, y, el menor valor se dio en el T3: Nardo blanco + Kinetina adenina con 1,00 brote/explante. (Cuadro No. 6 y Gráfico No. 6)

A los 45 y 60 días los resultados del NBE se calcularon dos rangos de significancia A y B; de forma consistente en el rango A, se fijó el mayor número de brotes/explante al aplicar la citoquinina Kinetina a la variedad de Nardo amarillo (T6) con 3,00 y 4,00 brotes respectivamente. El menor NBE a los 45 días se tuvo en el T1: Nardo blanco + (Testigo absoluto) con 1,00 brote/explante. En tanto que a los 60 días el NBE, recayó en el T4: Nardo amarillo + (Testigo absoluto) con 2,00 brotes/explante, resultados que pertenecen al rango B (Cuadro No. 6 y Gráfico No. 6)

En este trabajo investigativo, las dos variedades de nardo aplicando las dos citoquininas a los 60 días alcanzaron en promedio general 3,08 brotes/explante; valor superior al 1,82 brotes/explante reportados por De la Cruz, et. al. 2013, al investigar la Eficiencia en la micropropagación de dos especies silvestres del género *Polianthes* en relación a *Polianthes tuberosa*.

Estos resultados nos permiten confirmar que las citocininas promueven la formación de brotes axilares, la inducción, crecimiento, desarrollo y proliferación de brotes axilares. Por otra parte la formación de brotes múltiples es la fase más crucial en la propagación a gran escala de plantas por medio del cultivo de tejidos

3. Número de hojas por brote (NHB)

Cuadro No. 7. Análisis de efecto principal para evaluar los promedios de Factor A: Variedades de Nardo en la variable NHB a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.

NHB 30 días (NS)		NHB 45 días (**)		NHB 60 días (**)	
Variedad de Nardo	Promedio	Variedad de Nardo	Promedio	Variedad de Nardo	Promedio
A2: Amarilla	7,50	A1: Blanca	10,33	A1: Blanca	13,17
A1: Blanca	7,00	A2: Amarilla	9,67	A2: Amarilla	12,50
Efecto Principal: A2 - A1 = 0,50 hojas		Efecto Principal: A1 - A2 = 0,66 hojas		Efecto Principal: A1 - A2 = 0,67 hojas	

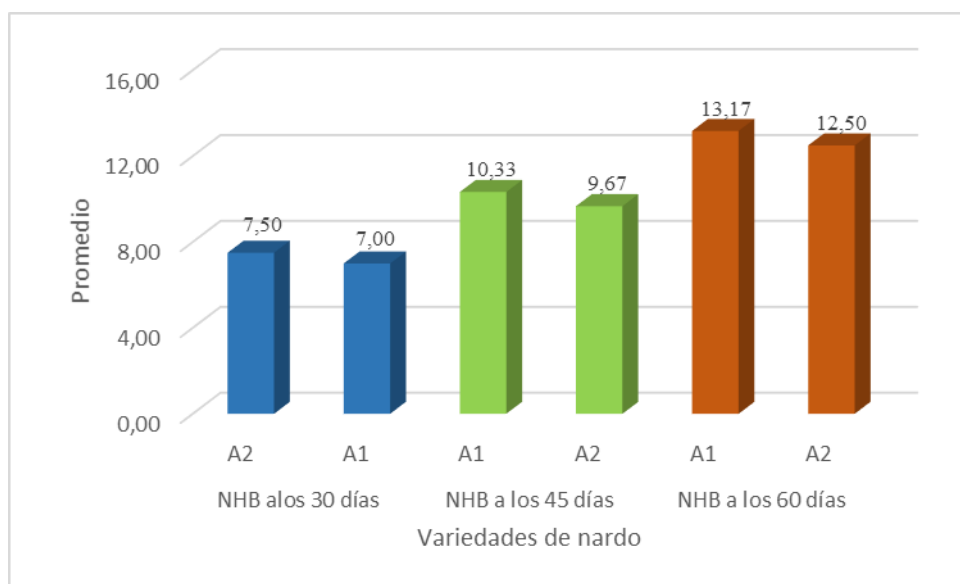
NS = No Significativo

**** = Altamente Significativo al 1%**

Fuente: (Datos obtenidos en el Laboratorio de Biotecnología,2022)

➤ Variedades de nardo (Factor A)

Gráfico No. 7. Variedades de Nardo en la variable número de hojas por brote a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.



Existió un efecto no significativo de las variedades de nardo en la variable NHB evaluada a los 30 días; sin embargo al evaluar el NHB a los 45 y 60 días, se registró una respuesta altamente significativa (Cuadro No. 7).

De acuerdo a los resultados del análisis de efecto principal a los 30 días, la variedad de Nardo Amarilla (A2), alcanzo 0,50 (1,00) hoja/brote más en comparación a la variedad Blanca (A1) que tuvo 7,00 hoja/brote (Cuadro No. 7 y Gráfico No. 7)

Al evaluar el NHB a los 45 y 60 días, en respuesta consistente en la variedad de Nardo Blanca (A1), se presentaron los promedios más altos con 0,66 y 0,67 (1,00) hoja/brote en comparación a A2: Nardo Amarillo, que alcanzó 9,67 (10,00) y 12,50 (13,00) hojas/brote respectivamente Cuadro No. 7 y Gráfico No. 7).

En las dos variedades de nardo, el valor promedio del NHB, alcanzado en esta investigación, es muy superior al reportado en su estudio Propagación

in vitro de tuberosa (*Polianthes tuberosa*) este cultivar tuvo entre 2 y 6 hojas por roseta. (Shagufta N. et. al. 2015,)

El NHB, es una característica propia de cada especie y mantiene una fuerte interacción genotipo – medio de cultivo

Cuadro No. 8. Resultados de la Prueba de Tukey al 5% para comparar los promedios de Factor B: Tipos de Citoquininas en la variable NHB a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.

