



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**  
**SEDE CUENCA**  
**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

EVALUACIÓN DE LA CALLOGÉNESIS *IN VITRO* EN EXPLANTES JÓVENES DE  
DURAZNO (*Prunus Persica L.*)

Trabajo de titulación previo a la obtención del  
título de Ingeniera Biotecnóloga

AUTORA: CAROLIN GISSEL ROLDÁN URDIALES

TUTORA: DRA. INÉS PATRICIA MALO CEVALLOS, PhD.

Cuenca - Ecuador

2025

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN**

Yo, Carolin Gissel Roldán Urdiales con documento de identificación N° 1400556518, manifiesto que:

Soy la autora y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 19 de febrero de 2025

Atentamente,



---

Carolin Gissel Roldán Urdiales

1400556518

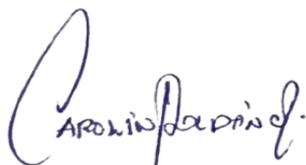
**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, Carolin Gissel Roldán Urdiales con documento de identificación N° 1400556518, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del Trabajo experimental: “Evaluación de la callogénesis *in vitro* en explantes jóvenes de durazno (*Prunus Persica L.*)”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera Biotecnóloga, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 19 de febrero de 2025

Atentamente,



---

Carolin Gissel Roldán Urdiales

1400556518

## CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Inés Patricia Malo Cevallos con documento de identificación N° 0102291044, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: EVALUACIÓN DE LA CALLOGÉNESIS *IN VITRO* EN EXPLANTES JÓVENES DE DURAZNO (*Prunus Persica L.*), realizado por Carolin Gissel Roldán Urdiales con documento de identificación N° 1400556518, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 19 de febrero del 2025

Atentamente,



Dra. Inés Patricia Malo Cevallos, PhD.

0102291044

## **Dedicatoria**

A mis padres, Fanny Urdiales y Fabricio Roldán, por su amor incondicional, su apoyo inquebrantable y sus sabios consejos. Gracias por ser mi guía y por inculcarme valores como la responsabilidad y la perseverancia, pilares fundamentales que me han permitido alcanzar mis metas.

A mi hermano, Jairo Roldán, por estar siempre a mi lado, brindándome su compañía y aliento en los momentos más desafiantes. Tu apoyo ha sido un pilar fundamental en este camino.

A mi inseparable compañero, Bruno, cuya lealtad y cariño incondicional han sido una fuente constante de alegría y consuelo a lo largo de este proceso.

A todos ustedes, con gratitud y amor, dedico esta tesis.

*Carolin.*

## **Agradecimientos**

En primer lugar, agradezco a Dios, fuente de fortaleza y guía en mi vida, por darme la oportunidad, la salud y la perseverancia necesarias para alcanzar este logro.

A mi familia, en especial a mis padres, por su amor incondicional, su apoyo moral y económico, y por ser mi mayor inspiración. A mi hermano, por sus consejos diarios y por motivarme a nunca claudicar en la búsqueda de mis metas académicas. Gracias por su comprensión y aliento constante; sin ustedes, este logro no habría sido posible.

A mi asesora de tesis, Dra. Inés Malo, por su orientación, paciencia y apoyo inquebrantable a lo largo de este proyecto. Su conocimiento y experiencia fueron pilares fundamentales en la realización de este trabajo.

A mis profesores y compañeros de la carrera de Biotecnología, por compartir conmigo enseñanzas, conocimientos y experiencias que fomentaron un ambiente de aprendizaje colaborativo y enriquecedor, contribuyendo significativamente a mi crecimiento académico y personal.

A mis amigos, por su compañía, sus palabras de aliento y los momentos de risas que hicieron más llevadero este camino. Gracias por creer en mí y por estar siempre a mi lado.

Finalmente, agradezco a todas las personas que, de una u otra manera, contribuyeron a la culminación de este trabajo con su apoyo, consejos y amabilidad. A todos ustedes, muchas gracias.

*Carolin.*

## Resumen

La micropropagación de plantas a partir de distintos tipos de explantes se ha consolidado como una herramienta clave en la reproducción y mejoramiento de especies vegetales. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la callogénesis *in vitro* de explantes jóvenes de *Prunus pérsica* L, considerando dos protocolos de desinfección y tres concentraciones de 2,4-D. La metodología se basó en una investigación de nivel explicativo y un diseño experimental puro. Se diseñaron dos tratamientos con NaClO al 2% y 2.5% y tres concentraciones de 2,4-D a 0.5, 1 y 1.5 mg/L. Se utilizó el medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) dispensado en frascos para la inoculación de tres explantes por unidad experimental. Se empleó estadística descriptiva e inferencial mediante un análisis de varianza mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Los resultados en cuanto a la desinfección no mostraron diferencia significativa en cuanto a contaminación (p-valor = 0.174) y oxidación de explantes (p-valor = 0.0972). Asimismo, la inducción de callos en respuesta a las tres concentraciones de 2,4-D aplicadas, de igual manera no mostraron diferencia significativa (p-valor = 0.287) en este proceso. Sin embargo, el análisis gráfico y la evidencia numérica en cuanto a cantidad de callos desarrollados demuestran una mejor respuesta de estos a concentración de 1.5 mg/L de 2,4-D. En síntesis, este estudio constituye un aporte fundamental al desarrollo de estrategias eficientes para el desarrollo de callogénesis del durazno *Prunus pérsica*.

**Palabras claves:** callogénesis *in vitro*, micropropagación, auxina 2,4-D, inducción de callos.

## Abstract

The micropropagation of plants from different types of explants has become a key tool in the reproduction and improvement of plant species. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* callogenesis of young explants of *Prunus persica L*, considering two disinfection protocols and three concentrations of 2,4-D. The methodology was based on an explanatory level of research and a pure experimental design. Two treatments were designed with NaClO at 2% and 2.5% and three concentrations of 2,4-D at 0.5, 1, and 1.5 mg/L. The Murashige & Skoog (MS) culture medium was used, dispensed in jars for the inoculation of three explants per experimental unit. Descriptive and inferential statistics were employed through variance analysis using the Kruskal-Wallis test. The results regarding disinfection showed no significant difference in contamination (p-value = 0.174) and explant oxidation (p-value = 0.0972). Likewise, the induction of calli in response to the three applied concentrations of 2,4-D also showed no significant difference (p-value = 0.287) in this process. However, the graphic analysis and numerical evidence regarding the number of developed calli show a better response to the 1.5 mg/L concentration of 2,4-D. In summary, this study provides a fundamental contribution to the development of efficient strategies for *Prunus persica* callogenesis

**Keys words:** *in vitro* callogenesis, micropropagation, auxin 2,4-D, callus induction.

## Índice de contenido

CAPÍTULO 1 .....	13
INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. Problemática .....	13
1.2. Antecedentes.....	16
1.3. Delimitación .....	18
1.3.1. Delimitación geográfica .....	18
1.3.2. Delimitación sectorial.....	18
1.4. Objetivos.....	18
1.4.1. Objetivo General .....	18
1.4.2. Objetivos Específicos .....	18
1.5. Hipótesis .....	19
CAPÍTULO 2 .....	20
MARCO TEÓRICO .....	20
2.1. Durazno ( <i>P. pérsica</i> ) .....	20
2.2. Callogénesis.....	21
2.3 Importancia de la Micropropagación en el Durazno ( <i>P. persica</i> ) .....	22
2.4. Desinfección en el cultivo <i>in vitro</i> .....	23
2.5. Reguladores de crecimiento vegetal.....	24
2.6. Uso de reguladores de crecimiento vegetal en la callogénesis.....	24
2.7. Fases de la micropropagación .....	25

2.8. Factores que influyen en la micropropagación.....	26
2.8.1. Medio de cultivo y reguladores del crecimiento .....	27
2.8.2. Sistemas de inmersión temporal (SIT) .....	27
2.8.3. Genotipo y factores ambientales .....	27
2.9. Contaminación de cultivos de tejidos vegetales .....	28
CAPÍTULO 3 .....	29
MARCO METODOLÓGICO .....	29
3.1. Nivel de investigación .....	29
3.2. Diseño de investigación.....	29
3.3. Diseño del experimento .....	29
3.3.1. Factores estudiados.....	30
3.3.2. Número de tratamientos .....	30
3.3.3. Número de réplicas.....	30
3.4. Experimentación de laboratorio .....	31
3.4.1. Preparación del medio de cultivo .....	31
3.4.2. Inducción a callogénesis.....	32
3.5. Técnicas e instrumentos de recolección de datos .....	32
3.5.1. Calidad del callo .....	33
3.6. Análisis estadístico .....	34
CAPÍTULO 4 .....	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	35

4.1. Resultados.....	35
4.1.1. Análisis estadístico .....	35
4.1.2. Desinfección del material vegetal .....	35
4.1.3. Inducción de callos a distintas concentraciones de 2,4-D y NaClO.....	37
4.1.4. Calidad del callo .....	39
4.2. Discusión .....	41
CAPÍTULO 5 .....	43
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	43
5.1. Conclusiones.....	43
5.2. Recomendaciones .....	43
ANEXOS.....	50
Anexo 1. Data de experimentación .....	50
Anexo 2. Evidencia fotográfica.....	52

### Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica del Durazno ( <i>P. pérsica</i> ).....	20
Tabla 2. Diseño experimental de la callogénesis <i>in vitro</i> en explantes jóvenes de durazno.....	30
Tabla 3. Componentes del medio de cultivo.....	32
Tabla 4. Calificación de la calidad del callo.....	34
Tabla 5. Reporte Shapiro-Wilk: grupos de datos.....	35

Tabla 6. Resultado de la prueba de Kruskal-Wallis: desinfección. .... 36

Tabla 7: Inducción de callos con distintas concentraciones de 2,4-D y NaClO..... 37

### **Índice de Figuras**

Figura 1. Durazno ( <i>P. Pérsica</i> ).....	21
Figura 2. Diagrama de barras agrupadas .....	36
Figura 3. Inducción de callos en función de la concentración de 2,4-D, evaluada bajo dos concentraciones de NaClO .....	37
Figura 4. Diagrama de dispersión de datos .....	38
Figura 5. Diagrama de dispersión de datos .....	39
Figura 6. Calidad del callo en función del color, necrosis y textura. ....	40

## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN

#### 1.1. Problemática

La Biotecnología Vegetal ha avanzado significativamente en las últimas décadas, permitiendo el desarrollo de técnicas como la micropropagación *in vitro*, fundamental para la propagación de especies vegetales de importancia agrícola, ornamental y forestal a gran escala (Kumari y colaboradores, 2023). No obstante, la aplicación de técnicas de cultivo de tejidos vegetales para la propagación comercial de plantas puede enfrentar diversos obstáculos debido a su susceptibilidad a enfermedades y dificultades en la regeneración a partir de explantes (Abdalla y colaboradores, 2022). Por lo tanto, la investigación de técnicas eficientes para la inducción de callos en *Prunus persica L*, resulta crucial, ya que la callogénesis es un paso previo esencial para la regeneración de tejidos y la producción de plantas completas.

