



Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

Dirección de Ciencias Agrícolas

Trabajo de Tesis

Diagnóstico y antibiograma de microorganismos contaminantes en la micropropagación de plátano (*Musa* spp) en el Centro Nacional de Cultivo de Tejidos del INTA

Autores:

Br. Katherine Navidad Sandino Lacayo

Br. Walter Eduardo Salmerón Quezada

Asesores:

M.Sc. Andrea María Zamora Jarquín

M.Sc. Donald Alonso Juárez Gámez

Ing. Rudy Javier Cáceres Murillo

Presentado a la consideración del honorable comité
evaluador como requisito final para optar al grado de
Ingeniero en Sanidad Vegetal

Managua, Nicaragua
Enero, 2024

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable comité evaluador designado por la Dirección Especifica de Ciencias Agrícolas como requisito final para optar al título profesional de:

Ingeniero en Sanidad Vegetal

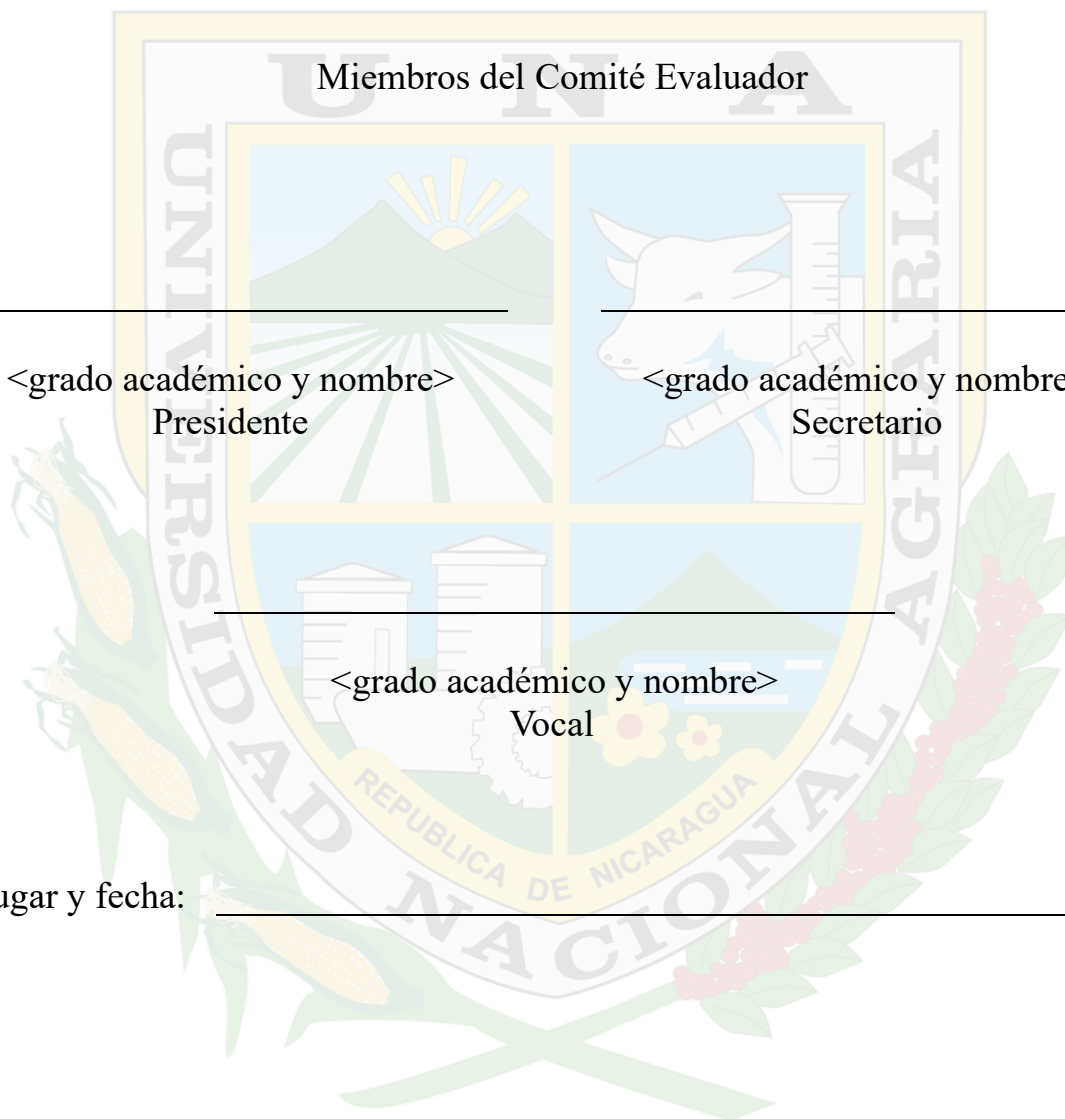
Miembros del Comité Evaluador

<grado académico y nombre>
Presidente

<grado académico y nombre>
Secretario

<grado académico y nombre>
Vocal

Lugar y fecha:



DEDICATORIA

La presente tesis la dedico primeramente a **Dios** por darme salud y fuerza para seguir adelante y culminar esta etapa universitaria.

A mi madre **Martha Lorena Lacayo** y a mi padre **Augusto Cesar Sandino López** que han sido un pilar fundamental en mi formación como profesional, por brindarme la confianza, consejos y recursos para lograrlo.

A mi hermana **Krisna Sandino** gracias por estar siempre presente por brindarme tu apoyo, amor y paciencia.

Br. Katherine Navidad Sandino Lacayo.

DEDICATORIA

La presente tesis la dedico primeramente a **Dios** por darme salud, sabiduría y fuerza para seguir adelante y culminar esta etapa universitaria.

A mi madre **Sandra Guadalupe Quezada García** que ha sido un pilar fundamental en mi formación como profesional, por brindarme su apoyo incondicional, su confianza, consejos y recursos para lograr culminar mi carrera.

A mi esposa **Sonia Nazaret Mejía Castillo** y mi hijo **Raúl Mauricio** por estar presente en cada momento, por brindarme su apoyo y animarme a seguir adelante siendo ellos parte fundamental en mi crecimiento personal.

Al **Ing. Gregorio Varela Ochoa (q.e.p.d.)**, por ser parte de mi formación profesional y personal, por sus consejos y confianza que me brindo para ser una persona de bien.

Br. Walter Eduardo Salmerón Quezada

AGRADECIMIENTO

A Dios el maestro de excelencia, por haberme permitido lograr culminar mis estudios académicos en esta prestigiosa universidad.

A mi Alma Mater, la Universidad Nacional Agraria (UNA) por ser la institución encargada de contribuir a mi formación profesional.

A mis asesores **M.Sc. Andrea Zamora, Ing. Rudy Cáceres** y **M.Sc. Donald Juárez** por haberme brindado la confianza y parte de todos sus conocimientos en el transcurso de la elaboración de este trabajo.

Al personal técnico del **laboratorio de Microbiología Agrícola** por brindarnos su asesoría para desarrollar del estudio.

Al **Centro Nacional de Cultivo de Tejidos (CNCT)** y al laboratorio de Agrobiotecnología por apoyarnos con algunos materiales para el trabajo del laboratorio.

Al **Dr. Oswalt Rafael Jiménez Caldera** por brindarnos el financiamiento para realizar la secuenciación de las muestras en el Centro de Biología Molecular de la Universidad Nacional Casimiro Sotelo.

Br. Katherine Navidad Sandino Lacayo.

Br. Walter Eduardo Salmerón Quezada

INDICE DE CONTENIDO

SECCION	PAGINA
DEDICATORIA	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
INDICE DE CONTENIDO	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
III. MARCO DE REFERENCIA	4
3.1 Generalidades del plátano	4
3.2 Cultivo de tejido de plátano	5
3.2.1 Etapa cero: Selección y preparación del material	5
3.2.2 Etapa 1: Establecimiento	6
3.2.3 Etapa 2: Multiplicación o Propagación	6
3.2.4 Etapa 3: Formación de raíces o enraizamiento	7
3.2.5 Etapa 4: Aclimatización	7
3.3 Microorganismos contaminantes en la micropropagación de plátano	7
3.3.1 Contaminación endófito	7
3.3.2 Contaminación por Fitopatógenos y manipulación en el laboratorio	8
3.4 Antibióticos y su importancia en la producción <i>in vitro</i> de plantas	9
3.4.1 Ampicilina	9
3.4.2 Cloranfenicol	10

3.4.3 Neomicina	10
3.4.4 Rifampicina	10
3.4.5 Estreptomina	11
3.4.6 Cicloheximida	11
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1 Ubicación del estudio	12
4.2 Diseño de la investigación, diseño experimental y diseño de tratamientos	13
4.3 Manejo del ensayo y metodología	13
4.3.1 Material <i>in vitro</i>	13
4.3.2 Aislamiento y purificación de microorganismos contaminantes creciendo sobre el medio de cultivo	14
4.3.3 Identificación morfológica de hongos	16
4.3.4 Identificación morfológica de bacterias	16
4.3.5 Identificación bioquímica de bacterias	16
4.3.6 Secuenciación de bacterias	16
4.3.7 Antibiograma	17
4.4 Datos o variables evaluados	18
4.4.1 Cuantificación de microorganismos contaminantes	18
4.4.2 Caracterización de bacterias a través de pruebas bioquímicas	19
4.4.3 Antibiograma para determinación de eficacia de antimicrobianos en el desarrollo de bacterias.	20
4.5 Análisis de datos	21
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
5.1 Identificación morfológica de hongos encontrado durante la micropropagación de plátano	22
5.2 Porcentaje de frascos contaminados por microorganismo en la micropropagación de plátano	22
5.2.1 Total de microorganismos contaminantes por muestreo	22
5.2.2 Porcentaje de contaminación por microorganismos en la etapa de establecimiento	24
5.2.3 Porcentaje de contaminación por microorganismos en la etapa de multiplicación	25
5.2.4 Porcentaje de contaminación de microorganismo por variedad.	27

5.2.5 Porcentaje de contaminación de microorganismos provenientes de tejido vegetal	28
5.3 Identificación y clasificación de bacterias mediante pruebas bioquímicas.	30
5.4 Identificación bacteriana por secuenciación de ADN	32
5.5 Antibiograma para determinación de eficacia de antimicrobianos en el desarrollo de bacterias.	35
V. CONCLUSIONES	37
VI. RECOMENDACIONES	38
VII. LITERATURA CITADA	39
VIII. ANEXOS	44

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Antibióticos utilizados en el estudio	17
2. Identificación de bacterias a nivel de género.	29

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
1. Mapa Google Earth ubicacion de laboratorio de Microbiologia UNA y CNCT INTA	12
2. Proceso de aislamiento y purificación de hongos encontrados en la micropropagación de plátano.	14
3. Proceso de aislamiento de bacterias contaminantes encontradas en la micropropagación de plátano.	15
Figura 4. Proceso de aplicación de tratamientos del antibiograma	18
5. Medición de halo de inhibición. A) Aparición del halo de inhibición. B y C) Medición del halo.	20
6. Porcentaje de frascos contaminados por muestreo	23
7. Porcentaje de microorganismos contaminantes en etapas de establecimiento in vitro de plátano	25
8. Porcentaje de microorganismos contaminantes en etapas de multiplicación in vitro de plátano	26
9. Microorganismos contaminantes por variedad.	28
10. Microorganismos contaminantes en tejido de plátano por subcultivos.	29
11. Dendograma de similitud y diferencia de 69 aislados de bacterias obtenidos de procesos de micropropagación in vitro de plátano.	32
12. Árbol filogenético de las cepas Bacillus, Stenotrophomonas.	34
13. Sensibilidad de aislados bacterianos ante antibióticos	36

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO	PÁGINA
1. Identificación de bacterias mediante pruebas bioquímicas	43
2. Crecimiento bacteriano en tejido	44
3. Proceso de aislamiento de bacterias contaminantes encontradas en micropropagación de plátano.	45
4. Proceso de aplicación de tratamientos del antibiograma	46
5. Proceso de desinfección de tejido	47

RESUMEN

El Centro Nacional de Cultivo de Tejidos (CNCT) del INTA posee problemas fitosanitarios por microorganismos contaminantes en el proceso de micropropagación de plátano, que limitan el crecimiento del explante y aumenta la tasa de mortalidad en todas las fases de la micropropagación. El objetivo de este estudio es generar información sobre los principales microorganismos contaminantes y evaluar el efecto de 6 antibióticos sobre el crecimiento de bacterias contaminantes encontradas en la micropropagación de plátano. Se realizaron 3 muestreos consecutivos en las fases de establecimiento (1 y 2) y multiplicación (subcultivo 19) de las variedades Cuerno enano, Cuerno gigante y Cemsa ¾. La cuantificación de hongos y bacterias se realizó según la etapa de la micropropagación del plátano, variedad, muestreo y procedencia de manera descriptiva. Posteriormente, se identificó fenotípicamente los principales géneros de hongos y a través de características macroscópicas, morfología, pruebas bioquímicas y secuenciación se determinó géneros y especies de las bacterias contaminantes. En total se muestrearon 647 frascos contaminados de los cuales el 53 % presentó afectación por hongo y 47 % por bacterias. De 690 plántulas totales con síntomas de necrosis y clorosis solamente el 70% presentó bacterias (Subcultivo 5-9). Los hongos identificados fueron: especies de *Aspergillus*, *Botritis*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Monilia*, *Phoma*, *Penicillium* y *Trichoderma*. Las bacterias identificadas a nivel de género fueron: *Micrococcus*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacterias* y *Staphylococcus*. Por secuenciación se identificaron 2 bacterias endofíticas provenientes de tejido vegetal *in vitro*: *Stenotrophomona maltophilia* y *Bacillus cereus*. Se efectuó un análisis de antimicrobianos a 30 cepas utilizando el método de difusión con disco, determinando que los más efectivos fueron rifampicina y ampicilina. La contaminación en el proceso de micropropagación de plátano en el CNCT se presenta en todas las fases causado principalmente por hongos y bacterias y con índices que superan el 5 % establecido por algunos laboratorios de referencia.

Palabras clave: Antibióticos, pruebas fenotípicas, secuenciación, hongos, bacterias.

