

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA  
ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADOS

**Evaluación de métodos de desinfección y  
tipos de explante de la especie vegetal  
*Piper oradendron* Trel. & Standl., para el  
establecimiento de su cultivo *in Vitro*.**

Informe de tesis  
Presentado por

**Hernán Perla González**

Para optar al título de

**Maestría Multidisciplinaria en Producción y  
Uso de Plantas Medicinales**

Guatemala, noviembre de 2007

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**JUNTA DIRECTIVA**

Óscar Manuel Cobar Pinto, Ph.D.	DECANO
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto	SECRETARIO
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M.A.	VOCAL I
Licda. Liliana Vides de Urizar	VOCAL II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	VOCAL III
Br. Mariesmeralda Arriaga Monterroso	VOCAL IV
Br. José Juan Vega Pérez	VOCAL V

**CONSEJO ACADÉMICO  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

Óscar Manuel Cobar Pinto, Ph.D. , DECANO

Licda. Anne Liere de Godoy, M.Sc.

Dr. Jorge Luis De león Arana

Dr. Jorge Erwin López Gutiérrez

Félix Ricardo Veliz Fuentes, M.Sc.

## DEDICATORIA

Dedico esta tesis a:

**DIOS:** Por brindarnos la vida y la posibilidad de aprender y servir.

**MIS HIJOS:** Jessica Alejandra y César Hernán  
Sirva este esfuerzo para inspirar su propia formación.

**MIS PADRES:** Virgilia González Barrera y Demecio Perla Rivera.  
Por su infinito amor y apoyo incondicional.

**VILMA DUARTE:** Por su constante apoyo y amor.

**A LOS DISTINGUIDOS PROFESORES:**  
Lic. Armando Cáceres  
Lic. Benito Soler  
Licda. Erica Márquez

**A LA UNIVERSIDAD RAFAEL LANDIVAR**

**AL INSTITUTO DE AGRICULTURA, RECURSOS NATURALES Y AMBIENTE – IARNA -.**

**A TODOS MIS COMPAÑEROS Y COMPAÑERAS**

## INDICE GENERAL

	Página
CARATULA	1
AUTORIDADES UNIVERSITARIAS	2
DEDICATORIA	3
INDICE GENERAL	4
INDICE DE FIGURAS	6
INDICE DE CUADROS	6
RESUMEN EJECUTIVO	7
1. INTRODUCCIÓN	9
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	11
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. MARCO TEÓRICO	14
4.1. Antecedentes	14
4.1.1. Especies del género <i>Piper</i> promisorias en Latinoamérica	14
4.1.2. Estudios realizados en Guatemala	15
4.2. Cultivo de tejidos vegetales	17
4.2.1. Explante	17
4.2.2. Asepsia	18
4.2.3. Medios de cultivo	18
4.2.4. Reguladores de Crecimiento	19
4.3. Propagación de Piperáceas	20
5. OBJETIVOS	21
5.1. General	21
5.2. Específicos	21
6. HIPOTESIS	22
7. MATERIALES Y METODOS	23
7.1. Descripción del lugar de trabajo	23
7.2. Material Experimental	24
7.2.1. Material Vegetal	24
7.2.2. Equipo de Laboratorio	26

7.2.3. Instrumentos	26
7.2.4. Cristalería	27
7.2.5. Materiales	27
7.2.6. Reactivos	27
7.3. Metodología	28
7.3.1. Fase de pruebas preliminares	28
7.3.1.1. Desinfección del material vegetal en el laboratorio	29
7.3.2. Fase definitiva de experimentación	30
7.4. Factores evaluados	33
7.5. Tratamientos y variables de respuesta evaluados.	33
7.6. Análisis estadístico	36
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
8.1. Pruebas preliminares	38
8.2. Fase definitiva de experimentación	38
9. CONCLUSIONES	42
10. RECOMENDACIONES	43
11. BIBLIOGRAFIA	44
12. ANEXOS	46

## INDICE DE FIGURAS

	Página
Fig. 1. Colecta de <i>Piper oradendron</i> Trel. & Standl	24
Fig. 2. Detalle de rama con inflorescencia	25
Fig. 3. Planta de <i>Piper oradendron</i> antes de su ingreso al Invernadero	26
Fig. 4. Material vegetal utilizado en las pruebas preliminares	29
Fig. 5. Esquejes de plantas colectadas de <i>P. oradendron</i>	31.
Fig. 6. Esquejes sembrados en bolsas de polietileno conteniendo tierra negra y arena volcánica	31
Fig. 7. Brote de <i>Piper oradendron</i> obtenido de las estacas sembradas en el invernadero, que se utilizaron como explantes en el experimento.	32
Fig. 8. Explantes de yema lateral del <i>P. oradendron</i> cultivados en medio nutritivo, pruebas preliminares.	35
Fig. 9. Explante de yema apical de <i>P. oradendron</i> cultivado en medio nutritivo, pruebas preliminares.	35
Fig. 10. Explante de hoja de <i>P. oradendron</i> cultivada en medio nutritivo, en pruebas preliminares.	36
Fig. 11. Explante de hoja con contaminación.	39
Fig.12. Explante de yema apical de <i>P. oradendron</i> mostrando contaminación fúngica.	39
Fig. 13. Explante de yema apical de <i>P. oradendron</i> cultivado en medio nutritivo, mostrando contaminación fúngica y bacterial.	40
Fig. 14. Tubo con explante necrótico sin contaminación	41

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos y variables de respuesta evaluados.	34
--	----

## RESUMEN

Considerando el potencial comercial de la especie *Piper oradendron* Trel & Standl en el campo de las plantas aromáticas y/o medicinales y con el fin de realizar el establecimiento del cultivo *in vitro*, como una alternativa de producción masiva y buscando evitar su depredación en poblaciones silvestres, se evaluaron diferentes métodos de desinfección superficial para los explantes, haciendo una combinación entre concentraciones de hipoclorito de sodio (1, 1.5 y 2 % v/v) y tiempos de inmersión (5, 10 y 15 minutos). Los explantes evaluados fueron, en la fase preliminar: fragmento de hoja, yema lateral con fragmento de tallo y yema apical, provenientes de plantas extraídas de poblaciones silvestres de la costa sur de Guatemala. En la fase definitiva del experimento solamente se utilizaron los explantes de yema lateral con fragmento de tallo y yema apical, provenientes de estacas cultivadas en el invernadero, que fueron sometidas a tratamiento con fungicida y bactericida, por 30 días.