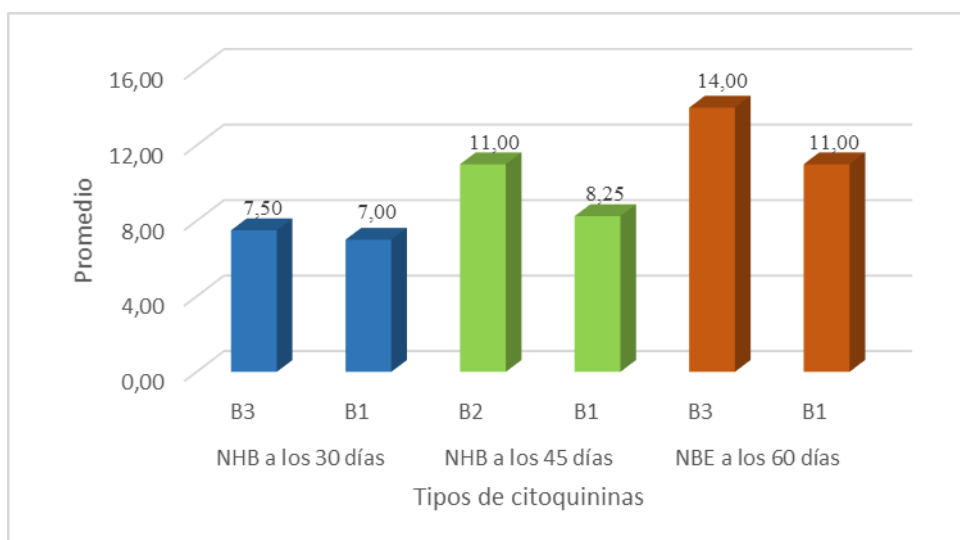
NHB 30 días (NS)			NHB 45 días (**)			NHB 60 días (**)		
Tipos de Citoquininas	Promedio	Rango	Tipos de Citoquininas	Promedio	Rango	Tipos de Citoquininas	Promedio	Rango
B3: Kinetina	7,50	A	B2: Bencil adenina	11,00	A	B3: Kinetina	14,00	A
B1: (Testigo absoluto)	7,25	A	B3: Kinetina	10,75	A	B2: Bencil adenina	13,50	A
B2: Bencil adenina	7,00	A	B1: (Testigo absoluto)	8,25	B	B1: (Testigo absoluto)	11,00	B

Promedios con distinta letra, son estadísticamente diferentes al 5%

Fuente: (Datos obtenidos en el Laboratorio de Biotecnología,2022)

➤ Tipos de citoquininas (Factor B)

Gráfico No. 8. Tipos de Citoquinas en la variable número de hojas por brote a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.



La respuesta de los tipos de citoquininas en cuanto a la variable NHB a los 45 y 60 días, muy diferente (**). No así para a los 30 días donde se registró un efecto similar (Cuadro No. 8).

Con la prueba de Tukey al 5%, a los 30 días, los resultados del NHB se agruparon en un solo rango de significancia A; el promedio más elevado de esta variable se registró al aplicar Kinetina (B3) con 7,50 (8,00) hojas/brote; el menor NHB se dio en el B2: Bencil adenina con 7,00 hojas (Cuadro No. 8 y Gráfico No. 8).

Los resultados del NHB, se agruparon en dos rangos de significancia A y B; el mayor NHB a los 45 días se evaluó en la citoquinina Bencil adenina (B2) con 11,00 hojas/brote, situándose en el rango A; el promedio menor, se registró en B1: (Testigo absoluto) con 8,25 (8,00) hojas/brote, resultado que se situó en el rango B (Cuadro No. 8 y Gráfico No. 8).

A los 60 días los resultados del NHB se agruparon en dos rangos de significancia A y B; en el rango A, se dio se evaluó el mayor NHB al aplicar la citoquinina B3: Kinetina con 14,00 hojas/brote. El menor NHB

se tuvo en B1: (Testigo absoluto) con 11,00 hojas/brote, valor que se ubicó en el rango B (Cuadro No. 8 y Gráfico No. 8).

En este trabajo investigativo, los resultados promedios reportados para el NHB a los 60 días fueron superior al alcanzado por De la Cruz, et. al. 2013, quienes, al concluir su investigación, consiguieron como resultado 3,00 hojas/brote

Con estos resultados se confirma lo mencionado las citocininas generan cambios morfológicos en los tejidos cultivados in vitro, resultado del estímulo de la actividad mitótica celular; lo que genera brotación de hojas en el explante. (Hernández-Mendoza et. al., 2021,)

Cuadro No. 9. Resultados de la Prueba de Tukey al 5% para comparar los promedios Tratamientos: Variedades de Nardo por Tipos de Citoquinas en la variable NHB a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.

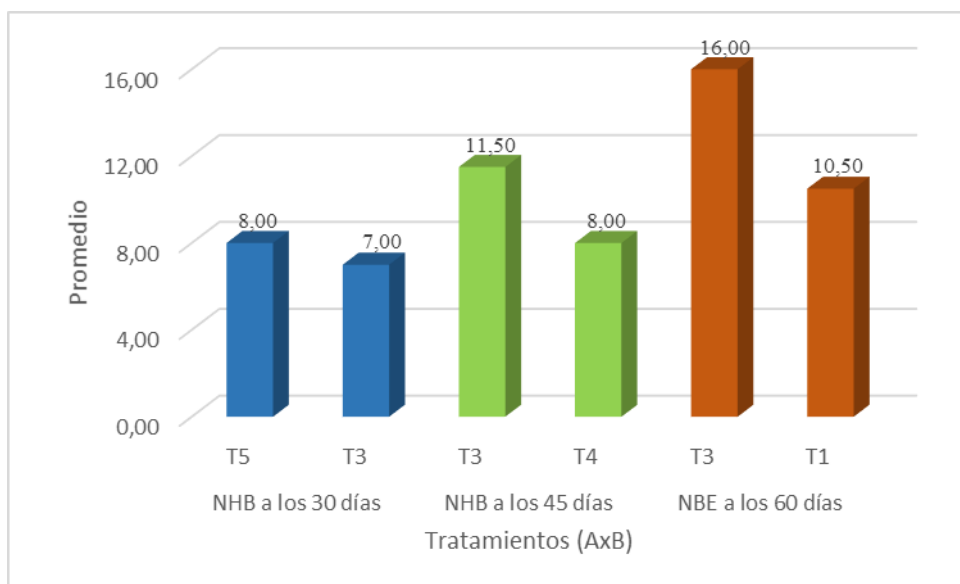
NHB 30 días (NS)			NHB 45 días (**)			NHB 60 días (**)		
Tratamiento No.	Promedio	Rango	Tratamiento No.	Promedio	Rango	Tratamiento No.	Promedio	Rango
T5: Nardo amarillo + Bencil adenina	8,00	A	T3	11,50	A	T3	16,00	A
T4: Nardo amarillo + (Testigo absoluto)	7,50	A	T5	11,00	AB	T5	14,00	B
T6: Nardo amarillo + Kinetina	7,00	A	T2	11,00	AB	T2	13,00	BC
T1: Nardo blanco + (Testigo absoluto)	7,00	A	T6	10,00	ABC	T6	12,00	CD
T2: Nardo blanco + Bencil adenina	7,00	A	T1	8,50	BC	T4	11,50	CD
T3: Nardo blanco + Kinetina	7,00	A	T4	8,00	C	T1	10,50	D
Media General: 7,25 hojas			Media General: 10,00 hojas			Media General: 12,83 hojas		
CV = 11,95%			CV = 7,76%			CV = 1,25%		

Promedios con distinta letra, son estadísticamente diferentes al 5%

Fuente: (Datos obtenidos en el Laboratorio de Biotecnología,2022)

➤ Tratamientos (Interacción de factores AxB)

Gráfico No. 9. Tratamientos: Variedades de Nardo por Tipos de Citoquinas en la variable número de hojas por brote a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.