ABSTRACT

The National Tissue Culture Center (CNCT) of INTA has phytosanitary problems due to contaminating microorganisms in the banana micropropagation process, which limit the growth of the explant and increase the mortality rate in all phases of micropropagation. The objective of this study is to generate information on the main contaminating microorganisms and to evaluate the effect of six antibiotics on the growth of contaminating bacteria found in banana micropropagation. Three consecutive samplings were carried out in the establishment (1 and 2) and multiplication (subculture 1-9) phases of the varieties Cuerno enano, Cuerno gigante and Censa ³/₄. The quantification of fungi and bacteria was carried out according to the stage of the micropropagation of the banana, variety, sampling, and origin in a descriptive way. Subsequently, the main genera of fungi were identified morphologically and through phenotypical and sequencing characterization genera and species of contaminating and endophytic bacteria were determined. In total, 647 contaminated bottles were sampled, of which 53% were affected by fungi and 47% by bacteria. Of 690 total seedlings with symptoms of necrosis and chlorosis, only 70% had bacteria (Subculture 5-9). The fungi identified were *Aspergillus spp*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Monilia*, *Phoma*, *Penicillium*, *Trichoderma*. The bacteria identified at the genus level were *Micrococcus*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* and *Staphylococcus*. Sequencing identified 3 endophytic bacteria from plant tissue *in vitro*: *Stenotrophomona maltophilia* and *Bacillus cereus*. An antimicrobial susceptibility analysis was performed on 30 strains using the disc diffusion method, determining that the best inhibitors were rifampicin and ampicillin. Contamination in the banana micropropagation process in the INTA CNCT occurs in all phases caused mainly by fungi and bacteria and with rates that exceed 5% established by some reference laboratories.

Keywords: Antibiotics, phenotypic tests, sequencing, fungi, bacteria

I. INTRODUCCIÓN

EL plátano (*Musa spp*), es originario del sureste asiático, es un cultivo tropical perenne perteneciente a la familia de las musáceas. A nivel mundial en los países productores, el plátano representa un rubro importante ya que genera ingresos, fuentes de trabajo y es un alimento básico en la dieta diaria de millones de personas (Gálvez y Ochoa, 2021)

La alta potencialidad y rentabilidad del cultivo del plátano ha permitido que Nicaragua exporte productos de alta calidad a países como Estados Unidos, Guatemala, Honduras, El Salvador y Costa Rica. Esta demanda incide directamente en la ampliación de áreas productivas, generando empleos directos en los departamentos de Rivas, Carazo, Masaya, Granada, León y Chinandega. La producción de este rubro ha venido incidiendo positivamente en el desarrollo del sector socioeconómico primario (Serrano y Valdivia, 2015).

Dada la ampliación del área productiva a nivel mundial, el plátano es una de las especies más micropropagadas por la técnica de cultivo de tejidos ya que mediante este método de propagación masiva se obtienen las siguientes ventajas: semilla libre de plagas y enfermedades, mayores volúmenes de producción, uniformidad en las plantaciones, disposición de material de siembra en cualquier época del año y cosechas más precoces con un nivel mayor de producción (Galán et al., 2018).

En el proceso de micropropagación existen problemas fitosanitarios que causan pérdidas cuantiosas de material, tanto en los trabajos de investigación como en la micropropagación comercial. De acuerdo con Castro y Madariaga (2015), la contaminación puede tener dos orígenes: a) microorganismos que colonizan en la superficie o el interior del explante (endófitos) y b) microorganismos introducidos durante la manipulación en el laboratorio. Los contaminantes más frecuentes en condiciones *in vitro* son los hongos, bacterias y levaduras (Suárez, 2020).

Los contaminantes que ocasionan más problemas en la micropropagación son las bacterias, ya que son sistémicos, difícil de detectar y eliminar. Por otro lado, los hongos representan los contaminantes adquiridos por mala manipulación y falta de asepsia en los protocolos de producción. Por último, otro contaminante como las bacterias endofíticas son las menos estudiadas debido a que habitan dentro de los tejidos de las plantas al menos durante una parte de su ciclo de vida sin causar daño alguno al hospedero, sin embargo, se vuelve fitopatógenas en la micropropagación. Estos contaminantes se manifiestan en todas las etapas y subcultivos, en algunos casos no se presentan en los primeros subcultivos de la micropropagación porque requieren de un periodo de adaptación, debido a la alta presión osmótica o por ciertas hormonas de los medios de cultivo que pueden inhibir su crecimiento (Pérez et al., 2013).

El Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA), desde el 2017 inauguró el CNCT, que posee una capacidad instalada para la producción de 1,000,000 de plántulas al año. Recientemente, la micropropagación en la Biofábrica se ha visto afectada por contaminantes en las diferentes fases de la micropropagación ocasionando pérdidas económicas y de producción.

El presente trabajo pretende identificar y cuantificar los principales microorganismos contaminantes que predominan en las diferentes etapas de la micropropagación de plátano. Así mismo, evaluar el efecto de seis antibióticos en el crecimiento de bacterias contaminantes y así contribuir al mejoramiento sanitario de la producción *in vitro* del CNCT del INTA. Cabe mencionar que este es el primer trabajo en Nicaragua dirigido a la cuantificación, identificación e inhibición de microorganismos contaminantes en cultivo de tejidos de plátano.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Generar información sobre el diagnóstico y sensibilidad a antibióticos de los principales microorganismos contaminantes en el proceso de micropropagación de plátano que nos permitirá contribuir al mejoramiento sanitario de la producción *in vitro* en el Centro Nacional de Cultivo de Tejidos del INTA.

2.2 Objetivos específicos

- Cuantificar el grado de contaminación por microorganismos en las etapas de micropropagación de plátano.
- Identificar fenotípicamente los diferentes tipos de microorganismos contaminantes presentes en la micropropagación de plátano.
- Determinar la eficacia de seis antibióticos en el crecimiento de bacterias contaminantes presentes en el proceso de micropropagación de plátano.

III. MARCO DE REFERENCIA

3.1 Generalidades del plátano

El plátano es una fruta tropical originaria del sureste de Asia, perteneciente a la familia de las musáceas su nombre científico es *Musa spp* (Roberto, 2021). El ciclo fenológico del cultivo de plátano se divide en tres etapas, iniciando desde la fase infantil, hasta la fase reproductiva de la planta.

La duración del ciclo fenológico en promedio oscila en 404 días y está determinada por la variedad, la altitud, latitud y las condiciones edafoclimáticas de cada una de las regiones productivas. El cultivo de plátano tiene un ciclo de transición, es decir que presenta diferentes estadios de crecimiento en una misma planta. Por lo tanto, se puede tener al mismo tiempo una planta madre en producción, un hijo desarrollado y una nueva brotación (Vargas et al., 2017).

De acuerdo con el (Ministerio de Fomento Industria y Comercio [MIFIC], 2022), Centroamérica representa el 2.23% de la producción mundial de plátano y el 8.53% de la Producción de América Latina y el Caribe:

El mayor productor de plátano en la región es Honduras con un área cultivada de 21,199 ha, en segundo lugar, se encuentra Guatemala (7,088 ha), en tercer lugar, El Salvador (2,647 ha), en cuarto lugar, Costa Rica (11,000 ha) y en último lugar de producción regional se encuentra Nicaragua con un total de 4,300 ha dedicadas a la producción de este rubro (p. 5)

En Centroamérica el cultivo de plátano es un producto de gran importancia económica y de seguridad alimentaria. Esta especie se cultiva en más de 120 países, los cuales producen 100 millones de toneladas anualmente y constituye el principal alimento de al menos 400 millones de personas (p.7).

La producción de plátano en Nicaragua se realiza durante todo el año en la región del Pacífico principalmente en Rivas y Chinandega. Para el ciclo 2022/23 se estima una producción con igual volumen que el ciclo anterior. No obstante, el volumen de exportación es de 1.5 millones de plátanos (+8%), por US \$18.3 millones (p. 28).

3.2 Cultivo de tejido de plátano

Según Galán et al., (2018) mencionan que “La micropropagación, es una de las aplicaciones de la biotecnología más generalizada del cultivo *in vitro*, consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado con el empleo de un medio de cultivo” (p.5).

Existen dos técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*: Hussain et al. (2012) mencionan que:

La organogénesis es la producción de órganos de las plantas (raíz, brote, hojas) ya sea directamente de los meristemos, o indirectamente de masas de células desdiferenciadas (callos), tanto para la propagación masiva de las plantas a estudiar como para el crecimiento de órganos particulares de interés (p. 6).

“La callogénesis por otra parte se produce cuando el explante, prolifera células desdiferenciadas de callo. Las células del callo se consideran como totipotenciales debido a su habilidad para regenerar una planta completa” (Ochoa-Villarreal et al., 2015 p. 6).

La micropropagación en plátano consiste en aislar una porción de la planta (explante) en condiciones asépticas y proporcionarle condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células regeneren una planta nueva (Brochero y Suarez, 2015). El explante, es la parte de la planta (tejido u órgano), utilizado para iniciar el proceso de multiplicación de la planta madre que debe reunir ciertas características como: tamaño, fuente y la edad fisiológica del (Ruscitti et al., 2011).

Según Galán et al., (2018), se pueden distinguir las siguientes etapas en el proceso de micropropagación de musáceas:

3.2.1 Etapa cero: Selección y preparación del material

Esta etapa inicia en campo, seleccionando la planta madre de acuerdo con caracteres morfológicos, fitosanitarios y productivos. Luego esta se somete a un proceso de desinfección con el fin de eliminar patógenos endógenos y exógenos (Jiménez, 2004).

3.2.2 Etapa 1: Establecimiento

Esta fase se inicia una vez se establece el explante en el medio de cultivo y tiene una duración aproximada de 30 días, durante el cual los explantes permanecen en un medio ambiente cuyas condiciones deben de ser controladas. Se recomienda condiciones de 16 horas luz, 25 ± 2 °C además de una humedad relativa del 60-70 % (Israeli et al., 1995).

Diferentes autores como López, y Caldera (2002), reportan que el medio Murashige y Skoog (1962), es el más ampliamente utilizado en el cultivo de plátano.

Las fitohormonas más utilizadas en los medios de cultivo se clasifican en 4 grupos principales: a) auxinas, en este grupo se encuentran el Ácido Indolacético (AIA), Ácido Naftaleacético (ANA), Acido Indol Butírico (IBA), 2,4-D, Picloran y Dicamba; b) citoquininas, en este grupo se encuentran el 6-Bencil Aminopurina (BAP), N⁶-(2-Isopentil) Adenine (2iP), Kinetine, Tiazuron y la Zeatina; c) Giberelinas, en este grupo se encuentra el Ácido Giberélico (GA₃); d) el Ácido Abscísico y d) las Poliaminas (Alcántara y Acero 2019).

En esta etapa es importante tener en cuenta que el nivel aceptable de incidencia de contaminación no debe exceder el 5 % (Jiménez, 2004).

3.2.3 Etapa 2: Multiplicación o Propagación

El objetivo de esta fase es formar nuevas plantas o brotes a partir del explante inicial, esto depende del genotipo, composición del medio de cultivo, tamaño inicial del explante, procedimiento y edad del cultivo (Jiménez, 2004).

Los explantes son extraídos al cabo de 30 días del medio inicial y se colocan en un medio nuevo suplementado con una relación de auxinas y citoquininas óptima para promover la multiplicación o brotación. Para tal efecto, es característico que se corte el pseudotallo de la plántula con la finalidad de herir el meristemo y evitar la dominancia apical (Núñez y Mariño, 2008).

3.2.4 Etapa 3: Formación de raíces o enraizamiento

El objetivo de esta etapa es lograr que las plantas emitan suficiente cantidad de hojas y raíces, para facilitar la absorción de agua y nutrientes del sustrato, ayudando así a la adaptación de las plantas a las condiciones ambientales (Chavarría y López, 2010).

Los brotes provenientes de la fase de multiplicación que presenten un tamaño aproximado de 1 a 1.5 cm son separados individualmente y se colocan en un medio de cultivo que permita después de 30 días el desarrollo de una plántula con un adecuado sistema radicular y follaje (Jiménez, 2004).

3.2.5 Etapa 4: Aclimatización

Es la última fase de la micropropagación y una de las más importantes de todo el proceso. En esta etapa las plantas procedentes del enraizamiento son trasladadas a condiciones de vivero en invernaderos. En esta fase las plantas son sometidas a stress debido a que las condiciones de humedad y temperatura dejan de ser totalmente controladas. Por lo tanto, antes de transferirlas a las condiciones externas es necesario un proceso de acondicionamiento gradual: protección a la luz, la transpiración estomática y cuticular (Núñez y Mariño, 2008).

3.3 Microorganismos contaminantes en la micropropagación de plátano

3.3.1 Contaminación endófitas

Los endófitos, son microorganismos (bacterias y hongos) que existen o desarrollan parte de su ciclo de vida dentro de una planta. Visualmente no se observan síntomas en las plantas por su colonización. La mayoría de las endófitas colonizan diferentes compartimentos de la planta como el apoplasto, incluyendo los espacios intercelulares de las paredes de las células y los vasos del xilema. Las bacterias endófitas, como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacterias* entre otras forman infecciones discretas dentro de los tejidos de plantas sanas para todo o casi todo su ciclo de vida (Pérez, et al., 2013).

“Entre los hongos endofíticos podemos encontrar a *Fusarium circinatum*, *Phytophthora alni*, *P. pluvivora*., *Gremmeniella abietina*, *Cryphonectria parasitica* y *Heterobasidion annosum*”(Flores y Pacheco, 2017).

3.3.2 Contaminación por Fitopatógenos y manipulación en el laboratorio

Pérez, et al.,(2013), mencionan que la contaminación puede ocurrir durante el proceso de cultivo de tejidos, cuando los microorganismos presentes en los medios de cultivo, las herramientas o los materiales utilizados para el cultivo se introducen o entran en contacto con las plantas. También puede ocurrir cuando las plantas se obtienen a partir de semillas o de otra fuente contaminada (p.2).

La contaminación por microbios puede aparecer en cualquier fase del proceso de cultivo de tejidos. Las condiciones ambientales dentro del recipiente, como los altos niveles de humedad relativa, fácil disponibilidad de nutrientes en el medio, ausencia de agentes antagónicos y falta de aireación; favorecen al crecimiento rápido de cualquier inóculo microbiano. Por tal razón, una contaminación en condiciones *in vitro* puede resultar en una colonización rápida, que es evidente en pocos días después del establecimiento del cultivo o puede ser una manifestación lenta que pueda detectarse en varios días después del establecimiento del explante; causando la pérdida parcial o total del tejido cultivado (Suárez, 2020).

Suárez (2020), menciona que las bacterias más comunes en cultivos *in vitro* se encuentran los géneros *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* y *Xanthomonas*. Los síntomas más comunes de la contaminación bacteriana en los tejidos vegetales son la muerte completa del explante, crecimiento desuniforme, necrosis, bajas tasas de multiplicación y baja capacidad de enraizamiento. Generalmente, la contaminación se identifica por la presencia de manchas acuosas y coloración variada en el tejido vegetal (p. 30).

