



## Obtención de callos embriogénicos a partir de explantes foliares y meristemáticos de pechiche (*Vitex gigantea*)

### Obtaining embryogenic callus from foliar and meristematic explants of pechiche (*Vitex gigantea*)

Morán Bajaña, Joaquín Teodoro; Santander Villao, Manuel Oswaldo; Centanaro Quiroz, Paulo Humberto; Peña Haro, César Antonio

**Joaquín Teodoro Morán Bajaña**

jmoran@uagraria.edu.ec

Universidad Agraria del Ecuador

**Manuel Oswaldo Santander Villao**

msantander@uagraria.edu.ec

Universidad Agraria del Ecuador

**Paulo Humberto Centanaro Quiroz**

pcentanaro@uagraria.edu.ec

Universidad Agraria del Ecuador

**César Antonio Peña Haro**

cpena@uagraria.edu.ec

Universidad Agraria del Ecuador

#### Pro Sciences: Revista de Producción, Ciencias e Investigación

CIDEPRO, Ecuador

e-ISSN: 2588-1000

Periodicidad: Trimestral

Vol. 6, No. 42, 2022

editor@journalprosciences.com

Recepción: 27 Enero 2022

Aprobación: 3 Marzo 2022

**DOI:** <https://doi.org/10.29018/issn.2588-1000vol6iss42.2022pp146-160>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional.

**Cómo citar:** Morán Bajaña, J. T., Santander Villao, M. O., Centanaro Quiroz, P. H., & Peña Haro, C. A. (2022). Obtención de callos embriogénicos a partir de explantes foliares y meristemáticos de pechiche (*Vitex gigantea*). Pro Sciences: Revista De Producción, Ciencias E Investigación, 6(42), 146-160. <https://doi.org/10.29018/issn.2588-1000vol6iss42.2022pp146-160>

**Resumen:** El Ecuador provee de especies maderables a países de Asia y Oriente Medio cuya madera, principalmente es la teca. Ésta se exporta como materia prima a la India quien acapara el grueso de las exportaciones de los bosques de este árbol. Esta demanda promovió la siembra indiscriminada de la teca ocasionando problemas de tipo ambiental debido a que se realizaron cultivos en diversas zonas sin un estudio previo y encima en desmedro de otras especies como el pechiche, el mismo fernán sánchez, moral, laurel, etc. Del árbol de pechiche se extrae además de su madera, que es utilizada en la construcción de viviendas, pisos, pilares, etc., su fruto que es rico en polifenoles, muy apetecidos por su capacidad antioxidante y porque además su contenido es empleado en ciertos medicamentos denominados de origen natural. El objetivo de la investigación fue de inducir la producción de callos embriogénicos a partir de explantes foliares y meristemáticos de pechiche con fines de micropropagación. Se trata de una investigación descriptiva, mixta, correlacional y experimental. Para el análisis estadístico se utilizó el Software Infostat al 5% de probabilidad de error tipo 1. Se obtuvo como resultado que los tejidos foliares y meristemáticos de pechiche si responden al estímulo hormonal para obtener callos embriogénicos con fines de micropropagación con la concentración hormonal a base de 2,4 D y 6 BAP. Llegando a la conclusión que a través de la presente investigación se lograron obtener embriones somáticos con capacidad de convertirse posteriormente en plántulas listas para el trasplante.

**Palabras clave:** callos embriogénicos, madera, pechiche, micropropagación.

**Abstract:** Ecuador supplies timber species to countries in Asia and the Middle East whose wood, mainly teak. This is exported as a raw material to India, which accounts for the bulk of exports from the forests of this tree. This demand promoted the indiscriminate planting of teak, causing environmental problems due to the fact that cultivars were grown in various areas without prior study and to the detriment of other species such as pechiche, fernán sánchez himself, moral, laurel, etc. In addition to its wood, which is used in the construction of houses, floors, pillars, etc., its fruit is extracted from the pechiche tree, which is rich in polyphenols, highly desired for its antioxidant capacity and because its content is also used

in certain medicinal products of natural origin. The objective of the research was to induce the production of embryogenic calli from foliar and meristematic explants of pechiche for micropropagation purposes. It is a descriptive, mixed, correlational and experimental research. For the statistical analysis, the Infostat Software was used at a 5% probability of type 1 error. The result was that the foliar and meristematic tissues of pechiche do respond to hormonal stimulation to obtain embryogenic calluses for micropropagation purposes with the hormonal concentration based on of 2.4 D and 6 BAP. Reaching the conclusion that through the present investigation it was possible to obtain somatic embryos with the capacity to subsequently become seedlings ready for transplantation.

**Keywords:** embryogenic callus, wood, pechiche, micropropagation

## INTRODUCCIÓN

El rubro exportable de gran valor, en el Ecuador, entre las exportaciones no petroleras, es sin duda la madera. La exportación maderera se incrementó hasta el 54% a partir del 2012 hasta 2017. Su crecimiento se incrementó desde USD 161 millones a USD 247,4 millones.

Los principales mercados internacionales del Ecuador, para la madera nacional son los países de Asia y Oriente Medio, siendo la India el destino del grueso de las exportaciones, de madera (Valarezo, 2018).

Se han identificado que el pechiche (*Vitex gigantea*), planta forestal y maderera, ha disminuido su población, entre otras causas, porque no se han promovido su propagación siendo una especie endémica del país y la región Gaibor, (2017).

Del árbol de pechiche se extrae además de su madera, que es utilizada en la construcción de viviendas, pisos, pilares, etc. su fruto que es rico en polifenoles, muy apetecidos por su capacidad antioxidante y porque además su contenido es empleado en ciertos medicamentos del grupo denominado como “productos de origen natural”.

El interés por parte de los productores de viveros y plantas forestales de propagar especies con alta demanda de los clientes, más debido a la tendencia de los diversos usos como por ejemplo teca, guayacán blanco, laurel entre otros, que repercute negativamente en la propagación de plántulas de muchas otras especies de gran utilidad como es el caso del pechiche y se debe principalmente al desconocimiento de los múltiples beneficios que presentan estas especies.

En las provincias de los Ríos, Manabí, Guayas y Esmeraldas la información acerca del *Vitex gigantea* es muy escasa. La poca información existente se encuentra muy dispersa, algunos árboles de esta especie muy conocida sirven de alimento al papagayo de Guayaquil (*Ara ambiguus guayaquilensis*) ave símbolo del puerto principal del Ecuador (Gaibor, 2017).

Este mismo autor recalca que se debe impulsar la reforestación paulatina con el pechiche para garantizar la supervivencia del colibrí nombrado como Estrellita Esmeraldeña (*Chaetocercus berlepschi*), especie en peligro de extinción, cuya principal fuente de alimentos es la flor del pechiche.

