

Título: PRODUCCIÓN E INOCULACIÓN DE MICORRIZAS AUTÓCTONAS EN CULTIVOS HORTÍCOLAS

Índice:

Introducción	pag 2
Puesta a punto de técnicas y metodología aplicada	pag 2
Resultados hasta 2018	pag 5
Galería de imágenes	pag 11
Próximas campañas	pag 12

MEMORIA CIENTÍFICA DE 2018

INTRODUCCIÓN

Dentro del proyecto “Producción e inoculación de micorriza autóctona en cultivos hortícolas”

Se ha trabajado específicamente en dos de los objetivos específicos propuestos:

- Aislar inóculos locales de Micorrizas Vesículo-Arbusculares (MVA)
- Producción de inóculos de Micorrizas Vesículo-Arbusculares

Y se ha iniciado una prueba de inoculación directa en planta de tomate en cultivo abierto y protegido en plántula, que entraría dentro de los dos siguientes objetivos:

- Aplicación de MVA bajo condiciones controladas de laboratorio.
- Aplicación de MVA bajo condiciones de campo.

De esta forma se cumple el hito planteado en la memoria presentada del proyecto:

- Cultivo y producción MVA en laboratorio. Pruebas en campo para conocer cultivos más susceptibles.

Para ello se han realizado las siguientes actividades que se detallan más adelante:

- Puesta a punto de técnicas de laboratorio y de aplicación en cultivos.
- Búsqueda de inóculos micorrízicos en diferentes muestras de suelos de áreas cercanas (monte, pradera y linde de huerta) a las fincas de experimentación.
- Comprobación de existencia de esporas, propágulos o raíces micorrizadas en inóculos originales.
- Inoculación de cada tipo de inóculo (monte, pradera, huerta) en dos gramíneas (*Paspalum notatum* y *Zea mays*).
- Comprobación mensual de los inóculos midiendo porcentaje de colonización, densidad de raíces y número de propágulos/esporas.
- Inoculación directa en plántula y semilla de tomate.

PUESTA A PUNTO DE TÉCNICAS Y METODOLOGÍA APLICADA

Las técnicas puestas a punto para realizar el estudio han sido las siguientes:

- Tinción de raíces micorrizadas
- Determinación del nivel de colonización
- Montaje de preparaciones y observación microscópica
- Separación y extracción de esporas y propágulos en suelo

- Cálculo de densidad de raíces.
- Desarrollo de cultivos trampa para generar inóculos

Observación: en el estudio siempre se han utilizado las mismas muestras, macetas o alveolos, las cuales se extraían completamente de su contenedor, y se tomaba muestra hacia la mitad de la maceta (10 g) tanto para extraer raíces, esporas o propágulos, y tras este proceso, se volvían a meter en su contenedor.

La micorrización se ha evaluado atendiendo a tres parámetros: densidad de raíces, colonización de raíces y producción de esporas/propágulos.

TINCIÓN DE RAÍCES MICORRIZADAS

Se pesan 1 g de raíces extraídas del suelo o de la planta (las más finas) y se lavan durante dos minutos con agua abundante, (comprobaremos por rutina que el pH se encuentra entre 7 y 8 y el nivel de cloro que se encuentre entre 0,2 a 0,8 ppm), luego se colocaron en vasos de cultivo in vitro de 250 ml. Se clarifican hidróxido de potasio (KOH) al 10% hasta que todas las raíces quedaron cubiertas y se mantuvieron en baño maría a 90 °C durante una hora (dependiendo del tamaño de la raíz puede ser más o menos). Posteriormente, se elimina el hidróxido de potasio (KOH), se lava con agua y se añade ácido clorhídrico (HCl) al 2% durante una hora a temperatura ambiente. Luego se elimina el HCl y se lavan las raíces con agua. Finalmente, se aplica la tinción con tinta azul Pelikan como colorante acidificada con acético y se deja al baño maría a 90 °C durante una hora; transcurrido este tiempo se decanta el tinte y las raíces se depositan en placas de Petri con glicerol. Las placas se conservan refrigeradas hasta el día de la evaluación.

