

01

MICROORGANISMOS

**ENDOFÍTICOS EN PLANTAS IN VITRO DE DIOSCOREA
CAYENSIS SUBSP. ROTUNDATA POIR CLON BLANCO DE
GUINEA**



© 2025; Los autores. Este es un artículo en acceso abierto, distribuido bajo los términos de una licencia Creative Commons que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio siempre que la obra original sea correctamente citada.

MICROORGANISMOS

ENDOFÍTICOS EN PLANTAS IN VITRO DE *DIOSCOREA CAYENENSIS SUBSP. ROTUNDATA* POIR
CLON BLANCO DE GUINEA

ENDOPHYTIC MICROORGANISMS IN PLANTS IN VITRO OF *DIOSCOREA CAYENENSIS SUBSP. ROTUNDATA* POIR CLONE WHITE GUINEA

Jorge Liusvert Pérez-Pérez¹

E-mail: liusvert2021@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3372-7559>

Aracelis Villavicencio-Ramírez^{1,2}

E-mail: aracelisvr1966@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-2299-5718>

Misterbino Borges-García¹

E-mail: misterbinobgarcia@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2052-7294>

Yanet Hernández-Jeréz¹

E-mail: yhernandezj@udg.co.cu

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4827-7386>

Juan José Silva-Pupo¹

E-mail: silvapupo@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1049-5740>

¹ Universidad de Granma. Cuba.

² Ministerio de la Agricultura. Granma. Cuba.

Cita sugerida (APA, séptima edición)

Pérez-Pérez, J. L., Villavicencio-Ramírez, A., Borges-García, M., Hernández-Jeréz, Y., & Silva-Pupo, J. J. (2025). Microorganismos endofíticos en plantas *in vitro* de *Dioscorea cayenensis subsp. rotundata* Poir clon blanco de Guinea. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 8(S2), 7-17.

Fecha de presentación: 23/05/2025

Fecha de aceptación: 19/07/2025

Fecha de publicación: 01/09/2025

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo caracterizar los contaminantes microbianos presentes en plantas *in vitro* de *Dioscorea cayenensis subsp. rotundata* clon blanco de Guinea tras varios subcultivos, y su control mediante el cultivo de meristemos. Segmentos uninodales se cultivaron en condiciones asépticas durante siete subcultivos. Además, se cultivaron meristemos en presencia de ácido naftalenacético combinado con las citoquininas bencilaminopurina o metatopolina en diferentes concentraciones. Se observó un incremento en la contaminación microbiana superior al 45 % a partir del quinto subcultivo. El análisis microbiológico mediante tinción Gram, pruebas bioquímicas y fisiológicas, permitió identificar bacterias endófitas del género *Pseudomonas* en hojas-tallos, y *Bacillus* en raíces. El cultivo de meristemos en medios de cultivo con ácido naftalenacético (0,1 mg.l⁻¹) y metatopolina (0,15 mg.l⁻¹), redujo la fenolización, favoreció la brotación y las variables morfológicas evaluadas. Estos resultados demuestran que el cultivo de meristemos, bajo condiciones y combinaciones hormonales óptimas, es una estrategia efectiva para controlar los contaminantes endofíticos y mejorar la calidad morfogénica de plantas *in vitro* de ñame, incrementando el potencial para su micropropagación comercial.

Palabras clave:

Aislamiento microbiano, bacterias, contaminantes endógenos, cultivo de meristemo, medios de cultivo, micropropagación, ñame, reguladores del crecimiento.

ABSTRACT

The present study aimed to characterize microbial contaminants in *in vitro* plants of *Dioscorea cayenensis subsp. rotundata* clone white Guinea after multiple subcultures, and to evaluate their control through meristem culture. Uninodal segments were aseptically cultured over seven subcultures. Additionally, meristems were cultured in the presence of naphthaleneacetic acid combined with the cytokinins benzylaminopurine or meta-topoline at different concentrations. A microbial contamination increases exceeding 45 % was observed from the fifth subculture onward. Microbiological analysis using Gram staining, biochemical, and physiological tests allowed for the identification of endophytic bacteria belonging to the genus *Pseudomonas* in leaf-stem tissues, and *Bacillus* in roots. Meristem culture in media supplemented with naphthaleneacetic acid (0.1 mg.l⁻¹) and meta-topoline (0.15 mg.l⁻¹) reduced phenolization, promoted sprouting, and enhanced evaluated morphological parameters. These results demonstrate that meristem culture under optimal conditions and hormonal combinations constitutes an effective strategy to control endophytic contaminants and improve the morphogenetic quality of *in vitro* yam plants, thereby increasing their potential for commercial micropropagation.

Keywords:

Microbial isolation, bacteria, endogenous contaminants, meristem culture, culture medium, micropropagations, yam, growth regulators.

INTRODUCCIÓN

El ñame (*Dioscorea* spp.) pertenece a la familia Dioscoreaceae, y comprende aproximadamente 600 especies de ñames domesticados y silvestres (Luo et al., 2022). Alrededor del 98 % de la producción se encuentra en África, donde son una parte clave de los sistemas alimentarios, la economía y vida cultural (Condé et al., 2025). Es un cultivo rico en carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas y minerales, con propiedades farmacológicas para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, cáncer, osteoporosis, diabetes, úlceras e inflamación (Ikiriza et al., 2020; Obidiegwu et al., 2020).

Actualmente se cultiva en diversas regiones de todo el mundo, que incluyen países de África, el Caribe, América y Asia, donde representan una fuente importante de alimento (Luo et al., 2022). Entre las especies de importancia económica se encuentran el complejo *Dioscorea cayenensis* - *rotundata* y *Dioscorea alata*. El complejo *D. cayenensis-rotundata*, lo conforman *D. cayenensis* subsp. *rotundata* (Poir.) J. Mige y *D. cayenensis* subsp. *cayenensis* Poir (Condé et al., 2025).

