



El contenido del presente documento es propiedad de CICYTEX y no puede ser reproducido total ni parcialmente por cualquier medio sin la expresa autorización del mismo.

TITULO: PROTOCOLO DE TRABAJO EN LABORATORIO PARA LA PREPARACIÓN DE INÓCULO MICORRÍCICO

FECHA: 1 de abril de 2014

ESTADO: Rev. 1

CONTACTO: Adrián J. Montero Calvo
Ingeniero de Montes
Área de Dehesas, Pastos y Producción Forestal

Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura
Instituto del Corcho, la Madera y el Carbón Vegetal
Polígono Industrial El Prado, C/Pamplona s/n - 06800 Mérida, Badajoz
Telf. +34 924 00 31 00 (63132) / Fax. +34 924 00 31 35
Email: adrian.montero@gobex.es / Web: cicytex.gobex.es

Fecha	1.04.2014	CICYTEX	Preparación inóculo micorrízico
Rev.1	El contenido del presente documento es propiedad de CICYTEX y no puede ser reproducido total ni parcialmente por cualquier medio sin la expresa autorización del mismo		

PROTOCOLO DE TRABAJO EN LABORATORIO PARA LA PREPARACIÓN DE INÓCULO MICORRÍCIDO

A.- INÓCULO ESPORAL

El inóculo esporal es un tipo de inóculo micorrízico que destaca por ser económico y por la sencillez de preparación. El problema reside en que no todos los hongos ectomicorrízicos realizan una micorrización eficiente con este método, por lo que es necesario trabajar con micelio.

Si se plantea la micorrización de plantas con inóculo esporal, ya sean de vivero o plantas adultas, es fundamental hacer una selección adecuada de los hongos a utilizar por una doble razón:

- Los hongos seleccionados deben tener una buena germinación esporal y una elevada capacidad de producir micelio en el contenedor de la planta.
- La compatibilidad Hongo-Planta debe ser estudiada en detalle en la bibliografía e incluso apoyarse con la experiencia en campo y en la recolección de carpóforos.

En este protocolo de trabajo se presenta la metodología detallada para la recolección, conservación de carpóforos y preparación de inóculo esporal en condiciones óptimas.

Fecha	1.04.2014	CICYTEX	Preparación inóculo micorrízico
Rev.1	El contenido del presente documento es propiedad de CICYTEX y no puede ser reproducido total ni parcialmente por cualquier medio sin la expresa autorización del mismo		

A.1.- Selección de Hongos

La selección de hongos micorrícicos ha de realizarse a priori. Nuestro objetivo se centra en las especies de *Quercus ilex* y *Q. suber* como especies hospedantes principales.

Los hongos a utilizar en la micorrización deben estar presentes en Extremadura de forma natural, deben ser capaces de micorrizar a las especies hospedantes, deben ser capaces de micorrizar plantas jóvenes y deben ser eficientes mediante inoculación esporal.

Partiendo de estas premisas, los hongos seleccionados a priori son:

- *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch
- *Scleroderma verrucosum* (Bull.) Pers.,
- *Scleroderma polyrhizum* (J.F. Gmel.) Pers.,
- *Hebeloma crustuliniforme* (Bull) Qué.

A.2.- Recolección de Carporos

La recolección de carporos se realizará en diferentes áreas con preferencia de aquellas zonas que tengan como vegetación dominante *Q. ilex* y *Q. suber*. Una vez recogidos los carporos, se introducirán en bolsas de plástico con cierre tipo zip y se identificarán las bolsas con rotulador indeleble indicando al menos:

- Código de control (ID_MUESTRA)
- Fecha de recogida
- Lugar o paraje
- Árbol dominante
- Especie recogida

No es necesario transportar los carporos en frío.

Fecha	1.04.2014	CICYTEX	Preparación inóculo micorrízico
Rev.1	El contenido del presente documento es propiedad de CICYTEX y no puede ser reproducido total ni parcialmente por cualquier medio sin la expresa autorización del mismo		

A.3.- Conservación de Carpoforos

Antes de introducir los carpoforos bajo refrigeración, se limpiarán en seco para eliminar exceso de tierra y suciedad, y se eliminará el exceso de agua de la superficie, por ejemplo con papel de cocina.

Aquellos carpoforos que vayan a ser utilizados en menos de 15 días pueden ser conservados a 4°C en una cámara frigorífica. El resto, debe conservarse en congelador, enbolsados a -20°C.

En cada bolsa se indicarán los datos básicos con pintura indeleble, y en el interior de la bolsa se incluirá una ficha en papel con los mismos datos.

A.4.- Preparación de inóculo bruto

Denominamos inóculo bruto al inóculo elaborado en el que no se ha hecho todavía el ajuste de esporas/ml.

La preparación del inóculo bruto consiste en utilizar carpoforos frescos o conservados a -20°C para elaborar un producto aplicable en las plantas de vivero.

Los carpoforos frescos se utilizarán directamente. Si se encuentran congelados a -20°C deberán sacarse del congelador 12 horas antes.

