

CIENCIA DE LAS PLANTAS

Identificación fenotípica, molecular y sensibilidad antibiótica de bacterias endofíticas asociadas a vitroplantas de plátano (*Musa* spp)

Phenotypic and molecular identification and antibiotic susceptibility of endophytic bacteria associated with *in vitro* plantain (*Musa* spp.) plantlets

Andrea María Zamora Jarquín¹, Donald Alonso Juárez Gámez², Rudy Javier Cáceres³, Katerin Sandino Lacayo⁴, Walter Salmerón Quezada⁵

¹ MSc. Plant Production Science / Plant Pathology, Dirección de Ciencias Agrícolas, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3487-9343> / andrea.zamora@ci.una.edu.ni

² MSc. Plant Production Science / Horticulure, Dirección de Ciencias Agrícolas, ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-6141-4730> / donald.juarez@ci.una.edu.ni

³ Ingeniero en Sistemas de Protección Agrícola y Forestal, Dirección de Ciencias Agrícolas, ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-8766-5642> / rudy.caceres@ci.una.edu.ni

⁴ Ingeniero en Sanidad Vegetal, ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-3970-782X> / kathynavy09@gmail.com

⁵ Ingeniero en Sanidad Vegetal, ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-0104-2105> / salmeronnw7@gmail.com

Universidad Nacional Agraria

Autor para correspondencia: andrea.zamora@ci.una.edu.ni



RESUMEN

La proliferación de bacterias endofíticas representa un desafío crítico para la viabilidad de la microporogación de plátano (*Musa* spp.), comprometiendo la sanidad y el desarrollo de los explantes durante su establecimiento *in vitro*. El objetivo de esta investigación fue identificar bioquímica y molecularmente bacterias endofíticas asociadas con vitroplantas de plátano y evaluar la eficacia de cinco antibióticos para su control. La investigación se desarrolló entre abril de 2022 y septiembre de 2023 en el Centro Nacional de Cultivo de Tejidos del Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria - Centro Nacional de Investigación Agropecuaria (actualmente Ministerio Agropecuario) y en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua. Se analizaron 690 explantes sintomáticos de las variedades Cuerno Enano, Cuerno Gigante y CEMSA $\frac{3}{4}$, procedentes de siete subcultivos en

ABSTRACT

The proliferation of endophytic bacteria represents a critical challenge for the viability of *Musa* spp. microporogation, compromising the health and development of explants during their *in vitro* establishment. This study aimed to molecularly identify endophytic bacteria associated with plantain vitroplants and to evaluate the efficacy of five antibiotics for their control. The research was conducted between April 2022 and September 2023 at the National Center for Tissue Culture of INTA-CNIA and the Agricultural Microbiology Laboratory of the National Agrarian University, Managua, Nicaragua. A total of 690 symptomatic explants of the Cuerno Enano, Cuerno Gigante, and CEMSA $\frac{3}{4}$ varieties, obtained from seven subculture in multiplication microporogation stages, were analyzed. Bacterial isolates were obtained from internal tissues of leaves and stems through

Recibido: 6 de mayo del 2026

Aceptado: 25 de septiembre del 2026



Copyright 2026. Universidad Nacional Agraria (UNA).

Los artículos de la revista La Calera de la Universidad Nacional Agraria, Nicaragua, se comparten bajo términos de la licencia Creative Commons: Reconocimiento, No Comercial, Compartir Igual. Las autorizaciones adicionales a las aquí delimitadas se pueden obtener en el correo donald.juarez@ci.una.edu.ni

CIENCIA DE LAS PLANTAS

la etapa de multiplicación del proceso de micropropagación. Los aislados bacterianos se obtuvieron a partir de tejidos internos de hojas y tallos mediante desinfección superficial e incubación en agar nutritivo; posteriormente, se realizó su caracterización morfológica y bioquímica, seguida de la amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA en tres aislados bacterianos para establecer su identidad taxonómica. Se determinó la sensibilidad de nueve aislados bacterianos en cinco antibióticos de amplio espectro mediante el método de difusión en disco, utilizando un diseño experimental completamente al azar. De los 690 explantes, 485 (70.29 %) presentaron sintomatología de contaminación endofítica (microorganismo en el tejido vegetal), con incidencia variable entre subcultivos (52 % – 100 %). A partir de 24 aislados bacterianos se identificaron preliminarmente los géneros *Pseudomonas* (10 aislados), *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Stenotrophomonas*. La secuenciación confirmó la presencia de *Stenotrophomonas maltophilia* (aislados 19 y 25) y *Bacillus cereus* (aislado 57). En la evaluación de susceptibilidad, los aislados T58, T59 y T38 resultaron los más sensibles, con inhibiciones superiores al 80 % destacando ampicilina y cloranfenicol, que superaron el 85 % de efectividad, mientras que T19, T62 y T68 exhibieron una marcada resistencia con valores cercanos al 0 %; el aislado T19 fue el más resistente de la población. Estos resultados confirman que la eficacia de los tratamientos antimicrobianos depende intrínsecamente del perfil de sensibilidad de la microbiota endofítica prevalente, lo que resalta la necesidad de implementar protocolos de saneamiento ajustados a la composición bacteriana local.

Palabras clave: cultivo de tejido, subcultivo, micropropagación, microorganismos endofíticos, resistencia a antibióticos, saneamiento *in vitro*.

surface disinfection and incubation in nutrient agar; subsequently, morphological and biochemical characterization was performed, followed by amplification and sequencing of the 16S rRNA gene in three bacterial isolates to establish their taxonomic identity. The susceptibility of nine bacterial isolates to five broad-spectrum antibiotics was determined using the disk diffusion method under a completely randomized experimental design. Of the 690 explants evaluated, 485 (70.29%) showed symptoms of endophytic contamination, with variable incidence among subcultures (52%–100%). From 24 bacterial isolates, the genera *Pseudomonas* (10 isolates), *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and *Stenotrophomonas* were preliminarily identified. Sequencing confirmed the presence of *Stenotrophomonas maltophilia* (isolates 19 and 25) and *Bacillus cereus* (isolate 57). In the susceptibility evaluation, isolates T58, T59, and T38 were the most sensitive, with inhibition values exceeding 80%, particularly under ampicillin and chloramphenicol, which surpassed 85% effectiveness, whereas T19, T62, and T68 exhibited marked resistance with values close to 0%; isolate T19 was the most resistant in the population. These findings underscore that the effectiveness of antimicrobial treatments intrinsically depends on the sensitivity profile of the prevalent endophytic microbiota, highlighting the need to implement sanitation protocols tailored to the local bacterial composition.

