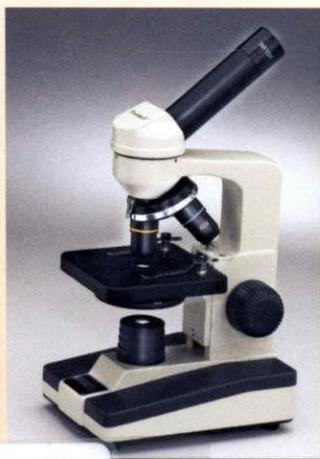


Anais da XIII Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE)



.01461

Anais...

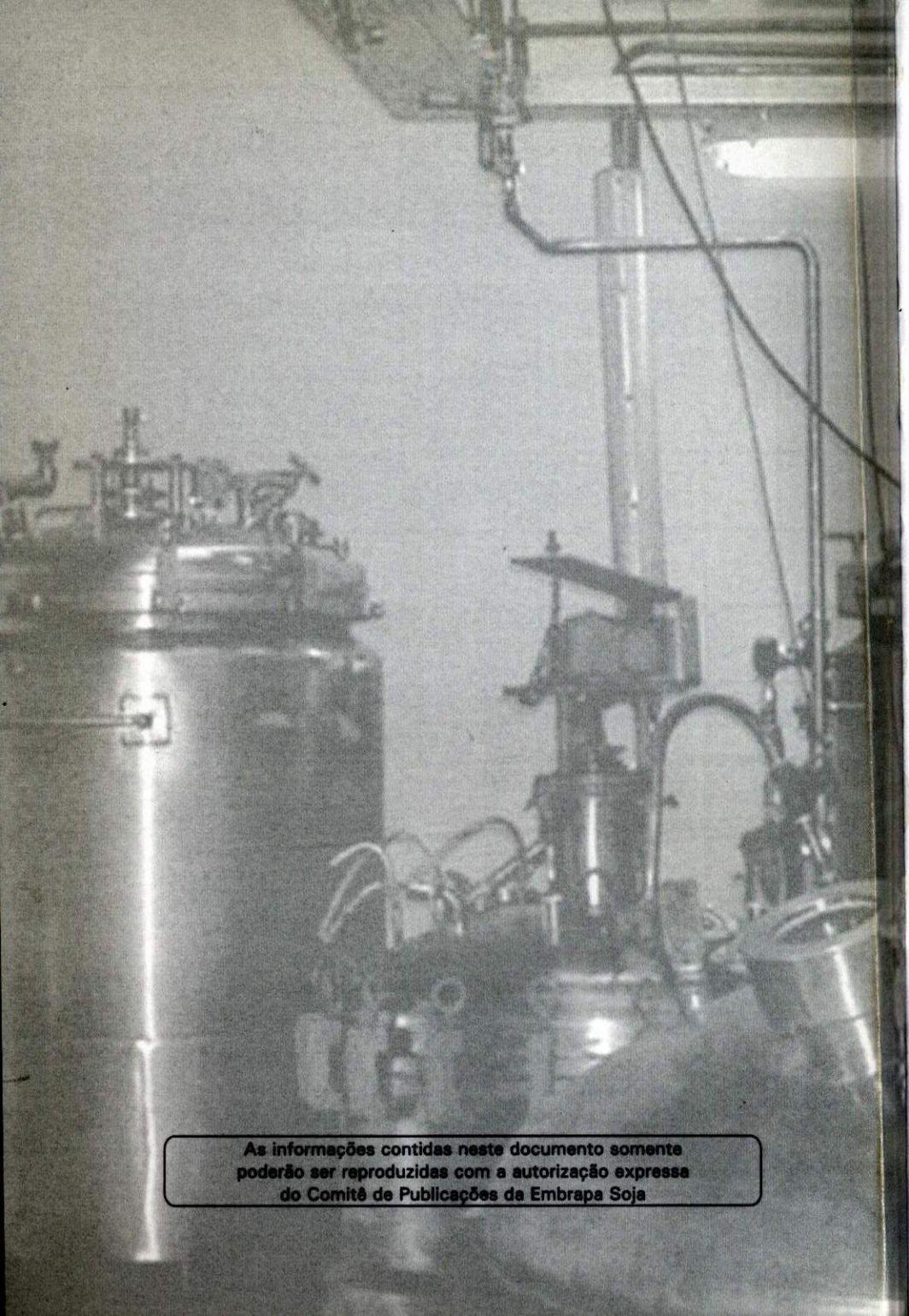
2007

PC-2007.01461



40849-1

rapa



As informações contidas neste documento somente poderão ser reproduzidas com a autorização expressa do Comitê de Publicações da Embrapa Soja

ISSN 1516-781X

Agosto, 2007

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Soja
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Documentos 290

Anais da XIII Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE)

Organizado por:

Rubens José Campo

Mariângela Hungria

Embrapa Soja
Londrina, PR
2007

Unidade:	<i>Ag-Sole</i>
Valor aquisição:	
Data aquisição:	
N.º N. Fiscal/Fatura:	
Fornecedor:	
N.º OCS:	<i>Dacros</i>
Orgem:	<i>Dacros</i>
N.º Registro:	<i>0141107</i>

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Soja

Rodovia Carlos João Strass - Acesso Orlando Amaral

Caixa Postal 231 - 86001-970 - Londrina, PR

Fone: (43) 3371-6000 - Fax: 3371-6100

www.cnpso.embrapa.br

sac@cnpso.embrapa.br

Comitê de Publicações da Embrapa Soja

- Presidente: *Alexandre José Cattelan*
 Secretária executiva: *Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite*
 Membros: *Antonio Ricardo Panizzi*
Claudine Dinaili Santos Seixas
Francismar Corrêa Marcelino
Ivan Carlos Corso
José Miguel Silveira
Maria Cristina Neves de Oliveira
Rafael Moreira Soares
Ricardo Vilela Abdelnoor

- Coordenador de editoração: *Odilon Ferreira Saraiva*
 Bibliotecário: *Ademir Benedito Alves de Lima*
 Editoração eletrônica: *Neide Makiko Furukawa*
 Capa: *Danilo Estevão*
 Foto da capa: *Cedida pela empresa L.B. do Brasil Ltda.*

1ª edição
1ª impressão (2007): tiragem 500 exemplares

Todos os direitos reservados.
 A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Soja

Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE) (13. : 2006: Londrina, PR)
 Anais da XIII Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE). / - Londrina: Embrapa Soja, 2007.
 212p. - (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 1516-781X; n. 290)

Organizado por Rubens José Campo, Mariângela Hungria.

1.Fixação de nitrogênio. I.Título. II.Série.

CDD 572.545

Comissão Organizadora da XIII RELARE

Presidente

Rubens José Campo

Secretário

Arnaldo Collozi Filho

Membros

Mariângela Hungria
Suzete Regina França Prado

Apresentação

Em 1985, por iniciativa do professor e pesquisador Dr. João Rui Jardim Freire, foi realizada, em Curitiba, PR, a primeira reunião entre pesquisadores da área de Fixação Biológica de Nitrogênio e representantes da indústria de inoculantes para discutir as recomendações de estirpes para leguminosas. A partir dessa época ocorreram encontros sucessivos até que, em junho de 1998, por ocasião do VII encontro em Londrina, PR, por solicitação do MAPA, esses encontros passaram a ser oficiais. Nesse mesmo encontro, aprovou-se o Estatuto Social e a denominação do encontro passou a ser chamada **RELARE – REDE DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO, PADRONIZAÇÃO E DIFUSÃO DE TECNOLOGIA DE INOCULANTES MICROBIOLÓGICOS DE INTERESSE AGRÍCOLA**.

A partir de então ocorreram avanços tecnológicos substanciais nas RELARES seguintes com aprovações de protocolos para a validação de produtos à base de diversos outros microrganismos e de estirpes para diversas leguminosas.

Chegamos, em 2006, com a realização da XIII RELARE. Por iniciativa da comissão organizadora da reunião apresentamos esse documento com a finalidade de englobar, documentar e divulgar todos os protocolos aprovados até então, o estatuto social da RELARE com suas modificações e as atas da XIII RELARE, para facilitar o acesso da pesquisa, da indústria e dos importadores de inoculante para que os avanços tecnológicos nessa área sejam, ainda, maiores.

Alexandre José Cattelan

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento
Embrapa Soja

Sumário

Estatuto social	11
Preâmbulo	11
Trabalhos apresentados na XIII RELARE.....	19
• Validação dos parâmetros do protocolo da RELARE recomendados para a avaliação da eficiência agrônômica com a cultura da soja	20
• Controle de qualidade dos produtos inoculantes executado no ano de 2005	21
• Qualidade dos inoculantes líquidos para soja comercializados no Brasil	22
• Eficiência agrônômica do inoculante Biagro em pré-inoculação da soja.....	23
• CPAC 15 ou CPAC 7? Eis a questão!.....	24
• SEMIA 5080 (CPAC-7) e SEMIA 5079 (CPAC-15): retrospectiva dos experimentos conduzidos na Embrapa Cerrados. Parte I: Olhando para o passado e para o futuro	25
• SEMIA 5080 (CPAC-7) e SEMIA 5079 (CPAC-15): retrospectiva dos experimentos conduzidos na Embrapa Cerrados. Parte II: Fixar N eficientemente é preciso mas, competir pelos sítios de infecção, também é.....	27
• Eficiência da fixação biológica de nitrogênio pela inoculação de estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> em soja, no estado de Mato Grosso do Sul	29
• Avaliação da fixação biológica de nitrogênio (FBN) na cultura da soja no cerrado de Roraima.....	30
• Avaliação de estirpes ou combinações de estirpes de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>B. elkanii</i> para a soja	32
• Isolamento, seleção, caracterização e identificação de estirpes eficientes para inoculação em feijão comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	33
• Eficiência simbiótica de isolados de rizóbio em feijoeiro na presença de exsudatos de sementes de <i>Mimosa flocculosa</i> e/ou N-mineral.....	34
• Seleção de estirpes de rizóbio para inoculação em feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	36
• Eficiência agrônômica de estirpes de rizóbio em feijão-caupi	37