En la zona de Milagro y sus alrededores no se encuentran árboles de la especie *V. gigantea* en la misma proporción de la teca (*Tectona grandis*), guayacán blanco (*Tabebuia chrysantha*), fernán

sánchez (*Triplaris cumingiana* Fisch), laurel (*Laurus nobilis*), clavellín, (*Pseudobombax ellipticum*) etc., de hecho, en los predios de la Ciudad Universitaria Milagro apenas existe un árbol de pechiche, pareciera como que la población de éstos se estuviera reduciendo.

Mediante la propagación *in vitro* se pueden obtener y multiplicar las plantas no sólo de interés económico sino también de aquellas en peligro de extinción o de población reducida.

Por otro lado, el uso de fitohormonas constituye en una vía para incentivar a los tejidos vegetales a desarrollarse y multiplicarse por lo que se asume que el pechiche no puede estar ajeno a este proceso.

Es necesario, por lo tanto, impulsar su propagación para contar con este árbol cuyos beneficios abarcan además la explotación de su fruto, rico en antioxidantes naturales, como conserva y variados usos medicinales.

Se espera que los tejidos foliares y meristemáticos de pechiche respondan al estímulo hormonal para obtener callos embriogénicos con fines de micropropagación.

El propósito de la investigación fue la de inducir la producción de callos embriogénicos a partir de explantes foliares y meristemáticos de pechiche con fines de micropropagación.

## METODOLOGÍA

Se evaluó el comportamiento de dos tipos de explantes bajo seis concentraciones de dos hormonas diferentes. Las variables de respuesta fueron: Formación de callos, masas de callos, estado de los callos y tiempo de formación.

Los tratamientos se formaron por la combinación del factor A que estuvo representado por la auxina 2,4 Diclorofenoxiacético (2-4D), cuyas dosis se establecieron en función de lo publicado por Espinosa, (2012). El factor B representó a la citocinina 6-Bencilaminopurina (BAP), siendo sus dosis también seleccionadas de la bibliografía pertinente publicada por Martínez, (2012). Como factor C se consideró el tipo de explante definido por las partes: meristemas y hojas nuevas de plantas en estado de desarrollo. Las dosis de las hormonas consideradas, así como las combinaciones de los 3 factores se detallan en la tabla 1.

**Tabla 1.** Combinaciones factoriales (tratamientos) evaluadas

| No. | Facto A (2,4 D)<br>mg/L <sup>-1</sup> | Factor B (6-BAP)<br>mg/L <sup>-1</sup> | Factor C<br>(explante) | Combinación<br>A x B x C |
|-----|---------------------------------------|--|------------------------|--------------------------|
| 1   | a1:0.1                                | b1:0.1                                 | c1: Foliar             | a1b1c1                   |
| 2   | a2:0.2                                | b1:0.1                                 | c1: Foliar             | a2b1c1                   |
| 3   | a3:0.3                                | b1:0.1                                 | c1: Foliar             | a3b1c1                   |
| 4   | a1:0.1                                | b2:0.2                                 | c1: Foliar             | a1b2c1                   |
| 5   | a2:0.2                                | b2:0.2                                 | c1: Foliar             | a2b2c1                   |
| 6   | a3:0.3                                | b2:0.2                                 | c1: Foliar             | a3b2c1                   |
| 7   | a1:0.1                                | b1:0.1                                 | c2: Meristemo          | a1b1c2                   |
| 8   | a2:0.2                                | b1:0.1                                 | c2: Meristemo          | a2b1c2                   |
| 9   | a3:0.3                                | b1:0.1                                 | c2: Meristemo          | a3b1c2                   |
| 10  | a1:0.1                                | b2:0.2                                 | c2: Meristemo          | a1b2c2                   |
| 11  | a2:0.2                                | b2:0.2                                 | c2: Meristemo          | a2b2c2                   |
| 12  | a3:0.3                                | b2:0.2                                 | c2: Meristemo          | a3b2c2                   |

Este ensayo, daba la condición de laboratorio bajo la cual se llevó a cabo, se utilizó un diseño completamente al azar, generándose un total de 36 unidades experimentales compuestas por el número de tratamientos (Tabla 1), los cuales se valoraron con tres repeticiones cada una. Por las combinaciones factoriales, el experimento se representó por el arreglo  $3 \times 2 \times 2$ .

Cada unidad experimental estuvo representada por 25 ml de medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962), utilizando envases plásticos.

El Adeva del experimento fue el siguiente:

**Tabla 2.** Adeva del experimento

| F. de V.                      | GI |
|-------------------------------|----|
| Factor A (2,4 D) (a-1)        | 2  |
| Factor B (6-BAP) (b-1)        | 1  |
| Factor C (Explantes) (c-1)    | 1  |
| Interacción A x B (a-1) (b-1) | 2  |
| Interacción A x C (a-1) (c-1) | 2  |
| Interacción B x C (b-1) (c-1) | 1  |
| Error experimental            | 26 |
| Total, abcr-1                 | 35 |

### ***Material***

Material de vidrio, contenedores plásticos de 150 mL, gasa, plastifilm, papel aluminio y algodón. El material vegetal se obtuvo de dos plantas de pechiche recolectadas de un vivero comercial del cantón Milagro.

La planta en el vivero se trató con el fungicida Captan al 0.1 % en una disolución con agua destilada con cuatro aplicaciones con un intervalo de ocho días. Además, se regó cada dos días a razón de 20 mL de agua con aporte de Claxus (aminoácidos, hormonas de crecimiento y micro minerales) en dosis de 0.1 % cada ocho días. Los tejidos evaluados fueron meristemas y hojas jóvenes de la copa de la planta. El protocolo para procesar la asepsia de los explantes consistió en abundante agua y detergente comercial aniónico a una concentración de 1 % por 15 min, luego se sumergió en una solución de NaClO al 2 %, posteriormente se colocó en etanol al 70 % por 30 segundos y después del lavado triple con agua destilada estéril se volvió a lavar con agua destilada estéril con 2 gotas de Tween 80 (Bio Pack, Argentina) en 100 mL de agua destilada estéril durante 10 min., para lavarlos finalmente 5 veces con agua destilada estéril.

