

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Propagación *in vitro* de guayusa (*Ilex guayusa*) a partir de
segmentos nodales**

Proyecto de Investigación

Michelle Stephanie Rodríguez Álvarez

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

**Trabajo de titulación de pregrado presentado como requisito
para la obtención del título de Ingeniero en Procesos Biotecnológicos**

Quito, 10 de diciembre de 2018

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Propagación *in vitro* de guayusa (*Ilex guayusa*) a partir de segmentos nodales

Michelle Stephanie Rodríguez Álvarez

Calificación:

Nombre del profesor, Título Académico:

María de Lourdes Torres, PhD

Firma del Profesor:

Quito, 10 de diciembre de 2017

© 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 el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante:

Nombre:

Michelle Stephanie Rodríguez Álvarez

Código de estudiante:

00107627

C. I.:

1726881756

Lugar, Fecha

Quito, 10 de diciembre del 2018

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por no dejarme caer, brindándome toda la sabiduría para concluir mis estudios universitarios. También agradezco a mi padre René, mi mejor amigo, compañero y mi ejemplo a seguir; que sin duda me ha llenado de buenos valores para ser una mujer de bien. A mi madre María Fernanda, por darme la vida, ser mi pilar más importante y acompañarme en todos los momentos, sin ti nada de esto sería posible. A mi hermano Nicolás y a mis abuelitos Alicia y Mario que me han brindado su mayor apoyo, amor y confianza para que siempre logre lo que me propongo. A mi tía Macarena, por ser mi hermana mayor, mi cómplice, mi guía; a mis pequeñas María Emilia y Valentina. Así mismo, a la bebé que llevo dentro por ser mi mayor inspiración y fuerza. Son una bendición para mí, les amo.

De igual manera quiero agradecer a María De Lourdes Torres, por brindarme la oportunidad de realizar mi proyecto en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, por la paciencia, confianza y por todo lo que me ha enseñado. Igualmente, a María Mercedes Cobo, Bernardo Gutiérrez, Venancio Arahana, Andrea Montero, Alejandro Alvear y Miguel Orellana, por ser parte fundamental de mi trabajo con su guía y apoyo constante. Y a la Fundación RUNA, en especial a Eliot Logan por brindarnos la materia prima y el apoyo en la investigación.

Finalmente y no menos importante, quiero agradecer a Emilia Peñaherrera y todas las personas que me han brindado su apoyo durante mi trabajo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

RESUMEN

Ilex guayusa es una planta nativa de la Amazonía ecuatoriana que se caracteriza por sus propiedades energéticas y medicinales. En sus hojas se pueden encontrar altos contenidos de cafeína, terpenos, fenoles y otras metilxantinas. En los pueblos Kichwa, Shuar y Achuar, es ampliamente utilizada en la preparación de bebidas ceremoniales y energizantes; además, se conoce que se la consume para el tratamiento de la gastritis, el estrés, la infertilidad, entre otras enfermedades. Debido a problemas de fertilidad y escasez de las semillas, la propagación de la guayusa se da por medio de estacas recolectadas de plantas madre sembradas en el campo. Por este motivo se acudió al uso de técnicas de cultivo *in vitro* debido a su capacidad para incrementar el número de plantas en espacios reducidos, disminución del tiempo de multiplicación, mayor control sanitario, entre otros beneficios. El objetivo de este proyecto fue establecer un protocolo de cultivo *in vitro* de guayusa mediante el uso de segmentos nodales. Para esto, se aislaron segmentos de 2 cm de longitud que contenían una yema axilar a partir de plantas de guayusa previamente cultivadas en invernadero. La introducción *in vitro* de los explantes se realizó empleando un protocolo de desinfección basado en el uso de etanol 70%, hipoclorito de sodio 2%, Tween, y antibiótico (Ampicilina 300 mg/L), método con el cual se logró obtener una baja tasa de contaminación de los explantes. Para la regeneración de yemas axilares, se probaron dos medios de cultivo ¼ MS y mWPM. Para promover el enraizamiento de los brotes, se utilizó los mismos medios de regeneración suplementados con IBA en dos concentraciones (9.1 µM y 18.2 µM), y/o 3 g/L de carbón activado. Los resultados mostraron un porcentaje de regeneración de brotes del 100% en los dos medios de cultivo utilizados. En la fase de enraizamiento de plántulas se obtuvo mejores resultados de regeneración de raíces en los medios de cultivo suplementados con IBA (9.1 µM) sin presencia de carbón activado. En todos los casos no se encontraron diferencias significativas. Finalmente, las plántulas enraizadas se aclimataron en turba, o tierra con turba, siendo turba el sustrato en el que se observó el mayor crecimiento de las plántulas. Esta investigación reporta el primer protocolo de propagación *in vitro* de la guayusa, una especie de interés actual.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, explante, IBA, propagación vegetativa, carbón activado

ABSTRACT

Ilex guayusa is a native ecuadorian plant from the Amazon region, characterized by its medicinal and energetic properties. Caffeine, terpenes, phenoles and other metilxanthines can be found on high quantities on its leaves, which is why it is used by the Kichwa, Shuar and Achuar cultures for the preparation of ceremonial and energetic beverages. It is also known that this tea is drunk as treatment for some diseases like gastritis, stress, infertility, among others. Guayusa has some fertility issues, which leads to a lack of seeds, so guayusa propagation is made by cuttings from mother plants cultivated on the field. This is the reason for the use of *in vitro* culture techniques, due to its capacity to increase the number of plants in small spaces, decrease in multiplication time, sanitary control, among other benefits. The study's main objective was to stablish an *in vitro* culture protocole for guayusa propagation, with the use of nodal segments. For this, 2cm nodal segments with an axillary bud were cut from guayusa plants maintained on a greenhouse. The *in vitro* introduction of the explants consisted of a disinfection protocole using etanol (70%), 2% of sodium hiplochloryte, Tween and 300 mg/L of ampicillin, which helped us achieve the lowest contamination rate of the explants. For the axillary buds regeneration, we tested two different culture media, ¼ MS and mWPM. Furthermore, to promote the rooting of the buds, the same culture media were used supplemented with two different concentrations of IBA (9.1 uM and 18.2 uM) in the presence or absence of activated charcoal. The rooting shoots were transferred to two different sustrates for acclimatation, one with pure peat, and the other one with peat plus soil. The results showed a 100% of shoot regeneration on both culture media. In the rooting stage the best results were obtained in the culture media supplemented with IBA (9.1uM) and without activated charcoal. However, no significant differences were found between treatments for these experiments. Finally, the rooted shoots showed a better growth on the acclimatation stage in the peat sustrate. This investigation reports for the first time a protocol for the *in vitro* culture of guayusa, a species of current interest.

Key words: *in vitro*, seedlings, IBA, vegetative propagation, activated carbon

Tabla de contenido

1. Introducción	12
1.1 <i>Género Ilex</i>	12
1.2 <i>Ilex guayusa Loes</i>	12
1.2.1 Generalidades.....	12
1.2.2 Taxonomía y especies relacionadas con la guayusa.....	13
1.2.3 Descripción morfológica.....	14
1.2.4 Propiedades y usos de la guayusa.....	15
1.2.5 Cultivo de la guayusa.....	15
1.3 <i>Cultivo in vitro</i>	17
1.3.1 Generalidades.....	17
1.3.2 Medios de cultivo.....	17
1.3.3 Técnica de propagación <i>in vitro</i> a través de segmentos nodales	19
1.3.4 Cultivo <i>in vitro</i> de especies del género <i>Ilex</i>	19
2 Objetivos.....	21
2.1 <i>Objetivo General</i>	21
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	22
3 Área de estudio.....	22
4 Justificación.....	22
5 Materiales	23
5.1 <i>Material vegetal en invernadero</i>	23
5.2 <i>Desinfección del material inicial</i>	23
5.3 <i>Introducción de explantes de guayusa a condiciones in vitro</i>	24
5.4 <i>Enraizamiento de plántulas de guayusa</i>	24
5.5 <i>Aclimatación de plantas de guayusa</i>	25
6 Metodología.....	25
6.1 <i>Obtención del material vegetal</i>	25
6.2 <i>Desinfección del material inicial</i>	26
6.3 <i>Introducción de explantes de guayusa a condiciones in vitro</i>	26
6.4 <i>Enraizamiento de plántulas de guayusa</i>	27
6.5 <i>Aclimatación de plantas de guayusa</i>	28

7 Resultados.....	28
7.1 <i>Desinfección del material inicial.....</i>	28
7.2 <i>Introducción de explantes de guayusa a condiciones in vitro.....</i>	29
7.3 <i>Enraizamiento de plántulas de guayusa.....</i>	30
7.4 <i>Aclimatación de plantas de guayusa</i>	30
8 Discusión.....	31
8.1 <i>Desinfección del material inicial.....</i>	31
8.2 <i>Introducción de explantes de guayusa a condiciones in vitro.....</i>	32
8.3 <i>Enraizamiento de plántulas de guayusa.....</i>	34
8.4 <i>Aclimatación de plantas de guayusa</i>	35
9 Conclusiones	36
10 Recomendaciones.....	37
11 Referencias	38
12 Tablas.....	455
13 Figuras	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Tratamientos de desinfección de segmentos nodales de guayusa. Se probaron diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio, etanol, Tween 20 y los tiempos de inmersión de cada uno.....	45
Tabla 2 Tratamientos de desinfección de explantes en los distintos medios de cultivos suplementados con distintas concentraciones de antibióticos.....	46
Tabla 3 Resultados del tamaño de los brotes obtenidos después de la introducción <i>in vitro</i> de guayusa.....	47
Tabla 4 Resultados del porcentaje de enraizamiento de plántulas de guayusa obtenidos en los distintos tratamientos.....	47
Tabla 5 Crecimiento de las plantas de guayusa, provenientes de cultivo <i>in vitro</i> , en la fase de aclimatación con el uso de dos sustratos.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Proceso de preparación de llegada del material (paso de plantas con fundas de plástico a macetas grandes y podadas) proveniente de los viveros de RUNA al invernadero del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ para la obtención del material inicial para cultivo in vitro.....49
- Figura 2** Proceso de desinfección de las yemas axilares de 2 cm de longitud provenientes del invernadero del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ.....50
- Figura 3** Tinción Gram de inóculos provenientes de explantes contaminados de guayusa en donde se identificó la presencia de Bacilos Gram positivos.....50
- Figura 4** Proceso de introducción de explantes de guayusa a condiciones in vitro provenientes del ensayo de desinfección de explantes y sembrados en 2 medios de cultivo ($\frac{1}{4}$ MS y mWPM)51
- Figura 5** Proceso para enraizamiento in vitro de brotes de guayusa con la adición de la hormona IBA en dos concentraciones y carbón activado a los medios de cultivo.....52
- Figura 6** Proceso para aclimatación de plántulas in vitro provenientes del ensayo de enraizamiento en dos sustratos distintos: Turba y Tierra + turba.....53
- Figura 7** Porcentaje de eficiencia de desinfección mediante pruebas con antibióticos suplementados en los medios de cultivo $\frac{1}{4}$ MS y mWPM54
- Figura 8** Tamaño promedio de brotes (mm) en un periodo de 60 días de los dos tratamientos utilizados: Medio de cultivo $\frac{1}{4}$ MS + 300 mg/L Amp (azul) y Medio de cultivo mWPM + 300 mg/L Amp (rojo).....55
- Figura 9** Tasa de crecimiento de guayusa en un periodo de 60 días de los dos tratamientos utilizados: Medio de cultivo $\frac{1}{4}$ MS + 300 mg/L Amp (azul) y Medio de cultivo mWPM + 300 mg/L Amp (rojo).....55

- Figura 10** Porcentajes de enraizamiento en los ocho tratamientos utilizados en presencia y ausencia de carbón activado con distintas concentraciones (9.1 y 18.2 μM) de IBA.....56
- Figura 11** Número promedio de raíces en ocho tratamientos de enraizamiento en presencia o ausencia de carbón activado con distintas concentraciones (9.1 y 18.2 μM) de IBA.....57
- Figura 12** Porcentaje de supervivencia de plantas de guayusa en la fase de aclimatación con los dos sustratos utilizados (Turba y Tierra negra + turba).....58
- Figura 13** Plantas de guayusa aclimatadas en el cuarto de cultivo a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 16 horas de luz a los 180 días: A) sustrato turba B) sustrato tierra negra + turba.....58
- Figura 14** Plantas de guayusa in vitro provenientes del cuarto de cultivo a los 220 días de aclimatación traspasadas a condiciones de Invernadero.....59

1. Introducción

1.1 Género *Ilex*

El género *Ilex*, miembro de la familia Aquifoliaceae, comprende más de 400 especies que se clasifican en árboles o arbustos caducifolios y perennes que tienen gran importancia económica (Sun *et al*, 2010). El género cuenta con gran diversidad morfológica con especies distribuidas principalmente en América Central, América del Sur, Asia, África y Europa. Sin embargo, América del Sur es considerada una de las áreas con mayor diversificación del género, al igual que Asia Oriental. *Ilex* se encuentra principalmente en áreas con climas tropicales o subtropicales (Gottlieb *et al*, 2005; Dueñas *et al*, 2013; Alikaridis, 1987). Las plantas pertenecientes al género *Ilex* se caracterizan por ser dioicas con hojas simples alternas, coriáceas con sus bordes presentados de manera aserrada, crenulada o entera y cuentan con estípulas pequeñas. Sus flores son pequeñas actinomorfas perfectas o imperfectas dispuestas de manera simple o agrupadas; sus sépalos se encuentran en igual número, o alternados con los pétalos. Las especies más consumidas mundialmente de este género, por contener altos niveles de cafeína y teobromina son: *Ilex vomitoria* (yaupon), *Ilex paraguariensis* (yerba mate) e *Ilex guayusa* (guayusa) (Gottlieb *et al*, 2005).

