
Propagación masiva del matico (*Piper tuberculatum* Jacq.) y su aplicación en la erradicación de vectores de enfermedades metaxénicas en Lambayeque (Perú)

G. E. Delgado-Paredes*, A. J. Duque-Aurazo, C. Vásquez-Díaz y C. Rojas-Idrogo

Laboratorio General de Biotecnología y Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Ciudad Universitaria, Juan XXIII No 391, Lambayeque, PERÚ

Large-scale propagation of matico (Piper tuberculatum Jacq.) for the purpose of eradication of metaxenic diseases vectors.

Abstract

The abusive and uncontrolled use of insecticides for the control of vectors of diseases such as dengue and malaria, Leishmaniasis and Trypanosomiasis have caused irreparable damage to the environment, by the waste in the soil and water, food poisoning and creating resistance in the insects, resulting in more difficult eradication of diseases that are transmitted in humans. For this reason, the objective of the present study was to evaluate the *in vitro* mass propagation of 'matico' (*Piper tuberculatum*) and its application in the control of vectors of metaxenic diseases in Lambayeque, a region on the north coast of Peru with increasing incidence of dengue, transmitted by *Aedes aegypti* and Leishmaniasis ("uta"), transmitted by *Lutzomya* sp. *P. tuberculatum* is a species that contains numerous secondary metabolites like amides, lignans and flavonoids, with great insecticidal activity. The results indicated that using the *in vitro* culture of shoot apices and nodal segments it is possible to obtain thousands of plants that can be successfully transferred to field conditions and produce extracts of inflorescences with insecticidal potential. The results indicate that using the *in vitro* culture of shoot apices and nodal segments, thousands of plants are obtained that can be transferred successfully to field conditions and by means of an extraction process with organic solvents, obtain secondary metabolites with bioinsecticidal activity.

Key words: Amides, clonal propagation, crude extract, insecticidal activity, plant growth regulator.

Resumen

El uso abusivo y descontrolado de insecticidas para el control de vectores de enfermedades como el dengue y la malaria, Leishmaniasis y Tripanosomiasis vienen provocando daños irreparables al medio ambiente, por los residuos en el suelo y el agua, intoxicación de alimentos y creando resistencia en los insectos, resultando más difícil la erradicación de enfermedades que se transmite en humanos. Es por ello que el objetivo del presente estudio fue evaluar la propagación masiva *in vitro* del 'matico' (*Piper tuberculatum*) y su aplicación en el control de vectores de enfermedades metaxénicas en la comunidad de Lambayeque, la cual está ubicada en la costa norte del Perú, y ha presentado en los últimos años una mayor incidencia de dengue, transmitido por el mosquito *Aedes aegypti* y Leishmaniasis ("uta"), transmitida por *Lutzomya* sp. *Piper tuberculatum* es una especie que contiene numerosos metabolitos secundarios como amidas, lignanos y flavonoides, con gran actividad insecticida. Los resultados indican que utilizando el cultivo *in vitro* de ápices caulinares y nudos se obtienen miles de plantas que pueden ser transferidas exitosamente a condiciones de campo y mediante un proceso de extracción con solventes orgánicos obtener metabolitos secundarios con actividad bioinsecticida.

*Autores de correspondencia
Email: guidelg2015@yahoo.es

Palabras claves: Actividad insecticida, amidas, extracto crudo, propagación clonal, reguladores de crecimiento.

Introducción

La familia Piperaceae, conjuntamente con las familias Chlorantaceae y Saururaceae forma un grupo primitivo y taxonómicamente aislado de angiospermas basales (Taylor y Hickey, 1992; Jaramillo et al., 2004). En el sistema APG IV (Angiosperm Phylogeny Group IV) la familia Piperaceae fue incorporada en el orden Piperales, conjuntamente con Aristolochiaceae, Lactoridaceae y Saururaceae, dentro de las Magnoliids (APG IV, 2016). Algunos autores como Mabberley (1997) consideran que la familia Piperaceae comprende 14 géneros y alrededor de 1950 especies, con más de 700 especies para *Piper* (Parmar et al., 1997), habiéndose reportado para el Perú los géneros *Piper*, *Peperomia* y *Sarcorrhachis* con 811 especies y 528 especies endémicas (Brako y Zarucchi, 1993). *Piper tuberculatum* Jacq. es una especie tropical con amplia distribución desde México a Paraguay, reportándose para el Perú en las regiones de Amazonas, Huánuco, Lambayeque, Loreto, San Martín, Tumbes y Ucayali (Brako y Zarucchi, 1993). La especie fue identificada taxonómicamente por Trelease (1936) y Yuncker (1973) aunque en los últimos años fue caracterizada como *P. arboreum* subsp. *tuberculatum* (Jacq.) Tebbs stat. nov. (Tebbs, 1989), en base a algunas diferencias morfológicas con *P. arboreum* subsp. *arboreum* Aublet. Sin embargo, estudios fitoquímicos comparativos han revelado que amidas extraídas de hojas de *P. arboreum* son diferentes a las extraídas de *P. tuberculatum* (Navickiene et al., 2000; Regasini et al., 2009), por lo que *P. tuberculatum* debe ser considerada una especie distinta.

Varias especies de *Piper* han sido reportadas en la literatura con actividad insecticida (Parmar et al., 1997). Por ejemplo, la especie de la Amazonía, *P. rotundistipulum* es utilizada como insecticida y veneno de peces (Schultes et al., 1990). Extractos acuosos, aceites esenciales y semillas pulverizadas, se han usado en la zona de África tropical para el control de diferentes insectos causantes de enfermedades en humanos (Ntonifor, 2011). Extractos acuosos de *P. nigrum* se han empleado para el control de insectos defoliadores de diferentes especies como *Diprion similis*, *Malacosoma*

disstria, *Lymantria dispar* y *Choristoneura fumiferana* (Scott et al., 2007). El uso de extractos acuosos y etanólicos de semillas de *P. nigrum* aplicados al follaje presentaron efectos repelentes en cultivos de caupí (*Vigna unguiculata*) (Adjaye-Gbewonyo et al., 2010). Las especies de la India, *P. longum*, *P. betle*, *P. peepuloides* y *P. cubeba* han mostrado actividad insecticida contra mosquitos y moscas (Miyakado et al., 1989). Recientemente, el uso de extractos crudos combinado con amidas, de *P. tuberculatum*, han mostrado su potencial insecticida contra *Anticarsia gemmatilis* (Navickiene et al., 2007). Asimismo, extractos etanólicos y de diclorometano-metanol de espigas maduras y plantas propagadas *in vitro* han mostrado actividad insecticida contra *Diatraea saccharalis* (Soberón et al., 2006), *Spodoptera frugiperda* (Soberón et al., 2012), *Aedes aegypti* y *Anopheles pseudopunctipennis* (Bazán-Calderón et al., 2011), *Dysdercus peruvianus* (Mendoza-Frías et al., 2013) y *Heliothis virescens* (Monsalve-Asencio et al., 2015).

