

**Documentos**

**ISSN 0104-6187**

**Dezembro, 1999**

**Número, 105**



**Protocolo da Embrapa Agrobiologia para Isolamento de  
Rizóbio a partir de Nódulo de Planta-Isca**

**Embrapa**

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

**Agrobiologia**

**Ministério da Agricultura e do Abastecimento**

***República Federativa do Brasil***

***Presidente***

*Fernando Henrique Cardoso*

***Ministério da Agricultura e do Abastecimento***

***Ministro***

*Marcus vinicius Prantini de Moraes*

***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa***

***Diretor Presidente***

*Alberto Duque Portugal*

***Diretores***

*Elza Ângela Battaggia Brito da Cunha*

*Dante Daniel Giacomelli Scolari*

*José Roberto Rodrigues Peres*

***Embrapa Agrobiologia***

***Chefe Geral***

*Maria Cristina Prata Neves*

***Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento***

*Sebastião Manhães Souto*

***Chefe Adjunto Administrativo***

*Vanderlei Pinto*

*DOCUMENTO Nº 105*

*ISSN 0104-6187*

*Dezembro 1999*

**Protocolo da Embrapa Agrobiologia para Isolamento de  
Rizóbio a partir de Nódulo de Planta-Isca**

*Norma Gouvêa Rumjanek*

*Seropédica – RJ*

*1999*

*Exemplares desta publicação podem ser solicitadas à*

**Embrapa Agrobiologia**

Caixa Postal: 74505

23851-970 – Seropédica – RJ

Telefone: (021) 682-1500

Fax: (021) 682-1230

e-mail: [sac@cnpab.embrapa.br](mailto:sac@cnpab.embrapa.br)

**Expediente:**

Revisor e/ou ad hoc: *Bruno José Rodrigues Alves*

Normalização Bibliográfica/Confecção/Padronização: *Dorimar dos Santos Felix*  
e/ou *Sérgio Alexandre Lima*

*Tiragem: 50 exemplares*

*Comitê de Publicações: Sebastião Manhães Souto (Presidente)*

*Johanna Döbereiner*

*José Ivo Baldani*

*Norma Gouvêa Rumjanek*

*José Antônio Ramos Pereira*

*Robert Michael Boddey*

*Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)*

*Coordenadora Editorial: Érica Cruz Rosas de Oliveira*

RUMJANEK, N.G. **Protocolo da Embrapa Agrobiologia para Isolamento de Rizóbio a partir de Nódulo de Planta-Isca**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 1999. 8p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 105).

ISSN 0104-6187

1. Rhizobium. I. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). II. Título. III. Série.

CDD 579.334

© Embrapa

# SUMÁRIO

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| 1. OBJETIVO.....                  | 4 |
| 2. MATERIAL NECESSÁRIO.....       | 4 |
| 2.1 REAGENTES.....                | 4 |
| 2.2 VIDRARIAS E OUTROS.....       | 5 |
| 3. PROCEDIMENTO.....              | 5 |
| 3.1 PLANTA-ISCA.....              | 5 |
| 3.2 PLANTIO.....                  | 6 |
| 4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA ..... | 8 |

# Protocolo da Embrapa Agrobiologia para Isolamento de Rizóbio a partir de Nódulo de Planta-Isca

*Norma Gouvêa Rumjanek <sup>1</sup>*

## 1. OBJETIVO

Estabelecer o procedimentos utilizados para o isolamento de rizóbio a partir de nódulo de planta-isca.

## 2. MATERIAL NECESSÁRIO

### 2.1 Reagentes

|   |  |
|---|--|
| Água oxigenada (100ml)  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                        |
| Sulfato de magnésio hepta hidratado   | MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                 |
| Ácido sulfúrico (100ml)   | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                       |
| Sulfato de cobre penta hidratado  | CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O                |
| Sulfato de zinco hepta hidratado  | ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O                |
| Ácido bórico  | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       |
| Sulfato de ferro hepta hidratado  | FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O                |
| Sulfato de manganês mono hidratado  | MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O                 |
| Molibdato de sódio di hidratado   | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O |
| Ácido cítrico   |  |
| Álcool comercial diluído 70% (200ml)  | -  |
| Água estéril  | -  |
| Sílica gel (suficiente para ocupar 1/3 do frasco para estocagem de nódulos) | -  |

<sup>1</sup> Pesquisadora, Embrapa Agrobiologia, Caixa Postal 74505, CEP 23.851-970, Seropédica - RJ

## 2.2 Vidrarias e Outros

- Erlenmeyer (250ml);
- Solo;
- Sementes;
- Areia estéril (100g/por copo);
- Recipiente plástico com furos para drenagem (300ml);
- Algodão;
- Fluxo laminar;
- Placa de Petri (descasadas para colocar sob os copos e para realizar o plantio das sementes esterilizadas) vidro hermeticamente fechado (50ml)
- Malha plástica (nylon);
- Pipetador automático e ponteira (1000 $\mu$ l e 100 $\mu$ l);
- Câmara de crescimento;
- Pinça;
- Balança;
- Etiqueta de identificação;
- Papel alumínio;
- Bastão de vidro.