1.2 *Ilex guayusa* Loes

1.2.1 Generalidades

En 1901, Theodor Loesener describió una nueva especie (recolectada originalmente por Warszewicz en 1898 en Perú) y la nombró guayusa (*Ilex guayusa*). Las hojas de guayusa son utilizadas en países como Colombia, Perú y Ecuador por pueblos indígenas, debido a sus propiedades medicinales (Montagnini *et al*, 2015). La planta es considerada como un árbol emblemático en la Amazonía y se encuentra ampliamente distribuida en las regiones tropicales y subtropicales del continente americano (Radice & Vidari, 2017), entre los 200 a 2600 metros sobre el nivel del mar. En Ecuador, *Ilex guayusa* se la encuentra en las provincia

de Napo, Sucumbíos, Orellana, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe (Castañeda *et al*, 2016). Por otro lado, se puede encontrar una mayor cantidad de plantas cultivadas en chacras por los nativos de cada región, actividad que se ha dado durante siglos en la región amazónica (Crespo, 2013; Castañeda *et al*, 2016). Para el cultivo, los indígenas realizan cultivos masivos de estacas extraídas de plantas madres (Crespo, 2013)

1.2.2 Taxonomía y especies relacionadas con la guayusa

La guayusa, miembro de la familia Aquifoliaceae y del género *Ilex*, mantiene su posición taxonómica de la siguiente manera (Castañeda *et al*, 2016):

Reino: Plantae,

División: Magnoliophyta,

Clase: Magnoliopsida,

Orden: Celastrales,

Familia: *Aquifoliaceae*,

Género: *Ilex*,

Especie: *Ilex guayusa* Loes.

Otra de las especies importantes del género *Ilex* es la yerba mate. *Ilex paraguariensis*, es reconocida por el uso que se da a sus hojas para la preparación de una bebida parecida al té (Juaristi *et al*, 2018; Sansberro *et al*, 1998). Esta especie se encuentra presente en las regiones subtropicales de América del Sur, se la consume comúnmente en Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina. Su consumo se ha dado a conocer a nivel mundial gracias a los movimientos migratorios y los intercambios culturales por todos los beneficios medicinales que proporciona el consumo de sus hojas (Juaristi *et al*, 2018). El té de mate proporciona efectos antioxidantes, antiinflamatorios, antiobesidad o cardioprotectores (Oellig *et al*, 2017 & Juaristi *et al*, 2018). Así mismo, se ha demostrado su gran aporte contra ciertos tipos de cáncer presentes en la cavidad oral. La yerba mate es considerada una fuente interesante de

compuestos bioactivos, como metilxantinas (cafeína y teobromina) y saponinas triterpénicas, las mismas que tienen efecto estimulante sobre el sistema nervioso (Oellig *et al*, 2017 & Juaristi *et al*, 2018).

Otra especie perteneciente al género *Ilex* es *I. rotunda*, la cual se encuentra en las regiones tropicales y subtropicales de países asiáticos como Japón, Corea, Vietnam y la región sur de China. Esta planta es utilizada como medicina tradicional en China para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales y cardiovasculares (Yang *et al*, 2018). *I. rotunda* contiene varios compuestos con actividad antibacteriana y antiinflamatoria, entre ellos tripernoides, hemiterpenes, lignanos y aromáticos (Yang *et al*, 2018).

Por otro lado, *Ilex glabra* e *I. aquifolium*, se encuentran en zonas más frías en Europa, son utilizadas como plantas ornamentales, e incluso como árboles de navidad en el caso de *I. aquifolium* (Pedroza, 2009). Por otro lado, *I. glabra* no produce semillas y es cultivada por medio de estacas (Sun *et al*, 2010).

1.2.3 Descripción morfológica

Ilex guayusa Loes es un árbol perenne que alcanza un tamaño de 10 a 25 m de altura y un diámetro entre 50-80 cm; sin embargo, se han reportado individuos que han llegado a medir 30 a 40 m de altura (Radice *et al*, 2016). La copa de los árboles de guayusa es irregular con un follaje denso con hojas coriáceas de color verde, con disposición simple y alterna. Las hojas pueden crecer entre los 15-21 cm de longitud y 5-8 cm de ancho con un pecíolo corto de 1 cm (Castañeda *et al*, 2016). Su fruto es una baya redonda de color verde con un ancho aproximado de 0,75 a 1 cm de ancho (Radice & Vidare, 2007). Su flor posee una corola blanca verdosa, anteras oblongas, estambres y pétalos. Su tronco es bifurcado, su corteza es de textura lisa y color blanco. El sistema radicular está formado por varias raíces secundarias y carece de raíz principal (Caranqui & Humanante, s.f.).

1.2.4 Propiedades y usos de la guayusa

Por medio del estudio fitoquímico de las hojas de guayusa, se ha reportado la presencia de triterpenos, clorogénicos, terpenos, taninos, flavonoides, alcaloides, esteroides, compuestos lactónicos o cumarínicos, metilxantinas (teobromina, teofilina y cafeína), guanidina, aceites esenciales, ácido isobutírico, ácido nicotínico, ácido ascórbico, entre otros (Cardozo, 2003; Burneo, 2009 & Carrión, 2011). Tradicionalmente las comunidades locales han usado las hojas de guayusa por sus efectos como cicatrizante, diaforético y diurético. También ha sido utilizada para el reumatismo, asma, gastritis, dolor de cabeza, enfermedades venéreas, dolor corporal y la infertilidad femenina (Contero, 2015). Gracias a su alto contenido de metilxantinas, se conoce que combate la fatiga proporcionando agilidad física y mental (Castañeda *et al*, 2016). Se ha reportado el uso de la guayusa por al menos seis grupos indígenas del oriente ecuatoriano (Kichwa, Cofán, Secoya, Záparo, Shuar y Achuar) y dos grupos indígenas de la sierra (Kichwa y Tsáchila) (Dueñas *et al*, 2013).

La guayusa es conocida con diferentes nombres comunes, dependiendo del lugar donde es cultivada, como por ejemplo waysa, wayusa o huayusa. Dentro de las comunidades indígenas, el consumo del té de guayusa es parte de la convivencia cotidiana entre las personas, principalmente en reuniones formales, mejorando las relaciones interpersonales (Castañeda, 2016, Paguay *et al*, 2017). Mientras se consume el té, los adultos tejen redes de pesca, trampas, bolsas de hombro, tocan música y cuentan historias ancestrales (Dueñas *et al*, 2016). Además, la guayusa es cultivada en chacras debido a que evitan la erosión de los suelos, por medio del fuerte anclaje de sus raíces, permitiendo una mayor agrobiodiversidad (Krause & Ness, 2017).

1.2.5 Cultivo de la guayusa

La planta de guayusa tiene cierta sensibilidad a la luz directa del sol, por lo que su siembra se realiza bajo árboles grandes o junto a plantas de café o cacao existentes en cada zona. La poda constante para obtener mayor crecimiento de estas plantas es de gran importancia (Collahuazo, 2012). Se ha demostrado que la siembra de la guayusa se la puede realizar junto

con papa china, maní, yuca, guaba, limón, caimito y guayaba, uvilla, tumbo, charichuelo, maíz y yuca (Fundación Runa, s.f.). Se la puede encontrar en el bosque asociadas con sangre de drago (*Croton lechleri*), cedro (*Cedrela odorata*), llora sangre (*Otoba glicicarpa*), copal (*Dacryodes peruviana*), bella maría (*Calophyllum longifolium*), paja toquilla (*Phytelephas aequatorialis*), entre otras (Collahuazo, 2012).

Debido al uso de sus hojas para la elaboración de bebidas energizantes y estimulantes por parte de los pueblos indígenas, la guayusa tiene gran importancia en la agricultura. Una ventaja del cultivo de guayusa es que se puede obtener durante todas las estaciones del año, permitiendo aproximadamente hasta seis recolecciones de hojas por año (Krause & Ness, 2017). Actualmente existen varios cultivos de guayusa con fines comerciales, permitiendo a personas ajenas a las comunidades indígenas el acceso a esta planta y sus beneficios. Este tipo de ventas no solo incluye a las hojas, sino también a productos como infusiones de té o bebidas energéticas con guayusa como su base. Un ejemplo de esto es la Fundación RUNA, la cual cultiva guayusa con fines de comercialización nacional e internacional en la ciudad de Archidona, provincia de Napo. Sin embargo, la mayoría de los productores centran la venta de las hojas en las carreteras que son accesibles a vehículos (Krause & Ness, 2017) Los agricultores colocan las hojas en saquillos o changuinas que luego son transportadas en hombro hasta la comunidad más cercana (Collahuazo, 2012).

En comparación con el cacao y el café, la guayusa que es cultivada en viveros es una planta libre de plagas. Por lo general, las poblaciones de insectos o microorganismos no afectan en gran proporción a la planta, con la excepción de la hormiga arriera y del hongo fumagina (*Capnodium* sp). La hormiga puede afectar directamente a las hojas en los primeros meses después del trasplante; mientras que el hongo la utiliza como soporte para su crecimiento (Alvarado, 2016; Krause & Ness, 2017). Se conoce que muchas de las plantas de guayusa sirven como refugio y alimentos para aves como el gorrión y el pacharraco (Collahuazo, 2012).

1.2.6 Limitaciones actuales del cultivo de guayusa

Los pueblos indígenas han optado como método de propagación de la especie la siembra de estacas leñosas o semi-leñosas de tamaños variables que son extraídos de tallos de madera dura sin hojas, provenientes de plantas maduras de aproximadamente 4 y 5 años (Dueñas *et al*, 2016). Según el “Manual de prácticas de manejo sostenible de Guayusa para agricultores familiares” diseñado por la Fundación RUNA (s.f) se recomienda el corte de estacas de color blanco o café claro, que mantengan el ancho de un lápiz; además, se debe realizar el corte en la parte baja del árbol o “el asiento” (Fundación Runa, s.f). El tiempo de siembra y cosecha es una de las causas que proporcionan mayor limitación en el cultivo de la guayusa, debido a que se requiere un año contando desde la siembra para proceder con la primera cosecha. Una vez que se ha realizado la primera cosecha, se puede recolectar las hojas cada dos o tres meses, ya que este tiempo es el lapso en el cual las hojas logran la madurez fisiológica adecuada para ser entregadas al mercado (Alvarado, 2016).

1.3 Cultivo *in vitro*

1.3.1 Generalidades

El cultivo *in vitro* consiste en tomar una porción de una planta (explante) y sembrarla en un medio nutritivo estéril rico en nutrientes y muchas veces suplementado con reguladores de crecimiento (hormonas vegetales) para generar una o varias plantas (Cañal *et al*, 2001; Abdelnor & Escalant, 1994) El cultivo se realiza bajo distintas condiciones controladas de luz, temperatura y humedad. Los factores a considerar para brindar una respuesta adecuada del explante, incluyen: el estado fisiológico y la edad ontogenética de la planta (Cañal *et al*, 2001).

1.3.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo son soluciones nutritivas donde pueden crecer distintos tipos de células, tejidos y órganos, con o sin la presencia un agente solidificante como el agar (Pierik, 1997). Están conformados principalmente por una fuente de carbono, sales inorgánicas

(minerales), vitaminas, sustancias reguladoras del crecimiento, compuestos orgánicos y la presencia de un agente gelificante. Su función es mantener la viabilidad de la planta, estimular su diferenciación celular y el crecimiento (Esquivel & Escalant, 1994; Levitus *et al*, 2010). Durante el cultivo se debe mantener condiciones controladas como de temperatura, humedad atmosférica, fotoperiodo, intensidad de luz y asepsia (Levitus *et al*, 2010).

Dependiendo de los requerimientos de las plantas, existen varios medios de cultivo, como por ejemplo el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS); y Woody Plant Medium (mWPM). El medio MS, formulado en 1962 por Toshio Murashige y Folke Skoog, es comúnmente utilizado para la siembra de varias especies del género *Ilex*. Por otro lado, el medio mWPM, formulado en 1981 por Lloyd y McCown, es ampliamente utilizado para la propagación de especies leñosas (Méndez, 2011). Los medios de cultivo pueden ser suplementados con fitohormonas, las cuales son sustancias químicas que naturalmente se producen en las plantas, con el propósito de estimular, inhibir o regular la comunicación intracelular (Esquivel & Escalant, 1994; Smith, 2006).

Uno de los riesgos del cultivo *in vitro*, es la contaminación. Ésta se puede dar debido a la incorrecta manipulación por parte del operador al controlar de manera errónea la atmósfera de trabajo, la esterilización de los utensilios, y de las soluciones madres (Esquivel & Escalant, 1994). Los contaminantes más comunes son las bacterias, hongos, levaduras y micoplasma (Bulevar, 2013). Por otro lado, la contaminación también puede ser endógena, esto quiere decir que al momento de la siembra el material inicial puede contener patógenos endógenos. Estos patógenos puede ser capaces de interferir en el desarrollo del cultivo de tejidos por medio de la competencia de los nutrientes presentándose en la base del explante o alrededor de él (Pérez *et al*, 2016).

Existen diversas maneras de combatir la contaminación, entre ellos el uso de agentes antimicrobianos o antibióticos como suplemento para los medios de cultivo. Los antibióticos pertenecen a un grupo heterogéneo de sustancias que mantienen un comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, capaces de ejercer cierta acción sobre los microorganismos actuando en concentraciones bajas y con toxicidad selectiva (Seija &

Vignoli, 2008). Algunos ejemplos de agentes antimicrobianos utilizados en el cultivo *in vitro* son la penicilina, centromicina, ampicilina, gentamicina, ciprofloxacino, entre otros (Valenzuela & Armendáriz, 2008). La ampicilina y cefotaxima son agentes antimicrobianos betalactámicos que tienen acción bactericida de amplio espectro, y su función es inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana produciendo la lisis de las bacterias y su muerte en gram positivas y negativas. Otro antibiótico importante en este estudio es el ciprofloxacino, que pertenece a las fluorquinolonas y se encarga de inhibir la replicación de las bacterias (Abreu *et al*, 2016).