Los explantes fueron sembrados en tubos de cultivo de vidrio de 25 x 150 mm, conteniendo 10 ml del medio nutritivo Murashige y Skoog (1962) completo (Ver anexos), suplementado con sacarosa al 3 %, Agar 7 g/l, bencilaminopurina (BAP) 0.1 mg/l y ácido naftalenacético (ANA) 0.05 mg/L. Los explantes se incubaron a 27 +- 2 grados centígrados y 16 horas de luz diarias a una intensidad lumínica de 1000 lux. Los datos se obtuvieron 15 días después de la siembra.

El hipoclorito de sodio (NAOCl), en las concentraciones y tiempos de inmersión evaluados, no logró controlar los microorganismos contaminantes en los tres tipos de explantes evaluados y pudo apreciarse un efecto de quemadura en los mismos, como resultado del contacto con el desinfectante.

Los resultados observados en el presente trabajo demuestran la dificultad que presenta esta especie para ser cultivada *in Vitro*, lo que determina la necesidad de continuar con las investigaciones, utilizando diferentes desinfectantes, períodos de cuarentena en el invernadero más prolongados y con tratamientos

intensivos de fungicidas y bactericidas sistémicos y el uso de antibióticos directamente en el medio nutritivo.



## 1. INTRODUCCIÓN

El género *Piper* en Guatemala tiene una amplia distribución geográfica, principalmente en los departamentos de Alta Verapaz e Izabal y su importancia etnobotánica ha venido dilucidándose a través de algunos estudios. Tradicionalmente se utilizan algunas especies para el tratamiento de diferentes afecciones de la salud, pero se desconoce las propiedades de muchas de ellas.

La Facultad de Agronomía y la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, han venido desarrollando esfuerzos de investigación con algunas especies de este género, principalmente a través del proyecto “Caracterización de aceites esenciales y extractos de ocho especies mesoamericanas de Piperáceas y evaluación de la actividad biocida para su aprovechamiento como nuevos recursos aromáticos y/o medicinales”. En dicho proyecto se recomienda continuar con la investigación de las especies *P. jacquemontianum*, *P. donnell smithii* y *P. oradendron*, por su composición química interesante y actividad biocida mostrada.

Las características descubiertas en cuanto a su rendimiento de aceite esencial, composición química y actividad microbicida, aumenta la demanda de material vegetal para la incorporación de dichas especies a procesos industriales futuros. Sin embargo no se tiene definida la tecnología de propagación y producción agrícolas, por lo que aún queda mucho trabajo de investigación relacionado con la domesticación de dichos materiales.

Adicionalmente dichas especies corren el riesgo de perderse si solamente se realizan extracciones de las poblaciones silvestres, así también por la deforestación que se está dando en los bosques naturales donde ellas crecen.

El cultivo de tejidos vegetales se presenta como una alternativa de conservación y de propagación masiva. Dicha técnica abarca un grupo de técnicas que consisten en aislar y cultivar ciertas partes de la planta (explantes) como células, tejidos y órganos y proporcionarles condiciones físicas y

químicas artificiales para que expresen su capacidad morfogénica (Roseel y Villalobos, 1990). (1)

El presente trabajo de investigación constituye uno de los pasos preliminares para poder emplear la técnica del cultivo de tejidos vegetales, como una alternativa viable para iniciar la propagación de la especie *Piper oradendron* Trel. & Standl., (1952), lo cual posteriormente puede constituirse en información útil para ser aplicada a las otras dos especies mencionadas (*P. Jacquemontianum* y *P. donnell smithii*).

Se evaluaron métodos de desinfección con Hipoclorito de sodio (Concentraciones y tiempos de inmersión) y 2 tipos de explantes (nudo con yema axilar y yema apical). Se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), adicionado con 0.1 mg/l de BAP (bencilaminopurina) y 0.05 mg/l de ANA (ácido naftalenacético), donde se sembraron los explantes. Lo que se pretendió al utilizar el medio MS y esas concentraciones hormonales, fue hacer observaciones preliminares de la respuesta de los explantes en dichas condiciones.

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Rafael Landívar y tuvo una duración de 2 meses incluyendo la etapa de investigación y elaboración del informe final y forma parte de los prerrequisitos para obtener el grado de Maestro en Artes de la Maestría Multidisciplinaria en Producción y Uso de Plantas Medicinales –MUPLAN- de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

## 2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Un buen número de especies silvestres vegetales son utilizadas para satisfacer las necesidades de parte de la población rural debido a su accesibilidad, bajo costo y uso con fines culturales y sociales, alimenticios, energéticos y constructivos. Se reportan 706 especies de flora y 101 especies de fauna utilizadas (CONAMA, 1999). (2)

Los fines medicinales constituyen el mayor uso del total de plantas identificadas como flora útil, aproximadamente 50 % del total. Muchas plantas han sido utilizadas tradicionalmente en el área rural por ser una opción de fácil acceso, bajo costo y porque se cuenta con el conocimiento cultural para su utilización. (Perfil Ambiental de Guatemala, 2004). (3)

Sin embargo ha sido tradicional que la fuente de la materia prima sean las poblaciones naturales, con lo que se han extinguido algunas especies valiosas, otras están en las listas de especies en peligro de extinción y otras más podrían correr el mismo riesgo si se continúa con dichos métodos extractivos.

Es por eso que se hace necesario establecer métodos de propagación masivos para aquellas especies que se van detectando con potencial económico. En este caso la especie *Piper oradendron* Trel. & Standl., (1952), ha sido incluida dentro de la lista de 3 especies del género *Piper* con potencial comercial debido a su rendimiento de aceite esencial, composición química y actividad microbiciada, establecida en estudios realizados en la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

La técnica de cultivo de tejidos es una buena alternativa para la propagación masiva de dicha especie, luego de superar las dificultades que implica el establecimiento del cultivo *in Vitro* de cualquier especie vegetal.

Para la introducción de cualquier especie vegetal al cultivo *in Vitro*, se hace necesario superar la etapa previa de la determinación del método de desinfección y el tipo de explante más adecuados, ya que la contaminación en

el medio de cultivo siempre es alta, considerando que las plantas, en condiciones naturales de crecimiento, están asociadas a microorganismos endógenos y exógenos que encuentran condiciones favorables de desarrollo en dichos medios nutritivos.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de tejidos vegetales es una buena alternativa para la producción masiva de la especie *Piper oradendron* Trel. & Standl., (1952), ya que ésta ha sido incluida en una lista de tres especies del género *Piper* con buenas características en el campo de las medicinas naturales, principalmente por su buen rendimiento de aceite esencial, composición química y actividad microbicida.