Las especies de *Piper* producen numerosos compuestos biológicamente activos entre los que, de manera general, se cuenta a flavononas, amidas alifáticas y aromáticas, propenilfenoles, alcaloides, lignanos, neolignanos, cromenos y ácido benzoico (Parmar et al., 1997; 1998; Silva et al., 2002; Danelutte et al., 2003; Lago et al., 2004). Sin embargo, estudios recientes en 112 especies de *Piper* demuestran la presencia de 667 metabolitos secundarios (190 alcaloides/amidas, 49 lignanos, 70 neolignanos, 97 terpenos, 39 propenilfenoles, 15 esteroides, 18 kavapironas, 17 chalconas/dihidrochalconas, 16 flavonas, 6 flavononas, 4 piperolidos cinnamilidona butenolidos y otros 46 no incluidos en las categorías mayores) (Richards et al., 2015). Algunos autores denominan a estos 46 últimos como de origen biosintético mixto (Kato y Furlan, 2007). *Piper tuberculatum* produce especialmente amidas como metabolitos secundarios [piperina, piperlonguminina, fagaramida, (*E*)-piplartina y pellitorina] (Figura 1) y varios de estos compuestos presentan diversas actividades biológicas con propiedad insecticida, antifúngica, anticancerígena y tripanocida (Palacios et al., 2009; Cotinguiba et al., 2009; Raj et al.,

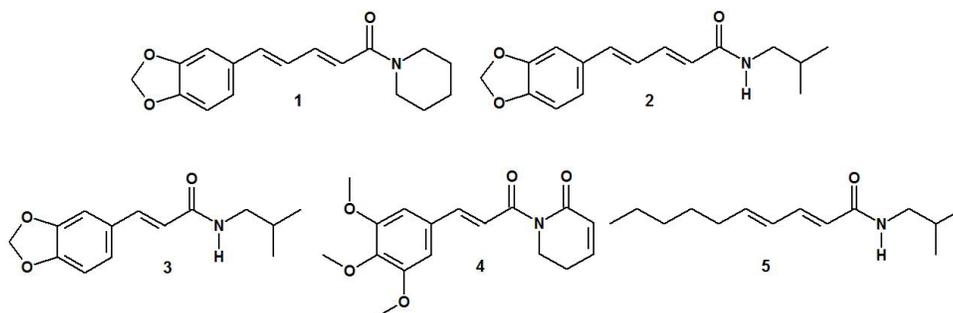


Figura 1. Amidas antifúngicas aisladas de *Piper tuberculatum*: piperina (1), piperlonguminina (2), fagaramida (3), (E)-piplartina y pellitorina.

2011; Monsalve-Asencio *et al.*, 2015). Estos metabolitos secundarios se encuentran mayormente en las espigas maduras, que se consideran como tal cuando la abscisión ocurre de manera natural del arbolillo y se muestran blandas al tacto pudiendo visualizarse fácilmente las semillas de color negro oscuro. Es posible, sin embargo, observar semillas marrones en escaso número las cuales no han alcanzado la madurez fisiológica, por lo tanto, no germinarán (Delgado-Paredes *et al.*, 2012).

Al respecto, en São Paulo (Brasil), no obstante que numerosos metabolitos secundarios de *Piper* poseen actividad insecticida, se ha observado a catorce insectos fitófagos de Coleoptera, Lepidoptera e Hymenoptera, algunos considerados plagas de importancia económica, se alimentan de especies de Piperaceae (Vanin *et al.*, 2008). Estos resultados infieren fuertes interacciones tróficas entre la diversidad química de las plantas y los insectos herbívoros (Richards *et al.*, 2015).

Este hecho ha generado el interés de usar extractos crudos y compuestos puros de *Piper tuberculatum* para el control de insectos-plagas de cultivos agrícolas y de vectores de enfermedades metaxénicas. Por lo cual es relevante el estudio sobre extracción y formulación de un biocida a partir de la amida isobutílica 4,5-dihydropiperlonguminina extraída de *P. tuberculatum* para el control del pulgón amarillo (*Sipha flava*) en caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) (López *et al.*, 2010).

En la región Lambayeque, ubicada en la costa norte del Perú, se han incrementado en los últimos tres años los casos de enfermedades metaxénicas. El Boletín Epidemiológico de la Gerencia Regional de Salud (GERESA)-Lambayeque reportó en 2015 un acumulado de 615 casos de dengue sin signos de

alarma y 232 de Leishmaniasis (uta). Mientras que en el 2016, 1195 casos de dengue sin señales de alarma, 5 con signos de alarma, 2 dengue grave y 106 de Leishmaniasis. Finalmente, hasta setiembre de 2017, se reportaron 1460 casos de dengue confirmados sin señales de alarma, 33 con signos de alarma, 5 dengue grave (4 defunciones) y 104 de Leishmaniasis (GERESA-Lambayeque, 2017).

Los objetivos del presente estudio son: (a) la producción de plántulas *in vitro* por semilla sexual, (b) la propagación clonal por cultivo de ápices caulinares y segmentos nodales y (c) la aclimatación y liberación de plantas para que la población rural de Lambayeque (Perú) produzca sus propios bioinsecticidas para el control de los insectos vectores de varias enfermedades metaxénicas.

Materiales y métodos

Procedencia del material vegetal

Espigas maduras, con frutos y semillas, se colectaron de plantas adultas de matico (*Piper tuberculatum* Jacq.), de 5 a 10 años de edad, en las mejores condiciones fisiológicas y fitosanitarias, sembradas a la sombra de otras especies arbóreas en la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (UNPRG) de Lambayeque (Perú). Las plantas procedían de plántulas de semillas germinadas *in vitro*, colectadas en las riberas del río Cumbil, Chota (Cajamarca), en el año 1999 y reproducidas por subcultivos sucesivos de ápices y segmentos nodales cada 15 meses. En la actualidad, los escasos especímenes que existían en su ambiente natural han desaparecido en su totalidad como consecuencia de incendios, desbordes de ríos y quebradas y la actividad antrópica.