1.3.3 Técnica de propagación *in vitro* a través de segmentos nodales

Existen varias técnicas de cultivo *in vitro* tales como el uso de cloroplastos, tejidos, órganos e incluso plantas completas (Abdelnor & Escalant, 1994). La técnica de propagación vegetativa de plantas *in vitro* utilizada en este estudio se realizó por medio del uso de segmentos nodales que son obtenidos de la planta madre con el propósito de tener descendencia uniforme con plantas que sean genéticamente idénticas (Castillo, 2009). En donde se debe considerar el ambiente químico (composición del medio de cultivo y pH) y el ambiente físico controlado (Temperatura, Luz/fotoperiodo y humedad) (Castillo, 2009). El proceso de propagación tiene distintas etapas que consisten en la selección y preparación de la planta madre; la desinfección; la introducción del material; la brotación; el enraizamiento y la aclimatación (Castillo, 2009). Entre los beneficios que presenta el cultivo *in vitro* a partir de segmentos nodales, se pueden observar el incremento acelerado del número de plantas, reducción del tiempo de multiplicación, obtención de grandes cantidades de plantas en un espacio reducido, mejora en el control sanitario de las plantas que se propaga, entre otras (Esquivel & Escalant, 1994).

1.3.4 Cultivo *in vitro* de especies del género *Ilex*

Hasta el momento, se han reportado alrededor de 25 publicaciones relacionadas al cultivo *in vitro* del género *Ilex*. Entre las especies más estudiadas se encuentran *Ilex paraguariensis*, *I. dumosa*, *I. argentina*, *I. brasiliensis*, *I. brevicuspis*, *I. Dumosa*, *I. microdonta*, *I. pseudoboxus* e *I. kunthiana* (Sansberro *et al*, 1998; Sansberro *et al*, 1999, Sansberro *et al* 2000 & Sansberro

et al 2001). La técnica más común para el cultivo de las especies mencionadas es la micropropagación *in vitro* de semillas y segmentos nodales. Dichos explantes pasan por un proceso de desinfección estándar que incluye el uso de detergentes (generalmente hipoclorito de sodio y Benlate), además de la inmersión en etanol en distintas concentraciones. Por otro lado, para la fase de propagación los explantes son sembrados en los medios de cultivo MS con $\frac{1}{4}$ de la concentración de sales, y mWPM en presencia de distintos reguladores de crecimiento como son la Zeatina (ZT), Kinetina (KIN), 6-bencilaminopurina (BAP). Para la fase de enraizamiento, el uso de auxinas cumple un papel fundamental para el crecimiento de raíces y se utiliza comúnmente el ácido naftalenacético (ANA), ácido giberélico (AG) y ácido indolbutírico (IBA) suplementados en los medios de cultivo $\frac{1}{4}$ MS y mWPM. Hay poca información acerca de la aclimatación de *Ilex*; sin embargo, estudios manifiestan mejor respuesta en Turba (100%) que en tierra (67%) (Castañeda, 2016, Paguay *et al*, 2017).

A continuación, se resumen algunos experimentos realizados con la yerba mate, ya que es una especie donde se ha reportado protocolos eficientes de propagación *in vitro*.

Ross *et al.* (2017), evaluó el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de la yerba mate (*Ilex paraguariensis*). Para la desinfección, se utilizó dos concentraciones de hipoclorito de sodio (15 y 20 minutos) y no se observó diferencias significativas ($p=0,9240$) en el porcentaje de supervivencia. La adición de nitrato de calcio (6 o 12 μM) fue indispensable para combatir la contaminación bacteriana y la oxidación de la planta independientemente de la concentración. Se obtuvo un 70% de regeneración de brotes a partir de segmentos nodales.

Sun *et al.* (2010), probó la desinfección de segmentos nodales de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) con hipoclorito de sodio y los sembró en un medio MS sin hormonas. Los brotes fueron cultivados en un medio MS suplementado con BAP, cinetina (KIN) o zeatina (ZT) en distintas concentraciones (2.3, 4.5, 9.1, 18.2 mM). Se observó que en un periodo de 38 días se obtuvo mejor respuesta con el uso de las hormonas ZT y BAP induciendo significativamente la producción de brotes. Para la inducción del enraizamiento se cultivó en medio de cultivo $\frac{1}{4}$ MS con IBA y ANA en concentraciones 2.6, 5.1 o 10.3 mM y se observaron raíces adventicias con mejor respuesta (100%) en las concentraciones de 10.3

mM después del periodo de 2 a 4 semanas. La supervivencia de las plántulas en la fase de aclimatación en tierra fue del 73.6%.

En varios estudios realizados sobre *Ilex paraguariensis* se sembró en condiciones *in vitro* segmentos nodales de yerba mate. Sansberro *et al.* (1999) probó ¼ MS y obtuvo un porcentaje del 100% de regeneración de brotes. En la inducción de raíces, los brotes fueron transferidos al mismo medio de cultivo con IBA (7,4 µM) y se observaron raíces en 4 semanas. A su vez, Sansberro *et al.* (2000), estudió plantas madres de 2 y 20 años de las cuales se extrajeron segmentos nodales que fueron sembrados en medio ¼ MS complementado con BAP (0.4-0.9 M) y se obtuvieron 60-65% de brotes regenerados. Para el enraizamiento se probó vermiculita con 1 y 1.5% de IBA y se obtuvo un 50% y 25% de eficiencia de enraizamiento para las plantas de 2 y 20 años, respectivamente. En los dos estudios se obtuvo un 100% de supervivencia de las plantas aclimatadas en turba.

Gracias a las propiedades fitoquímicas de las hojas de guayusa y usos ya expuestos; al igual que por su uso tanto por culturas ancestrales como también por industrias, como RUNA, que comercializan internacionalmente el té de guayusa, se escogió a *Ilex guayusa* como planta de estudio. Además, debido a las dificultades que presenta al momento de su reproducción por su baja fertilidad, los agricultores han empezado a la propagación de guayusa por medio de estacas, la cual conlleva tiempos prolongados. Es por esto que se propuso realizar el cultivo *in vitro* de segmentos nodales con el propósito de observar el comportamiento de guayusa en esta forma de cultivo.

2 Objetivos

2.1 Objetivo General

- Estandarizar un protocolo de propagación *in vitro* de guayusa a partir de segmentos nodales.

2.2 Objetivos específicos

- Estandarizar un protocolo de desinfección de segmentos nodales de guayusa.
- Establecer un protocolo *in vitro* de regeneración de brotes de yemas axilares de *Ilex guayusa*.
- Implementar un protocolo de enraizamiento *in vitro* de plántulas de *Ilex guayusa* obtenidas a partir de yemas axilares.
- Aclimatar plántulas de guayusa obtenidas *in vitro* a condiciones de invernadero.

3 Área de estudio

El proyecto “Propagación *in vitro* de guayusa (*Ilex guayusa*) a partir de segmentos nodales” se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, Ecuador. El material vegetal inicial se obtuvo a través de la Fundación RUNA, quienes proveyeron plantas originarias de viveros ubicados en el kilómetro ½ vía Rukullacta, cantón Tena, provincia de Napo, Ecuador.

4 Justificación

La comercialización de *Ilex guayusa* ha incrementado en la región amazónica en Ecuador. La Fundación RUNA es una de las principales empresas dedicadas al procesamiento de la hoja para diversos usos (té y bebidas energizantes) desde el 2009 (Fundación Runa, s.f). Las comunidades que cultivan guayusa están aprendiendo a valorar esta especie como una fuente de ingresos económicos y por lo tanto ampliando el área de cultivo (Jarret *et al*, 2012). Se han realizado varios estudios que han reportado propiedades fitoquímicas en las hojas, como la presencia de metilxantinas, entre otros (Jarret *et al*, 2012, Castañeda *et al* 2016). Ante este panorama, y debido a las limitaciones que tiene el cultivo tradicional de *Ilex guayusa*, es importante encontrar formas alternativas de propagación de esta especie. Al tener restricciones con la germinación de semillas, la siembra depende exclusivamente de formas de propagación vegetativa, lo cual eventualmente podría conducir a una reducción de su

diversidad genética y llevarla a una condición de vulnerabilidad. Desde el punto de vista ecológico, el cultivo y mantenimiento *in vitro* de guayusa podría constituir una forma de conservación *ex situ* de esta especie. Por estas razones, este estudio representa un primer acercamiento para establecer protocolos de cultivo *in vitro* de guayusa por medio de la propagación de segmentos nodales.

5 Materiales

5.1 Material vegetal en invernadero

- 45 plantas de guayusa (2 años de edad) obtenidas del vivero de la fundación RUNA
- Macetas de plástico
- Turba (Marca Promix)
- Tierra negra (Marca Promix)

5.2 Desinfección del material inicial

- Detergente (Marca Axion)
- Agua potable
- Alcohol etílico 70%
- Hipoclorito de sodio (NaClO)
- Tween-20 (6 gotas)
- Vasos de precipitación de 1000 ml estériles
- Cajas Petri de vidrio estériles
- Agua destilada estéril
- Pinzas
- Cernidor
- Cámara de flujo laminar (LABCONCO, Estados Unidos),
- Autoclave (Biobase, China)

5.3 Introducción de explantes de guayusa a condiciones *in vitro*

- Cajas Petri de vidrio estériles
- Pinzas estériles
- Bisturís estériles
- Cámara de flujo laminar (LABCONCO, Estados Unidos)
- Medio de cultivo ¼ Murashige & Skoog (¼ MS) (Murashige & Skoog, 1962)
- Medio de cultivo Modified Woody Plant Medium (mWPM) (Lloyd and McCown's, 1981)
- Frascos de vidrio estériles
- Etanol 70 %
- Alcohol potable (96%)
- Plástico wrap (Diamond)
- Antibióticos (Ampicilina, cefatoxima y ciprofloxacina)
- Filtros (Corning Incorporated, Tamaño del poro 0,20 micrómetros, Tamaño de filtro 28 mm)
- Jeringas (5 mL)
- Autoclave (Biobase, China)

5.4 Enraizamiento de plántulas de guayusa

- Cajas Petri de vidrio estériles
- Pinzas estériles
- Bisturís estériles
- Plástico wrap (Diamond)
- Cámara de flujo laminar (LABCONCO, Estados Unidos)
- Medio de cultivo ¼ Murashige & Skoog (¼ MS)
- Medio de cultivo Modified Woody Plant Medium (mWPM)
- Frascos de vidrio estériles
- Etanol 70 %

- Alcohol potable (96%)
- Ácido indol-3-butírico (IBA)
- Ampicilina
- Filtros (Corning Incorporated, Tamaño de poro 0,20 micrómetros, Tamaño de filtro 28 mm)
- Jeringas (5 mL)
- Carbón activado (Loba Chemie)

5.5 Aclimatación de plantas de guayusa

- Agua destilada
- Frascos de vidrio autoclavados
- Platic wrap (Diamond)
- Macetas pequeñas autoclavadas
- Tierra negra autoclavada (Marca Promix)
- Tierra turba autoclavada (Marca Promix)
- Autoclave (Biobase, China)

6 Metodología

6.1 Obtención del material vegetal

Todo el material vegetal de este proyecto se obtuvo a partir de 45 plantas de guayusa adultas (2 años de edad) cultivadas en los viveros de RUNA, en la Provincia de Napo ubicada en la Amazonía ecuatoriana. Las plantas fueron trasladadas en fundas de plástico al invernadero del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, Ecuador; en tres grupos diferentes, dos en el año 2015 y una en el año 2016. Posteriormente, se procedió al traspaso de las plantas a macetas de plástico. Los explantes fueron obtenidos 30 días después de la primera poda realizada a las plantas madre, donde se cortaron los segmentos nodales de aproximadamente 2 cm de longitud (Figura 1).

6.2 Desinfección del material inicial

Para la desinfección del material vegetal previo a su introducción a condiciones *in vitro*, se eliminó el tejido foliar de los segmentos nodales para utilizar únicamente las yemas axilares como explante inicial. Se trabajó con 48 explantes (24 explantes en cada medio de cultivo $\frac{1}{4}$ MS y mWPM). Para remover todas las impurezas de los explantes se realizó un primer lavado por 10 minutos con agua potable y detergente (Marca Axion). Posteriormente, se enjuagó con agua destilada estéril hasta eliminar todo el detergente remanente. Luego, se realizaron diferentes protocolos de desinfección que se basaron en la inmersión en etanol 70%, seguido de hipoclorito de sodio con Tween-20 y lavados con agua destilada estéril. En dichos procesos se modificaron: a) el tiempo de exposición del material vegetal en etanol 70% y b) las concentraciones y tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio (NaClO) (Tabla 1). Adicionalmente, en la inmersión en hipoclorito de sodio, se incluyeron diferentes volúmenes (en gotas) de Tween 20 y por último se hicieron 6 enjuagues con agua destilada estéril en todos los tratamientos (Figura 2). Para cada tratamiento se calculó el porcentaje de desinfección tomando en cuenta el número de explantes no contaminados en un periodo de 45 días. Además, para establecer el tratamiento más eficiente, se observó si los explantes presentaban necrosamiento (explantes oxidados de color negro). Estos primeros ensayos de desinfección con todas sus variaciones presentaron altas tasas de contaminación, por lo que se decidió analizar el tipo de contaminación presente y realizar nuevos ensayos con el uso de antibióticos en el medio de cultivo. Se realizó una tinción Gram de la base de los explantes contaminados, con la cual se identificó la presencia de bacilos Gram positivos (Figura 3). A continuación, se realizaron pruebas con varios antibióticos (Ampicilina, ciprofloxacino y cefatoxima) a distintas concentraciones con el objetivo de evitar el crecimiento bacteriano (Tabla 2).

6.3 Introducción de explantes de guayusa a condiciones *in vitro*

Para establecer un protocolo *in vitro* de regeneración de brotes a partir de yemas axilares, de los 48 explantes desinfectados, un total de 24 explantes fueron introducidos a medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) con $\frac{1}{4}$ de las concentraciones originales de sales ($\frac{1}{4}$ MS)

suplementado con 3% de sacarosa, pH 5.8. Los 24 explantes restantes fueron introducidos a medio de cultivo modified Woody Plant Medium (mWPM) (Lloyd and McCown's, 1981) con 3% sacarosa, pH 5.2. Ambos medios fueron además suplementados con distintas concentraciones de antibióticos (Tabla 2), hasta obtener porcentajes bajos de contaminación. El mejor resultado se obtuvo con 300 mg/L de ampicilina por lo que todos los medios de cultivo usados en las distintas fases del cultivo *in vitro* fueron suplementados con esta concentración y tipo de antibiótico. Previo a la introducción de cada explante al medio de cultivo, se removió el tejido que se presentaba de color negro, producto de la necrosis del proceso de desinfección. Este proceso se realizó en condiciones estériles dentro de una cámara de flujo laminar. Se sembraron dos explantes por frasco y se los incubó en el cuarto de cultivo a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 16 horas de luz durante 60 días. Todos los medios fueron renovados cada 30 días (Figura 4). La eficiencia de regeneración de brotes fue evaluada en base a las mediciones del tiempo para la aparición de los primeros primordios foliares (registrado como “días a brotación”); el tamaño de los brotes; y la tasa de crecimiento, calculada en base a las mediciones del tamaño de brotes cada 3 días por un periodo de 60 días. Las diferencias entre medios de cultivo fueron evaluadas en base a pruebas T para cada variable, con un alfa de 0.05.