Sin embargo para la introducción de cualquier especie vegetal al cultivo *in Vitro*, se hace necesario superar algunas barreras previas como son: la de la elevada contaminación por microorganismos, principalmente bacterias y hongos que conviven con las plantas. Para ello debe realizarse la evaluación de productos desinfectantes y formas de aplicación, así como la parte de la planta (explante) más adecuado que permitan un buen desarrollo de los mismos en el medio de cultivo nutritivo, que viene a ser una segunda etapa en este tipo de trabajos de investigación.

Una vez superada la etapa indicada, ya se puede iniciar la propagación masiva de dicha especie y formar un banco de germoplasma *in Vitro* para asegurar su conservación y disponibilidad de material para futuras investigaciones o intercambios científicos.

## 4. MARCO TEORICO

### 4.1. Antecedentes

#### 4.1.1. Especies del género *Piper* promisorias en Latinoamérica:

El género *Piper* contiene aproximadamente unas 1,500 especies, con cerca de 1,000 en América tropical; las especies de este género son a menudo elementos conspicuos del sotobosque, alcanzando su mayor diversidad en bosques húmedos premontanos y de tierras bajas. Estas especies son utilizadas localmente como antídoto contra mordeduras de serpientes y así mismo como remedio eficaz en el tratamiento de cálculos renales y afecciones bronquiales. Muchas especies se conocen con el nombre de "Cordoncillo" (Stevens, *et al.*, 2001). (4)

El interés que se ha venido desarrollando en los últimos años por el cultivo y utilización de las plantas aromáticas y medicinales, como fuente de obtención de principios activos para la industria (farmacéutica, alimenticia, cosmética) y la necesidad de buscar nuevas alternativas de cultivo dentro del proceso de diversificación, ha planteado la necesidad de impulsar otras especies con potencial.

El género *Piper* comprende un elevado número de especies, tiene interés por su amplia utilización en la medicina tradicional de varios países, dichas especies presentan una gran complejidad tanto desde el punto de vista botánico como químico. El análisis de los constituyentes volátiles de estas especies ha revelado la presencia de monoterpenos, sesquiterpenos y arilpropanoides que han mostrado propiedades biológicas interesantes (Parmar *et al.*, 1997 (5); Martins *et al.*, 1998(6); Moreira *et al.*, 1998 (7). Investigaciones fotoquímicas de extractos han encontrado la presencia de muchos compuestos activos tales como amidas, alcaloides, lignanos, cromononas.

Como ejemplo de especies aromáticas promisorias en Latinoamérica se menciona una selección de siete especies del género *Piper* (*P. auritum*, *P.*

*aduncum*, *P. lenticellosum*, *P. divaricatum*, *P. artanthe*, *P. chiadoense*, *P. peltatum* y *P. tuberculatum*). Para esta selección se tomó como factor discriminatorio, el conocimiento popular de la especie como aromática, el conocimiento específico y técnico que se dispone de sus componentes volátiles (Bandoni, 2000). (8)

En un estudio realizado en tres Piperáceas panameñas se identificó la composición química del aceite esencial de las hojas de *P. arboreum*, *P. jimbrikatatum* y *P. obliquum*. Los principales constituyentes de *P. arboreum* fueron 8-cadineno, r-copaeno y -pineno; en el aceite de *P. jimbrikatatum*, -cariofileno y monoterpenos oxigenados como linalol y acetato de linalilo, en *P. obliquum* se identificó -cariofileno, espatulenol y algunos sesquiterpenos no caracterizados previamente tales como 1,5-epoxisalvial-4 (14) eno y el -selineno (Mundina *et al.*, 1997). (9)

#### 4.1.2. Estudios realizados en Guatemala:

En Guatemala el género *Piper* presenta una amplia distribución especialmente en Alta Verapaz e Izabal, algunas de las especies son utilizadas por las comunidades humanas para diferentes afecciones, mientras que de otras especies se desconocen sus propiedades y son utilizadas indistintamente como cerco. A través de estudios previos se ha detectado que muchas de sus especies son promisorias para generar productos que puedan ser industrializados.

Se han realizado estudios de algunas especies como *P. jacquemontianum* Kunth, la cual ha demostrado actividad citotóxica en líneas celulares y una composición química interesante con un potencial en perfumería por su contenido de linalool y *P. amalago* L. las cuales han demostrado bioactividad contra protozoos.

En estudios previos como el proyecto sobre “Caracterización de aceites esenciales y extractos de ocho especies mesoamericanas de Piperáceas y evaluación de la actividad biocida para su aprovechamiento como nuevos

recursos aromáticos y/o medicinales” financiado por la DIGI-USAC 2006, se han detectado aproximadamente 8 especies de las cuales se puede continuar estudiando al menos tres especies, las cuales son *P. jacquemontianum*, *P. donnell smithii* y *P. oradendron*, por su composición química interesante y actividad biocida mostrada.

En un estudio etnobotánico de siete comunidades de la zona de influencia del Parque Nacional Laguna Lachuá realizado en Cobán Alta Verapaz, Guatemala, se reporta las familias con mayor número de especies utilizadas como medicinales a las Piperáceas, dentro de ellas las más reportadas tanto en comunidades como en número de informantes fueron *P. aeruginosibaccum*, *P. amalago*, *P. tuerckheimii*, *P. cayoense*. Dentro de las plantas con usos medicinales más diversos se mencionan *P. amalago*, *P. tuerckheimii*, *P. aeruginosibaccum*, *P. variable*, *P. umbellatum* y *P. cayoense* (Cleaves, 2001). (10)

En otra investigación se observó que de cinco especies evaluadas de *Piper*, todos los aceites esenciales presentaron actividad biológica contra *A. salina*, *A. aegypti*, *A. albimanus*, *M. smegmatis* y *B. subtilis* y una de las especies que presentó mayor actividad fue *P. oradendrum*. El tamizaje fotoquímico reveló la presencia de flavonoides, saponinas, principios amargos, alcaloides y aceite esencial (Cruz, 2005). (11)

En el proyecto DIGI del programa PUIRNA “Caracterización de aceites y extractos de ocho especies Mesoamericanas de Piperáceas y evaluación de la actividad biocida para su aprovechamiento como nuevos recursos aromáticos y/o medicinales” se detectaron aproximadamente 8 especies obteniéndose mejores rendimientos en las especies *P. peltatum*, *P. oradendrum*, *P. jacquemontianum*, *P. donnell smithii*, *P. umbellatum* y la especie que presentó actividad contra *M. smegmatis* y *B. subtilis* fue *P. jacquemontianum* (Datos no publicados, 2006). Con esta información actualmente se está desarrollando el proyecto “Caracterización morfológica, ecológica, genética y química de 3 especies de *Piper* (*Piper jacquemontianum*, *Piper donnell smithii* y *Piper oradendron* con fines de conservación y mejoramiento para su



aprovechamiento como nuevos recursos aromáticos y/o medicinales en Guatemala, financiado por la CONCYT.

