

Manejo de Plántulas de Mango (*Mangifera indica* L.) Obtenidas *in vitro* para Estudios de Sanidad Vegetal

Martha Elena López-Estrada, Brigada de Educación para el Desarrollo Rural No. 90, SEP-DGETA, Maya No. 30, Iguala, Guerrero, México CP 40000; **María Concepción Acosta-Rodríguez**, Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No. 35, SEP-DGETA, km 22.5 Carr. Fed. México-Puebla, Apdo. Postal 38, Tlalpizahuac, Edo. de México CP 56576; **Gabriel Otero-Colina**, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, km 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Edo. de México CP 56230; **Alejandro Casimiro Michel-Aceves**, Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, SAGARPA, km 14.5 Carr. Iguala-Cocula, Apdo. Postal 6 y 9, Iguala, Guerrero, México CP 40000; y **David Heriberto Noriega-Cantú**, INIFAP, Campo Experimental Iguala, km 2.5 Carr. Iguala-Tuxpan, Iguala, Guerrero, México CP 40000. Correspondencia: gotero@colpos.mx

(Recibido: Junio 27, 2007 Aceptado: Diciembre 4, 2007)

López-Estrada, M.E., Acosta-Rodríguez, M.C., Otero-Colina, G., Michel-Aceves, A.C. y Noriega-Cantú, D.H. 2008. Manejo de plántulas de mango (*Mangifera indica* L.) obtenidas *in vitro* para estudios de sanidad vegetal. Revista Mexicana de Fitopatología 26:184-187.

Resumen. A partir de embriones inmaduros de mango se obtuvieron plántulas *in vitro* libres de contaminantes externos y transmitidos por semilla; luego se trasplantaron a suelo usando sólo materiales esterilizados. Se sembraron embriones de mango de 45 a 60 días de edad en medio B5 modificado; cuando las plántulas alcanzaron 10 cm de altura se trasplantaron a suelo + perlita expandida en recipientes de plástico especialmente diseñados y ahí se regaron con solución nutritiva universal. En la etapa *in vitro* se presentó 10% de contaminación por *Penicillium*, *Aspergillus*, *Xanthomonas* y *Cladosporium*. La contaminación en los recipientes asépticos alcanzó gradualmente 15% después de cinco meses. En el sustrato se determinó a *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Rhizopus* y *Fusarium*, mientras que en los recipientes se identificó a *Helminthosporium*, *Curvularia*, *Penicillium* y *Syncephalastrum*.

Palabras clave adicionales: Cultivo de embriones, contaminantes, sustrato, micropropagación, desinfección.

El cultivo de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas que se basan en la siembra aséptica de tejidos y órganos sobre un medio de cultivo específico para lograr diferentes objetivos, entre los que destaca la obtención de plantas libres de contaminantes (Kozai, 2006). Los embriones normalmente se desarrollan dentro de óvulos que a su vez están cubiertos por los ovarios; puesto que existen ya en un ambiente estéril,

Abstract. *In vitro* mango seedlings free of external and seed-transmitted contaminants were obtained from immature embryos. Then, they were transplanted to soil using only sterilized materials. Mango embryos 45-60 days old were plated in modified B5 medium; and after seedlings attained 10 cm height, they were transplanted to soil + expanded perlite in specially designed plastic containers. Plants were irrigated with nutritive universal solution. During the *in vitro* stage 10% contamination with *Penicillium*, *Aspergillus*, *Xanthomonas* and *Cladosporium* was observed. Contamination in plastic containers gradually reached 15% after five months. *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, and *Fusarium* were identified in the substrate, whereas *Helminthosporium*, *Curvularia*, *Penicillium*, and *Syncephalastrum* appeared in the plastic containers.

Additional keywords: Embryo culture, contaminants, substrate, micropropagation, disinfection.

Abbreviated article.

Plant tissue culture is a set of techniques based on sowing tissues and organs on a specific medium under aseptic conditions; one of its main goals is to obtain contaminant-free plants (Kozai, 2006). Embryos normally develop inside ovules which are covered by ovaries; since they are already in a sterile environment, disinfection is not necessary unless seed testa is injured or there is a systemic infection (Razdan, 2003). *In vitro* propagation is also aimed at obtaining biological material to study phytosanitary aspects; the objective of this work was to establish an *in vitro* aseptic environment for mango (*Mangifera indica* L.) embryos, their germination, and transplant to closed containers for