Para la inducción de callos se empleó como base  $4.25 \text{ g/L}^{-1}$  medio Murashige y Skoog MS (1962) con vitaminas (Phyto Technology Laboratories, USA), más  $10 \text{ mL/L}^{-1}$  de agua de coco,  $30 \text{ g/L}^{-1}$  de sacarosa,  $8 \text{ g/L}^{-1}$  de agar-agar y el complejo hormonal de los tratamientos, ajustado a un pH de 5.8. El medio fue distribuido en los envases experimentales (vasos plásticos transparentes) y esterilizado por 20 min en autoclave a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Para la iniciación de los callos se empleó diferentes concentraciones de ácido 2-4 Diclórofenoxiacético (2-4D) y 6- Bencilaminopurina (BAP) y a pH 5.8 en condiciones de oscuridad total por 6 días. A partir de allí se manejó un fotoperiodo de 16 horas de oscuridad y 8 de luz blanca artificial durante 118 días con tres reemplazos de medio fresco.

La valoración estadística de las variables evaluadas en el ensayo se realizó mediante el análisis de varianza, cuyo modelo se planteó considerando tanto el diseño experimental utilizado como el arreglo

factorial evaluada el cual puede observarse en la tabla 2. La comparación de medias se realizó mediante el test de Duncan. Estos análisis se desarrollaron utilizando el software estadístico Infostat, al 5 % de probabilidad de error tipo 1.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 3 a continuación se presentan los resultados del efecto de la hormona 2,4 D en el tiempo expresado en *días* de obtención de los callos provenientes de tejido vegetal de pechiche los cuales no presentaron significancia mediante el test de Duncan  $p_{<0.05}$ . En esta tabla se observa que la concentración 0,3 mg/L presentó un valor de 87,92 días que fue el menor tiempo de obtención de los callos frente a la concentración 0,1 mg/L que demoró 105 días en la calloformación.

**Tabla 3.** Efecto del factor A (hormona 2,4 D) en el tiempo de inducción de callos a partir de explantes de pechiche (*Vitex gigantea*)

| Factor A (2,4 D) | Medias  | n  | E.E   |
|------------------|---------|----|-------|
| a1: 0.1 mg/L     | 105,00a | 12 | 11,14 |
| a2: 0.2mg/L      | 95,58a  | 12 | 11,14 |
| a3: 0.3 mg/L     | 87,92a  | 12 | 11,14 |

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*  
**Test: Duncan Alfa=0,05 Error: 1489,2500 gl: 24**

En la Tabla 4 se exhiben los resultados del efecto de la hormona 6-BAP en el tiempo de calloformación expresado en *días* los cuales no mostraron significancia entre tratamientos mediante la prueba de Duncan  $p_{<0.05}$ . Se observó que la concentración 0,1 mg/L presentó un tiempo de 84,39 días que fue mucho menor frente a la concentración 0,2 mg/L que demoró 107,94 días.

**Tabla 4.** Efecto del factor B (hormona 6-BAP) en el tiempo de inducción de callos a partir de explantes de pechiche (*Vitex gigantea*)

| Factor B (6-BAP) | Medias  | n  | E.E  |
|------------------|---------|----|------|
| b2: 0.2mg/L      | 107,94a | 18 | 9,10 |
| b1: 0.1mg/L      | 84,39a  | 18 | 9,10 |

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*  
**Test: Duncan Alfa=0,05 Error: 1489,2500 gl: 24**

En la Tabla 5 se muestran los resultados del efecto del tipo de explante en el tiempo de formación de callo expresado en *días* los cuales no mostraron significancia entre tratamientos mediante la prueba de Duncan  $p_{<0.05}$  sin embargo se pudo constatar que el tejido meristemático (c2) presentó un tiempo de 95,39 días siendo menor en contraste con el explante foliar que demoró 96,94 días.

**Tabla 5.** Efecto del factor C (tipo de explante) en el tiempo de inducción de callos a partir de tejido de pechiche (*Vitex gigantea*)

| Factor C (Explante) | Medias | n  | E.E  |
|---------------------|--------|----|------|
| c1: foliar          | 96,94a | 18 | 9,10 |
| c2: meristemo       | 95,39a | 18 | 9,10 |

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)*  
**Test: Duncan Alfa=0,05 Error: 1489,2500 gl: 24**

En la Tabla 6 se muestran los resultados del efecto combinado del factor A (2,4 D) con el factor B (6-BAP) en el tiempo de formación de la masa de callo expresado en *días* de inducción los cuales no mostraron significancia entre tratamientos mediante la prueba de Duncan  $p_{<0.05}$  sin embargo se pudo apreciar que la combinación 0,3 mg/L de la auxina 2,4 D con 0,1 mg/L de la citocinina 6-BAP presentó un menor tiempo de 58,50 días en la calloformación siendo menor en contraste con las demás combinaciones.

**Tabla 6.** Efecto combinado del factor A (hormona 2,4 D) más el factor B (hormona 6-BAP) en el tiempo de inducción de callos a partir de explantes de pechiche (*Vitex gigantea*)

| Factor A (2,4-D) | Factor B (6-BAP) | Medias  | n | E.E   |
|------------------|------------------|---------|---|-------|
| a1: 0.1 mg/L     | b1: 0.1mg/L      | 117,67a | 6 | 15,75 |
| a3: 0.3 mg/L     | b2: 0.2mg/L      | 117,33a | 6 | 15,75 |
| a2: 0.2mg/L      | b2: 0.2mg/L      | 114,17a | 6 | 15,75 |
| a1: 0.1 mg/L     | b2: 0.2mg/L      | 92,33a  | 6 | 15,75 |
| a2: 0.2mg/L      | b1: 0.1mg/L      | 77,00a  | 6 | 15,75 |
| a3: 0.3 mg/L     | b1: 0.1mg/L      | 58,50a  | 6 | 15,75 |

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)*  
**Test: Duncan Alfa=0,05 Error: 1489,2500 gl: 24**

En la Tabla 7 se muestran los resultados del efecto combinado del factor A (2,4 D) con el factor C (tipo de explante: foliar y meristemático) en el tiempo de formación de la masa de callo expresado en *días* de inducción los cuales no mostraron significancia entre tratamientos mediante la prueba de Duncan  $p_{<0.05}$  no obstante se pudo estimar que la combinación 0,2 mg/L de la auxina 2,4 D con tejido meristemático presentó un menor tiempo de 75,36 días en la formación de la masa de callo siendo menor frente a las demás combinaciones mientras que la concentración 0,2 mg/L alcanzó el mayor tiempo (115,83 días) de inducción en el explante foliar.