El durazno (*P. persica*), de la familia Rosaceae, es un árbol caducifolio de pequeño tamaño cuyo fruto, una drupa grande, ha sido valorado globalmente a lo largo de la historia, es así como en la actualidad, su relevancia económica ha aumentado considerablemente (Hernández-Amasifuen y colaboradores, 2021).

La micropropagación de plantas a partir de distintos tipos de explantes se ha consolidado como una herramienta clave tanto en la investigación científica como en aplicaciones industriales a gran escala. Estas técnicas *in vitro* han ganado gran importancia en la Biotecnología Agrícola, facilitando la reproducción y el mejoramiento de diversas especies vegetales (Hasnain y colaboradores, 2022). Esta herramienta esencial en la Biotecnología Agrícola ha permitido la propagación masiva de plantas y la conservación de especies de interés comercial o en riesgo (Kulak y colaboradores, 2022).

No obstante, la aplicación de técnicas de cultivo con tejidos vegetales puede enfrentar diversos obstáculos, que pueden ser debido a factores técnicos, biológicos, fisiológicos y/o genéticos. Además, problemas como la sobreproducción, la falta de instalaciones adecuadas y la escasez de técnicos especializados también pueden limitar el éxito de estas técnicas (Abdalla y colaboradores, 2022). En este contexto, el durazno es reconocido como uno de los cultivos más desafiantes de propagar en condiciones *in vitro* debido a sus características particulares. Su cultivo bajo condiciones controladas se ve obstaculizado por su alta susceptibilidad a la contaminación durante el proceso de desinfección y la variabilidad en su respuesta a los reguladores de crecimiento (I. Mitrofanova y colaboradores, 2020; O. Mitrofanova y colaboradores, 2019).

Asimismo, Hernández-Amasifuen y colaboradores, (2021) destacan que las especies del género *Prunus* presentan varios desafíos en condiciones *in vitro*, entre ellos, una alta incidencia de oxidación de los explantes, la presencia de inhibidores de crecimiento y dificultades en el enraizamiento. Debido a estos factores, el durazno es considerado una especie de comportamiento recalcitrante, lo que complica su propagación *in vitro*.

En este contexto, el éxito del cultivo de tejidos vegetales depende de la eliminación de microorganismos contaminantes, como virus, bacterias, levaduras y hongos, que compiten por los nutrientes y pueden provocar mortalidad, necrosis, así como una disminución en el crecimiento y enraizamiento de los cultivos. La esterilización de la superficie de los explantes es crucial, pero no existe un método único que funcione para todas las especies, ya que la carga microbiana varía según la estación. Comúnmente se utilizan desinfectantes como hipoclorito de sodio, que deben eliminar la contaminación sin dañar las células vegetales (Eliwa y colaboradores, 2024).

En este mismo ámbito Saleem y colaboradores, (2022) mencionan que cada etapa de la micropropagación requiere un protocolo específico y eficiente para cada genotipo, ya que la respuesta varía según el tipo y la concentración del regulador de crecimiento vegetal. Por lo tanto, para lograr una micropropagación efectiva, es fundamental evaluar el regulador de crecimiento más eficaz o las combinaciones de estos, con el fin de maximizar la tasa de crecimiento en un período de tiempo reducido.

La importancia de este estudio radica en la búsqueda de protocolos eficientes para mejorar la propagación *in vitro* de *P. persica*, una especie con gran relevancia en la agricultura mundial (Nowicka y colaboradores, 2019). En la actualidad, la necesidad de optimizar estos procesos se vuelve cada vez más evidente, dada la creciente demanda de plantas libres de patógenos, así como la necesidad de incrementar la productividad en áreas donde los métodos tradicionales de propagación resultan insuficientes (Kumari y colaboradores, 2023).

El enfoque teórico que sustenta esta investigación se basa en los principios de la Biotecnología Vegetal y la fisiología del cultivo de tejidos *in vitro*. Según Kumari y colaboradores, (2023) la capacidad de las plantas para regenerar tejidos a partir de explantes depende de factores como la combinación adecuada de reguladores de crecimiento, la composición del medio de cultivo y las condiciones ambientales. En este marco, se consideran especialmente relevantes las teorías sobre la acción de las auxinas, como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), en la inducción de callos y la regeneración celular.

Este estudio contribuirá al avance del conocimiento en Biotecnología Vegetal, donde la callogénesis *in vitro* se considera una herramienta clave para la regeneración de plantas y la propagación masiva de cultivos importantes. Dado que el durazno es una de las frutas más relevantes en climas templados, con alto valor económico y nutricional, optimizar su

propagación *in vitro* podría facilitar su producción a gran escala, beneficiando tanto a productores como a consumidores.

## 1.2. Antecedentes

Los esfuerzos para optimizar la propagación del durazno han impulsado el desarrollo de diversas metodologías biotecnológicas, siendo la micropropagación *in vitro* una de las más destacadas. No obstante, investigaciones previas han revelado limitaciones significativas en este proceso, relacionadas con la alta susceptibilidad a la contaminación microbiana y la variabilidad en la respuesta de los explantes a los reguladores de crecimiento. Estos factores afectan de manera directa la eficiencia de la callogénesis, un proceso clave para la regeneración de tejidos.

Un estudio reciente sobre la variedad de *P. persica* realizado en Perú buscó optimizar el proceso de inducción de callos a partir de hojas de durazno. Este trabajo se centró en la utilización de concentraciones específicas de hipoclorito de sodio (NaClO) para la desinfección de los explantes y el uso de 2,4-D en combinación con agua de coco como medio de cultivo. Los resultados fueron prometedores, logrando un 100% de inducción de callos con una concentración de 1 mg/L de 2,4-D y 50 mL/L de agua de coco, lo que sugiere una mejora significativa en la propagación del durazno *in vitro* (Hernández-Amasifuen y colaboradores, 2021).

Por otro lado, un estudio realizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad de Damietta en Egipto, estableció un protocolo eficiente de micropropagación para tres portainjertos de durazno importados: Okinawa, Nemared y Garnem. Los explantes remojados en hipoclorito de sodio (NaOCl) al 20% durante 15 minutos lograron las mejores tasas de respuesta (82.81%) y supervivencia (96.61%), con una mínima mortalidad (3.14%) y

baja contaminación (0.24%). La proliferación de brotes se incrementó notablemente al usar 5.0 mg/L de 6-bencilaminopurina (BAP) en combinación con 0.2 mg/L de ácido indol-butírico (IBA) (Eliwa y colaboradores, 2024).

En otro estudio se utilizaron segmentos de hojas de *P. persica* recolectados de bro53e y Skoog (MS) a la mitad de su concentración, vitaminas Staba, sacarosa y agar. Se evaluó la influencia de seis reguladores de crecimiento en tres concentraciones (5, 10 y 15  $\mu\text{M}$ ) sobre la inducción de callos bajo un fotoperíodo de 16 horas. La tidiázurón (TDZ) indujo callos verdes compactos, mientras que la 6-benciladenina (BA) y la zeatina generaron callos pequeños; la kinetina no indujo callos. En cuanto a las auxinas, tanto el 2,4-D como la dicamba produjeron callos friables de color blanco a amarillento (Declerck y Korban, 1996).

Finalmente, un estudio reciente sobre *Prunus cerasifera* (ciruelo de hoja púrpura) investigó un protocolo eficiente de micropropagación *in vitro*, utilizando hipoclorito de sodio al 15% o cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) al 0.1% durante 10 minutos para la desinfección de explantes, obteniendo los mejores resultados en cuanto a descontaminación (100% y 90.2%, respectivamente) y tasas de supervivencia (90% y 92%, respectivamente). Estos hallazgos resaltan la eficacia de los desinfectantes y su aplicación en la propagación *in vitro* de especies del género *Prunus* (Fawzia, 2020).

Es importante destacar que, a pesar de los avances en la propagación de especies del género *Prunus*, los estudios específicos sobre *P. persica* siguen siendo limitados en comparación con otras especies. Esta falta de investigaciones dificulta la optimización de técnicas para mejorar su propagación. Sin embargo, los estudios revisados muestran que la selección adecuada de desinfectantes y reguladores de crecimiento puede incrementar de

manera significativa la eficiencia de la callogénesis y la micropropagación, favoreciendo así la propagación *in vitro* de estas plantas.

### **1.3. Delimitación**

#### **1.3.1. Delimitación geográfica**

La presente investigación se llevó a cabo en el cantón Cuenca, provincia de Azuay, donde se adquirieron las plantas de durazno.

#### **1.3.2. Delimitación sectorial**

Los ensayos se realizaron en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, Sede Cuenca.

### **1.4. Objetivos**

#### **1.4.1. Objetivo General**

- Evaluar la callogénesis *in vitro* en explantes jóvenes de durazno (*Prunus persica L*) bajo 2 protocolos de desinfección y 3 concentraciones de 2,4-D valorando las técnicas de regeneración.

#### **1.4.2. Objetivos Específicos**

- Realizar una revisión bibliográfica sobre los factores que afectan la callogénesis *in vitro* en durazno (*P. persica*), utilizando bases de datos científicas, estableciendo un marco referencial sólido para el desarrollo del experimento.
- Evaluar el efecto de 2 protocolos de desinfección y 3 concentraciones de 2,4-D en la viabilidad y respuesta de los explantes jóvenes de durazno, identificando condiciones óptimas que mejoren la eficiencia del proceso.

- Analizar los resultados experimentales mediante herramientas estadísticas determinando la influencia de los protocolos de desinfección y las concentraciones de 2,4-D en la eficiencia de la callogénesis.

### **1.5. Hipótesis**

Los protocolos de desinfección y las diferentes concentraciones de 2,4-D influyen significativamente en la inducción y crecimiento del callo en explantes jóvenes de durazno (*P. persica*), donde condiciones óptimas mejorarán la formación y calidad del callo.