Keywords: Tissue culture, subculture, micropropagation, endophytic microorganisms, antibiotic resistance, *in vitro* sanitization.

El plátano constituye un cultivo estratégico para la seguridad alimentaria y la economía de Nicaragua, por lo que su propagación masiva mediante técnicas *in vitro* resulta esencial para garantizar material de siembra de alta calidad fitosanitaria.

La presencia de bacterias endofíticas representa un desafío crítico en este proceso. Estos microorganismos persisten en los tejidos internos y evaden la detección inicial (Reed y Tanprasert, 1995), manifestándose durante las fases de multiplicación o enraizamiento (Agbadje *et al.*, 2021), lo que compromete la viabilidad de las vitroplantas y genera pérdidas económicas significativas (Szewczyk-Taranek *et al.*, 2020). Sin embargo, no todas las bacterias endofíticas deben considerarse exclusivamente contaminantes perjudiciales, ya que algunas pueden actuar como bacterias promotoras del crecimiento vegetal, favoreciendo el desarrollo, la tolerancia al estrés y la protección frente a fitopatógenos (Liu *et al.*, 2019). A pesar de esta potencial simbiosis, la proliferación descontrolada de ciertas cepas dentro del medio de cultivo puede alterar la morfogénesis del explante (tejido

en crecimiento), incrementando las tasas de mortalidad y disminuyendo la eficiencia de la micropropagación (Cantabella *et al.*, 2021).

A pesar de la relevancia de este rubro, en Nicaragua no se reportan resultados de investigaciones sobre la caracterización taxonómica y el control químico de la microbiota endofítica en plantas procedentes de cultivo de tejidos. Los métodos de identificación fenotípicos convencionales suelen ser insuficientes para la discriminación precisa de especies bacterianas endofíticas (Thomas, 2010), por lo que el empleo de herramientas moleculares, tales como la secuenciación del gen 16S rRNA, resulta fundamental para superar las limitaciones diagnósticas, lo que permite un diagnóstico robusto y la selección precisa de agentes antimicrobianos (El-Banna *et al.*, 2021). En este contexto, la determinación de la susceptibilidad antibiótica mediante métodos estandarizados, como la difusión en disco (prueba de Kirby-Bauer), permite identificar agentes bactericidas capaces de erradicar los contaminantes, aunque estos agentes pueden afectar la multiplicación y el crecimiento de los tejidos (El-Banna *et al.*, 2021).

CIENCIA DE LAS PLANTAS

Este estudio tiene como objetivo caracterizar bioquímica y molecularmente las bacterias endofíticas asociadas a vitroplantas de plátano, así como evaluar la eficacia de cinco antibióticos de amplio espectro para su control; analizando la diversidad bacteriana mediante la amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA para la definición de protocolos de desinfección específicos que garanticen la calidad fitosanitaria del material vegetal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de investigación. Este estudio es de tipo experimental aplicado, con enfoque cuantitativo y alcance explicativo, según los lineamientos metodológicos establecidos por Mares (2019). La evaluación de la eficacia antimicrobiana se realizó mediante un diseño completamente al azar, para la determinación de la sensibilidad de nueve aislados bacterianos a cinco tratamientos antibióticos.

Período y ubicación del estudio. La investigación se realizó entre abril de 2022 y septiembre de 2023. La fase de muestreo de material vegetal *in vitro* se realizó en el Centro Nacional de Cultivo de Tejidos del Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria y Centro Nacional de Investigación Agropecuaria (INTA-CNIA), Managua, Nicaragua, ubicado en la latitud 12°07'55" Norte y longitud 86°08'55" Oeste, a una altitud de 70 msnm. Las fases de aislamiento endofítico, caracterización bioquímica, secuenciación molecular y pruebas de sensibilidad antimicrobiana se desarrollaron en el laboratorio de microbiología agrícola de la Universidad Nacional Agraria, ubicada en el km 12.5 de la Carretera Norte en Managua, capital de Nicaragua en las coordenadas 12°08'36" de latitud Norte y 86°09'49" de longitud Oeste.

Muestreo de material vegetal *in vitro* con síntomas sistémicos. El muestreo se realizó mensualmente durante un periodo de tres meses (abril, mayo y junio 2022), empleando un método estratificado dirigido. Se seleccionaron exclusivamente frascos cuyas vitroplantas presentaron sintomatología de clorosis y necrosis progresiva en el área foliar y tallos. En total se seleccionaron 690 explantes sintomáticos distribuidos en siete subcultivos (M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9) de un total de nueve en la etapa de multiplicación en el proceso de micropropagación.

Material biológico. Se utilizaron vitroplantas de plátano de las variedades Cuerno Enano, Cuerno Gigante y CEMSA ¾. El material procedió de lotes en fase de multiplicación, con orígenes geográficos en el departamento de Rivas, al suroeste de Nicaragua.

Aislamiento de bacterias endofíticas a partir de tejido. Para el aislamiento, se seleccionaron tejidos internos de hojas

y tallos. Con el fin de asegurar la naturaleza endofítica de los aislados, se aplicó un protocolo de desinfección superficial: inmersión en hipoclorito de sodio al 1 % durante cinco minutos, seguido de etanol al 70 % por 30 segundos y tres enjuagues con agua destilada estéril. Los tejidos desinfectados se seccionaron e inocularon en placas Petri con medio agar nutritivo (AN). Se utilizaron 97 placas con una densidad de cinco secciones de tejido por unidad. La incubación se realizó a 25 °C durante 24 a 48 horas. Las colonias emergentes de los bordes del tejido fueron purificadas mediante estriado sucesivo en medio AN hasta obtener cultivos axénicos (cultivo puro).

Caracterización bioquímica e identificación molecular.

La morfología bacteriana se determinó según los criterios de Bergey (Levanova y Zakharaova, 2017) mediante tinción de Gram. La identidad bioquímica a nivel de género se estableció empleando las pruebas de catalasa, oxidación-fermentación, fermentación de azúcares en agar TSI, utilización de citrato e hidrólisis de gelatina y almidón. Para la identificación a nivel de especie, se seleccionaron tres aislados para su secuenciación, mediante el gen ribosomal 16S rRNA (Clarridge, 2004) en un equipo SeqStudio ABI 3200 del Centro de Biología Molecular de la Universidad Nacional Casimiro Sotelo Montenegro en Managua, Nicaragua. Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando la herramienta BLAST (Fenollar *et al.*, 2006). Para la secuenciación se seleccionaron tres aislados sobre la base de la prevalencia morfológica y diferencias bioquímicas.