A pesar de su importancia agronómica y socio-económica, la producción de ñame enfrenta desafíos como el alto costo del saneado del cultivo, donde el material de plantación puede representar más del 50 % del costo de producción. Además, las plantaciones en campo se ven afectadas por la baja producción de tubérculos y su vulnerabilidad a plagas y enfermedades (Komolafe et al., 2025). Por ejemplo, en Cuba los rendimientos no superan las 4,0 t.ha⁻¹, debido principalmente a la carencia de semillas de calidad agronómica con certificación fitosanitaria (Folgueras et al., 2020).

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales ofrecen una solución promisoría para la obtención de material de plantación sano, mediante el cultivo de meristemos, la termoterapia, quimioterapia y la propagación masiva de plantas (Negi et al., 2024). Al respecto, múltiples protocolos han sido documentados en la propagación *in vitro* de *Dioscorea* spp., los cuales incluyen el uso simple o combinado de reguladores de crecimiento como la kinetina, bencilaminopurina, benciladenina, ácido indol-3-acético y ácido naftalenacético (Ikiriza et al., 2020).

Sin embargo, uno de los retos en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, está asociado a los problemas de contaminación microbiana (Gammoudi et al., 2022). Estos contaminantes pueden ser epifíticos al encontrarse en la superficie, o endofíticos al estar alojados en los espacios intercelulares de los tejidos y resistir a los métodos de desinfección, los cuales pueden manifestarse después de iniciado el cultivo o permanecer latentes durante un largo periodo de cultivo (Okoroafor et al., 2022). La presencia de contaminantes puede alterar la composición química del medio de cultivo mediante la liberación de

metabolitos secundarios y la degradación de nutrientes (Komolafe et al., 2025).

En tal sentido, la micropropagación de plantas a partir de la proliferación de pequeños tejidos meristemáticos, unido al empleo de pruebas microbiológicas para la detección de microorganismos en el cultivo *in vitro* de especies del género *Dioscorea*, constituyen un paso importante para su control. En tal sentido, la investigación tuvo como objetivo caracterizar los contaminantes microbianos después de varios subcultivos y su control mediante el cultivo de meristemos en *Dioscorea cayenensis* subsp. *rotundata* Poir clon blanco de Guinea.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal (CEBVEG) de la Facultad de Ciencias Agropecuarias en la Universidad de Granma en colaboración con el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la provincia Granma.

Se seleccionaron plantas *in vitro* de ñame (*Dioscorea cayenensis* subsp. *rotundata* Poir) clon blanco de Guinea, obtenidas a partir de segmentos uninodales de 10 mm de longitud, cultivados en medio de cultivo con las sales y vitaminas MS (Murashige & Skoog, 1962), sacarosa 30 g.l⁻¹, Agar 6 g.l⁻¹ y pH 5,7. Las plantas crecieron en una cámara de cultivo bajo condiciones asépticas, con una temperatura de 24 ± 2 °C, humedad relativa 70-80 %, e iluminación solar con fotoperiodo de 11-12 horas. Se realizaron siete subcultivos a medio de cultivo fresco con intervalos cada 35 días.

En cada subcultivo mediante observación directa y ayuda de un microscopio estereoscopio (OLYMPUS) acoplado a una computadora, se determinó en 100 muestras el número de plantas *in vitro* con presencia de contaminantes microbianos (%).

Para el aislamiento de los posibles contaminantes microbianos endófitos, se seleccionaron de forma aleatoria un total de 25 plantas aparentemente sanas. Fragmentos de estas plantas *in vitro* fueron macerados en suero fisiológico; luego sembrados por el método de estrías o agotamiento, en placas Petri que contenían de manera independiente los medios de cultivo: Agar Nutriente, MS y MS con extracto de levadura + peptona bacteriológica. Las placas Petri se colocaron en incubadora (BINDER) a 27 °C, durante 24-48 horas para promover el crecimiento de bacterias endógenas, y su posterior aislamiento e identificación.

La identificación se llevó a cabo mediante la descripción de las características culturales de las colonias bacterianas en el medio de cultivo, y las características morfológicas de las células de estas cepas, con la ayuda del Manual Bergey de identificación bacteriológica (Garrity et al., 2004).

Las colonias crecidas en medio de cultivo Agar Nutriente (BioCen), se observaron a simple vista y con un microscopio estereoscópico (OLYMPUS, 40x) para describir las siguientes características culturales: color (blanco, amarillo, rojo); forma de las colonias (puntiforme, filamentosa, ondulado, círculo, irregular); borde (aserrado, lobulado, filamentoso, ondulado, entero); elevación (plano, convexo, elevado, umbiliforme o umbilicado).

A las colonias procedentes de hojas, tallos y raíces, cultivadas en medio de cultivo Agar Nutriente durante 48 horas, se les realizó la tinción diferencial de Gram, y se observaron sus características morfológicas microscópicas con ayuda de un microscopio óptico (OLYMPUS) con lente de aceite de inmersión (1000x); además, la respuesta tintorial de color violeta (Gram +) o rosado (Gram -), según la diferencia en la estructura de la pared celular de las bacterias.

Para la identificación de los géneros de las cepas bacterianas en las muestras contaminadas, se emplearon las pruebas bioquímicas; Óxido–Fermentación (O/F), Arginina dihidrolasa, Oxidasa, Catalasa; y las pruebas fisiológicas: producción de Levana, Motilidad, Pudrición de la Papa y Reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*).

Control de los contaminantes endófitos mediante el cultivo de meristemos:

A partir de plantas *in vitro* en tercer subcultivo se aisló el meristemo con 0,3 a 0,5 mm de longitud, con ayuda de una aguja y el microscopio estereoscópico (40x). Luego se sembró un meristemo por frasco, que contenía medio de cultivo MS, con diferentes reguladores de crecimiento, con 25 repeticiones por tratamiento. El factor A correspondió a la auxina ácido naftalenacético (ANA) y el factor B a las combinaciones de las citoquininas benclaminopurina (BAP) y metatopolina (mT), en diferentes tratamientos (Tabla 1).

Tabla 1. Combinaciones de reguladores de crecimiento en el cultivo *in vitro* de meristemos de *Dioscorea cayenensis subsp. rotundata* Poir clon blanco de Guinea.

