

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Propagación *in vitro* de *Ilex guayusa* y los efectos de diferentes
tratamientos de luces LED en su desarrollo.**

Kelly Nicole Zúñiga Vera

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera Biotecnóloga

Quito, 17 de diciembre de 2021

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Propagación *in vitro* de *Ilex guayusa* y los efectos de diferentes tratamientos de luces LED en su desarrollo.

Kelly Nicole Zúñiga Vera

Nombre del profesor, Título académico

María de Lourdes Torres, PhD.

Sofia Carvalho, PhD.

Quito, 17 de diciembre de 2021

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Kelly Nicole Zúñiga Vera

Código: 00202209

Cédula de identidad: 1723707392

Lugar y fecha: Quito, 17 de diciembre de 2021

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

AGRADECIMIENTOS

Todo este trabajo ha sido el fruto de un esfuerzo conjunto. Agradezco a toda mi familia, especialmente a mis padres Rosana y Fabián y a mis abuelitos Laura y Ángel por apoyarme siempre, creer en mí, enseñarme valores y principios que me hacen ser la persona que soy y alentarme a seguir adelante a pesar de los obstáculos y adversidades.

A mis profesoras, Lourdes y Sofia, quienes creyeron en mí y me dieron las herramientas y la oportunidad de participar en este proyecto.

Al laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ y todos los que conforman, especialmente a Mayrita, muchas gracias por toda tu ayuda y apoyo. Han sido como una segunda familia.

A mi pareja Paúl. Muchas gracias por apoyarme y alentarme en todo el transcurso de la carrera.

RESUMEN

Ilex guayusa (familia Aquifoliaceae) es una especie medicinal originaria de la Amazonía de Ecuador, Perú y Colombia. Esta especie ha sido ampliamente utilizada por varias comunidades indígenas y es actualmente una planta de gran interés en la industria, teniendo alto impacto a nivel internacional por sus potenciales propiedades medicinales y químicas. Al ser la guayusa una especie poco estudiada, existe limitada información acerca de su fotobiología y factores ambientales que podrían afectar a su desarrollo. Por lo que, la implementación de técnicas de cultivo *in vitro* podría servir como base de futuros estudios y ser una solución para la propagación de esta especie a mayor escala con un alto rendimiento, y un menor uso de recursos y espacio. El presente estudio buscó optimizar un protocolo de propagación *in vitro* de *Ilex guayusa* mediante la exposición a diferentes tratamientos de luz con combinaciones de: luz roja (R), azul (A), verde (V) y rojo lejano (RL), emitidas por fuentes LED, en dos etapas de desarrollo, brotación y elongación de los brotes. Se observó que los tratamientos que presentan luz RL a una mayor intensidad T4 (R+A+RL2) y T6 (R+A+V+ RL2) podrían influenciar a un mayor número brotes, mientras que los tratamientos T2 (R+A+V), T5 (R+A+V+ RL1) y T6 (R+A+V+ RL2), que presentan luz V, podrían inducir a una mayor elongación. No obstante, para obtener un conocimiento profundo del crecimiento y desarrollo de esta especie, se debería analizar el efecto de la luz en etapas posteriores de desarrollo como en el enraizamiento y aclimatación, así como realizar nuevos ensayos y evaluar el efecto de tratamientos de luz adicionales que usen intensidades de rojo lejano y verde más altas.

Palabras clave: *Ilex guayusa*, guayusa, cultivo *in vitro*, luz LED, brotación, elongación, fotobiología, propagación.

ABSTRACT

Ilex guayusa (family Aquifoliaceae) is a medicinal species native to the Amazon region of Ecuador, Peru, and Colombia. This species has been widely used by several indigenous communities and is currently a plant of great interest in the industry, having high impact internationally due to its potential medicinal and chemical properties. As guayusa is a poorly studied species, there is limited information about its photobiology and environmental factors that affect its development. Therefore, implementing *in vitro* culture techniques may serve as basis for future studies and could be a solution for the propagation of guayusa on a larger scale with high yields, and a lower use of resources and space. The present study sought to optimize a protocol for the *in vitro* propagation of *Ilex guayusa* by exposing it to different light treatments with combinations of: red (R), blue (B), green (G) and far red (FR), emitted by LED sources, at two developmental stages, shoot regeneration and shoot elongation. It was observed that the treatments presenting FR light at a higher intensity T4 (R+B+FR2) and T6 (R+B+G+FR2) may influence the development of a higher number of shoots, while treatments T2 (R+B+G), T5 (R+A+V+ RL1) and T6 (R+B+G+ FR2), with G light, may induce a higher shoot elongation. However, to obtain an in-depth knowledge of the growth and development of this species, the effect of light in later stages of development such as rooting and acclimatization should be analyzed, as well as carrying out new assays and evaluating the effect of additional light treatments using higher FR and G intensities.

Key words: *Ilex guayusa*, guayusa, *in vitro* culture, LED lights, shoot regeneration, elongation, photobiology, propagation.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	12
2. Metodología	16
2.1. Recolección de material vegetal.	16
2.2. Protocolo de desinfección de estacas.....	16
2.3. Medio de cultivo.	16
2.4. Tratamientos de luces y diseño experimental.....	17
2.5. Brotación, elongación y enraizamiento.....	17
a) Brotación	17
b) Elongación	17
c) Enraizamiento	18
2.6. Análisis estadístico.....	18
3. Resultados	19
3.1. Porcentaje de brotación.....	19
3.2. Elongación de los brotes.....	20
3.3. Porcentaje de necrosis	21
3.4. Enraizamiento	22
4. Discusión.....	23
5. Conclusiones	27
6. Tablas.....	28
7. Figuras	30
8. Referencias.....	32
9. Anexos.....	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos de luces y sus respectivas intensidades.....	28
Tabla 2. Porcentaje de brotación a partir de los 30 días de cultivo del ensayo 1 y 2.....	28
Tabla 3. Porcentaje de brotes separados en los ensayos 1 y 2 a los 60 y 90 días de cultivo. .	29
Tabla 4. Porcentaje de plantas con necrosis del ensayo 1 y 2.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo de un brote de guayusa a partir de una estaca de 2 cm de largo, ensayo 2, tratamiento 2. A).	30
Figura 2. Longitud de las plantas del ensayo 1 y 2.....	30
Figura 3. Plantas de guayusa adulta del invernadero de la Universidad San Francisco de Quito.....	31
Figura 4. Brotes desarrollados a los 90 días de cultivo en cada uno de los tratamientos, Ensayo 1.	31

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Composiciones del medio de cultivo de plantas leñosas modificado WPM original y WPM modificado.....	38
Anexo 2. Porcentaje de plantas con generación espontánea de raíz, número y longitud de raíces primarias y secundarias del ensayo preliminar a los 210 días.	39

1. INTRODUCCIÓN

La guayusa (*Ilex guayusa*) es miembro de la familia Aquifoliaceae originaria del noroeste de la Amazonía comprendida entre Ecuador, Perú y Colombia. Es un árbol tolerante a la sombra, de hoja perenne que se distribuye a una altitud de 0 a 1500 m.s.n.m (Jessenia *et al.*, 2019). Este árbol puede llegar a crecer hasta 30 m de altura, tiene una copa irregular con un follaje frondoso, ramas flexibles y extendidas. Las hojas color verde-oliva miden de 7 a 22 cm de largo y de 2.5 a 7 cm de ancho, y pueden ser ovaladas, elípticas, oblongas o lanceoladas, con un margen dentado o aserrado (Jessenia *et al.*, 2019; Wise & Negrin, 2020).