6.4 Enraizamiento de plántulas de guayusa

Para implementar y evaluar protocolos de enraizamiento *in vitro*, los explantes que regeneraron durante el periodo de 60 días (descritos en la sección anterior) fueron clasificados en dos grupos: aquellos que no regeneraron raíces y los que regeneraron raíces espontáneamente. Los brotes (aparición de primeros primordios foliares) que mostraron regeneración de raíces espontáneas pasaron directamente a un ensayo de aclimatación; mientras que los que no mostraron crecimiento de raíces fueron transferidos a tratamientos para regenerar raíces. Se utilizaron dos medios de cultivo distintos ($\frac{1}{4}$ MS y mWPM) suplementados con ampicilina 300 mg/L y con la hormona ácido indolbutírico (IBA) en dos diferentes concentraciones (9.1 μM y 18.2 μM), y se realizaron dos experimentos con y sin carbón activado (CA). Se incubaron en el cuarto de cultivo a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 16 horas de luz durante 90 días. Todos los medios fueron renovados cada 30 días (Figura 5).

La variable de análisis fue el número de raíces $\bar{}$ regeneradas. Se realizó un ANOVA con el propósito de observar diferencias significativas entre todos los tratamientos.

6.5 Aclimatación de plantas de guayusa

Para aclimatar las plántulas (plantas jóvenes con hojas y raíces) de guayusa, se evaluó el crecimiento de las plántulas enraizadas provenientes de los experimentos anteriores en dos sustratos distintos: tierra + turba (50:50) y turba pura. Los sustratos y el material para la aclimatación fueron previamente esterilizados en autoclave (Biobase, China) a 121 °C por 20 minutos. Las plantas fueron transferidas a los sustratos estériles en macetas individuales tras un lavado con agua destilada estéril para retirar los restos de agar presentes en las raíces de las plantas. Se colocó cada maceta en un frasco individual y se lo selló con plástico. Se realizaron orificios en el plástico cada 3 días, por un periodo de 30 días. Posterior a este tiempo, se retiró el plástico completamente para dar como finalizado el proceso de aclimatación. Las plantas sobrevivientes a este último proceso fueron trasladadas a macetas más grandes para el paso al invernadero de la USFQ (Figura 6). La variable analizada fue el tamaño de las plantas en los dos sustratos utilizados, por un periodo de 60 días. Las diferencias entre sustratos fueron evaluadas en base a pruebas T para cada variable, con un alfa de 0.05.

7 Resultados

7.1 Desinfección del material inicial.

Con el protocolo de desinfección estándar establecido en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal (Hipoclorito de sodio, etanol, Tween 20 y lavados con agua destilada estéril) no se logró la desinfección de los explantes de guayusa (Tabla 1). Por este motivo, se probó otros protocolos de desinfección donde se utilizó etanol e hipoclorito de sodio en diferentes concentraciones y tiempos sin lograr resultados satisfactorios (Tabla 1). Mediante tinción gram se logró observar la presencia de bacterias Gram positivas en los medios de cultivo, se procedió a la realización de distintos experimentos con antibiótico suplementado en los

medios de cultivo (Tabla 2). Se utilizó ciprofloxacino y cefatoxima que dio como resultado un 0% de eficiencia desinfección en ambos medios de cultivo. Mientras que la ampicilina 200 mg/L redujo la contaminación del 75% y 50% para ¼ MS y mWPM, respectivamente. Se realizó otra prueba con ampicilina (300 y 400 mg/L) y no se mostró contaminación ni necrosis de los explantes (Figura 7). El protocolo final utilizado para la desinfección de los explantes de guayusa fue el siguiente: lavado con agua y detergente, etanol 70% por 2 minutos, hipoclorito de sodio al 2% por 30 minutos, 5 gotas de Tween 20 y el uso de antibióticos (ampicilina 300 mg/L) suplementado en los dos medios de cultivo utilizados.

7.2 Introducción de explantes de guayusa a condiciones *in vitro*

En este ensayo de introducción de 48 segmentos nodales de guayusa a condiciones *in vitro*, se utilizaron dos medios de cultivo ¼ MS y mWPM, suplementados con ampicilina (300 mg/L) a los que se dio seguimiento por un periodo de 60 días.

Se observó un porcentaje de regeneración de brotes del 100% en los dos medios de cultivo utilizados. El tiempo promedio para la regeneración de los explantes sembrados *in vitro* fue de 16 ± 6.36 días y 17 ± 4.69 días en ¼ MS y mWPM respectivamente. El tamaño promedio de los brotes fue de $1,842 \pm 0,839$ cm y $1,855 \pm 0,733$ cm para ¼ MS y mWPM respectivamente. Se encontró brotes de mayor tamaño en el medio mWPM; sin embargo, al realizar la prueba T tanto para el tamaño de los brotes ($p=0,9459$) y la tasa de crecimiento ($p=0,9635$), no se encontraron diferencias significativas entre los medios de cultivo utilizados (Tabla 3). En la Figura 8, se puede observar que el mayor crecimiento se obtuvo entre semana 1 a la 4, mientras que en la semana 5 a 8 el crecimiento disminuyó. Por otro lado, en la Figura 9, se puede observar la tasa de crecimiento que se presentó en cada semana en los distintos medios de cultivo (¼ MS y mWPM).

Adicionalmente, se observó la presencia de raíces espontáneas en algunos de los brotes. En ¼ MS se obtuvo raíces espontáneas en 6 de 24 brotes (25%) y en mWPM en 2 de 24 brotes (8,33%). Estas plántulas fueron trasladadas a la fase de aclimatación directamente.

7.3 Enraizamiento de plántulas de guayusa

Para inducir el enraizamiento de las 40 plántulas que no generaron raíces, se probaron dos medios de cultivo $\frac{1}{4}$ MS y mWPM suplementados con ampicilina (300 mg/L) y dos concentraciones de la hormona ácido indol- butírico IBA (9.1 y 18.2 μ M) en presencia o ausencia de carbón activado (3 g/L). La aparición de raíces se observó a partir de los 30 días en 31 plántulas. Se realizó un ANOVA para analizar el efecto de los medios de cultivo y la concentración de hormonas en el número de raíces y el porcentaje de plantas enraizadas. Se observó que ninguno de los tratamientos analizados mostró diferencias significativas ($p=0.534$).

Se observó que el mayor porcentaje de enraizamiento se dio en los tratamientos en ausencia de carbón activado, mostrando un 100% de enraizamiento para los dos medios de cultivo suplementados con las dos concentraciones de IBA. Mientras que se obtuvo un enraizamiento del 33,3 al 62,5% en presencia de carbón activado (Tabla 4, Figura 10). Por otro lado, para el número de raíces, se observó mayor cantidad de raíces en el medio de cultivo mWPM + 300 mg/L Amp + 9.1 μ M en un periodo de 90 días ($2,5 \pm 0,5$ número de raíces (Figura 11).

7.4 Aclimatación de plantas de guayusa

La eficiencia de aclimatación de las 31 plántulas de guayusa *in vitro* en los dos sustratos analizados (Turba, y Tierra negra con turba), se evaluó midiendo el tamaño de las plantas en un periodo de 30 días. Se observó crecimiento significativamente mayor en el sustrato turba, comparado con el sustrato tierra y turba ($p=0,0003$). Se obtuvo plantas con tamaño promedio entre $10,1 \pm 3,5$ cm y $3,5 \pm 2,5$ cm en cada sustrato analizado respectivamente (Tabla 5). El porcentaje de supervivencia fue del 57% y 43% para turba, y tierra negra con turba, respectivamente (Figura 12). Después de 30 días de aclimatación, se realizó el paso de las 31 plantas a macetas grandes con turba, debido a que los mejores resultados se obtuvieron en este sustrato y se obtuvo un porcentaje de supervivencia en invernadero del 64,5%. En las Figuras 13 y 14 se muestra imágenes de las plantas en los dos sustratos utilizados y en invernadero.

8 Discusión

8.1 Desinfección del material inicial.

Para este experimento se utilizaron explantes jóvenes, provenientes de plantas maduras podadas. Se realizaron varios tratamientos de desinfección que dieron como resultado un 90,9 a 100% de contaminación en los explantes. Debido a esta incapacidad de desinfección, se realizó una búsqueda de sustancias antimicrobianas (antibióticos), por su capacidad de controlar con éxito la contaminación con bacterias en el cultivo de tejidos, esto se da por medio de la inhibición del crecimiento celular en un gran número de especies de plantas (Luna *et al*, 2009). Se procedió a realizar una prueba de tinción Gram con el propósito de identificar el tipo de bacteria (Bacilos Gram positivos) que se encontraba presente en los medios de cultivos, para proceder a decidir el tipo de antibiótico adecuado para impedir la proliferación de dichos microorganismos.

Los cultivos de tejidos vegetales pueden presentar contaminación por una gran gama de bacterias gram positivas o negativas, que en distintas ocasiones pueden ser específicas de la especie (Wojtania *et al*, 2005). Esto quiere decir que la contaminación se encuentra en el interior de las células, en los espacios intracelulares o en los haces conductores, por lo que se crea un sistema de protección hacia los agentes químicos que pueden presentarse en la etapa de desinfección inicial del cultivo *in vitro* o en los subcultivos, permitiendo la colonización de la superficie o el interior del explante (Hernández & Gonzáles, 2010).

Por otro lado, la contaminación también puede aparecer en los medios de cultivos, ya que es una fuente de nutrientes para el crecimiento microbiano, los mismos que compiten con los tejidos vegetales produciendo toxinas que son perjudiciales para las plantas (Msogoya *et al*, 2012). La contaminación de explantes puede interferir en la tasa de crecimiento ocasionando la muerte o la oxidación de la planta.

Se ha comprobado la eficiencia del uso de la cefatoxima, ciprofloxa y ampicilina en cultivos *in vitro* para bacterias gram positivas (Mathias & Mukasa, 1987; Wojtania *et al*,

2005; Velu & Baskaran, 2012). Se ha demostrado que la presencia de cefatoxima en el medio de cultivo logra promover el crecimiento y la morfogénesis que se da en cultivos de callos de cebada, donde se probó concentraciones de 60 y 100 g/ml y se observó crecimiento de los callos en un 75% a comparación de los controles realizados sin antibiótico (Mathias & Mukasa, 1987). Por otro lado, en *Pelargonium* se utilizaron concentraciones de 250 mg/L cefatoxima donde se obtuvo un porcentaje del 37% de eficiencia de desinfección en los brotes cultivados, pero mostró brotes más cortos y hojas amarillas a comparación de la carbenicilina, otro antibiótico utilizado para la siembra de esta especie (Wojtania *et al*, 2005). Además, estudios han demostrado que el uso de la ciprofloxacina en concentración 10 mg/L logra inhibir el crecimiento de bacterias gram positivas en cultivos *in vitro* de *Withania somnifera* (Velu & Baskaran, 2012). Sin embargo, con la guayusa hubo un efecto contrario, ya que los antibióticos mencionados no lograron inhibir la contaminación de los explantes.

Se identificó un porcentaje de desinfección del 100% en los estudios realizados con antibiótico. Estos resultados son similares a la investigación realizada por Luna (2009) donde menciona la presencia de bacterias endógenas en una especie del género *Ilex* (*Ilex dumosa*). En este trabajo se probó varios antibióticos en el medio de cultivo, entre los cuales se experimentó: estreptomycin (200 mg/L), cloranfenicol (50 mg/L), cefatoxima (0.25, 0.50 y 1 mg/L), ampicilina (200 mg/L) y los resultados demostraron la inhibición del crecimiento de bacterias a los 30 días de cultivos que permitieron el 100 % de regeneración de brotes en las plantas con el uso de ampicilina. Por este motivo, se procedió al uso del antibiótico ampicilina en una concentración de 300 mg/L, ya que con esta concentración de antibiótico los explantes regeneraron sin mostrar contaminación. Al igual que los resultados en guayusa la contaminación se presentó en la primera semana de cultivo, lo que sugiere que es un hecho típico de bacterias endógenas que se encuentran en plantas aparentemente sanas (Luna, 2009).

8.2 Introducción de explantes de guayusa a condiciones *in vitro*

En varios estudios se ha demostrado que la propagación *in vitro* por medio de estacas es uno de los métodos más eficiente en términos de rapidez, costos y manejo (García *et al*, 2005;

Sansberro *et al*, 2000; Sansberro *et al* 2001). Como se pudo observar en nuestros resultados, los segmentos nodales de guayusa regeneraron brotes en ambos medios de cultivo ($\frac{1}{4}$ MS y mWPM), sin mostrar diferencias significativas en el porcentaje de brotes entre los medios de cultivo utilizados. Es importante tomar en cuenta el proceso de poda inicial debido a que el uso de material juvenil proporciona mayor respuesta en las fases de desinfección, introducción de explantes y enraizamiento. Como menciona Sansberro *et al* (2000), en el cultivo *in vitro* de yerba mate hubo mejor respuesta del material juvenil (80%) a diferencia del material adulto (30%), esto se asimila a la regeneración de brotes de guayusa que fue del 100% al utilizar explantes jóvenes como material inicial. Otro dato importante a considerar es el número de brotes por explantes, en guayusa se observó 1 brote por estacas al igual que los resultados obtenidos en la yerba mate (Sansberro *et al*, 2000).