Evaluación de la eficacia de antibióticos. Se seleccionaron nueve aislados bacterianos predominantes para determinar la sensibilidad de los aislados a cinco antibióticos mediante la técnica de difusión de discos en agar Mueller-Hinton (Nassar *et al.*, 2019), de acuerdo con procedimientos estandarizados propuestos por González *et al.* (2022). Los antibióticos evaluados fueron: Neomicina (0.05 g ml⁻¹), Rifampicina (0.5 g ml⁻¹), Cloranfenicol (0.2 g ml⁻¹), Ampicilina (0.2 g ml⁻¹) y Estreptomina (1 g ml⁻¹). Esta metodología, consiste en la inoculación uniforme de una suspensión bacteriana sobre la superficie del medio, en cuya superficie se depositan discos impregnados con concentraciones definidas de antibióticos. Las placas se incubaron a 27 °C durante 24 a 48 horas, lo que permite identificar el antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de la bacteria endofítica mediante la medición de los halos de inhibición formados alrededor de cada disco con antibiótico.

Variables evaluadas

Incidencia de sintomatología endofítica (%). Se determinó mediante el conteo de explantes que presentaron síntomas

CIENCIA DE LAS PLANTAS

visuales de necrosis y clorosis vascular activa sobre el total de vitroplantas evaluadas. El registro se realizó mensualmente (por tres meses), clasificando los explantes según la severidad y el tipo de daño observado en los tejidos foliares y los tallos. Estos síntomas se consideraron indicadores presuntivos de contaminación bacteriana, ya que también pueden derivarse de factores abióticos, estrés oxidativo del medio de cultivo o vitrificación, lo que podría conducir a una sobreestimación de la incidencia (Ilinkin *et al.*, 2023). Por ello, su etiología bacteriana se validó posteriormente mediante el aislamiento microbiológico de los tejidos sintomáticos.

Caracterización fenotípica por género de bacterias. Para la caracterización inicial de la diversidad bacteriana aislada durante el proceso de propagación *in vitro* del plátano, se evaluaron características morfológicas y fenotípicas mediante tinción de Gram y un conjunto de pruebas bioquímicas estandarizadas. No obstante, debido a la limitada resolución de las pruebas fenotípicas para establecer una identificación taxonómica definitiva en bacterias endofíticas de plátano, este procedimiento se consideró un tamizaje preliminar que justificó la integración de las herramientas moleculares descritas en la sección subsiguiente. Para garantizar la reproducibilidad del protocolo, las pruebas bioquímicas se incubaron a 25 °C en un período de 24 a 48 horas.

Pruebas bioquímicas estandarizadas. La prueba de catalasa evaluó la capacidad bacteriana para producir la enzima catalasa, la cual descompone el peróxido de hidrógeno. La producción sostenida de burbujas de gas o efervescencia tras la adición del reactivo se considera un resultado positivo. La prueba de Oxidación-Fermentación se utilizó para clasificar el metabolismo de la glucosa. Se considera un microorganismo oxidativo cuando aparece una coloración amarilla únicamente en la superficie del medio, mientras que un microorganismo fermentador provoca un viraje a color amarillo en todo el tubo. Si el medio no cambia de color o vira a azul, el microorganismo se clasifica como inactivo frente a la glucosa. La prueba de fermentación de azúcares en agar triple azúcar-hierro (TSI) se categorizó la actividad metabólica según las siguientes respuestas:

- Bisel alcalino/fondo alcalino: No se observa fermentación de azúcares.
- Bisel alcalino/fondo ácido: Fermentación de glucosa; lactosa y sacarosa no fermentadas. Sin producción de gas ni de H₂S.
- Bisel alcalino/fondo ácido con producción de H₂S: Fermentación de glucosa; lactosa y sacarosa no fermentadas. Sin producción de gas, pero con producción de H₂S.
- Bisel alcalino/fondo negro: Fermentación de glucosa; lactosa y sacarosa no fermentadas, con producción de gas y H₂S.

-Bisel ácido/fondo ácido: Fermentación de glucosa, lactosa y/o sacarosa. Puede presentar producción de H₂S.

La prueba de citrato se considera positiva cuando se observa crecimiento bacteriano a lo largo de la estría, frecuentemente acompañado por el viraje del indicador a color azul. La prueba de hidrólisis de Gelatina mide la capacidad de hidrolizar la gelatina; se determinó por la ausencia de precipitado blanco en la región de crecimiento bacteriano, lo que indica la actividad proteolítica del microorganismo. La prueba de hidrólisis de Almidón se evaluó mediante la adición de yodo al medio; la aparición de un halo transparente o café alrededor de las colonias indica una reacción positiva (hidrólisis), mientras que la formación de una coloración azul violeta en el resto del medio indica una prueba negativa.

Identidad molecular de bacterias (similitud genotípica). Se obtuvo mediante la comparación de la secuencia del gen 16S rRNA de cada aislado con secuencias de referencia encontradas en la base de datos de The National Center for Biotechnology Information (NCBI), empleando la herramienta BLAST (Fenollar *et al.*, 2006; Twigg *et al.*, 2020). El porcentaje de identidad se utilizó para estimar la afinidad taxonómica a nivel de especie, ya que se reconoce que no existe un consenso cuantitativo universal para definir los límites entre especies (Clarridge, 2004).

Inhibición bacteriana frente a antibióticos (%). La susceptibilidad antimicrobiana se evaluó mediante la técnica de difusión de discos en medio Agar Mueller-Hinton (Nassar *et al.*, 2019), midiendo el radio de los halos de inhibición formados alrededor de cada disco antibiótico. A las 24 horas, se realizaron las mediciones del radio, desde el centro del disco hasta el borde del halo, siguiendo los procedimientos estandarizados de referencia propuestos por González *et al.* (2022). Los aislados bacterianos se clasificaron como sensibles, intermedios o resistentes de acuerdo con su capacidad de crecimiento en la zona de inhibición, basándose en criterios estándar de susceptibilidad antimicrobiana. Este análisis permitió establecer un perfil de resistencia específico para cada cepa bacteriana, lo que proporcionó datos necesarios para optimizar los protocolos de saneamiento *in vitro* y asegurar la fitosanidad del material vegetal (Vilchez-Chávez *et al.*, 2024). La eficacia de los antibióticos se analizó mediante el porcentaje de inhibición, utilizando la siguiente fórmula:

$$E = \frac{RDI_{Tto}}{RDI_{max}} \times 100\%$$

Donde:

E = Porcentaje de eficacia del producto

RDI_{Tio} = Radio de inhibición obtenido en el tratamiento
 RDI_{max} = Máximo radio de inhibición obtenido en el mejor tratamiento

Análisis de datos. La cuantificación de la incidencia endofítica se realizó mediante estadística descriptiva en el programa Excel de Microsoft Office 365 Empresarial (Microsoft, 2023). Las variables cualitativas bioquímicas se transformaron en una matriz binaria para calcular distancias genéticas en Arlequin v3.5.2.2. La reconstrucción filogenética de los perfiles bioquímicos y de las secuencias moleculares se realizó mediante el método Neighbour-Joining con un Bootstrap de 1 000 réplicas en el software MEGA v11. La sensibilidad antimicrobiana se visualizó mediante un mapa de calor (Heatmap) para identificar patrones de multirresistencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Incidencia de sintomatología endofítica. Durante el proceso de multiplicación *in vitro*, se evaluó un total de 690 explantes, de estos 485 (70.29 %) presentaron sintomatología característica de contaminación endofítica, manifestada principalmente mediante necrosis tisular y clorosis vascular. La sintomatología fue variable entre los subcultivos (M), oscilando entre 9 % y 100 % de crecimiento bacteriano. La variedad CEMSA 3/4 exhibió una progresión ascendente gradual del 9 % al 100 %. La variedad Cuerno Enano y Cuerno Gigante presentaron porcentajes de crecimiento bacteriano superiores a 84 % y alcanzó 100 % en el subcultivo M5, para Cuerno Enano y un máximo crecimiento bacteriano en el subcultivo evaluado (M7) para Cuerno Gigante (Figura 1).

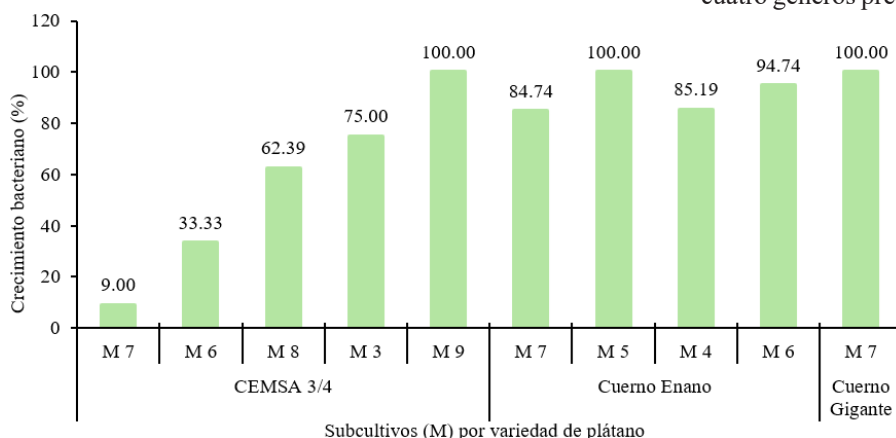


Figura 1. Crecimiento bacteriano por variedad y subcultivos en tejido de plátano en etapa de multiplicación.

Estos resultados confirman que la problemática endofítica es un factor determinante en la eficiencia de la micropropagación, caracterizada por dinámicas de colonización heterogéneas entre los genotipos evaluados. Esta variabilidad en las tasas de colonización sugiere que

existen factores intrínsecos al cultivar y a la bacteria que influyen en la persistencia del inóculo, lo que constituye un obstáculo significativo para la micropropagación vegetal (Permadi *et al.*, 2023). La presencia de contaminación bacteriana endofítica constituye uno de los desafíos más críticos en la micropropagación *in vitro* de *Musa* spp (Permadi *et al.*, 2023). Estos microorganismos, al residir dentro de los tejidos del explante, a menudo pasan desapercibidos durante la selección inicial, permaneciendo en estado latente que se activa al ser trasladados a condiciones de cultivo *in vitro*, lo que compromete la viabilidad del material vegetal (Hassen *et al.*, 2022).

Hamill y Rames (2018) señalan que la contaminación bacteriana, más allá de causar la muerte inmediata del tejido, se dispersa progresivamente durante la micropropagación, elevando significativamente las tasas de mortalidad y reduciendo la tasa de proliferación de brotes. Este deterioro no solo compromete la calidad fitosanitaria del material final, sino que incrementa sustancialmente los costos de producción y disminuye la rentabilidad global del sistema de obtención de semilla.

La heterogeneidad observada en los niveles de infestación sugiere que la prevalencia de las comunidades bacterianas no es uniforme, lo que concuerda con la complejidad del microbioma de *Musa* spp. y su potencial asociación a condiciones de estrés biótico o abiótico durante el proceso de propagación (Sambolín-Pérez *et al.*, 2026).

Caracterización bioquímica de bacterias. A partir de los 24 aislados bacterianos, se realizó la identificación preliminar de cuatro géneros predominantes, cuya clasificación taxonómica

presenta una correspondencia directa con la organización observada en el análisis filogenético. La integración del perfil metabólico de los aislados bacterianos con la construcción del dendrograma filogenético, facilitó la categorización de la diversidad endofítica presente en el material vegetal analizado (Figura 2).

El género *Pseudomonas* constituyó el grupo más numeroso, con 10 aislados. En el análisis filogenético, estos se agruparon de manera consistente en clados diferenciados, evidenciando una alta homología filogenética y una clara distinción metabólica respecto al resto de la población

bacteriana. Esta agrupación robusta sugiere la consistencia de los perfiles bioquímicos obtenidos para dicho género. El género *Staphylococcus* incluyó igualmente 10 aislados. La caracterización reveló una distribución en subgrupos que se refleja fielmente en la arquitectura del árbol filogenético,

CIENCIA DE LAS PLANTAS

donde estos aislados se localizan en ramas superiores. Los géneros *Micrococcus* y el aislado no identificado (N/I), se posicionaron en una sección intermedia del dendrograma, mostrando una diferencia evolutiva, entre los dos aislados, uno metabólicamente similar a *Pseudomonas* y el otro a *Staphylococcus*, mientras que el género *Stenotrophomonas* presentó proximidad filogenética al clado de *Staphylococcus* bajo las condiciones experimentales.