**Tabla 7.** Efecto combinado del factor A (hormona 2,4 D) más el factor C (tipo de explante) en el tiempo de inducción de callos a partir de tejido de pechiche (*Vitex gigantea*)

| Factor A (2,4-D) | Factor C (Explante) | Medias  | n | E.E   |
|------------------|---------------------|---------|---|-------|
| a2: 0.2mg/L      | c1: foliar          | 115,83a | 6 | 15,75 |
| a1: 0.1 mg/L     | c2: meristemo       | 113,67a | 6 | 15,75 |
| a3: 0.3 mg/L     | c2: meristemo       | 97,17a  | 6 | 15,75 |
| a1: 0.1 mg/L     | c1: foliar          | 96,33a  | 6 | 15,75 |
| a3: 0.3 mg/L     | c1: foliar          | 78,67a  | 6 | 15,75 |
| a2: 0.2mg/L      | c2: meristemo       | 75,33a  | 6 | 15,75 |

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)*  
**Test: Duncan Alfa=0,05 Error: 1489,2500 gl: 24**

En la Tabla 8 se presentan los resultados del efecto combinado del factor B (6-BAP) con el factor C (tipo de explante: foliar y meristemático) en el tiempo de calloformación expresado en *días* de inducción los cuales no mostraron significancia entre tratamientos mediante la prueba de Duncan  $p_{<0.05}$  sin embargo se pudo considerar que la combinación 0,1 mg/L de la citocinina 6-BAP con el tejido meristemático presentó un menor tiempo de 78 días en la formación de la masa de callo la cual fue menor en relación a las demás combinaciones. Por su parte la peor respuesta expresado en el mayor tiempo de inducción 112,78 se obtuvo concentración 0,2 mg/L de 6-BAP combinado con el tejido meristemático llegó a durar un tiempo de 112,78 días) en la obtención de los callos.

**Tabla 8.** Efecto combinado del factor B (hormona 6-BAP) más el factor C (tipo de explante) en el tiempo de inducción de callos a partir de tejido de pechiche (*Vitex gigantea*)

| Factor B (6-BAP)   | Factor C (Explante) | Medias  | n | E.E   |
|--|---------------------|---------|---|-------|
| b2: 0.2mg/L  | c2: meristemo       | 112,78a | 9 | 12,86 |
| b2: 0.2mg/L  | c1: foliar          | 103,11a | 9 | 12,86 |
| b1: 0.1mg/L  | c1: foliar          | 90,78a  | 9 | 12,86 |
| b1: 0.1mg/L  | c2: meristemo       | 78,00a  | 9 | 12,86 |
| <i>Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p &gt; 0,05)</i> |                     |         |   |       |
| <b>Test: Duncan Alfa=0,05 Error: 1489,2500 gl: 24</b>                                |                     |         |   |       |

En la Tabla 9 se exponen los resultados del efecto combinado del factor A (2,4 D), el factor B (6-BAP) y el factor C (tipo de explante: foliar y meristemático) en el tiempo de calloformación expresado en *días* de inducción los cuales no mostraron significancia entre tratamientos mediante la prueba de Duncan  $p_{<0.05}$  aún a pesar de eso se obtuvo que la combinación 0,2 mg/L del 2,4 D más 0,1 mg/L de la citocinina 6-BAP con el tejido meristemático presentó un menor tiempo de 38,3 días en la formación de la masa de callo la cual fue inferior frente a las demás combinaciones. El mayor tiempo de respuesta en la calloformación correspondió a 118,00 días obtenido con la combinación de 0,3 mg/L del factor A, 0,2 mg/L del factor B en el explante foliar (factor C2).

**Tabla 9.** Efecto combinado del factor A (hormona 2,4 D), más el factor B (hormona 6-BAP) más el factor C (tipo de explante) en el tiempo de inducción de callos a partir de tejido de pechiche (*Vitex gigantea*)

| Factor A (2,4-D)   | Factor B (6-BAP) | Factor C (Explante) | Medias  | n | E.E   |
|--|------------------|---------------------|---------|---|-------|
| a3: 0.3 mg/L   | b2: 0.2mg/L      | c1: foliar          | 118,00a | 3 | 22,28 |
| a1: 0.1 mg/L   | b1: 0.1mg/L      | c2: meristemo       | 118,00a | 3 | 22,28 |
| a1: 0.1 mg/L   | b1: 0.1mg/L      | c1: foliar          | 117,33a | 3 | 22,28 |
| a3: 0.3 mg/L   | b2: 0.2mg/L      | c2: meristemo       | 116,67a | 3 | 22,28 |
| a2: 0.2mg/L  | b2: 0.2mg/L      | c1: foliar          | 116,00a | 3 | 22,28 |
| a2: 0.2mg/L  | b1: 0.1mg/L      | c1: foliar          | 115,67a | 3 | 22,28 |
| a2: 0.2mg/L  | b2: 0.2mg/L      | c2: meristemo       | 112,33a | 3 | 22,28 |
| a1: 0.1 mg/L   | b2: 0.2mg/L      | c2: meristemo       | 109,33a | 3 | 22,28 |
| a3: 0.3 mg/L   | b1: 0.1mg/L      | c2: meristemo       | 77,67a  | 3 | 22,28 |
| a1: 0.1 mg/L   | b2: 0.2mg/L      | c1: foliar          | 75,33a  | 3 | 22,28 |
| a3: 0.3 mg/L   | b1: 0.1mg/L      | c1: foliar          | 39,33a  | 3 | 22,28 |
| a2: 0.2mg/L  | b1: 0.1mg/L      | c2: meristemo       | 38,33a  | 3 | 22,28 |
| <i>Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p &gt; 0,05)</i> |                  |                     |         |   |       |
| <b>Test: Duncan Alfa=0,05 Error: 1489,2500 gl: 24</b>                                |                  |                     |         |   |       |

En la Tabla 10 a continuación se presentan los resultados del efecto de la hormona 2,4 D en el diámetro (cm) de los callos provenientes de tejido vegetal de pechiche los cuales no presentaron significancia mediante el test de Duncan  $p_{<0.05}$  siendo todos iguales entre sí con un valor de 1,28 cm.

**Tabla 10.** Efecto del factor A (hormona 2,4 D) en el diámetro ajustado de los callos provenientes de tejido vegetal de pechiche (*Vitex gigantea*)

| Factor A (2,4 D)   | Medias | n  | E.E  |
|--|--------|----|------|
| a2: 0.2mg/L  | 1,28a  | 12 | 0,11 |
| a1: 0.1 mg/L   | 1,28a  | 12 | 0,11 |
| a3: 0.3 mg/L   | 1,28a  | 12 | 0,11 |
| <i>Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p &gt; 0,05)</i> |        |    |      |
| <b>Test: Duncan Alfa=0,05 Error: 0,1478 gl: 24</b>                                   |        |    |      |

En la Tabla 11 se muestran los resultados del efecto de la hormona 6 BAP en el diámetro (cm) de los callos provenientes de tejido vegetal de pechiche los cuales no presentaron significancia mediante el test de Duncan  $p_{<0.05}$ . Sin embargo el factor b2 (0,2 mg/L) de 6 BAP logró un mayor diámetro de 1,67 cm y el b1 (0,1 mg/L) apenas alcanzó 0,82 cm.