la desinfección de la superficie del embrión es innecesaria a menos que se dañen las capas de la semilla o esté presente una infección sistémica (Razdan, 2003). La propagación *in vitro* tiene también la aplicación de obtener material biológico para trabajar sobre los aspectos de sanidad, como es el caso del presente trabajo, cuyo objetivo fue conseguir un ambiente aséptico durante el establecimiento *in vitro* de embriones de mango (*Mangifera indica* L.), germinación y trasplante a un sistema de frasco cerrado, a fin de obtener plantas libres de contaminantes para observar fenómenos patológicos. Se colectaron 250 frutos inmaduros de 45 a 60 días de edad a partir de la antesis, procedentes de árboles de mango criollo poliembriónico en Iguala, Guerrero, México. Se lavaron con detergente y se enjuagaron con agua de la llave. En la campana de flujo laminar se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 6% por 15 min y se lavaron dos veces con agua destilada estéril (autoclave, 121°C, 1.05 kg/cm², 60 min). Con instrumentos estériles se extrajo el óvulo de cada mango y se le retiró la nucela, se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 0.6% por 10 min, se lavaron tres veces con agua destilada estéril, se sembraron en frascos con medio basal B5 modificado (Gamborg *et al.*, 1968), y se incubaron en un cuarto de crecimiento con temperatura de laboratorio (entre 20 y 32°C) e iluminación fluorescente. Todos los contaminantes observados se sembraron en papa-dextrosa-agar (PDA) y se identificaron a nivel de género mediante las claves de Barnet y Hunter (1998). Para determinar si las semillas eran o no portadoras de gérmenes, se sembraron 50 embriones y sus nucelas en cajas Petri con PDA y otros 50 embriones y sus nucelas en medio de Nash-Snyder (peptona-PCNB, pentacloronitrobenzeno) (Leslie y Summerell, 2006). A este último medio se le adicionaron sulfato de estreptomicina (1 g en 20 mL de agua) y neomicina (0.12 g en 12 mL de agua), previo tratamiento en filtros milipor de 0.22 µm de abertura y una vez que el medio se esterilizó en autoclave y bajara a una temperatura de aproximadamente 50°C. Las cajas Petri se colocaron bajo luz artificial a 25°C y se revisaron a 24, 48 y 72 h. Cuando habían alcanzado aproximadamente 10 cm de altura, las plantas se trasplantaron a suelo orgánico + perlita expandida (Agrolita®) + tezontle (2:1:1 por volumen), en recipientes especialmente diseñados (Fig. 1). Los frascos y las macetas se lavaron con agua y detergente, posteriormente, en la campana de flujo laminar se lavaron con agua destilada y con alcohol al 96%. Cuando quedaron completamente secos se introdujeron en bolsas dobles de polietileno, las que se sellaron con calor, exponiendo los recipientes a rayos UV. Las torundas se hicieron con rectángulos de algodón de 6 x 7 cm envueltos en gasa. Las tapaderas se lavaron igual que los frascos y las macetas, pero se esterilizaron con autoclave, ya que resistieron el calor. En el Cuadro 1 se muestran las variantes usadas para esterilizar los diferentes materiales usados. En todos los casos, se usó el método que resultó en 100% de asepsia. Luego de su trasplante (Fig. 1), las plantas se incubaron a temperatura de laboratorio (20-32°C) y dentro de la campana de flujo laminar se regaron cada 45 días con

