



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



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

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

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 ¹

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

¹ 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 μ l e 100 μ 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.

OBS₁ - 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.

OBS₂: 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;

OBS₃: Usar 1ml desta solução por kg de solo. Conforme o solo usar 0,5g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ /litro (Solos Podzólicos).

OBS₄: 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;

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.

OBS₅: As bactérias permanecem viáveis por pelo menos 1 ano, porém é interessante se proceder ao isolamento num período de até 2 meses.

OBS₆: 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.