

Avaliação de estirpes de *Bradyrhizobium*, inoculantes microbianos e métodos de inoculação, em diferentes regiões do Brasil (06.04.01.340.01)

Rubens J. Campo; Mariangela Hungria; Leny M. Miura; José Z. Moraes;
Rubson N. R. Sibaldelle; Miguel Pereira de Souza; Maria Cristina Neves de Oliveira

A recomendação atual de estirpes para os inoculantes de soja consiste em se utilizar duas das quatro estirpes, atualmente recomendadas: SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 5080. Sabe-se que, aumentando o número de células de uma estirpe na semente se aumenta a competição com a naturalizada, favorecendo a nodulação primária com a bactéria introduzida. Presume-se, então, que o uso de uma estirpe nos inoculantes, ao invés de duas, aumentará a eficiência do processo de FBN e o rendimento da soja. As quatro recomendadas foram testadas isoladamente e também comparadas com as combinações SEMIA 587 + SEMIA 5019, SEMIA 5079

+ SEMIA 5080 + SEMIA 587 + SEMIA 5080 e os tratamentos testemunhas sem inoculação e aplicação de 200 kg de N/ha. O trabalho foi repetido por vários anos em solos com população estabelecida, sendo quatro anos em Londrina e três anos em Ponta Grossa, e em solos sem população estabelecida de *Bradyrhizobium* de Jaciara e Lucas do Rio Verde, MT e dois anos em Taciba, SP. Na Tabela 1, são apresentados os resultados médios de sete experimentos, sendo quatro de Londrina e três de Ponta Grossa. Os resultados indicam dentre as estirpes inoculadas de forma individual, que a estirpe SEMIA 587 apresentou melhor desempenho que as demais, inclusive sendo superior às combinações de estirpes em que ela participa como SEMIA 587 + SEMIA 5019 e SEMIA 587 + SEMIA 5080, mostrando que os inoculantes para soja podem ser formulados com apenas uma estirpe (Tabela 2). De modo similar, em solo sem população estabelecida,

Tabela 1. Efeito da reinoculação da soja com estirpes de *Bradyrhizobium* na nodulação, N nos grãos, N totais nos grãos e rendimentos de grãos. Experimentos conduzidos em solos com população estabelecida de *Bradyrhizobium* em Londrina e Ponta Grossa, PR, safras 2000/01 a 2003/04. Médias de sete experimentos. Embrapa Soja, 2005.

Tratamentos	Nº N PI	MSN Mg.pl ⁻¹	N grãos Mg.g ⁻¹	N grãos kg.ha ⁻¹	Rend ³ kg.ha ⁻¹
1- Test. sem Inoculação	13,2c	26,9a	59,7d	179b	3016
2- 200 kg N/ha ²	8,5d	10,1b	59,9d	183ab	3071
3- Semia 587	14,4abc	29,2a	61,2a	189a	3094
4- Semia 5019	14,8ab	30,1a	60,4bcd	182ab	3016
5- Semia 5079	14,7ab	29,8a	60,9ab	185ab	3044
6- Semia 5080	14,9ab	30,8a	61,2a	180b	2955
7- Semia 587 + 5019	15,2a	30,2a	60,7abc	187ab	3081
8- Semia 5079 + 5080	13,8abc	28,4a	60,1cd	183ab	3062
9- Semia 587 + 5080	13,6bc	26,9a	60,2bcd	180b	3004
CV (%)	8,3	11,1	1,0	3,4	3,5ns

¹ N aplicado, sendo 50% na semente e 50% 35 após a emergência, fonte uréia;

² médias seguidas de mesma letra, na coluna, indicam que os tratamentos não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo método de Duncan;

³ rendimentos corrigidos para 13% de umidade.

Tabela 2. Efeito da inoculação da soja com estripes de *Bradyrhizobium* na nodulação, N nos grãos, N totais nos grãos e rendimentos de grãos. Experimentos conduzidos em solos sem população estabelecida de *Bradyrhizobium* em Lucas de Rio Verde e Jaciara, MT, safra 2001/02 e Taciba, SP, safras 2002/03 e 2003/04. Médias dos quatro anos. Embrapa Soja, 2005.

