Taller práctico: Preparación de inóculos de rizobios e inoculación de leguminosas

Esterilización de semillas y germinación

1. Introducir el doble de semillas necesarias en un matraz Erlenmeyer estéril de 250 mL de capacidad.
2. Verter alcohol etílico (95 %) hasta sumergir las semillas y dejarlas embebidas durante 5 minutos. Agitar periódicamente. Pasado dicho tiempo, retirar el alcohol.
3. Repetir el paso anterior con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30 % v/v, dejándolas durante 15 minutos.
4. Vaciar de H_2O_2 y lavar las semillas de 7 a 10 veces con agua destilada estéril.
5. Tras los lavados, embeber las semillas con agua destilada durante 2 horas en oscuridad.
6. Preparar placas Petri con agar agua al 1%.
7. Colocar 10 semillas en cada placa separadas entre sí.
8. Germinar las placas con las semillas en una cámara de cultivo a 30º C durante 3 días en oscuridad.

Aspecto de semillas de soja esterilizadas y pregerminadas antes de su inoculación

Co-funded by the European Union

Preparación del cultivo bacteriano e inoculación de las semillas

1. Cultivar la bacteria en sus condiciones adecuadas como por ejemplo, placas Petri de YMA. También puede usarse cultivos líquidos
2. Hacer una suspensión del cultivo en solución salina estéril (NaCl a 0,9%).
3. Ajustar en un espectrofotómetro a una densidad óptica de 0,9 medido a 600 nm, utilizando como blanco la solución salina.
4. Añadir a cada semilla 1 mL del inóculo preparado en condiciones de esterilidad utilizando un mechero Bunsen:
    a. Desinfectar la superficie de trabajo con alcohol.
    b. Esterilizar pinzas metálicas con alcohol con la llama del mechero Bunsen.
    c. Hacer un agujero con las pinzas en la perlita de la maceta, previamente esterilizada.
    d. Colocar la semilla germinada en el agujero con la radícula hacia abajo.
    e. Añadir 1 mL a cada semilla del inóculo correspondiente, teniendo especial cuidado en que se distribuya bien por toda la semilla. El control negativo no se inoculó, por lo que este paso no se realizó.
    f. Cerrar los agujeros con las semillas y el inóculo, y a continuación enrasar la jarra con perlita esterilizada en autoclave.
    g. Repetir esta secuencia en cada maceta, inoculando con la bacteria correspondiente a cada tratamiento.

Inoculación en condiciones de esterilidad

Co-funded by the European Union