• Isolamento, seleção, caracterização e identificação de estirpes eficientes para inoculação em caupi, recomendadas pela XII RELARE (INPA3-11B e UFLA 3-84) e referendadas na IN10 de 21/3/2006	38
• Estudos da eficiência de estirpes de rizóbio para ervilha em condições de campo	40
• Isolamento e seleção de rizóbios para trevo branco em condições de áreas de várzea	41
• Identificação e recomendação de bactérias eficientes na fixação de nitrogênio para leguminosas florestais	42
• Metodologias de caracterização para o monitoramento das estirpes liofilizadas semia, recomendadas na produção de inoculantes	43
• Utilização de formulações à base de biopolímeros como suporte para inoculantes de leguminosas	44
• Nutrição nitrogenada da soja: contribuição da fixação biológica do N ₂ e do fertilizante nitrogenado para o rendimento de grãos	45
• Metodologia de contagem de <i>Bradyrhizobium</i> em semente inoculada e/ou tratada com fungicidas e micronutrientes	46
• Volume de calda com diferentes produtos para o tratamento de semente de soja e seu efeito sobre a qualidade fisiológica	48
• Tres factores que afectan la calidad de la inoculación	49
• Recuperação de células de <i>Bradyrhizobium</i> em semente de soja inoculada, armazenada e tratada com fungicidas e micronutrientes.....	51
• Taxonomia das estirpes de rizóbios recomendadas para o uso em inoculantes comerciais no Brasil.....	53
• Estudos da variabilidade genética entre estirpes de rizóbio para ervilha e lentilha por meio de RFLP	54
• Especificidade hospedeira entre estirpes de rizóbio e variedades de ervilha	55
• Resposta da soja à reinoculação em solos com população estabelecida de <i>Bradyrhizobium</i> , em Guarapuava (PR) e Cruz Alta (RS)	56
• Uso de inoculante comercial à base de <i>Azospirillum brasilense</i> (NOCTIN AZO) como promotor de crescimento em gramíneas	57
• Dupla inoculação em sementes de soja com inoculante comercial à base de <i>Azospirillum brasilense</i> (NOCTIN AZO) e inoculante comercial à base de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (NOCTIN A).....	59

Composição da Diretoria da RELARE	60
Ata da XIII reunião da rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbianos de interesse agrícola (RELARE).....	61
Ata da XIII RELARE	84
Protocolo para análise da qualidade e da eficiência agronômica de inoculantes, estirpes e outras tecnologias relacionados ao processo de fixação biológica do nitrogênio em leguminosas	89
Protocolo para a análise da qualidade e da eficiência agronômica de inoculantes, estirpes e outras tecnologias relacionadas ao processo de fixação biológica do nitrogênio em plantas não leguminosas	124
Protocolo para análise da qualidade e da eficiência agronômica de inoculantes de cianobactérias para arroz irrigado.....	143
Protocolo para análise da qualidade e da eficiência agronômica de inoculantes, estirpes e outras tecnologias relacionadas a bactérias promotoras do crescimento vegetal.....	154
Anexos	174
Protocolo para análise da qualidade e da eficiência agronômica de inoculantes contendo fungos micorrízicos arbusculares.....	182
Empresas produtoras e/ou comercializados de inoculantes instaladas no Brasil (ordem alfabética) que contribuíram financeiramente para a realização da XIII REALARE realizada em, Londrina, PR, nos dias 02 e 03 de junho de 2006	211

Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão da Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola - RELARE

Estatuto social

PREÂMBULO

A então denominada "Rede de Laboratórios Recomendadores de Estirpes de Rhizobium", foi criada por iniciativa do Centro de Recursos Microbiológicos (MIRCEN) – Porto Alegre, RS em conjunção com o Eng. Agro. Solon Cordeiro Araujo, então da empresa NITRAL, produtora de inoculantes. A primeira reunião foi realizada em Curitiba, PR de 07 a 09 de maio de 1985, com a presença de:

João R. Jardim Freire – UFRGS/MIRCEN; Allert Rosa Suhet – EMBRAPA/CPAC; José Roberto R. Peres – EMBRAPA/CPAC; Edemar Brose – EMPASC; Márcio Voss – IAPAR; Eli Sidney Lopes – IAC/Campinas; Maria Josefa F. Sanches – INSTITUTO DE ZOOTECNIA/Nova Odessa; Avílio A. Franco – EMBRAPA/UAPNPBS; Ricardo S. Araujo – EMBRAPA/CNPAF, Rubens José Campo – Embrapa/CNPSo; Siu Mui Tsai Saito – CENA/USP; Maria Helena T. Pedroso – IPAGRO/MIRCEN; João Kolling – IPAGRO/MIRCEN; Solon Cordeiro de Araujo – NITRAL; Sonia Maria Sava – NITRAL; Marli Berwig – TURFAL; José Abrão/CEP/FECOTRIGO; Joseph Pan – AGROQUÍMICA PLANALTO; Roberto Castellaneta Peel – AGROQUÍMICA PLANALTO; João Vicente Badzinski – AGROQUÍMICA PLANALTO; Carlos Ilson de Mattos – LEIVAS LEITE; José Antonio Mazza Leite – LEIVAS LEITE; José Carlos Aranalde Olendzki – LEIVAS LEITE; Carlos Alberto Mantovani – BIOSOJA; Luiz Fernando S. Carvalho – DICOF/Ministério da Agricultura; Trajano Wilson M. Borges – DFA-RS/MA; Enio Rubens Scheffer – DFA-PR/MA e Carlos Mendes Gonçalves – DFA-PR/MA.

A principal razão de criação da RELARE foi a não existência de um mecanismo para a recomendação de estirpes. O Decreto nr. 75583, de 09 de abril de 1975 estabelecia:

“Artigo 23. Os inoculantes somente poderão ser registrados:

a) quando produzidos com estirpes recomendadas pelas instituições públicas de pesquisa”.

Após a primeira reunião, outras sete foram realizadas, sempre congregando pesquisadores, técnicos e representantes das indústrias de inoculantes.

Capítulo I

Da denominação e sede social

Art. 1º - Sob a denominação de REDE DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO, PADRONIZAÇÃO E DIFUSÃO DA TECNOLOGIA DE INOCULANTES MICROBIOLÓGICOS DE INTERESSE AGRÍCOLA - RELARE, fica instituída uma associação civil, sem fins lucrativos, criada pela Assembléia Geral realizada em 02 de junho de 1998, na cidade de Londrina, estado do Paraná, que se regerá pelo presente Estatuto e pelos dispositivos legais que lhe forem aplicáveis.

Parágrafo único - A sede social da entidade será à Rodovia Carlos João Strass, Acesso Orlando Amaral, Distrito de Warta, no Município de Londrina, PR.

Capítulo II

Do objetivo social

Art. 2º - A RELARE tem por objetivos:

- a) Apoiar e estimular o trabalho técnico, científico e industrial na área de inoculantes microbiológicos de interesse agrícola;
- b) Estabelecer as normas técnicas para recomendação de estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* ou outros microorganismos para produção de inoculantes;
- c) Recomendar ao Ministério da Agricultura as estirpes de *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e outros microorganismos para a produção de inoculantes,

- baseada em dados de pesquisa apresentados e aprovados em suas Assembléias;
- d) Propor, baseado em dados de pesquisa, as tecnologias de uso, produção e divulgação de inoculantes para leguminosas;
 - e) Propor e subsidiar, quando for o caso, a legislação e as normas de fiscalização dos inoculantes junto ao Ministério da Agricultura;
 - f) Congregar os pesquisadores e os produtores e/ou os estabelecimentos comerciais importadores de inoculantes, em torno de objetivos comuns.

Capítulo III Do quadro social

Art. 3º - São membros natos da RELARE os pesquisadores ou representantes das seguintes instituições ou empresas:

Centro de Pesquisa de Fixação Biológica do Nitrogênio - FEPAGRO; Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS; Centro de Recursos Microbiológicos - MIRCEN; Instituto Agrônômico do PR - IAPAR; Embrapa Soja; Embrapa Arroz e Feijão; Embrapa Agrobiologia; Embrapa Cerrados; Embrapa Trigo; FUNDACEP/FECOTRIGO; Distribuidora de Produtos Agropecuários Rizobacter Ltda; Instituto Agrônômico de Campinas - IAC; Instituto de Pesquisas Tecnológicas - IPT; USP - Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA); UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV); Ministério da Agricultura e do Abastecimento - MA; Indústria Biosoja de Inoculantes Ltda; Turfal-Indústria e Comércio de Produtos Biológicos e Agrônômicos Ltda; Nitral-Indústria e Comércio de Inoculantes e Produtos Agropecuários Ltda; Defesa S.A; BASF S/A; Campo Verde - Comércio e Importação e Exportação Ltda e Centro de Promoción de Negócios.

Parágrafo único - As empresas produtoras e/ou importadoras de inoculante, mesmo as membros natos, somente serão sócias da RELARE enquanto estiverem registradas no Ministério da Agricultura e do Abastecimento - MA como produtoras e/ou estabelecimentos comerciais importadores de inoculantes.

Art. 4º - Novas instituições ou empresas poderão ser admitidas como membros da RELARE, desde que a solicitação de filiação seja feita por escrito e submetida a aprovação da Assembléia Geral.