Tratamentos	Nº N pl. ⁻¹	MSN mg.pl ⁻¹	N grãos mg.g ⁻¹	N grãos kg.ha ⁻¹	Rend ³ kg.ha ⁻¹
1- Test. sem Inoculação	6,3d	38,2d	60,6d	125	2061
2- 200 kg N/ha ²	5,1d	26,2d	61,6bcd	127	2101
3- Semia 587	23,9a	100,8a	61,9ab	130	2123
4- Semia 5019	22,1a	95,0a	61,4bcd	127	2093
5- Semia 5079	16,0c	54,2c	62,7a	125	2016
6- Semia 5080	14,0c	66,9c	61,8ab	131	2143
7- Semia 587 + 5019	19,0b	81,3b	61,6bcd	123	2011
8- Semia 5079 + 5080	14,3c	60,9c	61,7abc	132	2133
9- Semia 587 + 5080	21,4ab	90,8ab	60,7cd	126	2088
CV(%)	13,5	15,6	1,3	8,0ns	7,4ns

¹ N aplicado, sendo 50% na semente e 50% 35 após a emergência, fonte uréia;

² médias seguidas de mesma letra, na coluna, indicam que os tratamentos não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo método de Duncan;

³ rendimentos corrigidos para 13% de umidade.

os resultados mostram melhor a superioridade da estirpe SEMIA 587, em relação às demais às combinações testadas.

Anualmente, diversos inoculantes coletados no comércio vêm sendo acompanhados quanto à sua qualidade. Nesta safra, tomou-se o cuidado de coletar inoculantes em estabelecimentos comerciais em diversas regiões do País. Os inoculantes (Tabela 3) foram avaliados em estudos de laboratório e casa-de-vegetação, de acordo com metodologia estabelecida pela RELARE. Em condições de laboratório, foram avaliadas as populações de células em meio ágar manitol (AM) e meio seletivo (MS), e a ocorrência de contaminantes em meios BDA e Agar nutritivo (NA). Em casa-de-vegetação, as populações de células foram testadas por método de diluição em plantas (NMP). À exceção do inoculante Biomax líquido e do Microxisto líquido e turfoso, todos os testados (Tabela 3) apresentaram populações

Tabela 3. Número de células de *Bradyrhizobium* por g ou ml de inoculante obtidos em meios de cultura ágar manitol, meio seletivo e em plantas e número de contaminantes em BDA e ágar nutritivo de inoculantes coletados em estabelecimentos comerciais, safra de soja 2004/05. Embrapa Soja, 2005.

Inoculantes/lotos	Ágar manitol	Meio seletivo	NMP em planta	Nº contam.
Adhere 50 – T	$2,14 \times 10^9$	0,0	$6,80 \times 10^8$	$3,33 \times 10^8$
Biagro – T Lo 08/04	$5,79 \times 10^9$	$6,57 \times 10^9$	$1,73 \times 10^9$	0,0
Biomax – L Lo 038/04	0,0	0,0	NR	$2,22 \times 10^9$
Biomax – T	$1,11 \times 10^9$	$1,33 \times 10^9$	NR	0,0
Cell Tech L Lo 33/04	$3,13 \times 10^9$	$2,04 \times 10^9$	$2,78 \times 10^8$	$1,85 \times 10^9$
Optimize – L	$4,44 \times 10^9$	$7,23 \times 10^9$	$2,40 \times 10^9$	$3,17 \times 10^6$
Masterfix – T Lo 497	$2,97 \times 10^9$	$3,06 \times 10^9$	$2,39 \times 10^8$	$2,78 \times 10^9$
Masterfix – L Lo 402	0,0	0,0	0,0	$1,85 \times 10^7$
Microxisto L Lo 666	$1,09 \times 10^9$	$1,09 \times 10^9$	$6,80 \times 10^8$	$6,94 \times 10^8$
Microxisto T Lo 1177	$2,38 \times 10^8$	$1,67 \times 10^8$	$6,80 \times 10^7$	$4,63 \times 10^6$
Nitrosoil L Lo 02/04	$2,47 \times 10^9$	$1,52 \times 10^9$	$4,30 \times 10^8$	$1,30 \times 10^8$
Nitrosoil T Lo 03/04	$2,60 \times 10^9$	0,0	$9,30 \times 10^8$	$1,18 \times 10^8$
Nodu Soja L	$2,51 \times 10^{10}$	$2,97 \times 10^{10}$	$2,13 \times 10^{10}$	$1,85 \times 10^7$
Rhizomax L Lo 035	$1,81 \times 10^9$	$2,23 \times 10^9$	$2,80 \times 10^8$	0,0
Rizoliq – L Lo 01/04	$1,24 \times 10^9$	$5,56 \times 10^8$	$1,70 \times 10^8$	0,0