Tratamientos	Factor A: Auxina (mg.l ⁻¹)	Factor B: Citoquininas (mg.l ⁻¹)	
	ANA	BAP	mT
1	0	0,10	-
2	0	0,20	-
3	0	-	0,15
4	0	-	0,30
5	0,10	0,10	-
6	0,10	0,20	-
7	0,10	-	0,15
8	0,10	-	0,30
9 Control	0,01	0,01	-

10 Control absoluto	0	0	0
---------------------	---	---	---

A los 45 días se evaluó el número de explantes con brotación, fenolización y/o enraizamiento (%); número de hojas extendidas completamente por explante; número de nudos; longitud del vástago (cm), desde la base hasta el punto de inserción de la primera hoja; número de raíces; longitud de la raíz principal (cm), desde la base del explante hasta el extremo de la raíz.

Para detectar la presencia de microorganismos endógenos, se tomaron muestras al azar de las plantas regeneradas, las cuales fueron colocadas en medio de cultivo basal MS con peptona bacteriológica 10 g.l⁻¹ y extracto de levadura 10 g.l⁻¹.

Se aplicó un diseño completamente aleatorizado, y un análisis de varianza bifactorial para evaluar el efecto de diferentes combinaciones de auxina (ANA) y citoquininas (BAP y mT) en el cultivo de meristemos. La normalidad de los datos se comprobó mediante la prueba de Kolmogorov–Smirnov y para la homogeneidad de varianzas la prueba de Bartlett. Para determinar las diferencias entre las medias, se utilizó la prueba de Tukey (p<0,05), con el programa estadístico InfoStat 2020. Los datos expresados en porcentaje, fueron analizados mediante la prueba **Wald Test** (p<0,05), para la comparación múltiples de proporciones del programa CompaProp (Castillo & Miranda, 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los contaminantes microbianos son uno de los desafíos más persistentes en los laboratorios de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales a nivel internacional, lo cual puede afectar la iniciación de los cultivos, su mantenimiento, reduce el crecimiento, y causa pérdida de germoplasma (Gammoudi et al., 2022; Komolafe et al., 2025).

En el presente estudio, se evaluó la contaminación microbiana en plantas *in vitro* de *Dioscorea cayenensis* subsp. rotundata Poir clon blanco de Guinea, durante siete subcultivos consecutivos. Los resultados mostraron que durante los primeros cuatro subcultivos que se extendieron hasta los 140 días, la contaminación microbiana osciló en el rango del 4 a 5 %, dados principalmente por hongos filamentosos (Figura 1).

Sin embargo, después de los 175 días de cultivo, comenzaron a incrementarse estos valores alcanzando un rango del 46 al 50 % de contaminación que se extendió desde el quinto al séptimo subcultivo (Figura 1). La presencia de estos contaminantes puede ser atribuido a microorganismos endófitos latentes en el material vegetal como bacterias y/o levaduras, lo que provoca pérdidas de material vegetal y una limitante para la micropropagación a escala comercial de este clon.

Medias con letras distintas por columnas difieren significativamente según prueba de comparación de proporciones Wald Test ($p < 0,05$)

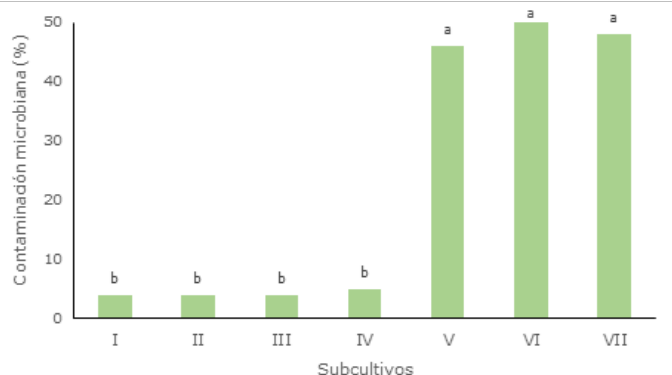


Figura 1. Porcentaje de contaminación microbiana de plantas *in vitro* de *Dioscorea cayenensis subsp. rotundata* Poir clon blanco de Guinea en diferentes subcultivos durante 245 días de cultivo.

La contaminación puede ser originada por diferentes fuentes como el explante, el ambiente del laboratorio, instrumentos, los operarios, e inadecuada esterilización (Okoroafor et al., 2022); además, la contaminación bacteriana del medio de cultivo puede ser controlada mediante el autoclaveado, pero la contaminación de las plantas es muy difícil de controlar especialmente si los contaminantes son endofíticos (Tewelde et al., 2020). Incluso con una adecuada desinfección superficial, y el uso de buenas prácticas de cultivos, la contaminación de los tejidos vegetales puede ser persistente durante la micropropagación (Romadanova et al., 2022), debido a que los métodos de desinfección al no penetrar profundamente en el tejido vegetal, generalmente no afectan a los contaminantes endógenos (Volk et al., 2022).

En otros casos existen contaminantes bacterianos y fúngicos que han mostrado resistencia a los protocolos de desinfección previo al establecimiento *in vitro* de plantas. Entre los microorganismos que han mostrado resistencia a desinfectantes basados en hipoclorito se hayan entre otros *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Okoroafor et al., 2022).

Los resultados de la baja presencia de contaminantes en los primeros subcultivos coinciden con lo plasmado en la literatura científica internacional y pudo estar relacionado con un pH no favorable del medio de cultivo; luego se hicieron visibles al pasar el tiempo, probablemente por su habituación a las condiciones de cultivo.

Al respecto, varios autores han encontrado que en muchas especies vegetales la infección bacteriana no siempre se manifiesta en la etapa inicial del cultivo de tejidos; sin embargo, tras un cultivo prolongado o cualquier otro tipo de estrés, como un largo periodo sin subcultivo, pueden aparecer bacterias alrededor de la base del explante

(Izarra et al., 2020; El-Banna et al., 2021; Bajerski et al., 2021), y en el medio de cultivo, a menudo directamente asociadas con los tejidos vegetales sumergidos en el medio, los que inhiben o impiden el crecimiento posterior de la planta (Volk et al., 2022).