La especie fue identificada y reportada en un

estudio previo (Soberón *et al.*, 2006), en base a las descripciones realizadas por Trelease (1936), Yuncker (1973) y Tebbs (1989), aun cuando este último autor lo clasifica como *P. arboreum* subsp. *tuberculatum* (Jacq.) Tebbs, stat. nov. Los experimentos de cultivo in vitro se realizaron en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y Recursos Genéticos de la Facultad de Ciencias Biológicas y el Laboratorio General de Biotecnología, del Vicerrectorado de Investigación, ambos de la UNPRG.

Desinfestación y cultivo de semillas

Se emplearon 50 semillas que, debido a su pequeño tamaño (1.70 ± 0.4 mm de lado), se acondicionaron en contenedores conformados por bolsas pequeñas de tul. Se desinfestaron con alcohol etílico 70% durante un minuto y luego con Clorox® (5,25% de cloro activo) y tres gotas de Tween 20 durante 10 min. Ambos desinfestantes fueron removidos con tres enjuagues con agua destilada esterilizada. Las semillas fueron cultivadas a razón de 5-8 unidades por tubo de ensayo en el medio de cultivo de germinación de semillas, constituido por las sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementadas con las vitaminas tiamina.HCl 0.4 mg l^{-1} y m-inositol 100.0 mg l^{-1} , sacarosa 2% y agar 0.6%.

Propagación clonal

Plántulas de 2-3 meses de edad, con 3 a 5 nudos, provenientes de semillas germinadas in vitro, se propagaron mediante el cultivo de ápices caulinares y segmentos nodales, en medio de cultivo de micropropagación. En el segundo y sucesivos ciclos de propagación clonal se utilizaron plántulas de 8 a 12 meses de edad de las que obtuvieron entre 12 a 15 explantes o unidades de siembra. La asepsia de las plántulas propagadas se considera per se.

Formulación y preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo basal estuvo conformado por las sales minerales MS, las vitaminas tiamina.HCl 0.4 mg l^{-1} y m-inositol 100.0 mg l^{-1} y sacarosa 30 g l^{-1} . Fueron ensayados dos tratamientos de medio de cultivo de germinación de semillas, uno suplementado con ácido giberélico (AG_3) 0.5 mg l^{-1} y otro carente de reguladores de crecimiento. El medio de cultivo de propagación clonal por ápices caulinares y segmentos nodales, procedentes de plántulas in vitro, fue suplementado con ácido

indol-3-acético (AIA) 0.02 mg l^{-1} y AG_3 0.02 mg l^{-1} (Delgado-Paredes *et al.*, 2012). En ambos medios de cultivo el pH se ajustó a 5.8 ± 0.1 con KOH y HCl 0.1 N, antes de incorporar el agar 0.6%; luego de dispensarse en tubos de ensayo de 100×12 y 150×18 mm los medios de cultivo de germinación de semillas y propagación clonal, respectivamente, fueron esterilizados en autoclave a $125 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura y 15 lb pulg^{-2} de presión.

Aclimatación de plántulas y establecimiento en campo

Después de 30 días de permanencia, en el medio de cultivo de propagación de plantas, y cuando alcanzaron una altura promedio de 3 cm, con 2 a 3 nudos e igual número de hojas expandidas así como un óptimo desarrollo radicular (3-5 raíces de 2 cm de longitud), las plántulas recibieron un tratamiento de pre-aclimatación descubriendo los tubos de ensayo durante tres días, en condiciones de laboratorio. Posteriormente, las plántulas fueron aclimatadas sumergiendo el sistema radicular en agua hervida fría durante una semana, antes de su establecimiento en diferentes tipos de sustratos en condiciones de invernadero. Estos sustratos fueron conformados por varias mezclas de tierra de cultivo, arena de río y humus de lombriz, obtenido de las deyecciones de la lombriz roja californiana, *Eisenia foetida*, en diferentes proporciones (1:1:1, 1:2:2 y 1:0:2). Asimismo, se redujo la intensidad de la irradiación protegiendo las plántulas con malla de color negro. Otros protocolos de pre-aclimatación y aclimatación también fueron ensayados.

Preparación y utilización de extractos

Inflorescencias maduras, con frutos y semillas, fueron secados a temperatura ambiente bajo sombra durante 20 a 30 días y luego molidas en mortero hasta obtener un polvo fino. Después de determinado el peso seco se sometió al proceso de extracción con alcohol etílico 96% por 3 veces consecutivas durante 24 horas por vez, filtrándose en papel de filtro Whatman N° 1. El extracto fue pesado para determinar el rendimiento y luego de disolverse a razón de 1 g en 10 ml de alcohol etílico se llevó al volumen correspondiente de agua corriente para obtener la solución final a aplicar por asperjación directamente sobre los vectores de las enfermedades metaxénicas.

Resultados y discusión

Características morfológicas relevantes de las inflorescencias

Al igual que en todas las especies de *Piper* (Piperaceae), las inflorescencias de *P. tuberculatum* son del tipo espiga, alcanzando en su fase madura una media de 14.5 (15.6-12.0) cm de largo y 7.1 mm de diámetro, un peso fresco de 3.5 g y alrededor de 550 semillas/espiga [430 maduras (78%) y 120 inmaduras (22%)], con 1.70±0.4 mm de lado, siendo de forma ligeramente cuadrada.

Germinación de semillas

Observaciones en condiciones de campo, en los jardines de la UNPRG, realizadas a lo largo de varios años, en terrenos ligeramente removidos y con suministro de agua permanente, mostraron que la regeneración natural es poco frecuente, registrándose apenas la aparición de escasas plántulas debajo de la plante adulta, posiblemente debido a la corta viabilidad de la semilla y la alta exigencia de los factores que inducen la germinación. Estos hallazgos de alguna manera corroboran observaciones de plantas en campo, en su ambiente natural, de varias especies de *Piper*, cuya distribución es bastante rara y esparcida en grandes áreas de terreno. A ello se suma el hecho de que algunas especies de hormigas (Hymenoptera-Formicidae) transportan las semillas hacia sus hormigueros, desconociéndose la finalidad de dicha actividad. En un estudio realizado en la ciudad de São Paulo sobre las preferencias alimentarias de 15 especies de insectos sobre alrededor de 50 especies de Piperaceae (*Piper* y *Peperomia*), no obstante presentar diversos metabolitos secundarios con propiedades insecticidas, diversos insectos fitófagos de Coleoptera, Lepidoptera y Hemiptera, algunos

considerados plagas de importancia económica, fueron observados alimentándose de diversos órganos vegetales. Sin embargo, en dicho estudio no fue reportada ninguna especie de hormiga y solamente adultos de la especie *Chasmodia* sp. (Coleoptera – Scarabaeidae) fue observada en frutos de *P. gaudichaudianum*, además de adultos y ninfas de *Sibaria armata* (Hemiptera – Pentatomidae) en frutos de *P. aduncum*, *P. hispidum*, *P. arboreum* y *P. cernuum* (Vanin et al., 2008). Por otro lado, varios ensayos sobre germinación de semillas en condiciones de laboratorio (22-26 °C de temperatura y baja irradiancia) con mayor semejanza a las condiciones naturales como utilizando placas de Petri con papel de filtro Whatman N° 1 o con algodón hidrofílico, no resultaron exitosos, puesto que las semillas no germinaron.