Por otro lado, los géneros de hongos más comunes que se encuentran relacionados a la contaminación de cultivo *in vitro* son: *Aspergillus*, *Candida*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Saccharomyces*, este último conocido como levadura (p. 31).

Para prevenir la contaminación, es importante mantener condiciones de higiene adecuadas en los laboratorios de cultivo de tejidos, utilizando medios de cultivo estériles y desinfectando adecuadamente las herramientas y los materiales utilizados. Además, es importante realizar pruebas periódicas de detección de microorganismos para identificar y eliminar cualquier contaminación endofítica presente en las plantas cultivadas *in vitro* (p. 21).

3.4 Antibióticos y su importancia en la producción *in vitro* de plantas

Los antibióticos son un subgrupo de antimicrobianos con actividad antibacteriana, estos se pueden clasificar en: a) Bacteriostáticos: impiden el desarrollo y multiplicación bacteriana, pero sin llegar a destruir las células y b) Bactericidas: letal, llevando a la lisis bacteriana (Barboza, 2015).

Hernández y Gonzales (2010), mencionan que los antibióticos matan o inhiben el crecimiento de bacterias y hongos en los medios de cultivo y plantas cultivadas en *in vitro*. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el uso excesivo o inapropiado de antibióticos puede llevar al desarrollo de resistencia bacteriana, lo que puede tener efectos negativos en la producción comercial de plantas. Por lo tanto, es importante usar los antibióticos de manera responsable y en combinación con otras medidas de control de la contaminación, como la esterilización adecuada de los medios de cultivo, herramientas y equipos.

De acuerdo con Martínez et al., (2008) los antibióticos más importantes para la inhibición de bacterias para la micropropagación son:

3.4.1 Ampicilina

Es un antibiótico de amplio espectro, particularmente eficaz contra algunos microorganismos Gram negativos. Su efecto se atribuye a que se une e inactiva a la transpeptidasa, acción que evita el entrecruzamiento de las cadenas de peptidoglucano que le dan fuerza y rigidez a la pared bacteriana. También inhibe la reproducción, crecimiento, y provoca alargamiento y lisis de las bacterias susceptibles (Martínez et al., 2018)

3.4.2 Cloranfenicol

Es un antibiótico bacteriostático de amplio espectro que puede ser bactericida a altas concentraciones o en casos de cepas altamente susceptibles. Destaca su acción contra *Salmonella typhi*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Bordetella pertussis*, *Bacteroides fragilis*, *Moraxella lacunata*, *Staphylococcus aureus*, *Rickettsias* y especies de *Neisseria*, *Chlamydia*, *Mycoplasma* y *Clostridium*. Se difunde a través de la membrana celular de las bacterias, se une a la subunidad 50S del ribosoma 70S, inhibe la peptidiltransferasa y la unión exitosa del RNA de transferencia completo al ribosoma y, en consecuencia, la formación de péptidos y la síntesis proteínica (Palomares et al., 2013).

3.4.3 Neomicina

Es un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro, estable en un amplio límite de pH (2 a 9), el cual no es inactivado por exudados, enzimas o productos del crecimiento bacteriano. Por un lado, inhibe la síntesis proteínica a nivel de la subunidad 30S de los ribosomas, y por el otro induce lecturas erróneas del RNAm, incorporando aminoácidos incorrectos a la cadena peptídica en crecimiento; sin embargo, se desconoce su mecanismo de acción bactericida. Es eficaz contra numerosos microorganismos Gram negativos (*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Vibrio cholerae*) y Gram positivos (*Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus anthracis*) y *Mycobacterium tuberculosis*) (Hilal et al., 2015)

3.4.4 Rifampicina

Es un agente bactericida de amplio espectro que impide la síntesis de ácidos nucleicos en las bacterias al unirse con la polimerasa de RNA dependiente del DNA. Es activa contra bacterias Gram positivas, contra algunas micobacterias, sobre todo *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, y contra algunas bacterias gram negativas, incluyendo *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* (Hooper D.C 2022)

3.4.5 Estreptomicina

Es un antibiótico del grupo de los aminoglucósidos aislado de los cultivos del *Streptomyces griseus*, de acción bactericida, cuya acción antimicrobiana resulta de la fijación sobre la unidad 30 S de los ribosomas. Impide sobre todo la fase de iniciación, perturbándose la ordenación del RNA mensajero y provocando una lectura incorrecta del código genético por el RNA de transferencia. Perturba además la permeabilidad de la membrana bacteriana. (Beauduy et al., 2021).

3.4.6 Cicloheximida

Es un compuesto producido por la bacteria *Streptomyces griseus* que muestra una actividad antibiótica antifúngica con la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas sólo en células eucariotas. Es producida por la bacteria *Streptomyces griseus*, la cicloheximida puede inhibir la síntesis de proteínas en células eucariotas, pero no en las procariotas, al interactuar directamente con la enzima translocasa e interferir con el paso de translocación. Además, este compuesto también bloquea el sitio A de ribosomas (Cell, 2023).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación del estudio

El muestreo y colecta de material vegetal *in vitro* de plátano se realizó en los meses de Abril, Mayo y Junio del 2022 en el Centro Nacional de Cultivo de Tejidos (CNCT), localizado en el Centro Nacional de Investigación Agropecuarias Augusto C. Sandino ubicado en el municipio de Managua, km 14 ½ carretera norte 2 km al sur, con las siguientes coordenadas geográficas: latitud Norte 12° 07' 55'' y longitud Oeste 86° 08' 55'' a una altura de 70 m.s.n.m (Instituto Nicaragüense de Estudio Territoriales [INETER], 2018).

Por otro lado, el desarrollo de pruebas y experimentos con los microorganismos se llevaron a cabo en el laboratorio de Microbiología Agrícola de la Universidad Nacional Agraria (UNA) ubicado en el km 12.5 carretera norte en las coordenadas 12°08'36'' latitud Norte y 86° 09'49'' longitud Oeste (Figura 1). La investigación fue realizada desde abril del 2022 a septiembre del 2023.

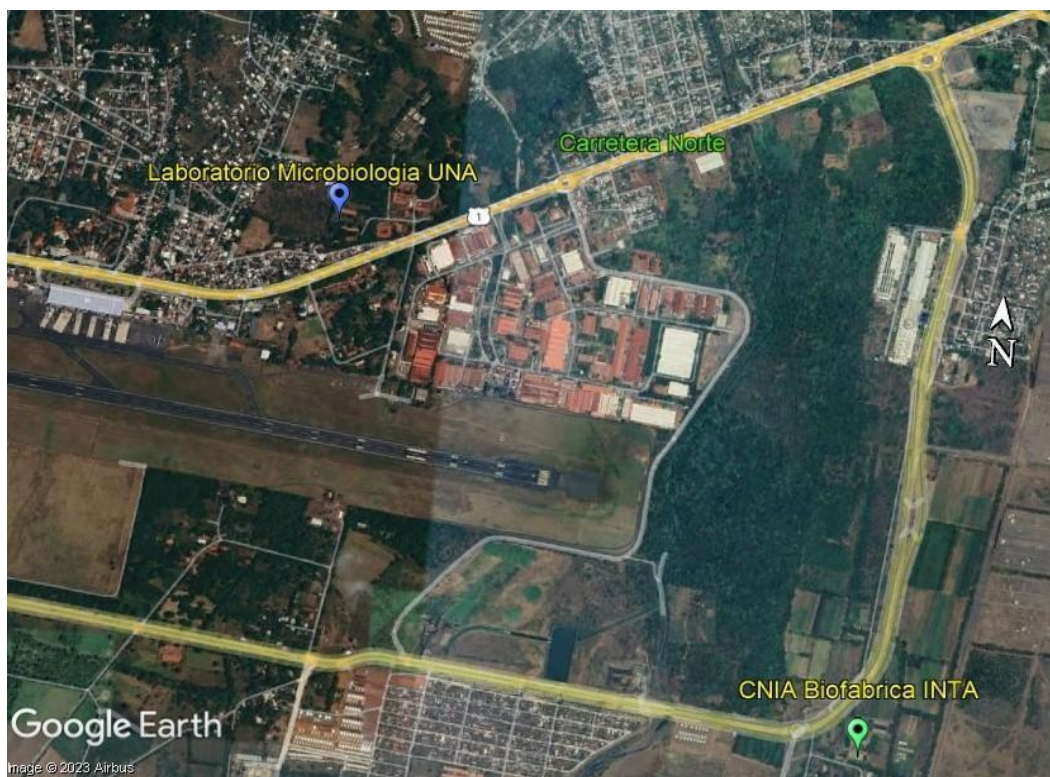


Figura 1. Mapa Google Earth ubicación de laboratorio de Microbiología UNA y CNCT INTA

4.2 Diseño de la investigación, diseño experimental y diseño de tratamientos

El tipo de estudio de la presente investigación, según las metodologías utilizadas, variables evaluadas y métodos para el análisis de los datos se le considera de carácter descriptivo (Piura, 2008), tomándose en cuenta el tiempo de ocurrencia, es de corte transversal (Salinas, 2012). Por el tipo de estudio no se utilizó ningún diseño experimental ni tratamientos.

4.3 Manejo del ensayo y metodología

4.3.1 Material *in vitro*

El material genético utilizado en el estudio consistió en vitroplantas de diferentes lotes de las fases de Establecimiento (etapa 1 y 2) y Multiplicación (subcultivos 1-9) de las variedades Cuerno Enano, Cuerno Gigante y CEMSA ¾, todos con procedencias diferentes (Managua, León, Rivas). La nomenclatura utilizada para abreviación de departamentos en Nicaragua se realizó bajo los códigos de normalización 3166-2 publicados por la Organización Internacional de normalización.

Muestreo del material *in vitro*. El muestreo se realizó una vez por mes, durante tres meses. Se utilizó el muestreo estratificado dirigido considerando frascos que presentaban crecimiento de hongos y bacterias (exudado bacteriano blanquecino, amarillo o coloración oscura) dentro del medio o alrededor del explante. De igual manera, frascos con presencia de clorosis y necrosis en el área foliar y tallos de las vitroplantas.

Se muestrearon un total de 647 frascos contaminados en diez etapas del proceso de micropropagación de plátano (dos establecimientos y ocho subcultivos de multiplicación) utilizando la fórmula para estimar el tamaño de la muestra a partir de una población desconocida:

$$n: \frac{Zx^2 * p * q}{ex^2}$$

Donde:

- n: Tamaño de la muestra buscado
- Z: parámetro estadístico que depende el nivel de confianza (NC)
- e: Error de estimación máximo aceptado
- p: Probabilidad de que ocurra el evento
- q: Probabilidad de que no ocurra el evento

En el primer muestreo se seleccionaron 234 frascos, 155 frascos en el segundo y 258 frascos en el tercer muestreo.

4.3.2 Aislamiento y purificación de microorganismos contaminantes creciendo sobre el medio de cultivo

Aislamiento y purificación de hongos: El aislamiento de hongos se inició extrayendo micelio directamente de los frascos contaminados e inoculándolos en medio PDA (Papa-Dextrosa Agar) + Ácido láctico, usando placas Petri desechables (15 mm de profundidad x 100mm de diámetro). Estos se mantuvieron a temperatura ambiente por 7 días. Este proceso se repitió 3 veces para obtener el cultivo puro (Figura 2) (Rojas, 2011).

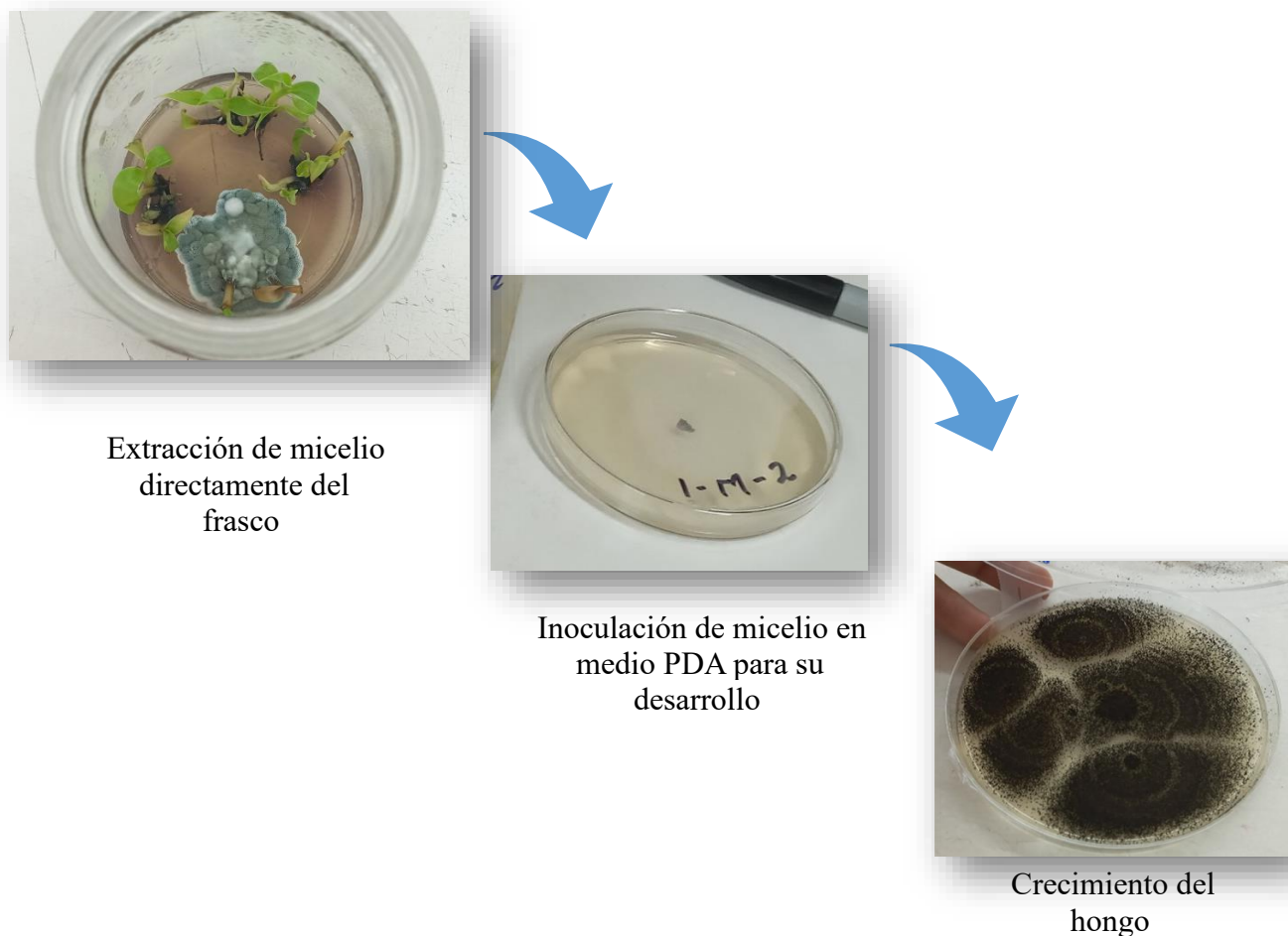


Figura 2. Proceso de aislamiento y purificación de hongos encontrados en la micropropagación de plátano.