Tanto $\frac{1}{4}$ MS como mWPM, proporcionan todos los macro y micronutrientes que son esenciales para promover el crecimiento de las plantas del género *Ilex*, a pesar de que para tener eficiencia en la siembra hay que tomar en cuenta la naturaleza del explante y la etapa de cultivo (Jain & Haggman, 2007). Lo que diferencia a estos dos medios sólidos es la concentración (mg/L) de sales (Jain & Haggman, 2007). El medio de cultivo MS cuenta con altas concentraciones de sales, por este motivo para el cultivo de esta especie del género *Ilex* se diluyó MS cuatro veces. Según Sansberro *et al* (2000) y Sun *et al*, (2010) las plantas de este género tienen mejor respuesta en concentraciones bajas de sales. Por otro lado, el medio de cultivo mWPM es utilizado para el cultivo de brotes de plantas leñosas y para la propagación de arbustos y árboles (Jain & Haggman, 2007). A pesar de que no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de regeneración de brotes entre los medios de cultivos utilizados, se pudo notar mejor respuesta de los brotes en el medio de cultivo mWPM, lo que se pudo haber dado por la naturaleza leñosa característica de la guayusa (Dueñas *et al*, 2013). En estudios realizados sobre la yerba mate (Sansberro *et al*, 2000) los mejores resultados se observaron en el medio $\frac{1}{4}$ MS.

8.3 Enraizamiento de plántulas de guayusa

El tratamiento con la hormona ácido indol butírico (IBA) en dos concentraciones (9.1 y 18.2 μM) favoreció el enraizamiento de los brotes regenerados *in vitro* de *I. guayusa*. La selección de IBA como el único regulador de crecimiento, se debe a la capacidad de este tipo de auxina de inducir el alargamiento de las células, la división celular y la inducción de raíces (Pierik, 1997). IBA es comúnmente utilizada en cultivos *in vitro* de las especies *I. paraguriensis* (Sansberro, 2000), *I. dumosa* (Luna 2009), *I. glaba* (Sun *et al*, 2010), en donde se ha demostrado que al suplementar IBA en los medios de cultivo se obtiene un porcentaje alto de enraizamiento (75-100%), esto se compara con los resultados obtenidos en este trabajo (100% en tratamientos en ausencia de carbón activado).

Según García *et al* (2005), en la fase de enraizamiento de leñosas el uso del tejido juvenil es importante para promover el crecimiento de raíces. Se ha observado en la yerba mate que el número de raíces se ve afectado por la edad de la planta madre y se observó que al utilizar material juvenil hubo un promedio entre 5-8 raíces por explante a diferencia de los explantes extraídos de plantas adultas en donde no se vio mas de 5 raíces por explante (Sansberro *et al*, 2000). Esto se puede comparar con los resultados obtenidos en este estudio, donde a partir de explantes jóvenes se obtuvo hasta 9 raíces por brote.

Para el número de raíces observadas, se realizó un ANOVA con el propósito de identificar diferencias significativas entre los ocho tratamientos analizados en donde se varió la concentración de la hormona IBA (9.1 y 18.2 μM) y la presencia o ausencia de carbón activado (3 g/L). Se pudo observar que los resultados del ANOVA realizado no mostraron diferencias significativas al momento de comparar todos los tratamientos. Por otro lado, el mejor tratamiento que dio como resultado mayor cantidad de raíces mayor porcentaje de enraizamiento fue con el medio de cultivo mWPM suplementado con ampicilina (300 mg/L) e IBA (9.1 μM), esto puede deberse a que las concentraciones bajas de auxinas predominan en la formación de raíces a comparación con las concentraciones altas que aumenta la formación de callos (Pierik, 1997).

Por otro lado, se utilizó carbón activado en los medios de cultivo con el propósito de observar una mejor respuesta en el enraizamiento de los cultivos; sin embargo, el porcentaje de enraizamiento fue menor que el de las plántulas cultivadas en ausencia de carbón activado, a pesar de que el carbón activado promueve el crecimiento y el desarrollo celular (Thomas, 2008). Por otro lado, la aparición de raíces se observó a partir de los 30 días (4 semanas) de cultivo en los tratamientos de enraizamiento, estos resultados son similares a los propuestos por Majada *et al* (2000), en donde el enraizamiento de yerba mate comenzó después de 4 semanas de cultivo en medios suplementados con IBA.

8.4 Aclimatación de plantas de guayusa

Se considera que para garantizar el desarrollo de las plantas hay que tener especial atención en las características y las necesidades físicas, químicas y biológicas que requieren las plantas siendo las más importantes la densidad del sustrato, la porosidad y la disponibilidad de agua y de aire (Puerta *et al*, 2011). Se observó mayor diferencia en el tamaño promedio de las plantas sembradas en el sustrato turba a diferencia del sustrato tierra negra con turba. El sustrato turba proviene de un musgo perteneciente al género *Sphagnum*, y es conocido como un material compacto que puede mantener hasta 20 veces su peso seco en agua, por lo cual mantiene húmedo el ambiente de la planta. *Ilex guayusa* crece en ambientes con altos índices de precipitación y humedad, por lo que su crecimiento se pudo ver beneficiado por la capacidad de retención de agua que presenta dicho sustrato (Dueñas *et al*, 2013; Alikaridis, 1987). La supervivencia en el invernadero de las plantas fue del 64.5% debido a que no todas las plantas de guayusa soportaron el cambio de ambiente desde el cuarto de cultivo al invernadero. Los resultados obtenidos en esta fase de aclimatación son similares a otros estudios *in vitro* realizados a especies del género *Ilex* donde se observó que en la fase de aclimatación según Sansberro (2001) y Sun *et al* (2010) se muestra una respuesta favorable con el uso del sustrato turba en las especies *Ilex argentina*, *I. brasiliensis*, *I. brevicuspis*, *I. dumosa*, *I. integerrima*, *I. microdonta*, *I. pseudoboxus*, *I. glaba*, *I. theezans* e *Ilex paraguariensis*.

9 Conclusiones

- El uso de antibiótico en los medios de cultivo en los protocolos de introducción de yemas axilares y enraizamiento de guayusa *in vitro*, es indispensable para controlar la contaminación. La desinfección de los explantes permite la regeneración de brotes sanos y el seguimiento en las posteriores fases de crecimiento.
- El proceso de poda de las plantas de guayusa utilizadas en la siembra *in vitro* es de gran importancia para comenzar la siembra.
- Se observó un porcentaje del 100% de regeneración de brotes de guayusa partir de segmentos nodales en los dos medios de cultivo ($\frac{1}{4}$ MS y mWPM) utilizados sin necesidad de la presencia de reguladores de crecimiento.
- El uso de la hormona IBA en concentraciones (9.1 y 18.2 μ M) resultó en un enraizamiento eficiente de las plántulas de guayusa sin diferencias significativas entre los tratamientos utilizados.
- Las plántulas de guayusa obtenidas en condiciones *in vitro* muestran mejor respuesta al ser aclimatadas en el sustrato turba debido a su capacidad de retención de humedad, ya que logra crear un ambiente similar al de la planta en campo.
- El proceso de cultivo *in vitro* de guayusa muestra tiempos prolongados de regeneración con un promedio total de 180 días desde la desinfección de explantes hasta el paso de plantas al invernadero. Las plantas de guayusa en invernadero mostraron un rango de tamaño promedio que se encontraba entre los 3,5 y 10,1 cm de longitud.

10 Recomendaciones

Para futuros ensayos de regeneración de plantas *in vitro* de guayusa, se recomienda el uso de material joven proveniente de la poda de las plantas madres extraídas del campo y mantenidas en invernadero.

Es importante incluir antibiótico en los medios de cultivo en todas las etapas del cultivo *in vitro* con el propósito de inhibir el crecimiento de microorganismos causantes de contaminación. Además, se recomienda una revisión del fotoperiodo utilizado en el cuarto de cultivo debido a que la guayusa es una planta con sensibilidad a la luz.

Así mismo, se recomienda un nuevo estudio utilizando el protocolo de desinfección de este experimento con la combinación de factores donde se incluya la prueba de otros reguladores de crecimiento, como el uso de giberelinas y ácido naftalenacético en distintas concentraciones, debido a que se reporta en la literatura el uso de estas dos hormonas en otras especies de *Ilex* para la fase de enraizamiento.

11 Referencias

- Alvarado, E. (2016). Guía técnica del cultivo de guayusa. *Jumandipro S.A.*
- Alikaridis, F. (1987). Natural constituents of *Ilex* Species. *Journal of Ethnopharmacology*, (20), 121-144
- Abreu, E., Castillo, M., Ascunce G & Gonzáles, G (2016). Efecto de antibióticos en la propagación *in vitro* de *Agave fourcroydes* Lem. *UCLV*. (16) 1 31:36.
- Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana* 20(1): 153-175.
- Bulevar, J. (2013). Contaminación en el cultivo celular, un mal común en el laboratorio. *Laboratorios Metrix*
- Burneo, Z. (2009) Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de los extractos totales de doce especies vegetales nativas del sur del Ecuador: *Adiantum poiretti* (Culantrillo), *Neonelsonia acuminata* (Zanahoria blanca), *Siparuna eggersii* (Monte de oso), *Ilex guayusa* (Guayusa), *Verbena litoralis* (Verbena), *Justicia colorata* (Insulina), *Oreocalix grandiflora* (Cucharillo), *Baccharis genistelloides* (Tres filos), *Artocarpus altilis* (Fruto del pan), *Costus comosus* (Caña agria), *Piper crassinervium* (Guabiduca) y *Croton wagneri* (Mosquera). Loja, Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja.

Castillo, A. (2009). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. INIA.

Cañal, M. J., Rodríguez, R., Fernández, B., Sánchez-Tames, R., & Majada, J. P. (2001). Fisiología del cultivo *in vitro*. Biotecnología vegetal. 1: 3-9.

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

Caranqui, J & Humanante, A. (s.f.) Estudio sobre la Taxonomía y Estado de Conservación de la Guayusa (*Ilex guayusa* Loes) del Cantón Pastaza. Fundación Runa Tarpuna.

Cardozo, C. (2003) Estudio *in vitro-in vivo* de la actividad antioxidante plantas medicinales. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

Carrión, G. (2011) Aislamiento biodirigido (in vitro) de compuestos antioxidantes antihiper glucemiantes a partir de *Ilex guayusa*. Loja, Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja.

Collahuazo, P. (2012) Plan de manejo de la especie guayusa en la comunidad Wapu. Chankuap. 1:44

Contero, F., Vinuesa, A., Moreno, J., Tuquinga, M & Paca N. (2015) Estrogenic activity of ethanolic extracts from leaves of *Ilex guayusa* Loes and *Medicago sativa* in *rattus norvegicus*. Pharmacologyonline. (2) 95-99.

Crespo, P. (2013) La guayusa: trayectoria y sentido. MFS: Programa de manejo forestal sostenible en la región andina.

Dueñas, J., Jarret, C., Cummis & Logan-Hines, E. (2016) Amazon guayusa (*Ilex guayusa*): A Historical and Ethnobotanical Overview. Fundación Runa.

Dueñas, J., Logan-Hines, E., Stimola, M., Montagnini, F., Humanate, A & Melican, N. (2013) Runa guayusa- Desarrollo de un sistema de cultivo agroforestal de *Ilex guayusa* Loes. Grupo Runa.

Dolce, N & Hebe R. (2006) Cultivo *in vitro* de ápices de *Ilex paraguariensis*: efecto del pretratamiento con medios líquidos sobre la brotación. *Laboratorio de Cultivo de tejidos. IBONE*, Corrientes, Argentina.

Esquivel, A & Escalant, J. (1996) Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. *Catie*. 1:30

Fundación RUNA. (s,f) Manejo Sostenible de Guayusa para Agricultores Familiares. Manual de buenas prácticas.

García, R., Vargas, J., Cetina, V & Villegas, A. (2005) Afecto del ácido indolbutírico (IBA) y tipo de esta en el enraizado de *Gmelia arbórea*. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol, 38 (4): 319-326.

Hawkings-Smith, R., Murashige, T. (1970). *In vitro* development of the isolated shoot apical meristem of angiosperms. *American Journal of Botany*. 57 (5): 562-568.

Hernández, Y & Gonzáles, M. (2010) Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Instituto nacional de ciencias agrícolas*. La Habana, Cuba.

Jain, M & Haggman, H. (2007) Protocols for Micropropagation of woody trees and fruits. Springer: Sección A: 3-15.

Jarret, Y. Mendoza, M., Valdivieso, M (2009). Control y prevención de la contaminación microbiana en la micropropagación de plantas. CENIC. (31)2, 1:5

Juaristi, M., López, S., Sarria, B., Bravo, B & Mateos, R. (2018) Absorption and metabolism of yerba mate phenolic compounds in humans. Food Chemistry 240: 1028-1038.

Krause, T & Ness, B. (2017) Energizing agroforestry: *Ilex guayusa* as an additional commodity to diversify Amazonian agroforestry systems. Taylor & Francis (13:1) 191-203, doi: 10.1080/21513732.2017.1303646

Luna, C., Collavino, P., Sansberro, P & Mroginski, L. (2009) Bacterial Contamination in *Ilex dumosa* (Aquifoliaceae) Cultures: Antibiotic Treatment. A Romano.

Majada, P., Sánchez, R., Revilla, M & Casares A. (2000) Micropropagation of *Ilex aquifolium*. *Lab. Fisiología Vegetal*, Oviedo, Spain

Mathias, R & Mukasa, C. (1987) The effect of cefotaxime on growth and regeneration of callus from four varieties of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant cells reports*. (6): 454-457

Msoyoya, T., Kanyagha, H., Mutigitu, J., Kulebelwa, M & Mamiro, D. (2012) Identification and management of Microbial contaminants of banana *in vitro* cultures. *Journal of applied biosciences*. (55): 3987-3994.

Montagnini, F., Somarriba, E., Murgueitio, E., Fassola, H & Eibl B. (2015) Sistemas agroforestales: Funciones productivas, socioeconómicas y ambientales. (402) ISBN: 978-958-9386-74-3

Oellig, C., Schunck, J & Schwack, W. (2017) Determination of Caffeine, theobromine and theophylline in Mate beer and Mate soft Drink by high-performance thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography*.

Pérez, S., Leyva, E., Magallanes, M., Arce, A., Méndez, A. (2016) Hongos contaminantes en el establecimiento *in vitro* de ápices de papa. Vol 27 (4) doi: <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.26063.69284>

Pedroza, J., Villacorte, W. (2009) Micropagación de *Ilex kunthiana* Triana & Planchon (Aquifoliaceae), una especie de gran importancia en programas de revegetalización. Vol 10 (3). Rev. Colombia Biotecnol.