## CAPÍTULO 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1. Durazno (*P. pérsica*)

El durazno, una fruta de la familia Rosaceae (ver Tabla 1 y Figura 1), se cultiva principalmente en regiones de clima templado y tiene una gran demanda en el mercado internacional, siendo la tercera fruta más importante de climas templados después de la manzana y la pera (Manganaris y colaboradores, 2022). Más del 90% de su producción mundial se consume en fresco y sus frutos destacan por su contenido de vitamina C, así como por la presencia de carbohidratos como fructosa, sorbitol, glucosa y sacarosa, además de ácidos como el oxálico, cítrico, isocítrico, málico, fumárico y shikímico (Nowicka y colaboradores, 2019).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del Durazno (*P. pérsica*).

<b>Reino</b>	<b>Plantae</b>
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Género	<i>Prunus</i>
Especie	<i>Persica</i> (L.) Batsch.

Fuente: Sagarpa, (2006) citado en Espinoza-Lázaro y Rincón-Rosales, (2015).



Figura 1. Durazno (*P. Pérsica*)  
Fuente: (Bessica Piante, n.d.)

## 2.2. Callogénesis

La callogénesis es el proceso mediante el cual se genera un tejido de callo, compuesto por células no diferenciadas, a partir de un explante vegetal en condiciones de laboratorio. Este fenómeno es estimulado por la acción de reguladores de crecimiento vegetal, como las auxinas, en un medio de cultivo apropiado (Sidek y colaboradores, 2022).

Se reconoce ampliamente que las células madre en tejidos animales tienden a diferenciarse en células específicas que conforman los tejidos definitivos, no obstante, en los tejidos vegetales, se cree que las células ya diferenciadas poseen la capacidad de desdiferenciarse, permitiendo la regeneración del tejido dañado o incluso de la planta completa. Además, se considera que pueden formar células de callo con potencial totipotente. Sin embargo, un concepto más reciente plantea que las células vegetales no se desdiferencian, sino que el callo se origina a partir de células madre ya presentes en la planta (Efferth, 2019).

El callo puede generarse a partir de diversos tipos de explantes, tanto meristemáticos como no meristemáticos, y es fundamental para la formación de embriones de *novo* o el desarrollo de órganos, lo que lo convierte en una base clave para la Biotecnología Vegetal. La inducción de callos está influenciada por múltiples factores, como el tipo de medio de cultivo, los reguladores de crecimiento, incluidas las vitaminas y fitohormonas, el tipo y edad del explante, además de condiciones extrínsecas como la temperatura, humedad y luz. En cuanto a las fitohormonas, las más utilizadas en este proceso son las auxinas, como el 2,4-D y el NAA, así como las citoquininas, como el BAP y la kinetina (Sarabandi y colaboradores, 2024).

### **2.3 Importancia de la Micropropagación en el Durazno (*P. persica*)**

La micropropagación del durazno es crucial para mejorar la diversidad genética, mejorar el rendimiento de los cultivos y garantizar la disponibilidad de material de plantación de alta calidad. Este enfoque biotecnológico permite la producción rápida y eficiente de plantas libres de enfermedades, lo cual es esencial para el cultivo comercial de durazno (Marín y colaboradores, 2023).

Se consideran algunas ventajas de la micropropagación descritas a continuación:

- **Multiplicación rápida:** la micropropagación permite la producción a gran escala de plantas de alta calidad en poco tiempo, asegurando un suministro constante de material de siembra de alta calidad (Shahzad y colaboradores, 2017).
- **Uniformidad genética:** esta técnica garantiza una multiplicación fiel al tipo, rápida y a gran escala, que mantenido rasgos deseables a través de generaciones, cruciales para mantener la calidad en huertos comerciales (Gosal y Wani, 2018).
- **Manejo de enfermedades:** al utilizar el cultivo *in vitro*, los productores pueden producir plantas libres de enfermedades, lo que reduce el riesgo de pérdida de

cultivos debido a la infección por agentes causantes de enfermedades (Gosal y Wani, 2018).

Si bien la micropropagación ofrece numerosos beneficios, es esencial considerar los desafíos potenciales, como los altos costos asociados con la instalación de instalaciones de cultivo de tejidos y la necesidad de personal capacitado para gestionar los procesos de manera efectiva (Marín y colaboradores, 2023).

#### **2.4. Desinfección en el cultivo *in vitro***

La desinfección desempeña un papel crucial en el éxito de los cultivos *in vitro* al minimizar la contaminación microbiana, que puede obstaculizar gravemente el crecimiento y desarrollo del tejido vegetal. Los protocolos de desinfección eficaces son esenciales para establecer condiciones asépticas, mejorando así la viabilidad de los explantes y el éxito general de la micropropagación (Eliwa y colaboradores, 2024). Según Samiei y colaboradores, (2017), en estudios iniciales de micropropagación, la falta de desinfección adecuada puede resultar en un 100% de contaminación, lo que subraya la necesidad de protocolos de esterilización rigurosos para garantizar un entorno aséptico y maximizar las tasas de éxito en la propagación de plantas. Además, cada especie puede requerir métodos específicos de desinfección debido a la variabilidad en la susceptibilidad a la contaminación.

El establecimiento de un cultivo aséptico es crucial para el éxito del cultivo de tejidos vegetales. Una desinfección eficaz minimiza los riesgos de contaminación por microorganismos, lo que favorece el desarrollo óptimo de callos y plántulas, sin embargo, los protocolos de desinfección deben ser cuidadosamente ajustados a cada especie y tipo de tejido, ya que diferentes explantes presentan distintas sensibilidades a los agentes desinfectantes. Este enfoque personalizado es fundamental para evitar daños en los tejidos vegetales mientras se

asegura la esterilidad necesaria para el crecimiento *in vitro* (Teixeira da Silva y colaboradores, 2016).

La esterilización superficial de los explantes se lleva a cabo utilizando una variedad de desinfectantes, como hipoclorito de sodio, cloruro de mercurio, ácido bórico, etanol y peróxido de hidrógeno, entre otros. De todos ellos, el hipoclorito de sodio es el desinfectante más comúnmente empleado en la desinfección de explantes de diversas especies vegetales debido a su eficacia para eliminar contaminantes sin causar un daño significativo a los tejidos (Kaushik y colaboradores, 2022).

## **2.5. Reguladores de crecimiento vegetal**

Los reguladores de crecimiento vegetal son compuestos químicos que influyen en el desarrollo y crecimiento de las plantas, interviniendo en procesos fisiológicos como la germinación, el enraizamiento, la floración y la maduración de los frutos. Estos compuestos pueden ser de origen natural, como las auxinas, giberelinas y citoquininas, o sintético, como el 2,4-D. En el ámbito de la callogénesis *in vitro*, el 2,4-D desempeña un papel fundamental, ya que estimula la formación de callos a partir de los explantes mediante la inducción de la división celular y la dediferenciación (Jayarama y Niveshika, 2021).

## **2.6. Uso de reguladores de crecimiento vegetal en la callogénesis**

El éxito del cultivo de tejidos vegetales depende de varios factores, como los nutrientes disponibles, la síntesis de auxinas endógenas, los compuestos orgánicos y las condiciones ambientales. Según Bingsheng y colaboradores, (2019), la auxina es una de las hormonas vegetales más importantes que median las señales endógenas de desarrollo y las señales ambientales exógenas para controlar diversas respuestas de crecimiento y desarrollo de las

plantas. Como hormona vegetal, la formación de un gradiente de auxina apropiado es fundamental para su función.

El ácido 2,4-D es una auxina sintética que actúa como un herbicida sistémico postemergente, utilizado para el control selectivo de plantas de hojas anchas. Además, en bajas concentraciones, funciona como un potente regulador del crecimiento de las plantas (Özkul y colaboradores, 2016). Se utiliza ampliamente en experimentos biológicos debido a su capacidad para inducir respuestas típicas de las auxinas, como la división celular y la diferenciación de tejidos en plantas. Esta auxina sintética es fundamental en sistemas de regeneración *in vitro*, donde se emplea para promover la formación de callos, órganos o incluso embriones somáticos, dependiendo de las condiciones de cultivo. Su acción estimula la dediferenciación de las células del explante, lo que permite la formación de nuevas estructuras vegetales (Karami y colaboradores, 2023).

## **2.7. Fases de la micropropagación**

Las etapas de la micropropagación están cuidadosamente diseñadas para asegurar una multiplicación eficiente y una aclimatación exitosa de las plantas. A continuación, se describen cada una de estas fases, según lo indicado por Read y Preece, (2014), Thakur y colaboradores, (2024) y Usharani y colaboradores, (2024):

- **Etapa 0** (selección del material vegetal): esta fase inicial consiste en la selección y preparación de plantas madre sanas, que actúan como fuente de explantes para el cultivo de tejidos. La salud y la estabilidad genética de las plantas madre son determinantes para el éxito del proceso en las etapas posteriores.
- **Etapa I** (establecimiento): los explantes, como puntas de brotes o yemas axilares, se desinfectan cuidadosamente y se colocan en un medio nutritivo diseñado para

promover su crecimiento inicial. El principal objetivo de esta etapa es establecer cultivos asépticos y prevenir cualquier tipo de contaminación que pueda comprometer el desarrollo.

- **Etapa II** (multiplicación): una vez establecidos, los explantes se subcultivan repetidamente para fomentar la proliferación de brotes. Este proceso aumenta significativamente el número de plántulas disponibles. Durante esta etapa, el uso de reguladores de crecimiento puede optimizar la división y el desarrollo de los brotes.
- **Etapa III** (etapa previa al trasplante – enraizamiento): los brotes desarrollados se transfieren a un medio específico para estimular la formación de raíces. Este paso es esencial para garantizar que las plántulas estén preparadas para el trasplante. A menudo, la composición del medio se ajusta para favorecer un enraizamiento robusto.
- **Etapa IV** (aclimatación): en esta etapa final, las plántulas enraizadas se adaptan gradualmente a las condiciones ambientales naturales. Esto implica transferirlas de un ambiente *in vitro* controlado a un invernadero o al campo, permitiéndoles ajustarse a la luz natural, la temperatura y la humedad externas.

## **2.8. Factores que influyen en la micropropagación**

Varios factores influyen en el éxito de la micropropagación de las plantas, incluida la elección del medio de cultivo, los reguladores del crecimiento, el genotipo y las condiciones ambientales.

### **2.8.1. Medio de cultivo y reguladores del crecimiento**

La elección del medio de cultivo y la concentración de los reguladores de crecimiento son factores determinantes en el éxito de la micropropagación. Estudios han demostrado que el medio de Murashige y Skoog (MS), enriquecido con reguladores como el ácido naftalenacético (ANA) la benzilaminopurina (BAP), favorece significativamente la inducción de brotes en *Maytenus emarginata* (Singh-Deora, 2023).