DETERMINACIÓN EL NIVEL DE COLONIZACIÓN

Se toman varias muestras pequeñas de la masa de raíces al azar. La masa total de esta muestra debe ser de 0,1 a 0,2 g. Se tiñe la muestra según la técnica anterior. Las raíces se disponen aleatoriamente en una placa de contacto de 6 cm de diámetro con filtro de microfibras cuadrado (Cuadrícula de 0,5 cm²).

Se observan las raíces bajo el microscopio estereoscópico, tomando los siguientes datos bajo lupa binocular a 20-40X:

- Nº total de intersecciones entre líneas de la cuadrícula y las raíces (R1).
- Nº total de intersecciones donde la raíz está micorrizada (R2)

Calculamos el porcentaje de micorrización observando el número de intersecciones raíz micorrizada respecto al total de intersecciones de las raíces ($R1 \cdot 100 / R2$).

MONTAJE DE PREPARACIONES Y OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

Tomamos varios trozos de raíces conservadas en glicerol con unas pinzas de puntas muy finas y los colocamos sobre un porta-objetos. Echamos unas gotas de agua o bien de PVLG en un lado y colocamos un cubre-objetos de tal forma que el extremo del cubre-objetos cubra el agua o el PVLG. Inclina la preparación con ayuda de un lapicero para que todo el líquido se extienda por toda la

preparación. Evitar, en lo posible, que se formen burbujas. Es conveniente realizarlo bajo el microscopio estereoscópico.

Posteriormente realizamos la observación con el microscopio óptico a 40, 100 o 400 aumentos.

EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE ESPORAS Y PROPÁGULOS, RECUENTO

Se pesan 5 g de suelo fresco y se colocan en bote de cultivo in vitro con agua (a pH entre 7 y 8 y Cloro libre 0,2-0,8 ppm), se rompen los agregados con una espátula. Se añade agua hasta 200 ml de agua destilada y la suspensión se agita durante 1h a 200 rpm en agitador orbital. La suspensión se pasa por tamices de 500 μ m, 250 μ m (A) y 50 μ m (C). Se añade agua para limpiar bien el bote. Los materiales retenidos en los tamices A y C se colocan en dos tubos centrífuga con 50 ml de agua. Se centrifugan durante 5 minutos a 2000 rpm. Se descarta el sobrenadante de cada tubo. El sedimento se resuspende en sacarosa al 50% y se centrifuga a 2000 rpm 2 min. El sobrenadante se pasa por un papel de filtro Prat Dumas y se lava dos veces con agua destilada, usando vacío con equipo de filtración con embudo Büchner y placa porosa. Los papeles se colocan en placa Petri y se mantienen en refrigeración hasta su identificación y conteo. Bajo el estereoscopio y el objetivo de 2, aislamos esporas y se cuentan.

CÁLCULO DE LA DENSIDAD DE RAÍCES

Para el cálculo de densidad de raíces a lo largo del tiempo, se tomaba muestra del cepellón hacia mitad del contenedor, ayudados de unas tijeras. Se pesan 10 gramos de suelo (M1) y se aíslan las raíces y se pesan (M2). Se calcula la masa de raíces respecto a la masa total de suelo extraída.

DESARROLLO DE CULTIVOS TRAMPA PARA GENERAR INÓCULO

- **Búsqueda de inóculos, comprobación de los mismos**

Se buscan lugares cercanos a las finca de trabajo que presuponemos que no han sido cultivados, o tratados desde un mínimo de 5 años. Para ello se eligen tres puntos: en monte en un bosque de repoblación de unos 15 años, un pastizal y un linde de huerta que se encuentra en ecológico.

Se toman muestras con pala hasta unos 20-25 cm, se eliminan la vegetación superior y se introducen en bolsas. Se transportan al laboratorio donde son desmenuzadas y se comprueba si hay raíces, esporas o propágulos según las técnicas anteriores.

- **Desarrollo de cultivos trampa**

A las muestras anteriores desmenuzadas se les cortan las raíces en fragmentos pequeños y se mezclan completamente con el suelo asociado usando una tijera. A este inóculo puro (mezcla de las raíces y suelos original) se añade arena gruesa autoclavada, vemiculita y compost en relación 1:1 (v/v). Usamos bolsas con cierre (Zip-loc) para el proceso de mezcla, porque es más fácil de "masajear" la bolsa y romper los pequeños grumos de suelo o raíces y mejorar las probabilidades para obtener un producto homogéneo.