Los registros arqueológicos e históricos sugieren que la guayusa ha sido usada y comercializada como planta medicinal desde hace al menos 500 C.E. (Dueñas *et al.*, 2016). Estudios etnobotánicos reportan que los indígenas utilizaban la guayusa para tratar diferentes afecciones físicas, como: el dolor de estómago, fiebre, congestión respiratoria, disentería, esterilidad femenina, hiperglucemia, infecciones venéreas, y como un agente: emético, diurético, antiinflamatorio y antibacterial frente *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Bussmann *et al.*, 2010; Radice *et al.*, 2017; Castañeda *et al.*, 2016). Estudios recientes indican que esta planta se emplea como repelente de insectos, tonificador facial, y para tratar el asma y la gastritis (Dueñas *et al.*, 2016; Wise & Negrin, 2020; Saltos *et al.*, 2016). En la actualidad, *Ilex guayusa* tiene un alto valor comercial en la producción de bebidas energizantes (Brito & Jaramillo, 2013), especialmente por sus componentes químicos como teofilina, teobromina y cafeína, así como la composición de carbohidratos (fibra cruda), aminoácidos (altos niveles de alanina, glutamina y triptófano), compuestos fenólicos, y metabolitos secundarios triterpenoides (alto contenido de ácido ursólico y menor contenido de ácido oleanólico) que le otorgan propiedades fortificantes, antioxidantes, hipoglucemiantes, estimulantes, tónicos y energizantes (Wise & Negrin, 2020; Castañeda *et al.*, 2016).

Los Kichwas consideran a la guayusa como planta nacional y es un producto predominante en los sistemas agroforestales indígenas (Wise & Negrin, 2020). Actualmente, los agricultores reproducen esta planta por propagación vegetativa mediante el trasplante de esquejes en suelo arcilloso, y a un pH entre 4.34 y 5.01. En este caso, existe un control de la luz ambiental, en el que se remueven árboles aledaños para proveer una mayor luz y espacio a las plantas de guayusa durante el crecimiento temprano; y un control mecánico de maleza a lo largo del ciclo de la planta (Wise & Negrin, 2020). Como consecuencia, las técnicas de cultivo *in vitro* pueden mejorar las tasas de crecimiento de *Ilex guayusa* por medio de la optimización de condiciones de luz, humedad, pH y nutrientes (Dolce et al., 2011).

Hasta el momento, los sistemas de propagación *in vitro* se han utilizado ampliamente en la multiplicación de varias especies ornamentales, no obstante, la aplicación en especies leñosas, entre ellas *Ilex guayusa* es limitada por problemas con la oxidación de los explantes (Montes-Salazar & Sepúlveda-Jiménez, 2016). En varios estudios con especies leñosas se ha implementado el uso de medios de cultivo con los requerimientos nutricionales necesarios para su crecimiento, como el medio 1/4 Murashige and Skoog (MS), o el Woody Plant Medium (WPM), el cual contiene bajas concentraciones de sales (Martínez-Villegas et al., 2015). Así mismo, en algunos estudios se utiliza el carbón activado en el cultivo de tejidos vegetales para contrarrestar los efectos de los compuestos químicos oxidantes que conducen a la necrosis y para absorber sustancias inhibitoras en el medio de cultivo, pues se ha identificado que el carbón activado disminuye considerablemente la oxidación fenólica, promueve un pH óptimo para morfogénesis, establece un medio oscuro (simula las condiciones del suelo) y en consecuencia, mejora el crecimiento y desarrollo del material vegetal (Carvalho et al., 2021; Vaca et al., 2018).

En los bosques tropicales, los rasgos físicos o fenotipos de las plantas se relacionan con la adaptación a la disponibilidad de luz, agua y la tolerancia a la escasez de estos recursos. Los

requerimientos específicos de luz influyen a las características de los tallos y hojas. En un estudio realizado en el bosque tropical húmedo semiperennifolio de La Chonta (Bolivia), con precipitaciones anuales de 1520 mm y una altitud de 400 m, se encontró que las especies que no toleran la sombra tienen una mayor tasa de crecimiento, menor supervivencia de semillas, así como hojas con baja densidad de masa y de corta duración en comparación con especies tolerantes a la sombra (Poorter & Bongers, 2006). De igual manera, se obtuvo que con relación a plantas leñosas, los rasgos anatómicos de la madera se relacionan con los gradientes de luz y estatura de la planta, no obstante, estas relaciones pueden variar dependiendo de las condiciones climáticas (Kraft et al., 2010). Por lo tanto, la luz, su intensidad y longitudes de onda, a más de ser fuente de energía utilizada por las plantas para realizar los procesos fotosintéticos, tiene efectos específicos en el crecimiento, desarrollo, metabolismo y fisiología de las plantas. En sistemas de cultivo *in vitro*, se ha utilizado diferentes tipos de luces artificiales y lámparas fluorescentes como fuente de luz para los cultivos vegetales desde hace mucho tiempo. No obstante, las luces LED (Diodo Emisor de Luz) podrían incorporarse para modular los ambientes de luz de acuerdo a las intensidades y longitudes de onda necesarias para mejorar el crecimiento de plantas leñosas bajo condiciones controladas (Carvalho & Folta, 2014; Manivannan et al., 2017).

Las luces LED son ampliamente utilizadas como fuentes de luz en los cultivos vegetales por: su eficiencia luminosa (Ma et al., 2021), menor radiación térmica, tamaño compacto, bajo impacto ambiental, mayor vida útil, bajo consumo de energía y cualidades espectrales variadas (Manivannan et al., 2015). Los efectos de los ambientes de luz variable en las plantas dependen del momento del ciclo de vida de la planta en el que se aplican (Ma et al., 2021). Además, se ha demostrado que la luz induce una reprogramación masiva de la expresión génica en las plantas, por ejemplo, la exposición a la luz roja aumentó la actividad de la peroxidasa del ácido ascórbico (APX) y catalasa (CAT) en *Morinda citrifolia*, y de la superóxido dismutasa (SOD),

la peroxidasa (POD), la catalasa (CAT) y ácido salicílico en *Solanum lycopersicum*, en el cual condujo a una resistencia y supresión de la enfermedad causada por *Botrytis cinerea* (Petrillo et al., 2014; Ma et al., 2021; Baque et al., 2010; Xu et al., 2017).

Con relación a *Ilex guayusa*, existen limitados estudios y conocimiento acerca de la propagación e influencia de la luz (intensidad y longitud de onda) en el crecimiento y desarrollo de esta planta. En el presente estudio, se consiguió propagar eficientemente plantas de *Ilex guayusa in vitro* de acuerdo con el protocolo previamente establecido por Carvalho et al. (2021). De igual manera, al exponer a las plantas a diferentes tratamientos de luces con: luz roja, verde, azul y roja lejana con intensidades específicas, se logró determinar nuevos aspectos de la fotobiología de la guayusa, y funciones específicas de las diferentes longitudes de onda en distintas etapas de su desarrollo, cuyos detalles podrían permitir la optimización de su cultivo y crecimiento.

2. METODOLOGÍA

2.1.Recolección de material vegetal.

Se recolectaron ramas jóvenes de plantas de guayusa de dos años de edad del Invernadero del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ. Estas plantas de guayusa se obtuvieron a través de la fundación RUNA, en Tena (Ecuador).

2.2.Protocolo de desinfección de estacas

Para la desinfección de las hojas y tallos de las ramas jóvenes de guayusa, primero se realizó una limpieza superficial de las ramas con algodón y etanol al 70% seguido de lavados con agua potable hasta retirar la mayor cantidad de residuos. Posteriormente, se cortó el tallo en varias estacas (segmentos de aproximadamente 2 cm de longitud), cada una con una yema axilar y se procedió a realizar un corte transversal en el pecíolo de las hojas. Las estacas obtenidas se colocaron en una caja Petri estéril dentro de la cámara de flujo laminar para la desinfección química de las mismas. Para la desinfección, se sumergieron las estacas en etanol al 70% durante dos minutos con agitación constante. Seguido, las estacas pasaron a una solución de hipoclorito de sodio (2.5%) con cinco gotas de Tween 20 durante 25 minutos; con agitación cada cinco minutos. Finalmente, se realizó cinco lavados con agua destilada estéril para retirar cualquier residuo. Las estacas estériles se cultivaron en el medio de cultivo.