En conjunto, la integración de las pruebas bioquímicas y el análisis filogenético valida la estructura de la microbiota endofítica en los explantes. La formación de clados definidos en el dendrograma corrobora la fiabilidad de las técnicas de identificación empleadas, lo que permite concluir que la diversidad bacteriana observada se encuentra conformada por géneros con perfiles metabólicos y filogenéticos distintivos y bien estructurados. Esta diversificación taxonómica, que incluye géneros reportados previamente en diversos estudios sobre la microbiota endofítica de *Musa* spp. (Singh *et al.*, 2022), (Kapadia *et al.*, 2021), resalta la complejidad de la comunidad bacteriana que coloniza los tejidos internos durante las etapas de multiplicación *in vitro*.

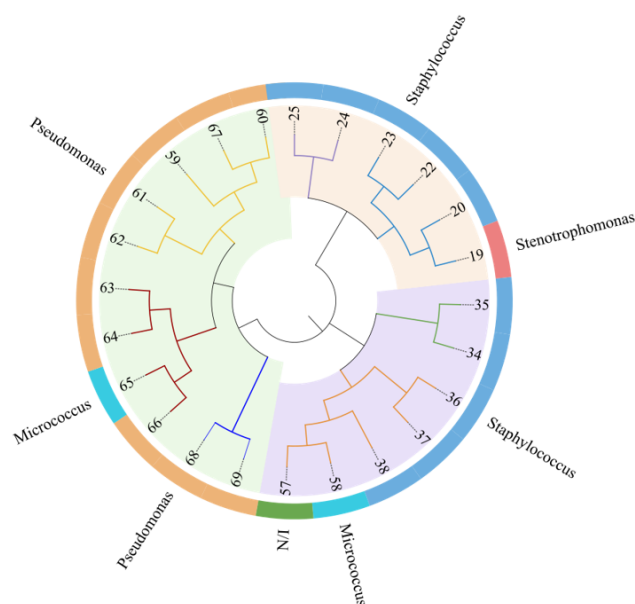


Figura 2. Perfiles bioquímicos de aislados bacterianos de vitroplantas de plátano.

Esta diversidad taxonómica resulta consistente con hallazgos previos que identifican a géneros como *Pseudomonas*, *Bacillus* y otros miembros de las clases Proteobacteria y Firmicutes como habitantes recurrentes en tejidos internos de diversas especies vegetales (Banihashemian *et al.*, 2022). Específicamente, géneros como *Pseudomonas* y *Bacillus* han sido documentados como predominantes en el microbioma endofítico del banano, consolidándose como las poblaciones bacterianas con mayor

frecuencia de aislamiento en sistemas de cultivo *in vitro* (Blanco-Meneses, 2024). Asimismo, se han identificado géneros adicionales, tales como *Pantoea*, *Stenotrophomonas* y *Microbacterium*, como componentes significativos de estas comunidades, los que presentan una amplia versatilidad metabólica que favorece su persistencia dentro del tejido vegetal (Cantabella *et al.*, 2021), (Schmidt *et al.*, 2021).

Esta estructura comunitaria, dominada principalmente por Proteobacteria y Firmicutes, refleja una especialización adaptativa que les permite transitar desde el ambiente externo hacia los tejidos internos, donde logran establecer nichos ecológicos estables (Birt *et al.*, 2022). Esta capacidad de colonización interna está intrínsecamente ligada a su versatilidad metabólica, lo que permite que géneros como *Pseudomonas* establezcan relaciones comensales (relación biológica) o de beneficio potencial, aunque su proliferación no controlada durante la micropropagación interfiera con el desarrollo normal de la vitroplanta (Agbadje *et al.*, 2021).

Identidad molecular de las bacterias. Del total de bacterias estudiadas, se seleccionaron tres aislados para su secuenciación debido a sus diferencias morfológicas y bioquímicas. La selección de estos tres aislados se fundamentó en los requerimientos económicos asociados a las técnicas de secuenciación molecular.

El análisis genético determinó que dos de los aislados (19 y 25, Figura 2), corresponden a *Stenotrophomonas maltophilia*, aunque bioquímicamente el aislado 25, se comporta como un *Staphylococcus* (Figura 2); y el aislado 57 a *Bacillus cereus*. Al comparar los tres aislados con secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) de organismos de referencia, se evidenció que 19 y 25 presentaron similitud con *Stenotrophomonas* sp. RB25, así como a las cepas *Stenotrophomonas maltophilia* LH-S3, DUCC3756 y NS-24 16S. El aislado 57 resultó similar a las cepas de *Bacillus cereus* XUYI 351, IV17 y *Bacillus subtilis* cepa Ta2. En contraste, los tres aislados no presentaron similitud con el resto de los microorganismos de referencia (*Bacillus grandii*, *Bacillus rossius*, *Pseudomonas savastanoi*, *Pseudomonas viridiflava*, *Bacillus aceticus* y *Pseudomonas syringae*) (Figura 3).

La identificación de *Bacillus cereus* resulta relevante, ya que se considera un microorganismo benéfico ampliamente utilizado en la agricultura y la agroecología. En este sentido, Kulkova *et al.* (2023) señalan que el uso de *Bacillus cereus* en combinación con abono orgánico promueve la síntesis de ácido indolacético y sideróforos, además de facilitar la solubilización de fosfato; estos procesos se vinculan con la reducción de la salinización, lo que favorece el crecimiento del cultivo y la producción. Cardoso *et al.* (2021) indican que la combinación de *Bacillus cereus* con abono orgánico suele mejorar la eficiencia en el uso del nitrógeno.

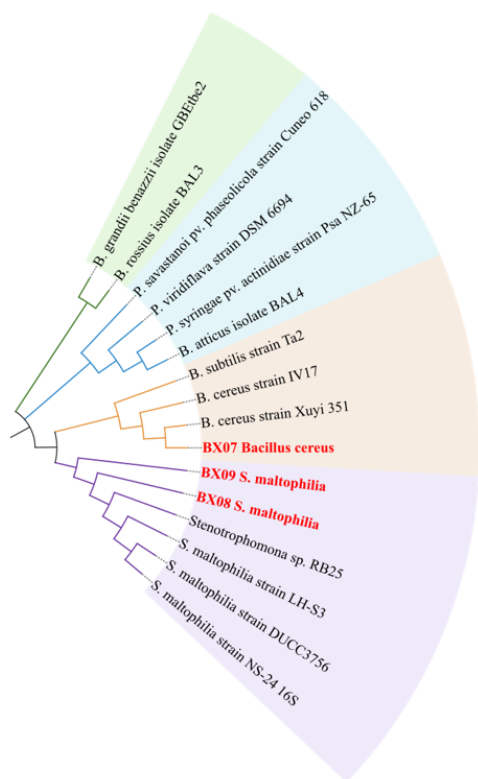


Figura 3. Filogenia de tres aislados de bacterias endofíticas procedentes de vitroplantas de plátano.

