



Nº15, Jun./97, p.1/9

COMUNICADO  
TÉCNICO

**MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO DE SEMENTES DE ARROZ PARA CULTIVO  
MONOXÊNICO COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS**

Vera Lúcia Divan Baldani<sup>1</sup>  
José Ivo Baldani<sup>2</sup>  
Johanna Döbereiner<sup>2</sup>

Resultados de pesquisa sugerem que bactérias diazotróficas endofíticas facultativas como *Azospirillum* spp. e obrigatórias como *Herbaspirillum* spp., e *Burkholderia* spp, são capazes de crescer dentro de plantas de arroz e transferir o nitrogênio fixado diretamente para as plantas hospedeiras com muito mais eficiência que as bactérias diazotróficas da rizosfera (Baldani, 1996). O potencial de fixação biológica de nitrogênio (FBN) desta associação endofítica pode ser maximizada através da seleção de cultivares, assim como de bactérias mais eficientes no repasse do nitrogênio fixado para as plantas. Entretanto, os estudos de seleção de estirpes estão diretamente ligados ao uso de sementes livres de bactérias diazotróficas, uma vez que as mesmas podem ser anatomia das sementes, transmitidas pelas sementes (Baldani et al., 1992) e desse modo mascarar os resultados.

<sup>1</sup> Lic.Ciências Agrícolas, PhD., Embrapa-CNPAB, km 47, Rodovia Rio-São Paulo, Caixa Postal 74505, 23851-970 Seropédica, RJ

<sup>2</sup> Eng. Agron., PhD., Embrapa-CNPAB

Nº15, Jun./97, p.2/9

Comunicado Técnico

A presença de fendas no tegumento das sementes de arroz dificulta o processo de esterilização já que microrganismos geralmente alojam-se nestas fendas e não permitem a obtenção de sementes totalmente livres de bactérias. Por outro lado a falta de estruturas visíveis, como nas leguminosas, durante o processo de infecção e colonização das raízes das plantas pelas bactérias diazotróficas endófitas tem dificultado os estudos de inoculação em condições monoxênicas, já que outros microrganismos podem estar presentes nas sementes. Com o objetivo de se estudar este processo em raízes de arroz, visando sua aplicação na seleção de estirpes mais eficientes, vários métodos de esterilização de sementes foram testados buscando obter sementes livres de bactérias fitopatogênicas e também diazotróficas.

Os métodos de esterilização foram testados em sementes com e sem casca e detalhados a seguir:

Método 1- Imersão em álcool etílico hidratado (92,8° GL) e flambagem.

Método 2- Imersão em água destilada estéril aquecida a 55°C por 1 h.

2.1- Imersão em água estéril aquecida a 55°C por 1 h mais 6 minutos a 70°C.

2.2- Imersão em água estéril aquecida a 55°C por 1 h mais 6 minutos a 70°C e 4 minutos a 75°C.

2.3- Imersão em água estéril aquecida a 55°C por 1 h, 6 minutos a 70°C, 4 minutos a 75°C e finalmente a 80°C por 3 min. (Modificado de Dunnewald, 1934).

Método 3- Imersão em solução de bicloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) na proporção de 1:1000 por 90 segundos. Usar 2,5 ml da solução estoque (40,0 g  $\text{HgCl}_2$ , 100 ml  $\text{HCl}$ ) em 1000 ml de água destilada.

Método 4- Imersão em álcool etílico hidratado (92,8° GL) e agitação a 100 rotações por minuto (rpm), em agitador horizontal (LAB-LINE) por 20 minutos.

Método 5 - Imersão em solução de álcool etílico hidratado (92,8° GL) nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 70, e 90% em água destilada estéril e agitação a 100 rpm por 10 minutos cada.

Método 6- Imersão em solução de estreptomicina 0,1%, acrescida de 2 gotas de detergente comercial e mantidas sob agitação a 100 rpm por 20 minutos e posteriormente tratadas em  $\text{HgCl}_2$  na proporção de 1:1000 e agitação a 100 rpm por 10 minutos.

Método 7- Imersão em álcool etílico hidratado (92,8° GL) por 30 segundos, acrescido de 5 minutos em solução de hipoclorito de sódio acidificado\*\* e lavadas 4 vezes em água destilada estéril. Posteriormente as sementes foram imersas novamente em solução de hipoclorito acidificado e mantidas sob agitação de 100 rpm por 5 minutos, lavadas 3 vezes em água destilada estéril, colocadas em peróxido de hidrogênio (30%  $\text{O}_2$ , P.A.) e mantidas sob agitação de 100 rpm por 5 minutos

\*\* Solução de hipoclorito acidificada (Pinheiro, 1992).