Los ensayos sobre germinación *in vitro* de semillas de *P. tuberculatum* mostraron que en semillas colectadas a lo largo de la primera semana la germinación fue 100%, a un mes de colectadas la germinación fue alrededor de 40%, a los tres meses 15% y a los seis meses o más las semillas no germinaron (Tabla 1). Estos resultados coinciden parcialmente con lo reportado por Delgado-Paredes et al. (2012), quien para *P. tuberculatum* informaron que semillas cultivadas *in vitro* a un mes de colectadas alcanzaron una tasa de germinación de 35.7%. Mientras que en otras especies como *P. aduncum*, a una semana de colectadas, las semillas germinaron 20% y a los siete meses 9.6%, al igual que *P. flavoviride* en que a los siete meses germinaron 13.2%. Una tendencia similar se observó en más de 10 especies de *Piper* evaluadas, colectadas en Perú y Brasil (Delgado-Paredes et al., 2012). En *P. solmsianum* se observó que la tasa de germinación fue 35 y 80%, después de cuatro y ocho semanas de cultivo, respectivamente, en

Tabla 1. Germinación y crecimiento de plántulas *in vitro* de matico (*Piper tuberculatum*) en la región Lambayeque (Perú)^a.

Tiempo ^b (meses)	Germinación (%)	Crecimiento ^c		
		Elongación del brote (cm)	Proliferación de brotes (N°)	Nudos (N°)
1 ^b	100 ± 0.0 a	-	-	-
1	40 ± 2.5 b	-	-	-
2	-	2.7 ± 0.52 c	1.8 ± 0.31 a	2.2 ± 0.24 c
3	15 ± 3.2 c	-	-	-
4	-	6.1 ± 0.71 b	2.2 ± 0.42 a	4.5 ± 0.71 b
6	0	-	-	-
12	0	14.5 ± 0.43 a	2.1 ± 0.74 a	12.3 ± 0.26 a

^aMS + vitaminas + AIA 0.02 mg l⁻¹ + AG₃ 0.02 mg l⁻¹ + sacarosa 30 g l⁻¹

^bUna semana

^cEn el crecimiento de plántulas *in vitro* los valores presentados son la media ± DE de diez repeticiones. Valores seguidos por letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey (n= 0.05)

semillas que se presume fueron cultivadas inmediatamente después de colectadas (Balbuena *et al.*, 2009) y sobre esta misma especie Delgado-Paredes *et al.* (2012) reportaron que semillas cultivadas *in vitro* después de una semana y tres meses de colectadas alcanzaron una tasa de germinación de 98.1 y 0%, respectivamente. En estudios pioneros sobre germinación de semillas de varias especies de *Piper* (Vásquez-Yañes, 1974) y *P. hispidum* realizados en cajas de Petri, demostraron que el proceso era fuertemente influenciado por la luz, donde la longitud de onda roja, azul y blanca resultaron favorables (Ludlow y Vásquez-Yañes, 1979). Sin embargo, en estos estudios no se discutieron aspectos relacionados sobre la viabilidad de las semillas y las condiciones de conservación. Al respecto, una clasificación clásica sobre la viabilidad de las semillas es en ortodoxas y recalcitrantes (Roberts, 1973) y se sabe que las semillas recalcitrantes mueren en condiciones de almacenamiento por debajo de 10% de humedad y temperaturas bajas (-10 a -20 °C). No obstante, varios autores han señalado que existe una categoría intermedia, como resultado de un gradiente entre las categorías ortodoxa y recalcitrante (Barbedo *et al.*, 2013; Berjak y Pammenter, 2013). Es posible, entonces, considerar a *Piper tuberculatum* como recalcitrante.

La tasa de contaminación por hongos y bacterias observada en el cultivo de semillas *in vitro* de *P. tuberculatum* fue 2%. En varios estudios sobre germinación *in vitro* de semillas de *Piper* se reportó la presencia de contaminación endógena por hongos, bacterias y fitoplasmas en *P. nigrum* (Mathews y Rao, 1984) y *P. colubrinum* (Kelkar y Krishnamurthy, 1998), que dificultaron dramáticamente el establecimiento del cultivo pero sin especificar los porcentajes de contaminación, aunque en el estudio realizado en *P. solmsianum* se reportó 10% de contaminación (Balbuena *et al.*, 2009) y 2-5% en varias especies de *Piper* (Delgado-Paredes *et al.*, 2012), concordando este último resultado con el obtenido en el trabajo que se presenta. No obstante estos resultados, investigaciones recientes sobre la contaminación endógena de los cultivos *in vitro* han enfatizado en el rol promotor en el crecimiento, específicamente en el incremento en el peso fresco y número de raíces laterales de varias especies de hongos y bacterias, denominados genéricamente como 'endófitos', interactuando sinérgicamente (Wang

et al., 2016). Como se conoce, los endófitos son microorganismos que viven en las plantas, por lo menos parte de su ciclo de vida, sin causar alguna manifestación visible de enfermedad (Bacon y White, 2000) y que además tienen una enorme capacidad de biosintetizar un amplio espectro de metabolitos secundarios (Kusari *et al.*, 2012).