Asimismo, los diferentes tipos y concentraciones de citoquininas también desempeñan un papel crucial, siendo la AP particularmente eficaz en combinación con otros aditivos según lo reportado por Singh-Deora, (2023).

### **2.8.2. Sistemas de inmersión temporal (SIT)**

Los sistemas de inmersión temporal (TIS, por sus siglas en inglés) representan una tecnología avanzada en la micropropagación que optimiza el contacto periódico entre los explantes y el medio de cultivo. Este enfoque mejora significativamente las tasas de proliferación y aumenta la eficiencia en la aclimatación, lo que lo convierte en una solución versátil para la propagación de diversas especies vegetales (Méndez-Hernández y Loyola-Vargas, 2024).

### **2.8.3. Genotipo y factores ambientales**

El éxito de la micropropagación está influido significativamente por el genotipo de la planta y la estación de recolección del explante. Por ejemplo, las variedades de nogal persa (*Juglans regia*) responden de manera diferencial a los protocolos de micropropagación en función de su genotipo (Yegizbayeva y colaboradores, 2021).

Además, las condiciones ambientales desempeñan un papel clave en el proceso. Factores como la preparación adecuada de las plantas madre y las condiciones fisicoquímicas

del laboratorio son determinantes para lograr una propagación eficiente y consistente (Pant y Husen, 2022).

#### **2.8.4. Desafíos**

La micropropagación enfrenta varios desafíos, entre ellos la contaminación, las variaciones somaclonales y las dificultades para lograr un enraizamiento efectivo. Sin embargo, estos problemas pueden minimizarse mediante la implementación de protocolos adaptados a las necesidades específicas de cada especie y asegurando una infraestructura de laboratorio adecuada para el control y manejo de los cultivos (Abdalla y colaboradores, 2022).

### **2.9. Contaminación de cultivos de tejidos vegetales**

La contaminación de plantas *in vitro* es un obstáculo crítico que impide el éxito de la micropropagación, al involucrar microorganismos como bacterias, hongos, mohos y levaduras. Este problema es la principal causa de pérdida de tiempo, esfuerzo y aumento de costos en los protocolos de cultivo de tejidos (PCT). La contaminación externa proviene de materiales y equipos de laboratorio, mientras que la interna se asocia con microbios endofíticos de las plantas madre. Para prevenirla, se pueden aplicar métodos de esterilización como agentes químicos (antisépticos, detergentes, cloruro de mercurio o hipoclorito de sodio), luz ultravioleta (UV), autoclave y buenas prácticas de manejo (Abdalla y colaboradores, 2022).

## **CAPÍTULO 3**

### **MARCO METODOLÓGICO**

#### **3.1. Nivel de investigación**

Se aplicó un nivel explicativo de investigación, el mismo, según Guevara-Alban y colaboradores, (2020) se encarga de buscar el porqué de los hechos mediante el establecimiento de relaciones causa-efecto.

#### **3.2. Diseño de investigación**

Se utilizó un diseño experimental. Según Hernández-Sampieri y colaboradores, (2014) este enfoque permite manipular y controlar variables con el fin de investigar su efecto sobre un fenómeno específico. En este diseño, se crean grupos de tratamiento y control, donde se aplican diferentes condiciones experimentales y se observan las respuestas resultantes.

En este estudio se manipularon variables como las concentraciones de 2,4-D y diferentes protocolos de desinfección para evaluar su influencia en la callogénesis. Los experimentos se realizaron bajo condiciones controladas, lo que facilitó una medición y análisis precisos de los resultados obtenidos.

#### **3.3. Diseño del experimento**

Se aplicó un diseño experimental puro, el mismo que según Guevara-Alban y colaboradores, (2020) permite controlar todos los factores que pudieran alterar el proceso experimental, garantizando la equivalencia de los grupos mediante la asignación aleatoria y el uso de grupos de comparación.

### 3.3.1. Factores estudiados

Se analizaron factores que podrían influir en la eficiencia del proceso de callogénesis.

A continuación, se detallan los aspectos considerados:

- Concentración de NaClO (hipoclorito de sodio): utilizado como desinfectante en dos concentraciones (2% y 2.5%).
- Concentración de 2,4-D: una hormona vegetal utilizada para inducir la callogénesis en tres niveles (0.5 mg/L, 1 mg/L, y 1.5 mg/L).

### 3.3.2. Número de tratamientos

Se diseñaron dos tratamientos (T1 y T2), cada uno combinando un nivel específico de NaClO con una concentración determinada de 2,4-D (ver Tabla 2).

### 3.3.3. Número de réplicas

Para cada tratamiento, se realizaron nueve réplicas, lo que garantizó la consistencia de los resultados y permitió realizar un análisis estadístico robusto.

Tabla 2. Diseño experimental de la callogénesis *in vitro* en explantes jóvenes de durazno.

Experimento	Tratamiento			Réplicas
	T	NaClO (%)	2,4-D	
E1	T0	0	0	3
E2		2	0	3
E3	T1	2	0.5	9
E4		2	1	9
E5		2	1.5	9
E6		2.5	0	3
E7	T2	2.5	0.5	9
E8		2.5	1	9
E9		2.5	1.5	9
<b>TOTAL</b>				<b>63</b>

### **3.4. Experimentación de laboratorio**

La experimentación de laboratorio se llevó a cabo siguiendo las directrices establecidas por Hernández-Amasifuen y colaboradores, (2021):

Se seleccionaron hojas jóvenes de plantas de durazno como explantes. Estas se lavaron inicialmente con detergente y agua corriente, asegurándose de enjuagar minuciosamente para eliminar cualquier residuo visible. A continuación, el material vegetal se trasladó a una cámara de flujo laminar, donde se llevó a cabo el proceso de desinfección. Primero, se sumergieron en alcohol al 70 % durante un minuto y, posteriormente, se sometieron a diferentes tratamientos con NaClO, según lo indicado en la Tabla 2, durante 10 minutos para cada tratamiento.

Tras el tiempo establecido de inmersión, los explantes se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril para eliminar cualquier residuo de hipoclorito. Luego, las hojas se cortaron en segmentos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>.

Los tratamientos se incubaron durante 15 días en condiciones controladas para evaluar el porcentaje de contaminación y oxidación. La cámara de incubación se mantuvo a una temperatura constante de 25 °C y en total oscuridad.

#### **3.4.1. Preparación del medio de cultivo**

Se utilizó el medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) a una concentración de 4.4 g/L, enriquecido con sacarosa como fuente de carbono, agar como agente gelificante, kinetina y distintas concentraciones de la auxina 2,4-D (ver Tabla 3). El pH del medio se ajustó a 5.7 antes de ser esterilizado en autoclave a 121 °C y 1.2 bar de presión durante 15 minutos.

Tabla 3. Componentes del medio de cultivo.

	<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
	Medio MS	2.6 g
	Sacarosa	18 g
	Agar	4.2 g
	Kinetina	600 $\mu$ L
<b>C1</b>	2,4D (0.5 mg/L)	26 $\mu$ L
<b>C2</b>	2,4D (1 mg/L)	53 $\mu$ L
<b>C3</b>	2,4D (1.5 mg/L)	79 $\mu$ L

### 3.4.2. Inducción a callogénesis

La inducción de callos se llevó a cabo colocando tres explantes en cada frasco que contenía medio de cultivo previamente esterilizado. Los tratamientos fueron incubados en una cámara de crecimiento mantenida a 25 °C y en completa oscuridad durante un periodo de 35 días. Se realizaron observaciones cada 3 días para monitorear el desarrollo y registrar el progreso del proceso de inducción de callos.

### 3.5. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Se considerará las siguientes técnicas de recolección de datos:

- **Observación directa:** se observó el crecimiento y la inducción de callos en los explantes a lo largo del tiempo. Se registró visualmente las características de los callos, como su color, textura y presencia de necrosis, así como cualquier respuesta a los tratamientos aplicados.
- **Mediciones cuantitativas:** se realizó mediciones para cuantificar parámetros específicos, como: el número de callos inducidos por explante, el tamaño de los callos, la tasa de

crecimiento de los callos en diferentes condiciones (concentraciones de 2,4-D y protocolos de desinfección).

- **Registro fotográfico:** se registró fotografías de los explantes y callos en diferentes etapas de desarrollo.

### **3.5.1. Calidad del callo**

La calidad del callo se determinó mediante observación directa en función del color, textura y presencia de necrosis. Se calificó de acuerdo con una escala propuesta que está basado en una numeración de 1 a 3 que corresponde a lo siguiente:

- **1= Calidad excelente:** presencia de un color homogéneo, con textura consistente sin presencia de oxidación y necrosis. Se clasifica con valoración en color verde (ver Tabla 4).
- **2 = Calidad aceptable:** presencia de un color amarillo intenso con tendencia a marrón, con una textura no compacta, puede presentar áreas oxidadas o con necrosis, pero mínimamente invasivas. Se clasifica con valoración en color naranja (ver Tabla 4).
- **3= Calidad deficiente:** presencia de un color marrón oscuro, con una textura blanda-esponjosa, más del 50% del área presenta necrosis con signos visibles de daño celular. Se clasifica con valoración en color rojo (ver Tabla 4).

Tabla 4. Calificación de la calidad del callo

Excelente = 1	Aceptable = 2	Deficiente = 3
		

### 3.6. Análisis estadístico

Se empleó estadística descriptiva, como el cálculo de la media, para resumir y visualizar los datos. En cuanto a la estadística inferencial, se verificaron los supuestos de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk, con el fin de determinar la aplicación de pruebas paramétricas o no paramétricas. Se realizó un análisis de varianza no paramétrico mediante Kruskal Wallis, para comparar los tratamientos de desinfección y las diferentes concentraciones de 2,4-diclorofenoxiacético, utilizando un nivel de significancia del 5%.

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Resultados

En la presente sección se detallan los resultados obtenidos del proceso experimental de la callogénesis in vitro de *Prunus persica L*, donde se incluye el análisis estadístico y figuras representativas que permiten visualizar las tendencias observadas en el experimento.

##### 4.1.1. Análisis estadístico

En el presente capítulo se exponen los resultados de laboratorio obtenidos en el proceso de desinfección e inducción de callos.

Los resultados de la prueba de Shapiro-Wilk demostró que los grupos de datos no siguen una distribución normal ( $p$ -valor  $< 0.05$ ) (ver Tabla 5), y adicionalmente, dado que el tamaño de la muestra es pequeño ( $< 30$ ) se optó por pruebas no paramétricas en los análisis posteriores.