Onde: L (líquido); T (turfa); Lo (lote) e NR (não realizado)

de células no meio AM superior ao mínimo, 1×10^9 células por ml ou g de produto. A exceção dos inoculantes Biagro, Biomax Turfos, Rhizomax e Rizoliq, todos os outros apresentaram número de contaminantes superior ao mínimo legal. De modo geral, ao longo desses quatro anos, mais de 60 amostras de inoculantes foram coletadas no comércio e ou recebidos de empresas e foram analisados e, de modo geral, com raras exceções, todos melhoram de qualidade.

Nos dois anos anteriores, 21 testes de eficiência agrônômica foram realizados, na safra 2003/2004, dois inoculantes líquidos, Rhizomax e Gelfix, duas tecnologias de inoculação antecipada, com os inoculantes Biagro e Cell Tech e três produtos fatores de crescimento e nodulação. Os trabalhos

realizados em Londrina, solo com população estabelecida, Taciba solos de 1º e 2º anos de cultivo de soja. De modo geral, tem-se verificado que esses fatores de crescimento, inoculantes e técnicas de inoculação antecipadas de semente são iguais aos padrões nos solos de população estabelecida, mas nos solos de primeiro ano de cultivo, a nodulação e o rendimento do inoculante padrão foram superiores aos inoculantes testes.

Para avaliação do terceiro objetivo do projeto, dois tipos de estudos foram realizados. O primeiro consistiu de se comparar o método atual de inoculação, aplicação de inoculante turfoso na dose de 300 000 células/semente, com a aplicação de diversas populações de células de *Bradyrhizobium*. Dentro de determinados limites, aumentando-se o número de células na semente pela inoculação aumenta-se a nodulação e, por conseqüência, a fixação biológica do nitrogênio. Crescentes números de células foram aplicados às sementes de soja em comparação com as testemunhas sem inoculação. Os experimentos foram instalados em solos sem população estabelecida de Luisiana, Cristalina, Jaciara, Lucas do Rio Verde, Taciba safra 2002/03 e Taciba safra 2003/04 (Fig. 1 e Fig. 2) e em solos de população estabelecida de Londrina e Taciba safras 2002/03 e 2003/04 (Fig. 3 e Fig. 4). De modo geral, esses resultados confirmam os resultados das safras anteriores demonstrando que são necessários no mínimo 600 000 células/semente para obtenção de altas taxas de FBN, embora o ideal seja aplicar 1200 000 células/semente, indicando que a recomendação técnica de 300 000 células/semente necessita ser alterada. O outro estudo consistiu da comparação do método de inoculação atual, aplicação de inoculante turfoso na semente com e sem fungicidas e micronutrientes com a aplicação de doses de inoculante líquido no sulco de semeadura. O inoculante à base de turfa moída e neutralizada, pela sua qualidade do suporte aliado ao seu custo, tornou-se o método tradicional de inoculação das sementes de leguminosas em todo o mundo. Entretanto, fatores como as dificuldades do uso de inoculante turfoso com semeadoras para semeadura direta, necessidade de esterilização de turfas para obtenção de inoculantes com maiores populações, demandas de inoculantes de melhor qualidade e em maiores quantidades para atender à expansão da cultura da soja para áreas degradadas ou, até mesmo para atender à necessidade de aplicação de fungicidas, inseticidas e micronutrientes na semente da

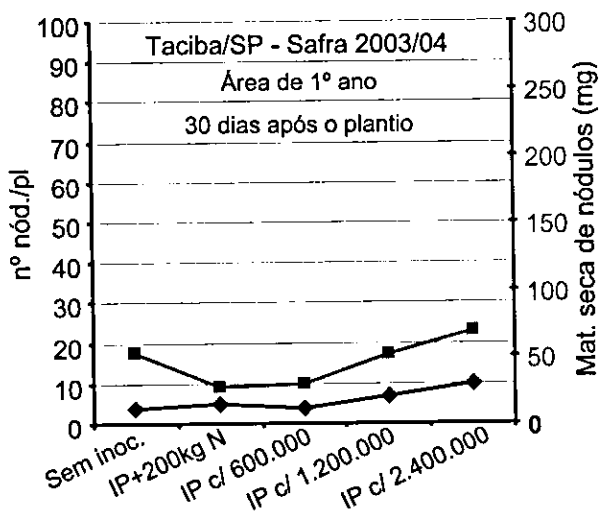


Figura 1. Número e massa de nódulos secos por planta obtidos aos 30 dias após emergência, em função da variação do número de células aplicados à semente, em solo sem população estabelecida de Taciba, SP, safra 2003/04.