**Tabla 11.** Efecto del factor B (hormona 6-BAP) en el diámetro ajustado de los callos provenientes de tejido vegetal de pechiche (*Vitex gigantea*)

| Factor B (6-BAP)   | Medias | n  | E.E  |
|--|--------|----|------|
| b2: 0.2mg/L  | 1,67a  | 18 | 0,09 |
| b1: 0.1mg/L  | 0,82a  | 18 | 0,09 |
| <i>Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p &gt; 0,05)</i> |        |    |      |
| <b>Test: Duncan Alfa=0,05 Error: 0,1478 gl: 24</b>                                   |        |    |      |

En la Tabla 12 se exhiben los resultados del efecto del tipo de explante en el diámetro (cm) de los callos los cuales no presentaron significancia según Duncan  $p_{<0.05}$ . No obstante el tejido meristemático se comportó mejor con un diámetro de 1,387 cm mientras que el tejido foliar apenas alcanzó un valor de 1,11 cm.

**Tabla 12.** Efecto del factor C (tipo de explante) en el diámetro ajustado de los callos provenientes de tejido vegetal de pechiche (*Vitex gigantea*)

| Factor C (Explante)  | Medias | n  | E.E  |
|--|--------|----|------|
| c2: meristemo  | 1,38a  | 18 | 0,09 |
| c1: foliar   | 1,11a  | 18 | 0,09 |
| <i>Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p &gt; 0,05)</i> |        |    |      |
| <b>Test: Duncan Alfa=0,05 Error: 0,1478 gl: 24</b>                                   |        |    |      |

En la Tabla 13 se observan los resultados del efecto combinado entre el factor A y el B en el diámetro (cm) de los callos los cuales presentaron significancia de acuerdo con el test de Duncan  $p_{<0.05}$ . La combinación a3b2 mostró un mejor comportamiento en cuanto al diámetro alcanzado el cual fue de 1,82 mientras que la combinación a3b1 llegó a medir 0,55 cm.

**Tabla 13.** Efecto combinado del factor A (hormona 2,4 D) y el factor B (hormona 6-BAP) en el diámetro ajustado de los callos provenientes de tejido vegetal de pechiche (*Vitex gigantea*)

| Factor A (2,4-D)   | Factor B (6-BAP) | Medias | n | E.E  |
|--|------------------|--------|---|------|
| a3: 0.3 mg/L   | b2: 0.2mg/       | 1,82a  | 6 | 0,16 |
| a2: 0.2mg/L  | b2: 0.2mg/L      | 1,73a  | 6 | 0,16 |
| a1: 0.1 mg/L   | b2: 0.2mg/L      | 1,45ab | 6 | 0,16 |
| a1: 0.1 mg/L   | b1: 0.1mg/L      | 1,10bc | 6 | 0,16 |
| a2: 0.2mg/L  | b1: 0.1mg/L      | 0,82cd | 6 | 0,16 |
| a3: 0.3 mg/L   | b1: 0.1mg/L      | 0,55d  | 6 | 0,16 |
| <i>Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p &gt; 0,05)</i> |                  |        |   |      |
| <b>Test: Duncan Alfa=0,05 Error: 0,1478 gl: 24</b>                                   |                  |        |   |      |

En la Tabla 14 se observan los resultados del efecto combinado entre el factor A y el C en el diámetro (cm) de los callos, los cuales si presentaron significancia de acuerdo con el test de Duncan  $p_{<0.05}$ . La combinación a1c2 mostró una mejor posición al ubicarse con el diámetro de 1,60 mientras que la combinación a3c1 fue la de menor diámetro al medir 0,82 cm.

**Tabla 14.** Efecto combinado del factor A (hormona 2,4 D) y el factor C (tipo de explante) en el diámetro ajustado de los callos provenientes de tejido vegetal de pechiche (*Vitex gigantea*)

| Factor A (2,4-D)   | Factor C (Explante) | Medias | n | E.E  |
|--|---------------------|--------|---|------|
| a1: 0.1 mg/L   | c2: meristemo       | 1,60a  | 6 | 0,16 |
| a2: 0.2mg/L  | c1: foliar          | 1,57a  | 6 | 0,16 |
| a3: 0.3 mg/L   | c2: meristemo       | 1,55a  | 6 | 0,16 |
| a2: 0.2mg/L  | c2: meristemo       | 0,98b  | 6 | 0,16 |
| a1: 0.1 mg/L   | c1: foliar          | 0,95b  | 6 | 0,16 |
| a3: 0.3 mg/L   | c1: foliar          | 0,82b  | 6 | 0,16 |
| <i>Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p &gt; 0,05)</i> |                     |        |   |      |
| <b>Test: Duncan Alfa=0,05 Error: 0,1478 gl: 24</b>                                   |                     |        |   |      |

En la Tabla 15 se observan los resultados del efecto combinado entre el factor B y el C en el diámetro (cm) de los callos, los cuales mostraron diferencias significativas en concordancia con el test de Duncan  $p_{<0.05}$ . La combinación b2c2 superó a las demás con el diámetro de 1,96 mientras que la combinación b1c2 alcanzó un diámetro de 0,80 cm.

**Tabla 15.** Efecto combinado del factor B (hormona 6-BAP) y el factor C (tipo de explante) en el diámetro ajustado de los callos provenientes de tejido vegetal de pechiche (*Vitex gigantea*)

| Factor B (6-BAP)   | Factor C (Explante) | Medias | n | E.E  |
|--|---------------------|--------|---|------|
| b2: 0.2mg/L  | c2: meristemo       | 1,96a  | 9 | 0,13 |
| b2: 0.2mg/L  | c1: foliar          | 1,38b  | 9 | 0,13 |
| b1: 0.1mg/L  | c1: foliar          | 0,84c  | 9 | 0,13 |
| b1: 0.1mg/L  | c2: meristemo       | 0,80c  | 9 | 0,13 |
| <i>Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p &gt; 0,05)</i> |                     |        |   |      |
| <b>Test: Duncan Alfa=0,05 Error: 0,1478 gl: 24</b>                                   |                     |        |   |      |

En la Tabla 16 se exhiben los resultados del efecto combinado del factor A (2,4 D), el factor B (6-BAP) y el factor C (tipo de explante: foliar y meristemático) en el diámetro de los callos expresados en centímetros los que si mostraron significancia entre tratamientos según el test de Duncan ( $p_{<0.05}$ ).

Se puede apreciar que la combinación a3b2c2, es decir, 0,3 mg/L del 2,4 D más 0,2 mg/L de la citocinina 6-BAP con el tejido meristemático logró el mayor diámetro ajustado de la masa de callos cuyo valor fue de 2,17 cm mientras que la peor fue a3b1c1 (0,3 mg/L de 2,4 D; 0,1 mg/L de 6-BAP en el tejido foliar) que apenas logró una dimensión de 0,17 cm.