2.3.Medio de cultivo.

El medio de cultivo seleccionado (Anexo 1) para la propagación *in vitro* de guayusa fue Modified Woody Plant Medium (mWPM) suplementado con carbón activado (CA) (2g/L), el cual fue descrito por Schuchovski & Biasi (2019) y usado con éxito en guayusa por Carvalho et al. (2021). El pH del medio se ajustó a 5.8. Las estacas se cultivaron bajo condiciones

controladas a una temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ y con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad.

2.4. Tratamientos de luces y diseño experimental

Se lanzó tres ensayos de propagación *in vitro* de *Ilex guayusa* (ensayo preliminar, ensayo 1 y ensayo 2), en cada uno se realizaron siete tratamientos de luces: seis tratamientos con diferentes combinaciones de luces LED (T1, T2, T3, T4, T5 y T6) y un control o luz blanca (C). Las combinaciones de luces incluyen: Luz roja (R), luz azul (A), luz verde (V) y luz rojo lejano (RL). La combinación de luces de cada tratamiento y la intensidad correspondiente se detalla en la Tabla 1. En el ensayo preliminar se utilizó un total de 70 estacas (10 estacas por tratamiento). En los ensayos 1 y 2 se utilizó un total de 84 estacas iniciales (12 explantes por tratamiento). Cada tratamiento se ubicó en un cubículo de madera cubierto con papel aluminio. La intensidad de luz fue codificada y medida en cada cubículo con un medidor quantum de luz (Modelo MQ-620, Apogee Instruments) previamente al lanzamiento de cada ensayo.

2.5. Brotación, elongación y enraizamiento

a) Brotación

Para los análisis de brotación, a partir de los 30 días de cultivo, se realizaron registros semanales del número de estacas que desarrollaron brotes por tratamiento en cada ensayo. A partir de estos datos, se elaboró una tabla en la que el número de brotes obtenidos por estaca y por tratamiento se convirtió en porcentajes, obteniendo así, el cálculo de la eficiencia de brotación.

b) Elongación

Se realizó la medición de la longitud de brotes cada 30 días a partir del primer subcultivo de la estaca. El proceso de separación de brotes empezó a partir de los 60 días de que se inició el cultivo. Se evaluó si los brotes alcanzaron la longitud necesaria para ser

separados; aquellos brotes con una longitud mayor a 1 cm se separaron de la estaca y brotes con una longitud menor a 1 cm se volvieron a subcultivar junto a ésta. Con esta información, se elaboró una tabla con los porcentajes de brotes separados por tratamiento y por ensayo. En cada medición se empleó registros fotográficos y una regla de 20 cm como referencia de escala para medir la longitud en el programa ImageJ.

c) Enraizamiento

Solo se obtuvo datos de enraizamiento en el ensayo preliminar. Se realizó dos tipos de análisis: presencia-ausencia de raíz y longitud de las raíces primarias y secundarias a los 210 días de cultivo (Anexo 2). La guayusa no tiene sistema principal/secundario, pero se estableció este método visual de análisis para comparar la morfología de la raíz entre tratamientos. Para la medición de longitud de raíces se empleó registros fotográficos y una regla de 20 cm como referencia de escala en el programa ImageJ.

2.6. Análisis estadístico.

El análisis de los datos se realizó en el programa GraphPad Prism. Para evaluar si existe una diferencia estadísticamente significativa de la longitud de los brotes se realizó el análisis de varianza de una vía ANOVA. Se consideró significativo un valor $p < 0.05$. Se efectuó una prueba de comparación múltiple de Dunnett para identificar los tratamientos con una media de longitud de brote estadísticamente diferente al control. Finalmente, para representar gráficamente los resultados se usó diagramas Box plot.

3. RESULTADOS

La propagación *in vitro* de *Ilex guayusa*, mediante el cultivo de estacas obtenidas de plantas de guayusa, fue efectiva. La Figura 1 indica las diferentes etapas de desarrollo de un brote de guayusa. La aparición del brote se observó a partir de los 15 días de cultivo, y a los 30 días, éste alcanzó una longitud de 0.6 cm, con presencia de 2-3 hojas verde-oliva, lanceoladas y aserradas (Figura 1B). Finalmente, a los 60 días de cultivo, al medir el brote una longitud \geq 1 cm se lo separó de la estaca mediante un corte longitudinal entre la estaca y la yema axilar (Figura 1C).

3.1. Porcentaje de brotación

Se registró el porcentaje de brotación, cuyos datos fueron tomados hasta antes del comienzo de la separación de los brotes de sus respectivas estacas (hasta los 60 días de cultivo).

En el ensayo 1 (Tabla 2), los datos de brotación a los 30 días de cultivo mostraron que el tratamiento con un porcentaje más alto y que supera al control (58%) fue T2 (75%). A los 44 días, T4 fue el que presentó un porcentaje más elevado de brotación con el 92%, seguido de T2 con un 83%, superando al control (75%). Los tratamientos T2 y T4 presentaron el mayor desarrollo de brotes obteniendo el 100% de brotes a los 58 días de cultivo, seguidos por T6 (83%) que igualó al control (83%). Por otra parte, T3 y T5 con 75% y el T1 con 67% fueron los que presentaron un menor porcentaje de desarrollo de brotes. Así mismo, se obtuvo que, del total de 84 estacas cultivadas en el día 1, 70 estacas (83%) desarrollaron brotes a los 58 días de cultivo. De las estacas que no desarrollaron brotes (17%), ninguna tuvo presencia de necrosis.

Con respecto al ensayo 2 (Tabla 2), al inicio de la brotación y en la elongación de brotes, se visualizó que T3, T4 y T6 presentaron porcentajes de brotación similares y los más altos a

los 30 y 44 días, logrando el 92% de estacas con brotes y superando al control (83%). En cuanto a los 58 días de cultivo, T3 y T6 mantuvieron la misma tendencia, presentando el desarrollo del 100% de brotes, porcentaje similar al control; seguidos por el T1 y T4 que resultaron en 92% en el segundo subcultivo; mientras que T3 y T5 obtuvieron los porcentajes de brotación más bajos con 75%. Así mismo, el porcentaje de brotación total del ensayo fue alto, y de las 84 estacas cultivadas el 90% presentó brotes a los 58 días de cultivo. Del 10% de estacas que no desarrollaron brotes, el 8% presentaron indicios de necrosis.

3.2. Elongación de los brotes

Con el fin de evaluar el crecimiento de los brotes, se realizaron mediciones de longitud cada 30 días (durante cada subcultivo) (Figura 2). En cuanto a la longitud promedio de los brotes de los siete tratamientos de luz del ensayo 1, a los 30 días de cultivo los brotes mostraron una longitud de 0.23 cm en la etapa inicial de brotación, una longitud de aproximadamente el doble a los 60 días de cultivo (0.42 cm) en la fase de elongación de brotes, y de aproximadamente 0.73 cm a los 90 días de cultivo, etapa de continuo crecimiento vegetativo (Figura 2A). En los tres tiempos de medición, T2 y T6 mantuvieron los promedios más altos, alcanzando longitudes de 0.9 cm y 0.79 cm, respectivamente, a los 90 días de cultivo. Por otro lado, T3, control y T4 presentaron las medias más bajas en los tres subcultivos realizados, alcanzando a los 90 días de cultivo longitudes medias de 0.75 cm, 0.69 cm y 0.62 cm, respectivamente. En los tres subcultivos, la diferencia de las medias entre los seis tratamientos y el control tuvo una variación entre 0.01 a 0.2 cm; y estadísticamente no se obtuvo diferencias significativas. Por otra parte, el crecimiento de los brotes hasta los 60 días de cultivo permitió separar el 10% de brotes del total de estacas cultivadas, y el 33% a los 90 días. Como se visualiza, los mayores porcentajes de brotes separados pertenecen al tratamiento T2 (58%) (Tabla 3).