Se determinó una dependencia de factores altamente significativa en la variable NHB a los 45 y 60 días (Cuadro No. 9); es decir la respuesta de las variedades de nardo en cuanto a la variable NHB, dependió de los tipos de citoquininas.

Mientras que para el NHB a los 30 días, la respuesta de las variedades de nardo no dependió de los tipos de citoquininas (Cuadro No. 9).

La media general para esta variable fue de 7,25 hojas a los 30 días; 10,00 hojas a los 45 días y 12,83 hojas a los 60 días (Cuadro No. 9).

Con la Prueba de Tukey al 5%, a los 30 días el rango de significancia fue A para todos los tratamientos. Estadísticamente, los valores promedios más altos del NHB, se registró en el tratamiento T5: A2B2: Nardo amarillo + Bencil adenina con 8,00 hojas/brote; en tanto que el menor NHB, se tuvo en el T3: A1B3: Nardo blanco + Kinetina con 7,00 hojas (Cuadro No. 9 y Gráfico No. 9).

Al evaluar el NHB a los 45 días, los resultados de la prueba de Tukey al 5%, son agrupados en tres rangos de significancia A y C, en tanto que a los 60 días los resultados de esta variable se arraigó en cuatro rangos de significancia A y D. En forma consiste a los 45 y 60 días, los promedios más altos del NHB, se consolidó en el rango A, que corresponde a la variedad de nardo Blanco aplicando la citoquina Kitenina (T2) con 11,50 (12,00) hojas y 16,00 hojas respectivamente. (Cuadro No. 9 y Gráfico No. 9).

Mientras que en el rango C, se ubicaron los valores promedios más bajos de NHB a los 45 días, registrándose en el testigo absoluto: Variedad de Nardo amarillo sin la aplicación de citoquininas (T4) con 8,00 hojas/brote. A los 60 días el tratamiento con el menor NHB fue el T1: A1B1: Nardo blanco + (Testigo absoluto) con 10,50 (11,00) hojas/brote que corresponde al rango D (Cuadro No. 9 y Gráfico No. 9).

Los resultados alcanzados en esta investigación para el NHB, son muy superiores a los obtenidos por de la Cruz, et. al. 2013. quienes señalan que los tratamientos probados incrementaron el número de hojas con el tratamiento que contenía la mayor concentración de reguladores de crecimiento ANA 1.0, BA 3.0, KIN 0.5 mg·L⁻¹ propiciando la formación de un promedio de tres hojas por explante

La variable NHB, es un carácter varietal y mantiene una fuerte interacción genotipo ambiente, son factores determinantes la fuente de origen del explante, el tiempo en que el material ha estado sometido al cultivo *in vitro*, de las condiciones y componentes que forman el medio de cultivo.

4. Altura de brotes (AB)

Cuadro No. 10. Análisis de efecto principal para evaluar los promedios de Factor A: Variedades de Nardo en la variable AB a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.

AB 30 días (**)		AB 45 días (NS)		AB 60 días (**)	
Variedad de Nardo	Promedio	Variedad	Promedio	Variedad	Promedio
A2: Amarilla	2,86	A2: Amarilla	3,38	A2: Amarilla	4,92
A1: Blanca	2,09	A1: Blanca	3,30	A1: Blanca	4,52
Efecto Principal: A2 - A1 = 0,77 cm		Efecto Principal: A2 - A1 = 0,08 cm		Efecto Principal: A2 - A1 = 0,40 cm	

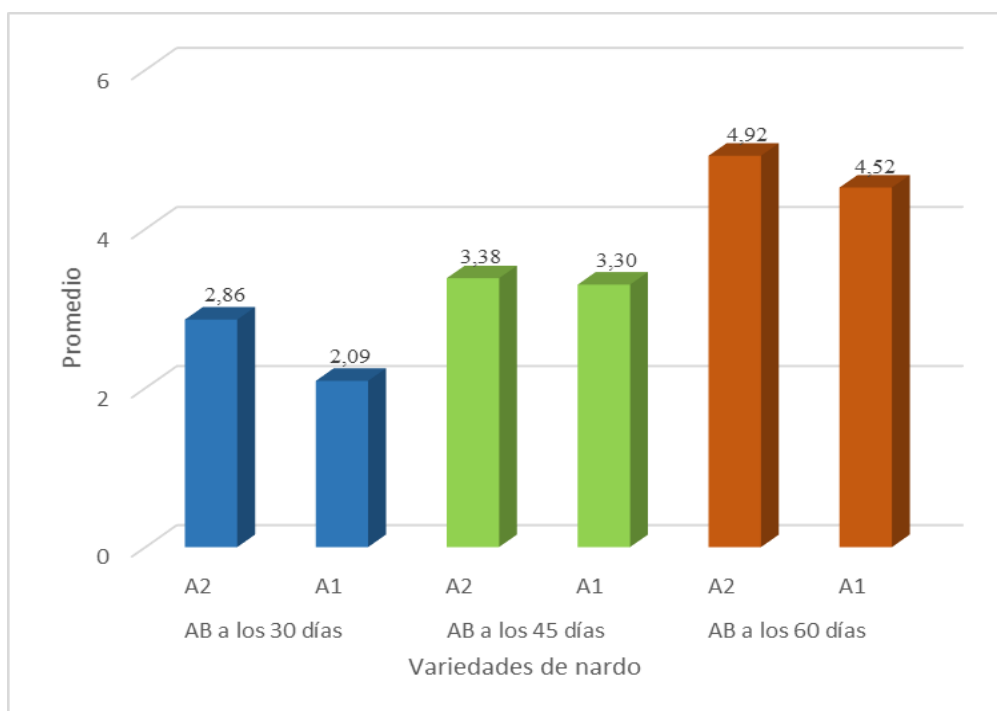
NS = No Significativo

**** = Altamente Significativo al 1%**

Fuente: (Datos obtenidos en el Laboratorio de Biotecnología,2022)

➤ Variedades de nardo (Factor A)

Gráfico No. 10. Variedades de Nardo en la variable altura del brote a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.



Existió un efecto altamente significativo como respuesta de las variedades de nardo en cuanto a la variable altura del brote evaluado en cm a los 30 y 60 días. En cambio a los 45 días, se determinó una respuesta similar entre los cultivares (Cuadro No. 10).

Con el análisis de efecto principal, forma consistente al evaluar la AB a través del tiempo, en el cultivar de Nardo Amarilla (A2) se registró 0,77 cm de AB a los 30 días; 0,08 cm a los 45 días y 0,40 cm a los 60 días, más en comparación a Nardo Blanca (A1) en la que se tuvo una AB de 2,09 cm a los 30 días; 3,30 cm a los 45 días y 4,52 cm a los 60 días (Cuadro No. 10 y Gráfico No. 10).