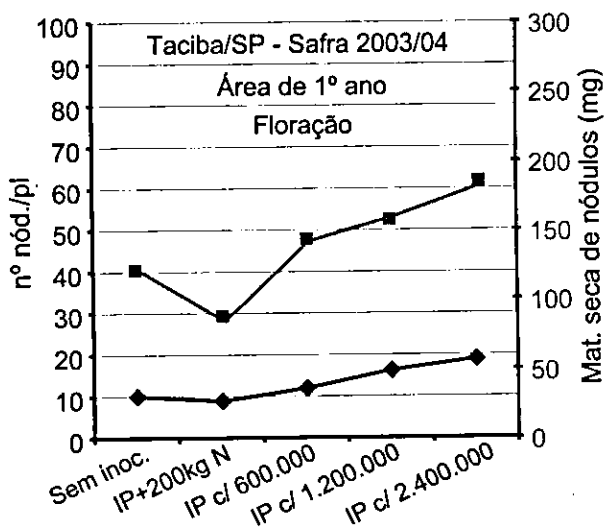


Figura 2. Número e massa de nódulos secos por planta obtidos na floração, em função da variação do número de células aplicados à semente, em solo sem população estabelecida de Taciba, SP, safra 2003/04.

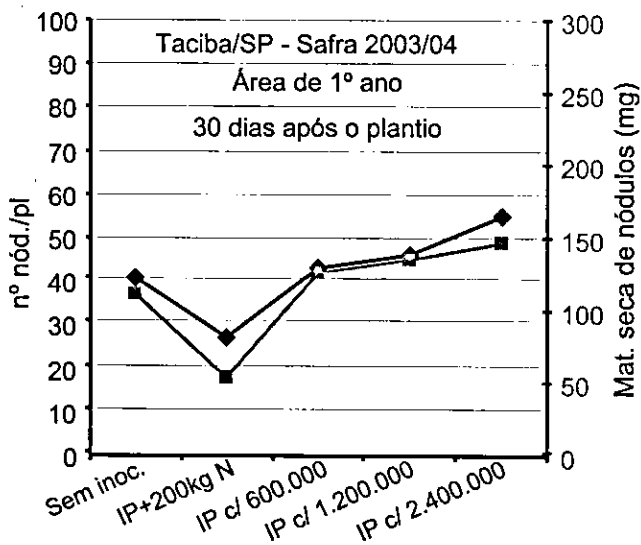


Figura 3. Número e massa de nódulos secos por planta obtidos aos 30 dias após emergência, em função da variação do número de células aplicadas à semente, em solo com população estabelecida de Taciba, SP, safra 2003/04.

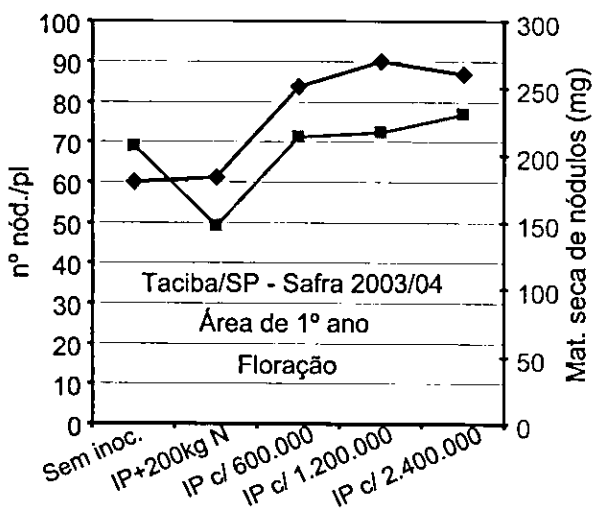


Figura 4. Número e massa de nódulos secos por planta obtidos na floração, em função da variação do número de células aplicadas à semente, em solo com população estabelecida de Taciba, SP, safra 2003/04.