Aislamiento de bacterias: El aislamiento de bacterias se realizó extrayendo exudado (zooglea) directamente del frasco contaminado y se cultivó en placas Petri desechables (15 mm de profundidad x 100mm de diámetro) utilizando medio AN (Agar Nutritivo) estas permanecieron en condiciones de 35 °C/ 24h-48h (Figura 3, anexo 3).

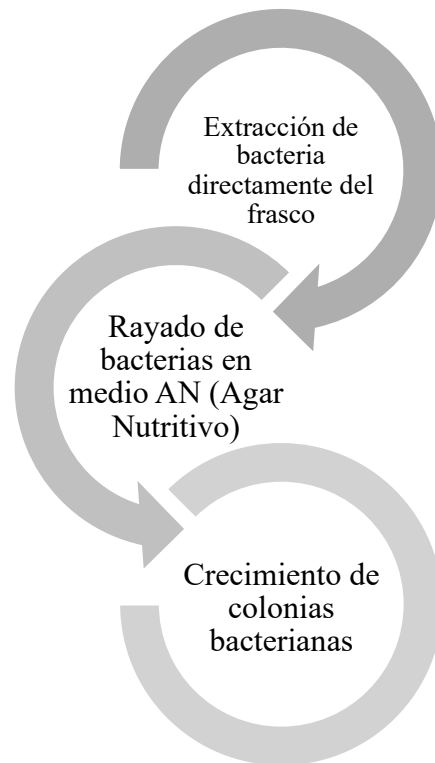


Figura 3. Proceso de aislamiento de bacterias contaminantes encontradas en la micropropagación de plátano.

Aislamiento de microorganismos contaminantes a partir de material vegetal: Para la realización de esta etapa se utilizaron tejidos de hojas y tallos de plantas con síntomas (necróticos y cloróticos) de daño por hongos y bacterias, los cuales se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1 % por cinco minutos, seguido de etanol al 70 % por 30 segundos y finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Los tejidos fueron inoculados en medio PDA utilizando una proporción de cinco tejidos en una placa Petri desechable. En total se inocularon 97 placas Petri. Los hongos o bacterias resultantes del aislamiento se purificaron en medio PDA y AN.

4.3.3 Identificación morfológica de hongos

Los hongos provenientes del medio de cultivo usado en la micropropagación de plátano y los provenientes de tejido vegetal se caracterizaron de acuerdo con su género utilizando las claves taxonómicas propuestas por Barnett y Hunter (1998). Siguiendo esta metodología se analizaron características macroscópicas como: color, forma, elevación y textura del micelio de los hongos contaminantes así mismo, observaciones microscópicas de hifas del micelio, septos que dividen las hifas y células que contienen uno o dos núcleos.

4.3.4 Identificación morfológica de bacterias

La morfología bacteriana se determinó de acuerdo con su forma y agrupación y a sus características macroscópicas en medio de cultivo basándonos en la metodología propuesta por Bergey (2012), usando agar nutritivo inclinado y caldo nutritivo.

4.3.5 Identificación bioquímica de bacterias

Las bacterias también se caracterizaron a nivel de género empleando pruebas de Tinción gram y metabólicas (bioquímicas) descritas por Schaad et al., (2001): Prueba de Catalasa, Prueba de Oxidación-Fermentación, Fermentación de Azúcares en Agar TSI, Prueba de Citrato, Prueba de Hidrólisis de Gelatina y Prueba de Hidrólisis de Almidón.

4.3.6 Secuenciación de bacterias

La secuenciación se realizó únicamente en 3 aislados bacterianos obtenidos de tejido vegetal que presentaron características morfológicas y bioquímicas diferentes del resto. Se utilizó un secuenciador tipo SeqStudio ABI 3200 machine (Applied Biosystems) del Centro de Biología Molecular de la Universidad Casimiro Sotelo Montenegro. El resultado de la secuenciación se utilizó para identificar las bacterias a nivel de especie al comparar sus secuencias con datos almacenados en el National Center for Biotechnology Information (NCBI).

4.3.7 Antibiograma

Como resultado de las pruebas bioquímicas y por su predominancia como microorganismos contaminantes se seleccionaron 30 aislados bacterianos para ser evaluados con seis tipos de antibióticos con una única dosis para cada uno (Cuadro 1), utilizando la técnica de difusión de discos inhibidores en agar propuesta por Kirby y Bauer, (1966).

Para las pruebas se utilizó el medio agar Muller-Hinton, (1941) con 18 hrs de incubación.

Cuadro 1. Antibióticos utilizados en el estudio

Tipo de Inhibidor	Dosis Principal
Neomicina	0.05 g/ml
Cycloheximida	0.1 g/ml
Rifampicina	0.5 g/ml
Cloranfenicol	0.2 g/ml
Ampicilina	0.2 g/ml
Estreptomina	1 g/ml

El antibiograma consistió en depositar en la superficie del agar de una placa Petri previamente inoculada con el microorganismo, seis discos de papel filtro (1.4 mm de diámetro) impregnados cada uno con un tipo de los seis antibióticos. Una vez en contacto con la superficie húmeda del agar, el antibiótico se difundió en el medio radialmente formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 horas de incubación los discos aparecieron rodeados por un halo de inhibición (Figura 4).



Inoculación de bacterias en el medio



Preparación de discos de papel filtro con antibióticos



Distribución de los discos de papel filtro impregnados con antibióticos en agar Muller Hinton

Figura 4. Proceso de aplicación de tratamientos del antibiograma

4.4 Datos o variables evaluados

4.4.1 Cuantificación de microorganismos contaminantes

Identificación morfológica de microorganismos contaminantes (hongos)

Porcentaje de frascos contaminados: Se contabilizó número de frascos con hongos y bacterias por cada muestreo.

Porcentaje de hongos y bacterias en etapa de establecimiento: se contabilizaron los frascos contaminados en las etapas de establecimiento uno y dos.

Porcentaje de hongos y bacterias en etapa de multiplicación: se contabilizaron los frascos contaminados en las etapas de multiplicación del subcultivo uno al ocho.

Porcentaje de hongos y bacterias por variedad de plátano: se contabilizaron los frascos contaminados en las tres variedades consideradas en el estudio.

Porcentaje de microorganismos contaminantes provenientes de tejido de plátano: Se contabilizó total de frascos que presentaron síntomas de necrosis en hojas y tallos.

4.4.2 Caracterización de bacterias a través de pruebas bioquímicas

Para establecer diferencias entre las diferentes bacterias identificadas en el proceso de propagación *in vitro* de plátano, se usaron variables cualitativas que resultaron de las diferentes pruebas bioquímicas (Rojas et al., 2011):

Prueba de catalasa: Se evaluó la producción sostenida de burbujas de gas o efervescencia, catalasa (+) y catalasa (-) cuando no hay presencia de gas.

Prueba de Oxidación-Fermentación: Se evaluó microorganismos oxidativos, el color amarillo aparece en la superficie del medio; cuando el microorganismo es fermentador, se observa el viraje a amarillo en todo el tubo. Si el medio no cambia de color o vira a azul (pH básico), se considera que el microorganismo es inactivo frente a la glucosa.

Fermentación de Azúcares en Agar TSI (Triple Sugar Iron Agar). Se tomó en cuenta la siguiente categorización:

- Bisel alcalino/fondo alcalino (Alcalino/Alcalino/gas-/H₂S-): No hay fermentación de azúcares.
- Bisel alcalino/fondo ácido (Alcalino/Ácido/gas-/ H₂S-): Glucosa fermentada, lactosa-sacarosa no fermentadas. No hay producción de gas ni de H₂S.
- Bisel alcalino/fondo ácido (Alcalino/Ácido/gas-/H₂S+): Glucosa fermentada, lactosa-sacarosa no fermentadas. No hay producción de gas, pero sí de H₂S.
- Bisel alcalino/fondo negro (Alcalino/Ácido/gas+/H₂S+): Glucosa fermentada, lactosa-sacarosa no fermentadas, producción de gas y H₂S.
- Bisel ácido/fondo ácido (Ácido/Ácido): Glucosa y lactosa y/o sacarosas fermentadas. Puede producirse H₂S o no.

Prueba de Citrato: Se evaluó si la prueba es positiva, cuando se observa crecimiento a lo largo de la estría, acompañado o no de un viraje del indicador a color azul.

Prueba de Hidrólisis de Gelatina: Se evaluó el precipitado blanco indicador de presencia de gelatina no hidrolizada; la ausencia del precipitado en la región de crecimiento bacteriano indica hidrólisis de la gelatina.

Prueba de Hidrólisis de Almidón: Se evaluó la aparición de una coloración azul violeta en el medio, indica una prueba negativa y la aparición de halos de color café (color del Lugol), alrededor de las colonias, es indicativo de una reacción positiva.

4.4.3 Antibiograma para determinación de eficacia de antimicrobianos en el desarrollo de bacterias.

Se realizaron mediciones radiales desde el disco hasta el borde del halo bacteriano a las 18 horas para posteriormente categorizar las bacterias según su capacidad de crecimiento en la zona con antibiótico en: Sensible (2 cm a 5 cm), Intermedio (1 cm a 1.5 cm) y Resistente (inferior a 1.5 cm) Giacopello et al., (2012). Con la ayuda de una regla se realizaron las mediciones del área de inhibición de los discos impregnados con los antibióticos (Figura 5). El termino sensible indica que la bacteria puede tratarse de forma adecuada empleando dosis habituales de antimicrobiano, el intermedio indica que se puede esperar o no eficacia del antimicrobiano y finalmente, el resistente se refiere a aquellas bacterias que no se inhiben por las concentraciones utilizadas de antimicrobiano. Giacopello et al., (2012).

Los datos de la eficacia de los antibióticos se analizaron en términos de porcentajes empleando la fórmula propuesta por López-Cardona y Castaño-Zapata (2011) citada en (Centeno, 2017)

$$E = \frac{RDI\ Tto}{RDI\ Máx} \times 100\%$$

Donde:

E = Porcentaje (%) de eficacia del producto

RDI Tto = Rango de inhibición obtenido del tratamiento

RDI Máx. = Máximo rango de inhibición obtenido del mejor tratamiento

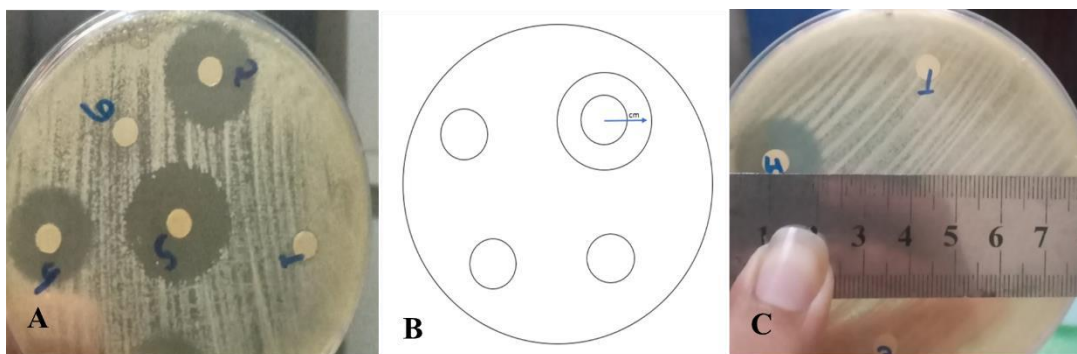


Figura 5. Medición de halo de inhibición. A) Aparición del halo de inhibición. B y C) Medición del halo.

4.5 Análisis de datos

La cuantificación de hongos y bacterias según la etapa de la micropropagación del plátano, variedad, muestreo y procedencia se realizó de manera descriptiva por análisis de porcentajes utilizando el programa Excel (2023) de Microsoft Office 365 Empresarial.

Para la caracterización de bacterias a través de pruebas bioquímicas, los datos fueron registrados en una matriz en Excel (2023) de Microsoft Office 365 Empresarial (Microsoft, 2023) y debido a que su patrón es binario se establecieron categorías registradas con números múltiples de 100 de acuerdo con la identidad de cada categoría. Luego, con el único propósito de graficar las relaciones entre género de bacterias, se diseñó una base de datos de tal manera que represente a cada genotipo como un idiotipo homocigótico hipotético para así realizar el cálculo de distancias genéticas empleando el software Arlequin versión 3.5.2.2 (Excoffier y Lischer 2010). Posteriormente, la matriz de distancia genética fue utilizada para trazar un árbol filogenético aplicando la inferencia por el método Neighbour-Joining utilizando el software MEGA versión 11 (Tamura et al., 2021).

Con el propósito de apreciar la relación genética de las bacterias que fueron secuenciadas en el estudio con géneros y especies diferentes, se utilizó la Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamiento Local (BLAST por sus siglas en inglés) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) para identificar las secuencias de ADN de los organismos comparadores. Posteriormente, las secuencias fueron alineadas y analizadas para construir un árbol filogenético con la inferencia por el método Neighbour-Joining utilizando un Bootstrap Consensos de 1000 réplicas con el software MEGA versión 11 (Tamura et al., 2021).

En los datos obtenidos en el antibiograma se realizó un diagrama tipo heatmap, con el objetivo de representar las similitudes de los aislados en relación con su nivel de tolerancia con los 6 antibióticos.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Identificación morfológica de hongos encontrado durante la micropropagación de plátano

De las muestras obtenidas de los frascos con hongos en el medio de cultivo *in vitro* se lograron identificar: *Aspergillus* spp, *Botritis* spp, *Cladosporium* spp, *Curvularia* spp, *Monilia* spp, *Phoma* spp, *Penicillium* spp y *Trichoderma* spp.

Hernández y Gonzales, (2010), señalan que estos contaminantes fungosos antes mencionados forman parte de los microorganismos contaminantes más comunes encontrados en cultivos *in vitro*.

Alvarado (1998) y Hernán (1987) mencionan que entre los contaminantes *in vitro* de plantas se han aislado microorganismos fungosos de los géneros *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Curvularia* y *Fusarium*; lo que denota gran relación con nuestros resultados.