Los valores promedios del AB obtenido en las dos variedades de nardo, son mayores a los alcanzados al comprobar la Eficiencia en la micropropagación de dos especies silvestres del género *Polianthes* en relación a *Polianthes*

tuberosa; quienes indican la mejor respuesta fue *P. howardii* alcanzando un tamaño promedio de brote de hasta 7.53 mm. (De la Cruz, et. al. 2013,)

Cuadro No. 11. Resultados de la Prueba de Tukey al 5% para comparar los promedios de Factor B: Tipos de Citoquininas en la variable AB a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.

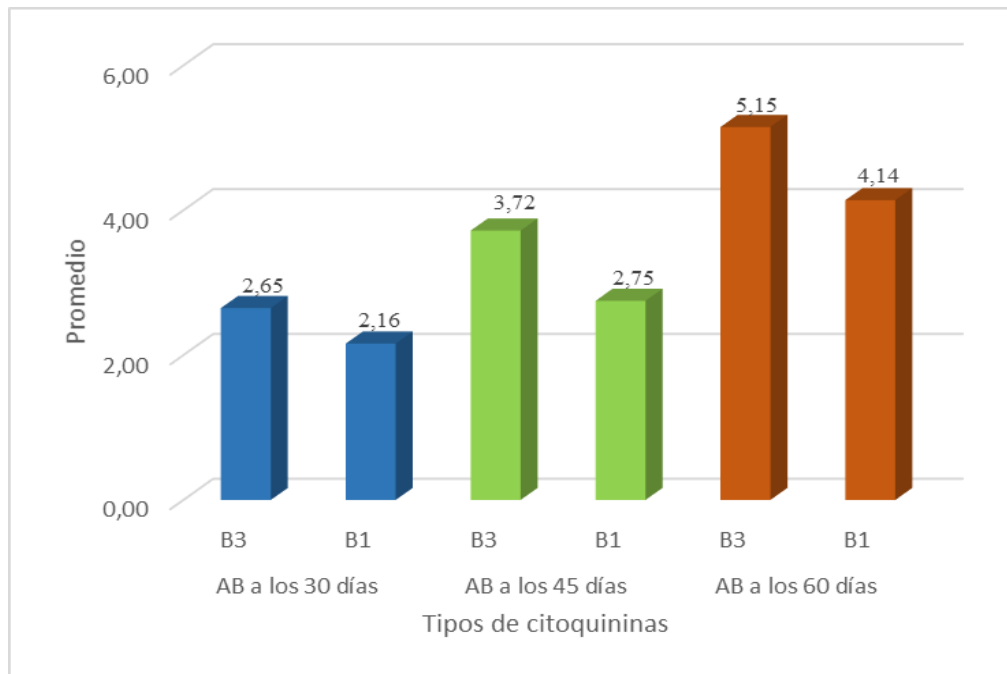
AB 30 días (NS)			AB 45 días (*)			AB 60 días (**)		
Tipos de Citoquininas	Promedio	Rango	Tipos de Citoquininas	Promedio	Rango	Tipos de Citoquininas	Promedio	Rango
B3: Kinetina	2,65	A	B3: Kinetina	3,72	A	B3: Kinetina	5,15	A
B2: Bencil adenina	2,60	A	B2: Bencil adenina	3,55	A	B2: Bencil adenina	4,87	A
B1: (Testigo absoluto)	2,16	A	B1: (Testigo absoluto)	2,75	B	B1: (Testigo absoluto)	4,14	B

Promedios con distinta letra, son estadísticamente diferentes al 5%

Fuente: (Datos obtenidos en el Laboratorio de Biotecnología,2022)

➤ Tipos de citoquininas (Factor B)

Gráfico No. 11. Tipos de Citoquininas en la variable altura del brote a los 30, 45 y días. Laguacoto III. 2022



El efecto de los tipos de citoquininas en relación a la variable AB a los 30 días fue no significativo. Mientras que a los 45 días fue significativo y a los 60 días altamente significativa (Cuadro No. 11).

Con la prueba de Tukey al 5%, los resultados de la AB se agrupó en dos rangos de significancia A y B; de manera consistente en el rango A, se encuentra la mayor AB, que se evaluó al aplicar Kinetina (B3) con 2,65 cm a los 30 días; 3,72 cm a los 45 días y 5,15 cm a los 60 días. Mientras que en el rango B, se consolidó la menor AB que corresponde al Testigo absoluto (B1) con 2,16 cm a los 30 días; 2,75 cm a los 45 días y 4,14 cm a los 60 días (Cuadro No. 11 y Gráfico No. 11).

Los valores promedios de la AB calculado en este trabajo de investigación, son superiores a los reportados investigadores que manifiestan que para la variable tamaño de brote los mejores resultados se obtuvieron con el

tratamiento que contenía una mayor concentración de citocininas, obteniendo brotes con un tamaño de hasta 12 mm, (De la Cruz, et. al. 2013,)

La variable AB, a más de ser características genéticas propias de la especie, depende también del ambiente, sanidad y nutrición del explante. Quizá en el incremento del AB, se vio influenciado de manera positiva por el contenido de la hormona Kitenina que en su composición tiene Fosforo (P_2O_5) 1.00% p/v; Potasio (K_2O) 1.00% p/v y Citoquininas 0.01%.

Cuadro No. 12. Resultados de la Prueba de Tukey al 5% para comparar los promedios Tratamientos: Variedades de Nardo por Tipos de Citoquinas en la variable AB a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.