Pierik, R. (1997) *In vitro* culture of higher plants. Springer Science. Kluwer Academic Publisher.

Puerta, C., Russian T & Ruiz, C. (2011) Producción de plántulas de pimentón (*Capsicum annum* L.) en sustratos orgánicos a base de mezclas con fibra de coco. Universidad experimental francisco de Miranda.

Radice, M., Cossio, N & Scalvenzi, L. (2016) *Ilex guayusa*: A systematic review of its Traditional Uses, Chemical Constituents, Biological Activities and Biotrade Opportunities. Mol2Net, doi: 10.3390/MOL2NET-02-M

Radice, A & Sablón, N. (2017) The market of *Ilex guayusa*. Products, stakeholders and trends in the Ecuadorian Amazon Region. Modec. (3), doi: 10.3390/mol2net-03-04849

Radice, M & Vidari, G. (2007) Caracterización fitoquímica de la especie *Ilex guayusa* Loes. y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial. Ciencias de la vida. ISSN 1390-3799.

Ross, S., Arriaga, M & Pechi, E. (2017) Establecimiento *in vitro* de Yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St-Hil) nativa de Uruguay

Sansberro, P., Rey, H., Collavino, M. (1998) *In vitro* plant regeneration of *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). Facultad de Ciencias Agrícolas.

Sansberro, P., Rey, H., Mroginski, L & Collavino, M. (1999) *In vitro* regeneration of *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). Vol 35: 401-402.

Sansberro, P., Rey, H., Bernardis, A., Luna, C., Collavino, M & Mroginski, L. (2000) Plant Regeneration of *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae) by *in vitro* culture of Nodal Segments. *Biocells* Vol 24 (1): 53-63

Sansberro, P., Rey, H & Mroginski, L. (2001) *In vitro* Culture of Zygotic Embryos of *Ilex* Species. Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Botánica del Nordeste, C.C. 209, (3400) Corrientes, Argentina

Smith, R. (2006). Regulator Factors. Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments. Academic Press. 3era edición: 33-36.

Sun, Y., Zhang, D & Smagula, J. (2010) Micropropagation of *Ilex glabra* (L.) A. Gray. *HortScience*. 45 (5): 805-808.

Thomas, T. (2008) The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances. Elsevier*. 26 (6): 618-631.

Valenzuela, L & Armendáriz, S. (2008) Uso de antibióticos en medios de cultivo para reducir la presencia de agentes contaminantes en la propagación *in vitro* de Palma Datilera (*Phoenix dactylifera* L) Universidad Regional de Zonas Áridas. (8)

Velu, S & Baskara, C. (2012) Phytochemical analysis and *in vitro* antimicrobial activity of *Withania somnifera*. *J. Nat. Plan Resour*. Vol 2 (6): 711-716.

Yang, B., Zhu, J., Rong, L., Jin, J., Cao, D., Hui, L & Zhou, X. (2018) Tripernoids with antiplatelet aggregation activity from *Ilex rotunda*. *Photochemistry* 145: 179-185.

Wojtania, A., Pulawska, J & Eleonora Gabryszewska. (2005) Identification and elimination of Bacterial contaminants from Pelargonium tissue cultures. Journal of fruit and ornamental plant Research. Vol (13): 101-018.

12 Tablas

Tabla 1 Tratamientos de desinfección de segmentos nodales de guayusa. Se probaron diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio, etanol, Tween 20 y los tiempos de inmersión de cada uno.

Ensayo	Pretratamiento	Inmersión etanol 70% (min)	(NaClO) (%)	Tween (gotas)	Tiempo Inmersión (NaClO + Tween)	Porcentaje (%) de explantes contaminados
1	-	3	2.5	5	20	100
2	-	1	1.6	2	30	100
3* (Múltiples ensayos)	Agua jabonosa 10 min	1	1,6 o 2.5	2,4,5,6	10-30	90,9

Tabla 2 Tratamientos de desinfección de explantes en los distintos medios de cultivos suplementados con distintas concentraciones de antibióticos.

Antibiótico	Medio de cultivo	Concentración (mg/L)	N. explantes sembrados	N. explantes contaminados	Eficiencia desinfección (%)
Ampicilina	¼ MS	200	4	1	75
	mWPM		4	2	50
	¼ MS	300	4	0	100
	mWPM		4	0	100
	¼ MS	400	4	0	100
	mWPM		4	0	100
Ciprofloxacino	¼ MS	10	4	4	0
	mWPM		4	4	0
Cefatoxima	¼ MS	150	4	4	0
	mWPM		4	4	0
Control	¼ MS	0	4	4	0
	mWPM		4	4	0

Tabla 3 Resultados del tamaño de los brotes obtenidos después de la introducción *in vitro* de guayusa

Medio de cultivo (300 mg/L amp)	Tamaño del brote		Tasa de crecimiento	
	Promedio (mm)	Valor p	Promedio (mm/semana)	Valor p
1/4 MS	1,84 ± 0,83	0,95*	5,61 ± 4,58	0,96*
mWPM	1,85 ± 0,73		5,66 ± 4,46	

*No hubo diferencias significativas en los tratamientos probados para el tamaño y crecimiento total de los brotes.

*Los valores fueron obtenidos mediante pruebas T con un nivel de significancia del 0.05.

Tabla 4 Resultados del porcentaje de enraizamiento de plántulas de guayusa obtenidos en los distintos tratamientos

N. Tratamiento	Medio de cultivo + AMP	IBA (µM)	Carbon activado (mg/)	% Enraizamiento
1	1/4 MS	9.1	-	100
2			3	50
3		18.2	-	100
4			3	50
5	mWPM	9.1	-	100
6			3	62,5
7		18.2	-	100
8			3	33,3

Tabla 5 Crecimiento de las plantas de guayusa, provenientes de cultivo *in vitro*, en la fase de aclimatación con el uso de dos sustratos.

Sustratos para aclimatación	Promedio (mm)	Valor p
Turba	10,07 ± 3,5	
Tierra negra + turba (50:50)	7,46 ± 2,5	0,00033*

* Hubo diferencia significativa para los sustratos utilizados en la aclimatación

* Los valores fueron obtenidos mediante pruebas T y un nivel de significancia del 0.05.

13 Figuras



Figura 1 Proceso de preparación del material vegetal (paso de plantas con fundas de plástico a macetas grandes y podadas) proveniente de los viveros de RUNA al invernadero del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ para la obtención del material inicial para cultivo *in vitro*.

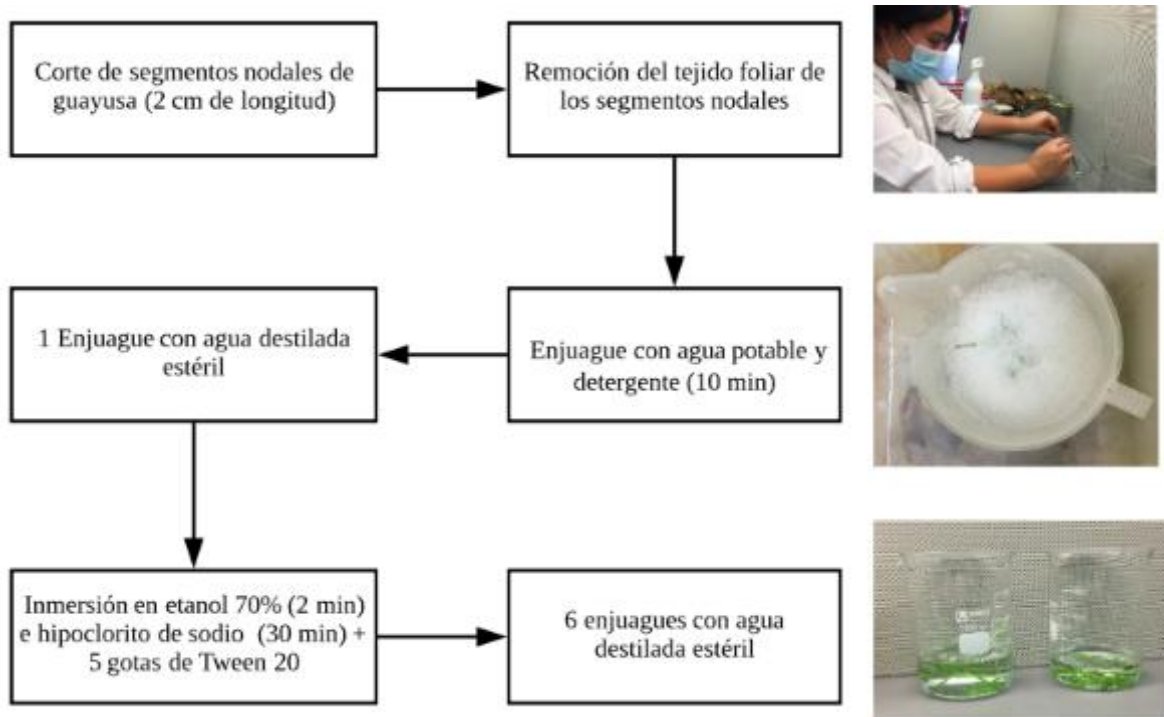


Figura 2 Proceso de desinfección de los segmentos nodales de 2 cm de longitud provenientes del invernadero del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ.

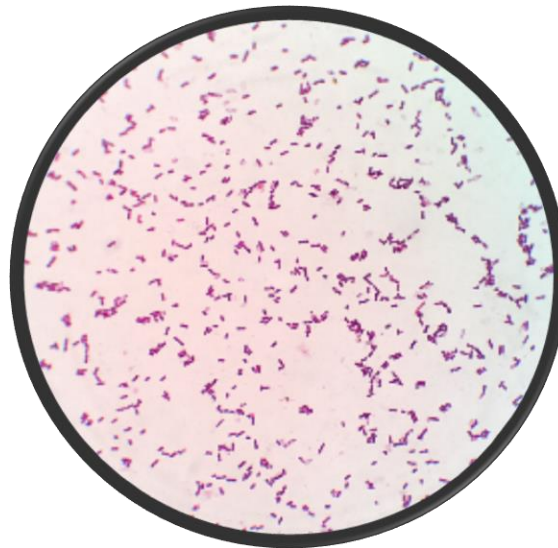


Figura 3 Tinción Gram de inóculos provenientes de explantes contaminados de guayusa en donde se identificó la presencia de Bacilos Gram positivos.

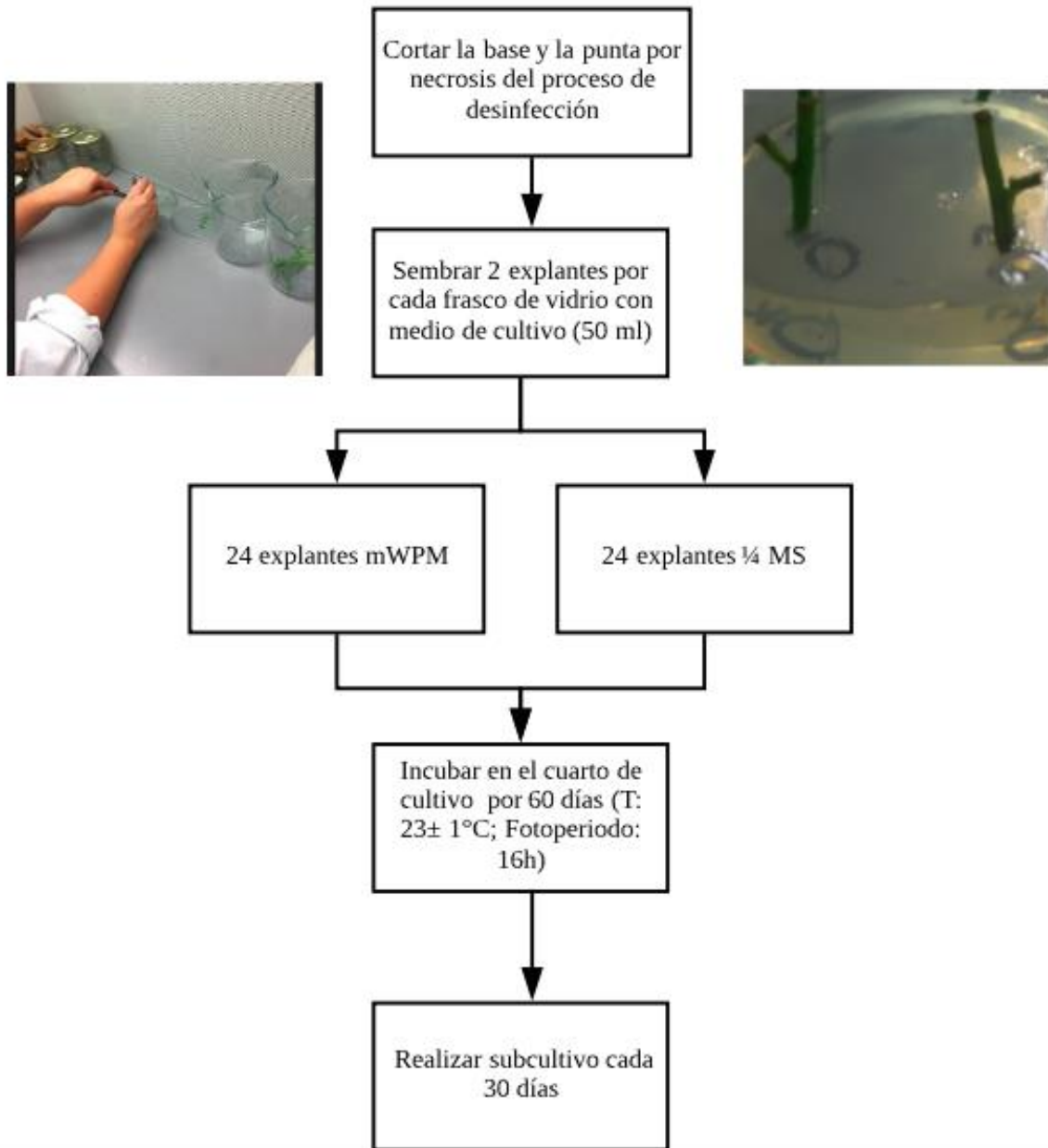


Figura 4 Proceso de introducción de explantes de guayusa a condiciones *in vitro* provenientes del ensayo de desinfección de explantes y sembrados en 2 medios de cultivo ($\frac{1}{4}$ MS y mWPM)