Llorente (2002), indica que las condiciones de luz, temperatura y humedad además de favorecer el crecimiento de los cultivos *in vitro* estos contribuyen al desarrollo de microorganismos.

5.2 Porcentaje de frascos contaminados por microorganismo en la micropropagación de plátano

5.2.1 Total de microorganismos contaminantes por muestreo

Se muestrearon en total 647 frascos contaminados en 10 etapas del proceso de micropropagación de plátano. El 53 % de los frascos muestreados presentaban contaminación por hongos y el 47 % por bacterias.

Después de analizar los frascos, se observó que el tercer muestreo presentó el mayor porcentaje de afectación por hongos, alcanzando un 72 %. En contraste, el segundo muestreo registró el menor porcentaje (39 %) con el mismo tipo de microorganismo.

Cuando se analizaron los frascos con síntomas de contaminación bacteriana se determinó que el muestreo con mayor afectación fue el segundo con un índice de 61 %, en cambio el tercer muestreo presentó la menor afectación por bacterias (28 %) (Figura 6).

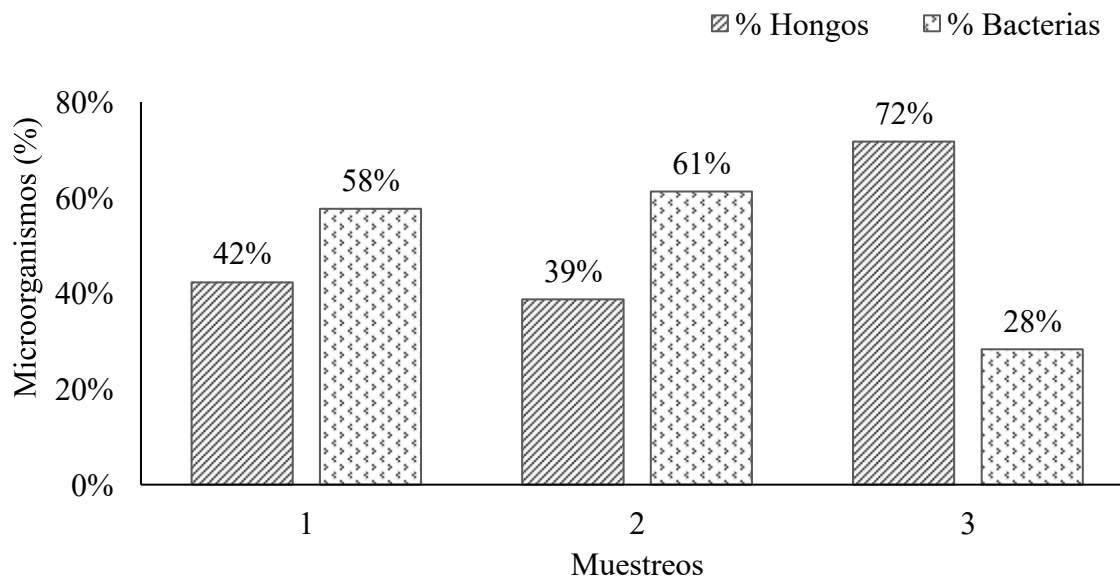


Figura 6. Porcentaje de frascos contaminados por muestreo

La contaminación en el cultivo *in vitro* de plátano puede ocurrir por la entrada de bacterias y hongos desde fuentes externas, como el aire, los equipos de laboratorio o los operadores. También puede deberse al uso de material vegetal contaminado, es decir que los explantes ya contienen endógenamente microorganismos no deseados.

Según Kubota y Tadokoro (1999), definen a la contaminación como la introducción accidental de microorganismos (bacterias, hongos, algas), vectores y fuentes patogénicas indeseables, donde se incluyen contaminantes patógenos y no patógenos.

Actualmente, el principal problema que se presenta cuando se trata de establecer un cultivo *in vitro* es la contaminación por diversos microorganismos (hongos, bacterias, levaduras), el ambiente generado por el explante es propicio para la proliferación de estos microorganismos, que provocan un efecto negativo dado que pueden reducir los coeficientes de multiplicación, inhibir el enraizamiento y ocasionar la muerte de la planta (Capó, 2000).

Los resultados en los dos primeros muestreos concuerdan con lo descrito por Hernández et al., (2005) donde afirman que los microorganismos con mayor predominancia en el cultivo *in vitro* son las bacterias. Adicionalmente, Sánchez Gutiérrez et al., (2015), señala que las bacterias son los microorganismos predominantes en cultivos *in vitro*. Cascante (2000), menciona que el principal problema de laboratorio de cultivo de tejidos es la contaminación bacteriana y puede alcanzar de 20 % a 55 % de contaminación.

5.2.2 Porcentaje de contaminación por microorganismos en la etapa de establecimiento

De los tres muestreos realizados únicamente en el primero y segundo se obtuvo material de las etapas de establecimiento que se trabajan en la Biofábrica del INTA. Se determinó que únicamente el 4 % de los frascos del establecimiento del muestreo uno presentó afectación por hongos. Para el caso de las bacterias en estas mismas etapas fue de 96 % mientras que el establecimiento dos del muestreo uno y ambos establecimientos del muestreo dos presentaron el 100 % de contaminación bacteriana (Figura 7).

Hernández y Gonzales (2010), plantean que la causa principal de la presencia de microorganismos en la fase de establecimiento *in vitro*, es atribuida principalmente al uso directo de material vegetal procedente de plantaciones comerciales contaminadas.

Un argumento relevante que justifica los índices de contaminación bacteriana en este estudio lo proponen Leifert et al, (1994), quienes afirman que las bacterias colonizan los espacios intercelulares y así escapan de la desinfección y manifiestan crecimiento en el medio de cultivo, en situaciones de estrés para el explante. De esta manera compiten con el tejido cultivado por nutrientes y espacio afectando negativamente su crecimiento y desarrollo. Adicionalmente, algunos de estos microorganismos pueden producir toxinas y causar la muerte del explante.

Por otro lado (Arbeláez et al., 2016), mencionan que al hacer uso de antibióticos en el cultivo de tejido de plátano la contaminación por microorganismos alcanza un 2 %. Dicho resultado difiere con los de este estudio, posiblemente debido a que en los procesos de micropropagación en la Biofábrica del INTA no se usaban antibióticos hasta el momento en que se realizaron los muestreos.

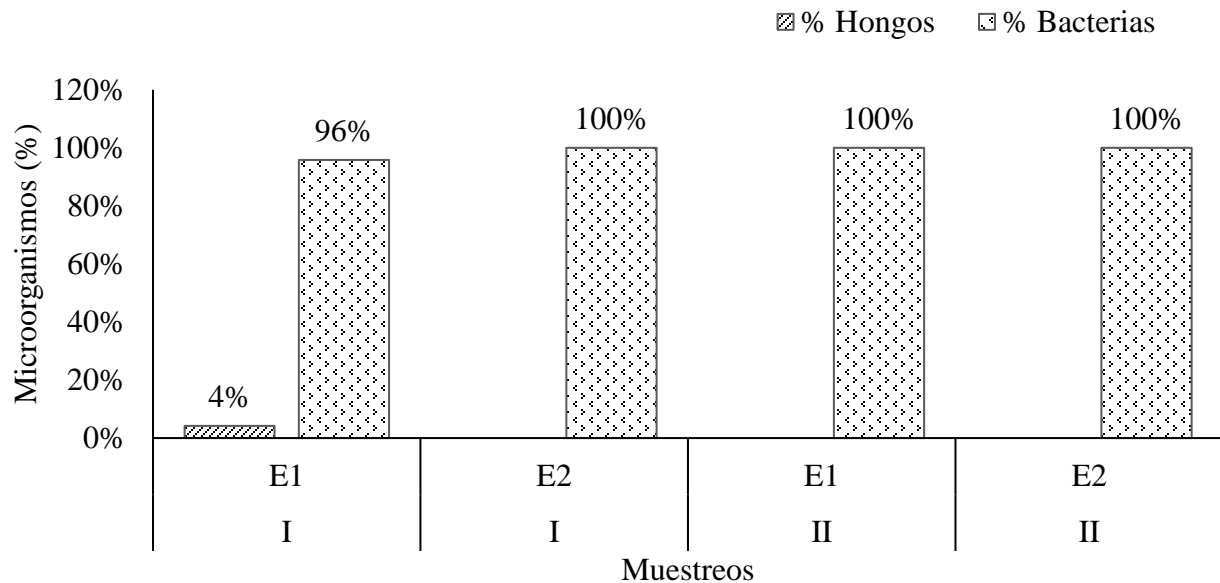


Figura 7. Porcentaje de microorganismos contaminantes en etapas de establecimiento in vitro de plátano.

5.2.3 Porcentaje de contaminación por microorganismos en la etapa de multiplicación

De los tres muestreos realizados en la etapa de multiplicación se determinó que en el séptimo subcultivo el 69 % de los frascos muestreados presentaron afectación por hongos, mientras que el menor porcentaje de afectación por este mismo tipo de microorganismo se obtuvo en el subcultivo tres (35 %).

Cuando se evaluó la afectación por bacterias, el subcultivo que presentó el mayor índice de contaminación fue el tercero (65 %) mientras que el séptimo subcultivo fue el de menor afectación (31 %) (Figura 8).

Según Roca y Mroginski (1991), la presencia ya sea de hongos y bacterias en cultivos *in vitro* se debe a varios factores, entre los que sobresalen la asociación del explante a su medio, así como por las condiciones de la introducción y la fuente origen del material vegetal; de ahí la importancia de obtener un material vegetal adecuado para usarlo como explante.

Existen estudios similares Sánchez y Gutiérrez et al., (2015) donde se menciona que los subcultivos de la fase de multiplicación muestran porcentajes de contaminación altos. Estas observaciones indicaron que en estos materiales vegetales la contaminación microbiana puede provenir del explante inicial

Sánchez Gutiérrez et al., (2015), menciona que a medida que se incrementa el número de subcultivos la presencia de contaminantes bacterianos puede ser mayor.

Leifert et al., (1991), plantean que cuando los microorganismos se introducen a los medios estériles causan una disminución en las tasas de multiplicación y de enraizamiento, así como la muerte de las plantas.

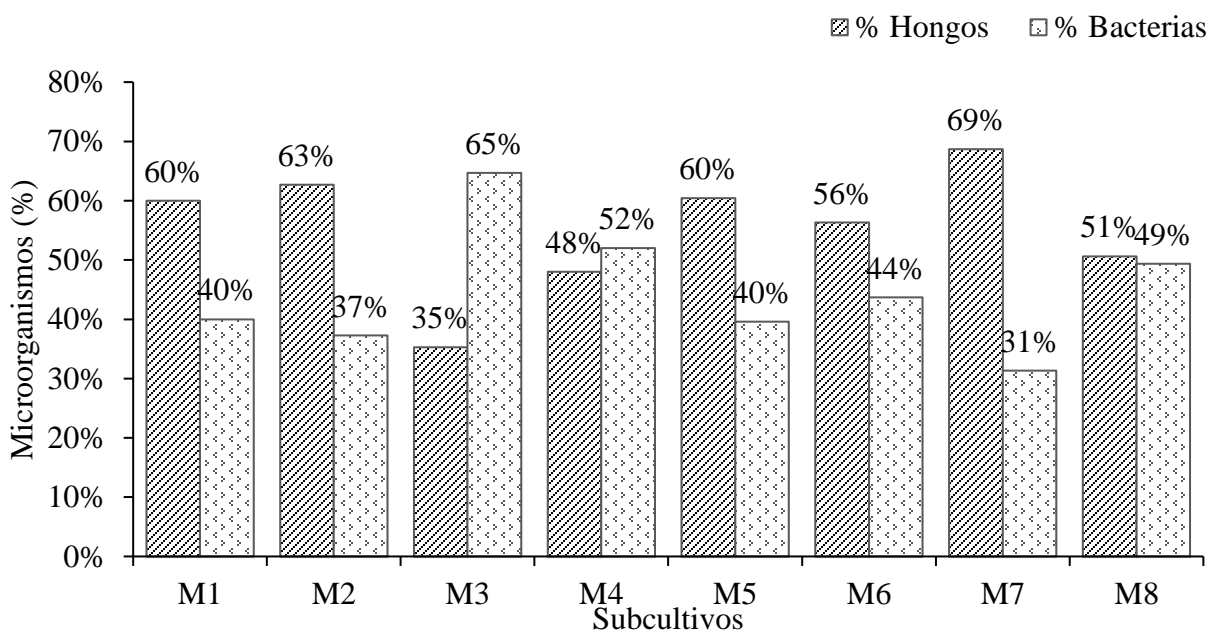


Figura 8. Porcentaje de microorganismos contaminantes en etapas de multiplicación in vitro de plátano.

5.2.4 Porcentaje de contaminación de microorganismo por variedad.

De las variedades muestreadas, CEMSA ³/₄ presentó un 18.5 % de afectación por bacterias, 10.5 % por hongos; cuerno enano 13.4 % afectación por bacterias y 14.4 % por hongos y cuerno gigante con un 1.5% afectación por bacterias y 2.5 % por hongos.

Por su parte Pereira, (2014) indica que la contaminación fúngica en el cultivo de tejidos vegetales procede principalmente del ambiente, mientras que las bacterias generalmente acompañan al explante y son un indicador de una desinfección deficiente.

Chavarría y López (2010) menciona que los métodos de desinfección no siempre eliminan las poblaciones de microorganismos en los tejidos de las plantas *in vitro* muchos son capaces de permanecer latentes en haces conductoras y quedan protegidos de los agentes químicos. También afirman que existen factores que pueden incidir en la contaminación como, por ejemplo: desinfección deficiente de los de los explantes, problemas con la esterilización de los medios de cultivo, contaminantes ambientales, deficiente manipulación en áreas estériles.