En cuanto a los resultados obtenidos del ensayo 2 (Figura 2B), en la etapa inicial de brotación (30 días de cultivo), la longitud de los brotes de los siete tratamientos de luz fue de 0.26 cm, aproximadamente el doble a los 60 días de cultivo (0.50 cm) en la fase de elongación de brotes, y un aumento de aproximadamente 0.15 cm a los 90 días (Figura 2B). A diferencia del ensayo 1, a los 30 días de cultivo se registró que T6 resultó en una longitud significativamente mayor en comparación al control; T6 alcanzó 0.36 cm, con una diferencia de 0.14 cm con el control (0.22 cm). En los tres subcultivos, T2, T6 y T5 se mantuvieron con los promedios de longitud más altos, obteniendo longitudes a los 90 días de cultivo de 0.79 cm, 0.72 cm, 0.64 cm, respectivamente. Por otra parte, se obtuvo que el T3 y T4 alcanzaron las longitudes medias más bajas a los 90 días de 0.62 cm y 0.48 cm, respectivamente. La diferencia entre las medias de las longitudes entre los tratamientos y el control fue entre 0.01-0.13 cm. No se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el control a los 60 y 90 días. Con relación a la separación de brotes, se separó el 8% del total de brotes a los 60 días de cultivo y el 25% a los 90 días, (Tabla 3). Todos los tratamientos obtuvieron un porcentaje similar o superior al control (17%) a los 90 días de cultivo, siendo T6 (42%) y T5 (33%) los que presentaron porcentajes más altos. Asimismo, se observó que, a los 60 días, no se separó ningún brote de T4 en los dos ensayos.

3.3. Porcentaje de necrosis

En el análisis de necrosis de las estacas (Tabla 4), se evidenció que, a los 30, 60 y 90 días de cultivo, los porcentajes de necrosis de las estacas de los ensayos 1 y 2 fueron de 2% y 10%, respectivamente a los 90 días. El proceso de necrosis se empezó a observar a partir de los 90 días del ensayo 1 y a partir de los 60 días en el ensayo 2. En los dos ensayos, T5 presentó la mayor cantidad de plantas necrosadas, con 17% en el primer ensayo y 45% en el segundo

ensayo; mientras que el control, T3 y T6 no presentaron ninguna estaca con necrosis en ningún subcultivo de los dos ensayos.

3.4.Enraizamiento

En el ensayo preliminar, a los 210 días de cultivo se observó el desarrollo de raíces espontáneas y se analizó la influencia de los tratamientos de luz en el desarrollo de raíces. Con respecto al análisis de presencia/ausencia de raíz, se obtuvo que el 37% de total de plantas desarrolló raíces espontáneas. El 71% de plantas expuestas a T5 desarrollaron raíces espontáneas, mientras que T1 obtuvo el menor porcentaje de plantas con presencia de raíces (13%). Las plantas que no desarrollaron raíces espontáneas (63%) fueron transferidas a los 210 días a un medio mWPM con la hormona Ácido Indol Butírico (IBA) a una concentración de 4.5 μ M. Con respecto a la longitud de raíces, ningún tratamiento obtuvo un promedio mayor al control.

4. DISCUSIÓN

La guayusa es una planta tradicional con varias aplicaciones medicinales y alimenticias (Radice et al., 2017). A pesar de ser una especie con una larga historia de uso, existen limitados estudios sobre varios aspectos de su desarrollo, factores que afectan a su crecimiento, fotobiología y metabolismo. El presente estudio podría facilitar el entendimiento de los mecanismos de respuesta a estímulos ambientales de *Ilex guayusa* y servir como base para futuros estudios sobre rutas metabólicas y químicas involucradas en la obtención de productos de interés en la industria alimentaria (cafeína o teobromina) o en la industria farmacéutica (actividad antimicrobiana, antimicótica y antiparásitaria) (Kapp et al., 2016; Castañeda et al., 2016).

La propagación *in vitro* de especies poco conocidas, como es el caso de *Ilex guayusa*, conlleva algunos retos. Diversos estudios de propagación *in vitro* de especies del género *Ilex* han sido previamente realizados; sin embargo, hasta el momento, únicamente un estudio establece un protocolo para la propagación *in vitro* de esta especie (Carvalho et al., 2021). Siguiendo el proceso de desinfección establecido, se obtuvo 100% de estacas estériles, las mismas que desarrollaron al menos el 83% de brotes de guayusa. El medio de cultivo utilizado, mWPM con CA (2 g/l), que se emplea frecuentemente para el cultivo de plantas leñosas por sus bajas concentraciones de sales (Martínez-Villegas et al., 2015), resultó ser efectivo para *Ilex guayusa*. Existen diversos medios de cultivo utilizados en especies leñosas; por ejemplo, ¼ MS tiene beneficios para la regeneración de brotes y disminución de necrosis (Mroginski et al., 1999). No obstante, dentro del género *Ilex* se ha encontrado mayor efectividad con el medio mWPM como el caso de *I. paraguariensis* o *I. cremata* (de Cássia Tomasi et al., 2019; Yang et al., 2015). La eficiencia de este medio puede deberse principalmente al bajo contenido de iones totales y nitrato de amonio, y alto contenido de magnesio y sulfato, compuestos que

favorecen al crecimiento de tejidos de plantas leñosas (Rahayu et al., 2019). El necrosamiento del material vegetal por la presencia de compuestos fenólicos es un factor importante que se debe considerar en el cultivo de plantas leñosas, pues se ha encontrado en *I. paraguariensis* que estos exudados afectan negativamente al proceso de enraizamiento, produciendo manchas pardas y muerte de los explantes (Tarragó et al., 2012). En consecuencia, varios estudios mencionan que WPM suplementado con antioxidantes como CA es capaz de controlar los síntomas de la necrosis e impedir la muerte del explante (Carvalho et al., 2021). El uso de este medio también fue eficiente en la propagación de *Elaeocarpus grandiflorus* (Rahayu et al., 2019). En el presente estudio, se obtuvo un reducido porcentaje de necrosis (<11%) a los 90 días (etapa final del desarrollo de los brotes) en los dos ensayos realizados. Dato que concuerda con el estudio de Carvalho et al. (2021), en donde aproximadamente el 10% de los brotes presentó necrosamiento durante la fase de elongación. Este bajo porcentaje debe tener relación con el uso del CA en el medio de cultivo debido a que este compuesto induce la liberación de algunas sustancias, desconocidas hasta el momento, que promueven el crecimiento vegetal. Asimismo, el CA produce el oscurecimiento del medio de cultivo, y la adsorción de varios iones metálicos, vitaminas y reguladores de crecimiento como etileno gaseoso y ácido abscísico, y de sustancias inhibitoras como metabolitos tóxicos y fenoles (Thomas, 2008; Vaca et al., 2018).