En la presente investigación durante los primeros cuatro subcultivos las pérdidas no superaron el 5 % de contaminación. Algunas referencias informan como aceptable para el cultivo *in vitro* de ñame, un porcentaje de **contaminación inicial entre 5 a 30 %**, aunque el objetivo es reducir al menos al 5 % mediante cultivos frecuentes, uso de cultivo de meristemo y tratamientos antibióticos para lograr cultivos lo más axénicos posible para la multiplicación. **Por ejemplo**, Balogun et al. (2017), obtuvieron en segmentos nodales de tres genotipos de *Dioscorea rotundata* valores entre 18 a 23 % de contaminación endofítica, y un 32 % en el clon TDr 95/19158.

Recientemente en Etiopía se optimizó un protocolo para la micropropagación de ñame (*D. alata*, variedad Bulcha). Los autores emplearon segmentos de hojas desinfectados con hipoclorito de sodio 1 % durante 15 minutos de exposición, logrando un 100 % de desinfección, pero sin supervivencia de los explantes; por el contrario, con 10 minutos de exposición la efectividad de la desinfección superficial tuvo un 86,6 % de supervivencia, pero con un 60 % de contaminación. Agregan que la alta tasa de contaminación en concentraciones y tiempos más bajos, pudo deberse a la insuficiente concentración del esterilizante y la duración de la exposición para eliminar los contaminantes, principalmente hongos y bacterias.

Aunque tradicionalmente las bacterias endofitas se han descrito como contaminantes, y en los laboratorios de cultivo de tejidos se ha buscado eliminar cualquier signo de bacterias visibles para mejorar el éxito de la micropropagación (Volk et al., 2022), estas han sido estudiadas debido a sus efectos sinérgicos en las plantas hospedadoras, como la promoción del crecimiento vegetal a través de la síntesis de fitohormonas que incluyen el ácido indol-3-acético (AIA), citoquininas y giberilinas o mediante la regulación interna de los niveles de hormonas en la planta, la producción de metabolitos secundarios y adaptación de las plantas a ambientes estresantes (Romadanova et al., 2022; Ali et al., 2024).

En tal sentido, Dang et al. (2024), detectaron en *Dioscorea nipponica*, seis géneros bacterianos y cinco géneros fúngicos, con funciones tales como fijación de nitrógeno, solubilizadores de fósforo, síntesis de sideróforo y producción de ácido indol-3-acético.

Las bacterias aisladas de los macerados de fragmentos de raíces de las plantas *in vitro* de *Dioscorea rotundata* clon blanco de Guinea, eran de color blanco-amarillas cremosas, con una leve presencia de brillo. En el medio de cultivo Agar Nutriente, se observaron colonias con formas irregulares, consistencia suave, borde entero

y una elevación convexa (Figura 2A). En tanto, los aislados obtenidos a partir de los fragmentos de hojas y tallos cultivados en Agar Nutriente, mostraron la formación de colonias de color blanco grisáceo, con bordes regulares, elevadas y de superficie brillante (Figura 2B).

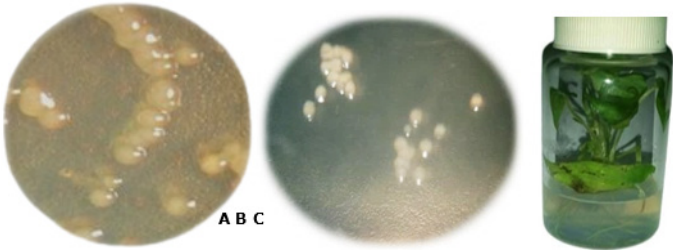


Figura 2. Características culturales de los contaminantes microbianos endofíticos aislados a partir de raíces (A) y hojas-tallos (B) de las plantas *in vitro* de *Dioscorea cayenensis* subsp. *rotundata* Poir clon blanco de Guinea (C) en quinto subcultivo.

Estas características morfológicas de los contaminantes procedentes de raíces de ñame clon blanco de Guinea, son similares a las observadas por Larrea *et al.* (2015) al evaluar el aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* spp., donde las cepas bacterianas fueron identificadas como típicas de *Bacillus* cuando poseían bordes irregulares, aplanados, de color blanco mate, brillante, aspecto harinoso, ceroso, seco o cremoso. Mientras que la descripción de los microorganismos presentes en hojas y tallos, es comparable con las características morfológicas y microscópicas de *Pseudomonas* spp., como son tamaño grande, forma circular, borde lobulado, elevación convexa, superficie lisa, aspecto brillante, color traslúcido, Gram negativas (Rabelo et al., 2020), bacterias aeróbicas y móviles con forma de bacilo (Sánchez & Guerra, 2022).

En la tinción de Gram de los aislados bacterianos a partir de hojas y tallos, se observaron *Bacillus* spp. Gram negativo (Figura 3A), mientras que los aislados procedentes de raíces, resultaron ser bacilos Gram positivo (Figura 3B), con una diferencia marcada en cuanto a

las características de la pared celular de ambos grupos bacterianos.

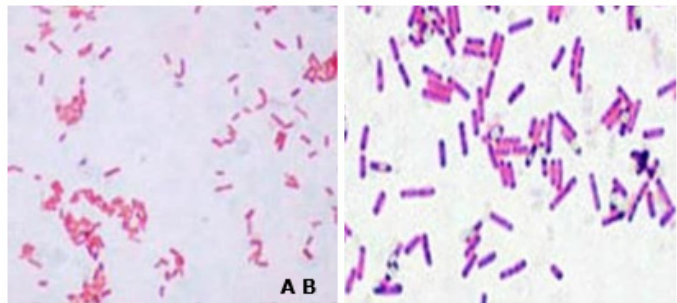


Figura 3. Características microscópicas de los aislados bacterianos de *Bacillus* spp., Gram negativo en hojas-tallos (A) y Gram positivo en raíces (B) procedentes de plantas *in vitro* de *Dioscorea cayenensis* subsp. *rotundata* Poir clon blanco de Guinea.