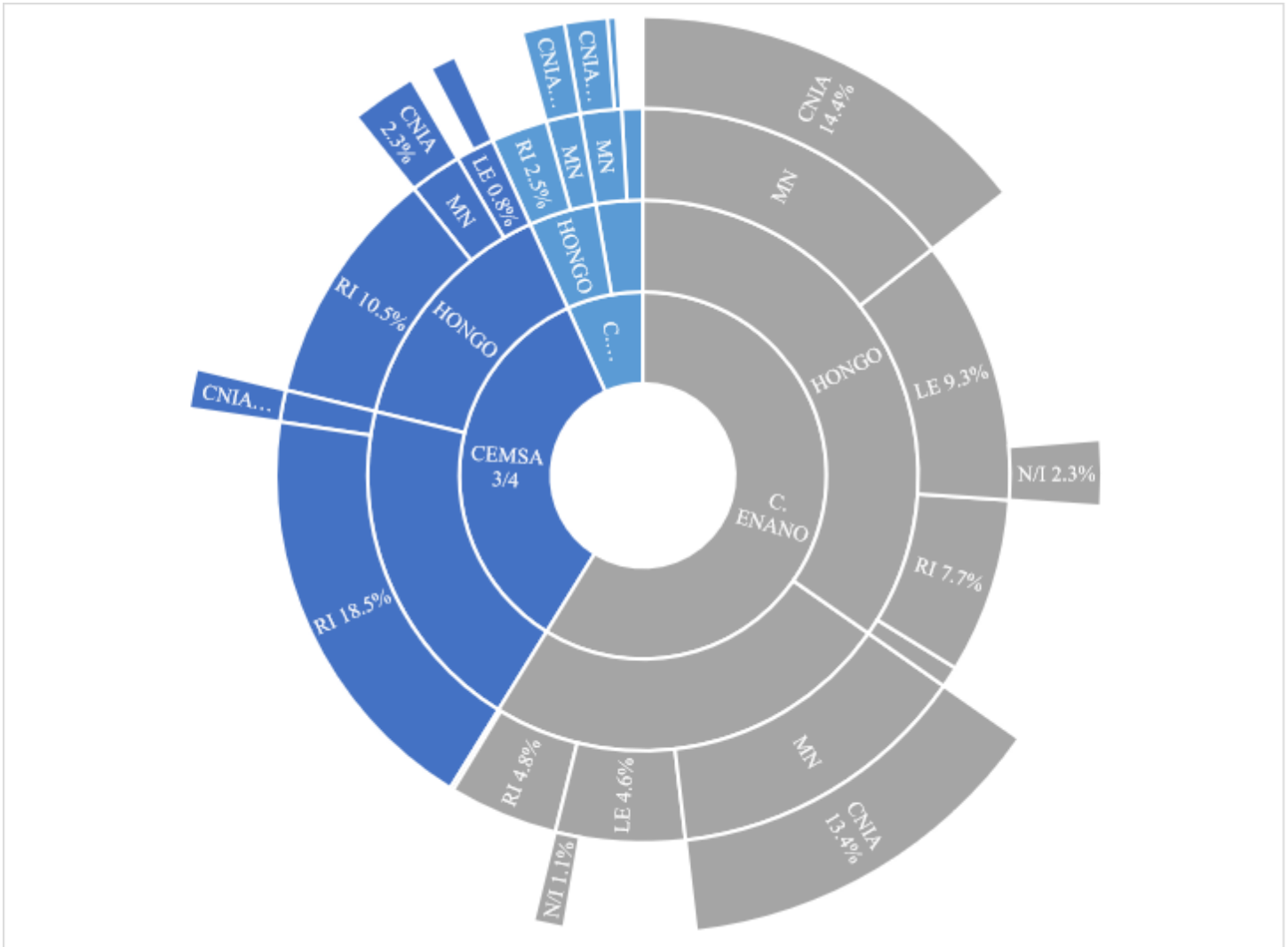


Figura 9. Microorganismos contaminantes por variedad.

5.2.5 Porcentaje de contaminación de microorganismos provenientes de tejido vegetal

Se analizó tejido vegetal (hojas y tallos) de 690 plantas que mostraban daño por necrosis y clorosis y se determinó presencia de bacterias únicamente en 485 de ellas. Los subcultivos 5 y 9 presentaron un 100 % de contaminación, mientras que la menos afectación la presentó el subcultivo 6 con 52 % (Figura 12, anexo 2).

Villalobos y Pérez (1979) como se citó en (Sánchez y Salaverria, 2004), confirman que la siembra directa de material vegetal para la propagación *in vitro* induce altos niveles de contaminación de los explantes, a diferencia de usar una fase intermedia de multiplicación en etapa de invernaderos.

Recalde y Bastidas citado en Ancasi et al., (2016), indican que la contaminación, más que matar a los explantes directamente, invade el cultivo haciendo que el explante no sea apto para la micropropagación, eleva los costos de producción y reduce la rentabilidad de esta técnica para la producción de semilla.

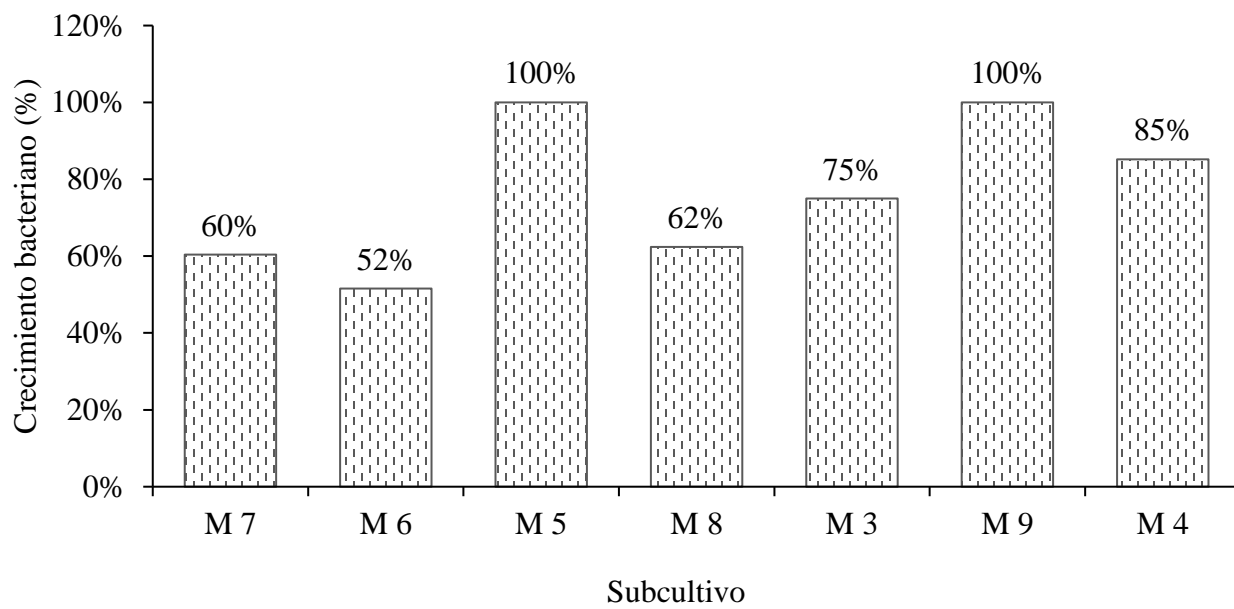


Figura 10. Microorganismos contaminantes en tejido de plátano por subcultivos.

5.3 Identificación y clasificación de bacterias mediante pruebas bioquímicas.

Conforme a los resultados de las pruebas bioquímicas fue posible identificar bacterias a nivel de género, tales como: *Micrococcus*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Enterobacteria* spp (Cuadro 2).

Leifert et al., (1991), mencionan que dentro de las bacterias endógenas se encuentran *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, lo que tiene relación con nuestros resultados. Este tipo de bacterias permanece latente en la micropropagación y se detectan meses después de la introducción del material vegetal *in vitro* (Cartago 2000).

Cuadro 2. Identificación de bacterias a nivel de género

Grupos	Aislados	identificación
1	2	<i>Micrococcus</i>
2	1,7,46,50,51	<i>Micrococcus</i>
3	33,3	<i>Bacillus</i>
4	4	<i>Bacillus</i>
5	5,9,13	<i>Stenotrophomonas</i>
6	6	<i>Micrococcus</i>
7	8,49	<i>Pseudomonas</i>
8	10	<i>Bacillus</i>
9	11,12,14,16,56	<i>Micrococcus</i>
10	15	<i>Bacillus</i>
11	17,18,19	<i>Stenotrophomonas</i>
12	20,22, 23, 24, 25, 28, 38	<i>Staphylococcus</i>
13	26	<i>Bacillus</i>
14	27,32,39	<i>Enterobacterias</i>
16	30,31	<i>Bacillus</i>
17	34,35,36,37	<i>Staphylococcus</i>
19	41, 42	N/I
20	43,52,54	<i>Pseudomonas</i>
21	45	<i>Micrococcus</i>
22	47	<i>Micrococcus</i>
23	53,55	<i>Micrococcus</i>
24	57	N/I
25	58,65	<i>Micrococcus</i>
26	59,60,61,64,66	<i>Pseudomonas</i>
27	62,67,63,68,69	<i>Pseudomonas</i>

Mediante el aislamiento se logró obtener 69 aislados de bacterias, con los que se estudió su reacción a pruebas bioquímicas para comprender como obtienen su energía y nutrientes y poder establecer en un futuro estudios para conocer sus aplicaciones biotecnológicas y estudios de microbiología microbiana.

Con los resultados de las pruebas bioquímicas fue posible conformar el idiotipo de cada bacteria y conforme las similitudes y diferencias metabólicas se agruparon en 27 grupos.

Del total de grupos, 10 aislados individuales son considerados únicos, es decir, que pueden poseer capacidades diferentes para utilizar los nutrientes y metabolizar diversas sustancias en comparación con el resto de aislados.

Adicionalmente, se logró identificar un grupo conformado con 7 aislados, 4 grupos con 5 aislados, 6 grupos con 2 aislados, 5 grupos con 3 aislados y un solo grupo compuesto con 4 aislados (Figura 11).

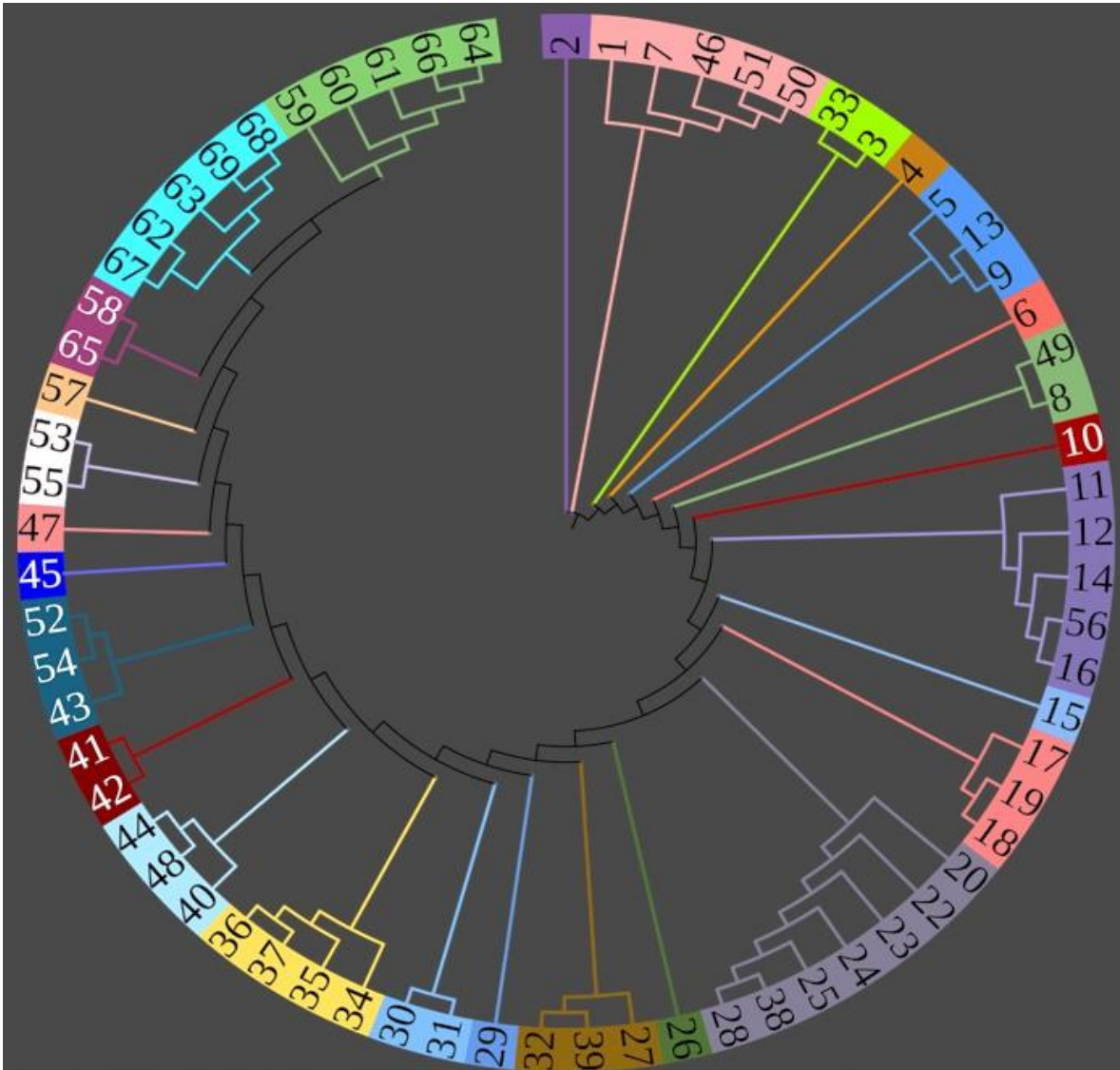


Figura 11. Dendrograma de similitud y diferencia de 69 aislados de bacterias obtenidos de procesos de micropropagación in vitro de plátano.

5.4 Identificación bacteriana por secuenciación de ADN

Del total de bacterias estudiadas, se realizó la selección de 3 aislados (17/Bx08, 13/Bx09, 31/Bx07) para su secuenciación en vista a que fueron morfológicamente diferentes al resto. El resultado demostró que dos de las bacterias (Bx08 y Bx09) son *Stenotrophomonas maltophilia* y el aislado Bx07 es *Bacillus cereus*.

Cuando se cotejaron los tres aislados con secuencias de ADN de los organismos comparadores se evidenció que Bx08 y Bx09 son similares a *Stenotrophomonas* sp. RB25, *Stenotrophomonas maltophilia* strains LH-S3, DUCC3756 y NS-24. En el caso del aislado Bx07 es similar a *Bacillus cereus* strains XUYI 351, IV17 y *Bacillus subtilis* strain Ta2. Por el contrario, los tres aislados seleccionados no presentan similitud con el resto de los microorganismos de referencia (*Bacillus grandii*, *Bacillus rossius*, *Pseudomonas savastanoi*, *Pseudomonas viridiflava*, *Bacillus actticus* y *Pseudomona syringae*) (Figura 12).