Con respecto a la eficiencia de brotación, los tratamientos de luz T4 (R+A+RL2) y T6 (R+A+V+ RL2) fueron los que desarrollaron un mayor número de brotes en los dos ensayos realizados; siendo estos los que presentan mayor influencia en la etapa de brotación. En un estudio de otra especie leñosa *Populus euramericana* se encontró que la combinación de luz R y luz A producía el mayor porcentaje de regeneración de brotes, en comparación con luz monocolor y fluorescente (control). (Kwon et al., 2015). En el presente estudio, todos los tratamientos utilizados presentaron la combinación de luz R y A con la misma intensidad. Sin

embargo, T4 y T6 también contenían RL con una intensidad relativamente alta ($16 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), por lo que se podría sugerir que la adición de luz RL tendría un efecto importante en el desarrollo de los brotes. Esto puede deberse a que en la naturaleza las luces R y RL afectan el desarrollo de plantas bajo el dosel, incluyendo a plantas tolerantes a la sombra como *Ilex guayusa*, e influyen en procesos como la extensión del tallo y la morfología de las hojas (Pérez-García et al., 2017).

Con relación a la elongación de los brotes, se obtuvo que, en los tres puntos de medición del crecimiento de los brotes, el T2 (R+A+V) y T6 (R+A+V+ RL2) obtuvieron los promedios más altos en los dos ensayos. Los análisis estadísticos indicaron que ningún tratamiento tuvo una media de longitud estadísticamente diferente al control en el ensayo 1, mientras que en el ensayo 2 se encontró que el T6 fue estadísticamente diferente al control a los 30 días. Sería interesante realizar nuevos ensayos para determinar si T6 promueve en realidad un crecimiento mayor en esta primera etapa de desarrollo. Estos resultados de crecimiento de los brotes y su elongación son consistentes con el estudio previo de Carvalho et al. (2021), donde se observó que hasta el cuarto subcultivo (120 días) no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes tratamientos de luces LED y el control. Otro factor que también pudo tener un efecto en el crecimiento fue la exposición a la luz V, debido a que la mayor cantidad de brotes separados a los 60 días pertenecían a T2 (R+A+V), T5 (R+A+V+ RL1) y T6 (R+A+V+ RL2). La elongación de brotes en plantas, incluyendo plantas leñosas, está modulada por diferentes señales lumínicas como la intensidad de luz, el fotoperiodo, y la composición espectral (ejemplo, relación R:RL) (Olsen & Juntila, 2002). Por ejemplo, en una especie leñosa intolerante a la sombra (*Populus tremula x tremuloides*), el tratamiento con RL aumentó significativamente la longitud de los brotes en plantas con fenotipo enano (sobreexpresores del *phyA*) debido a que estimuló la división y extensión celular, y niveles altos de giberelina (GA). En otra especie leñosa y tolerante a la sombra del mismo género, *Populus americana*, se

observó que la luz V afectó positivamente al crecimiento de las plantas, en términos de las hojas y del alargamiento temprano del tallo (Kwon et al., 2015; Olsen & Junntila, 2002). Además, en *Alocasia odora*, tolerante a la sombra, se encontró que la luz RL alivió la fotoinhibición de PSI y aumentó la tasa de fijación fotosintética de CO₂ en un ambiente con baja luz (Terashima et al., 2021). Esto podría indicar que la combinación de luz RL y V tiene un mayor efecto en el crecimiento de brotes. Estos mecanismos de respuesta están influenciados por los fitocromos, en donde el *phyA* es el que inicia mecanismos de respuesta al RL siendo esencial para la supervivencia en la sombra del dosel (Ganesan et al., 2012; Rausenberger et al., 2011).

Finalmente, en cuanto al enraizamiento, el desarrollo de raíces espontáneas se observó a partir de los 210 días, y ningún tratamiento obtuvo una media de longitud de raíz mayor al control. Resultados que difieren de los obtenidos en un estudio previo (Carvalho et al., 2021). Esta variación puede deberse a problemas con el material vegetal, el cual presentó varias complicaciones en diferentes etapas del desarrollo: crecimiento lento, desprendimiento frecuente de hojas y un pequeño porcentaje de desarrollo de raíces espontáneas. Estas limitaciones en el crecimiento pueden estar relacionados con los mecanismos de regulación de auxina endógena; un regulador importante en organogénesis y enraizamiento (Hu et al., 2017; Olatunji et al., 2017). Por ejemplo, en algunas especies del género *Citrus*, los niveles elevados de auxina en el extremo basal de los esquejes de tallo inhiben la organogénesis de los brotes, por lo que podría pasar algo similar en las estacas de guayusa (Hu et al., 2017). Otro factor que pudo afectar es la calidad fisiológica y genética de la planta madre (da Costa et al., 2013). En *Ilex paraguariensis* se encontró que la inhibición de raíces de las estacas depende de la estación del año y de los niveles de sombra recibidos por la posición de las ramas de la planta madre, que alteran la concentración y el perfil de compuestos fenólicos y flavonoides en las estacas (Tarragó et al., 2012).

5. CONCLUSIONES

La guayusa es una planta con potenciales propiedades medicinales e industriales, por lo que es altamente relevante estudiar esta planta para conocer nuevos aspectos sobre su fotobiología y los factores que afectan a su crecimiento y metabolismo. En el presente estudio se logró propagar eficientemente esta planta obteniendo entre el 83% y 100% de brotes, en el ensayo 1 y 2, respectivamente. Los tratamientos que presentan luz RL a una mayor intensidad, T4 (R+A+RL2) y T6 (R+A+V+ RL2), podrían influenciar a un mayor número brotes, mientras que los tratamientos T2 (R+A+V), T5 (R+A+V+ RL1) y T6 (R+A+V+ RL2), que presentan luz V, podrían inducir a una mayor elongación. La luz RL podría tener un efecto significativo en la brotación y elongación de brotes de guayusa, cuyos mecanismos están regulados por *phyA*, el fotorreceptor que inicia los mecanismos de respuesta usando la luz RL cuando existe una baja cantidad de luz R incidente. Finalmente, el uso de una combinación de luz RL con luz V podrá tener un mayor efecto en crecimiento de brotes, de acuerdo con lo que se observó en T6 en los parámetros analizados.

Se recomienda realizar nuevos ensayos de este estudio para comparar los resultados obtenidos. Además, sería útil implementar y ejecutar una mayor cantidad de subcultivos para evaluar el efecto de la luz en etapas posteriores de la planta, así como utilizar tratamientos adicionales con intensidades de RL y V más altas.

6. TABLAS

Tabla 1. *Tratamientos de luces y sus respectivas intensidades.*

							
Tratamiento	Control	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 5	Tratamiento 6
Combinación de luz	Luz blanca	R+A	R+A+V	R+A+RL1	R+A+RL2	R+A+V+RL1	R+A+V+RL2
Intensidad de luz $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	50	25/25	25/25/5	25/25/4	25/25/16	25/25/5/4	25/25/5/16

Tomado de: Carvalho et al., (2021). **R**: rojo; **A**: azul; **V**: verde; **RL**: rojo lejano.

Tabla 2. *Porcentaje de brotación a partir de los 30 días de cultivo del ensayo 1 y 2.*

Ensayo 1							
Tratamiento	Número de Explantes	30 días		44 días		58 días	
		N° Brotes	%	N° Brotes	%	N° Brotes	%
C	12	7	58%	9	75%	10	83%
T1	12	7	58%	8	67%	8	67%
T2	12	9	75%	10	83%	12	100%
T3	12	8	67%	8	67%	9	75%
T4	12	8	67%	11	92%	12	100%
T5	12	5	42%	8	67%	9	75%
T6	12	5	42%	8	67%	10	83%
TOTAL	84	49	58%	62	74%	70	83%
Ensayo 2							
Tratamiento	Número de Explantes	30 días		44 días		58 días	
		N° Brotes	%	N° Brotes	%	N° Brotes	%
C	12	7	58%	10	83%	12	100%
T1	12	8	67%	10	83%	11	92%
T2	12	7	58%	9	75%	9	75%
T3	12	9	75%	11	92%	12	100%
T4	12	9	75%	11	92%	11	92%
T5	12	7	58%	9	75%	9	75%
T6	12	9	75%	11	92%	12	100%
TOTAL	84	56	67%	62	74%	76	90%

Nota: **C**: control; **T1**: tratamiento 1; **T2**: tratamiento 2; **T3**: tratamiento 3; **T4**: tratamiento 4;

T5: tratamiento 5; **T6**: tratamiento 6.