observations of pathological phenomena. Two hundred and fifty immature fruits 45 to 60 days old accounted from anthesis, were collected from polyembryonic Criollo trees in Iguala, Guerrero, Mexico. They were washed with detergent and rinsed with tap water. Inside a laminar air-flow chamber they were disinfected with sodium hypochlorite (6%) during 15 min, then rinsed twice with sterile distilled water (autoclave, 121°C, 1.05 kg/cm², 60 min). Using sterile instruments, the ovule was extracted from each fruit and the nucelli were removed, then, they were disinfected with sodium hypochlorite (0.6%) during 10 min, rinsed three times with sterile distilled water, plated on modified basal B5 medium (Gamborg *et al.*, 1968), and incubated in a growth chamber at laboratory temperature (20-32°C) and fluorescent illumination. All contaminants detected were plated on potato-dextrose-agar (PDA) and identified to genus level using Barnet and Hunter's keys (1998). To determine if seeds were carriers of contaminants, 50 embryos and their nucelli were plated on Petri dishes with PDA, and 50 more on Nash-Snyder medium (peptone-PCNB, pentachloronitrobenzene, plus streptomycin sulfate, 1 g in 20 mL water, and neomycin, 0.12 g in 12 mL water); antibiotics were filtered through millipore 22 µm, then, added to the medium once it had been autoclaved and cooled to about 50°C (Leslie and Summerell, 2006). Petri dishes were placed under artificial light at 25°C and were checked 24, 48, and 72 h later. Seedlings were transplanted to organic soil + expanded perlite (Agrolita®) + basaltic scoria (2:1:1 by volume), in especially designed plastic containers (Fig. 1) when they were about 10 cm high. Bottles and inner pots, making the containers, were washed with water and detergent; then, washed with distilled water and alcohol (96%) inside a laminar air-flow chamber. Once the bottles and pots were dry, they were placed inside double plastic bags, sealed with heat and exposed to germicide ultraviolet rays. Pads, 6 x 7 cm, were made with cotton and gauze. Lids were washed as bottles and pots, but they were autoclaved because they were resistant to heat. Table 1 shows the variables used to sterilize all materials. In all cases, the method used was the one which resulted without any contamination. After transplanting (Fig. 1), seedlings were incubated at room temperature (20-32°C) and irrigated inside a laminar air-flow chamber every 45 days with universal nutritive solution (Juárez-Hernández *et al.*, 2006). After 18 days, practically 100% of the embryos had germinated, a fact associated with their condition of recalcitrant seed (Corbinaeu *et al.*, 1987). Since mango seeds were polyembryonic, it was possible to obtain 1-4 seedlings from each ovule; seedlings grew rapidly up to 15 cm within 21 days. The use of polyembryonic mangoes allows to work with genetically different material, increasing biological variation, and as a consequence greater representation of plant response in pathogenicity studies. Table 2 shows the contaminants found in materials used during plant development. All contaminants are considered opportunistic organisms established during the process; none of them has been reported as pathogen or endophyte in mango (Morales-

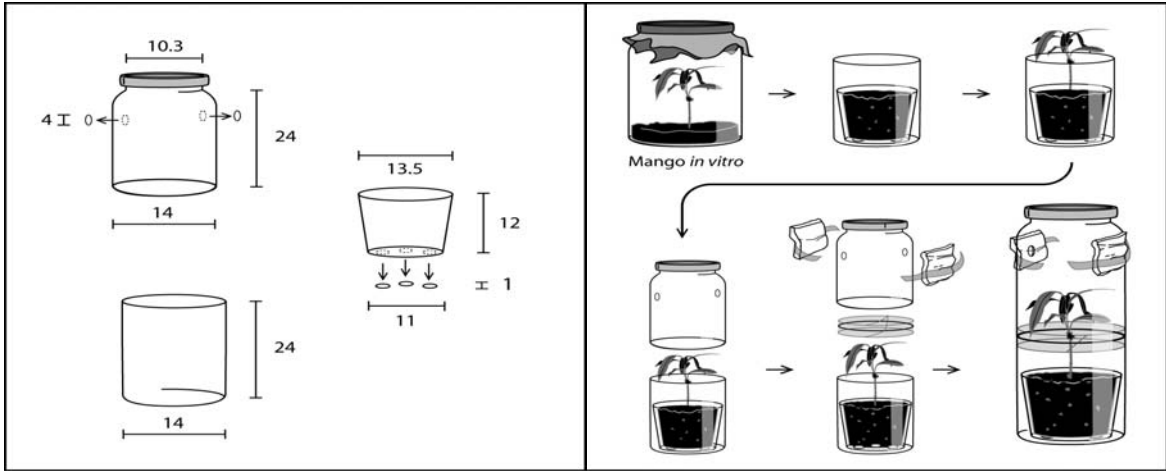


Fig. 1. Diseño del frasco y transplante aséptico de plántulas de mango (*Mangifera indica*) *in vitro*. Medidas en centímetros y frascos de plástico transparente (PC11®).
Fig. 1. Container design and aseptic *in vitro* transplanting of mango (*Mangifera indica*) seedlings. Measures are in centimeters and containers were made of transparent plastic (PC11®).

solución nutritiva universal de Juárez-Hernández *et al.* (2006). A los 18 días prácticamente 100% de los embriones de mango habían germinado, lo que se asocia con su condición de semillas recalcitrantes (Corbinaeu *et al.*, 1987). El uso de mango criollo poliembriónico permitió obtener de una a cuatro plantas de cada óvulo, las que crecieron rápidamente hasta alcanzar aproximadamente 15 cm en 21 días. El hecho de haber usado mangos poliembriónicos permite trabajar con material genéticamente diferente, con lo que se cuenta con variación en el material biológico en consecuencia mayor representatividad en la respuesta de plantas en estudios de patogenicidad. El Cuadro 2 muestra los contaminantes observados en los materiales usados a lo largo del proceso de desarrollo de las plantas. Todos los contaminantes identificados se consideran organismos oportunistas que se

Rondón and Rodríguez-González, 2006). No contaminants were found in ovules sown. Transplanting seedlings to soil make them independent from growth regulators and organic substances, that may affect fungal or bacterial growth used as inoculum during *in vitro* pathogenicity studies. Seedlings obtained by the method described may be taken out from containers, and become adapted to the laboratory or greenhouse environment, although they will lose their aseptic condition. However, if properly handled, they may be kept free from selected pathogens or be inoculated selectively, rendering them useful for etiological studies.
End of the abbreviated article.