Parágrafo único: Só poderão ser admitidas como membros da RELARE, instituições que exerçam trabalhos de pesquisa, divulgação ou análise de inoculantes microbiológicos de interesse agrícola e empresas que estejam registradas no MA como produtoras, com unidade produtiva em território brasileiro e/ou estabelecimentos comerciais importadores de inoculantes.

Art. 5º - São direitos dos membros da RELARE:

- a) Participar das reuniões, tanto de Assembléia Geral como de Diretoria;
- b) Votar e ser votado para cargos da Diretoria;
- c) Apresentar propostas e sugestões tanto à Assembléia Geral como à Diretoria, visando a consecução dos objetivos da associação.

Parágrafo único: Só poderão votar e serem votados os membros da RELARE ou seu representante.

Art. 6º - São deveres dos membros da RELARE:

- a) Cumprir e fazer cumprir o presente Estatuto;
- b) Cumprir os compromissos assumidos na Assembléia Geral;
- c) Comparecer às reuniões de Assembléia Geral;
- d) Cumprir as decisões da Assembléia Geral.

Parágrafo único: Os membros da associação não respondem, solidariamente, pela dívida ou encargo contraídos pela Diretoria da associação.

Capítulo IV Da administração da RELARE

Art. 7º - A RELARE será administrada por uma Assembléia Geral e uma Diretoria, ambas regidas pelos artigos a seguir.

Art. 8º - A Assembléia Geral é o órgão máximo da associação e se reunirá

em caráter ordinário de dois em dois anos, sempre na segunda quinzena do mês de maio.

Art. 9º - A Assembléia Geral será composta por representantes, devidamente credenciados, de todos os membros da RELARE.

Parágrafo 1º - Cada membro da RELARE deverá credenciar um representante com direito a voto na Assembléia Geral. É facultada a participação de qualquer pessoa interessada na Assembléia Geral.

Parágrafo 2º - O voto será individual, por representante, e as decisões serão tomadas por metade mais um dos votos dos presentes na Assembléia Geral. Em caso de empate, o presidente da RELARE ou seu representante legal terá direito ao voto de desempate.

Parágrafo 3º - Assuntos técnico-científicos não serão submetidos à votação.

Art. 10 - A Assembléia Geral será presidida pelo Presidente da associação e secretariado por um sócio escolhido pelo presidente da assembléia.

Art. 11 - A Assembléia Geral será convocada pela Diretoria da RELARE, com antecedência mínima de sessenta dias da data de sua realização, por escrito, constando data, local e pauta da reunião.

Parágrafo único: Em caso de urgência ou em se tratando de assuntos relevantes, a Assembléia Geral poderá ser convocada extraordinariamente pela Diretoria ou por um terço de seus membros, com antecedência mínima de trinta dias de sua realização.

Art. 12 - A Assembléia Geral será aberta com a presença mínima de 50% mais um de seus membros em primeira convocação ou com qualquer número de seus membros em segunda convocação, meia hora após a primeira convocação.

Art. 13 - Cada Membro fará o credenciamento de seu representante por escrito.

Capítulo V

Da diretoria da RELARE

Art. 14 - A Diretoria da RELARE será composta por:

- Presidente
- Vice Presidente
- Secretário

Parágrafo único: A Diretoria poderá contratar Secretario(s) executivos, remunerados, para exercer os trabalhos administrativos. O Secretário Executivo terá Direito a participação nas reuniões de Diretoria e Assembléia Geral, com direito a voz mas não a voto.

Art. 15 - Os mandatos dos membros da Diretoria terão a duração de dois anos, contados entre o espaço de tempo de duas Assembléias Gerais Ordinárias consecutivas.

Parágrafo único: Os membros da Diretoria poderão ser reeleitos por, no máximo, um período sucessivo.

Art. 16 - São atribuições da Diretoria:

- a) Executar as deliberações da Assembléia Geral;
- b) Cumprir e fazer cumprir o presente Estatuto;
- c) Convocar a Assembléia Geral ordinária ou extraordinária, na forma do art. 11 deste Estatuto;
- d) Administrar os recursos da associação, dar conhecimento de suas atividades e fazer prestações a cada Assembléia Geral ordinária, para sua aprovação;
- e) Receber contribuições e doações;
- f) Tomar medidas para o bom funcionamento da entidade.

Art. 17 - São atribuições do Presidente:

- a) Representar a RELARE em juízo ou fora dele;
- b) Presidir as reuniões de Diretoria e da Assembléia Geral;
- c) Apresentar à Assembléia Geral relatórios das atividades da associação;
- d) Designar substituto aos membros da Diretoria até a próxima assembléia geral;

- e) Autorizar despesas e aplicação dos recursos da associação;
- f) Assinar cheques bancários.

Parágrafo 1º - Quando impossibilitado de comparecer a eventos para o qual a RELARE seja convidada, o Presidente poderá indicar outro representante, tendo preferência: O vice presidente, o secretário, ou outro membro.