#### 4.2. Cultivo de tejidos vegetales:

El cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in Vitro* de tejidos vegetales, es una técnica de reproducción en condiciones totalmente asépticas, en la que a partir de un pequeño segmento inicial de tejido (explante) es posible regenerar en poco tiempo miles o millones de plantas genéticamente iguales a la planta madre, cuando a este tejido le es aplicado un estímulo por medio de variables físicas y químicas controladas en un medio de cultivo.

A diferencia de las técnicas tradicionales de cultivo, esta poderosa herramienta permite la propagación de grandes volúmenes de plantas en menor tiempo; así como el manejo de las mismas en espacios reducidos. Por otro lado, la técnica es de gran utilidad en la obtención de plantas libres de patógenos; plantas homocigotas, en la reproducción de plantas en peligro de extinción, en estudios de ingeniería genética, etc.

##### 4.2.1. Explante:

Parte separada de un vegetal, por ejemplo: protoplasto, célula, tejido u órgano, que al ser cultivado en medio adecuado puede permitir la regeneración de plantas completas (Roca y Mroginski, 1993) (12)

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento exitoso del cultivo de tejidos; dicha elección estará en función del objetivo perseguido y de la especie vegetal utilizada.

El tamaño del explante es otro factor a considerar y que también va a depender del objetivo y de la especie vegetal. Un explante más grande puede favorecer la proliferación callosa o el pegue en el medio, pero también se puede producir mayor heterogeneidad y contaminación por patógenos. Existe también un tamaño mínimo debajo del cual no se obtiene la respuesta deseada.

Hay que considerar además otros factores que inciden en la respuesta del explante cultivado, con son: la época del año, pretratamientos a los explantes y las condiciones de crecimiento de las plantas donantes de los mismos. (Roca y Mroginski, 1993) (12)

#### 4.2.2. Asepsia:

La asociación explante-medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacterias, hongos), los cuales pueden destruir tales cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo. Evitar las contaminaciones con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito.

Para establecer cultivos asépticos es necesario: a) trabajar en ambientes adecuados; b) esterilizar los medios de cultivo; c) desinfectar superficialmente los explantes, para liberarlos de microorganismos exógenos y d) Manejar adecuadamente las normas de asepsia.

Es generalizado el uso de etanol (70 % v/v) y de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1 al 3 %. Con menor frecuencia se usan el hipoclorito de calcio  $[Ca(OCl)_2]$ , del 6 al 12 % y el cloruro de mercurio ( $HgCl_2$ ) del 0.1 al 1.5 %.

En algunos casos es útil agregar algún agente tensoactivo (por ejemplo, Tween-20, del 0.01 al 0.1 %). No es necesario cuando se incluye un primer lavado con etanol.

Posteriormente es necesario dar varios lavados con agua destilada estéril dentro de la cámara de flujo laminar.

Por último vale tomar en cuenta que la desinfección debe eliminar los microorganismos con el menor daño al explante.

#### 4.2.3. Medios de cultivo:

Componentes:

- a. Carbono
- b. Nutrientes minerales
- c. Vitaminas
- d. Agente gelificante (en el caso de medios semisólidos)
- e. Sustancias reguladoras del crecimiento.
- f. Otros compuestos.

Fuentes de Carbono: la sacarosa (2 al 5 %) es la más utilizada, puede reemplazarse por glucosa y en menor medida por fructosa.

Nutrientes minerales: el medio de cultivo debe proveer macro y micronutrientes a los explantes. La composición varía según la especie vegetal, el tipo de explante y los resultados esperados. Entre los medios más usados están: MS=Murashige et al., 1962; B5=Gamborg et al., 1968; N6=Chu et al., 1975; Wh = Chite, 1943.

Vitaminas: en general los medios contienen varias vitaminas, siendo esencial la incorporación de tiamina.

Agente gelificante: en los medios semisólidos comúnmente se adiciona agar-agar (0.6 al 1.0 %), pero es importante considerar la calidad del mismo.

#### 4.2.4. Reguladores de Crecimiento:

En algunos casos se obtienen en los cultivos de tejidos vegetales la respuesta deseada usando solamente el medio base (MB), sin embargo en la mayoría de los casos se hace necesario agregar sustancias reguladoras del crecimiento del tipo auxinas, citocininas y giberelinas.

Las auxinas más utilizadas son: 2,4-D, ANA, AIA y AIB. Mientras que las citocininas más comunes son: KIN, BAP y ZEA. En el caso de las giberelinas han demostrado ser necesarias para el cultivo de ápices de meristemas caulinares de algunas especies como *Phaseolus vulgaris*, *Solanum tuberosum*, *Fragaria x ananassa*, *Manihot esculenta*, etc. El ácido abscísico (ABA) se emplea en ocasiones.

Otros componentes: como fuentes de nitrógeno reducido, factores de crecimiento, carbohidratos, etc. Por ejemplo: agua de coco, AC, (5 al 15 %, v/v), jugo de tomate, extracto de levadura y extracto de tubérculos de papa.

Además de glicina, se agregan otros aminoácidos como asparagina, cisteína y L-tirosina.

En algunos medios se adiciona ácido cítrico, ácido málico, succínico y pirúvico, como precursores de aminoácidos; L-glutamina y caseína hidrolizada (0.1 al 1.0 %).

El empleo de sustancias antioxidantes (ácido ascórbico, L-cisteína, polivinilpirrolidona) puede ser de utilidad para el cultivo de explantes con alto contenido de polifenoles, cuya oxidación produce oscurecimientos y eventual muerte de los explantes.

El carbón activado (0.1 al 5 %), incorporado al medio, ha mostrado ser de utilidad en el cultivo de diferentes explantes, posiblemente por absorber metabolitos tóxicos.