Cuadro 1. Resultados de la esterilización de los componentes de los métodos para la obtención de plantas asépticas de mango (*Mangifera indica*).
Table 1. Results obtained after sterilization of components of methods to produce aseptic mango (*Mangifera indica*) plants.

Material	Método de esterilización	n	Contaminación (%)
Suelo + perlita + tezontle	3 h autoclave, un día	10	60
	3 h autoclave, tres días sucesivos	10	0
	Testigo	7	100
Botes y macetas	30 min rayos UV germicidas	10	40
	45 min UV germicidas	10	0
	Testigo	6	100
Torundas	1 h autoclave, tres días sucesivos	20	100
	2 h autoclave, tres días sucesivos	20	30
	3 h autoclave, tres días sucesivos	20	0
	Testigo	7	100
Tapas	1 h autoclave	20	0
	30 min autoclave	10	0
	Testigo	10	100

Cuadro 2. Hongos identificados en los diferentes materiales usados durante la producción de plántulas asépticas de mango (*Mangifera indica*).

Table 2. Fungi identified in different materials used during production of aseptic mango (*Mangifera indica*) seedlings.

Material	Géneros de hongos identificados
Medio B5	<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Xanthomonas</i> y <i>Cladosporium</i>
Suelo	<i>Cladosporium</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Rhizopus</i> y <i>Fusarium</i>
Recipientes	<i>Helminthosporium</i> , <i>Curvularia</i> , <i>Penicillium</i> y <i>Syncephalastrum</i>

establecieron durante el proceso a pesar de las condiciones de asepsia, y ninguno ha sido citado como patógeno o endófito en mango (Morales-Rondón y Rodríguez-González, 2006). En ninguno de los óvulos sembrados aparecieron contaminantes. El hecho de que las plantas hayan sido trasplantadas a suelo, ofrece como ventaja que son independientes de reguladores de crecimiento y sustancias orgánicas que podrían afectar el crecimiento de hongos o bacterias inoculadas durante estudios de patogenicidad *in vitro*. Las plantas obtenidas por el método *in vitro* desarrollado pueden ser sacadas de sus frascos y aclimatadas al ambiente de laboratorio o invernadero, en cuyo caso inevitablemente perderán su condición de asepsia. Sin embargo, podrá garantizarse que están libres de patógenos selectos y con un manejo adecuado podrán mantenerse libres de éstos o inocularlas selectivamente, lo que las hace útiles para determinar relaciones de etiología.

LITERATURACITADA

Barnet, L.H., and Hunter, B.B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.

Corbineau, F., Kante, M., et Come, D. 1987. Germination des graines et développement des plantules de manguier

(*Mangifera indica* L.). Fruits 42:113-120.

Gamborg, O., Miller, P.A., and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. Experimental Cell Research 50:151-158.

Juárez-Hernández, Ma.J., Baca-Castillo, G.A., Aceves-Navarro, L.A., Sanchez-García, P., Tirado-Torres, J.L., Sahún-Castellano, J. y Colinas-León, Ma.T. 2006. Propuesta para la formulación de soluciones nutritivas en estudios de nutrición vegetal. Interciencia 31:246-253.

Kozai, T. 2006. Closed systems for high quality transplants using minimum resources. pp. 275-312. In: S. Dutta-Gupta, and Y. Ibaraki (eds.). Plant Tissue Culture Engineering. Springer. Dordrecht, The Netherlands. 480 p.

Leslie, J.F., and Summerell, B.A. 2006. The Laboratory *Fusarium* Manual. Blackwell Publishing. Ames, Iowa, USA, 388 p.

Morales-Rondón, V. y Rodríguez-González, M. 2006. Hongos endófitos en plantaciones de mango "Haden" de la planicie de Maracaibo, Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Zulia (LUZ) 23:273-283.

Razdan, M.K. 2003. Introduction to Plant Tissue Culture. Second Edition. Science Publishers, Inc. Enfield, New Hampshire, USA. 375 p.