Tabla 3. Porcentaje de brotes separados en los ensayos 1 y 2 a los 60 y 90 días de cultivo.

Tratamiento	Ensayo 1				Ensayo 2			
	60 días		90 días		60 días		90 días	
	Brotos separados	%	Brotos separados	%	Brotos separados	%	Brotos separados	%
C	1 de 12	8%	6 de 12	50%	1 de 12	8%	2 de 12	17%
T1	2 de 12	17%	2 de 12	17%	1 de 12	8%	3 de 12	25%
T2	3 de 12	25%	7 de 12	58%	1 de 12	8%	2 de 12	17%
T3	0 de 12	0%	3 de 12	25%	1 de 12	8%	3 de 12	25%
T4	0 de 12	0%	6 de 12	50%	0 de 12	0%	2 de 12	17%
T5	1 de 12	8%	3 de 12	25%	1 de 12	8%	4 de 12	33%
T6	1 de 12	8%	1 de 12	8%	2 de 12	17%	5 de 12	42%
TOTAL	8 de 84	10%	28 de 84	33%	7 de 84	8%	21 de 84	25%

Nota: **C:** control; **T1:** tratamiento 1; **T2:** tratamiento 2; **T3:** tratamiento 3; **T4:** tratamiento 4;

T5: tratamiento 5; **T6:** tratamiento 6.

Tabla 4. Porcentaje de plantas con necrosis del ensayo 1 y 2.

Tratamiento	Ensayo 1						Ensayo 2					
	30 días		60 días		90 días		30 días		60 días		90 días	
	Necrosis	%										
C	0 de 12	0%										
T1	0 de 12	0%	2 de 12	17%	2 de 12	17%						
T2	0 de 12	0%	1 de 12	8%								
T3	0 de 12	0%										
T4	0 de 12	0%	1 de 12	8%								
T5	0 de 12	0%	0 de 12	0%	2 de 12	17%	0 de 12	0%	5 de 12	42%	5 de 12	42%
T6	0 de 12	0%										
TOTAL	0 de 84	0%	0 de 84	0%	2 de 84	2%	0 de 84	0%	7 de 84	8%	9 de 84	10%

Nota: **C:** control; **T1:** tratamiento 1; **T2:** tratamiento 2; **T3:** tratamiento 3; **T4:** tratamiento 4;

T5: tratamiento 5; **T6:** tratamiento 6.

7. FIGURAS

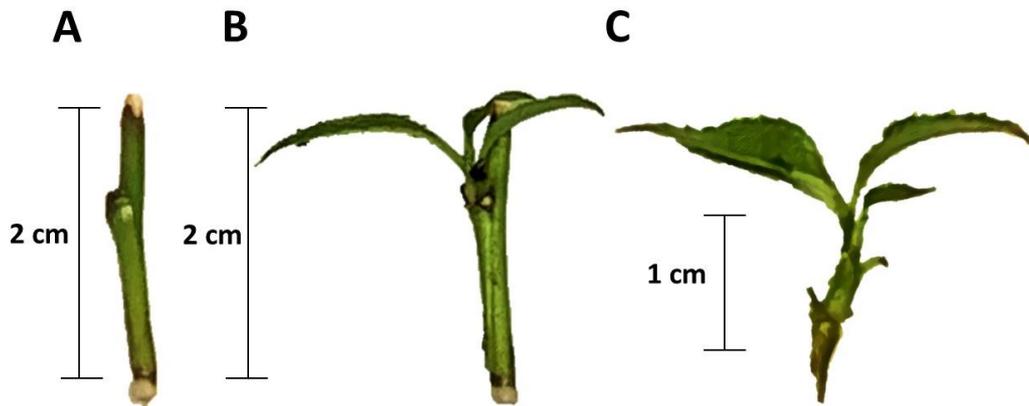


Figura 1. Desarrollo de un brote de guayusa a partir de una estaca de 2 cm de largo, ensayo 2, tratamiento 2. A). Cultivo de la estaca día 1, B). Desarrollo del brote a los 30 días de cultivo. C). Separación de brote a los 60 días de cultivo.

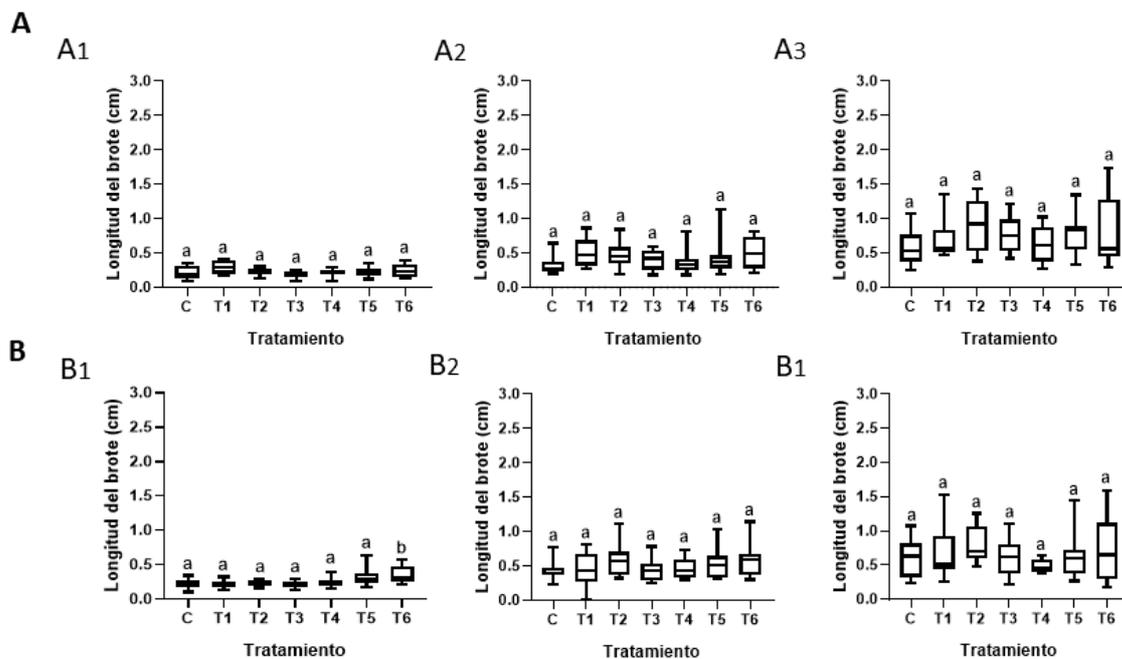


Figura 2. Longitud de las plantas del ensayo 1 y 2. A) Ensayo 1. A1 30 días de cultivo. A2, 60 días de cultivo. A3, 90 días de cultivo; means \pm s.e., $n=12$. B) Ensayo 2. B1, 30 días de

cultivo. B2, 60 días de cultivo. B3, 90 días de cultivo. means \pm s.e., $n=12$. Se realizó un análisis ANOVA, ($p < 0.05$). Se indican las diferencias entre tratamientos y control obtenidas mediante el test de Dunnett. (C: Control; T1: Tratamiento 1; T2: Tratamiento 2; T3: Tratamiento 3; T4: Tratamiento 4; T5: Tratamiento 5; T6: Tratamiento 6). *Las medias no etiquetadas con la letra a son significativamente diferentes de la media del nivel de control.*



Figura 3. *Plantas de guayusa adulta del invernadero de la Universidad San Francisco de Quito.*