Propagación clonal

En la tabla 1 y figura 2 se aprecia el crecimiento de plántulas *in vitro* y la producción de plantones de *P. tuberculatum*, respectivamente, mediante el cultivo de ápices caulinares y segmentos nodales, en medio de cultivo MS suplementado con AIA 0.02 mg l⁻¹ y AG₃ 0.02 mg l⁻¹, donde a partir de una inflorescencia madura con alrededor de 400 semillas fértiles es posible obtener entre alrededor de 20,000 plantones en el lapso de 18 meses desde el establecimiento del cultivo *in vitro*. En esta formulación, ensayada con éxito en la propagación de numerosas especies de *Piper* (Delgado-Paredes *et al.*, 2012) las fases de elongación y de enraizamiento se alcanzaron en una única formulación de medio de cultivo lo que conllevó a un ahorro significativo de tiempo y recursos económicos. Al igual que en el modelo clásico de propagación clonal establecido por Murashige (1974), en varias especies de *Piper* como en *P. longum* (Bhat *et al.*, 1995), *P. auritum* (Dominguez *et al.*, 2006) y *P. nigrum* (Hussain *et al.*, 2011) ha sido necesario utilizar dos fases: elongación del brote e inducción de raíces, en dos medios de cultivo de diferente formulación, hecho que no fue necesario en el trabajo que se presenta.

Aclimatación de plántulas y establecimiento de plantas en invernadero

En *P. tuberculatum* sustratos conformados por humus-tierra de cultivo-arena, en proporción 1:1:1, y condiciones ambientales de 24-30 °C de temperatura, 8,000 a 10,000 lux inicial hasta 30,000 lux final de irradiancia y 100% de humedad relativa, lograron hasta 96% de supervivencia (Tabla 2). Como es ampliamente conocido, la supervivencia de las plántulas *in vitro* depende de las características anatómicas, estructurales y fisiológicas que adquieren durante su desarrollo en tales condiciones donde por lo general ocurre una alta humedad relativa, óptima disponibilidad de nutrientes y sacarosa, baja intensidad lumínica, bajo intercambio gaseoso y escasa variación de la tempe-

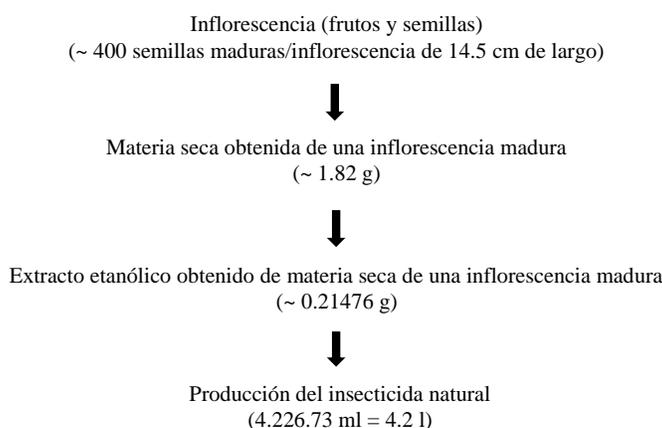


Figura 2. Flujograma en la producción de plántulas y plantones de matico (*Piper tuberculatum*) en la región Lambayeque (Perú).

Tabla 2. Factores que influyen en el proceso de aclimatación de plántulas y plantones de matico (*Piper tuberculatum*) en la región Lambayeque (Perú).

Sustrato ^a	Factores ambientales			Supervivencia (%)
	Temperatura (°C)	Irradiancia (lux)	Humedad relativa (%)	
Humus/Tierra de cultivo (2:1)	22-26 ^b	35,000	70-80	17.0
Humus/Tierra de cultivo/Arena (2:1:2)	24-30 ^c	35,000	100 ^d	71.0
Humus/Tierra de cultivo/Arena (1:1:1)	24-30 ^c	25,000	100 ^d	96.0

^asustrato sin esterilización; ^btemperatura de laboratorio; ^ctemperatura de casa de mallas; ^dcondiciones artificiales de alta humedad.

ratura (Aloisio, 1997; Martínez-Ruiz *et al.*, 2005; Ahmed *et al.*, 2012), condiciones que conllevan a ineficiencia fotosintética, reducida capacidad de formar cutículas serosas, estomas escasamente funcionales, escasa formación de tejido mecánico e ineficiente absorción y transporte de agua (Preece y Sutter, 1991).

En la aclimatación de plantas *in vitro* de *Eucalyptus urophylla* y *E. grandis* se logran tasas de supervivencia de 75 y 85%, respectivamente, utilizando sustrato esterilizado, tratamiento de raíces con benlate 1 g l⁻¹, fertilización con 17-17-17 y aspersiones con oxiclورو de cobre 0.3 g l⁻¹ (Martínez-Ruiz *et al.*, 2005), lo que no fue necesario en la aclimatación de plántulas en el trabajo que se presenta. Asimismo, en la aclimatación de plantas *in vitro* de caña de azúcar la utilización de humus de lombriz, en varios porcentajes respecto a la tierra de cultivo, indujo la formación de un óptimo sistema radicular y altura de plantas (Díaz *et al.*, 2004) lo que alguna manera se correlaciona con los resultados que se presentan en *P. tuberculatum* donde 1/3 del sustrato estuvo conformado con

humus de lombriz, un compuesto que por lo general presenta entre 25-55% de materia orgánica y diversos nutrientes esenciales como Ca, Mg, Fe, Cu, Zn y Mo, facilitando la fijación de N atmosférico en suelos deficientes en bacterias *Azotobacter* sp. y *Azospirillum* sp. (Medina *et al.*, 2001). Por otro lado, el uso de mallas de plástico como cobertura para atenuar el efecto de la luz contribuyó a incrementar el porcentaje de supervivencia en *P. tuberculatum*, tal como fue señalado por Agramonte *et al.* (1998) en un amplio estudio realizado en aclimatación de plantas *in vitro* en Cuba.

Distribución de plantones

Los plantones se distribuyeron en las localidades andinas de Incahuasi, Cañaris y Salas (caseros de Penachí y Kerguer), en la provincia de Ferreñafe, consideradas en pobreza extrema y fuerte presencia de la 'uta' o Leishmaniasis cutánea (*Leishmania* sp.), protozoario parásito transmitido por especies del género *Lutzomyia*, destacando Salas. Mientras que en el caso de la localidad costanera de Tuman, en la provincia de Chiclayo, fue por la incidencia