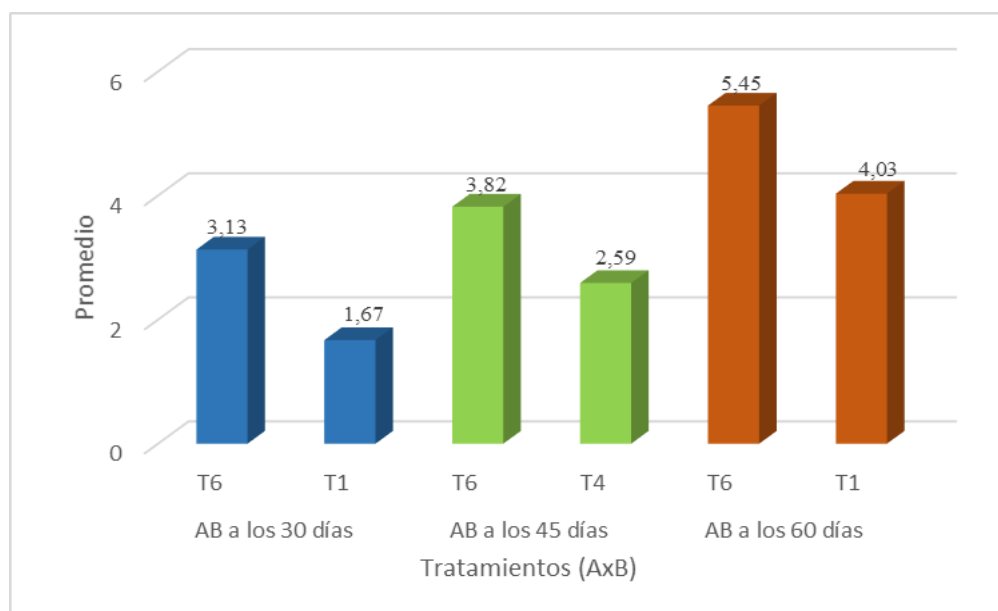
AB 30 días (*)			AB 45 días (*)			AB 60 días (*)		
Tratamiento No.	Promedio	Rango	Tratamiento No.	Promedio	Rango	Tratamiento No.	Promedio	Rango
T6: Nardo amarillo + Kinetina	3,13	A	T6	3,82	A	T6	5,45	A
T5: Nardo amarillo + Bencil adenina	2,79	AB	T5	3,69	A	T5	5,06	AB
T4: Nardo amarillo + (Testigo absoluto)	2,65	AB	T2	3,62	A	T2	4,85	AB
T3: Nardo blanco + Kinetina	2,52	AB	T3	3,41	AB	T3	4,69	AB
T2: Nardo blanco + Bencil adenina	2,08	AB	T1	2,9	BC	T4	4,25	B
T1: Nardo blanco + (Testigo absoluto)	1,67	B	T4	2,59	C	T1	4,03	B
Media General: 2,47 cm			Media General: 3,34 cm			Media General: 4,72 cm		
CV = 14,14%			CV = 4,54%			CV = 1,25%		

Promedios con distinta letra, son estadísticamente diferentes al 5%

Fuente: (Datos obtenidos en el Laboratorio de Biotecnología,2022)

➤ Tratamientos (Interacción de factores AxB)

Gráfico No. 12. Tratamientos: Variedades de Nardo por Tipos de Citoquininas en la variable altura del brote a los 30, 45 y 60 días. Laguacoto III. 2022.



La respuesta de las variedades de nardo en la variable AB a través del tiempo (30, 45 y 60 días), dependió de los tipos de citoquininas, es decir existió dependencia significativa de factores (Cuadro No. 12).

La media general para la AB fue de 2,47 cm a los 30 días, 3,34 cm a los 45 días y 4,72 cm a los 60 días (Cuadro No. 12).

Al evaluar la AB a través del tiempo, los resultados a los 30 y 60 días se consolidó en dos rangos de significancia A y B; mientras que a los 45 días se tuvo tres rangos de significancia A y C (Cuadro No. 12).

Con la Prueba de Tukey al 5%, en las tres evaluaciones en forma consistente la mayor AB se ubicó en el rango A, promedio que se registró en la variedad de Nardo amarillo aplicado la citoquinina Kinetina (T6: A2B3) con 3,13 cm a los 30 días; 3,82 cm a los 45 días y 5,45 cm a los 60 días. El promedio más bajo del AB a los 30 días se situó en el rango B, dato que se tuvo en la variedad de nardo blanco sin aplicación de citoquininas (T1: A1B1) con 1,67

cm; en tanto que a los 60 días, la AB menor se dio en el tratamiento T1: A1B1: Variedad de nardo blanco sin aplicación de citoquininas 4,03 cm, siendo B su rango de significancia. A los 45 días promedio menor del AB, se tuvo en el T4: A2B1: Nardo amarillo + (Testigo absoluto) con 2,59 cm, valor que agrupo en el rango C (Cuadro No. 12 y Gráfico No. 12).

Al finalizar la investigación, la AB promedio fue de 4,72 cm; valor muy superior al 1,20 cm de AB, alcanzado por De la Cruz, et. al. 2013, al comprobar la Eficiencia en la micropropagación de dos especies silvestres del género *Polianthes* en relación a *Polianthes tuberosa*.; quienes alcanzaron tamaño de brote de 7.53 mm, en el tratamiento entre la especie *P. platyphylla* con ANA (Ácido naftalenacético) 1.0 mg·L⁻¹, BA (Benciladenina) 3.0 mg·L⁻¹, KIN (Cinetina) 0.5 mg·L⁻¹.

Con estos resultados podemos inferir que el tipo de citoquinina es un elemento influyente dentro del cultivo *in vitro*. Ya que estos reguladores de crecimiento favorecen la división celular, induciendo la formación y elongación brotes.

5. Análisis de correlación y regresión lineal

Cuadro No. 13. Análisis de correlación y regresión lineal de las variables independientes (Xs) que tuvieron una estrechez y asociación significativa sobre la tasa de velocidad de multiplicación. Laguacoto III. 2022.

VARIABLES INDEPENDIENTES (Xs)	Coeficiente de Correlación (r)	Coeficiente de regresión (b)	Coeficiente de determinación (R ² %)
Días a la brotación en el laboratorio	0,63 *	63,25 *	33
Número de brotes/explante a los 60 días	0,95**	50,00**	86
Altura de brotes a los 45 días	0,76 **	23,01 **	54
Altura de brotes a los 60 días	0,80 **	27,11 **	61

*= Significativo al 5%

** = Altamente significativo al 1%

➤ Coeficiente de correlación (r)

En esta investigación las variables independientes que tuvieron una relación positiva significativa con la tasa de velocidad de multiplicación fueron: días a la brotación en laboratorio; número de brotes/explante a los 60 días; altura de brotes a los 45 y 60 días (Cuadro No. 13).

➤ Coeficiente de regresión (b)

En este ensayo las variables independientes que incrementaron la tasa de velocidad de multiplicación fueron días a la brotación en laboratorio; número de brotes/explante a los 60 días; altura de brotes a los 45 y 60 días; es decir valores más altos de estos componentes, significó una mayor tasa de velocidad de multiplicación (Cuadro No. 13).

➤ Coeficiente de determinación (R^2)

En este ensayo el 86% de incremento de la tasa de velocidad de multiplicación fue debido a los valores más altos del Número de brotes/explante a los 60 días; la Altura de brotes a los 60 días contribuyó con el 61% del incremento. El 54% de incremento se debió a la altura de brotes a los 45 días (Cuadro No. 13).