También Orlikowska et al. (2017), listaron diferentes bacterias aisladas como contaminantes en el cultivo *in vitro* de células y tejidos de un amplio rango de especies vegetales. Según los autores, ciertas bacterias muestran un efecto beneficioso sobre los explantes en el cultivo; aumentan la multiplicación y enraizamiento, así como la organogénesis y embriogénesis somática de genotipos recalcitrantes; y un importante papel durante la aclimatación, cuando se reanude el crecimiento en condiciones naturales. Mientras que Okoroafor et al. (2022), informan que los contaminantes estuvieron representados por bacterias Gram-positivo (*Bacillus* spp.) y Gram-negativo (*Pseudomonas* spp.) en igual cantidad.

Las pruebas bioquímicas y fisiológicas realizadas a las bacterias aisladas de los diferentes órganos de la planta, muestran que ninguna resultó positiva a la prueba de hipersensibilidad en hojas de tabaco, no pudieron las rodajas de Papa, tampoco fermentaron la glucosa en ausencia de oxígeno resultando en una reacción. Además, coincidieron de manera positiva en las pruebas de motilidad, levan, catalasa y oxidasa (Tabla 2).

Tabla 2. Caracterización de las pruebas bioquímicas y fisiológicas en bacterias aisladas de plantas *in vitro* de *Dioscorea cayenensis* subsp. *rotundata* Poir clon blanco de Guinea.

Aislados	Pruebas bioquímicas				Pruebas fisiológicas			
	O/F	Arginina	Oxidasa	Catalasa	Levana	Motilidad	Pudrición en Papa	Hipersensibilidad en tabaco
Hojas	Oxidación	+	+	+	+	+	-	-
Tallos	Oxidación	+	+	+	+	+	-	-
Raíces	Oxidación	-	+	+	+	+	-	-

Los microorganismos aeróbicos obligados, aeróbicos y anaeróbicos facultativo, como las bacterias contienen típicamente la enzima superóxido dismutasa, la cual descompone el superóxido en peróxido de hidrógeno, que es degradado por las enzimas catalasa o peroxidasa. Mientras que la prueba Oxidasa, permite chequear la presencia de la enzima citocromo c oxidasa, con un rol clave en la transferencia de electrones durante la respiración aeróbica. Entre las bacterias Gram- las *Pseudomonas*, muestran una respuesta oxidasa positiva (Hafezi & Khamar, 2024).

Sin embargo, la prueba de arginina mostró diferencias entre los diferentes aislados, con presencia de la enzima arginina descarboxilasa en bacterias tomadas a partir de hojas y tallos, debido a la acción de esta enzima el medio de cultivo adquirió una coloración amarillo-púrpura resultando positivo la prueba; la cual no fue visible en aislados de raíces al no ocurrir el cambio de coloración en el medio de cultivo (Figura 4).

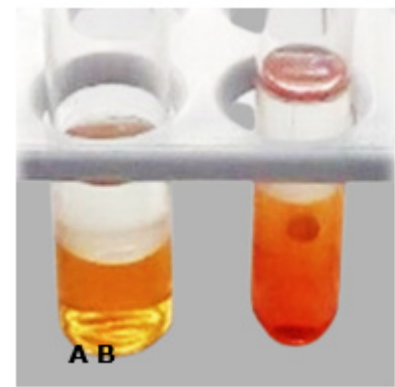


Figura 4. Prueba de arginina en bacterias aisladas de raíces (izquierda) y de hojas y tallos (derecha) de plantas *in vitro* de *Dioscorea cayenensis subsp. rotundata* Poir clon blanco de Guinea.

Las técnicas bioquímicas son herramientas fiables para la identificación preliminar de bacterias mediante el examen de las actividades enzimáticas asociadas a cada cepa. Cada cepa muestra una reacción diferente a las pruebas en función de sus características enzimáticas específicas, lo que provoca cambios en el pH del medio de cultivo y cambios en su color (Hafezi & Khamar, 2024).

Al analizar las características culturales macroscópicas, microscópicas, las pruebas bioquímicas y fisiológicas de las bacterias aisladas y basados en el Manual Bergey de identificación bacteriológica, se determinó la presencia

de los géneros *Pseudomonas* en la parte aérea de la planta y *Bacillus* en las raíces de la planta.

Estos dos géneros bacterianos han sido ampliamente informados en la literatura científica como contaminantes comunes asociados a las plantas de ñame. Por ejemplo, mediante estudios de biología molecular, se han detectado *Bacillus* spp. en tallo y raíces, tejidos contaminados y heridas de tubérculo; así como, *Pseudomonas* spp., en muestras de postcosecha y cultivo *in vitro* (Ojo & Afolayan, 2023).

Un estudio sobre densidad poblacional y diversidad genética de bacterias endofíticas de ñame en regiones tropicales, demostró que las mayores densidades de bacterias endofíticas totales y *Bacillus* se presentan en el interior de las raíces y disminuyen a medida que el órgano de la planta muestreado se separa del suelo. Los *Bacillus* spp., representan el 1,0 % de la población total de bacterias endofíticas. Su capacidad de crecer en condiciones anaerobias explica en parte que la mayor proporción de este género se encuentre en las capas profundas de la rizosfera (De Souza et al., 2017).

Debemos señalar que la mayor parte de la contaminación microbiana identificada en esta investigación procede de microorganismos presentes en el suelo, los cuales son transmitidos a los explantes de forma inter o intracelular. Por ello, el cultivo de meristemos es una alternativa para el saneamiento del material vegetal al reducir la incidencia de contaminantes endógenos.

Los meristemos cultivados con diferentes reguladores del crecimiento, demostró una interacción significativa, que influyó en la brotación, fenolización y enraizamiento de las plantas *in vitro* de ñame clon blanco de Guinea. Al combinar ANA/mT (0,10 y 0,15 mg.l⁻¹ respectivamente), se lograron los mejores resultados, con la brotación de la totalidad de los explantes, los valores más bajos de fenolización y el máximo enraizamiento alcanzado (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de diferentes combinaciones de auxina-citoquinina en la respuesta de meristemos de *Dioscorea cayenensis subsp. rotundata* Poir clon blanco de Guinea.