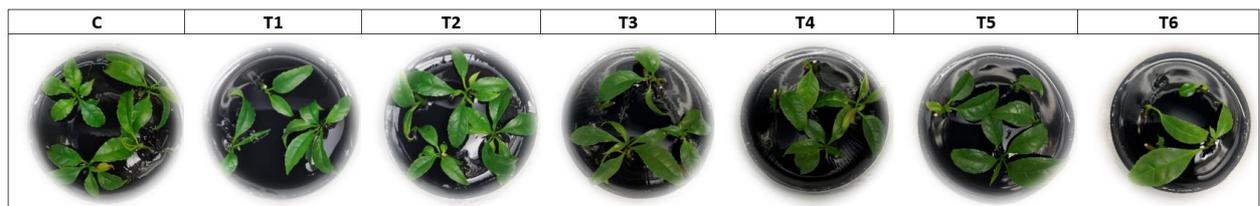


Figura 4. *Brotos desarrollados a los 90 días de cultivo en cada uno de los tratamientos, Ensayo 1.*

8. REFERENCIAS

- Baque, Md. A., Hahn, E.-J., & Paek, K.-Y. (2010). Induction mechanism of adventitious root from leaf explants of *Morinda citrifolia* as affected by auxin and light quality. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 46(1), 71–80.
<https://doi.org/10.1007/s11627-009-9261-3>
- Brito, F. M., & Jaramillo, N. (2013). *Néstor Jaramillo, Dr., Director de la Tesis*. 83.
- Bussmann, R. W., Malca-García, G., Glenn, A., Sharon, D., Chait, G., Díaz, D., Pourmand, K., Jonat, B., Somogy, S., Guardado, G., Aguirre, C., Chan, R., Meyer, K., Kuhlman, A., Townesmith, A., Effio-Carbajal, J., Frías-Fernandez, F., & Benito, M. (2010). Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 132(1), 101–108.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.048>
- Carvalho, S. D., & Folta, K. M. (2014). Sequential light programs shape kale (*Brassica napus*) sprout appearance and alter metabolic and nutrient content. *Horticulture Research*, 1(1), 8. <https://doi.org/10.1038/hortres.2014.8>
- Carvalho, S. D., Ortega, M., Orellana, M., Rodríguez, M., Folta, K. M., & Torres, M. de L. (2021). In vitro propagation of the Amazonian medicinal plant guayusa (*Ilex guayusa*) and effects of light in the growth and development of this shade tolerant plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02142-y>
- Castañeda, S., Costa, M., Celis C., Gambo, F., Gutiérrez, S & Luengas, P. (2016). *Ilex guayusa* Loes (Aquifoliaceae): Amazon and Andean Native Plant. *Pharmacologyonline*. 193-202

- da Costa, C. T., de Almeida, M. R., Ruedell, C. M., Schwambach, J., Maraschin, F. S., & Fett-Neto, A. G. (2013). When stress and development go hand in hand: Main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Frontiers in Plant Science*, *4*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00133>
- de Cássia Tomasi, J., Degenhardt-Goldbach, J., Lucia Grunennvaldt, R., Dávila dos Santos, G., Aparecida Vicente, V., Franciscon, L., Bona, C., & Quoirin, M. (2019). In vitro establishment of shoot meristems of *Ilex paraguariensis* and identification of endophytic bacteria. *Journal of Forestry Research*, *30*(5), 1765–1777. <https://doi.org/10.1007/s11676-018-0763-x>
- Dolce, N. R., Mroginski, L. A., & Rey, H. Y. (2011). Enhanced Seed Germination of *Ilex dumosa* R. (Aquifoliaceae) through In Vitro Culture of Cut Pyrenes. *HortScience*, *46*(2), 278–281. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.46.2.278>
- Dueñas, J. F., Jarrett, C., Cummins, I., & Logan–Hines, E. (2016). Amazonian Guayusa (*Ilex guayusa* Loes.): A Historical and Ethnobotanical Overview. *Economic Botany*, *70*(1), 85–91. <https://doi.org/10.1007/s12231-016-9334-2>
- Ganesan, M., Han, Y.-J., Bae, T.-W., Hwang, O.-J., Chandrasekkhar, T., Shin, A.-Y., Goh, C.-H., Nishiguchi, S., Song, I.-J., Lee, H.-Y., Kim, J.-I., & Song, P.-S. (2012). Overexpression of phytochrome A and its hyperactive mutant improves shade tolerance and turf quality in creeping bentgrass and zoysiagrass. *Planta*, *236*(4), 1135–1150. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1662-6>
- Hu, W., Fagundez, S., Katin-Grazzini, L., Li, Y., Li, W., Chen, Y., Wang, X., Deng, Z., Xie, S., McAvoy, R. J., & Li, Y. (2017). Endogenous auxin and its manipulation influence in vitro shoot organogenesis of citrus epicotyl explants. *Horticulture Research*, *4*(1), 17071. <https://doi.org/10.1038/hortres.2017.71>

- Jessenia, M., Edith, R., Hector, Z., & Darwin, P.-C. (2019). *Características anatómicas y propiedades físicas de la madera de Ilex guayusa Loes.* 9, 15.
- Kapp, R. W., Mendes, O., Roy, S., McQuate, R. S., & Kraska, R. (2016). General and Genetic Toxicology of Guayusa Concentrate (*Ilex guayusa*). *International Journal of Toxicology*, 35(2), 222–242. <https://doi.org/10.1177/1091581815625594>
- Kraft, N. J. B., Metz, M. R., Condit, R. S., & Chave, J. (2010). The relationship between wood density and mortality in a global tropical forest data set. *New Phytologist*, 188(4), 1124–1136. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03444.x>
- Kwon, A.-R., Cui, H.-Y., Lee, H., Shin, H., Kang, K.-S., & Park, S.-Y. (2015). Light quality affects shoot regeneration, cell division, and wood formation in elite clones of *Populus euramericana*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(3), 65. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1812-0>
- Ma, Y., Xu, A., & Cheng, Z.-M. (Max). (2021). Effects of Light Emitting Diode Lights on Plant Growth, Development and Traits A Meta-analysis. *Horticultural Plant Journal*, S2468014121000881. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2020.05.007>
- Manivannan, A., Soundararajan, P., Park, Y. G., Wei, H., Kim, S. H., & Jeong, B. R. (2017). Blue and red light-emitting diodes improve the growth and physiology of in vitro-grown carnations “Green Beauty” and “Purple Beauty.” *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 58(1), 12–20. doi:10.1007/s13580-017-0051-2
- Martínez-Villegas, Y. M., Andrade-Rodríguez, M., Colinas-León, M. T., Villegas-Torres, Ó. G., Castillo-Gutiérrez, A., & Alia-Tejacal, I. (2015). EFECTO DE LAS SALES INORGÁNICAS DEL MEDIO DE CULTIVO EN EL CRECIMIENTO DE PASCUITA (*Euphorbia leucocephala* Lotsy). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 38(4), 369. <https://doi.org/10.35196/rfm.2015.4.369>