del virus del dengue, transmitido por al ‘zancudo’ *Aedes aegypti*. Como se observa en la tabla 3, según lo reportado en la SE-2017 la mayor incidencia de dengue sin signos de alarma ocurrió en el distrito de Tután, distante 20 km de Chiclayo, con 946 casos y cuatro casos de dengue grave con el mismo número de fallecidos y en el distrito de Salas, con los caseríos andinos de Penachí y Kerguer, 56 casos de uta cutánea y en menor número en Cañaris e Incahuasi, especialmente en los espacios abrigados conocidos como “temples”, donde incluso se cultiva especies tropicales como caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), yuca (*Manihot esculenta*) y naranja (*Citrus x sinensis*). Por otro lado, en los distritos costaneros como Túcume y Mórrope, si bien es cierto no se reportaron casos de dengue, en 1995, específicamente en Mórrope, la peste bubónica, producida por la bacteria *Yersinia pestis* y transmitida por la pulga, mató a ocho personas, entre ellas a tres niños. Túcume, al igual que otros distritos de Lambayeque como Mochumí, Íllimo, Pacora y Jayanca, tienen poblaciones con un fuerte

componente indígena, con costumbres y hábitos de vida muy similares a Mórrope. De ahí la necesidad de tomar medidas de prevención con el cultivo de plantones de *P. tuberculatum* en estas localidades. Adicionalmente, en Chiclayo, la capital de Lambayeque, con una población de 297,777 habitantes (5794.98 hab/km²) y en sus distritos de La Victoria y José Leonardo Ortiz, los casos de dengue sin signos de alarma fueron 392 y de dengue con signos de alarma 19 (GERESA-Lambayeque, 2017), lo que merece una mayor atención por parte de las autoridades sanitarias ante la eventualidad de que en el verano del 2018 se repita el fenómeno conocido como El Niño Costero.

Preparación y utilización del extracto

Una media de espigas maduras, de 14.5 cm de largo, produjo una media de 1.82 g de peso seco/espiga madura de la que se obtuvo 0.2147 g de extracto/espiga madura (Figura 3). En el estudio realizado por Bazán-Calderón *et al.* (2011) sobre el control de adultos de *A. aegypti* se utilizó 0.05081

Tabla 3. Plantones de matico (*Piper tuberculatum*), provenientes de plántulas *in vitro*, liberados en algunas localidades de la región Lambayeque (Perú) con fuerte incidencia de enfermedades metaxénicas.

Localidad (Distritos)	Nº de plantones liberados	Año de liberación a campo	Incidencia de enfermedades metaxénicas (SE-2017)			
			Dengue			Uta cutánea
			Sin signos de alarma	Con signos de alarma	Grave	
Cañaris	30	2016	0	0	0	25
Incahuasi	30	2016	0	0	0	15
Tután	100	2017	946	9	4*	0
Túcume	30	2017	0	0	0	0
Mórrope	25	2017	0	0	0	0
Salas (Penachí-Kerguer)	50	2017	0	0	0	56

*Fallecidos

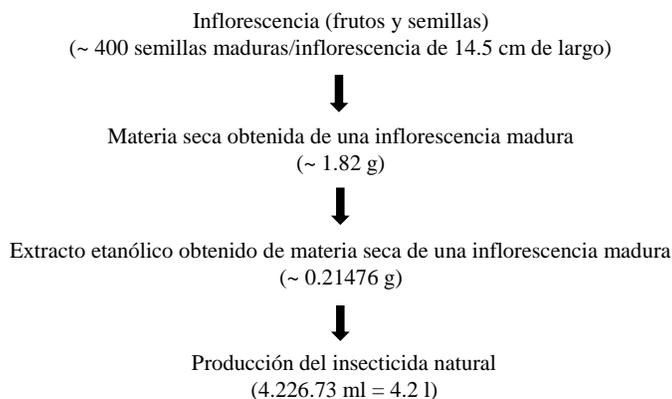


Figura 3. Flujograma en la obtención del extracto etanólico (alcohol etílico 96% o aguardiente de caña de azúcar del tipo ‘yonque’) a partir de una espiga madura de matico (*Piper tuberculatum*) en la región Lambayeque (Perú).

mg ml⁻¹ de extractos de espigas maduras de *P. tuberculatum* para alcanzar una mortalidad de 96.6% y 0.03126 mg ml⁻¹ para alcanzar una mortalidad de 100 y 98.8%, para los estadios larvales II y III, respectivamente. Asimismo, en estudios previos realizados en la obtención de extractos etanólicos de *P. tuberculatum* en el control de *Diatraea saccharalis* (Soberón et al., 2006) y dermatofitos en humanos (Palacios et al., 2009), de 45 g de materia seca de inflorescencias maduras se obtuvo 5.31 g de extracto, lo que representó un rendimiento de 11.78%. Estos resultados determinaron que con el peso seco

obtenido de una inflorescencia (1.82 g) fue posible obtener 0.2147 g (214.7 mg) de extracto y si para ejercer su acción insecticida del adulto de *A. aegypti* se requiere 0.05081 mg ml⁻¹ de extracto, entonces es posible preparar 4.226 ml (4.2 l) de insecticida (Figura 3).

En la figura 4 se presenta una planta adulta de *P. tuberculatum* con espigas maduras frescas y secas, así como semillas maduras, mientras que en la figura 5 se presenta plántulas *in vitro* de *P. tuberculatum* y plantones aclimatados en condiciones de invernadero.



Figura 4. a. Planta adulta de *P. tuberculatum*, b. Espiga madura fresca (14.5 cm de largo) y seca y c. Semillas maduras (1.70 mm de largo).



Figura 5. a. Plántulas *in vitro* de *P. tuberculatum* producidas por semillas; b y c. Plántulas propagadas por ápices caulinares; d. Plántulas en proceso de aclimatación; e. Plántulas propagadas por segmentos nodales y f. Plantón en condiciones óptimas para su siembra en campo definitivo.

Conclusiones

La cada vez más creciente incidencia de enfermedades metaxénicas, como el dengue y la uta, en varias localidades en el departamento de Lambayeque (Perú), determinó la búsqueda de

insecticidas de origen natural. En tal sentido, *P. tuberculatum*, una especie con gran potencial biocida fue propagada exitosamente en cultivo de tejidos a partir de semillas y posteriormente mediante el cultivo de ápices caulinares y nudos. La óptima aclimatación de las plántulas en condiciones

de invernadero posibilitó su liberación en gran escala a condiciones de campo. Fue posible obtener hasta 4.2 l de insecticida, a partir de una espiga madura de 1.8 g de peso seco, para el caso de *A. aegypti*, el vector del dengue.

Agradecimiento

Los autores agradecen al Dr. Ernesto Hashimoto Moncayo, Vicerrector de Investigación de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo de Lambayeque, por las facilidades ofrecidas para la ejecución del presente trabajo.