Tratamientos	Reguladores del crecimiento (mg.l ⁻¹)			Variables (%)		
	ANA	BAP	mT	Brotación	Fenolización	Enraizamiento
1	0	0,10	-	88,0 b	64,0 b	0 d
2	0	0,20	-	90,0 b	60,0 b	0 d
3	0	-	0,15	92,0 b	12,0 c	0 d
4	0	-	0,30	86,0 b	12,0 c	0 d
5	0,10	0,10	-	85,0 b	52,0 b	4,0 b
6	0,10	0,20	-	88,0 b	100 a	4,0 b
7	0,10	-	0,15	100 a	10,0 c	8,0 a
8	0,10	-	0,30	88,0 b	10,0 c	4,0 b
9	0,01	0,01	-	88,0 b	68,0 b	4,0 b
10	0	0	0	45,0 c	64,0 b	2,0 c
EE±				0,2	0,1	0,04

Medias con letras distintas por columnas difieren significativamente según prueba de Tukey ($p<0,05$)

Esta respuesta puede ser debido al mejor efecto de la metatopolina en combinación con el ANA, que el BAP que es la citoquinina más usada en los protocolos de cultivo de tejidos. La metatopolina permite solucionar las anomalías de los brotes, reducción de la capacidad de enraizamiento e hiperhidricidad, retarda la senescencia, incrementa el contenido de pigmentos fotosintéticos y modula la actividad antioxidante (Koç, 2021).

No obstante, los resultados con ANA/BAP fueron superiores a los encontrados por Salazar & Hoyos (2007),

quienes emplearon mayores concentraciones de ambos reguladores de crecimiento y obtuvieron solo un 50 % de brotación de plantas a partir de meristemos de *D. alata*.

La influencia de diferentes combinaciones de auxina y citoquinina, e igualmente evidenció los mayores valores significativos en todos los indicadores morfológicos, en la combinación ANA y mT previamente mencionada. No obstante, resultados similares se lograron con igual concentración de metatopolina, pero sin inclusión de la auxina excepto en la variable número de raíces. La no inclusión de auxina en el medio de cultivo, corroboró su efecto en la inducción de raíces, como ocurrió en los tratamientos del 1 al 4, donde las raíces fueron inhibidas (Tabla 4).

Tabla 4. Influencia de diferentes combinaciones de auxina-citoquinina en indicadores morfológicos de las plantas *in vitro* procedentes del cultivo de meristemos de ñame clon blanco de Guinea.

Tratamientos	Reguladores de crecimiento (mg.l ⁻¹)			Variables morfológicas (U)				Longitud (cm)	
	ANA	BAP	mT	Brotes	Nudos	Hojas	Raíces	Brote	Raíz
1	0	0,10	-	1,20 b	1,30 b	1,10 c	0 d	1,4 b	0 d
2	0	0,20	-	1,30 b	1,48 b	1,90 a	0 d	1,26 b	0 d
3	0	-	0,15	1,64 a	2,12 a	1,92 a	0 d	1,56 a	0 d
4	0	-	0,30	1,32 b	1,84 a	1,50 b	0 d	1,00 c	0 d
5	0,10	0,10	-	1,18 b	1,20 b	1,10 c	1,50 b	0,52 d	1,80 b
6	0,10	0,20	-	1,23 b	1,39 b	1,10 c	2,00 a	1,13 b	1,00 c
7	0,10	-	0,15	1,60 a	1,90 a	1,80 a	2,00 a	1,60 a	4,00 a
8	0,10	-	0,30	1,18 b	1,30 b	1,45 b	1,00 c	0,54 d	1,00 c
9	0,01	0,01	-	1,00 c	1,00 c	1,00 c	2,00 a	0,60 d	1,50 b
10	0	0	0	1,00 c	0,80 c	1,00 c	2,00 a	0,50 d	3,00 b
EE±				0,03	0,07	0,06	0,03	0,07	0,2

Medias con letras distintas por columnas difieren significativamente según prueba de Tukey ($p<0,05$)

Estos resultados son inferiores a los publicados por Mengs (2022), en *Dioscorea alata* clon Koffea y *D. rotundata* clon 11/02 en medio de cultivo MS pero con 3,0 mg.l⁻¹ de BAP al mes de cultivo. Ambos genotipos tuvieron el mayor número de brotes con 6,79 y 7,23 respectivamente, y entre 4 a 5 hojas. Agregan que dicho resultado es contradictorio con otros trabajos en *D. rotundata* que han notificado que el medio de cultivo MS con 4,0 y 5,0 mg.l⁻¹ BAP respectivamente fueron las concentraciones óptimas para la proliferación de brotes. Mientras que Ikiriza et al. (2020), estudiaron la especie *D. bulbifera* e informaron sobre el uso del medio de cultivo DKW (George et al., 2008), donde el uso de kinetina (1,5 mg.l⁻¹) en combinación con 1,0 mg.l⁻¹ BAP + 0,5 mg.l⁻¹ ANA estimuló hasta el 85,7 % de supervivencia, incrementó a 1,6 cm la longitud de los brotes y 1,4 cm el diámetro de las hojas.

Tanto las citoquininas como las auxinas, controlan numerosos procesos fisiológicos y de desarrollo vegetal, por lo que su elección debe optimizarse para cada genotipo. El menor efecto del BAP pudiera estar ligado a las bajas concentraciones, el tipo de explante y genotipo utilizados en la presente investigación. Por el contrario, la

superioridad de la metatopolina se atribuye a su fácil degradación y rápida translocación en el tejido vegetal que evita su acumulación (Gupta & Biraji, 2022; Grira et al., 2024). Múltiples investigaciones refieren que la metatopolina es más activa que el BAP en promover la formación y calidad de los brotes en múltiples especies vegetales, además una mayor actividad de enzimas antioxidantes y por lo tanto mayor capacidad de tolerancia al estrés (Koç, 2021; Ahmad et al., 2022).

En las plantas regeneradas a partir del cultivo de meristemos no se detectaron microorganismos endófitos en los fragmentos de tejidos de tallos y hojas, después de 72 horas en medio de cultivo microbiológico Agar Nutriente. Igualmente, no se detectó crecimiento en los segmentos uninodales en el medio de cultivo MS con peptona bacteriológica y extracto de levadura.