Uno de los resultados importantes de esta fase fue la identificación de la cepa *Bacillus cereus*, en vista a que está considerada con un microorganismo benéfico muy utilizado en la agricultura agroecología. En este orden de ideas se puede citar a Zhang et al., (2019), quienes mencionan que el uso de *Bacillus cereus* en combinación con abono orgánico produce ácido indol acético, sideróforos y la solubilización de fosfato; estos reducen la salinización que es esencial para el crecimiento de cultivo, de tal forma que al reducirla se generan condiciones que interactúan positivamente con la producción de frutos.

Bajo esta misma perspectiva Andrade-Sifuentes et al., (2022), indica que el uso combinado de *B. cereus* con abono orgánico suele mejorar la eficiencia de uso del nitrógeno.

Por otro lado, *strenotrophomonas maltophilia* es una bacteria gran negativa la cual se puede encontrar en cultivos de laboratorio, esta presenta un efecto inhibitor en los hongos con *Candida* spp y *Aspergillus* spp (Lopez 2002) menciona que esta inhibición puede ser debida a la produccion de pirrolnitrina.

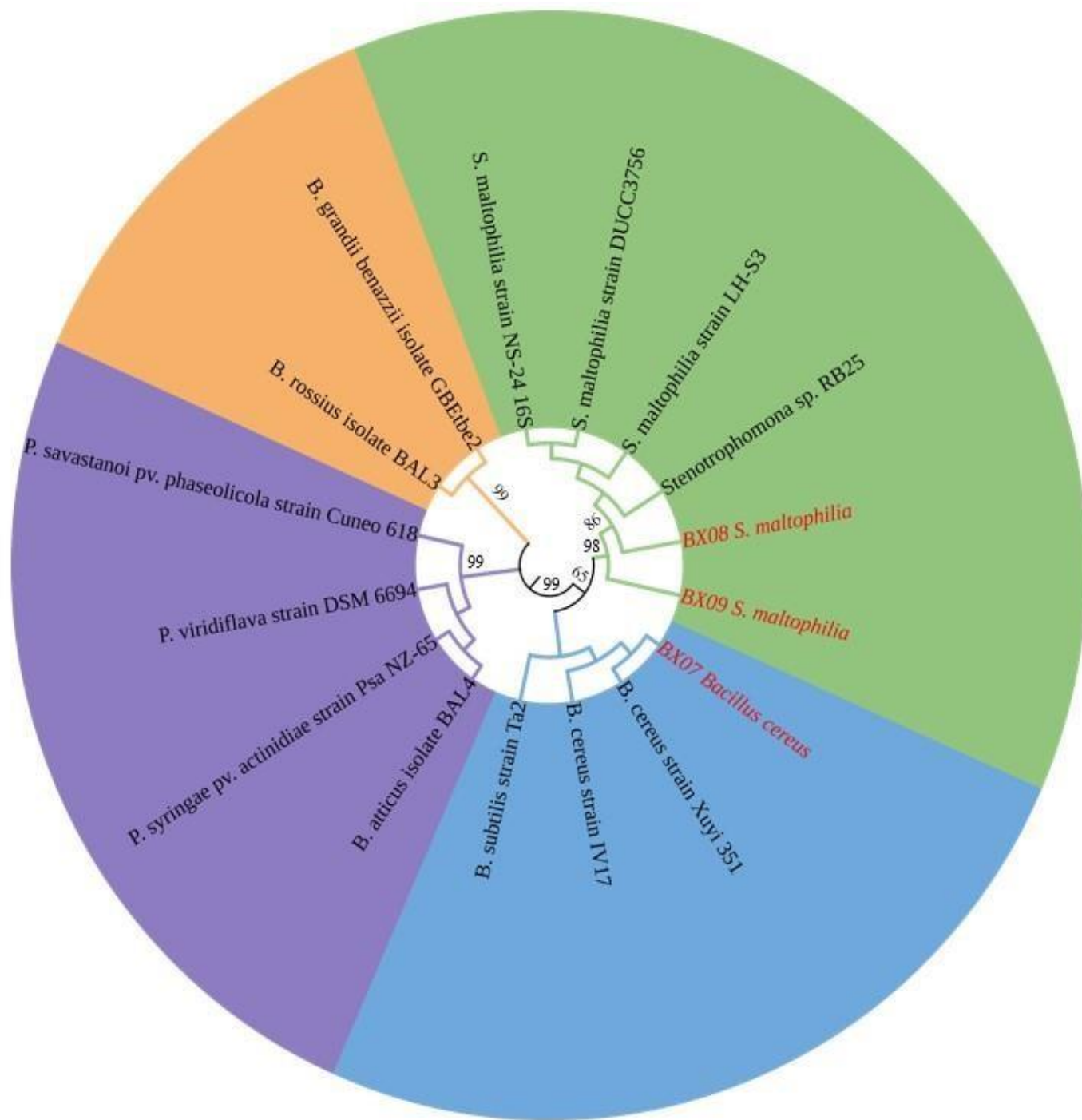


Figura 12. Árbol filogenético de las cepas Bacillus, Stenotrophomonas.

5.5 Antibiograma para determinación de eficacia de antimicrobianos en el desarrollo de bacterias.

La sensibilidad a antibióticos se estudió en 30 aislados, el efecto de estos se estimó a través del área de inhibición de crecimiento bacteriano.

En este estudio el mayor halo de inhibición fue de 4.8 cm del grupo de bacteria proveniente directamente del medio de los frascos muestreados. Rifampicina y ampicilina tuvieron mayor actividad inhibidora sobre las cepas. La figura 13 muestra los diferentes niveles de tolerancia a antibióticos expresadas por las bacterias. Así mismo muestra que seis grupos de bacterias fueron sensibles a ampicilina y 4 grupos a rifampicina.

Los aislados en los que se observó resistencia a los antibióticos posiblemente estuvieron sometidos a altas dosis o al uso frecuente de estos productos en el manejo del material vegetal usado para la micropropagación (crecimiento de cormos en canteros).

La afirmación anterior coincide con lo reportado con Vignoli y Seija (citado en Romero y Lisseth, 2018) quienes reportan que en la actualidad las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia antibióticas relacionados con su variabilidad genética, evidenciándose dos factores fundamentales en el desarrollo de esta problemática como la existencia de genes determinantes de mecanismos de resistencia y el uso indiscriminado de antibióticos que ocasionó la supervivencia de cepas.

También Quezada y Cardozo (2022), indican que la efectividad de los antibióticos presenta diferentes resultados, esto se debe al hecho de que cada antibiótico genera un tipo de defensa, depende de la composición química y la forma en que actúan sobre las bacterias.

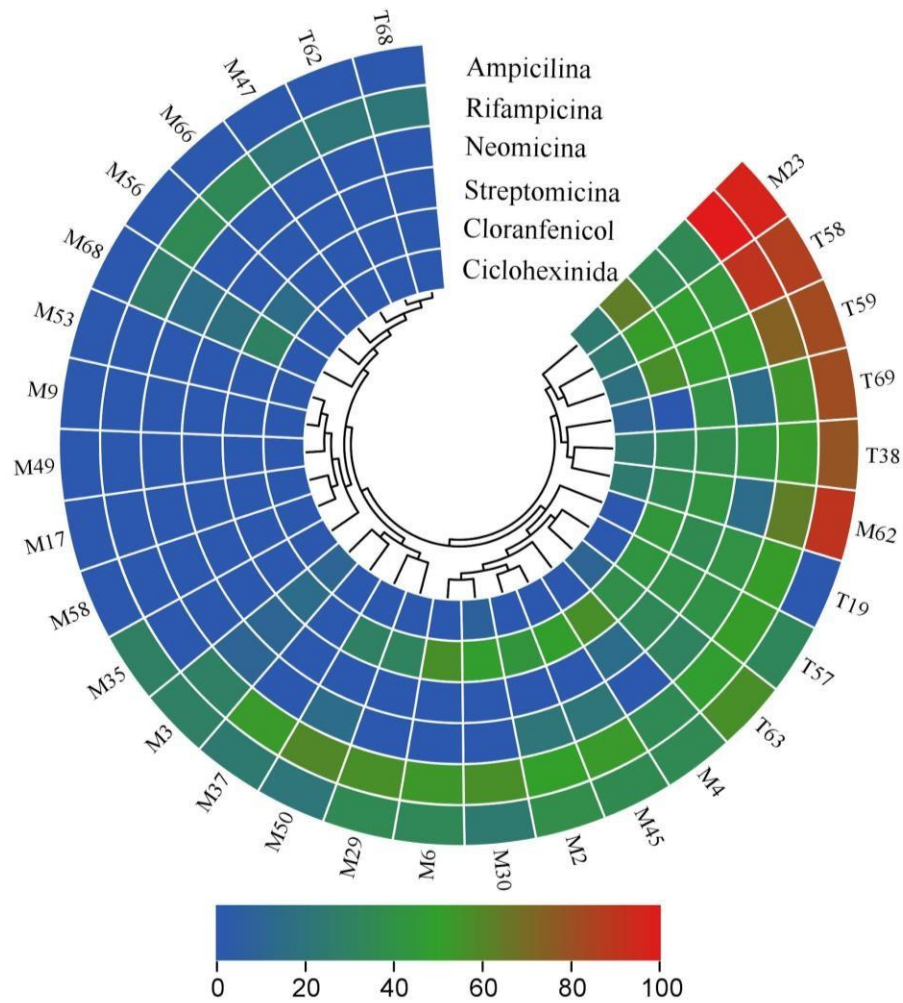


Figura 13. Sensibilidad de aislados bacterianos ante antibióticos

V. CONCLUSIONES

- Entre los principales microorganismos contaminantes que se lograron identificar en las diferentes fases de cultivo de tejidos de plátano están los hongos: *Aspergillus spp*, *Botritis*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Monilia*, *Phoma*, *Penicillium* y *Trichoderma*; y las bacterias de los géneros: *Micrococcus*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*.
- Mediante las pruebas bioquímicas fue posible conformar el idiótipo de cada bacteria y conforme las similitudes y diferencias metabólicas se agruparon en 27 grupos. De estos, 10 aislados individuales son considerados únicos.
- Los mejores antibióticos para reducir los niveles de contaminación por bacterias que pueden utilizar en la Biofábrica del INTA durante la preparación de cormos para la macropropagación y en el establecimiento *in vitro* son Rifampicina y Ampicilina en dosis de 0.5 y 0.2 g/ml respectivamente.
- La contaminación en el proceso de micropropagación de plátano en el CNCT del INTA se presenta en todas las fases causado principalmente por hongos y bacterias y con índices que superan el 5 % establecido por algunos laboratorios de referencia.
- Las bacterias del género *Bacillus* y *Pseudomonas* forman parte del grupo de la endófitas que promueven el crecimiento y rendimiento en la planta.

VI. RECOMENDACIONES

Implementar el uso de productos protectantes a base de los antibióticos rifampicina y ampicilina durante la preparación y manejo de cormos para la micropropagación y el establecimiento *in vitro*.

En la fase de multiplicación no exceder los subcultivos a más de 7, debido a que al aumentarlos se incrementan los niveles de contaminación por microorganismos.

VII. LITERATURA CITADA

- Ancasi, R., Montero, J., Ferreira, N., & Muñoz, I. (2016). *Determination better culture medium in the establishment phase for the in vitro propagation of banana (Musa paradisiaca L)*. Journal of the Selva Andina Research Society, 7(2), 104–111.
- Alvarado Capó, Y., Portal González, N., García Aguila, L., Ramírez, D., & Martínez, Y. (2003). *Incidencia de contaminantes microbianos en la micropropagación de la caña de azúcar*. Biotecnología Vegetal, 3 (1), 31–36.
<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/204/180>
- Aguilar, F. (2020). *Análisis de las Fuentes de contaminación en un Laboratorio de Cultivo de Tejidos: detección y medidas de control*. In Suparyanto dan Rosad (2015) vol 5, Issue 3, pp. 248-253
- Andrade-Sifuentes, A., Fortis-Hernández, M., Preciado-Rangel, P., Sáenz-Mata, J., CoriaArellano, Y., y Guigón López, C. (2022). *Promoción del crecimiento de tomate saladette con Bacillus cereus y estiércol solarizado en invernadero*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 13(7), 1259–1270. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i7.3120>
- Aranguren, M. M. (2008). *identificación de enterobacterias*.
- Arbeláez A, L. M., Montoya L, J., y Saavedra R, S. A. (2016). *Evaluación de protocolos para el establecimiento y desinfección In Vitro de meristemos de plátano Musa spp*. Vitae, 23, S391–S395.
- Alcántara J, Acero J. (2019) Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. Nova; [consultado el 15 de abr. de 2021]. 17(32):109–129.
<http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n32/1794-2470-nova-17-32-109.pdf>.
- Beauduy C.E., & Winston L.G. (2021). *Fármacos antimicobacterianos*. Katzung B.G., & Vanderah T.W.(Eds.), *Farmacología básica y clínica*, 15e. McGraw Hill.
<https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=3038§ionid=256841> 997
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C. & Turck, M. (1966) *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method*. American Journal of Clinical Pathology, 45, 493-496.
- Barboza, L. (2015). *Antibióticos*- Leandro Barboza (gdo 1. DFT). *Gdo 1. DFT, 1*, 1–24.

- Brochero, C., y Suarez, N. (2015). *Estandarización de las etapas de establecimiento y multiplicación in vitro de plátano Musa balbisiana variedad curare enano para la construcción de un protocolo de micropropagación*. In *Донну* (Vol. 5, Issue December).
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society.
- Capó, Y. A. (2000). *Control y prevención de la contaminación microbiana en la micropropagación de plantas*. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 31, 87–91.
- Castro, S., y Maradiaga, E. (2015). *Micropropagación tradicional y en biorreactores económicos de inmersión temporal del cultivar de plátano (Musa spp.) CEMSA 3/4*. <https://repositorio.una.edu.ni/3282/>
- Chavarría, D., & López, G. (2010). *Micropropagación de ápices caulinares en Plátano (Musa spp. AAB) cultivar Cuerno Gigante*.
- Giacopello, C., Foti, M., Passantino, A., Fisichella, V., Aleo, A., & Mammina, C. (2012). *Metodos basicos para el estudio de la sensibilidad a los antibioticos*. *Human and Veterinary Medicine*, 4(2), 76–81.
- Centeno, R. (2017). *Evaluación in vitro de la eficacia de bactericidas sobre la inhibición del crecimiento de Burkholderia glumae*. <http://repositorio.una.edu.ni/3622/1/tne10s687.pdf>
- Chavarría, D., y López, G. (2010). *Micropropagación de ápices caulinares en Plátano (Musa spp. AAB) cultivar Cuerno Gigante*.
- Excoffier, L y Lischer, HEL (2010) *Arlequin Suite ver 3.5, una nueva serie de programas para realizar análisis genéticos de poblaciones en Linux y Windows*. *Recursos de ecología molecular*, 10, 564-567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Flores-Pacheco, J. A. (2017). *Antagonismo in vitro de hongos endófitos para su uso en el biocontrol de enfermedades forestales*. *Revista Científica de FAREM-Estelí*, 23, 58–71. <https://doi.org/10.5377/farem.v0i23.5475>
- Galán, V., Rangel, A., Lopez, J., Hernandez, J. B., Sandoval, J., & Rocha, H. (2018). *Propagación del banano: técnicas tradicionales, nuevas tecnologías e innovaciones*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 40(4). <https://doi.org/10.1590/0100-29452018574>
- Gálvez, E., & Ochoa, J. (2021). *Multiplicación in vitro de plátano (Musa x paradisiaca L.)*.
- acopello, C., Foti, M., Passantino, A., Fisichella, V., Aleo, A., & Mammina, C. (2012). *Metodos basicos para el estudio de la sensibilidad a los antibioticos*. *Human and Veterinary Medicine*, 4(2), 76–81.

