

ISSN 0104-6187



Ministério da Agricultura e do Abastecimento  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA  
Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia-CNPAB



**PROTOCOLO OPERACIONAL CULTIVO DE PLANTA-ISCA PARA  
ISOLAMENTO DE RIZÓBIO A PARTIR DE NÓDULO DE PLANTA-ISCA**

**CNPAB  
Seropédica, RJ  
Dezembro/1997**

ISSN 0104-6187



Ministério da Agricultura e do Abastecimento  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA  
Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia-CNPAB



**PROTOCOLO OPERACIONAL CULTIVO DE PLANTA-ISCA PARA  
ISOLAMENTO DE RIZÓBIO A PARTIR DE NÓDULO DE PLANTA-ISCA**

**Gustavo R. Xavier, Lindete M.V. Martins, Jerri E. Zilli, Rojane C. Peixoto,  
Norma G. Rumjanek**

**CNPAB  
Seropédica, RJ  
Dezembro/1997**

Exemplares desta publicação podem ser solicitadas à

***Embrapa-Agrobiologia***

Antiga Rodovia Rio/São Paulo

Telefone: (021)682-1086; (021)682-1500

Fax: (021)682-1230

Caixa Postal 74505

23851-970 Seropédica, RJ

e-mail: agrob@cnps.embrapa.br

**Comitê de Publicações**

Helvécio De-Polli(Presidente)

Johanna Döbereiner

José Ivo Baldani

Paulo Augusto da Eira

Norma Gouveia Rumjanek

Sebastião Manhães Souto

Dorimar dos Santos Felix(Bibliotecária)

XAVIER, G.R.; MARTINS, L.M.V.; ZILLI, J.E.; PEIXOTO, R.C.; RUMJANEK, N.G.

**Protocolo operacional cultivo de planta-isca para isolamento de rizóbio a partir de nódulo de planta-isca.** Seropédica: *Embrapa-Agrobiologia*, Dez. 1997. 7p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 43).

1. Rhizobium. 2. Processamento. 3. Isolamento de microrganismo. 4. Método.  
I. Martins, L.M.V., colab. II. Zilli, J.E., colab. III. Peixoto, R.C., colab. IV. Rumjanek, N.G., colab. V. Embrapa . Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ).  
VI. Título. VII. Série.

CDD 579.334

© Embrapa

# SUMÁRIO

<b>1. OBJETIVO.....</b>	<b>4</b>
<b>2. MATERIAL .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. REAGENTES.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. EQUIPAMENTOS .....</b>	<b>4</b>
<b>2.3. VIDRARIAS .....</b>	<b>5</b>
<b>2.4. OUTROS.....</b>	<b>5</b>
<b>3. PROCEDIMENTO .....</b>	<b>5</b>
<b>3.1. PLANTA ISCA.....</b>	<b>5</b>
<b>3.2. PLANTIO .....</b>	<b>6</b>
<b>4. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....</b>	<b>7</b>

# PROTOCOLO OPERACIONAL CULTIVO DE PLANTA-ISCA PARA ISOLAMENTO DE RIZÓBIO A PARTIR DE NÓDULO DE PLANTA-ISCA

Gustavo R. Xavier<sup>1</sup>, Lindete M. V. Martins<sup>2</sup>, Jerri E. Zilli<sup>3</sup>, Rojane C. Peixoto<sup>4</sup>,  
Norma G. Rumjanek<sup>5</sup>

## 1. OBJETIVO

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

## 2. MATERIAL

### 2.1. REAGENTES

álcool comercial diluído 70% (200ml)  
água oxigenada - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100ml)  
água estéril  
ácido sulfúrico - H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (100ml)  
sílica gel (suficiente para ocupar 1/3 do frasco para estocagem de nódulos)  
sulfato de magnésio hepta hidratado (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O)  
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)  
ácido cítrico  
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)

### 2.2. EQUIPAMENTOS

balança  
pinça  
fluxo laminar  
câmara de crescimento

---

<sup>1</sup> Bolsista de Aperfeiçoamento-CNPq

<sup>2</sup> Bolsista de Pós-Graduação-CNPq

<sup>3</sup> Bolsista de Iniciação Científica-PIBIC-CNPq

<sup>4</sup> Assistente de Pesquisa-Embrapa-CNPAB, km 47, Caixa Postal 74505, CEP 23851-970, Seropédica, RJ

<sup>5</sup> Farmacêutica, PhD., Embrapa-CNPAB

## 2.3. VIDRARIAS

- erlenmeyer (250ml)
- recipiente plástico com furos para drenagem (300ml)
- bastão de vidro
- placa de Petri (descasadas para colocar sob os copos e para realizar o plantio das sementes esterilizadas)
- vidro hermeticamente fechado (50ml)

## 2.4. OUTROS

- sementes
- solo
- areia estéril (100g/por copo)
- algodão
- malha plástica (nylon)
- papel alumínio
- pipetador automático e ponteira (1000 $\mu$ l e 100 $\mu$ l)
- etiqueta de identificação

## 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 (*Macropitulum 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 erlenmyer com a parte superior fechada com uma malha plástica trançada. Acrescentar um volume de álcool (70%) de modo que todas as sementes fiquem imersas. Agitar ligeiramente por 30 segundos e verter. Acrescentar água oxigenada por 3 minutos, vertendo em seguida. Proceder a lavagem com água estéril, agitando ligeiramente e dispensando. Repetir 10 vezes a lavagem.

**3.1.4.** Para sementes que apresentam resistência a quebra de dormência, deve-se proceder inicialmente a escarificação. Agitar ligeiramente as sementes durante 1,5 minutos em álcool. Descartar o álcool. Acrescentar  $H_2SO_4$  (concentrado) durante 6 minutos. Descartar. Acrescentar novamente álcool (70%), durante 2 minutos. Lavar 5 vezes com água estéril, agitando suavemente e descartando em seguida.

OBS: – Iniciar com um excesso de 20% de sementes. Após a esterilização/escarificação selecionar as sementes íntegras.

## 3.2. Plantio

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

O recipiente deve ter sido esterilizado previamente através da imersão em água sanitária por 30 minutos, rinsado, enxaguando com água estéril e seco ao ar. O recipiente deve conter um furo para drenagem e ser colocado sobre uma placa 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. Obsevar 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-iscas utilizadas.

OBS: O solo deve ter sido coletado a não mais 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.

Solução nutritiva (Franco & Dobereiner, 1967):

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	150g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	15,8g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,908g
$H_3BO_3$	0,3g
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,5g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	20g
Ácido Cítrico	20g

Completar para 1000ml com água destilada

Conforme o solo usar 0,5g de  $MnSO_4 \cdot H_2O$ /litro (Solos Podzólicos)

Obs: Usar 1ml desta solução por kg de solo.

Obs: Se aparecerem sinais de toxidade, diminuir a frequência 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. Proceder a coleta da planta.

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

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

**3.2.7.** Colocar os nódulos sobre o algodão. Fechar hermeticamente. Sempre que a sílica se tornar rósea, trocar os nódulos para um frasco novo. Etiquetar. As bactérias permanecem viáveis por pelo menos 1 ano, porém é interessante se proceder ao isolamento num período de até 2 meses.

Obs: 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. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA**

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.