Esto puede deberse al menor tamaño del meristemo en relación con los nudos, y a que es poco probable que la región terminal del meristemo del brote, que se encuentra por encima de la zona de diferenciación vascular, contenga organismos patógenos debido a la ausencia de tejidos conductores diferenciados (Balogun et al., 2017).

Estos resultados también coinciden con Salazar & Hoyos (2007), quienes plantearon que las plantas *in vitro* de *D. alata* obtenidas a partir del cultivo de meristemos no presentaron ningún tipo de contaminación por bacterias ni síntomas de virus, lo cual no ocurrió cuando se utilizaron explantes a partir de plantas madre cultivadas en macetas en el invernadero.

Un estudio realizado por Acar et al. (2022), demostraron que al inocular yemas apicales de *Dioscorea sansibarensis* con una suspensión bacteriana de *Orrella dioscoreae* fue suficiente para colonizar hojas y propágulos recién formados y asegurar la transmisión a la siguiente generación de plantas. Según los autores, la motilidad flagelar no fue necesaria para el movimiento dentro de la planta, pero importante para la colonización de nuevos hospedadores. Además, proponen que las bacterias de la zona foliar dedican recursos a las funciones simbióticas, mientras que las bacterias en el ápice del brote aseguran la colonización exitosa del tejido meristemático y los propágulos.

Aunque el cultivo de meristemo es una alternativa para el saneado de las plantas a propagar, es un hecho la posible simbiosis entre tejidos y bacterias en ñame, lo que abre la oportunidad a nuevos estudios en *Dioscorea cayenensis* subsp. *rotundata* Poir clon blanco de Guinea, para la identificación de microorganismos con empleo de pruebas moleculares.

CONCLUSIONES

A partir del quinto subcultivo se incrementó a más de un 40 % el porcentaje de contaminación microbiana. Mediante tinciones Gram, pruebas bioquímicas y fisiológicas, se identificó la presencia de contaminantes endofíticos del género *Pseudomonas* en aislados de hojas y tallos, y del género *Bacillus* en raíces, de plantas *in vitro* que crecieron a partir de segmentos nodales.

El cultivo de meristemos permitió el control de los contaminantes, y su cultivo con ANA 0,1 mg.l⁻¹ más metatopolina 0,15 mg.l⁻¹, incrementó la respuesta de las variables morfológicas de plantas *in vitro* de ñame clon blanco de Guinea cultivadas durante 40 días.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acar, T., Moreau, S., Coen, O., De Meyer, F., Leroux, O., Beaumel, M., Wilkin, P., & Carlier, A. (2022). Motility-Independent Vertical Transmission of Bacteria in Leaf Symbiosis. *mBio*, 13(5), e0103322. <https://doi.org/10.1128/mbio.01033-22>

Ahmad, N., Fatima, N., Faisal, M., Alatar, A. A., & Pathirana, R. (2022). Photosynthetic Parameters and Oxidative Stress during Acclimation of Crepe-Myrtle (*Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers.) in a meta-Topolin-Based Micropropagation System and Genetic Fidelity of Regenerated Plants. *Plants* (Basel, Switzerland), 11(9), 1163. <https://doi.org/10.3390/plants11091163>

Ali, M. A., Ahmed, T., Ibrahim, E., Rizwan, M., Chong, K. P., & Hong, J. W. (2024). A review on mechanisms and prospects of endophytic bacteria in biocontrol of plant pathogenic fungi and their plant growth-promoting activities. *Heliyon*, 10(11). <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844024076047>

Bajerski, F., Nagel, M., & Overmann, J. (2021). Microbial occurrence in liquid nitrogen storage tanks: a challenge for cryobanking? *Applied microbiology and biotechnology*, 105(20), 7635–7650. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11531-4>

Balogun, M., Maroya, N., Augusto, J., Ajayi, A., Kumar, L., Aighewi, B., & Asiedu, R. (2017). Relative efficiency of positive selection and tissue culture for generating pathogen-free planting materials of yam (*Dioscorea* spp.). *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 53(1), 9–16. <https://doi.org/10.17221/117/2016-cjgpb>

Castillo, Y., & Miranda, I. (2014). Compaprop: Sistema para comparación de proporciones múltiples. *Revista Protección Vegetal*, 29(3), 231-234. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v29n3/rpv13314.pdf>

Condé, N., Burton, G., Touré, M., Gori, B., Cheek, M., Magassouba, S., Wilkin, P., Couch, C., Ryan, P. (2025). The biocultural heritage and changing role of indigenous yams in the Republic of Guinea, West Africa. *Plants People Planet*, 7(3), 719-733. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10498>

Dang, S., Geng, J., Wang, R., Feng, Y., Han, Y., & Gao, R. (2024). Isolation of endophytes from *Dioscorea nipponica* Makino for stimulating diosgenin production and plant growth. *Plant cell reports*, 43(4), 95. <https://doi.org/10.1007/s00299-024-03164-4>

De Souza, J. T., Oliveira, A. C., Pereira, F., Rodrigues, M., Oliveira, P., Ferreira, L., & Barbosa, E. (2017). Genetic diversity and population densities of endophytic *Bacillus* spp. in yam plants. *Bragantia, Campinas*, 76(2), 203-208. <https://www.scielo.br/brag/a/kGWBKy4LSd-L4SBHfZ87gNF/?lang=en>

El-Banna, A. N., 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). <https://www.mdpi.com/2311-7524/7/12/526>