Referencias

- Adjaye-Gbewonyo D., Quaye E.C., Wubah D.A. 2010. The effect of extracts of *Piper guineense* seeds on insect pest damage to cowpea plants. *Journal of Young Investigators*. June 2010.
- Ahmed ABA, Mohajer S, Elnaiem EM, Taha RM. 2012. In vitro regeneration, acclimatization and antimicrobial studies of selected ornamental plants. Chapter 11. *Plant Science*. Downloaded from: <http://www.intechopen.com/books/plant-science>
- Aloísio X. 1997. Enraizamiento in vitro de gemas de *Eucalyptus* multiplicados e elongados. *Revista Scientia Forestalis*. 51:26-29.
- Agramonte D, Jiménez F, Dita MA. 1998. Aclimatización. En: Pérez Ponce JN (ed.). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Instituto de Biotecnología de Plantas. Santa Clara, Villa Clara, Cuba, pp. 193-206.
- APG IV. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* 181:1-20.
- Bacon C.W., White J.F. 2000. *Microbial endophytes*. Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.
- Balbuena T., Santa-Catarina C., Silveira V., Kato M.J., Floh E.I.S. 2009. In vitro morphogenesis and cell suspension culture establishment in *Piper solmsianum* C.DC. (Piperaceae). *Acta Botânica Brasileira*. 23:274-281.
- Bazán-Calderón J., Ventura-Flores R., Kato M.J., Rojas-Idrogo, C., Delgado-Paredes G.E. 2011. Actividad insecticida de *Piper tuberculatum* Jacq. sobre *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) y *Anopheles pseudopunctipennis* Tehobal (Diptera: Culicidae). *Anales de Biología* 33:135-147.
- Barbedo C.J., Centeno D.C., Ribeiro R.C.L.F. 2013. Do recalcitrant seeds really exist?. *Hoehnea* 40:583-593.
- Bhat S.R., Chandel K.P.S., Malik S.K. 1995. Plant regeneration from various explants of cultivated *Piper* species. *Plant Cell Reports* 14:398-402.
- Berjak P., Pammentar N.W. 2013. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. *Frontiers in Plant Science* 4, article 478 1-9.
- Brako L, Zarucchi JL. Catalogue of the Flowering Plants and gymnosperms of Peru. 1993. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. Vol. 45.
- Cotinguiba F., Regasini L.O., Bolzani V.S., Debonsi H.M., Passerini G.D., Cicarelli R.M.B., Kato M.J., Furlan M. 2009. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. *Medicinal Chemistry Research* 18:703-711.
- Danelutte A.P., Lago J.H.G., Young M.C.M., Kato M.J. 2003. Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry* 64:555-559. FALTA?
- Delgado-Paredes G.E., Kato M.J., Vásquez-Dueñas N., Minchala-Patiño J., Rojas-Idrogo C. 2012. Cultivo de tejidos de *Piper* sp. (Piperaceae): Propagación, organogénesis y conservación de germoplasma in vitro. *Revista Colombiana de Biotecnología* 14:49-60.
- Díaz LP, Medina LF, Latife J, Digonzelli PA, Sosa SB. 2004. Aclimatación de plantas micropropagadas de caña de azúcar utilizando el humus de lombriz. *RIA* 33:115-128.
- Dominguez F., Lozoya X., Simon J. 2006. Tissue culture regeneration of a medicinal plant from Mexico: *Piper auritum* Kunth. *HortScience* 41:207-209.
- GERESA (Gerencia Regional de Salud – Lambayeque). 2017. *Boletín Epidemiológico S.E.* 36-2017. (Lambayeque, Perú). 20 p.
- Hussain A., Naz S., Nazir H., Khan Z. 2011. Tissue culture of black pepper (*Piper nigrum* L.) in Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* 43:1069-1078.
- Jaramillo M.A., Manos P.S., Zimmer E.A. 2004. Phylogenetic relationships of the perianthless piperales: reconstructing the evolution of floral development. *International Journal of Plant Science* 165:403-416.
- Kato M.J., Furlan M. 2007. Chemistry and evolution of Piperaceae. *Pure and Applied Chemistry* 79:529-538.
- Kelkar S.M., Krishnamurthy K.V. 1998. Adventitious shoot regeneration from root, internode, petiole and leaf explants of *Piper colubrinum* Link. *Plant Cell Reports* 17:721-725.
- Kusari S., Hertweck C., Spiteller M. 2012. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry & Biology* 19:792-798.
- Lago J.H.G., Ramos C.S., Casanova D.C.C., Morandim A.A., Bergamo D.C.B., Cavalheiro A.J., Bolzani V.S., Furlan M., Guimarães E.F., Young M.C.M., Kato M.J. 2004. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. *Journal of Natural Products* 67:1783-1788. FALTA?
- López E.A., Durán J., Cuervo R. 2010. Extracción y formulación de un bioinsecticida a partir de amida isobutílica 4,5-dihidro-piperlonguminina extraída del pipilongo (*Piper tuberculatum*) para el control del pulgón amarillo (*Sipha flava*) en caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). *Revista Científica Guillermo de Ockham* 8:115-123.
- Ludlow B., Vásquez-Yañes C. 1979. Germinación de semillas de *Piper hispidum* Sw. bajo diferentes condiciones de iluminación. En: *Investigaciones sobre la Regeneración de Selvas altas en Veracruz, México*. Gómez Pompa A., Del Amo S., Vázquez-Yanes C. y Butanda A. (eds.). 2da. Ed. México: Compañía Editorial Continental, S.A., p. 263-277.
- Mabberley D.J. 1997. *The Plant Book. A Portable Dictionary of the Higher Plants*. New York, USA: Cambridge University Press.
- Martínez-Ruiz R., Azpíroz-Rivero H.S., Rodríguez-De la O J.L., Cetina-Alcalá V.M., Gutiérrez-Espinosa M.A. 2005. Aclimatación de plantas obtenidas in vitro de *Eucalyptus urophylla* ST Blake y *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden Ra Ximhai 1:591-597.
- Mathews V.H., Rao P.S. 1984. In vitro responses in black pepper (*Piper nigrum*). *Current Science* 53:183-186.