Tabla 5. Reporte Shapiro-Wilk: grupos de datos.

Prueba estadística	Variables	p-valor
Shapiro-Wilk	NaClO (%)	2.64e-10
	2,4-D (mg/L)	2.844e-07
	Inducción de callos (%)	2.369e-11

##### 4.1.2. Desinfección del material vegetal

La concentración del NaClO en los distintos tratamientos no presentó diferencias significativas para las variables de contaminación y oxidación del material vegetal ( $p$ -valor  $> 0.05$ ; ver Tabla 6). Sin embargo, se observaron diferencias numéricas entre los tratamientos (ver Figura 2), lo que indica la posibilidad de presentar una tendencia no detectada estadísticamente, probablemente por la alta variabilidad en los grupos de datos y al número limitado de réplicas.

En la figura 2, se evidencia la influencia del NaClO en la desinfección del material vegetal, donde se demuestra que este desinfectante tiene un impacto en la reducción de la contaminación y la oxidación, sin embargo, en concentraciones más altas (2.5%) se observa un leve aumento en la contaminación y una disminución en la oxidación. Estos hallazgos indican que es importante encontrar un equilibrio mediante ajustes en la dosificación de NaClO para minimizar estos efectos.

Tabla 6. Resultado de la prueba de Kruskal-Wallis: desinfección.

Prueba estadística	P-valor	
	Contaminación	Oxidación
Kruskal-Wallis	0.174	0.0972

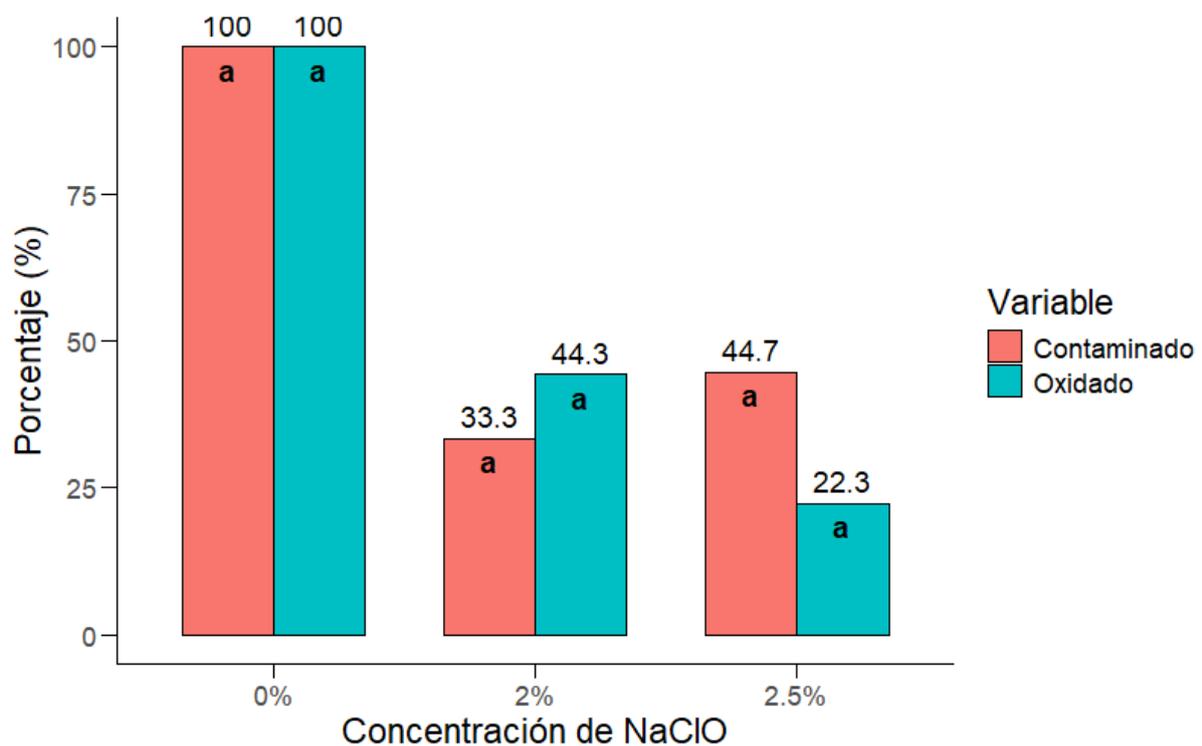


Figura 2. Diagrama de barras agrupadas: muestra la comparación de los distintos tratamientos de desinfección con NaClO: Las letras en cada barra indica la comparación estadística entre tratamientos, donde la presencia de la letra “a” en todas las barras evidencia la ausencia de diferencias significativas entre ellos.

### 4.1.3. Inducción de callos a distintas concentraciones de 2,4-D y NaClO

La prueba estadística de Kruskal-Wallis no mostró una diferencia significativa que avale que el 2,4-D en distintas concentraciones tenga un efecto sobre la inducción de callos, al igual que los distintos tratamientos de desinfección aplicados ( $p$ -valor  $> 0.05$ ). En síntesis, ninguna de las dos variables independientes (2,4-D y NaClO) en este estudio tiene un efecto significativo sobre la inducción de callos (ver Tabla 7 y Figura 3). Es probable que la pronunciada variabilidad en los grupos de datos y el número limitado de réplicas no exponga una tendencia adecuada.

Tabla 7: Inducción de callos con distintas concentraciones de 2,4-D y NaClO.

Prueba estadística	Variable	p-valor (2,4-D)	p-valor (NaClO)
Kruskal-Wallis	Inducción de callos	0.287	0.625

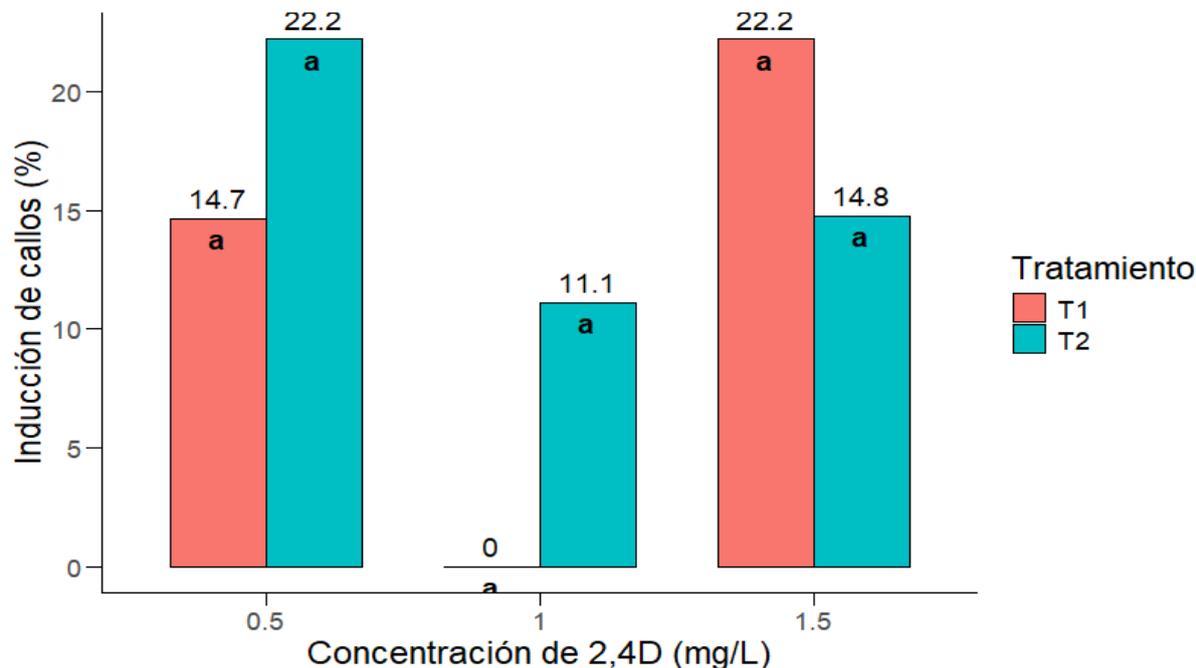


Figura 3. Inducción de callos en función de la concentración de 2,4-D, evaluada bajo dos concentraciones de NaClO. Las letras en cada barra indica la comparación estadística entre tratamientos, donde la presencia de la letra “a” en todas las barras evidencia la ausencia de diferencias significativas entre ellos.

La Figura 4 muestra la dispersión de datos en respuesta de los explantes frente a las diferentes condiciones de desinfección, evidenciando una notable variabilidad. Con una concentración del 2% de NaClO, se evidencia una mayor dispersión, con casos extremos de 0% y 100% de inducción de callos, sin embargo, a una concentración del 2.5% de NaClO, presenta una distribución más concentrada en rangos intermedios y altos.

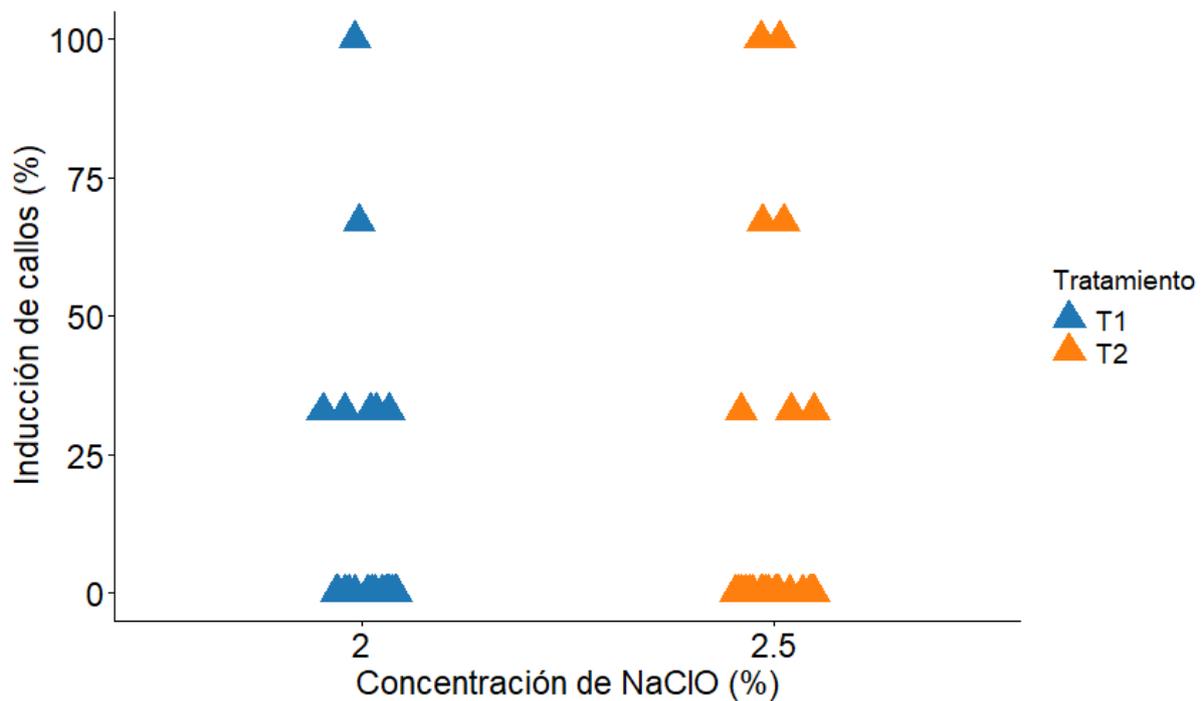


Figura 4. Diagrama de dispersión de datos: muestra la inducción de callos en función de la concentración de NaClO, considerando los dos tratamientos (T1 y T2).