#### 4.3. Propagación de Piperáceas:

Algunas especies como *P. nigrum* pueden propagarse en forma sexual y asexual. Se reporta que también se puede realizar la multiplicación *in Vitro* de la pimienta a partir de embriones somáticos a partir de los cuales se regeneran las plantulitas (Joseph et al, 1996) (13). Durante este proceso es usual que los embriones se vean afectados por una bacteriosis (*Xanthomonas betelicola*), causante de manchas en las hojas, que es combatida sistémicamente con antibióticos, sobre todo al multiplicar *Piper nigrum* cv kuching (Meyer et al, 1992). (14)

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. General:

Generar información valiosa para la introducción al cultivo *in Vitro* de la especie *Piper oradendron* Trel. & Standl., (1952)

### 5.2. Específicos:

5.2.1. Evaluar 3 concentraciones de Hipoclorito de Sodio y 3 tiempos de inmersión para la desinfección de explantes de la especie *Piper oradendron* Trel. & Standl., (1952), en la introducción al cultivo *in Vitro*.

5.2.2. Determinar el mejor tipo de explante (Yema lateral y tema apical) para la introducción al cultivo *in Vitro* de la especie *Piper oradendron* Trel. & Standl., (1952), en cuanto al porcentaje de contaminación.

5.2.3. Obtener información preliminar sobre la respuesta de la especie *Piper oradendron* Trel. & Standl., (1952), al cultivo *in Vitro*.

## 6. HIPOTESIS

- A. Al menos un explante dará resultados positivos estadísticamente significativos para el establecimiento *in Vitro* de la especie *Piper oradendron* Trel. & Standl., (1952)
  
- B. Al menos una concentración de Hipoclorito de Sodio y un tiempo de inmersión de los explantes dará resultados positivos estadísticamente significativos para el establecimiento *in Vitro* de la especie *Piper oradendron* Trel. & Standl., (1952).

## 7. MATERIALES Y METODOS

### 7.1. Descripción del lugar de trabajo.

El experimento se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente –IARNA- de la Universidad Rafael Landívar (Campus Central). El Laboratorio se encuentra localizado a 14 35'40'' de Latitud Norte y 90 29'05'' de Longitud Oeste, 1550 msnm.

El laboratorio de Biotecnología cuenta con cuatro áreas de trabajo bien diferenciadas que permiten un flujo de trabajo adecuado y garantiza la conservación del material a propagar.

Área de recepción de materiales: es el área donde se recibe el material vegetal para propagar en el laboratorio. Se anotan los datos de procedencia de las plantas (Nombre del lugar, ubicación geográfica, si es cultivada o silvestre, nombres comunes y científicos, etc.)

Área de preparación de medios: se utiliza para la preparación de medios de cultivo, para la desinfección superficial del material vegetal y el almacenamiento de la cristalería, reactivos y desinfectantes. Todos los medios de cultivo, así como el instrumental a utilizar en la siembra es auto clavado por 15 o 20 minutos a 121 C, a una presión de 15 libras por pulgada cuadrada, para conseguir la esterilización.

Área de Transferencia: Aquí se lleva a cabo el trabajo de disección y transferencia de los explantes a los medios de cultivo, utilizando la cámara de flujo laminar de aire. Esta cámara permite la esterilización del aire hasta en un 99 % mediante el paso a través de un filtro tipo HEPA, la cual permite garantizar la inocuidad del material vegetal y los utensilios que se usan para su manipulación.

Cuarto de Crecimiento: Aquí se almacena el material propagado (sembrado en el medio de cultivo) a una temperatura de 26 grados centígrados, iluminación

de 1000 a 4000 lux y 70 % de humedad relativa. El fotoperíodo es de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

## 7.2. Material Experimental

### 7.2.1. Material Vegetal

El material vegetal utilizado en el presente trabajo consistió en plantas de *Piper oradendron* Trel. & Standl., (1952), obtenidas a través de colectas de campo en la costa sur, en poblaciones silvestres, establecidas por el proyecto “Caracterización morfológica, ecológica, genética y química de 3 especies de Piper (*Piper jacquemontianum*, *Piper donnell smithii* y *Piper oradendron*) con fines de conservación y mejoramiento para su aprovechamiento como nuevos recursos aromáticos y/o medicinales en Guatemala”. (Figura 1 y 2)



Fig. 1. Colecta de *Piper oradendron* Trel. & Standl.





Fig. 2. Detalle de rama con inflorescencia.

El material colectado se llevó al invernadero del laboratorio de Biotecnología de la Universidad Rafael Landívar, donde se tuvo durante 30 días en cuarentena con aplicación intensiva de un fungicida y un bactericida (Benlate 50 WP y Agrimicyn 16.5 WP). En la figura 3 se muestra una planta representativa de este material.



Fig. 3. Planta de *Piper oradendron* antes de su ingreso al invernadero.

#### 7.2.2. Equipo de Laboratorio

La lista de equipo a utilizarse es el siguiente:

- a. Autoclave
- b. Cámara de flujo laminar de aire
- c. Estereoscopio
- d. Balanzas analíticas
- e. Pipetas para agua destilada
- f. Potenciómetro
- g. Mechero para alcohol
- h. Refrigerador
- i. Plancha térmica con agitador

#### 7.2.3. Instrumentos

- a. Mangos de bisturí

- b. Hojas de bisturí # 1
- c. Pinzas de punta fina
- d. Pinzas de punta gruesa
- e. Tijeras
- f. Espátulas

#### 7.2.4. Cristalería

- a. Cajas petri
- b. Tubos de ensayo
- c. Probetas de 10, 50 y 250 ml
- d. Beakers de 500, 1000 y 2000 ml
- e. Erlenmeyers de 250 ml
- f. Balones aforados de 500 y 1000 ml
- g. Buretas

#### 7.2.5. Materiales

- a. Papel absorbente
- b. Papel parafilm
- c. Papel periódico
- d. Papel aluminio
- e. Masking tape
- f. Marcadores indelebles
- g. Lapicero
- h. Cerillos
- i. Alcohol al 70 y 95 %
- j. Hipoclorito de Sodio
- k. Algodón
- l. Tween 20
- m. Agua desmineralizada
- n. Bolsas plásticas para las muestras vegetales

#### 7.2.6. Reactivos

- a. Sacarosa
- b. Agar-Agar/Phytigel
- c.  $\text{NH}_4\text{NO}_3$
- d.  $\text{KNO}_3$
- e.  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- f.  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- g.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- h.  $\text{H}_3\text{BO}_3$
- i.  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- j.  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- k. KI
- l.  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- m.  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- n.  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- o.  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- p.  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- q. Myo-inositol, glicina, ácido nicotínico, piridoxina-HCl y tiamina-HCl.
- r. Bencilaminopurina (BAP)
- s. Ácido Naftalenacético (ANA)

### 7.3. Metodología

#### 7.3.1. Fase de pruebas preliminares:

Las pruebas preliminares estuvieron encaminadas a la afinación de la metodología, en cuanto a los factores evaluados. Para dichas pruebas se utilizó material vegetal recién traído del campo, obteniéndose tres tipos de explantes: Hojas para la obtención de fragmentos de hoja, yemas apicales y yemas laterales. (Fig. 4)



Fig. 4. Material vegetal utilizado en las pruebas preliminares.