Stenotrophomonas maltophilia es una bacteria gramnegativa frecuentemente aislada en cultivos de laboratorio, que provoca un efecto inhibitor en hongos como *Candida* spp. y *Aspergillus* spp., efecto atribuible a la producción de agentes antifúngicos como la maltofilina (Kerr, 1996). No obstante, es preciso considerar que, si bien diversas especies de este género poseen propiedades beneficiosas, algunas cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* actúan como patógenos oportunistas, por lo que es importante monitorear su presencia y proliferación en los sistemas de micropropagación (Vermote *et al.*, 2022). El potencial biotecnológico de este género está respaldado por su capacidad para producir fitohormonas y ejercer actividades antibiofilm (sustancia para prevenir, romper o eliminar biopelícula), lo que resalta la dualidad de su comportamiento como endófito (Ulrich *et al.*, 2021). Esta versatilidad metabólica, que abarca desde la síntesis de enzimas degradadoras hasta la producción de reguladores del crecimiento, posiciona al género *Stenotrophomonas* como un agente con implicaciones tanto positivas como negativas en la estabilidad de las vitroplantas (Kumar *et al.*, 2023). Dada esta capacidad de adaptación, Sharma *et al.* (2024) destacan que cepas como *Stenotrophomonas maltophilia* BCM poseen perfiles genómicos que integran funciones de asimilación de nutrientes y actividad antimicrobiana, lo que sugiere su potencial como agente de biocontrol en diversas condiciones ambientales.

Inhibición de crecimiento de bacterias (%). Los aislados 59 y 58 presentaron los mayores niveles de susceptibilidad a ampicilina y rifampicina, alcanzando porcentajes de inhibición entre 73 % y 90 %. En el caso de los aislados 38 y 69, la mayor susceptibilidad se presenta con ampicilina.

El aislado 19 exhibe resistencia a ampicilina y tolerancia al resto de antibióticos. Los aislados 68 y 62 presentan resistencia a todos los antibióticos excepto a rifampicina (Figura 4). El análisis jerárquico permitió identificar una estructuración en el comportamiento de resistencia con dos grandes grupos, uno susceptible (aislado 59, 58, 38 y 69), conformado por tres subgrupos (subgrupo 1: 59 y 58, subgrupo 2: 38 y subgrupo 3: 69) y otro grupo tolerante (62, 68 19, 57 y 63), que se subdivide igualmente en tres subgrupos (subgrupo 1: 62 y 68, subgrupo 2: 19 y subgrupo 3: 57 y 63); confirmando la existencia de subgrupos con estrategias de supervivencia diferenciadas ante los agentes antibióticos.

La evaluación de la sensibilidad de los aislados bacterianos frente a cinco agentes antimicrobianos (ampicilina, rifampicina, neomicina, cloranfenicol y estreptomycin) indica una amplia variabilidad en los perfiles de inhibición. Los resultados sugieren que la susceptibilidad no fue uniforme, con una respuesta específica dependiente tanto del agente antibiótico como del aislado bacteriano. Se identificaron perfiles de respuesta que oscilan desde una alta sensibilidad hasta una marcada resistencia, sugiriendo una diversidad metabólica significativa en la comunidad bacteriana analizada.

Esta variabilidad en la susceptibilidad, caracterizada por altas concentraciones inhibitorias mínimas (la menor concentración de un agente antimicrobiano que, inhibe el crecimiento de una cepa bacteriana determinada) en cepas específicas, destaca la presencia de mecanismos adaptativos similares a los reportados en comunidades bacterianas complejas sometidas a presiones selectivas (Reverdy *et al.*, 2024), (Nguyen *et al.*, 2023). Asimismo, los perfiles de resistencia observados, particularmente en aislados con valores de concentración inhibitoria mínima elevados, sugieren una respuesta adaptativa que concuerda con las variaciones fenotípicas reportadas en estudios sobre la persistencia bacteriana frente a agentes de amplio espectro (Martins *et al.*, 2018). Estos patrones de resistencia, caracterizados por una marcada diferenciación cromática en los mapas de calor fenotípicos, evidencian una heterogeneidad en la respuesta microbiana similar a la observada en estudios de comunidades bacterianas expuestas a entornos con presiones selectivas variables (Navarrete *et al.*, 2026). El análisis de los perfiles de resistencia mediante métodos de difusión y dilución en caldo permite confirmar que la variabilidad observada no es aislada, sino un rasgo consistente con la robustez fenotípica detectada en diversos estudios de monitoreo ambiental (Barnwal y Saleh, 2025). La técnica de difusión en agar de Bauer y Kirby, permitió establecer una correlación directa entre la inhibición cualitativa

CIENCIA DE LAS PLANTAS

y la cuantificación de la concentración mínima inhibitoria para cada grupo farmacológico (Damavandi *et al.*, 2023).

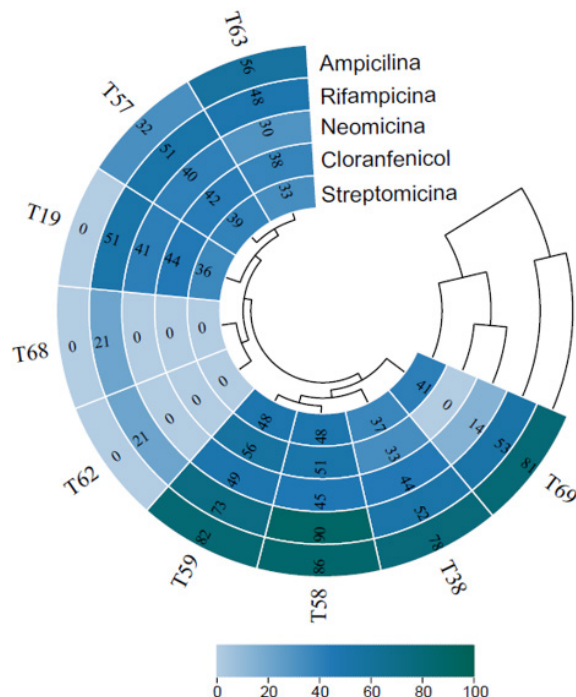


Figura 4. Respuesta de nueve aislados de bacterias endofíticas a cinco antibióticos.

CONCLUSIONES

La contaminación endofítica constituye un factor limitante crítico en la micropropagación de plátano, cuya persistencia compromete la sanidad de las vitroplantas.