soja junto com a inoculação, levaram a estudos de obtenção de outros inoculantes ou métodos de inoculação mais eficazes. As primeiras técnicas testadas foram para melhor aderir os inoculantes na semente. Diversas substâncias foram testadas e dentre elas a água açucarada a 10-15%, na dose de 300 ml/50 kg de semente, foi indicada pela pesquisa e é utilizada em larga escala pelos produtores. A partir de 2000, um novo inoculante em base líquida demonstrou eficiência agrônômica similar aos inoculantes turfosos e passou a ser utilizado em larga escala pelos agricultores. A partir daí, outros inoculantes líquidos em base aquosa surgiram no mercado e, atualmente, representam quase 50% dos inoculantes comercializados no Brasil. O método atual de inoculação da soja consiste na aplicação de inoculantes, líquido ou turfoso, diretamente sobre a semente. Na maioria das vezes, os produtores de soja aplicam esses inoculantes junto com fungicidas, inseticidas e os micronutrientes Co e Mo. Isso tem causado redução da sobrevivência da bactéria na semente e, por conseqüência, no número de células inoculadas, no desenvolvimento de nódulos na coroa do sistema radicular da soja, na eficiência da fixação biológica do nitrogênio (FBN), no fornecimento de N para a soja e nos rendimentos de grãos. Alternativamente, diversos estudos foram realizados nos últimos anos com o objetivo de comparar o método tradicional de inoculação, na presença e na ausência de fungicidas e micronutrientes, com a aplicação de inoculante líquido em pulverização no sulco de semeadura. Os experimentos foram realizados em solos de primeiro ano de cultivo com soja e em solos com população estabelecida. Todas as técnicas de cultivo da soja empregadas como preparo do solo, calagem, adubação, controle de plantas daninhas, insetos e doenças, bem como, inoculantes, fungicidas e micronutrientes utilizados na semente seguiram rigorosamente as recomendações técnicas para a cultura da soja.

Os resultados obtidos nas safras 2000/01, 2001/02, 2002/2003 e 2003/04 mostraram que, em ambos os solos, com e sem população estabelecida, é possível substituir a aplicação de inoculantes na semente pela aplicação no sulco de semeadura da soja, no entanto são necessárias aplicações de doses de inoculantes de, aproximadamente, seis vezes a dose da semente. Como conclusão, pode-se dizer que a eficiência da nodulação, da FBN e da obtenção de altos rendimentos é muito mais dependente do número de

células aplicado do que o método de inoculação utilizado. Os resultados obtidos pelo subprojeto na última safra permitiram a recomendação de duas novas tecnologias para os agricultores: alterar a recomendação de duas estirpes nos inoculantes para apenas uma estirpe; e indicar como a melhor estirpe a SEMIA 587, para compor os inoculantes.

O acompanhamento da qualidade dos inoculantes comerciais para a soja e os testes de eficiência agrônômica de novos produtos, ao longo dos quatro anos, permitiram a obtenção de uma melhoria substancial na qualidade dos inoculantes bem como na recomendação de dois inoculantes líquidos, Cell Tech e Urulec, que tinham restrição de uso pelos agricultores. Ficou demonstrado ainda que a recomendação de inoculação de 300 000 células/semente não era suficiente para obtenção de máxima nodulação e taxas de FBN o que levou a recomendação para 600 000 células, embora o ideal seja de 1,2 milhão.

Devido ao efeito negativo da aplicação de fungicidas e micronutrientes na semente, na presença da bactéria, nova tecnologia de aplicação de inoculante no sulco de semeadura foi avaliada e demonstrou ser igual à aplicação na semente desde que se utilize seis vezes a dose utilizada na semente. Os resultados permitiram demonstrar que a inoculação da semente pode ser substituída pela aplicação no sulco, tanto em solos com população estabelecida quanto em solos de primeiro ano de cultivo de soja. Essa tecnologia possui a vantagem de reduzir os efeitos tóxicos dos fungicidas quando aplicados na semente. Essa nova tecnologia de inoculação foi recomendada e já está sendo utilizada pelos produtores de soja, especialmente pelos que precisam aplicar fungicidas nas sementes.

A recomendação atual de inoculação da soja pode ser alterada de duas estirpes ns inoculantes para apenas uma estirpe. A estirpe que se destacou em solos de primeiro cultivo de soja e em solos de população estabelecida foi a SEMIA 587. Isso irá reduzir os custos de produção dos inoculantes, aumentar a capacidade industrial e reduzir o índice de contaminação dos inoculantes além de proporcionar maior competição da estirpe introduzida com a naturalizada no solo, aumentando os ganhos de rendimento da soja que podem chegar a 8,0%.