6. Análisis económico de la relación B/C.

Cuadro No. 14. Relación Beneficio Costo: De la micro propagación en dos variedades de nardo (*Polianthes tuberosa*) mediante multiplicación in vitro, utilizando dos tipos de citoquininas. Laguacoto III, 2022

Variables	Tratamientos					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
No. Plantas por tratamiento	15,00	20,00	20,00	15,00	20,00	20,00
Precio de venta por planta	1,00	1,00	1,00	1,50	1,50	1,50
Ingreso bruto \$	15,00	20,00	20,00	22,50	30,00	30,00
Costo por tratamiento						
Citoquininas: Bencil adenina	0,00	2,00	0,00	0,00	2,00	0,00
Citoquininas: Kinetina	0,00	0,00	2,00	0,00	0,00	2,00
Agar	3,96	3,96	3,96	3,96	3,96	3,96
Papel aluminio	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Frascos	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50
Papel film	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85
Total de costos que varían	10,81	12,81	12,81	10,81	12,81	12,81
Total Beneficio Neto	4,19	7,19	7,19	11,69	17,19	17,19
Relación Beneficio Costo RB/C	1,38	1,56	1,56	2,08	2,34	2,34
Relación Ingreso Costo RI/C	0,38	0,56	0,56	1,08	1,34	1,34

Relación beneficio – costo.

En esta investigación forma general y consisten en todos los tratamientos la relación Beneficio – costo fue superior a 1.

La mejor relación beneficio – costo, se evaluó en el tratamiento T5: Nardo amarillo + Bencil adenina y T6: Nardo amarillo + Kinetina con 2,34; es decir que tomando en cuenta únicamente los costos que varían, el productor de plantas de Nardo aplicando citoquinas Bencil adenina y Kinetina, por cada dólar invertido tiene una ganancia de \$. 1,34 (Cuadro No. 14)

VI. COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS

Una vez analizado y procesado los datos agronómicos, estadísticos y económicos, con base a sus resultados, se estableció una interacción significativa entre las variedades de Nardo con los Tipos de citoquininas en los componentes: Días a la brotación en laboratorio (DBL); Número de brotes por explante (NBE); Número de hojas por brote (NHB); Altura de brotes (AB) evaluados a los 30, 45 y 60 días; así como la Taza de velocidad de multiplicación (TVM), se acepta Hipótesis Alternativa que plantea: La micropropagación de dos variedades de nardo (*Polianthes tuberosa*) mediante multiplicación in vitro, utilizando dos tipos de citoquininas son diferentes.

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1. CONCLUSIONES

Una vez realizado e interpretado los análisis estadísticos, agronómicos y económicos, se sintetizan las siguientes conclusiones:

- La respuesta de las dos variedades de nardo (*Polianthes tuberosa*) y los tipos de citoquinas empleados en la micropropagación y multiplicación in vitro, fue diferente en la mayoría de las variables evaluadas.
- La variedad de nardo Amarilla registro los mejores resultados con una TVM de 0,06 explantes/día; 3,33 brotes/explante; 13,17 hojas/brotes, y, una altura del brote de 4,92 cm.
- La citoquina que tuvo los mayores efectos en la micropropagación de nardo fue Kinetina, alcanzando la mayor TVM con 0,06 explantes/día; 3,50 brotes/explante; 14,00 hojas/brote y 5,15 cm de AB
- A los 60 días; el tratamiento con los promedio más alto fue el T6: Nardo amarillo + Kinetina con una TVM de 0,07 explantes/día; 4,00 brotes/explante y una altura del brote de 5,45 cm
- Las variables que incrementaron la tasa de velocidad de multiplicación fueron: días a la emergencia, altura de plantas, vigor de plantas, peso y diámetro de la raíz a la brotación en laboratorio; número de brotes/explante a los 60 días; altura de brotes a los 45 y 60 días
- La mejor relación beneficio/costo e ingreso/costo; se evaluó en los tratamientos T5: Nardo amarillo + Bencil adenina y T6: Nardo amarillo + Kinetina con una B/C de 2,34 y una RI/C de 1,34.

7.2. RECOMENDACIONES

De acuerdo a las conclusiones obtenidas en este trabajo investigativo, se plantean las siguientes recomendaciones.

- Para la multiplicación in vitro de nardo, se recomienda la variedad amarilla, aplicando el regulador de crecimiento Kinetina; ya que en esta combinación de factores se tuvo los mejores resultados principalmente con la tasa de velocidad de multiplicación, número de brotes por explante; una mayor longitud del brote y la mejor relación B/C e I/C.
- Para corroborar la eficiencia de las citoquininas Bencil adenina y Kinetina; evaluar la micropropagación nardo utilizando como material de multiplicación in vitro hojas maduras, yemas apicales y flores.
- Para garantizar un adecuado estado fitosanitario de los brotes, de la manera más amigable posible con el medio ambiente, lavarlos con agua destilada y jabón líquido realizar enjuagues, desinfectar los brotes con alcohol al 50% durante 2 min, de igual modo utilizar hipoclorito de sodio (NaClO) al 60% durante 10 min, finalmente se eliminarán los residuos del desinfectante con agua destilada esterilizada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adema, M., & Sharry, S. (2015). Plantas probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro. La Plata: Edulp.
2. Alia, I., & Pérez, G. (2016). Daño mecánico por compresión en nardo. *Rev. Mex. Cienc. Agríc* 7(1).
3. Bhojwani, S., & Dantu, P. (. (s.f.).
4. Calvo, L. (2017). Aromas de México para el mundo, el caso del nardo: *Polianthes tuberosa*. Desde el Herbario CICY 9, 60-62.
5. Carrillo, G., Cruz, H. F., Eulogio, García, V., & Mendoza, M. (2021). Regeneración en Vitro de Plantas de *Polianthes tuberosa L.A* a partir de tejido foliar florar. *Tropical and subtropical Agroecosystems* 24 (55), 1-11.
6. Castell, J. (2017). El Nardo. *Revista de insdustria, distribución y socioeconomía hortícola: frutas, hortalizas, flores, plantas, árboles ornamentales y viveros* (58), 7-24.
7. Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. . I Seminario de Arándanos y Frambuesas, 1-8.
8. De la Cruz Cruz Adanelly, Rodríguez Domínguez José Manuel, Vigueras Guzmán Ana Lilia, Portillo Martínez Liberato, Arias García José Armando, Soltero Quintana Rafael, Castañeda Saucedo Ma. Claudia, Tapia Campos Ernesto. (2013). Eficiencia en la micropropagación de dos especies silvestres del género *Polianthes* en relación a *Polianthes tuberosa*. In 4to Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía. Innovación para el desarrollo sustentable. Universidad Autónoma de Guadalajara.
9. El Comercio. (2012). El nardo, un símbolo de la Sierra que ha perdido protagonismo. Quito: ElComercio.