Los carpoforos deben ser limpiados nuevamente si es necesario, para eliminar cualquier suciedad. Cuidadosamente se separará el himenio del peridio en el caso de los gasteromicetos, es decir, la cubierta que rodea a las esporas en el caso de *Pisolithus* y *Scleroderma* y las láminas (himenio) del sombrero en el caso de los basidiomicetos, en nuestro caso *Hebeloma*, y se introducirá en un recipiente de entre 1 y 3 litros de capacidad. En este recipiente se realizará la trituración del himenio (lo que contiene las esporas) seleccionado.

Para la trituración es necesario el siguiente material:

- Trituradora o batidora
- Recipiente de volumen suficiente
- Agua destilada
- Fairy (1 gota/litro de agua = 0,1ml/litro de agua)

La mezcla se triturará hasta tener una suspensión esporal homogénea.

Fecha	1.04.2014	CICYTEX	Preparación inóculo micorrizico
Rev.1	El contenido del presente documento es propiedad de CICYTEX y no puede ser reproducido total ni parcialmente por cualquier medio sin la expresa autorización del mismo		

La cantidad de agua a utilizar será la mínima posible para poder triturar y filtrar la suspensión, ya que si hay un exceso de agua, es posible diluir demasiado la suspensión y no contar con el número de esporas/ml necesario.

Es recomendable filtrar la suspensión preparada para eliminar restos de carne del carpóforo o restos de material no reproductivo de las láminas. Para ello se puede utilizar un colador lo más fino posible (250 μ m) o una tela de filtro.

La suspensión esporal preparada es posible conservarla a 4°C durante varias semanas. Para periodos de más de 1 mes, es recomendable conservarla a -20°C.

A.5.- Preparación de inóculo elaborado. Conteo de esporas.

Esta es la parte en la que un vivero puede encontrar mayor dificultad. Para solventarlo el Instituto del Corcho, la madera y el carbón Vegetal pone a disposición de los viveros extremeños un servicio para la preparación del inóculo a partir de la suspensión elaborada previamente por el vivero. En el caso de que así sea pueden saltarse este punto y saltar al siguiente.

Pueden informarse dirigiéndose a:

Adrián J. Montero Calvo

Ingeniero de Montes

Área de Recursos Forestales de la Dehesa

Centro de Investigaciones Científicas y tecnológicas de Extremadura

Instituto del Corcho, la Madera y el Carbón Vegetal

Consejería de Empleo, Empresa e Innovación

GOBIERNO DE EXTREMADURA

Polígono Industrial El Prado, C/Pamplona s/n - 06800 Mérida, Badajoz

Telf. +34 924 00 31 00 (63132) / Fax. +34 924 00 31 35

Email: adrian.montero@gobex.es / Web: cicytex.gobex.es

En el caso de que el vivero disponga de los medios para la preparación de inóculo, una vez preparada la suspensión esporal, siguiendo la metodología del apartado anterior, es necesario ajustar la concentración necesaria para la inoculación de las plantas en esporas/ml.

Generalmente se utiliza una concentración de entre 5×10^5 y 5×10^7 esporas/planta, dependiendo de la dosis de riego, esto es, del número de ml a dispensar por planta.

Esta cantidad de agua que va a ser añadida a la planta depende de:

- Del volumen del cepellón

Fecha	1.04.2014	CICYTEX	Preparación inóculo micorrizico
Rev.1	El contenido del presente documento es propiedad de CICYTEX y no puede ser reproducido total ni parcialmente por cualquier medio sin la expresa autorización del mismo		

- Del grado de humedad del sustrato
- Del método de inoculación

El volumen a aportar de la suspensión esporal debe estar ente 5 y 10 ml/planta por cada uno de los riegos que se realicen.

Para realizar el ajuste de la concentración esporal, es necesario utilizar una cámara cuentaglóbulos o de recuento tipo Cámara Neubauer.

Esta cámara permite hacer un conteo de esporas en una suspensión previa, por lo tanto podemos realizar el cálculo del agua que es necesario añadir para conseguir nuestra concentración objetivo.

La cámara Neubauer dispone de una cuadrícula formada de recintos de $0,0025 \text{ mm}^2$ y de $0,1 \text{ mm}$ de profundidad, por tanto, de $0,00025 \text{ mm}^3$ de volumen. El conteo se realiza en los 4 cuadrados de la diagonal de la cámara, formados a su vez por 16 cuadrados de $0,00025 \text{ mm}^3$. Por tanto, realizaremos el conteo en 16×4 cuadrados de ese volumen.

El procedimiento es el siguiente:

- Limpiar bien la cámara con alcohol de 96°.
- Colocar una gota de la suspensión esporal con la ayuda de una micropipeta.
- Colocar el cubreobjetos de la cámara.
- Introducir la cámara Neubauer en la placa del microscopio y realizar el conteo.

El conteo se realizará en los cuadrados amarillos del siguiente gráfico.