Parágrafo 2º - O presidente da associação não poderá, simultaneamente, representar sua entidade perante a RELARE. O membro deverá indicar outra pessoa para representá-lo.

Art. 18 - Compete ao vice presidente assistir as reuniões da Diretoria e substituir o titular nos impedimentos legais.

Art. 19 - Compete ao Secretário:

- a) Redigir as atas da Assembléia Geral e das reuniões da Diretoria, encaminhando-as aos órgãos competentes, quando for o caso, e cópia delas aos associados;
- b) Zelar pelos registros legais da associação em todos os órgãos pertinentes;
- c) Manter arquivo de toda a documentação da entidade;
- d) Redigir e enviar as correspondências da RELARE.

Capítulo VI

Das disposições gerais e transitórias

Art. 20 - Quando estiverem em julgamento atos do presidente da Diretoria, a Assembléia Geral da associação será presidida por membro escolhido entre os presentes.

Art. 21 - Os cargos de Diretoria não serão remunerados, sendo considerados como relevantes serviços prestados.

Art. 22 - A RELARE poderá ser extinta por Assembléia Geral especificamente convocada para este fim, por deliberação de 2/3 de seus membros.

Art. 23 - Para atender a despesas administrativas ou de outra natureza, a Assembléia Geral poderá determinar a cobrança de taxas dos associa-

dos, estipulando seu valor, bem como receber contribuições, doações ou rendimentos de outras fontes, permanentes ou eventuais.

Art. 24 - O presente Estatuto poderá ser alterado a qualquer tempo, por deliberação da maioria dos sócios, em Assembléia Geral.

Art. 25 - Os casos omissos no presente Estatuto serão resolvidos pela Assembléia Geral.

Art. 26 - Este Estatuto entrará em vigor na data de sua aprovação.

Solon Cordeiro de Araujo
Presidente

Suzete Regina França do Prado
Secretária

Aprovado em 02 de Junho de 1998.
Londrina - PR

**Trabalhos apresentados na
XIII RELARE**

VALIDAÇÃO DOS PARÂMETROS DO PROTOCOLO DA RELARE RECOMENDADOS PARA A AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA AGRONÔMICA COM A CULTURA DA SOJA*

Hungria, M.^{1,2,3}; Souza, R.A.^{1,2}; Campo, R.J.¹; Franchini, J.C.¹; Chueire, L.M.O.^{1,4}; Barcellos, F.G.^{1,2,6}. ¹Embrapa Soja, Laboratório de Biotecnologia do Solo, Cx. Postal 231, 86001-970, Londrina, PR; ²Universidade Estadual de Londrina; ³Bolsista de PQ do CNPq; ⁴Bolsista de AT CNPq; ⁵Bolsista de DTI do CNPq; ⁶Bolsista ProDoc da CAPES. hungria@cnpso.embrapa.br

As exigências crescentes de comprovação da qualidade dos ensaios e produtos, pela adoção de normas de BPL (Boas Práticas de Laboratórios) e do sistema ISO ("International Standardization for Organization") requerem a validação e a descrição adequada de metodologias. Os protocolos estabelecidos pela RELARE para a avaliação da eficiência agronômica de inoculantes e tecnologias de inoculação para a cultura da soja já representam uma etapa importante para o estabelecimento dos POPs (Procedimento Operacional Padrão), contudo, vários procedimentos precisam ser validados. O objetivo deste trabalho foi identificar e validar, a campo, um conjunto de parâmetros indicados pela RELARE para a avaliação da eficiência agronômica. Os ensaios foram conduzidos por duas safras, nos municípios de São Luiz Gonzaga, Passo Fundo, Cascavel, Ponta Grossa, Londrina, Santo Antônio da Posse, Sete Lagoas, Dourados, Santo Antônio de Goiás, Brasília e Planaltina. Foram avaliados o número de células de rizóbios no solo; número e massa de nódulos secos; identificação sorológica das estirpes ocupando os nódulos; massa da parte aérea seca; N total na parte aérea (g kg^{-1} e mg N planta^{-1}) e; N sob a forma de ureídeos (g kg^{-1} e $\text{mg N-ureído planta}^{-1}$). Os dados foram analisados em relação às variabilidades pontual e temporal, limites de coeficiente de variação (CV) e correlações entre os parâmetros. Além de definir os intervalos aceitáveis de CV para cada parâmetro, constatou-se que, nos solos brasileiros tradicionalmente cultivados com soja, sem aporte de N mineral, a determinação da massa de nódulos e da parte aérea seca foi adequada e suficiente para avaliar o desempenho simbiótico da soja.

*Financiado parcialmente pelo MCT/CNPq (CABBIO - 400710/2004-8, Instituto do Milênio, Universal 471773/2004-2).