El material vegetal obtenido se introdujo en una solución de Benlate WP 50 % + Agrimicyn 16.5 % y antioxidantes (ácido cítrico 0.4 % + ácido ascórbico 0.2 %) para su traslado al laboratorio, en donde se prosiguió con la desinfección.

7.3.1.1. Desinfección del material vegetal en el laboratorio: Ésta se realizó a través de los siguientes pasos:

Fuera de la cámara de flujo laminar de aire:

Paso 1: Lavar con jabón desinfectante 3 veces + agua destilada

Paso 2: Obtención de secciones nodales con su respectiva yema axilar, obtención de yema apical (dejando una pequeña sección del tallo y 2-3 primordios florales) y secciones de hoja de 1 x 4 cm.

Dentro de la cámara de flujo laminar de aire:

- Paso 3: Desinfectar durante 20 minutos en la misma solución de fungicida, bactericida y antioxidantes, y luego lavar con agua estéril destilada, 3 veces.
- Paso 4: Sumergir en alcohol-etanol al 70 % de 1-2 minutos
- Paso 5: Desinfección con Hipoclorito de sodio según se indica en el cuadro 1.
- Paso 6: Realizar 3 lavadas con agua estéril
- Paso 7: Reposar en antioxidante (100 mg de ac. Ascórbico + 150 mg de ac. Cítrico)/litro
- Paso 8: Segunda disección dentro de la cámara y con el auxilio de un estereoscopio y siembra en los medios de cultivo.

Los tres tipos de explantes obtenidos de las ramas jóvenes, se sembraron en magentas plásticas de cultivo, conteniendo 60 ml del medio nutritivo MS completo (Ver anexo 1), suplementado con sacarosa al 3 %, Agar 7 g/l, bencilaminopurina (BAP) 0.1 mg/l y Acido Naftalenacético (ANA) 0.05 mg/L.

Los explantes se incubaron a 27 +- 2 grados centígrados y 16 horas de luz diarias a una intensidad lumínica de 1000 lux.

#### 7.3.2. Fase definitiva de experimentación:

Para la realización de esta fase se procedió según los siguientes pasos:

- a. Obtención de esquejes de las plantas colectadas y siembra en bolsas de polietileno en el invernadero, como se puede apreciar en las figuras 5 y 6.



Fig. 5. Esquejes de plantas colectadas de *P. oradendron*.



Fig. 6. Esquejes sembrados en bolsas de polietileno conteniendo tierra negra y arena volcánica.

- b. Aplicación de Benlate y Agrimicyn, 2 veces por semana a los esquejes, durante 30 días.
- c. Obtención de brotes jóvenes de los esquejes, como fuente de explantes de yema lateral con fragmento de tallo y yema apical. En la figura 7 puede apreciarse una muestra del tamaño de los brotes utilizados. Lo que se pretendió con esto fue disponer de material vegetal libre de patógenos, que en condiciones naturales conviven con esta especie vegetal sin ser dañinos para la misma.



Fig. 7. Brote de *Piper oradendron* obtenido de las estacas sembradas en el invernadero, que se utilizaron como explantes en el experimento.



- d. Desinfección del material vegetal: se repite el mismo realizado en las pruebas preliminares.

En esta fase ya no se tomaron en cuenta los explantes de hoja porque ofrecen mayor dificultad en el proceso de desinfección y la siembra se realizó en tubos de ensayo de vidrio de 15 x 150 ml, conteniendo 15 ml del medio nutritivo MS completo (Ver anexo 1), suplementado con sacarosa al 3 %, Agar 7 g/l, bencilaminopurina (BAP) 0.1 mg/l y Acido Naftalenacético (ANA) 0.05 mg/L.

Los explantes se incubaron a 27 +- 2 grados centígrados y 16 horas de luz diarias a una intensidad lumínica de 1000 lux.

#### 7.4. Factores evaluados:

- A. Concentraciones de Hipoclorito de sodio (1, 1.5 y 2 % v/v)
- B. Tiempos de inmersión de los explantes en hipoclorito de sodio (5, 10 y 15 minutos)
- C. Tipos de explantes (yema apical y yema lateral con fragmento de tallo)

#### 7.5. Tratamientos y variables de respuesta evaluados.

En el cuadro 1 se presentan los 18 tratamientos evaluados.

Cuadro 1. Tratamientos y variables de respuesta evaluados.

Tratamiento	Tipo de explante	% NaOCl (concentración de ingrediente activo)	Tiempo de inmersión (Minutos)	Variables
1	Yema apical	1	5	% de explantes contaminados con hongos/bacterias después de dos semanas de la siembra y % de explantes oxidados o con alguna toxicidad por el método de desinfección.
2	Yema apical	1	10	Idem
3	Yema apical	1	15	Idem
4	Yema apical	1.5	5	Idem
5	Yema apical	1.5	10	Idem
6	Yema apical	1.5	15	Idem
7	Yema apical	2	5	Idem
8	Yema apical	2	10	Idem
9	Yema apical	2	15	Idem
10	Yema lateral	1	5	Idem
11	Yema lateral	1	10	Idem
12	Yema lateral	1	15	Idem
13	Yema lateral	1.5	5	Idem
14	Yema lateral	1.5	10	Idem
15	Yema lateral	1.5	15	Idem
16	Yema lateral	2	5	Idem
17	Yema lateral	2	10	Idem
18	Yema lateral	2	15	Idem

Las figuras 8, 9 y 10 muestran los tres tipos de explantes sembrados en medio de cultivo, durante las pruebas preliminares.



Fig. 8. Explantes de yema lateral del *P. oradendron* cultivados en medio nutritivo, pruebas preliminares.



Fig. 9. Explante de yema apical de *P. oradendron* cultivado en medio nutritivo, pruebas preliminares.