Esta mezcla se transfiere a un blíster con 35 alveolos, se usa un blíster para cada tipo de inóculo (monte, pradera y huerta). Se siembran en 14 alveolos 3 semillas de *Zea mays* y en otros 14 una cucharilla de café de semillas de *Paspalum notatum* y cubren con la mezcla y se riegan. Se dejan 7 alveolos en cada blíster con la mezcla como control. Los blíster se colocan en invernadero durante

varios meses. Cada mes se hace una comprobación en seis alveolos de cada tipo de inóculo y cada planta y comprobar, densidad de raíces, micorrización esporulación y propágulos.

Seis de los alveolos son trasplantados a los dos meses debido al crecimiento a macetas de mayor tamaño.

RESULTADOS HASTA JULIO DE 2018

COMPROBACIÓN DE INÓCULOS INICIALES

La recogida del suelo inicial que se usó para generar los inóculos se recogieron durante enero en monte, pradera y huerta. La micorrización se estudió atendiendo a dos parámetros: porcentaje de colonización de raíces por hongos endomicorrícicos y número de esporas/propágulos en suelo. De cada uno de ellos se tomaron 10 muestras de 25 g y de aquí, por un lado se aislaron las raíces más finas para ser teñidas y el resto del suelo se tamizó, para realizar el recuento de esporas y propágulos. Los resultados fueron los siguientes:

	% Colonización medio +/- Error	Nº esporas/propágulos medio +/- Error
MONTE	16,3 +/- 1,3 ^a	19,8 +/- 1,3 ^a
PRADERA	7,7 +/- 0,9 ^b	12,8 +/- 1,7 ^b
HUERTA	15,4 +/- 1,6 ^a	19,1 +/- 1,8 ^a

De la tabla anterior se desprende que el inóculo de monte tiene mayor porcentaje de colonización y también de propágulos/esporas, seguido del suelo de linde de huerta y de pradera.

Se aplicó un test T-Student para comprobar si entre los diferentes suelos tomados como inóculos había diferencias significativas. Se observó que no existían diferencias significativas (a) entre los inóculos de monte y huerta tanto en el porcentaje de micorrización de las raíces estudiadas como en el número de esporas y propágulos, mientras que sí la había entre monte, o pradera y huerta (b) con una probabilidad inferior a 0,01.

MICORRIZACIÓN DE LOS CULTIVOS TRAMPA

Aunque los inóculos iniciales de huerta y monte tienen mayor nivel de micorrización y de esporas/propágulos, se usaron los tres inóculos y ver si la cantidad inicial influencia el desarrollo posterior de micorrizas en los cultivos trampa. Las especies utilizadas como cultivo trampa han sido *Paspalum notatum* y *Zea mays*, utilizadas en diversos estudios similares como constata la bibliografía.

CULTIVOS TRAMPA CON PASPALUM NOTATUM

A continuación se exponen los resultados mensuales obtenidos en *Paspalum notatum*. Los datos expuestos corresponden al valor medio con el error estándar obtenido del estudio de seis muestras. En el mes de julio se ha realizado un test T-Student con el objetivo de comprobar si existen diferencias significativas entre los diferentes inóculos.

Los datos obtenidos corresponden al estudio de densidad de raíces, porcentaje de colonización y recuento de esporas/propágulos en el suelo recogido (10 g) en la mitad del alveolo.

DENSIDAD DE RAÍCES

Mes de observación	MONTE	PRADERA	HUERTA
Febrero	0	0	0
Marzo	0,70 +/- 0,08	0,20 +/- 0,04	0,25 +/- 0,05
Abril	1,25 +/- 0,15	0,50 +/- 0,08	0,62 +/- 0,09
Mayo	2,30 +/- 0,29	0,95 +/- 0,06	1,50 +/- 0,16
Junio	3,60 +/- 0,20	1,80 +/- 0,14	2,87 +/- 0,34
Julio	4,97 +/- 0,12 ^a	3,03 +/- 0,11 ^b	4,82 +/- 0,24 ^a

La densidad de raíces se realizó a partir de una muestra de suelo en mitad del cepellón extraído del alveolo de 10 g y se realizó siempre en peso fresco.