En la Figura 5 se expone la dispersión de datos de las variables 2,4-D y los distintos tratamientos con NaClO que influyen en la inducción de callos. Con una concentración de 2,4-D de 1.5 mg/L y NaClO al 2% se observa una mayor inducción de callos, alcanzando un caso aislado al 100%, lo que indica una posible respuesta atípica. A concentraciones de 0.5 y 1 mg/L, la inducción es más variante, con gran cantidad de datos iguales a 0%. A una concentración de 2,4-D de 1.5 mg/L y desinfección con NaClO al 2.5% se aprecia una tendencia hacia una mayor

inducción de callos, aunque menor que en 2% de NaClO. Con una concentración de 0.5 mg/L de 2,4-D, se presentan dos casos aislados con el 100% de inducción.

Estadísticamente no existe una diferencia significativa entre las concentraciones de 2,4-D y NaClO (ver Tabla 7). Evidentemente, existe una variabilidad considerable entre los tratamientos, lo que podría depender de otros factores experimentales. Sin embargo, mediante el análisis gráfico, estos resultados dejan en evidencia que la concentración de 1.5 mg/L de 2,4-D, es más eficaz en el desarrollo de los callos, demostrando una mejor respuesta, esto es, que el nivel de la auxina aplicado favorece de mejor manera el proceso de callogénesis.

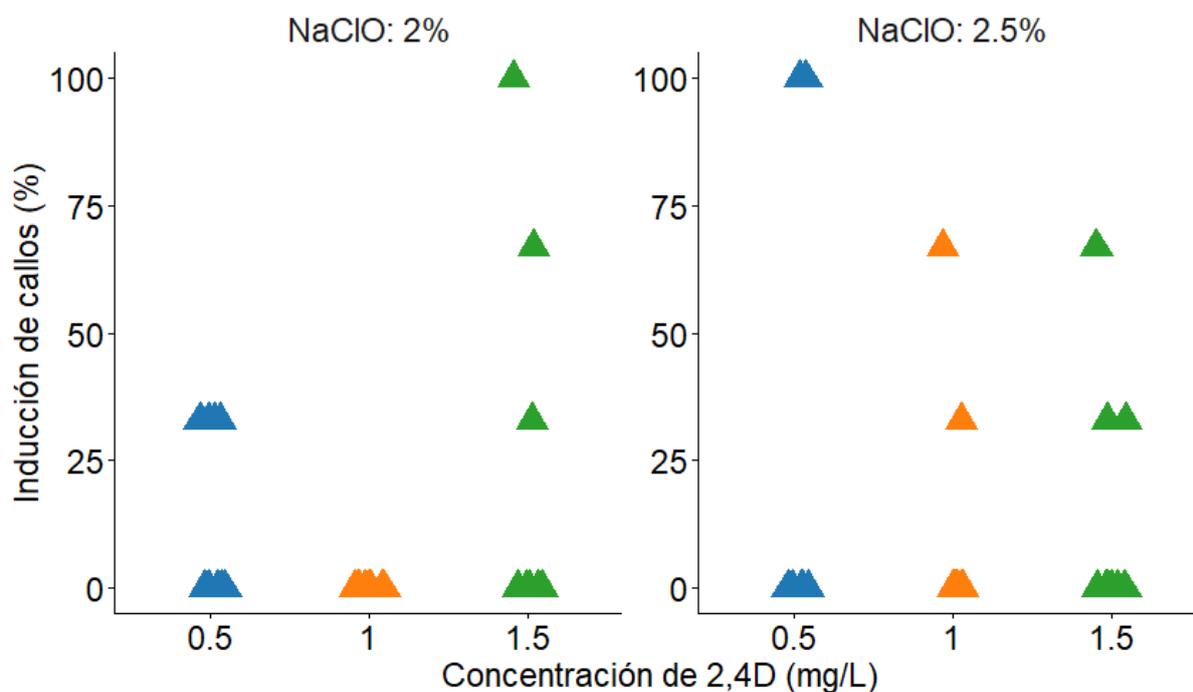


Figura 5. Diagrama de dispersión de datos: muestra la variabilidad de respuesta de la inducción del callo a diferentes concentraciones de 2,4-D y NaClO.

#### 4.1.4. Calidad del callo

El callo mostró un aspecto bien definido entre los 30 y 31 días a partir de su inoculación, con una tasa de crecimiento que estuvo en un rango de 0.2 y 0.5 mm/día (ver Anexo 1).

Los callos presentaron mejores resultados en cuanto al color a mayores concentraciones de 2,4-D y con NaClO al 2.5%. La necrosis es una de las variables más afectadas por las condiciones del experimento, con calificaciones que varían de “Aceptable” a “Deficiente”. La “textura” obtuvo resultados alentadores, similares a los del “color”, destacando la calificación “Excelente” con el tratamiento de NaClO al 2.5% y 1.5 mg/L de 2,4-D (ver Figura 6). A lo mencionado anteriormente y en base a lo descrito en la sección 3.5, las características de un callo “excelente” corresponde a un color uniforme con textura compacta y con mínima presencia de necrosis (ver Anexo 2).

En síntesis, la combinación de NaClO al 2.5% con 1.5 mg/L de 2,4-D presenta una buena calidad de callo en función del color, necrosis y textura. Las concentraciones más bajas de 2,4-D y el uso de NaClO al 2% se relacionan con un mayor deterioro de la calidad.

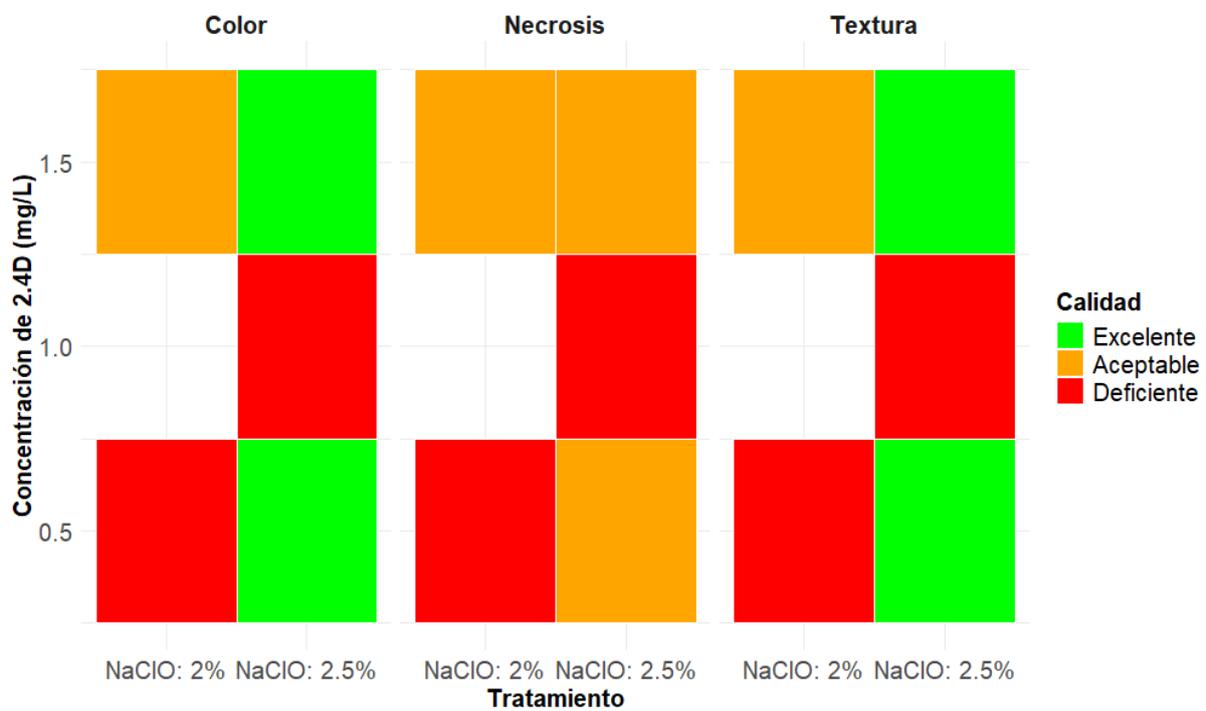


Figura 6. Calidad del callo en función del color, necrosis y textura.

## 4.2. Discusión

La presente investigación evaluó la callogénesis *in vitro* en explantes jóvenes de durazno (*Prunus pérsica* L.) bajo 2 protocolos de desinfección y 3 concentraciones de 2,4-D valorando las técnicas de regeneración, donde se ha rescatado hallazgos importantes.

La concentración del NaClO en los distintos tratamientos no presentó diferencias significativas ( $p$ -valor  $> 0.05$ ) para las variables de contaminación y oxidación del tejido vegetal, sin embargo, se observó diferencias numéricas entre los tratamientos evidenciando que el NaClO al 2% tiene impacto en la reducción de la contaminación y la oxidación. En este sentido Hernández-Amasifuen y colaboradores (2021), Eliwa y colaboradores (2024) y Guo y colaboradores (2020) coinciden que el NaClO en la desinfección del material vegetal es efectivo, siempre y cuando se tome en cuenta la concentración y tiempo de exposición, considerando que niveles muy bajos de NaClO podrían ser insuficientes en la eliminación de microorganismos patógenos, y, por el contrario, niveles muy altos, pueden producir daños al tejido vegetal.