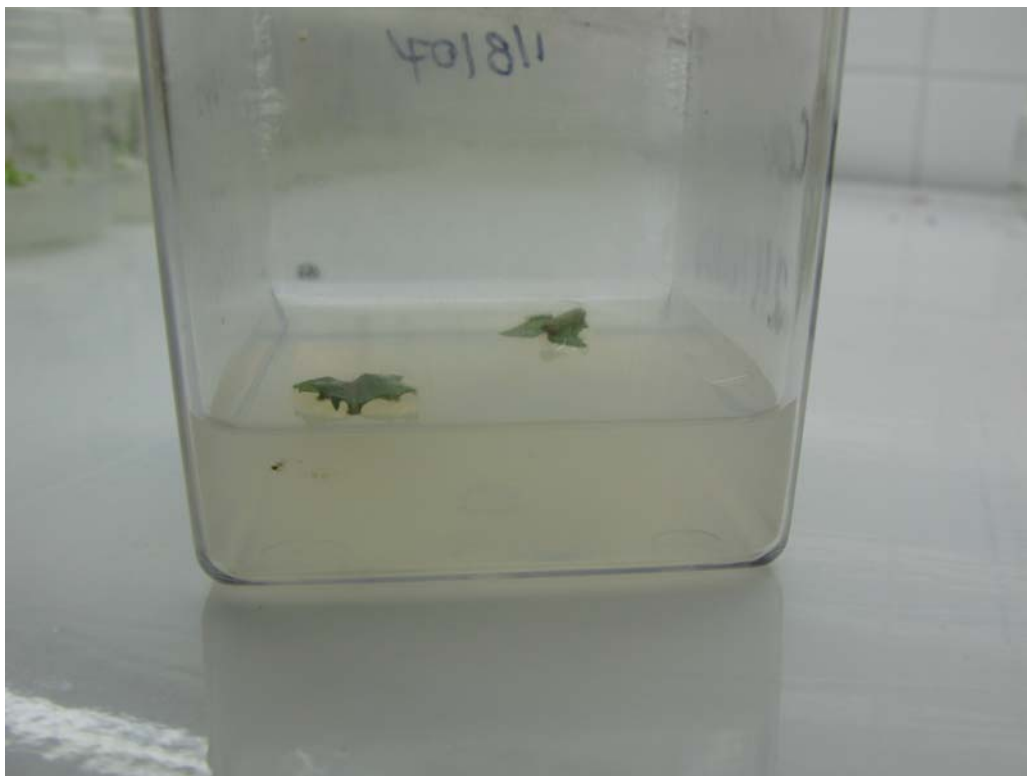


Fig. 10. Explante de hoja de *P. oradendron* cultivada en medio nutritivo, en pruebas preliminares.

#### 7.6. Análisis estadístico

Se planteó un diseño experimental de bloques completamente al azar para los factores evaluados.

Modelo estadístico:

$$Y_{ijkl} = \text{Media} + A_i + B_j + C_k + AB_{ij} + AC_{ik} + BC_{jk} + ABC_{ijk} + E_{ijkl}$$

Donde:

$Y_{ijkl}$ : valor de la variable respuesta asociado a la  $ijkl$ -ésima unidad experimental.

$A_i$ : Efecto de la  $i$ -ésima modalidad del factor A (Concentraciones de Hipoclorito de sodio)

$B_j$ : Efecto de la  $j$ -ésima modalidad del factor B (Tiempos de inmersión)

$C_k$ : Efecto de la  $k$ -ésima modalidad del factor C (Tipos de explante)

$AB_{ij}$ : Efecto de la  $ij$ -ésima interacción de los factores A y B.

$AC_{ik}$ : Efecto de la  $ik$ -ésima interacción de los factores A y C

$BC_{jk}$ : Efecto de la  $jk$ -ésima interacción de los factores B y C.

$ABC_{ijk}$ : Efecto de la triple interacción de los factores A, B y C.

$E_{ijkl}$ : Efecto del error experimental.

Se usaron 3 repeticiones por tratamiento.

Las variables respuestas se indican en el cuadro 1.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1. Pruebas preliminares:

Las pruebas preliminares tienen como objetivo ir guiando la investigación hacia la definición de métodos más adecuados para obtener los resultados esperados. En el presente trabajo se realizó una primera prueba de introducción de material vegetal al cultivo *in vitro*, utilizando plantas frescas traídas directamente de condiciones silvestres.

Se obtuvieron los tres tipos de explantes: fragmento de hoja, yema lateral con fragmento de tallo y yema apical.

Se aplicó la metodología de desinfección descrita en el presente trabajo, sin embargo y como es común en estos experimentos, la contaminación fue del 100 %. En la mayor parte de los tubos de ensayo se tuvo contaminación tanto fúngica como bacteriana.

### 8.2. Fase definitiva de experimentación:

Los resultados de esta fase no difieren en mucho de las pruebas preliminares, ya que en los casos donde la contaminación permitió observar el explante, éste se presentó necrótico como resultado del tratamiento con Hipoclorito de Sodio.

Como se indicó en la metodología, en esta fase ya no se incluyó el explante de hoja.

La escasez de resultados positivos no justificó la realización de análisis estadístico.

Las figuras 11, 12, 13 y 14 muestran los tubos de ensayo con los diferentes tipos de explantes contaminados y/o necróticos.



Fig. 11. Explante de hoja con contaminación.



Fig. 12. Explante de yema apical de *P. oradendron* mostrando contaminación fúngica.

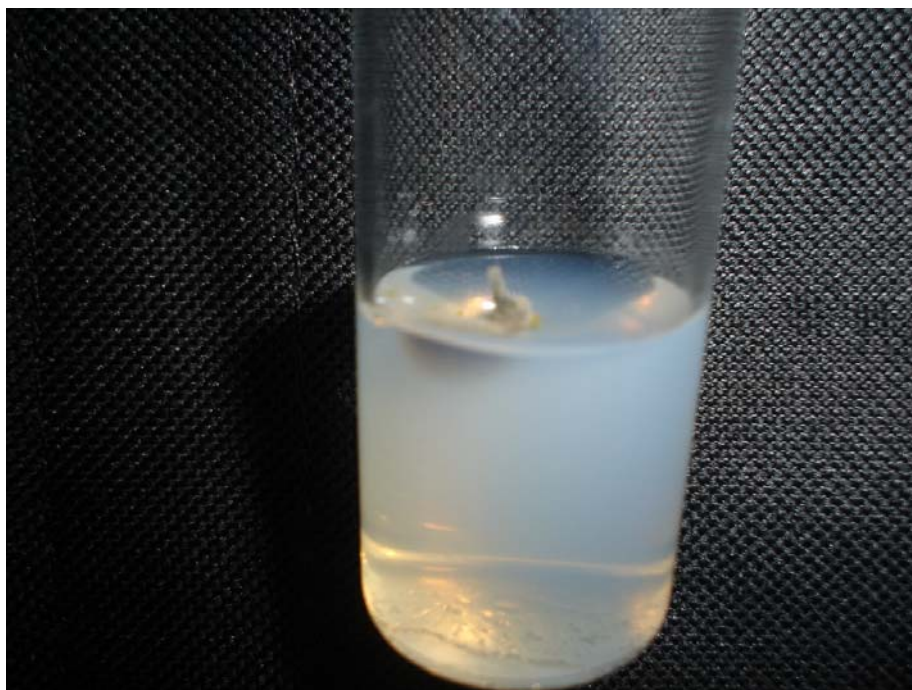


Fig. 13. Explante de yema apical de *P. oradendron* cultivado en medio nutritivo, mostrando contaminación fúngica y bacterial.