## 3. PROCEDIMENTO

### 3.1 Planta-Isca

**3.1.1** A seleção da planta-isca depende do objetivo do estudo que está sendo realizado. Caupi (*Vigna unguiculata*) e siratro (*Macropitilum atropurpurio*) são espécies normalmente utilizadas porque nodulam com vários grupos de rizóbio. Espécies nativas da região em estudo também são recomendáveis. A escolha de leguminosas herbáceas apresenta vantagens sobre arbustivas ou árvores uma vez

que o crescimento mais rápido, acarreta em deficiência de nitrogênio o que vai induzir a formação de nódulos.

**3.1.2** Sementes devem ser selecionadas, eliminando aquelas que apresentem má formação e danos físicos.

**3.1.3** Sementes frágeis e pequenas, devem ser previamente esterilizadas em um erlenmeyer com a parte superior fechada com uma malha plástica trançada:

**3.1.1.1** Acrescentar um volume de álcool (70%) de modo que todas as sementes fiquem imersas;

**3.1.1.2** Agitar ligeiramente por 30 segundos e verter;

**3.1.1.3** Acrescentar água oxigenada por 3 minutos, vertendo em seguida;

**3.1.1.4** Proceder a lavagem com água estéril, agitando ligeiramente e dispensando;

**3.1.1.5** Repetir 10 vezes a lavagem.

**3.1.4** Para sementes que apresentam resistência a quebra de dormência, deve-se proceder inicialmente a escarificação:

**3.1.1.6** Agitar ligeiramente as sementes durante 1,5 minutos em álcool e descartá-lo;

**3.1.1.7** Acrescentar  $H_2SO_4$  (concentrado) durante 6 minutos e descartá-lo;

**3.1.1.8** Acrescentar novamente álcool (70%), durante 2 minutos;

**3.1.1.9** Lavar 5 vezes com água estéril, agitando suavemente e descartando em seguida.

**OBS<sub>1</sub>** - Iniciar com um excesso de 20% de sementes. Após a esterilização/escarificação selecionar as sementes íntegras.

## **3.2 Plantio**

Esterilizar os recipientes através da imersão em água sanitária por 30 minutos, rinsado, enxaguar com água estéril e secar ao ar.

**3.2.1.1** Nos recipientes devem conter um furo para drenagem e serem colocados sobre placas de Petri estéril. Os recipientes devem ser colocados sobre uma mesa cuja superfície foi desinfestada com álcool (70%) e mantidos dentro de casa-de-vegetação.



**3.2.1.** Misturar 100g de solo destorroado com 100g de areia estéril. Colocar em um recipiente com capacidade para 300ml (copo de plástico);

Observar manutenção de condição de assepsia durante o período de cultivo;

Manter um controle negativo, que consta: da mistura solo areia autoclavada (1::1) anteriormente ao plantio. São necessários tantos controles negativos quantas forem as espécies de planta-isca utilizadas.

**OBS<sub>2</sub>:** O solo deve ter sido coletado a menos do que 1 semana anterior ao plantio e durante este período deve ser mantido a temperatura ambiente

**3.2.2** Antes do plantio, irrigar a superfície do substrato com 10ml de água estéril por vaso. Após esta etapa, com auxílio de um bastão de vidro, fazer 5 covas e colocar as sementes com uma pinça e cobrir;

**3.2.3** Irrigar com água estéril sempre que necessário, colocando a água ou solução sempre na placa de Petri. Uma vez por semana acrescentar *Solução de Micronutriente* isenta de nitrogênio;

**OBS<sub>3</sub>:** Usar 1ml desta solução por kg de solo. Conforme o solo usar 0,5g de  $MnSO_4 \cdot H_2O$ /litro (Solos Podzólicos).

**OBS<sub>4</sub>:** Se aparecerem sinais de toxidade, diminuir a freqüência da adubação. Observar ataque de pragas e/ou patógenos, e realizar tratamento com produtos de contato, tendo o cuidado de proteger a superfície do recipiente com papel alumínio.

**3.2.4** Verificar o aparecimento dos nódulos nas raízes com auxílio de uma espátula flambada;

**3.2.5** Proceder a coleta da planta;

**3.2.6** Lavar o sistema radicular em água corrente, secar em papel absorvente e coletar os nódulos;

**3.2.7** Preparar vidros contendo sílica gel recoberta com uma camada de algodão. A sílica gel deve estar seca, apresentando coloração azulada.

Colocar os nódulos sobre o algodão. Fechar hermeticamente. Sempre que a sílica se tornar rósea, trocar os nódulos para um frasco novo;

Etiquetar.

**OBS<sub>5</sub>:** As bactérias permanecem viáveis por pelo menos 1 ano, porém é interessante se proceder ao isolamento num período de até 2 meses.

**OBS<sub>6</sub>:** Quando já for conhecido previamente que a amostra de solo contém número reduzido de rizóbio, devem ser usadas diversas repetições com a mesma amostra, de forma a se obter um número razoável de nódulos (pelo menos 30).

#### 4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BALDANI, V. L. D.; ANDRADE, V.O.; NEVES, M.C.P.; BARBOSA, A. L., PEIXOTO, R. C.; OLIVEIRA, E.C.R. **Manual de Soluções e Reagentes da Embrapa Agrobiologia**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. 18p. (Embrapa CNPAB. Documentos, 86).

PEIXOTO, R.C. **Manual de Boas Práticas para Laboratório**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. 52p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 87).

FRANCO, A.A.; DÖBEREINER, J. Especificidade de hospedeiro na simbiose com Rhizobio - Feijão e influência de diferentes nutrientes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.2, p. 467-474, 1967.