- Chavarría, D., & López, G. (2010). *Micropropagación de ápices caulinares en Plátano (Musa spp. AAB) cultivar Cuerno Gigante*.
- Giacopello, C., Foti, M., Passantino, A., Fisichella, V., Aleo, A., & Mammina, C. (2012). Metodos basicos para el estudio de la sensibilidad a los antibioticos. *Human and Veterinary Medicine*, 4(2), 76–81.
- Hernandez, Y., y Gonzales, M. (2010). *Efecto de la contaminacion Microbiana y Oxidacion Fenolica en el Establecimiento In vitro de frutas perennes*. 4(1), 88–100.
- Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazir, H., & Ullah, I. (2012). Plant tissue culture: current status and opportunities. En A. Leva, & L. M. Rinaldi, *Recent Advances in Plant in vitro Culture* (pp. 1-28). <http://dx.doi.org/10.5772/50568>
- Hooper D.C. (2022). Resistencia bacteriana a los fármacos antimicrobianos. Loscalzo J, & Fauci A, & Kasper D, & Hauser S, & Longo D, & Jameson J(Eds.), Harrison. *Principios de Medicina Interna*, 21e. McGraw Hill. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=3118§ionid=267819> 97657
- Hilal-Dandan R, & Brunto. Goodman & Gilman. Manual de farmacología y terapéutica, 2e. McGraw Hill. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1468§ionid=9349922>
- Iraeli, Y; Labav, E; Reuveni, O. 1995. Bananas and Plantains. Growen, S. London, Chapman and Hall. 280 p.
- Jiménez, Z. A. (2004). Micropropagacion de plátano (Musa AAB, cv curaré) en un medio sustitución de insumos. In *Instituto Tecnológico de Costa Rica*.
- Kubota, C., & Tadokoro, N. (1999). Control of microbial contamination for large-scale photoautotrophic micropropagation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 35(4), 296–298. <https://doi.org/10.1007/s11627-999-0037-6>
- Leifert, C., Ritchie, J. Y., & Waites, W. M. (1991). Contaminants of plant-tissue and cell cultures. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 7(4), 452–469. <https://doi.org/10.1007/BF00303371>
- Llorente, B. E. (2002). *Cultivo de células y tejidos vegetales: generalidades*. Lopez, L ; Caldera, J. (2002). *Mejoramiento de la Eficiencia de Propagacion IN VITRO de Platano. (Musa AAB cv . Enano)*.
- Lopez, M. D. (2002). *Stenotrophomonas maltophilia: Estudio clínico, epidemiológico y pronóstico*.

- Martinez, F., Sigcha, E., & Toaquiza, P. (2008). Alternativa para la propagación in vitro de platano variedad maqueño (*Musa balbisiana* AAB). *Ciencia y Tecnología*, 1(1), 43. <https://doi.org/10.18779/cyt.v1i1.101>
- MIFIC. (2022). *Plan Nacional de la producción, consumo y comercio 2022-2023* (p. 153).
- Microsoft (2023). Excel 2023 (versión 16.0). Corporación Microsoft.
- Nacional De Colombia, U., Palmira, S., & Rojas-Triviño, A. (2011). *conceptos y práctica de microbiología general*.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). Basic Local Alignment Search Tool. (2009) [en línea]. USA: [Consultado ene., 2011] Disponible en Internet: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Núñez, L. M., & Mariño, J. G. (2008). Micropropagación vegetal. *Universidad de Vigo*, 3(12), 60–53.
- Ochoa-Villarreal, M., Howat, S., Jang, M.O., Kim, I.S., Jin, Y.W., Lee, E.K. et al. (2015). Cambial meristematic cells: A platform for the production of plant natural products. *New Biotechnology*, 32(6), 581-587. <http://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.02.003>
- Pereira, S. (2014). *Aspergillus spp . en plantas de maní nativo y cultivado . Identificación , capacidad toxicogénica y control biológico cultivado . Identificación , capacidad Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos*. “Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. <http://digital.bl.fcen.uba.ar>.”
- Perez, C., A., Chamorro, & Leonardo, A. (2013). Bacterias Endofíticas: Un nuevo campo de investigación para el desarrollo del sector Agropecuario. *Journal of the American Chemical Society*, 123(10), 2176–2181.
- Palomares C, & Vera G(Eds.), (2013). Fichero farmacológico. McGraw Hill. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1510§ionid=980092> 98
- Quezada, M., & Cardozo, W. (2022). *Evaluación de antibióticos y fungicidas , en la introducción in vitro de banano (Musa acuminata) en la Estación Experimental Sapecho*. 8(3), 2410–2417.

- Roberto, T. (2021). Efecto de los reguladores de crecimiento en la multiplicación in vitro de platano (*Musa x paradisiaca* L.). In *Biblioteca Wilson Popenoe: Vol. I* (Issue Efectos de los reguladores de crecimiento en la multiplicación in vitro de plátano).
- Roca, W., & Mroginski, L. (1991). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. In *Jurnal Penelitian Pendidikan Guru Sekolah Dasar* (Vol. 6, Issue August).
- Romero, N., & Lisseth, T. (2018). “Evaluación de la capacidad antibacteriana de los taninos extraídos del banano verde (*Musa sp.*) rehozado de las bananeras, frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC: 12600.”
- Rojas, A. (2011). *Conceptos y práctica de microbiología general. Universidad Nacional de Colombia, 1–161*. <http://bdigital.unal.edu.co/4999/1/albertorojastrivino.2011.pdf>
- Ruscitti, M., Beltrano, J., & Gimenez, D. (2011). Biotecnología vegetal. Cultivo de Tejido Vegetal. *Catedra de Fisiología Vegetal*.
- Schaad, N. W. ; Jones, J. B. ; Chun, W.(2001) Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria No.Ed. 3 pp.xii + 373 pp. Ref.24
- Sanchez Cuevas, M. C., & Salaverria, J. L. (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo in vitro de fresa. *Revista UDO Agrícola, 4*(1317–9152), 21–26. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2221549>
- Sánchez Gutierrez, Y., Torres, Y., Robaina, A., Bauta, M., & Rayas, A. (2015). Incidencia de contaminantes microbianos en la propagación in vitro de *Xanthosoma* spp . clon ‘ INIVIT MX-2007 ’ y *Colocasia esculenta* (L.) Schott . clon ‘ INIVIT MC-2012 .’ *Biotecnología Vegetal, 15*(3), 157–161.
- Serrano, Vera., & Valdivia, Ana. (2015). *Evaluación fenológica y productiva de plantas superiores en el cultivo de platano Harton enano (AAB) en el municipio de Telica, 2 ciclos periodo 2014-2015*. (Vol. 151, Issue 2).
- Suárez, I. (2020). Cultivo De Tejidos Vegetales. In *Fondo editorial, Universidad de Cordoba*.
- Tamura, K., Stecher, G. y Kumar, S. (2021). *MEGA11: Análisis de genética evolutiva molecular Versión 11. Biología molecular y evolución, 38* (7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Vargas, A., Watler, W., Morales, M., & Vignola, R. (2017). Ficha técnica cultivo de banano. In *Catie* (Vol. 2, Issue 21, pp. 1–56).

VIII. ANEXOS

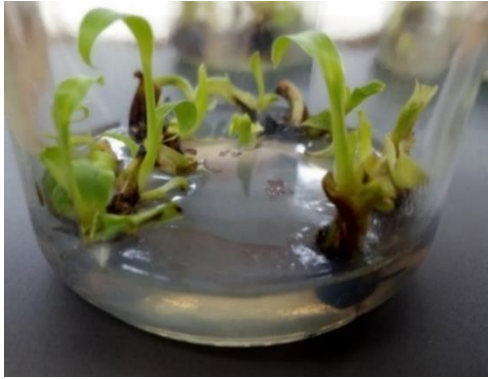
Anexo 1. identificación de bacterias mediante pruebas bioquímicas

Grupos	Aislados	identificación	Oxidación/ Fermentación	TSI	Hidrolisis de gelatina	Citrato	Hidrolisis de almidón
1	2	Micrococcus	Oxidación Positiva	K/A/gas-/h2s-	Negativo	Negativo	Negativo
2	1,7,46,50,51	Micrococcus	Oxidación Positiva	K/K/gas-/h2s-	Positivo	Negativo	Negativo
3	33,3	Bacillus	Oxidación Positiva	A/A/gas-/h2S-	Positivo	Positivo	Positivo
4	4	Bacillus	Oxidación Positiva	K/A/gas-/h2s-	Positivo	Positivo	Positivo
5	5,9,13	Stenotrophomonas	Oxidación Positiva	K/K/gas-/h2s-	Positivo	Negativo	Positivo
6	6	Micrococcus	Oxidación Positiva	K/K/gas-/h2s-	Negativo	Negativo	Positivo
7	8,49	Pseudomonas	Oxidación Positiva Microorganismo	K/A/gas-/h2s-	Positivo	Positivo	Negativo
8	10	Bacillus	Inactivo	A/A/gas-/h2S-	Positivo	Negativo	Positivo
9	11,12,14,16,56	Micrococcus	Oxidación Positiva	A/A/gas-/h2S-	Positivo	Negativo	Positivo
10	15	Bacillus	Fermentación Positiva	K/K/gas-/h2s-	Positivo	Negativo	Positivo
11	17,18,19 20,22, 23, 24,	Stenotrophomonas	Fermentación Positiva	A/A/gas-/h2S-	Positivo	Positivo	Negativo
12	25, 28, 38	Staphylococcus	Fermentación Positiva	A/A/gas-/h2S-	Positivo	Positivo	Positivo
13	26	Bacillus	Fermentación Positiva	K/A/gas+/h2s+	Negativo	Negativo	Negativo
14	27,32,39	Enterobacterias	Fermentación Positiva Microorganismo	A/A/gas-/h2S-	Positivo	Negativo	Negativo
15	29	Bacillus	Inactivo	K/K/gas-/h2s-	Positivo	Positivo	Positivo
16	30,31	Bacillus	Fermentación Positiva	A/A/gas-/h2S-	Positivo	Negativo	Positivo
17	34,35,36,37	Staphylococcus	Fermentación Positiva Microorganismo	K/A/gas-/h2s-	Positivo	Positivo	Positivo
18	40,44,48	N/I	Inactivo Microorganismo	K/K/gas-/h2s-	Positivo	Negativo	Negativo
19	41, 42	N/I	Inactivo	K/K/gas-/h2s-	Negativo	Negativo	Negativo
20	43,52,54	Pseudomonas	Oxidación Positiva	A/A/gas-/h2S-	Positivo	Negativo	Negativo
21	45	Micrococcus	Oxidación Positiva	K/K/gas-/h2s-	Negativo	Negativo	Negativo
22	47	Micrococcus	Oxidación Positiva	K/K/gas-/h2s-	Positivo	Positivo	Negativo
23	53,55	Micrococcus	Oxidación Positiva Microorganismo	K/A/gas-/h2s-	Positivo	Negativo	Negativo
24	57	N/I	Inactivo Microorganismo	A/A/gas+/h2S-	Positivo	Negativo	Negativo
25	58,65	Micrococcus	Inactivo	A/A/gas+/h2S-	Positivo	Negativo	Positivo
26	59,60,61,64,66	Pseudomonas	Oxidación Positiva	A/A/gas+/h2S-	Positivo	Negativo	Positivo
27	62,67	Pseudomonas	Oxidación Positiva	A/A/gas+/h2S-	Negativo	Negativo	Positivo
27	63	Pseudomonas	Oxidación Positiva	A/A/gas+/h2S-	Positivo	Negativo	Negativo
27	68	streptococcus	Oxidación Positiva	A/A/gas+/h2S-	Positivo	Positivo	Positivo
27	69	Pseudomonas	Oxidación Positiva	K/A/gas-/h2s-	Positivo	Negativo	Positivo

Anexo 2 Crecimiento bacteriano en tejido

Etapa de % Crecimiento Bacteriano Multiplicación	Plantas con síntomas necróticos	Crecimiento Bacteriano	a partir de tejido vegetal
M7	303	183	60%
M6	64	33	52%
M5	148	148	100%
M8	117	73	62%
M3	24	18	75%
M9	7	7	100%
M4	27	23	85%

Anexo 3. Proceso de aislamiento de bacterias contaminantes encontradas en la micropropagación de plátano.



Extracción de bacteria directamente del frasco



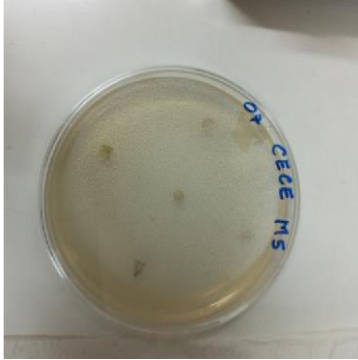
Crecimiento de colonias bacterianas



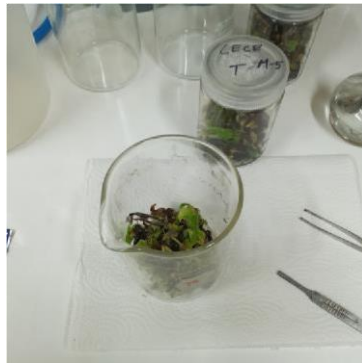
Rayado de bacterias en medio AN (Agar Nutritivo)



Anexo 4. Proceso de desinfección de tejido



Se dispusieron cinco tejidos por cada plato Petri plástico.



Desinfección de los explantes con:
Hipoclorito de sodio al 1% por 5 min
Etanol al 70% por 30 segundos
Y finalmente se enjuagaban 3 veces con agua destilada estéril.



Selección de plantas con síntomas necróticos en hojas y tallos.