La germinación de las semillas de *Paspalum notatum* tuvo lugar a las cuatro semanas de ser sembradas, de ahí que no hubiera raíces en la mitad del alveolo en febrero.

Un vez producida la germinación, el crecimiento de las raíces se hace palpable, aunque menor con el inóculo de pradera, llegando casi a la mitad del peso fresco de la muestra en las muestras con los inóculos de monte y huerta y sin diferencias significativas entre ellas ($p < 0,01$).

PORCENTAJE COLONIZACIÓN

Mes de observación	MONTE	PRADERA	HUERTA
Febrero	0	0	0
Marzo	0	0	0
Abril	0	0	0
Mayo	6,5 +/- 1,69	0	3,67 +/- 1,29
Junio	10,67 +/- 1,99	2,33 +/- 1,01	9,83 +/- 2,14
Julio	15,83 +/- 2,01 ^a	9,00 +/- 1,76 ^b	17,00 +/- 2,12 ^c

En cuanto a la micorrización, esta no se produce hasta el mes de mayo con el inóculo de monte y huerta, y un mes más tarde con el inóculo de pradera. La micorrización se va produciendo lentamente siendo significativamente diferente ($p < 0,01$) con respecto a los tres inóculos, y mayor en las muestras con el inóculo del lindero de huerta.

ESPORAS/PROPÁGULOS

El número de esporas/propágulos obtenido en todos los casos es bajo, un poco mayor en el inóculo de monte y pradera en los últimos meses. Aunque en el inóculo inicial era mayor,

hemos de tener en cuenta el efecto de dilución que hay al mezclar el inóculo con la vermiculita, la arena y el compost, de ahí que al no encontremos. Lo que podemos constatar es que se producen propágulos y esporas, aunque en muy pequeña cantidad. En los primeros meses el valor medio es inferior a 1, ya que se encontró algún propápulo, pero no en todas las repeticiones, debido probablemente a los propágulos del inóculo inicial mezclado con la arena, la vermiculita y compost.

Mes de observación	MONTE	PRADERA	HUERTA
Febrero	<1	<1	<1
Marzo	<1	<1	<1
Abril	<1	<1	<1
Mayo	<1	<1	<1
Junio	4,0 +/- 1,02	<1	5,5 +/- 0,68
Julio	5,5 +/- 1.09 ^a	3,3 +/- 0,97 ^b	7,2 +/- 0,66 ^a

CULTIVOS TRAMPA CON ZEA MAYS

Seguidamente se muestran los resultados mensuales obtenidos en *Zea mays*. Los datos expuestos corresponden al valor medio con el error estándar obtenido del estudio de seis muestras. En el mes de julio se ha realizado un test T-Student con el objetivo de comprobar si existen diferencias significativas entre los diferentes inóculos.

Los datos obtenidos corresponden al estudio de densidad de raíces, porcentaje de colonización y recuento de esporas/propágulos en el suelo recogido (10 g) en la mitad del alveolo o maceta.

DENSIDAD DE RAÍCES

Mes de observación	MONTE	PRADERA	HUERTA
Febrero	0,58 +/- 0,06	0,60 +/- 0,06	0,67 +/- 0,08
Marzo	1,27 +/- 0,05	1,58 +/- 0,08	1,60 +/- 0,12
Abril	2,30 +/- 0,12	2,40 +/- 0,06	2,52 +/- 0,12
Mayo	3,15 +/- 0,10	3,22 +/- 0,12	3,53 +/- 0,15
Junio	4,77 +/- 0,20	4,20 +/- 0,04	4,80 +/- 0,17
Julio	6,12 +/- 0,15 ^a	5,27 +/- 0,04 ^b	6,12 +/- 0,14 ^a

La densidad de raíces se realizó a partir de una muestra de suelo en mitad del cepellón extraído del alveolo de 10 g, y a partir de marzo de la maceta a la que se trasplantó. Se realizó siempre en peso fresco.