10. Erig, A. (2006). Factores que afectan la Multiplicación in vitro de Mirtilo. Scientia Agraria.
11. Estrada, A. (2010). Morfogénesis in vitro, identificación y control de hongos contaminantes y efecto de rayos gamma en nardo (*Polianthes tuberosa L.*). Michoacan: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
12. Flórez, V., & Pereira, M. (2008). Las citoquininas están asociadas al desarrollo floral de plantas de Solidago x luteus en días cortos. Agronomía Colombiana, 26 (2), 226-236.
13. Gómez, C. (2014). Análisis histórico del sector florícola en el Ecuador y estudio del mercado para determinar su situación actua. Quito: Universidad San Francisco de Quito.
14. Gonzáles, M. (2016). *Polianthes tuberosas L.*: Revisión de aspectos filogenéticos, morfológicos y de cultivo. Cultivos tropicales 37(3), 120-136.
15. Hartmann, H. T.; Kester, D. E. ; Dovies, J. T.; Geneve E, R. L. 1997. *Plant propagation principles and practices*. 6th ed. Upper Saddle River, New Jersey, USA: Prentice. Hall Inc. 770 p.
16. Hernández-Mendoza, F., Carrillo-Castañeda, G., Pedraza-Santos, M. E., Torres, E. de la C., Mendoza-Castillo, Ma. del C. (2014). Regeneración in vitro de brotes de *Polianthes tuberosa L.* a partir de yemas vegetativas de la inflorescencia y de tejido de cormo. Revista Electrónica Nova Scientia.
17. Jankiewicz LS. (2003). Reguladores de crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas. Propiedades y acción. Ed. Mundi- Prensa. México, D. F. 487 p.
18. Jordan, M. . (2006). Hormonas y reguladores de crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. Fisiología vegetal.

19. Kaviani, B. (2015). Some useful information about micropropagation. *Journal of Ornamental Plants* 5: 29-40
20. Khanchana, K., Kannan, M., Hemaprabha, K., Ganga, M. (2019). Standardization of protocol for sterilization and in vitro regeneration in tuberose (*Polianthes tuberosa L.*). *International Journal of Chemical Studies*, 7(1), 236-241.
21. Naz, S., Aslam F., Ilyas, S., Shahzadi, K., Tariq, A. 2012. *In vitro* propagation of tuberose (*Polianthes tuberosa*). *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(24), 4107-4112.
22. Pando, L. (2018). Efecto de distintos niveles de sombra sobre la producción y calidad de flores de nardos (*Polianthes tuberosa L.*). Cuenca: Universidad de Cuenca.
23. PDOT BOLÍVAR. (2012). Obtenido de Plan de desarrollo y ordenamiento territorial de la provincia de Bolivar.
24. Sánchez, A., & Tatiana, V. (2020). Sector Florícola Ecuador. Ambato: Observatorio Económico y Social de Tungurahua.
25. Sangavai, C., Chellapandi P. 2008. *In vitro* Propagation of a Tuberose Plant (*Polianthes tuberosa L.*). *Electronic Journal of Biology*, 4(3), 98-101.
26. Solano, E., & García, M. (2013). 'Neotipificación y reconocimiento de *Polianthes geminiflora* (Lex.) Rose (Agavaceae). *Acta Botánica Mexicana* 104, 1-18.
27. Shagufta N, Farah A, Saiqa L, kiran S y Amina T. 2012. *In vitro* propagation of tuberose (*Polianthes tuberosa*). *Journal of Medicinal Plants Research*. 6: 4107-4112.
28. Schuler G., Ingrid; Baquero O., Sonsire; Gaona T., Diego; Vega G., Enrique; Rodríguez R., Javier; Ramírez S., Claudia; Nieto R., Víctor;

Hodson de Jaramillo, Elizabeth. 2005. Propagación in vitro de material seleccionado de *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. (Ocobo) y *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken (Nogal Cafetero). *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. VII, núm. 1, julio, 2005, pp. 39-50 Universidad Nacional de Colombia.

29. Tapia, E. (2020). El nardo: uso ornamental y en aceites esenciales. CIATEJ.
30. Vita, M. & Pasquale, L. 2000. “Effect of two growth regulators on flowering of potte tuberosa (*Polianthes tuberosa L.*)”. *Journal Atti V Giornate Scientifiche S.O.I.*, vol. 2, 2000, pp. 423- 424, ISSN 1097-0142.
31. Yong, A. (2010). La biodiversidad Florística en los sistemas agrícolas. *Cultivos Tropicales* 31 (4), 5-11.

ANEXOS

Anexo 1: Ubicación del ensayo

Laboratorio Sector Laguacoto III UEB



Anexo 2: Base de Datos

1. Repeticiones	2. Factor A: Variedades de Nardo	3. Factor B: Tipo de Citoquinina	4. Días a la brotación en laboratorio	5. Numero de frascos contaminados
6. Numero de brotes/explante a los 30 días	7. Numero de brotes/explante a los 45 días	8. Numero de brotes/explante a los 60 días	9. Numero de hojas/brote a los 30 días	10. Numero de hojas/brote a los 45 días
11. Numero de hojas/brote a los 60 días	12. Altura del brote a los 30 días	13. Altura del brote a los 45 días	14. Altura del brote a los 60 días	15. Tasa de velocidad de multiplicación

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1	1	10,00	16,67	1,00	1,00	2,00	7,00	9,00	10,00	1,58	2,92	4,05	0,03
1	1	2	9,00	0,00	1,00	2,00	3,00	6,00	11,00	13,00	2,16	3,83	4,60	0,05
1	1	3	9,00	0,00	1,00	2,00	3,00	6,00	11,00	16,00	2,33	3,66	4,52	0,05
1	2	1	11,00	0,00	1,00	2,00	2,00	8,00	8,00	12,00	2,30	2,58	4,50	0,03
1	2	2	13,00	0,00	1,00	3,00	4,00	8,00	12,00	14,00	3,25	3,67	5,25	0,07
1	2	3	14,00	0,00	1,00	2,00	4,00	7,00	10,00	12,00	3,08	3,66	4,92	0,07
2	1	1	12,00	50,00	1,00	1,00	3,00	7,00	8,00	11,00	1,75	2,88	4,00	0,05
2	1	2	10,00	50,00	1,00	3,00	3,00	8,00	11,00	13,00	2,00	3,81	5,10	0,05
2	1	3	11,00	33,33	1,00	2,00	3,00	8,00	12,00	16,00	2,70	3,15	4,85	0,05
2	2	1	11,00	16,67	1,00	3,00	2,00	8,00	8,00	11,00	3,00	2,60	4,00	0,03
2	2	2	13,00	16,67	2,00	3,00	4,00	7,00	10,00	14,00	3,00	3,57	5,65	0,07
2	2	3	12,00	16,67	1,00	3,00	4,00	7,00	10,00	12,00	2,50	3,72	5,20	0,07

Anexo 3: Fotografías de la instalación, seguimiento y evaluación de la investigación.



Fotografía 1:
Adquisición de las plántulas de nardo



Fotografía 2:
Variedad amarilla y blanca



Fotografía 3:
Monitoreo de insectos



Fotografía 4: Esterilizamos en el autoclave



Fotografía 5:
Fracos con medio de cultivo.