- Folgueras, M. C., Castellón, M. C., Morales, L. M., Dávila, A., González, R. E., Ventura, V., González, J. E., & Pons, C. C. (2020). Manual Práctico. Manejo Integrado de Plagas en raíces, rizomas y tubérculos tropicales, plátanos y bananos. Editorial INIVIT.
- Garrrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. G. (2004). *Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, Verlag.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. (2008) Plant Propagation by Tissue Culture. Springer.
- Gira, M., Prinsen, E., & Werbrouck, S. (2024). New Understanding of Meta-Topolin Riboside Metabolism in Micropropagated Woody Plants. *Plants (Basel, Switzerland)*, 13(9), 1281. <https://doi.org/10.3390/plants13091281>
- Gupta, S., & Biraji, V. K. (2022). *In vitro* propagation of *Artocarpus lakoocha* Roxb.: effect of meta-topolin on shoot parameters. *Acta Hort.* 1339, 5-12. https://www.ishs.org/ishs-article/1339_2
- Hafezi, A., & Khamar, Z. (2024). The Method and Analysis of Some Biochemical Tests Commonly Used for Microbial Identification: A Review. *Compr Health Biomed Stud.*, 3(2), e160199. <https://brieflands.com/articles/chbs-160199>
- Ikiriza, H., Okella, H., Driciru, P., Ssekandi, J., Muwonge, A., Abdalla, M. A. A., & Tolo, C. U. (2020). Protocol optimization for *in vitro* micro propagation of *Dioscorea bulbifera* Linn. Germplasm. *Journal of Plant Sciences and Crop Protection*, 3(1). <https://www.annexpublishers.com/articles/JPSCP/3105-Protocol-Optimization-for-in-vitro-Micro-Propagation-of-Dioscorea-bulbifera-Linn-Germplasm.pdf>
- Izarra, M. L., Panta, A. L., Maza, C. R., Zea, B. C., Cruzado, J., Gutarra, L. R., Riveira, C. R., Ellis, D., & Kreuze, J. F. (2020). Identification and control of latent bacteria in *in vitro* cultures of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam]. *Front. Plant Sci.*, 11, 903. <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2020.00903/full>
- Koç, E. (2021). Effects of Meta-topolin on the Growth, Physiological and Biochemical Parameters in Plant Tissue Culture. En, N. Ahmad y M. Strnad, M. (eds), Meta-topolin: A Growth Regulator for Plant Biotechnology and Agriculture. (pp. 265–278). Springer.
- Komolafe, O. B., Oyinloye, O. H., Ogbimi, E. R., Hassan, K. O., & Pelemo, O. S. (2025). Optimizing disinfection protocols for yam explant regeneration in plant tissue culture. *International Journal of Horticultural Science*, 31, 66-72. <https://ojs.lib.unideb.hu/IJHS/article/view/15325>
- Larrea, I., Falconí, C., & Arcos, A. (2015). Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* spp. con actividad contra *Tetranychus urticae* Koch en cultivos comerciales de rosas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2, 140-148. <https://www.redalyc.org/pdf/776/77642873015.pdf>
- Luo, G. F., Podolyan, A., Kidanemariam, D. B., Pilotti, C., Houlston, G., & Sukal, A. C. (2022). A Review of Viruses Infecting Yam (*Dioscorea* spp.). *Viruses*, 14(4), 662. <https://doi.org/10.3390/v14040662>
- Mengs, B. (2022). Effect of plant hormones for micro propagation on improved and landrace yam varieties (*Dioscorea* species) via nodal culture. *World Journal of Food Science and Technology*, 6(1), 10-18. <https://www.sciencepublishinggroup.com/article/10.11648/j.wjfst.20220601.12>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, 15(3), 473-497. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Negi, S., Singh, P., Trivedi, V. L., Rawat, J. M., & Semwal, P. (2024). The current trends and research progress globally in the plant tissue culture: 90 years of investigation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 157(3), 73. <https://ouci.dntb.gov.ua/en/works/7pgZkvk9/>
- Obidiegwu, J. E., Lyons, J. B., & Chilaka, C. A. (2020). *The Dioscorea Genus (Yam)-An Appraisal of Nutritional and Therapeutic Potentials*. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(9), 1304. <https://doi.org/10.3390/foods9091304>
- Ojo, O. F., & Afolayan, A. O. (2023). Contamination of retailed yam products at two popular markets in Ibadan with *Pseudomonas* spp. and *Flavobacterium* spp. *Int J Agriculture Technology*, 3(2), 1-7. <https://www.scivisionpub.com/pdfs/contamination-of-retailed-yam-products-at-two-popular-markets-in-ibadan-with-pseudomonas-spp-enterobacter-spp-and-flavobacterium-s-2914.pdf>
- Okoroafor, U. E. (2022). Microbial Contamination in Plant Tissue Culture and Elimination Strategies. *Nigerian Agricultural Journal*, 53(2), 348–355. <https://www.ajol.info/index.php/naj/article/view/243321>
- Orlikowska, T., Nowak, K., & Reed, B. (2017). Bacteria in the plant tissue culture environment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 128(3), 487-508. <https://www.proquest.com/docview/2259398586?sourcetype=Scholarly%20Journals>
- Rabelo, R. A., Cuadrado, B. S., Márquez, M. A., Quintero, J. R., De La Rosa, D. (2020). Detección de *Pseudomonas* spp. en la bahía de Cartagena. *Revista de Investigaciones Universidad del Quindío*, 32(1), 30-41. <https://doi.org/10.33975/riuq.vol32n1.293>

- Romadanova, N. V., Tolegen, A. B., Kushnarenko, S. V., Zholdybayeva, E. V., & Bettoni, J. C. (2022). Effect of Plant Preservative Mixture™ on Endophytic Bacteria Eradication from In Vitro-Grown Apple Shoots. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(19), 2624. <https://doi.org/10.3390/plants11192624>
- Salazar, R., & Hoyos, R. A. (2007). Multiplication and *in vitro* tuberization of yam (*Dioscorea alata* L.) in temporary immersion system. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín* 60, 3907–3921. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/24418>
- Sánchez, R., & Guerra, P. (2022). *Pseudomonas* spp. benéficas en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 13(4), 715-725. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342022000400715
- Tewelde, S., Patharajan, S., Teka, Z., & Sbhatu, D. B. (2020). Assessing the efficacy of broad-spectrum antibiotics in controlling bacterial contamination in the *in vitro* micropropagation of Ginger (*Zingiber officinale* Rosc). *The Scientific World Journal*, 6431301, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2020/6431301>
- Volk, G. M., Bonnard, R., de Oliveira, A. C. A., & Henk, A. D. (2022). Minimizing the deleterious effects of endophytes in plant shoot tip cryopreservation. *Applications in plant sciences*, 10(5), e11489. <https://doi.org/10.1002/aps3.11489>