**Tabla 16.** Efecto combinado del factor A (hormona 2,4 D), más el factor B (hormona 6-BAP) más el factor C (tipo de explante) en el diámetro ajustado de los callos a partir de tejido de pechiche (*Vitex gigantea*)

| Factor A (2,4-D) | Factor B (6-BAP) | Factor C (Explante) | Medias    | n | E.E   |
|------------------|------------------|---------------------|-----------|---|-------|
| a3: 0.3 mg/L     | b2: 0.2mg/L      | c2: meristemo       | 2,17a     | 3 | 0,22  |
| a1: 0.1 mg/L     | b2: 0.2mg/L      | c2: meristemo       | 2,00ab    | 3 | 22,28 |
| a2: 0.2mg/L      | b2: 0.2mg/L      | c1: foliar          | 1,77abc   | 3 | 22,28 |
| a2: 0.2mg/L      | b2: 0.2mg/L      | c2: meristemo       | 1,70abcd  | 3 | 22,28 |
| a3: 0.3 mg/L     | b2: 0.2mg/L      | c1: foliar          | 1,47abcde | 3 | 22,28 |
| a2: 0.2mg/L      | b1: 0.1mg/L      | c1: foliar          | 1,37bcde  | 3 | 22,28 |
| a1: 0.1 mg/L     | b1: 0.1mg/L      | c2: meristemo       | 1,20cde   | 3 | 22,28 |
| a1: 0.1 mg/L     | b1: 0.1mg/L      | c1: foliar          | 1,00de    | 3 | 22,28 |
| a3: 0.3 mg/L     | b1: 0.1mg/L      | c2: meristemo       | 0,93ef    | 3 | 22,28 |
| a1: 0.1 mg/L     | b2: 0.2mg/L      | c1: foliar          | 0,90ef    | 3 | 22,28 |
| a2: 0.2mg/L      | b1: 0.1mg/L      | c2: meristemo       | 0,27fg    | 3 | 22,28 |
| a3: 0.3 mg/L     | b1: 0.1mg/L      | c1: foliar          | 0,17g     | 3 | 22,28 |

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)*  
**Test: Duncan Alfa=0,05 Error: 1489,2500 gl: 24**

En la Tabla 17 se exponen los resultados relacionados con el porcentaje de formación de embriones a partir de los callos como resultado del efecto combinado de los tres factores A (2,4 D), B (6-BAP) y C (tipo de explante: foliar y meristemático) donde se obtuvo que las combinaciones a3b2c2, a2b2c2 y a1b1c2 lograron el 100 % de formación de embriones, las combinaciones a1b1c1, a1b2c1, a2b2c1, a3b1c2 y alb2c2 formaron el 66 % de embriones, las combinaciones a2b1c1 y a2b1c2 constituyeron el 33 % de embriones mientras que la a3b1c1 no logró formar ningún embrión.

**Tabla 17.** Porcentaje de formación de embriones provenientes de los callos de tejido vegetal de pechiche (*Vitex gigantea*)

| No. | Tratamientos | Formación embriones (%) |
|-----|--------------|-------------------------|
| 1   | a1b1c1       | 66                      |
| 2   | a2b1c1       | 33                      |
| 3   | a3b1c1       | 0                       |
| 4   | a1b2c1       | 66                      |
| 5   | a2b2c1       | 66                      |
| 6   | a3b2c1       | 66                      |
| 7   | a1b1c2       | 100                     |
| 8   | a2b1c2       | 33                      |
| 9   | a3b1c2       | 66                      |
| 10  | a1b2c2       | 66                      |
| 11  | a2b2c2       | 100                     |
| 12  | a3b2c2       | 100                     |

De acuerdo a los resultados obtenidos y al análisis estadístico planteado no se detectó significancia ( $p_{<0.05}$ ) entre los tratamientos para el efecto individual y combinado de los factores A (2,4 D), B (6-BAP) y C (explante) para el menor tiempo de calloformación, sin embargo, numéricamente y de manera individual la mayor concentración de 2,4 D (0.3 mg/L) logró inducir en menor tiempo (87.92 días) la formación de callos, contrariamente la menor dosis 0.1 mg/L de 6-BAP indujo la formación de callo mientras que el mejor comportamiento en menor tiempo lo mostró el tejido meristemático. El mejor efecto combinado de los 3 factores lo exhibió el a2b1c2 es decir 0.2 mg/L de 2,4 D más 0,1 mg/L de 6-BAP más el tejido meristemático logrando formar callos en 38.33 días. Se ha informado que dosis bajas ( $< 1\text{mg/L}$ ) de 6 BAP con dosis más elevadas de auxinas en especial del 2,4 D han inducido de manera eficiente la producción de callos en diversos explantes de plantas con formación de brotes apicales.

Un comportamiento similar pero con dosis hormonales diferentes y en mayores tiempos de inducción presentó el estudio de Arzate y Mejía (2011) quienes registraron un crecimiento más acelerado de callo en tratamientos suplementados con 2.0 y 3.0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, sobre todo cuando contenían 1.0 mg L<sup>-1</sup> de 6-BAP; los callos obtenidos a los 60 de iniciada la inducción en los tratamientos formulados con medio Murashige y Skoog adicionado con vitaminas, bajo las concentraciones y combinaciones óptimas antes señaladas.

Los mismos autores informan que las citocininas favorecen principalmente la formación de brotes debido a que en el tratamiento donde no se logró la formación de callos sólo se empleó 6- BAP pero se desarrolló tejido apical sin crecimiento de raíz.

En el presente estudio se pudo observar el efecto hormonal de la auxina más la citocinina y de la misma hormona en el explanto meristemático en dosis de 0,3 y 0,1 mg/L respectivamente el que presentó el menor tiempo de inducción frente a las demás combinaciones (tratamientos). Por su parte la citocinina tuvo el mismo comportamiento en el explante meristemático.

Espinosa, (2012) logró la formación de los callos embriogénicos en explantes de hojas y tallos de *Morus alba* (mora) con concentraciones de 1,0 y 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D. Sin embargo estos mismos autores resaltan que la formación de callos en *M. alba* depende del genotipo, el tipo de explante y los reguladores del crecimiento utilizados y que los mejores explantes son los provenientes de las hojas curiosamente la dosis de 6 BAP empleada como acompañante en el complejo hormonal fue de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> con la cual se alcanzó hasta un 100 % de formación de callos.