La germinación de las semillas de *Zea mays* tuvo lugar a la semana de ser sembradas. En contraposición con *Paspalum*, se obtienen datos de densidad de raíces todos los meses.

Un vez producida la germinación, el crecimiento de las raíces se hace palpable, aunque menor con el inóculo de pradera, superando la mitad del peso fresco de la muestra en todas las muestras de julio, sin diferencias significativas entre las muestras con los inóculos de monte ($p < 0,01$).

Se observa mayor densidad de raíces en *Zea mays* que en *Paspalum*, se ha de tener en cuenta que son plantas muy diferentes.

PORCENTAJE COLONIZACIÓN

Mes de observación	MONTE	PRADERA	HUERTA
Febrero	0	0	0
Marzo	0	0	0
Abril	0	0	0
Mayo	4,00 +/-1,57	1,67 +/- 1,15	3,33 +/- 1,15
Junio	5,33 +/- 1,83	1,67 +/- 1,15	7,33 +/- 1,32
Julio	12,17 +/- 2,46 ^a	4,67 +/- 1,83 ^b	11,67 +/- 1,91 ^c

En cuanto a la micorrización, esta no se produce hasta el mes de mayo, al igual que en Paspalum con todos los inóculos. La micorrización se va produciendo lentamente siendo significativamente diferente ($p < 0,01$) con respecto a los tres inóculos, y mayor en las muestras con el inóculo del lindero de huerta, al igual que lo encontrado en la otra gramínea.

ESPORAS/PROPÁGULOS

Mes de observación	MONTE	PRADERA	HUERTA
Febrero	<1	<1	<1
Marzo	<1	<1	<1
Abril	<1	<1	<1
Mayo	<1	<1	<1
Junio	2,8 +/- 0,34	3,0 +/- 0,40	4,2 +/- 0,66
Julio	4,7 +/- 0,54 ^a	3,7 +/- 0,46 ^b	5,5 +/- 0,84 ^c

El número de esporas/propágulos obtenido en todos los casos es bajo. La tónica encontrada es similar a la que se ha observado en el césped, algo mayor con el inóculo de huerta y menor con el de pradera y con diferencias significativas entre ellos.

En la bibliografía consultada la esporulación suele iniciarse al tercer o cuarto mes de haberse producido la siembra. Los datos muestran que la esporulación y producción de propágulos se da una vez iniciada la colonización, aunque de forma muy leve.

CONCLUSIONES

De los resultados expuestos podemos desprender las siguientes conclusiones provisionales: Los inóculos iniciales muestran pequeñas diferencias en cuanto a propágulos/esporas y raíces micorrizadas que parecen tener influencia en la micorrización posterior.

El inóculo que presenta mejores actitudes para micorrizar parece ser el del lindero de huerta con las dos plantas, tanto la producción de propágulos como la colonización son significativamente mayores con este inóculo.

Estas conclusiones las hemos de interpretar como una tendencia, ya que la producción de propágulos y la intensidad de colonización se ven mejor con el tiempo, en concreto la

esporulación y producción de propágulos, en general, se intensifica al iniciarse la senescencia de las plantas.

MICORRIZACIÓN EN TOMATE

En mayo se volvió a recoger inóculo, esta vez solo del lindero de huerta en ecológico y se realizaron dos pruebas para pasar a campo y a invernadero, y ver el efecto de la inoculación en la producción vegetativa de las plantas.

Se realizó la misma mezcla inicial con el inóculo recogido y probar directamente si tiene un efecto sobre la germinación en tomate. Tomateco proporcionó las semillas de tomate.

Para ello se sembraron, 10 semillas por maceta que posteriormente serían utilizadas en cultivo de campo y de invernadero. Dejando controles sin inocular.

El esquema de siembras fue el siguiente:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1C	2C	3C	4C	5C	6C	7C	8C	9C	10C
1I	2I	3I	4I	5I	6I	7I	8I	9I	10I
1CI	2CI	3CI	4CI	5CI	6CI	7CI	8CI	9CI	10CI

La primera fila corresponden a macetas en las que añadió inóculo inicial y sembraron 10 semillas en cada una de las macetas, la segunda fila, es igual que la anterior, pero sin inóculo inicial y usaremos de control (C). Estas 20 macetas se destinarán a cultivo abierto sin protección.