La caracterización bioquímica de los aislados identificó una microbiota diversa representada por los géneros *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Stenotrophomonas*, y la secuenciación del gen 16S rRNA confirma a *Stenotrophomonas maltophilia* y *Bacillus cereus* como agentes de contaminación recurrente, evidenciando su naturaleza mixta (beneficiosa y patogénica en condiciones *in vitro*).

La eficacia de los antibióticos dependió del perfil de susceptibilidad de cada aislado siendo ampicilina y cloranfenicol los agentes más efectivos, mientras que una fracción de la población presentó una marcada resistencia, lo que refleja estrategias de supervivencia distintas bajo presión antibiótica. Ante esta variabilidad, un esquema de control basado en un único antibiótico resulta insuficiente, por lo que se recomienda incorporar pruebas de susceptibilidad previas al diseño de protocolos de saneamiento *in vitro* ajustados a la microbiota endofítica prevalente de cada variedad y laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agbadje, E. T. A. E., Agbidinokoun, A., Zandjanakou-Tachin, M., CACAÏ, G. T. H., & Ahanhanzo, C. (2021). Mass Production of Bananas and Plantains (*Musa* spp.) Plantlets through in vitro Tissue Culture Partway: A Review. *European Journal of Biology and Biotechnology*, 2(4), 1–8. <https://doi.org/10.24018/ejbio.2021.2.4.229>
- Banihashemian, S. N., Jamali, S., Golmohammadi, M., & Ghasemnezhad, M. (2022). Isolation and identification of endophytic bacteria associated with kiwifruit and their biocontrol potential against *Meloidogyne incognita*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 32(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-022-00601-y>
- Barnwal, S. K., & Saleh, A. M. (2025). Antibiotic resistance patterns of environmental bacteria from sewage water in Vellore, India: isolation, virulence analysis, and characterization. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1640369–1640369. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1640369>
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (1990). *Annals of Internal Medicine*, 112(5), 391–392. https://doi.org/10.7326/0003-4819-112-5-391_3
- Birt, H. W. G., Pattison, A. B., Skarshewski, A., Daniells, J., Raghavendra, A., & Dennis, P. G. (2022). The core bacterial microbiome of banana (*Musa* spp.). *Environmental Microbiome*, 17(1), 46–46. <https://doi.org/10.1186/s40793-022-00442-0>
- Blanco-Meneses, M. (2024). Identificación molecular de microorganismos en cultivos agrícolas, ornamentales y forestales en Costa Rica, 2009-2018. Parte 2. *Agronomía Mesoamericana*, 57347. <https://doi.org/10.15517/am.2024.57347>
- Cantabella, D., Mendoza, C. R., Teixidó, N., Vilaró, F., Torres, R., & Dolcet-Sanjuan, R. (2021). GreenTray® TIS bioreactor as an effective in vitro culture system for the micropropagation of *Prunus* spp. rootstocks and analysis of the plant-PGPMs interactions. *Scientia Horticulturae*, 291, 110622–110622. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110622>
- Cantabella, D., Teixidó, N., Solsona, C., Casanovas, M., Torres, R., & Dolcet-Sanjuan, R. (2021). Acidification of the culture medium as a strategy to control endophytic contaminations in *Prunus* spp. rootstocks cultured in GreenTray TIS bioreactor. *Scientia Horticulturae*, 290, 110521–110521. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110521>
- Cardoso, A. F., Alves, E. C., Costa, S. D. A. da, Moraes, A. J. G. de, Júnior, D. D. da S., Lins, P. M. P., & Silva, G. B. da. (2021). *Bacillus cereus* Improves Performance of Brazilian Green Dwarf Coconut Palms Seedlings With Reduced Chemical Fertilization. *Frontiers in Plant Science*, 12, 649487–649487. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.649487>