Los diámetros de los callos no mostraron significancia estadística para el efecto individual de la auxina (1,28 cm), aunque se observó el mismo comportamiento para la citocinina, los resultados numéricos revelan que la dosis de 0,2 mg/L logró un mejor diámetro (1,67 cm) al igual que el explantes meristemático que se permitió un diámetro de 1,38 cm aunque no presentó diferencia estadística frente al tejido foliar.

La combinación de las hormonas con los explantes si presentó significancia a favor de la combinación 2,4 D (0,3 mg/L) y 6 BAP (0,2 mg/L) alcanzando un diámetro de 1,82 en relación con las demás dosis, similar al comportamiento entre la hormona auxina (0,1 mg/L) con el tejido meristemático que lograron una medida de 1,60 cm al igual que la hormona citocinina con el mismo tejido siendo aun mayor el diámetro conseguido (1,92 cm).

El efecto combinado de las hormonas auxina y citocinina (0,3 mg/L más 0,2 mg/L respectivamente) en el tejido del meristema utilizado obtuvo un diámetro de 2,17 cm considerándose el mejor efecto obtenido en el estudio presentando diferencia estadística significativa en el análisis realizado.

Suksa-Ard *et al.* (Citados por Espinosa, (2012) recalcan que la formación y las características de los callos obedecen al tipo de explante. Estos autores consiguieron callos embriogénicos a partir de segmentos de tallos de *Dioscorea zingiberensis* (conocido en el Caribe como ñame) utilizando 0,5 mg/L<sup>-1</sup> de 6 BAP y 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4- D, alcanzando una formación del 87 % de callos.

Ortega y Korneva, (2010) consiguieron obtener vitroplantas a partir de multimeristemas y callos de diferentes variedades de banano y plátano (*Musa spp.*) a partir de meristemas apicales, las hormonas utilizadas fueron una mezcla de ácido indol acético AIA (0,3 mg/L<sup>-1</sup>) kinetina (0,2 mg/L<sup>-1</sup>) y ácido indol acético AIA (0,3 mg/L<sup>-1</sup>) más 6 BAP (0,1 mg/L<sup>-1</sup>). La planta de pechiche es muy apreciada por la calidad de su madera como por lo sensorialmente agradable de su baya. Algunos reportes dan cuenta de la riqueza de este fruto en antioxidantes. Los tejidos foliares y meristemáticos de pechiche si responden al estímulo hormonal para obtener callos embriogénicos con fines de micropropagación con la concentración hormonal a base de 2,4 D y 6 BAP. Los callos transformados en embriones obtenidos a partir de los explantos provenientes de meristemas presentaron mejor desarrollo que los de tejido foliar. Se lograron obtener embriones somáticos con capacidad de convertirse posteriormente en plántulas listas para el trasplante.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre M., Z., Díaz O., L., & Palacios H., B. (2015). Fenología de especies forestales nativas en el Jardín botánico el Padmi. *CEDAMAZ*, 5(1), 68 – 80.
- Alcívar V., M., & Vera V., V. (2013). *Aislamiento de bacterias celulíticas a diferentes profundidades en plantación de teca (Tectona grandis) y pechiche (Vitex gigantea)*. Calceta, Manabí: Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Feliz López.
- Arzate , A. M., & Mejía F., R. (2011). Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. *Rev. Fitotec. Mex.*, 34(2), 101-106.
- Barbosa C., I. (2011). Concentración mínima inhibitoria de higromicina B en callos embriogénicos de arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista Colombiana Biotecnológica*, 13(2), 193-198.
- Bejarano T., A., & Pedroza M., J. (2008). Propagación vegetativa in vitro de *Puya santossi*. *Rev. Colomb. Biotecnol.* , 10(1), 36-48.
- Canchignia M., H., & Espinoza R., M. (2008). Propagación vegetativa de plátano y banano con la aplicación de benzilaminopurina (6-BAP) y ácido indolacético (AIA). *Ciencia y tecnología*, 1, 11-15.
- Centeno T., J. (2017). *Diseño y gestión de marca para la comercialización de dulce de pechiche en la ciudad de Machala*. Machala, El Oro: Universidad Técnica de Machala.
- CFN. (2016). *Explotación de viveros forestales y madera en pie*. Quito: Corporación Financiera Nacional. Ficha técnica.
- Concepción R., & Chonillo R. (2016). Determinación de las potencialidades de aserrín en la ciudad de Guayaquil como materia prima para la producción de diversos surtidos en la industria forestal. *Holos*, 4, 105-114.
- Escobar, D., & Suarez M., K. (2013). *Evaluación morfológica de las plántulas de cinco especies forestales mediante la aplicación de tres tratamientos pregerminativos en el cantón Echeandía, provincia Bolívar*. Guaranda, Ecuador: Universidad Estatal de Bolívar. Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente. Escuela de Ingeniería Forestal.
- Espinosa A. (2012). Efecto del tipo de explante y la concentración de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en la formación de callos en *Morus alba* L. *Revista Pastos y Forrajes*, 35(4), 407-416.

- Fernández , Y., & González , M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento in vitro de frutales perennes. *Cultivos tropicales* , 1-19.
- Fernández D., Villaroel A., Cuamo L., & Storaci V. (2016). Evaluación de un sistema de regeneración por embriogénesis somática de neem. *Acta Biológica Colombiana*, 21(3), 581-592.
- Gaibor C., F. (2017). *Evaluación agronómica de plántulas de pechiche (Vitex gigantea) empleando tres métodos pregerminativos y dos tipos de sustratos*. Guaranda, Ecuador: Universidad Estatal de Bolívar. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Recursos Naturales y del Ambiente. Carrera de Ingeniería Forestal.
- Gatter, S., & Romero R. , M. (2005). Análisis económico de la cadena de aprovechamiento, transformación y comercialización de madera aserrada proveniente de bosques nativos en la región centro-sur de la Amazonía ecuatoriana. *Servicio Forestal Amazónico*, 1-29.
- Gómez Núñez, L. (2011). Expresión de la proteína E del virus del Oeste del Nilo en callos embriogénicos de maíz, transformados mediante biobalística. *Revista Mexico Ciencia Pecuarias*, 2(1), 01-14.
- González P., O., & Hernández E., M. (2011). Evaluación de la dinámica del crecimiento in vitro en callos de Ipomoea batatas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(1), 148-155.
- Hidalgo O. (2014). ). *Estudio preliminar para la obtención de explantes de cacao (Theobroma cacao L.) a través de embriogénesis somática*. Daule, Ecuador: Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Agrarias.
- Intagri. (2018). ). Ácido naftalenacético (ANA) y su uso en la agricultura. *Serie Nutrición Vegetal*, 120(3), 1-15.
- Jiménez M., N., & Mata V., S. (2018). *Factibilidad de la Asociación de Cultivadores de Pechiche de la Zona 5 y 8 y su Futura Exportación*. Guayaquil, Ecuador: Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Administrativas. Ingeniería en Comercio Exterior.
- Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. *Fisiología Vegetal*, 1-28.
- Jumbo S. , R. (2015). *Caracterización de procesos de deformación de la superficie terrestre usando la técnica de interferometría diferencial de radar de apertura sintética (dinsar) en las microcuencas de potosí, cristal, pechiche y balsas, ubicadas entre las provincias de los*. Sangolquí, Ecuador: Universidad de las Fuerzas Armadas.
- Krikorian A., D. (2002). Propagación clonal in vitro. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*, 96-108.
- Kryvenk, M. (2008). Obtención de callos con estructuras embriogénicas de Stevia rebaudiana Bert. en medios de cultivo semisólidos. *Biotecnología Vegetal*, 8(2), 91- 98.
- Liberato Portillo, & Santacruz R., F. (2006). Obtención de embrioides de Agave tequilana Weber a partir de explantes de raíz. *Zonas Áridas* (10 ).
- Martínez M., S. (2012). Efecto de dos citoquininas, ácido ascórbico y sacarosa en la obtención de plantas in vitro de Sorghum bicolor para la formación de callos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 101-110.
- Matos A. (2007). ). Inducción de callo en plantas silvestres de zábila (aloe vera) con diferentes combinaciones de 2,4-d, ba y kinetina. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 41(4), 503-516.
- Medina A. , M., Medina, C., & Medina, L. (2015). Propagación in vitro de Musa acuminata (Simmunds) plátano bocadillo del Chocó, Colombia, a partir del cultivo de meristemas apicales. *Rev. Biodivers. Neotrop*, 5(1), 47-53.
- Moreno B., & Miranda D. (2013). ). La zeatina fomenta la germinación de semillas de anon (Annona squamosa L. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 7(1), 9-19.