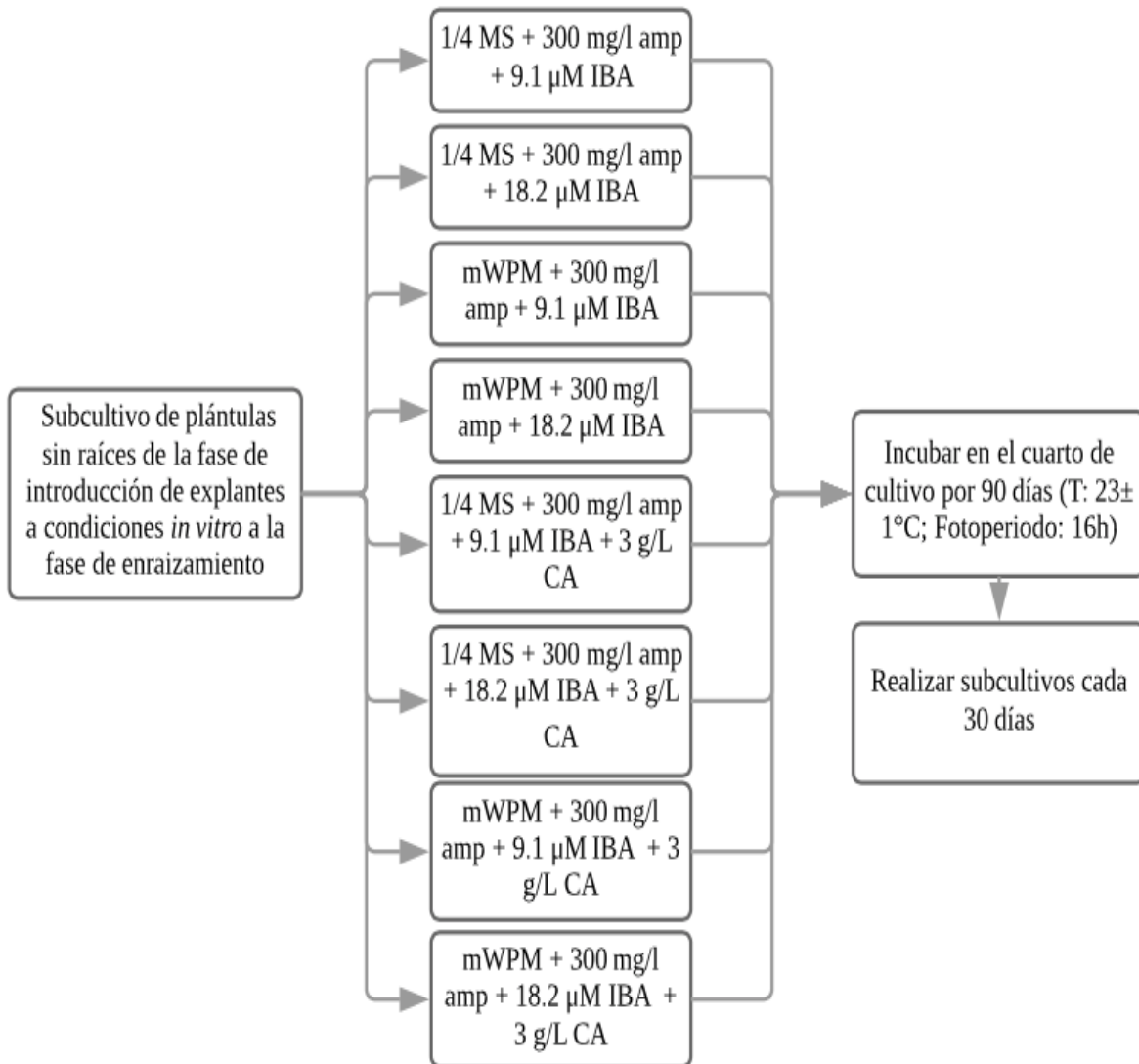


Figura 5 Proceso para enraizamiento *in vitro* de brotes de guayusa con la adición de la hormona IBA en dos concentraciones y carbón activado a los medios de cultivo.

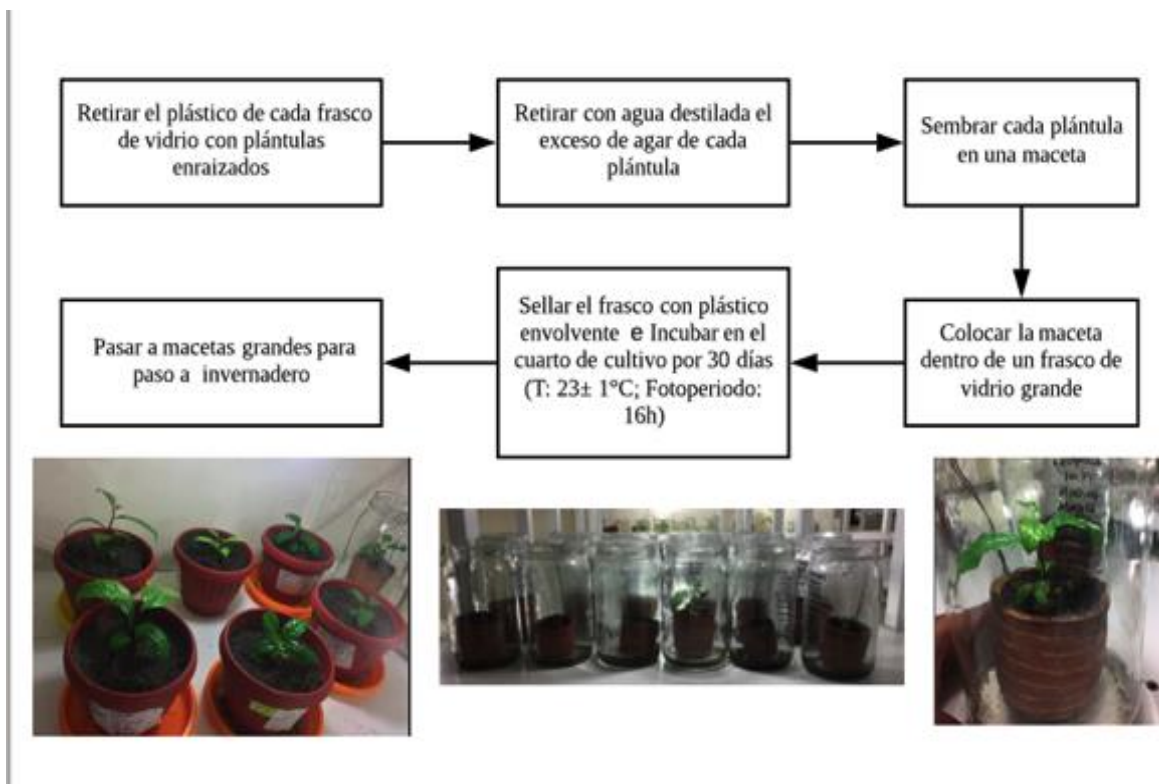


Figura 6 Proceso para aclimatación de plántulas *in vitro* provenientes del ensayo de enraizamiento en dos sustratos distintos: Turba y Tierra + turba.

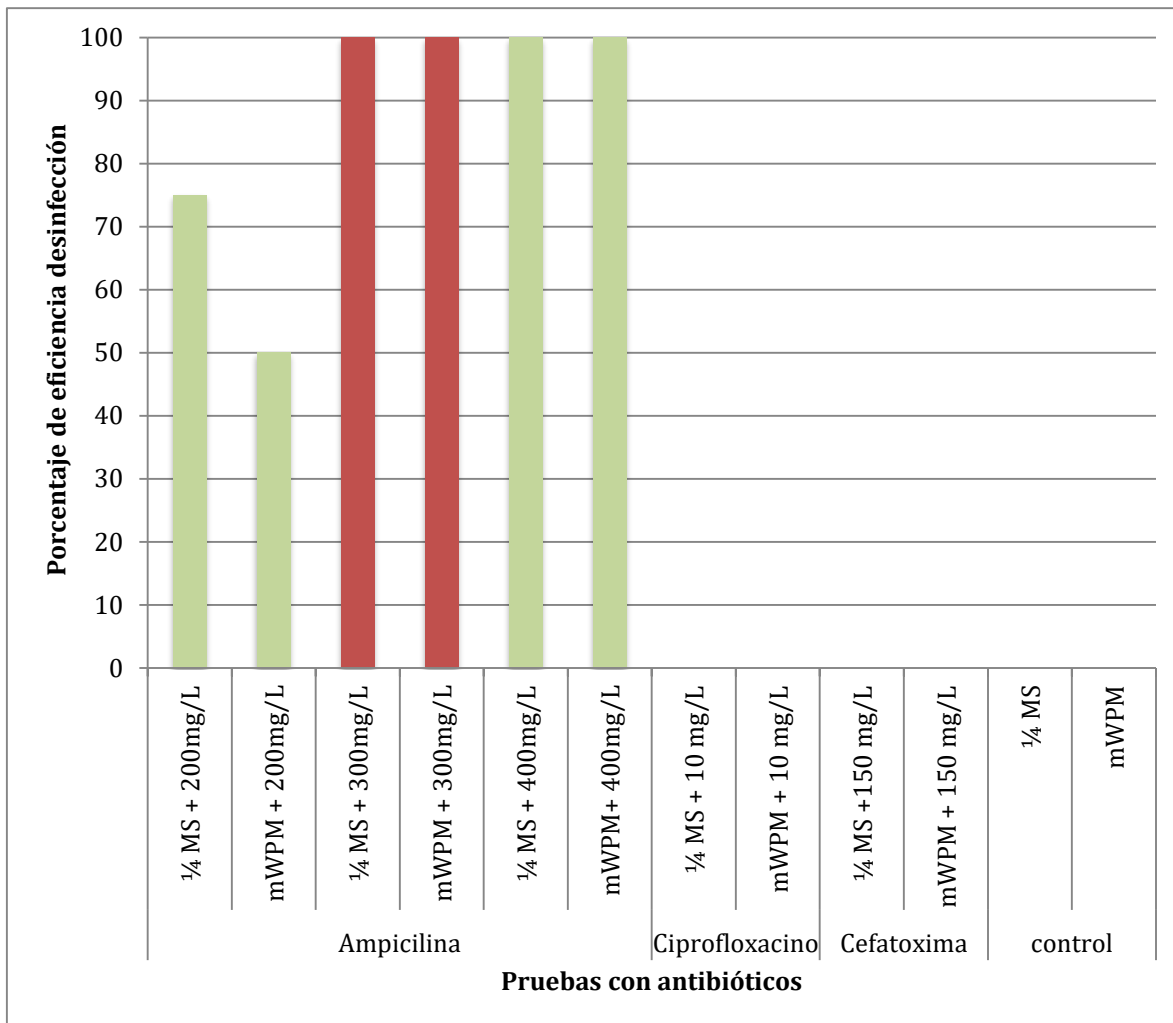


Figura 7 Porcentaje de eficiencia de desinfección mediante pruebas con antibióticos suplementados en los medios de cultivo 1/4 MS y mWPM

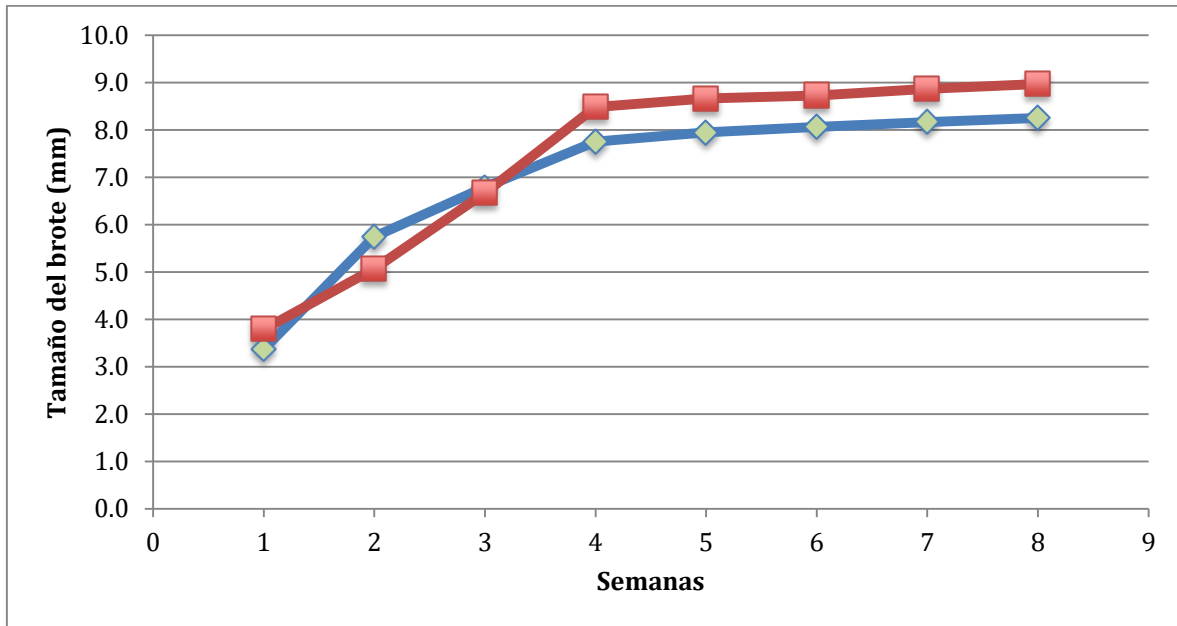


Figura 8 Tamaño promedio de brotes (mm) en un periodo de 60 días de los dos tratamientos utilizados: Medio de cultivo ¼ MS + 300 mg/L Amp (azul) y Medio de cultivo mWPM + 300 mg/L Amp (rojo).