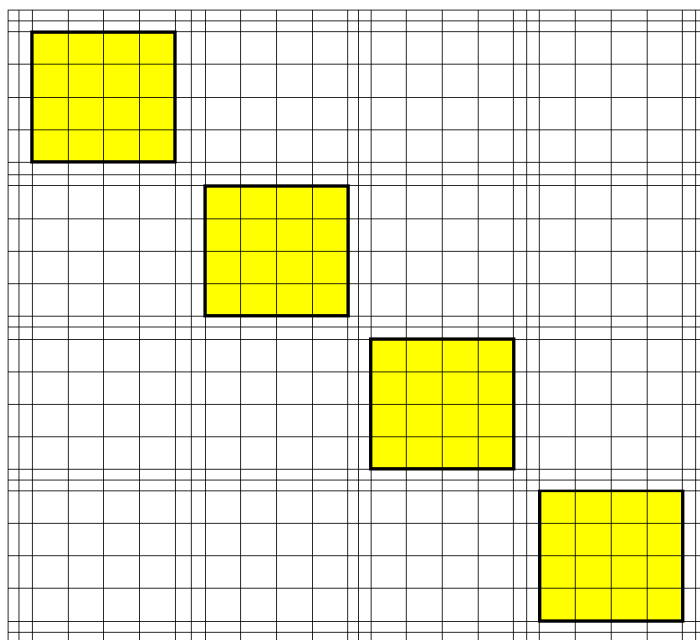


Figura 1. Esquema de la cuadrícula de la Cámara Neubauer

Fecha	1.04.2014	CICYTEX	Preparación inóculo micorrízico
Rev.1	El contenido del presente documento es propiedad de CICYTEX y no puede ser reproducido total ni parcialmente por cualquier medio sin la expresa autorización del mismo		

El número de esporas encontrado en esa diagonal se anotará, y se repetirá el proceso otras 2 veces (3 en total), agitando cada vez la suspensión esporal antes de tomar la dosis del recipiente de inóculo bruto con la micropipeta.

Con los 3 datos de esporas contadas se calculará la media y se procederá a realizar el cálculo de esporas/ml.

El cálculo es el siguiente:

El volumen de 1 cuadrado de la cámara Neubauer es de $0,00025 \text{ mm}^3$. Al hacer el conteo en la diagonal de la cámara, se cuenta el número de esporas en un volumen de: $0,00025 \text{ mm}^3 \times 4 \times 16 = 0,016 \text{ mm}^3$.

Si contamos X esporas en $0,016 \text{ mm}^3$, podemos saber cuántas habrá en 1 ml.

En resumen, el número de esporas por ml, nos lo dará la media de las esporas contadas dividido entre 0,000016.

$$\text{Esporas/ml} = X/0,000016$$

Como **ejemplo**, si la media de los 3 conteos nos da un valor de 20 esporas, la concentración será de $1,25 \times 10^6$ esporas/ml y queremos aportar $2,5 \times 10^6$ esporas/planta.

Si hiciéramos un riego esporal con esa concentración ($1,25 \times 10^6$ esporas/ml) añadiendo 10 ml por planta, estaríamos añadiendo $1,25 \times 10^7$ esporas/planta, de forma que la dosis sería excesiva. Con esa concentración podríamos hacer un riego esporal para 5 plantas, por lo que podríamos multiplicar por 5 el volumen de partida. Si este es de 1 litro, podríamos añadir 4 litros más de agua destilada de forma que regando con 10 ml/planta añadiríamos $2,5 \times 10^6$ esporas.

A.6.- Preparación de inóculo elaborado. Conteo por CICYTEX.

En el caso que hayan contado con nuestra ayuda para la fase anterior recibirán la información de la concentración de esporas en la suspensión que nos han enviado.

Como ejemplo:

Fecha	1.04.2014	CICYTEX	Preparación inóculo micorrízico
Rev.1	El contenido del presente documento es propiedad de CICYTEX y no puede ser reproducido total ni parcialmente por cualquier medio sin la expresa autorización del mismo		

Resultado de la medición

Espece	Concentración en la suspensión	Cantidad de suspensión
<i>P. tinctorius</i>	33.900.000 esporas /ml	13 L

Uso de la suspensión tal y como se entrega.

Espece	Multiplicador	Dosis (10 ml/planta)	Plantas (3 inoculaciones)
<i>P. tinctorius</i>	X338.6	440.172	146.724

Ejemplo 1:

Se van a inocular 10.000 plantas con *Pisolithus tinctorius* y se prepara el inóculo para las 3 inoculaciones, que se realizarán cada 15 días, manteniendo el inóculo en frío a 4°C.

10.000 plantas x 10 ml x 3 inoculaciones = **300.000 ml de inóculo listo para usar.**

Como el multiplicador es **x338.6** se necesitan:

Suspensión : 300.000 ml / 338.6 = 886 ml = **0,886 L de la suspensión original**

Agua: 300.000 ml – 886 ml = 299.114 ml = **299,1 L de agua.**

Fecha	1.04.2014	CICYTEX	Preparación inóculo micorrízico
Rev.1	El contenido del presente documento es propiedad de CICYTEX y no puede ser reproducido total ni parcialmente por cualquier medio sin la expresa autorización del mismo		