CIENCIA DE LAS PLANTAS

- Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840–862. <https://doi.org/10.1128/cmr.17.4.840-862.2004>
- El-Banna, A., El-Mahrouk, M. E., Dewir, Y. H., Farid, M. A., Elyazid, D. M. A., & Schumacher, H. M. (2021). Endophytic Bacteria in Banana In Vitro Cultures: Molecular Identification, Antibiotic Susceptibility, and Plant Survival. *Horticulturae*, 7(12), 526–526. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7120526>
- Fenollar, F., Roux, V., Stein, A., Drancourt, M., & Raoult, D. (2006). Analysis of 525 Samples To Determine the Usefulness of PCR Amplification and Sequencing of the 16S rRNA Gene for Diagnosis of Bone and Joint Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 1018–1028. <https://doi.org/10.1128/jcm.44.3.1018-1028.2006>
- González, A. C., Cazares-Silva, M. del R., Cordovéz-Martínez, M. del C., Campi, Y. C. R., & Guillén-Ferraro, M. L. (2022). Bacterias aisladas en productos agrícolas provenientes de la cuenca del río Guano. *Kasmera*, 50. <https://doi.org/10.56903/kasmera.5037965>
- Hamill, S., & Rames, E. K. (2018). An effective indexing method for banana tissue culture provides long-term freedom from bacterial contamination. *Acta Horticulturae*, 1205, 741–748. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2018.1205.92>
- Hassen, N. I., Badaluddin, N. A., Mustapha, Z., & Zawawi, D. D. (2022). Identification and Prevention of Microbial Contaminants in Musa paradisiaca Tissue Culture. *Malaysian Applied Biology*, 51(5), 129–143. <https://doi.org/10.55230/mabjournal.v51i5.2374>
- Ilinkin, V., Traykova, B., & Stanilova, M. (2023). In vitro clonal propagation of Tanacetum cinerariifolium and establishment of an ex situ collection of selected clones. *BIORISK – Biodiversity and Ecosystem Risk Assessment*, 20, 97–114. <https://doi.org/10.3897/biorisk.20.97566>
- Kapadia, H. V. C., Vyas, T. K., & Patel, N. (2021). Diverse Novel Bacterial Endosymbionts and their Plant Growth Promoting Traits in association with Banana Plant. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 10(2), 2047–2059. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2021.1002.244>
- Kerr, J. (1996). Inhibition of growth of fungi pathogenic to man by Stenotrophomonas maltophilia. *Journal of Medical Microbiology*, 45(5), 380–382. <https://doi.org/10.1099/00222615-45-5-380>
- Kulkova, I., Dobrzyński, J., Kowalczyk, P., Bełżeczki, G., & Kramkowski, K. (2023). Plant Growth Promotion Using Bacillus cereus. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9759–9759. <https://doi.org/10.3390/ijms24119759>
- Kumar, A., Rithesh, L., Kumar, V., Raghuvanshi, N., Chaudhary, K., Abhineet, & Pandey, A. K. (2023). Stenotrophomonas in diversified cropping systems: friend or foe? *Frontiers in Microbiology*, 14, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1214680>
- Levanova, L. A., & Zakharova, Y. V. (2017). Systematics, taxonomy and classification of bacteria. *Fundamental and Clinical Medicine*, 2(1), 91–101. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2017-2-1-91-101>
- Liu, Y., Zhu, A., Tan, H., Cao, L., & Zhang, R. (2019). Engineering banana endosphere microbiome to improve Fusarium wilt resistance in banana. *Microbiome*, 7(1), 74–74. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0690-x>
- Mares, M. G. (2019). Hernández-Sampieri, R. & Mendoza, C (2018). Metodología de la investigación. Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta. *Revista Universitaria Digital de Ciencias Sociales (RUDICS)*, 10(18), 92–95. <https://doi.org/10.22201/fesc.20072236e.2019.10.18.6>
- Martins, P. M. M., Merfa, M. V., Takita, M. A., & Souza, A. A. de. (2018). Persistence in Phytopathogenic Bacteria: Do We Know Enough? [Review of Persistence in Phytopathogenic Bacteria: Do We Know Enough?]. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01099>
- Microsoft Corporation. (2023). *Microsoft Excel* (versión de Microsoft 365) [Software informático].
- Nassar, M., Hazzah, W., & Bakr, W. (2019). Evaluation of antibiotic susceptibility test results: how guilty a laboratory could be? *Journal of the Egyptian Public Health Association*, 94(1), 4–4. <https://doi.org/10.1186/s42506-018-0006-1>
- Navarrete, D., Ruiz, O., Mosquera, M., & Montiel, M. (2026). Resistencia a Antibióticos en Cepas de Escherichia coli Aisladas del Estero Salado en Guayaquil, Ecuador. *Revista Politécnica*, 57(2), 7–20. <https://doi.org/10.33333/rp.vol57n2.01>
- Nguyen, B. T., Bonkowski, M., Dumack, K., Chen, Q., He, J., & Hu, H. (2023). Protistan predation selects for antibiotic resistance in soil bacterial communities. *The ISME Journal*, 17(12), 2182–2189. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01524-8>
- Permadi, N., Nurzaman, M., Alhasnawi, A. N., Doni, F., & Julacha, E. (2023). Managing Lethal Browning and Microbial Contamination in Musa spp. Tissue Culture: Synthesis and Perspectives. *Horticulturae*, 9(4), 453–453. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9040453>
- Reed, B. M., & Tanprasert, P. (1995). *Detection and control of bacterial contaminants of plant tissue cultures. A review of recent literature.* [https://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/person/4630/Contaminants/4.%20Plant%20Tissue%20Culture%20and%20Biotechnology%203%20137-142%20\(1995\)%20Bacteriology%20review.pdf](https://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/person/4630/Contaminants/4.%20Plant%20Tissue%20Culture%20and%20Biotechnology%203%20137-142%20(1995)%20Bacteriology%20review.pdf)
- Reverdy, A., Hathaway, D., Jha, J., Michaels, G., Sullivan, J., McAdoo, D. D., Riquelme, C., Chai, Y., & Godoy-Carter, V. (2024). Insights into the diversity and survival strategies of soil bacterial isolates from the Atacama Desert. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1335989>
- Sambolín-Pérez, C. A., Montes-Jiménez, S. M., Montes-Jiménez, H. M., Rosa-Morales, Y., Aybar-Batista, R., Núñez-Marrero, A., Rivera-Vicéns, R. E., Ríos-Velázquez, C., & Negrón-Berrios, J. A. (2026). Revealing and characterizing bacterial communities of in vitro Musa species through 16S rDNA metabarcoding and culture dependent approaches. *Scientific Reports*, 16(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-026-35510-9>

CIENCIA DE LAS PLANTAS

- Schmidt, C. S., Mrnka, L., Lovecká, P., Frantík, T., Fenclová, M., Demnerová, K., & Vosátka, M. (2021). Bacterial and fungal endophyte communities in healthy and diseased oilseed rape and their potential for biocontrol of Sclerotinia and Phoma disease. *Scientific Reports*, 11(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81937-7>
- Sharma, P., Pandey, R., & Chauhan, N. S. (2024). Biofertilizer and biocontrol properties of *Stenotrophomonas maltophilia* BCM emphasize its potential application for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1364807>
- Singh, S., Choure, K., Kant, P., Gour, S. S., & Agnihotri, V. K. (2022). Evaluation of plant growth-promoting activities of endophytic bacteria of *Musa acuminata* and their characterization. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 10(5), 94–101. <https://doi.org/10.7324/jabb.2022.100511>
- Szewczyk-Taranek, B., Jaglarz, A., Pałka, P., Supel, P., Kaszycki, P., Mazur, J., & Pawłowska, B. (2020). Identification and control of endophytic bacteria during in vitro cultures of *Staphylea pinnata* L. *Folia Horticulturae*, 32(1), 47–55. <https://doi.org/10.2478/fhort-2020-0005>
- Thomas, P. (2010). Plant tissue cultures ubiquitously harbor endophytic microorganisms. *Acta Horticulturae*, 865, 231–239. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2010.865.29>
- Twigg, M. S., Baccile, N., Banat, I. M., Déziel, É., Marchant, R., Roelants, S., & Bogaert, I. V. (2020). Microbial biosurfactant research: time to improve the rigour in the reporting of synthesis, functional characterization and process development. *Microbial Biotechnology*, 14(1), 147–170. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13704>
- Ulrich, K., Kube, M., Becker, R., Schneck, V., & Ulrich, A. (2021). Genomic Analysis of the Endophytic *Stenotrophomonas* Strain 169 Reveals Features Related to Plant-Growth Promotion and Stress Tolerance. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.687463>
- Vermote, L., Verce, M., Mozzi, F., Vuyst, L. D., & Weckx, S. (2022). Microbiomes Associated With the Surfaces of Northern Argentinian Fruits Show a Wide Species Diversity. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1-18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.872281>
- Vilchez-Chávez, M., Flores-Santos, J. C., Calderón-Toledo, S., Palma-Villanueva, J., & Zavaleta, A. I. (2024). Bacterias productoras de hidrolasas aisladas de suelos de cultivos de arroz: Caracterización fenotípica y molecular. *Manglar*, 21(2), 177–182. <https://doi.org/10.57188/manglar.2024.018>