- Montes-Salazar, A. M., & Sepúlveda-Jiménez, G. (2016). *Estudio preliminar para la propagación in vitro de Cedrus atlantica mediante yemas axilares** Preliminary study for in vitro propagation of *Cedrus atlantica* through axillary buds. 8.
- Mroginski, L. A., Rouvier, S. M., Fabisik, J. C., Levit, M., Marassi, M. A., Sansberro, P. A., & Rey, H. Y. (1999). Effect of medium composition and light supply on *in vitro* shoot proliferation in *Ilex paraguariensis* (Aquifolaceae). *Journal of Plant Nutrition*, 22(2), 359–368. <https://doi.org/10.1080/01904169909365633>
- Olatunji, D., Geelen, D., & Verstraeten, I. (2017). Control of Endogenous Auxin Levels in Plant Root Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2587. <https://doi.org/10.3390/ijms18122587>
- Olsen, J. E., & Junttila, O. (2002). Far red end-of-day treatment restores wild type-like plant length in hybrid aspen overexpressing phytochrome A. *Physiologia Plantarum*, 115(3), 448–457. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1150315.x>
- Pérez-García, M., Rincón, E., & Orozco-Segovia, A. (2017). Transmitancia del rojo y el rojo lejano y anatomía de las hojas de algunas especies leñosas de selva alta perennifolia. *Botanical Sciences*, 52, 79. <https://doi.org/10.17129/botsci.1405>
- Petrillo, E., Godoy Herz, M. A., Barta, A., Kalyna, M., & Kornblihtt, A. R. (2014). Let there be light: Regulation of gene expression in plants. *RNA Biology*, 11(10), 1215–1220. <https://doi.org/10.4161/15476286.2014.972852>
- Poorter, L., & Bongers, F. (2006). LEAF TRAITS ARE GOOD PREDICTORS OF PLANT PERFORMANCE ACROSS 53 RAIN FOREST SPECIES. *Ecology*, 87(7), 1733–1743. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2006\)87\[1733:LTAGPO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[1733:LTAGPO]2.0.CO;2)
- Radice, M., Scalvenzi, L., & Sablón Cossio, N. (2017). *Ilex guayusa*: A systematic review of its Traditional Uses, Chemical Constituents, Biological Activities and Biotrade Opportunities. *Proceedings of MOL2NET 2016, International Conference on*

Multidisciplinary Sciences, 2nd Edition, 3868. <https://doi.org/10.3390/mol2net-02-03868>

- Rahayu, E. S., Widiatningrum, T., Herlina, L., Hermayani, N., & Amalia, A. R. (2019). The optimal sterilizing compound and culture medium in *Elaeocarpus grandiflorus* L. *in vitro* shoot induction. *Journal of Physics: Conference Series*, 1321, 032040. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1321/3/032040>
- Rausenberger, J., Tscheuschler, A., Nordmeier, W., Wüst, F., Timmer, J., Schäfer, E., Fleck, C., & Hiltbrunner, A. (2011). Photoconversion and Nuclear Trafficking Cycles Determine Phytochrome A's Response Profile to Far-Red Light. *Cell*, 146(5), 813–825. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.023>
- Saltos, R. V. A., Vásquez, T. E. R., Lazo, J. A., Banguera, D. V., Guayasamín, P. D. R., Vargas, J. K. A., & Peñas, I. V. (2016). The use of medicinal plants by rural populations of the Pastaza province in the Ecuadorian Amazon. *Acta Amazonica*, 46(4), 355–366. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201600305>
- Schuchovski, C., & Biasi, L. (2019). In Vitro Establishment of 'Delite' Rabbiteye Blueberry Microshoots. *Horticulturae*, 5(1), 24. <https://doi.org/10.3390/horticulturae5010024>
- Tarragó, J., Filip, R., Mroginski, L., & Sansberro, P. (2012). Influence of the irradiance on phenols content and rooting of *Ilex paraguariensis* cuttings collected from adult plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(6), 2419–2424. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1009-8>
- Terashima, I., Matsuo, M., Suzuki, Y., Yamori, W., & Kono, M. (2021). Photosystem I in low light-grown leaves of *Alocasia odora*, a shade-tolerant plant, is resistant to fluctuating light-induced photoinhibition. *Photosynthesis Research*, 149(1–2), 69–82. <https://doi.org/10.1007/s11120-021-00832-4>

- Thomas, T. D. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*, 26(6), 618–631. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.08.003>
- Vaca, I., Marulanda, M., Verdesoto, J., Universidad Politécnica Salesiana, Carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales., Núñez, A., Universidad Politécnica Salesiana, Carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales., Acurio, R. D., Grupo de Investigación BIOARN. Universidad Politécnica Salesiana. Quito, Ecuador, Chiluisa-Utreras, V., & Grupo de Investigación BIOARN. Universidad Politécnica Salesiana. Quito, Ecuador. (2018). Efecto del carbón activado en la germinación y brotación in vitro de Citrus limon (L.) y su dinámica de crecimiento. *Bionatura*, 3(3). <https://doi.org/10.21931/RB/2018.03.03.5>
- Wise, G., & Negrin, A. (2020). A critical review of the composition and history of safe use of guayusa: A stimulant and antioxidant novel food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(14), 2393–2404. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1643286>
- Xu, H., Fu, Y., Li, T., & Wang, R. (2017). Effects of different LED light wavelengths on the resistance of tomato against *Botrytis cinerea* and the corresponding physiological mechanisms. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(1), 106–114. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61435-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61435-1)
- Yang, Y., Zhang, D., Li, Z., Jin, X., & Dong, J. (2015). Immature Embryo Germination and Its Micropropagation of *Ilex crenata* Thunb. *HortScience*, 50(5), 733–737. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.50.5.733>
- Zheng, X., Wu, S., Zhai, H., Zhou, P., Song, M., Su, L., Xi, Y., Li, Z., Cai, Y., Meng, F., Yang, L., Wang, H., & Yang, J. (2013). *Arabidopsis* Phytochrome B Promotes SPA1 Nuclear Accumulation to Repress Photomorphogenesis under Far-Red Light. *The Plant Cell*, 25(1), 115–133. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.107086>

9. ANEXOS

Anexo 1. Composiciones del medio de cultivo de plantas leñosas modificado WPM original y WPM modificado.

Compuestos	Original WPM (g/L)	mWPM (g/L)
Macronutrientes		
NH₄NO₃	0.4	5.4
KNO₃	-	3.9
K₂SO₄	0.99	-
KH₂PO₄	0.17	1.7
Ca(NO₃)₂*4H₂O	0.556	-
CaCl₂*2H₂O	0.096	2.8
MgSO₄*7H₂O	0.370	3.7
Micronutrientes		
FeSO₄*7H₂O	0.0278	2.78
Na₂-EDTA	0.0373	3.73
H₃BO₃	0.0062	0.62
MnSO₄*H₂O	0.0223	1.69
ZnSO₄*7H₂O	0.0086	1.05
KI	-	0.083
Na₂MoO₄*2H₂O	0.00025	0.025
CuSO₄*5H₂O	0.00025	0.0025
CoCl₂*6H₂O	-	0.0025
Elementos orgánicos		
Ácido Nicotínico	-	0.01
Tiamina	-	0.001
Piridoxina	-	0.01
Mio-Inositol	-	2
Glicina	-	0.04

Nota: (Trigiano and Gray 1999; Schuchovski and Biasi 2019)

Anexo 2. Porcentaje de plantas con generación espontánea de raíz, número y longitud de raíces primarias y secundarias del ensayo preliminar a los 210 días.

210 días de cultivo (mWPM + CA)								
Enraizamiento								
Tratamiento	Número de plantas con raíces espontáneas	%	Número de raíces		Longitud de raíces (cm)		Número de plantas sin raíces	%
			Primarias	Secundarias	Primarias	Secundarias		
Control	2 de 8	25%	7	15	1,108	0,160	6 de 8	75%
T1	1 de 8	13%	2	1	0,576	0,134	7 de 8	88%
T2	4 de 10	40%	9	9	1,135	0,395	6 de 10	60%
T3	1 de 5	20%	1	0	0,387	0,000	4 de 5	80%
T4	4 de 8	50%	7	12	0,711	0,406	4 de 8	50%
T5	5 de 7	71%	11	2	0,626	0,299	2 de 7	29%
T6	2 de 6	33%	4	0	0,351	0,000	4 de 6	67%
Total	19	37%	41	39	0,699	0,199	33	63%