Las distintas concentraciones de 2,4-D no mostraron diferencia significativa ( $p$ -valor  $> 0.05$ ) en la inducción de callos. No obstante, la concentración correspondiente a 1.5 mg/L de 2,4-D presenta una tendencia numérica mayor, sugiriendo ser la más efectiva en este estudio para la inducción de callos. Estos hallazgos son consistentes con los resultados de Hernández-Amasifuen y colaboradores (2021) donde, con una concentración de 1 mg/L de 2,4-D lograron un 100% de inducción de callos. En este contexto, Özkul y colaboradores (2016) enfatizan que el 2,4-D como regulador de crecimiento vegetal en los medios de cultivo, puede estimular la división celular, el agrandamiento de los explantes promoviendo la formación y el crecimiento de callos.

En este estudio, los callos desarrollados mostraron un aspecto bien definido entre los 30 y 31 días a partir de su inoculación, con una tasa de crecimiento entre 0.2 y 0.5 mm/día. Los callos mostraron resultados favorables como respuesta a 1.5 mg/L de 2,4-D, evidenciando un destacado color homogéneo, con textura consistente sin presencia de oxidación y necrosis. Según Dhiya Nabilla Ardhani y colaboradores (2024) y Kochkin y colaboradores (2020) destacan que las concentraciones bien definidas de 2,4-D promueven la formación de callos de excelente calidad, donde el estrés oxidativo es mínimo y promueven un desarrollo uniforme de este.

En este contexto, la presente investigación constituye un aporte fundamental al desarrollo de metodologías óptimas para el desarrollo de callogénesis del durazno. Además, es importante resaltar que, en base a los resultados obtenidos, es evidente una pronunciada variabilidad en los grupos de datos, sugiriendo que estos deben analizarse con prudencia, considerando que el número limitado de réplicas podría ser un factor que aporte a la fiabilidad de las tendencias observadas.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

La revisión de la literatura en este estudio fue fundamental para identificar los factores que intervienen en la callogénesis *in vitro* de durazno, con especial atención en las concentraciones óptimas del regulador de crecimiento como es el 2,4-D. Los resultados de este estudio corroboran la importante de implementar metodologías accesibles, brindando un marco referencial para futuras investigaciones.

Los protocolos de desinfección y las concentraciones de la auxina aplicados evidenciaron que la concentración de 2% de NaClO y 1.5 mg/L de 2,4-D mostraron una tendencia numérica favorable, pese a que estadísticamente no hubo diferencias significativas en la inducción de callos. Estos resultados coinciden con investigaciones previas donde se destaca al 2,4-D como un regulador de crecimiento de callos efectivo.

El análisis estadístico realizado, mostró una variabilidad en los grupos de datos posiblemente debido al número limitado de réplicas, no permitiendo observar una tendencia bien definida. Sin embargo, el análisis gráfico, permitió definir los protocolos de desinfección y las concentraciones de 2,4-D que tuvieron un impacto positivo en la formación de callos.

#### 5.2. Recomendaciones

Para futuras investigaciones en esta línea de investigación, es necesario considerar un número mayor de réplicas en el experimento, permitiendo de esta forma obtener resultados más robustos a fin de poder extrapolar los efectos de los distintos tratamientos. Asimismo, es importante tener en cuenta la optimización de los recursos, considerando que a mayor número de réplicas implicaría un costo mayor en términos de materiales e insumos de laboratorio.

## REFERENCIAS

- Abdalla, N., El-Ramady, H., Seliem, M. K., El-Mahrouk, M. E., Taha, N., Bayoumi, Y., Shalaby, T. A., & Dobránszki, J. (2022). An Academic and Technical Overview on Plant Micropropagation Challenges. *Horticulturae*, 8(8), 677. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8080677>
- Bessica Piante. (n.d.). *Prunus Persica Percoca Andros V24 - Frutcert - (pesco)*. Bessica Piante - Societa Agricola. Retrieved December 25, 2024, from <https://www.bessicapiante.it/it/catalogo/prunus-persica-percoca-andros-v24-frutcert-pesco-4436>
- Bingsheng, L., Zhenwei, Y., Huiyu, T., Xiansheng, Z., & Zhaojun, D. (2019). Local Auxin Biosynthesis Mediates Plant Growth and Development. *Trends in Plant Science*, 24(1), 6–9. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.10.014>
- Declerck, V., & Korban, S. S. (1996). Influence of growth regulators and carbon sources on callus induction, growth and morphogenesis from leaf tissues of peach (*Prunus persica* L. Batsch). *Journal of Horticultural Science*, 71(1), 49–55. <https://doi.org/10.1080/14620316.1996.11515381>
- Dhiya Nabilla Ardhani, Maharijaya, A., & Megayani Sri Rahayu. (2024). Callus formation response from immature male flower explant of plantain banana (*Musa acuminata* x *Musa balbisiana* cv. Kepok) treated by 2,4-D and BAP. *Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy)*, 52(1), 101–109. <https://doi.org/10.24831/jai.v52i1.49008>
- Efferth, T. (2019). Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. *Engineering*, 5(1), 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006>
- Eliwa, G. I., El-Dengawy, E.-R. F., Gawish, M. S., & Yamany, M. M. (2024). Comprehensive study on in vitro propagation of some imported peach rootstocks: in vitro explant surface sterilization and bud proliferation. *Scientific Reports*, 14(1), 5586. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55685-3>
- Espinoza-Lázaro, R., & Rincón-Rosales, R. (2015). *CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS SUELOS DEL CULTIVO DE DURAZNO (Prunus persica) DE LA COMUNIDAD EL DURAZNAL*,

MUNICIPIO DE SAN CRISTÓBAL DE LAS CASAS, CHIAPAS [Tesis]. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

Fawzia, Gh. Z. (2020). An efficient protocol for in vitro propagation of purple-leaf plum (*Prunus cerasifera*). *Egyptian Journal of Agricultural Research*, 3(98), 435–451. <https://lc.cx/JvOd3J>

Gosal, S. S., & Wani, S. H. (2018). Cell and Tissue Culture Approaches in Relation to Crop Improvement. In *Biotechnologies of Crop Improvement, Volume 1* (pp. 1–55). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-78283-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-78283-6_1)

Guevara-Alban, G. P., Verdesoto-Arguello, A. E., & Castro-Molina, N. E. (2020). Metodologías de investigación educativa (descriptivas, experimentales, participativas, y de investigación-acción). *RECIMUNDO*, 3(4), 163–173. [https://doi.org/10.26820/recimundo/4.\(3\).julio.2020.163-173](https://doi.org/10.26820/recimundo/4.(3).julio.2020.163-173)

Guo, G., Park, Y. G., Wei, H., Zhao, J., & Jeong, B. R. (2020). Establishment of methods of disinfection and callogenesis from needle explants of *Abies koreana*. *Acta Horticulturae*, 1291, 301–308. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1291.35>

Hasnain, A., Naqvi, S. A. H., Ayesha, S. I., Khalid, F., Ellahi, M., Iqbal, S., Hassan, M. Z., Abbas, A., Adamski, R., Markowska, D., Baazeem, A., Mustafa, G., Moustafa, M., Hasan, M. E., & Abdelhamid, M. M. A. (2022). Plants in vitro propagation with its applications in food, pharmaceuticals and cosmetic industries; current scenario and future approaches. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1009395>

Hernández-Amasifuen, A. D., Cortez-Lázaro, A. A., Argüelles-Curaca, A., & Díaz-Pillasca, H. B. (2021). Callogénesis in vitro de durazno (*Prunus persica* L.) var. Huayco rojo a partir de explantes foliares. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 23(1), e2032. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol23\\_num1\\_art:2032](https://doi.org/10.21930/rcta.vol23_num1_art:2032)

Hernández-Sampieri, R., Fernández-Collado, C., & Baptista-Lucio, P. (2014). *Metodología de la investigación* (S. Méndez-Valencia & C. Mendoza-Torres, Eds.; 6th ed.). McGRAW-HILL / Interamericana Editores, S.A. de C.V.

- Jayarama, R., & Niveshika. (2021). Plant Growth Regulators Used For In Vitro Micropropagation Of Orchids: A Research Review. *International Journal of Biological Research*, 8(1).  
<https://www.researchgate.net/publication/348677667>
- Karami, O., de Jong, H., Somovilla, V. J., Villanueva Acosta, B., Sugiarta, A. B., Ham, M., Khadem, A., Wennekes, T., & Offringa, R. (2023). Structure–activity relationship of 2,4-D correlates auxinic activity with the induction of somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 116(5), 1355–1369. <https://doi.org/10.1111/tpj.16430>
- Kaushik, P., Sansanwal, R., & Sharma, R. (2022). Comparative analysis of the in-vitro effects of various sterilization techniques and different disinfectants on the micropropagation of explants of *Asparagus Racemosus*. *International Journal of Health Sciences*, 11288–11294.  
<https://doi.org/10.53730/ijhs.v6nS3.8640>
- Kochkin, D. V., Tomilova, S. V., Galishev, B. A., Klyushin, A. G., & Nosov, A. M. (2020). Obtainment and Phytochemical Screening of Callus and Suspension Cell Cultures of *Phlojodicarpus sibiricus* (Steph. ex Spreng.) K.-Pol. *Biotekhnologiya*, 36(5), 54–61. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-5-54-61>
- Kulak, V., Longboat, S., Brunet, N. D., Shukla, M., & Saxena, P. (2022). In Vitro Technology in Plant Conservation: Relevance to Biocultural Diversity. *Plants*, 11(4), 503.  
<https://doi.org/10.3390/plants11040503>
- Kumari, N., Gupta, A., Pandey, B. C., Kushwaha, R., & Yaseen, M. (2023). In Vitro Cultures: Challenges and Limitations. In *Plants for Immunity and Conservation Strategies* (pp. 371–383). Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-99-2824-8\\_17](https://doi.org/10.1007/978-981-99-2824-8_17)
- Manganaris, G. A., Minas, I., Cirilli, M., Torres, R., Bassi, D., & Costa, G. (2022). Peach for the future: A specialty crop revisited. *Scientia Horticulturae*, 305, 111390.  
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111390>