- Mroginski , L., & Roca , W. (2000). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*, 1-44.
- Muñoz, S. (2006). Obtención de plantas a partir de anteras de espárrago (*Asparagus officinalis* L.). *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 6(9), 39-46.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio Assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* , 15.
- Nieto P., D. (2017). *La comercialización del dulce de pechiche y su impacto en el desarrollo socioeconómico del cantón Jipijapa*. Manta, Manabí: Universidad Laica Eloy Alfaro. de Manabí. Facultad de Ciencias Administrativas. Escuela de Ingeniería Comercial.
- Olivella C., Vendrell M., & Savé R. (2001). Determinación de ácido abscísico, ácido indolacético, zeatina y ribósido de zeatina en hojas desarrolladas de gerbera jamesonii cv bolus y su variación con la edad. *Investigación Agrónoma Prot. Veg.*, 16(3), 1-9.
- Olivia H., M., & Núñez , M. (2001). Empleo de dos análogos de brasinoesteroides en la formación de callos embriogénicos en papa (*Solanum tuberosum* L). *Cultivos Tropicales*, 22(4), 29-35.
- Ortega N., & Korneva S. (2010). Obtención de Multimeristemas y Callos de Diferentes Variedades de Banano y Plátano (*Musa* spp.) a partir de “Meristemas Apicales” y “Scalps”. *Revista Tecnológica*, 23(1), 99-104.
- Pedroza M., J., & Bejarano T., A. (2008). Propagación vegetativa in vitro de *Puya santossi*. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, 10(1), 36-48.
- Pesantes , C. I. (2018). *Detección de triterpenos pentacíclicos en callos embriogénicos de *Vernonanthura patens**. Guayaquil: Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Químicas. Tesis de pregrado.
- Quinapallo P., T. (2013). *Propagación sexual y asexual de cuatro especies forestales promisorias del bosque seco del cantón zapotillo, provincia de Loja*. Loja, Ecuador: Universidad Nacional de Loja. Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables.
- Ramírez H., Peralta M., Benavides M., & Sánchez L. (2005). Efectos de Prohexadiona - Ca en tomate y su relación con la variación de la concentración de giberelinas y citocininas. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 11(2), 283-290.
- Ramos G., Cruz R., Morante C., & Villacís O. (2006). Empleo de hormonas (ANA y AIB) estimuladoras del enraizamiento para la propagación vegetativa de *Chlorophora tinctoria* (L) Gaud (moral fino) en el litoral ecuatoriano. *Foresta Veracruzana*, 8(1), 9-12.
- Rodríguez M., P., & Sornoza Quintero, C. (2019). *Análisis Gastronómico y aplicaciones culinarias del pechiche (*vitex gigantea kunth*)*. Guayaquil, Ecuador : Universidad de Guayaquil. Facultad de Ingeniería Química. Carrera Licenciatura en Gastronomía.
- Román C., G. (2014). *Efecto de la hormona AIB en el enraizamiento de estacas juveniles de *Croton lechler Muell. Arg.** Lima, Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Ciencias Forestales.
- Ruiz R. , B. (2009). *Efecto del BAP y 2,4-D en la inducción de organogénesis indirecta in vitro de *Anthurium andraeanum* L.* Honduras: Zamorano. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria.
- Ruiz S., C. (2006). Estudios preliminares en la estandarización de un protocolo para la obtención de callos embriogénicos en dos clones de caucho (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) De diferentes orígenes geográficos. *Revista Colombiana de Biotecnología.*, 8(1), 32-47.
- Salazar C., E. (2000). *Estudio económico-ambiental del sistema de cultivo del mango en la región de la sub-cuenca del rio Daule*. Guayaquil, Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Sánchez F., C. (2008). Hojas caídas y aporte de nutrientes de diez especies forestales tropicales. *Ciencia y Tecnología*, 1, 73-78.

- Santos, A., & López Cabrera, M. (2002). Obtención de embriones somáticos y establecimiento de. *Biotecnología vegetal*, 2(2), 107-109.
- Suatunce C., P., & Díaz C., G. (2009). Crecimiento de especies arbóreas tropicales en la colección de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. *Ciencia y Tecnología*, 2(2), 21-27.
- Valarezo C., R. (2015). *Obtención de callos embriogénicos a partir de explantes florales en 2 clones de cacao (Theobroma cacao L.)*. Machala, Ecuador: Universidad Técnica de Machala.
- Valladolid O., J., & León M., Á. (2017). Selección de árboles semilleros en plantaciones forestales de la provincia de Santa Elena, Ecuador. *Revista Científica y Tecnológica UPSE*, 4 (2 ), 105-110.
- Vera Á., E., & Solis C., M. (2019). *Determinación de la composición nutricional del fruto de pechiche (Vitex gigantea Kunth)*. Quevedo, Ecuador: Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Facultad de Ciencias de la Ingeniería. Carrera de Ingeniería Agroindustrial.