La tercera y cuarta filas son iguales que las anteriores, pero se destinará al cultivo en invernadero (I), la cuarta fila son controles para invernadero (CI).

Una vez germinadas se dejará una única planta por maceta para luego trasplantarse a invernadero o a campo, según proceda.

ESTUDIO DE GERMINACIÓN

La germinación de todas las semillas tuvo lugar entre los 5 y 10 días de haber sembrado. Los resultados medios por maceta de la germinación fueron los siguientes:

Control	8,9 +/- 0,28 ^a
Inoculados	8,7 +/- 0,26 ^a

No se encontraron diferencias significativas entre las semillas control ($p < 0,01$) y las que tenían el inóculo.

DESARROLLO DE PLÁNTULAS

De las semillas germinadas en cada maceta se dejó sólo una que se midieron la longitud desde el suelo y el número de ramas, a partir de las dos semanas de haber germinado, semanalmente durante un mes hasta que se trasplantaron al invernadero y al campo. Se exponen los resultados medios a continuación. El número de datos es de 20 para el control y para las inoculadas.

		Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Longitud	Control	20,7 +/- 0,48	25,3 +/- 1,34	38,0 +/- 2 15	46,2 +/- 0,65 ^a
	Inoculado	20,8 +/- 0,36	26,8 +/- 0,43	33,8 +/- 0,59	41,1 +/- 0,69 ^b
Número de ramas	Control	5,4 +/- 0,13	7,2 +/- 0,17	8,7 +/- 0,13	9,1 +/- 0,14 ^a
	Inoculado	5,2 +/- 0,16	7,0 +/- 0 17	8,1 +/- 0,15	8,8 +/- 0,14 ^a

Durante el periodo de tiempo que se mantuvieron las plántulas germinadas en maceta se manifestó crecimiento en longitud que fue marcadamente y significativamente ($p < 0,001$) mayor en los controles, mientras que el número de ramas es ligeramente mayor en los controles, pero no significativamente.

Tras este periodo se trasplantaron 10 plantas inoculadas y 10 controles en campo y otras 10 inoculadas y 10 controles en invernadero.

De estas no se han tomado medidas ya que inicialmente hay que enterrarlas y no nos permite continuar con las medidas que se han iniciado, además la actividad de desniete y descarga tampoco nos permite realizar el conteo de ramas. Los datos que se tomarán de estas plantas serán: producción de fruto y, al final del periodo productivo, el peso de raíces.

GALERÍA DE IMÁGENES

		
Toma de inóculo local	Mezcla de inóculo con vermiculita, arena y compost	Inicio de la germinación de maíz
		
Inicio de germinación de <i>Paspalum</i>	Trasplante de maíz a maceta	Toma de muestra para estudio de micorrización y esporas
		
Tratamiento de raíces	Raíces teñidas para estudio de colonización	Hifas externas con esporas
		
Formación de propágulos en el interior de la raíz de <i>Paspalum</i> con inóculo de hueta	Ensayo de tomates trasplantados a campo. En primer término los controles.	Ensayo de tomates trasplantados a invernadero. En primer término los controles.

PRÓXIMAS CAMPAÑAS

En las próximas campañas se utilizarán otras especies hortícolas para producir inóculos, de forma que la parte aérea se pueda usar para el consumo alimentario y la radicular para micorrizar los siguientes cultivos y obtener más inóculo, y devolver al suelo su contribución y no desestabilizar el sistema agrario.

Se probará a utilizar puerro como planta trampa para desarrollar inóculos. También en posteriores estudios se tomarán datos de peso de los desnietes y descargas en las plantas de experimentación en la que sea necesario realizar estas prácticas culturales con el fin de obtener datos de la parte vegetativa que en esta campaña no se van poder tomar.

Martes, 25 de Julio de 2018
Doctora en Biología
M^a Angélica García Álvaro



Clean-Biotec
Biología Ambiental
C.I.F. B-26340950