- Marín, J. A., García, E., Lorente, P., Andreu, P., & Arbeloa, A. (2023). Assessing Effect of Rootstock Micropropagation on Field Performance of Grafted Peach Varieties by Fitting Mixed-Effects Models: A Longitudinal Study. *Plants*, *12*(3), 674. <https://doi.org/10.3390/plants12030674>
- Méndez-Hernández, H. A., & Loyola-Vargas, V. M. (2024). *Plant Micropropagation and Temporary Immersion Systems* (pp. 35–50). [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3954-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3954-2_3)
- Mitrofanova, I., Lesnikova-Sedoshenko, N., Mitrofanova, O., Smykov, A., & Chelombit, S. (2020). Comparative Studies of In Vitro Regeneration Capacity in Some Breeding Forms of *Prunus persica* (L.) Batsch. *BIO Web of Conferences*, *24*, 00055. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20202400055>
- Mitrofanova, O., Mitrofanova, I. V., Kuzmina, T. N., Lesnikova-Sedoshenko, N. P., & Dolgov, S. V. (2019). In vitro adventitious shoot regeneration from leaf explants of some apricot cultivars. *Ciência e Agrotecnologia*, *43*. <https://doi.org/10.1590/1413-7054201943001319>
- Nowicka, P., Wojdyło, A., & Laskowski, P. (2019). Principal component analysis (PCA) of physicochemical compounds' content in different cultivars of peach fruits, including qualification and quantification of sugars and organic acids by HPLC. *European Food Research and Technology*, *245*(4), 929–938. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03233-z>
- Özkul, M., Özel, Ç. A., Yüzbaşıoğlu, D., & Ünal, F. (2016). Does 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) induce genotoxic effects in tissue cultured *Allium* roots? *Cytotechnology*, *68*(6), 2395–2405. <https://doi.org/10.1007/s10616-016-9956-3>
- Pant, M., & Husen, A. (2022). Micropropagation in mature trees by manipulation of phase change, stress, and culture environment. In *Environmental, Physiological and Chemical Controls of Adventitious Rooting in Cuttings* (pp. 421–437). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90636-4.00002-7>
- Read, P. E., & Preece, J. E. (2014). Cloning: Plants – Micropropagation/Tissue Culture. In *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems* (pp. 317–336). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00224-2>

- Saleem, Y., Emad, M. Z., Ali, A., & Naz, S. (2022). Synergetic Effect of Different Plant Growth Regulators on Micropropagation of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) by Callogenesis. *Agriculture*, *12*(11), 1812. <https://doi.org/10.3390/agriculture12111812>
- Samiei, L., Aghdaei, M., & Reza-Vessal, S. (2017). Control of In Vitro Contamination in *Dionysia tapetodes* for Effective Micropropagation. *Journal of Ornamental Plants*, *7*(4), 223–228.
- Sarabandi, M., Singh, R. K., Kalantari, S., Shokrpour, M., Naresh, R., & Rafiee, S. (2024). Unveiling machine learning's impact on in vitro callogenesis optimization in *Crocus sativus* L. *South African Journal of Botany*, *168*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.02.053>
- Shahzad, A., Parveen, S., Sharma, S., Shaheen, A., Saeed, T., Yadav, V., Akhtar, R., Ahmad, Z., & Upadhyay, A. (2017). Plant Tissue Culture: Applications in Plant Improvement and Conservation. In *Plant Biotechnology: Principles and Applications* (pp. 37–72). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-2961-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-10-2961-5_2)
- Sidek, N., Nulit, R., Kong, Y. C., Yien, C. Y. S., Sekeli, R., & EL-Barghathi, M. F. (2022). Callogénesis y embriogénesis somática de *Oryza sativa* L. (cv. MARDI Siraj 297) bajo la influencia del ácido 2, 4-diclorofenoxiacético y la kinetina. *AIMS Agriculture and Food*, *7*(3), 536–552. <https://doi.org/10.3934/agrfood.2022033>
- Singh-Deora, N. (2023). Factors Affecting Micropropagation of *Maytenus Emarginata*: A Plant of Stressed Ecosystem. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, *12*(5), 1131–1132. <https://doi.org/10.21275/MR23513112038>
- Teixeira da Silva, J. A., Winarto, B., Dobránszki, J., Cardoso, J. C., & Zeng, S. (2016). Tissue disinfection for preparation of *Dendrobium* in vitro culture. *Folia Horticulturae*, *28*(1), 57–75. <https://doi.org/10.1515/fhort-2016-0008>

- Thakur, S., Shruti, Hashmi, S., Mishra, S., Ekka, S. K., Kushwaha, A., & Kujur, R. (2024). A Review on Plant Tissue Culture. *Asian Journal of Biology*, 20(2), 14–18. <https://doi.org/10.9734/ajob/2024/v20i2387>
- Usharani, T. R., Chandrashekar, N., & Pooja, R. (2024). *Crucial stages and process for successful banana micropropagation through plant tissue cultutre techniques*. <https://doi.org/10.35543/indiarxiv.57>
- Yegizbayeva, T. K., García-García, S., Yausheva, T. V., Kairova, M., Apushev, A. K., Oleichenko, S. N., & Licea-Moreno, R. J. (2021). Unraveling Factors Affecting Micropropagation of Four Persian Walnut Varieties. *Agronomy*, 11(7), 1417. <https://doi.org/10.3390/agronomy11071417>

## ANEXOS

### Anexo 1. Data de experimentación

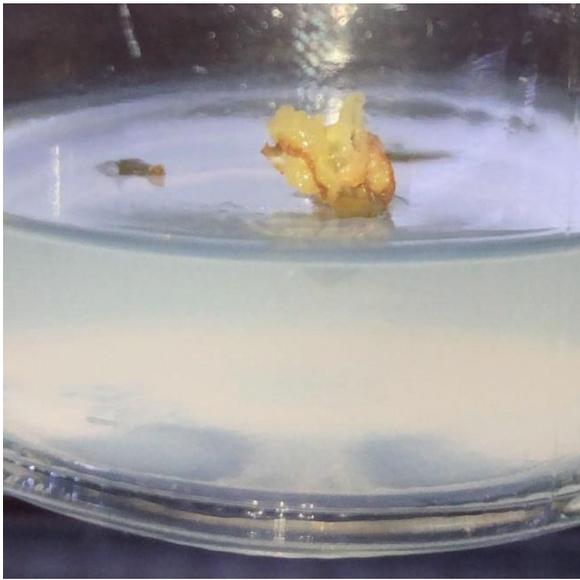
TRATAMIENTO	NaCl (%)	2,4D	RÉPLICA	TOTAL, DE EXPLANTES	NÚMERO DE EXPLANTES CON CALLO	TIEMPO DE APARICIÓN DE CALLOS (DÍAS)	TASA DE CRECIMIENTO (mm/semana)	CALIDAD DEL CALLO		
								TEXTURA	COLOR	PRESENCIA DE NECROSIS
T1	2	0.5	1	3	1	30	0.2	3	3	3
T1	2	0.5	2	3	0					
T1	2	0.5	3	3	0					
T1	2	0.5	4	3	0					
T1	2	0.5	5	3	1	31	0.2	3	3	3
T1	2	0.5	6	3	1	31	0.2	3	2	3
T1	2	0.5	7	3	0					
T1	2	0.5	8	3	0					
T1	2	0.5	9	3	1	31	0.2	2	2	2
T1	2	1	1	3	0					
T1	2	1	2	3	0					
T1	2	1	3	3	0					
T1	2	1	4	3	0					
T1	2	1	5	3	0					
T1	2	1	6	3	0					
T1	2	1	7	3	0					
T1	2	1	8	3	0					
T1	2	1	9	3	0					
T1	2	1.5	1	3	2	31	0.5	1	1	1
T1	2	1.5	2	3	0					
T1	2	1.5	3	3	0					
T1	2	1.5	4	3	0					
T1	2	1.5	5	3	0					
T1	2	1.5	6	3	0					
T1	2	1.5	7	3	3	30	0.5	3	3	3
T1	2	1.5	8	3	1	31	0.5	1	1	2
T1	2	1.5	9	3	0					
T2	2.5	0.5	1	3	0					
T2	2.5	0.5	2	3	3	30	0.5	1	1	2
T2	2.5	0.5	3	3	0					
T2	2.5	0.5	4	3	0					
T2	2.5	0.5	5	3	3	31	0.5	1	1	1

T2	2.5	0.5	6	3	0					
T2	2.5	0.5	7	3	0					
T2	2.5	0.5	8	3	0					
T2	2.5	0.5	9	3	0					
T2	2.5	1	1	3	0					
T2	2.5	1	2	3	0					
T2	2.5	1	3	3	0					
T2	2.5	1	4	3	0					
T2	2.5	1	5	3	0					
T2	2.5	1	6	3	1	30	0.5	3	3	3
T2	2.5	1	7	3	2	31	0.5	3	3	3
T2	2.5	1	8	3	0					
T2	2.5	1	9	3	0					
T2	2.5	1.5	1	3	0					
T2	2.5	1.5	2	3	0					
T2	2.5	1.5	3	3	0					
T2	2.5	1.5	4	3	1	30	0.5	1	1	1
T2	2.5	1.5	5	3	2	30	0.5	1	1	1
T2	2.5	1.5	6	3	0					
T2	2.5	1.5	7	3	1	30	0.5	2	2	3
T2	2.5	1.5	8	3	0					
T3	2.5	1.5	9	3	0					

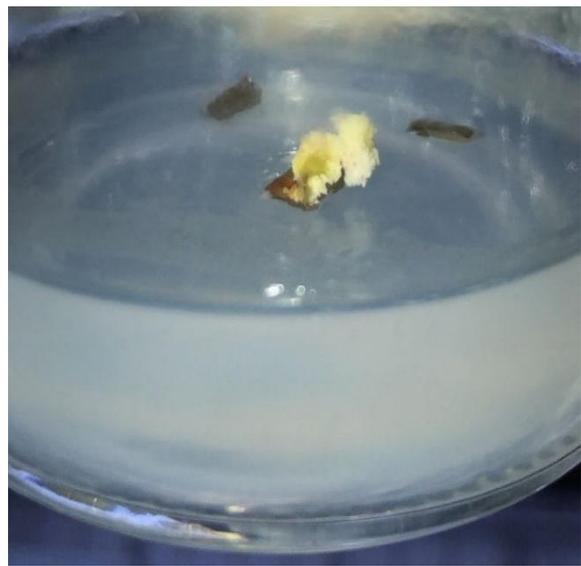
1. Nota: La evaluación de la calidad del callo se definió de la siguiente manera: 1 = Excelente, 2 = Aceptable y 3 = Deficiente.

## Anexo 2. Evidencia fotográfica

	
<p>Desinfección del material vegetal</p>	<p>Inoculación de explantes</p>
	
<p>Fase de crecimiento de callos</p>	<p>Callos desarrollados</p>



Callos desarrollados



Callos desarrollados