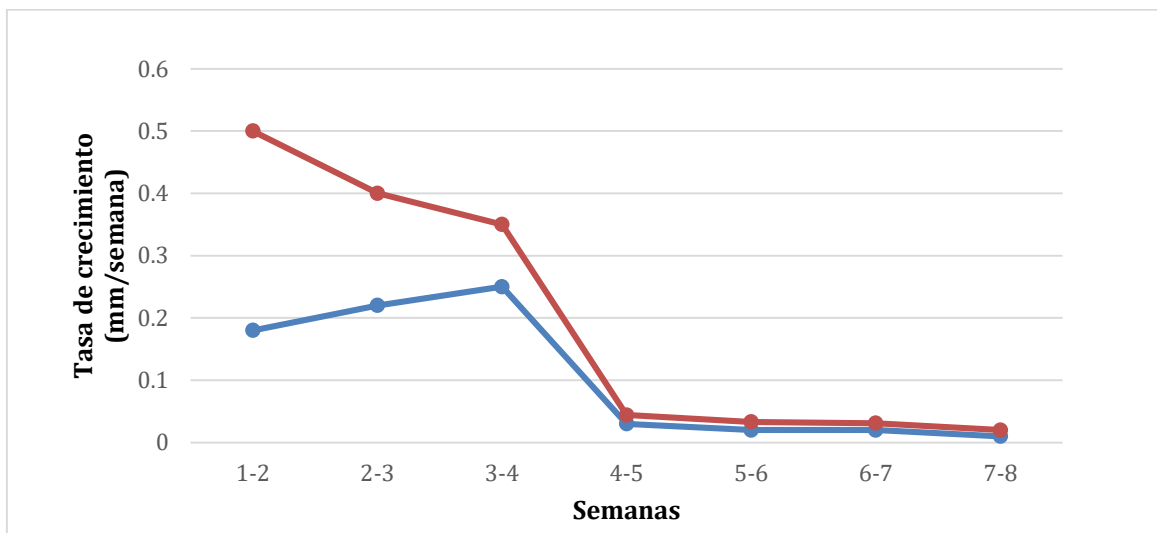


Figura 9 Tasa de crecimiento de guayusa en un periodo de 60 días de los dos tratamientos utilizados: Medio de cultivo ¼ MS + 300 mg/L Amp (azul) y Medio de cultivo mWPM + 300 mg/L Amp (rojo).

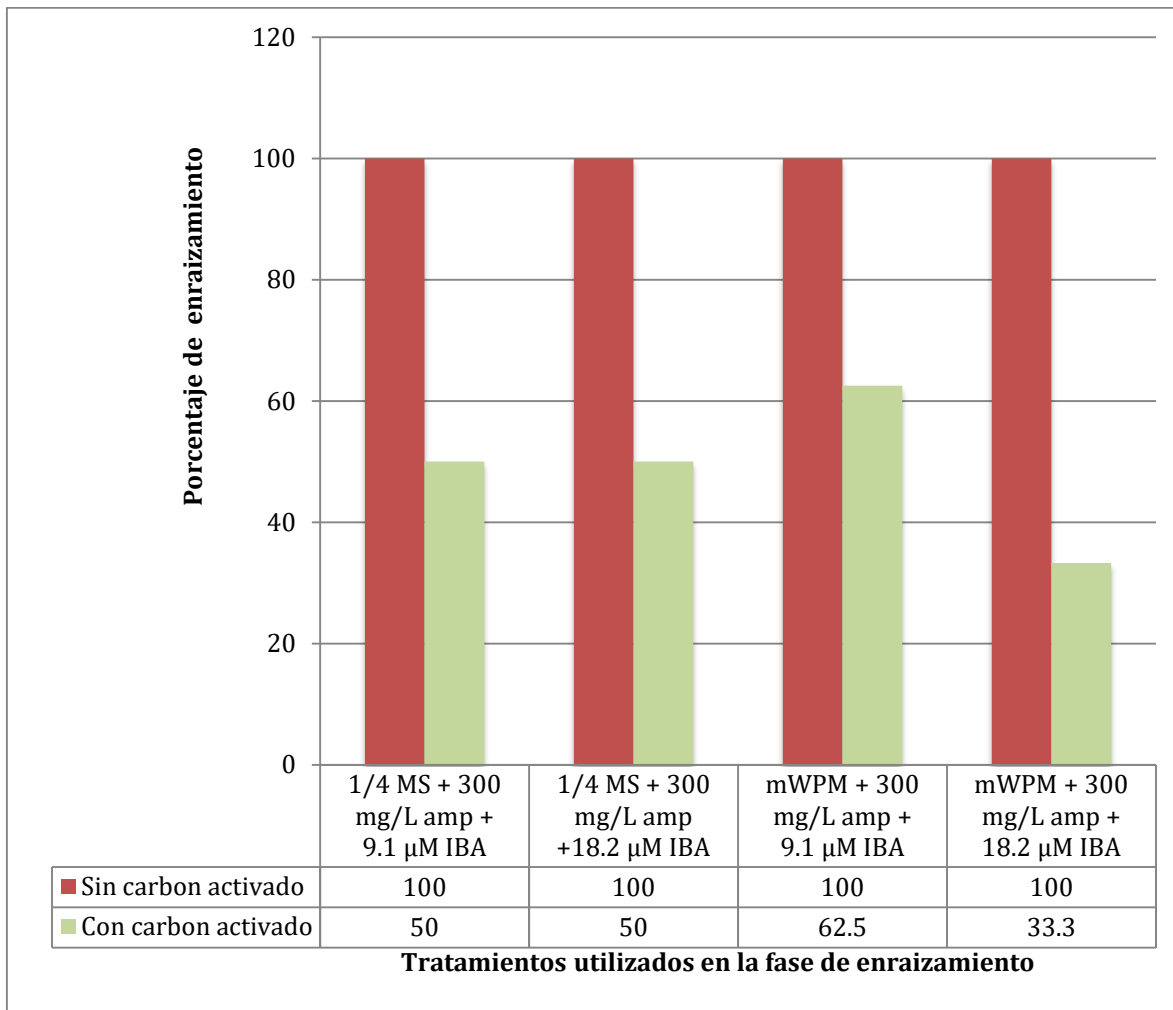


Figura 10 Porcentajes de enraizamiento en los ocho tratamientos utilizados en presencia y ausencia de carbón activado con distintas concentraciones (9.1 y 18.2 μM) de IBA.

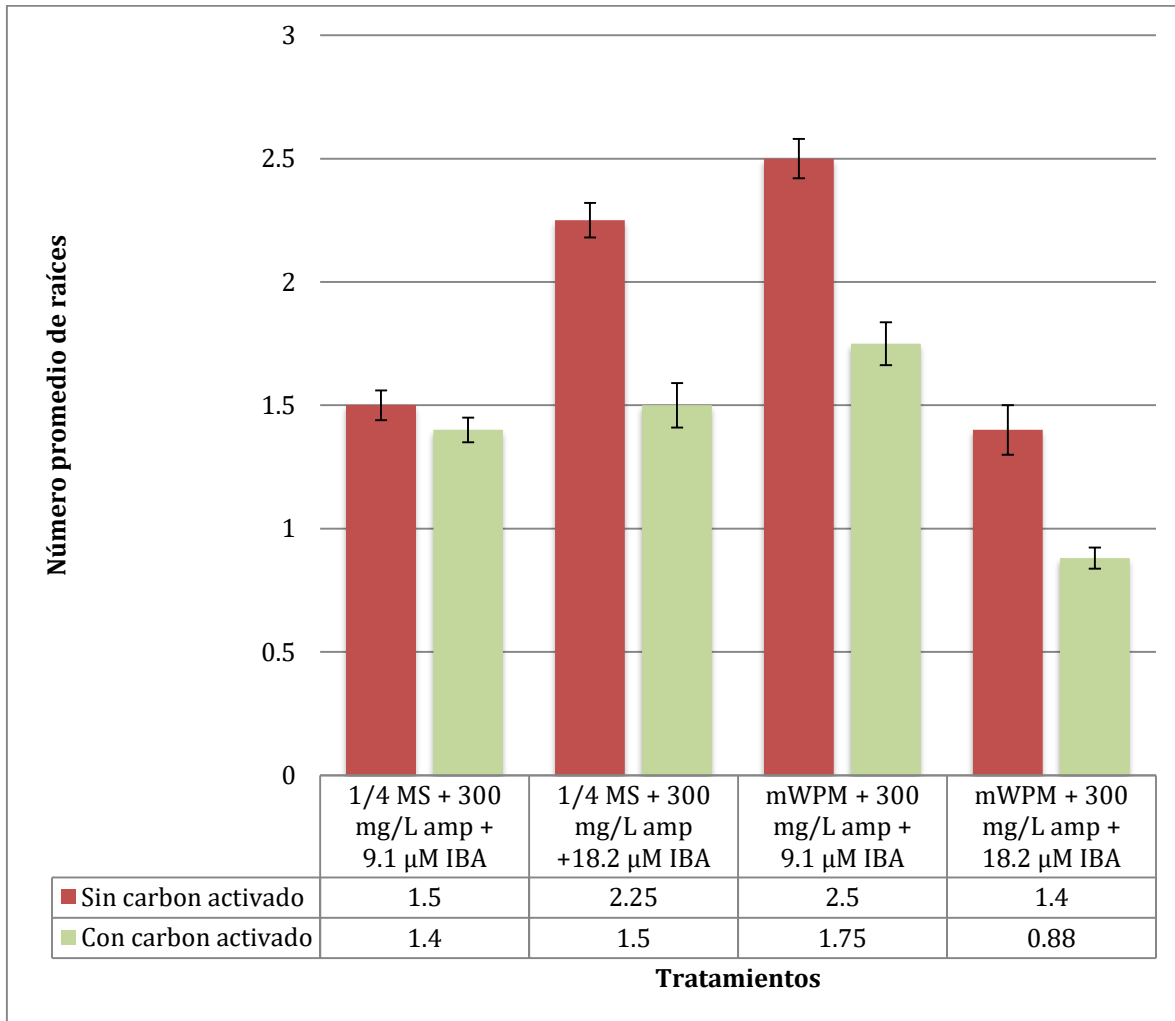


Figura 11 Número promedio de raíces en ocho tratamientos de enraizamiento en presencia o ausencia de carbón activado con distintas concentraciones (9.1 y 18.2 μM) de IBA.

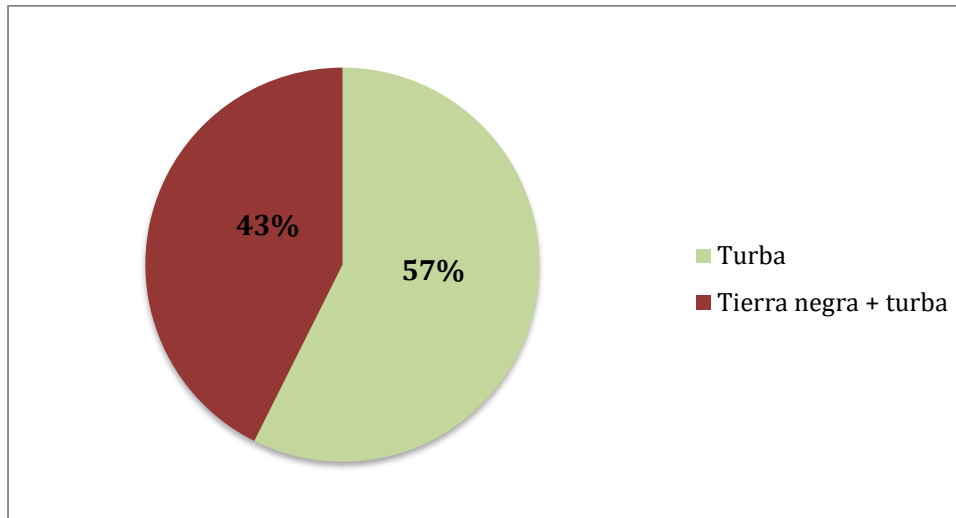


Figura 12 Porcentaje de supervivencia de plantas de guayusa en la fase de aclimatación con los dos sustratos utilizados (Turba y Tierra negra + turba).

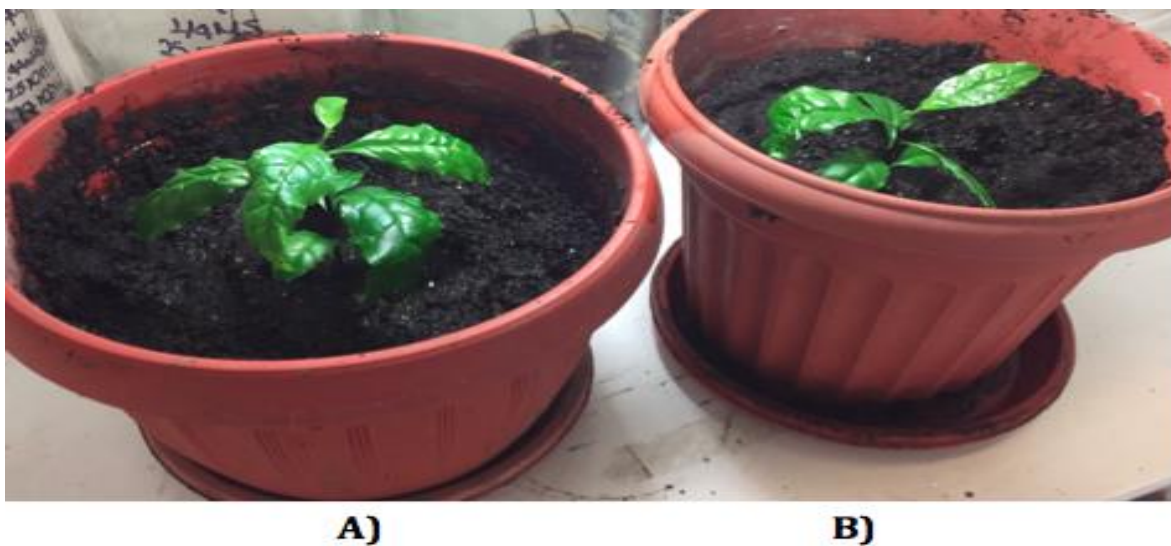


Figura 13 Plantas de guayusa aclimatadas en el cuarto de cultivo a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 16 horas de luz a los 180 días: A) sustrato turba B) sustrato tierra negra + turba.



Figura 14 Plantas de guayusa provenientes del cuarto de cultivo a los 220 días de aclimatación traspasadas a condiciones de Invernadero.