Los resultados confirman la dificultad que la mayoría de especies vegetales presentan para su introducción al cultivo de tejidos. La obtención de plántulas in Vitro, requiere la introducción de grandes cantidades, de tal manera de llegar a obtener unas pocas, con las que se pueda iniciar un proceso de micropropagación.





Fig. 14. Tubo con explante necrótico sin contaminación.

Ordoñez M., MA (2005) (15), trabajando con *Aloysia tripillia* (L´herrit) Brito, no logró controlar los microorganismos contaminantes en los explantes nodales, obteniendo porcentajes muy elevados de contaminación, entre el 89 y el 100 %. Sin embargo en los explantes foliares si se logró reducir la contaminación, obteniéndose el menor porcentaje de contaminación (44 %), al utilizar NaOCl al 2 % por 5 minutos.

## 9. CONCLUSIONES

1. La especie vegetal *Piper Oradendron* Trel & standl, presentó alto grado de contaminación al introducirse al cultivo in Vitro, en las condiciones del experimento.
2. La utilización de hipoclorito de sodio en las concentraciones de 1, 1.5 y 2 % v/v y los tiempos de inmersión de 5, 10 y 15 minutos, no evitaron la contaminación de los medios de cultivo al introducir los 3 tipos de explantes evaluados.
3. En los casos en donde se redujo la contaminación, los explantes se observaron necróticos como resultado del contacto con el Hipoclorito de sodio.
4. En las condiciones del presente experimento, ninguno de los tres explantes resultó adecuado para el cultivo in Vitro de *P. oradendron*.

## 10. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda evaluar el uso de otros agentes de desinfección o el uso de antibióticos adicionados directamente al medio de cultivo.
2. Se recomienda aplicar un pre-tratamiento a las plantas progenitoras, utilizando mayor variedad y concentraciones de fungicidas y bactericidas sistémicos, para tratar de limpiar los materiales antes de la extracción de los explantes.
3. Se recomienda evaluar diferentes tamaños de explantes para encontrar la combinación adecuada entre viabilidad y descontaminación.

## 11. BIBLIOGRAFIA

1. Rosell CH y Villalobos, VM. Fundamento teórico-práctico del Cultivo de Tejidos Vegetales. Italia. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO. 1990.
2. CONAMA. Comisión Nacional del Medio Ambiente. Estrategia nacional para la conservación y el uso sostenible de biodiversidad y plan de acción. Guatemala. CONAMA, CONAP, MAGA, GEF-PNUD y CONADIBIO. 1999.
3. UNIVERSIDAD RAFAEL LANDIVAR; IARNA-FACCA. Perfil Ambiental de Guatemala; informes sobre el estado del ambiente y bases para su evaluación sistemática. 2004. 461 pp.
4. Stevens WD, *et al.* Flora de Nicaragua. USA. Missouri Botanical Garden Press. 2001. (3), 2510.
5. Parmar VS, *et al.* Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochem.* 1997. 46 (4) 597-673.
6. Martins AP. *et al.* Essential oils from four *Piper* Species. *Phytochemistry.* 1998. 49(7), pp. 2019-2023.
7. Moreira DL, *et al.* Essential oil analysis of two *Piper* species (Piperaceae). *An. Acad. Bras. Ci.* 1998. 70 (4) 751-754.
8. Bandonil A. Los Recursos Vegetales Aromáticos en Lationoamérica. La Plata: Ed. Univ. Nac. de la Plata, 2000. 410 p.
9. Mundina M. *et al.* Leaf essential oils of three Panamanian *Piper* species. *Phytochemistry.* 1998 47(7). pp. 1277-1282.

10. Cleaves C. Etnobotánica participativa en siete comunidades de la zona de influencia del Parque Nacional Laguna Lachúa, Cobán, Alta Verapaz. Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Biología). 2001. 282 p.
11. Cruz M. Efecto de la 6-bencilaminopurina en la proliferación de brotes *in Vitro* de tres variedades de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Agronomía). 68 p.
12. Roca WM y Mroginski, LA. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. 1991.
13. Joseph B; Joseph D; Philip VJ . Plant regeneration from somatic embryos in black pepper. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*. 1996. 47(1): 87-90. pp
14. Meyer HJ; Vanstaden J; Allen S. The use of antibiotics to control systemic bacteria in invitro cultures of piper nigrum cv kuching. *South African Journal of Botany - suid - Afrikaanse Tydskrif vir Plantkunde*. 1992. 58 (6): 500-504.
15. Ordoñez M., MA. Establecimiento del cultivo in vitro de hierba luisa, *Aloysia triphylla* (L´herit) Brito. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Escuela de Post grado). Sp.

## 12. ANEXOS

Anexo 1:

**Preparación de soluciones madre para el medio de cultivo MS.**

Solución	Reactivo	MS (mg/l)	Solución Madre (g)	Cantidad por litro
Macroelementos (1000 ml) (100X)	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	16.500	100 ml
	KNO <sub>3</sub>	1900	19.000	
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	4.400	
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	3.700	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1.700	
Microelementos (1000 ml) (200X)	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	1.240	5 ml
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16.9	3.380	
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6	1.720	
	KI	0.83	0.166	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	0.050	
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	0.005	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	0.005	
Fe-EDTA (500 ml) (100X)	Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37.25	3.725	5 ml
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.85	2.785	
Vitaminas (1000 ml) (100X)	<i>myo</i> -inositol	100	10.000	10 ml
	Glicina	2	0.200	
	Ácido nicotínico	0.5	0.050	
	Piridoxina-HCl	0.5	0.050	
	Tiamina-HCl	0.1	0.010	