Fotografía 6: Aplicación del jabón líquido para lavar el Material.



Fotografía 7:
Povidyn desinfectante



Fotografía 8: Transferencia del material en la cámara.



Fotografía 9: Material vegetal introducido en el medio de cultivo.



Fotografía 10: Realizamos la transferencia con mucho cuidado.



Fotografía 11: Plantación de plántulas en el testigo.



Fotografía 12: Desinfección de los utensilios a utilizar.



Fotografía 13: Cortamos la parte terminal vegetal.



Fotografía 14: sellamos los frascos con papel aluminio y papel film.



Fotografía 15: Colocación en la estantería



Fotografía 16: bencil adenina con plántula de Nardo color amarillo.



Fotografía 17: Citoquinina con plántula de nardo Color amarillo.



Fotografía 18: Visita de campo.

Anexo 4. Glosario de términos

Agar: Es un agente gelificante del medio de cultivo.

Agrobiotecnología: Es la tecnología basada en la biología, especialmente usada en agricultura, farmacia, ciencia de los alimentos, ciencias forestales y medicina. Se desarrolla en un enfoque multidisciplinario que involucra varias especialidades y ciencias como biología, bioquímica, genética, virología, agronomía, ingeniería, física, química, medicina y veterinaria

Autoclave: es un recipiente metálico de paredes gruesas con cierre hermético que permite trabajar con vapor de agua a alta presión y alta temperatura, que sirve para esterilizar material médico o de laboratorio. El autoclave inactiva todos los virus y bacterias, aunque se ha llegado a saber que algunos microorganismos pueden soportar las temperaturas del autoclave. Las autoclaves se utilizan en aplicaciones principalmente de esterilización y en la industria química.

Bulbo: El término “bulbo” se utiliza en general para denominar aquellas plantas de estructuras de almacenamiento subterráneas carnosas. Sólo algunas de las plantas llamadas comúnmente bulbos lo son en realidad. La definición de bulbo es toda planta que almacena su ciclo de vida completo en una estructura de almacenamiento subterránea.

Biotecnología: La Biotecnología se define como un área multidisciplinaria, que emplea la biología, química y procesos varios, con gran uso en agricultura, farmacia, ciencia de los alimentos, ciencias forestales y medicina. Probablemente el primero que usó este término fue el ingeniero húngaro Karl Ereky, en 1919.

Bráctea: Hoja que nace del pedúnculo de las flores de ciertas plantas, y suele diferir de la hoja verdadera por la forma, la consistencia y el color.

Cámara de flujo laminar: es un recinto que emplea un ventilador para forzar el paso de aire a través de un filtro HEPA o ULPA y proporcionar aire limpio a la zona de trabajo libre de partículas de hasta 0.1 micras.

Citoquininas: La hormona vegetal citoquinina regula el crecimiento y desarrollo de las plantas. Las citoquininas o citocininas son un grupo de hormonas vegetales (fitohormonas) que promueven la división y la diferenciación celular. Pero hasta ahora no se sabía que también regulan el crecimiento y el desarrollo de las plantas.

Dosis: La dosis de un producto plaguicida es la cantidad de producto que podemos aplicar sobre un área de cultivo para estar seguros de que: En primer lugar, no causa daño al consumidor del producto que se produce en el área agrícola. En segundo lugar, no causa daño a las plantas.

Eco tipo: Es una subpoblación genéticamente diferenciada que está restringida a un hábitat específico, un ambiente particular o un ecosistema definido, con unos límites de tolerancia a los factores ambientales. Sanidad radicular: Se refiere a la incidencia o no de patógenos y plagas a nivel de la raíz en los vegetales.

Esterilización: Destrucción de todas las formas de vida microscópicas, incluidos virus y esporas.

Explante: Tejido vivo separado de su órgano propio y transferido a un medio artificial de crecimiento. El nombre “explante” es una versión castellanizada del vocablo inglés “explant”; acuñado especialmente para identificar a los tejidos vegetales cultivados in vitro y sin otro significado.

Fitoregulador: Producto regulador del crecimiento de las plantas; normalmente se trata de hormonas vegetales (fitohormonas), y sus principales funciones son estimular o paralizar el desarrollo de las raíces y las partes aéreas.

Genotipos: Un genotipo es la colección de genes de un individuo. El término también puede referirse a los dos alelos heredados de un gen en particular. El genotipo se expresa cuando la información codificada en el ADN de los genes se utiliza para fabricar proteínas y moléculas de ARN. La expresión del genotipo contribuye a los rasgos observables del individuo, lo que se denomina el fenotipo.

Inflorescencia: todo sistema de ramificaciones que remata en flores. Pedúnculo: es el eje principal o parte del tallo que soporta el receptáculo común o el raquis. Raquis: es la parte del tallo que lleva las ramas floríferas.

Micropropagación: es el conjunto de técnicas y métodos de cultivo de tejidos utilizados para multiplicar plantas asexualmente de forma rápida, eficiente y en grandes cantidades.

Multiplicación In vitro: El cultivo in vitro consiste en tomar una porción de una planta (ej. el ápice, una hoja o segmento de ella, segmento de tallo, meristemo, embrión, nudo, semilla, antera, etc.) y colocarla en un medio nutritivo estéril (usualmente gelificado, semisólido) donde se regenerará una o muchas plantas.

Nardo: El nardo es una planta bulbosa, herbácea y perenne con un tallo floral simple, el cual presenta en el extremo una inflorescencia.

Perigonio: Envoltura floral que no puede diferenciarse el cáliz de la corola, al ser iguales en forma, color, etc., denominándose tépalos.

Porta injertos: Planta que recibe el injerto, ésta lleva o desarrolla posteriormente las raíces con las que proporciona la nutrición mineral a la asociación patrón-variedad.

Reactivos: toda sustancia que interactúa con otra en una reacción química y que da lugar a otras sustancias de propiedades, características y conformación distinta, denominadas productos de reacción o simplemente producto.

Sésil: El término sésil se refiere a un organismo que está anclado a un sustrato y no puede moverse libremente. Por ejemplo, un alga sésil que vive en una roca (su sustrato).

Tejidos vegetales: En los tejidos vegetales superiores las células se agrupan para construir tejidos que desempeñan diversas funciones. Estos pueden dividirse en tejidos meristemáticos, que ayudan al crecimiento de la semilla a la longitud y grosor de la planta, y en tejidos adultos o definitivos.

Valores FOB: Se utiliza para valorar las Exportaciones y se define como "libre a bordo". Se refiere al Valor de Venta de los productos en su lugar de origen más el Costo de los fletes, seguros y otros Gastos necesarios para hacer llegar la Mercancía hasta la Aduana de salida.

Variedades: Es una población con caracteres que la hacen reconocible a pesar de que hibrida libremente con otras poblaciones de la misma especie. Es un rango taxonómico por debajo de la subespecie y por encima de la forma