**Nº15, Jun./97, p.4/9**

**Comunicado Técnico**

Solução A- Hipoclorito de sódio ( $\text{NaOCl}$  5% P.A.)

Solução B- (160 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1M; 40 ml HCL concentrado; 250 ml água destilada).

Solução C- Tween 80. Misturar 20 ml da solução A, 4 ml da solução B e 2 ml da solução C em 174 ml de água destilada estéril.

Método 8- Imersão em diferentes concentrações (1,0; 2,5; 5,0 e 10,0%) de hipoclorito de cálcio comercial (cloro utilizado para tratamento da água de piscinas) e mantidas sob agitação de 100 rpm por 10 minutos.

Em todos os casos, após o tratamento de esterilização, as sementes foram lavadas por 10 vezes em água destilada e estéril permanecendo na última água de lavagem por 4 h para facilitar a germinação e evitar o bloqueio da fotossíntese quando se utiliza  $\text{HgCl}_2$  no tratamento. Para a avaliação da porcentagem de germinação e de contaminação por microrganismos, as sementes (na quantidade de 20 sementes por placa) foram colocadas em placas contendo meio batata (Döbereiner et al., 1995), agarizado a 0,1% e incubadas a 30°C por 2-4 dias. A avaliação da presença de bactérias diazotróficas nas sementes foi feita através da observação da formação de película característica dos microrganismos diazotróficos nos meios JNFb e NFb semi-sólido (Döbereiner et al., 1995). Para isso, as sementes com ou sem casca foram colocadas inteiras ou amassadas em frascos (na quantidade de 1 semente por frasco, com 10 repetições) contendo 5 ml de meio JNFb e NFb semi-sólido e incubadas a 30°C por 3 a 5 dias.

**Nº15, Jun./97, p.5/9**

**Comunicado Técnico**

Dentre os métodos de esterilização de sementes utilizados, podemos observar que o tratamento baseado na utilização de solução 0,1% de estreptomicina com  $\text{HgCl}_2$

na proporção 1:1000 (método 6), foi aquele que apresentou menor contaminação de microrganismos quando avaliado em meio batata tanto para sementes com e sem casca (Tabela 1). Além disso, este tratamento afetou menos o processo de germinação das sementes (Tabela 1). Por outro lado, a avaliação de sementes esterilizadas e inoculadas inteiras nos meios semi-sólidos JNFb e NFb, mostrou que outros tratamentos utilizados também foram eficientes na eliminação dos microrganismos diazotróficos das sementes, uma vez que não houve formação de película característica de bactérias diazotróficas nos meios utilizados. Entretanto, quando as sementes esterilizadas sem a casca foram amassadas e inoculadas em meio NFb ou JNFb semi-sólido, ocorreu a formação de película na maioria dos tratamentos, exceção feita aos tratamentos 5, 6 e 7, onde verificou-se uma porcentagem bastante baixa (10%) na formação de película (Tabela 1). Isto confirma resultados anteriores de que as sementes são sítios de colonização e disseminação de bactérias diazotróficas. Os resultados mostraram também que a casca das sementes de arroz é responsável pela maioria das contaminações observadas já que as fendas presentes no tegumento permitem o alojamento de microrganismos (Tabela 1 e foto1) e que somente os tratamentos drásticos de esterilização são capazes de diminuir ou mesmo eliminar o crescimento desses microrganismos (foto 2 e 3). Os tratamentos considerados menos

**Nº15, Jun./97, p.6/9**

**Comunicado Técnico**

drásticos, além de não eliminarem os microrganismos presentes nas sementes de arroz afetaram também a germinação das mesmas (Tabela 1). Desse modo qualquer tipo de estudo a ser realizado visando o uso de sementes livres de microrganismos requer

testes preliminares para definir o melhor método a ser utilizado. É necessário uma condição que consiga reduzir ao máximo o crescimento de microrganismos, mas que não prejudique a germinação das sementes. A permanência de alguns microrganismos nas sementes mesmo após o processo de esterilização podem ser identificadas e as sementes eliminadas através da pré-germinação das mesmas em meio rico. Alguns métodos descritos na literatura foram adaptados e permitiram a obtenção de sementes livres de microrganismos. Por exemplo, a esterilização das sementes de trigo com hipoclorito acidificado eliminou os microrganismos das sementes e possibilitou os estudos da colonização das raízes de trigo por *Azospirillum* spp. (Pinheiro, 1992). Já a esterilização térmica foi eficiente na eliminação de microrganismos fitopatogênicos das sementes de pimentão (Kimura, comunicação pessoal) porém, pode favorecer o crescimento de fungos fitopatogênicos em espécies florestais (Dunnewald, 1934).