- Medina L.F., Jaime M., Chueca C., Bocanegra B., Toro F., Mascaró P. 2001. Presencia y cuantificación de *Azotobacter* sp. y *Azospirillum* sp. en lombricompost. Segunda Reunión de Producción Vegetal del NOA. San Miguel de Tucumán, Argentina.
- Mendoza-Frías N.L., Monsalve-Asencio L.J., Rojas-Idrogo C., Kato M.J., Delgado-Paredes G.E. 2013. Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* extracts on the cotton stainer bug, *Dysdercus peruvianus* Guérin-Méneville (Hemiptera: Pyrrhocoridae). Academic Journal of Entomology 6:153-161.
- Miyakado M., Nakayama I., Ohno N. 1989. Insecticidal unsaturated isobutylamides: From natural products to agrochemical leads. In: Arnason J.T., Philogène B.J.R., Morand P. (eds.). Insecticides of Plant Origin. ACS Symposium Series 387, American Chemical Society, New York. Pp. 183-187.
- Monsalve-Asencio L., Mendoza-Frías N.L., Rojas-Idrogo C., Kato M.J., Saavedra-Díaz, J., Delgado-Paredes, G.E. 2015. Larvicidal activity of *Piper tuberculatum* extracts on the tobacco budworm, *Heliothis virescens* Fabr. (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory conditions. International Journal of Pure & Applied Bioscience 3:1-9.
- Murashige T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Annual Review of Plant Physiology 25:135-166.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497.
- Navickiene H.M.D., Alcício A.C., Kato M.J., Bolzani V. da S., Young M.C.M., Cavalheiro A.J., Furlan M. 2000. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. Phytochemistry 55:621-626.
- Navickiene H.M.F., Miranda J.E., Bortoli S.A., Kato M.J., Bolzani V da S., Furlan M. 2007. Toxicity of extracts and isobutyl amides from *Piper tuberculatum*: potent compounds with potential for the control of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. Pest Management Science 63:399-403.
- Ntonifor N.N. 2011. Potentials of tropical African species as sources of reduced-risk pesticides. Journal of Entomology 8:16-26.
- Palacios Z.G.F., Delgado G.E., Moreno M.C., Kato M.J., Rojas C. 2009. Actividad antifúngica *in vitro* de extractos crudos de *Piper tuberculatum*. Revista Peruana de Biología 16:209-214.
- Parmar V.S., Jain S.C., Bisht K.S., Jain R., Taneja P., Jha A., Tyagi O.D., Prasad A.K., Wengel J., Olsen C.E., Boll P.M. 1997. Phytochemistry of the genus *Piper*. Phytochemistry 47:597-673.
- Parmar V.S., Jain S.C., Gupta S., Talwar S., Rajwansi V.K., Kumar R., Azim A., Malhotra S., Kumar N., Jain R., Sharma N.K., Tyagi O.D., Lawrie S.J., Errington W., Howarth O.W., Olsen C.E., Singh S.K., Wengel J. 1998. Polyphenols and alkaloids from *Piper* species. Phytochemistry 49:1069-1078.
- Preece JE, Sutter EG. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to greenhouse and field. In: Debergh PC, Zimmerman RH (eds.). Micropropagation: Technology and Application. Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 71-93.
- Raj L., Ide T., Gurkar A.U., Foley M., Schenone M., Li X., Tolliday N.J., Golub T.R., Carr S.A., Shamji A.F., Stern A.M., Mandinova A., Schreiber S.L., Lee S.W. 2011. Selective killing of cancer cells with a small molecule targeting stress response to ROS. Nature 475:231-234.
- Regasini L.O., Cotinguiba F., Morandim A.A., Kato M.J., Scorzoni L., Mendes-Giannini M.J., Bolzani V. da S., Furlan M. 2009. Antimicrobial activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae) against opportunistic yeasts. African Journal of Biotechnology 8:2866-2870.
- Richards L.A., Dyer L.A., Forister M.L., Smilanch A.M., Dodson C.D., Leonard M.D., Jeffrey C.S. 2015. Phytochemical diversity drives plant-insect community diversity. Proceedings of the National Academic of Sciences 112:10973-10978.
- Roberts E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. Seed Science and Technology 1:499-514.
- Schultes R.F., Raffauf R.F. 1990. Medicinal and toxic plants of the Indians of northwest Amazonia, Piperaceae. In: Schultes R.E., Raffauf R.F. (eds.). The Healing Forest: Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazonia. Historical, Etho- & Economic Botany Series. Vol. 2. Dioscoride Press, Portland, Oregon. Pp. 362-368.
- Scott L.M., Helson B.V., Strunz G.M., Finlay H. 2007. Efficacy of *Piper nigrum* (Piperaceae) extract for control of insect defoliators of forest and ornamental trees. The Canadian Entomologist 139:513-522.
- Silva R.V., Navickiene H.M.D., Kato M.J., Bolzani V., Méda C.I., Young M.C.M., Furlan M. 2002. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. Phytochemistry 59: 521-527. FALTA?
- Soberón G.V., Rojas C., Saavedra J., Kato M.J., Delgado G.E. 2006. Acción biocida de plantas de *Piper tuberculatum* Jacq. sobre *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae). Revista Peruana de Biología 13:107-112.
- Soberón G.V., Rojas Idrogo C., Kato M.J., Saavedra Díaz J., Armando Jr. J., Delgado Paredes G.E. 2012. Larvicidal activity of *Piper tuberculatum* on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory conditions. Revista Colombiana de Entomología 38:35-41.
- Taylor D.W., Hickey L.J. 1992. Phylogenetic evidence for the herbaceous origin of angiosperm. Plant Systematic and Evolution. 180:137-156.
- Tebbs M.C. 1989. Revision of *Piper* (Piperaceae) in the New World. 1. Review of characters and taxonomy of *Piper* section *Macrostachys*. Bulletin of the Natural History Museum of London 19:117-158.
- Trelease W. 1936. Piperaceae. In: Flora of Peru, Vol. XIII. MacBride J.F. (ed.). Chicago, USA. Field Museum of Natural History, 253 pp.
- Vanini S.A., Ramos C.S., Guimarães E.F., Kato M.J. 2008. Insect feeding preferences on Piperaceae species observed in São Paulo city, Brazil. Revista Brasileira de Entomologia 52:72-77.
- Vásquez-Yañes C. 1974. Estudios sobre ecofisiología de la germinación en una zona cálida húmedo de México. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, UNAM, México. 140 pp.
- Wang X., Yam T.W., Meng Q., Zhu J., Zhang P., Wu H., Wang J., Zhao Y., Song X. 2016. The dual inoculation of endophytic fungi and bacteria promotes seedlings growth in *Dendrobium catenatum* (Orchidaceae) under in vitro culture conditions. Plant Cell Tissue and Organ Culture 126:523-531.
- Yuncker T.G. 1973. The Piperaceae of Brazil II. Piper – Group V; Ottonia; Pothomorphe; Sarcorhachis. Hoehnea 3:29-284.