Atualmente a utilização de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) por 2 a 3 minutos, precedido de 30 segundos em álcool etílico (92,8 GL) é um método rotineiro e eficiente, utilizado no CNPAB para a esterilização de sementes de leguminosas florestais (Franco, A.A., comunicação pessoal). Baseado nos resultados podemos sugerir a utilização dos métodos 6 e 7 para estudos de colonização, infecção e seleção de

**Nº15, Jun./97, p.7/9**

**Comunicado Técnico**

estirpes de bactérias diazotróficas em cultivos monoxênicos de arroz, uma vez que as sementes são utilizadas sem a casca. Para estudos onde são necessários o uso de sementes de arroz pré-germinadas com a casca, sugere-se o método 6 por ser menos tóxico ao manuseio e preservar o meio ambiente, já que o mercúrio, por ser um metal

pesado, pode acumular no organismo humano se utilizado constantemente ao longo dos anos.

**Tabela 1-** Avaliação de diferentes métodos de esterilização de sementes de arroz.

TRATAMENTOS	% germinação/contaminação das sementes <sup>1</sup>		% contaminação <sup>1</sup>	% Presença de bactérias diazotróficas <sup>2</sup>	
	com casca	sem casca	apenas a casca	sementes	
				amassadas	inteiras
Controle	70 / 100	80 / 100	100	100	100
1- Flambada	60 / 100	70 / 100	100	100	100
2- Aquecimento a 55°C/1h.	20 / 100	40 / 60	100	90	90
2.1- 55°C/1h. +70°C/6 min.	30 / 100	50 / 50	100	90	90
2.2- 2.1 + 75°C/4 min.	30 / 100	50 / 50	100	40	10
2.3- 2.2 + 80°C/3 min.	20 / 100	50 / 30	100	100	<10
3- HgCl <sub>2</sub> 1:500	80 / 10	90 / 10	20	90	<10
4- Álcool etílico (92,8° GL)	60 / 80	60 / 50	100	100	10
5- Série alcóolica	80 / 40	100 / 20	100	10	10
6- 0,1%str + HgCl <sub>2</sub> 1.1000	100 / 20	100 / 10	10	10	<10
7- Hipoclorito acidificado	100 / 80	100 / 10	60	10	<10
8- Hipoclorito de cálcio comercial a 10%	40 / 80	60 / 40	80	20	<10

1- Avaliado em meio batata sólido (média de 20 repetições).

Nº15, Jun./97, p.8/9

Comunicado Técnico

2- Porcentagem da formação de película característica dos microrganismos diazotróficos nos meios NFb e JNFb semi-sólido, quando inoculados com sementes amassadas ou não, diretamente nos frascos (média de 10 repetições).

## REFERÊNCIAS

BALDANI, V.L.D. Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização

**parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** Seropédiaca: UFRRJ, 1996. 290p.  
Tese Doutorado.

BALDANI, V.L.D.; JAMES, E.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Localization of the N<sub>2</sub>-fixing bacterium *Herbaspirillum seropedicae* within root cells of rice. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 64, p.431, 1992

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas.** Brasília: EMBRAPA:SPI, Itaguaí: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60p.

DUNNEWALD, T.J. Soil factors in failure of lodge pole pine plantings. **Journal of American Society of Agronomy**, v.26, n.7, p.586-591, 1934.

PINHEIRO, R.O. **Investigação da adesão de *Azospirillum* spp. às raízes de trigo.** Seropédica: UFRRJ, 1992. 110p. Tese Mestrado.

#### **Agradecimentos:**

Os autores agradecem ao Geraldo Baeta da Cruz e a Cristhiane O. da Graça pela ajuda nos testes realizados.



**Foto 1:** Fotomicrografia de semente de arroz com casca lavada e sem esterilização.

**Foto 2:** Fotomicrografia de semente de arroz com casca após a esterilização.

**Foto 3:** Fotomicrografia de semente de arroz sem casca e esterilizada em solução de estreptomicina e HgCl<sub>2</sub>.