CONTROLE DE QUALIDADE DOS PRODUTOS INOCULANTES EXECUTADO NO ANO DE 2005

Bangel, E.V.; Schmitz, J.A.K.; Ferreira, S.B.; Silva, G.M.; Aquino, A.S.; Messa, L.; Ávila, L.D.; Lago, J.V.; Pupe, M.. FEPAGRO, Rua Gonçalves Dias 570, 90130-060, Porto Alegre, RS, microbiologia@fepagro.rs.gov.br

O Laboratório de Fixação Biológica do Nitrogênio (LFBN/MIRCEN) da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO) é o laboratório credenciado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para executar as análises fiscais e periciais dos produtos inoculantes comercializados no País. As amostras dos produtos inoculantes inspecionadas e fiscalizadas são coletadas, nas indústrias nacionais e nas barreiras alfandegárias, pelos fiscais agropecuários do MAPA, que enviam ao laboratório para a realização das análises de controle de qualidade. O LFBN tem o prazo de 30 dias para emitir o Certificado de Análise Fiscal para o produto ser certificado pelo SEFAG (Serviço de Fiscalização Agrícola) do Estado onde está registrado o inoculante. Os produtos inoculantes sujeitos a inspeção e fiscalização são analisados de acordo com os Métodos Padrões Oficiais para análise de Corretivos, Fertilizantes e Inoculantes definidos pela Portaria/SNDA nº 31, de 08 de junho de 1982. A metodologia consiste em contagem do número de células viáveis do rizóbio (método da diluição e contagem em placas), caracterização das estirpes presentes no inoculante através da tipificação sorológica por aglutinação e avaliação da presença ou ausência de microrganismos contaminantes na diluição 10^{-5} . No ano de 2005 foram analisadas 221 amostras de produtos inoculantes, sendo 50,68% de produtos nacionais e 49,32%, importados. Das amostras coletadas, 2% dos inoculantes eram recomendados para o feijoeiro e o restante, para soja. Nas análises fiscais dos produtos inoculantes foram obtidos os seguintes dados: 52,04% eram produtos em suporte fluido e 47,96%, turfosos; 44,80% inoculantes registrados com a concentração na faixa de garantia de $1,0$ a $2,0 \times 10^9$ células viáveis/mL(g) e 21,72%, na faixa de $4,1$ a $5,0 \times 10^9$; 45,25% produtos tiveram resultado analítico com concentração maior que $5,0 \times 10^9$ UFC.mL $^{-1}$ (g $^{-1}$) e 7,24%, menor que $1,0 \times 10^9$ UFC.mL $^{-1}$ (g $^{-1}$); e, 12,67% inoculantes apresentaram presença de contaminação na diluição 10^{-5} .

QUALIDADE DOS INOCULANTES LÍQUIDOS PARA SOJA COMERCIALIZADOS NO BRASIL

Lemos, E.G.M¹.; Carareto Alves, L.M.; Bento, M.C.; Val-Moraes, S.P.; Lemos, M.T.O. ¹FCAV/UNESP, via de acesso Prof. Dr. Paulo Donato Castellani s/n, 14884-900, Jaboticabal, SP, egerle@fcav.unesp.br

Conhecendo-se que o nitrogênio é o nutriente requerido em maior quantidade para a cultura da soja compreende-se o papel da inoculação com bactérias fixadoras do nitrogênio atmosférico. Neste contexto, avanços nas pesquisas de melhoramento genético vegetal e em microbiologia do solo permitiram expandir o uso de inoculantes comerciais contendo estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*, em contrapartida à adubação nitrogenada mineral. Atualmente, quatro estirpes são recomendadas oficialmente para a utilização nos inoculantes comerciais para soja (SEMIA 5079, 587, 5019 e 5080). O sucesso desta inoculação é dependente de uma série de fatores ambientais, somados ao método empregado na manipulação e aplicação do produto em campo. Contudo, os aspectos relacionados à formulação e fabricação dos inoculantes comerciais reúnem os fatores mais importantes para a obtenção de um produto de qualidade, obedecendo à legislação vigente, e alcançando uma boa aceitação de mercado. Em um período de 5 anos ocorreu uma evolução do inoculante em substrato sólido, turfa, para os inoculante líquidos. Sem duvida nenhuma a qualidade destes inoculantes líquidos aumentou como consequência de uma mais acessível condição para manter o produto sem contaminantes. Assim produtos disponíveis no mercado nacional foram analisados e observou-se que na sua grande maioria não apresentavam contaminantes. O número de células de rizóbios presentes nestes inoculantes foi a variável observada. Embora a maioria apresente o número recomendado na lei isto foi dependente da técnica utilizada para a contagem das células em diluição seriada (agitação manual ou vortex). Assim, sugere-se que o controle de qualidade destes inoculantes líquidos adotem a metodologia de agitação vigorosa em vortex.

EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DO INOCULANTE BIAGRO EM PRÉ-INOCULAÇÃO DA SOJA

Campo, R.J.¹; Mostasso, F.L.; Hungria, M.¹. ¹Embrapa Soja, Cx. Postal 231, 86001-970, Londrina, PR, rjcampo@cnpso.embrapa.br, hungria@cnpso.embrapa.br

Devido às dificuldades da sobrevivência do *Bradyrhizobium* na semente de soja, especialmente quando se aplica o inoculante junto com fungicidas e micronutrientes, as recomendações de inoculação para a soja sempre primaram por fazê-lo imediatamente antes da semeadura, ou seja, inoculação e semeadura no mesmo dia. Por outro lado, a inoculação antecipada da soja pode facilitar essa operação e possibilitar o aumento da sua adoção pelos produtores. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência agronômica do inoculante turfoso Biagro em pré-inoculação da soja, na presença de fungicidas e micronutrientes. Os experimentos consistiam em comparar os a inoculação com o inoculante padrão turfoso com o inoculante Biagro e a tecnologia INTA-Biagro, todos na presença ou não de fungicidas (carboxin + thiram) e micronutrientes (Mo + Co), nas doses recomendadas, mais os tratamentos sem inoculação e e com 200 kg de N, quando os experimentos foram a campo. Após inoculação as sementes foram armazenadas por 2 horas, 5 dias, 15 dias, para posterior avaliação. Os métodos utilizados seguiram, basicamente, os estabelecidos na RELARE. Os experimentos foram realizados nas safras 2003/04, 2004/05 e 2005/06 em, no mínimo, três locais. As análises da qualidade do inoculante turfoso Biagro mostraram populações de células, em meio agar-manitol e em meio seletivo, ao redor de cinco vezes maiores que o padrão mínimo de qualidade, 1×10^9 células/g inoculante, sem a presença de contaminantes. A pré-inoculação com o inoculante Biagro, tecnologia INTA-Biagro, apresentou sobrevivência da bactéria na semente em laboratório e casa-de-vegetação, igual ou superior ao tratamento inoculação padrão, mesmo após a adição de fungicidas e micronutrientes, nas leituras duas horas e cinco dias após a inoculação. A pré-inoculação, com a tecnologia INTA-Biagro apresentou nodulação, N total nos grãos e rendimentos de grãos iguais ao tratamento inoculação padrão, mesmo após adição de fungicidas e micronutrientes, após duas horas e cinco dias da inoculação. A tecnologia de inoculação INTA-Biagro pode ser utilizada em pré-inoculação para até cinco dias antes da semeadura de soja.

CPAC 15 OU CPAC 7? EIS A QUESTÃO!*

Hungria, M.^{1,3,4}; Mendes, I.C.^{2,4}; Batista, J.S.^{1,3,5}; Barcellos, F.G.^{1,3,6}; Chueire, L.M.O.⁷; Campo, R.J.¹. ¹Embrapa Soja, Laboratório de Biotecnologia do Solo, Cx. Postal 231, 86001-970, Londrina, PR, hungria@cnpso.embrapa.br; ²Embrapa Cerrados, Planaltina, DF; ³Universidade Estadual de Londrina - Depto. Microbiologia; ⁴Bolsista de PQ do CNPq; ⁵Bolsista de DTI do CNPq; ⁶Bolsista ProDoc da CAPES; ⁷Bolsista de AT do CNPq.

Em 1992 a Embrapa Cerrados lançou as estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15 (=SEMIA 5079, variante natural do sorogrupo da SEMIA 566) e CPAC 7 (=SEMIA 5080, variante natural da CB 1809) para a cultura da soja, que, por resultarem em maiores rendimentos de grãos, deram grande impulso ao uso de inoculantes. Desde então, tem sido detectada, em isolados desses sorogrupos, variabilidade elevada em propriedades morfológicas (p.e., na produção de exopolissacarídeos), sorológicas (p.e., reação sorológica desconhecida), fisiológicas (p.e., alteração na reação ácida ou alcalina *in vitro*), genéticas (p.e., nos perfis de DNA amplificados com "primers" para regiões repetitivas e intergênicas do cromossomo), e simbióticas (capacidade de fixação biológica do N₂ – FBN e competitividade). Essas alterações são ainda mais elevadas no sorogrupo da CPAC 7, de tal modo que, sete anos após a introdução dessas duas estirpes em um solo de Cerrados, somente 6,4% dos isolados mostraram semelhança elevada com a CPAC 15, enquanto nenhum foi semelhante à CPAC 7. A plasticidade genômica elevada da CPAC 7 também tem resultado em alterações nas propriedades morfológicas e fisiológicas *in vitro*, inclusive causando dúvidas sobre a presença de contaminantes nos inoculantes. Contudo, a eficiência da FBN com a CPAC 7 é sempre maior e, em um levantamento recente realizado em seis estados do Brasil, foi correlacionada positiva e significativamente com a ocupação dos nódulos pela CPAC 7 ($r=0,69^{**}$), mas não pela CPAC 15 ($r=-0,03^{n.s.}$). Já a CPAC 15 é menos eficiente na FBN, mas mais estável *in vitro* e apresenta capacidade saprofítica e competitiva elevadas. Estabilidade e competitividade ou eficiência de FBN? CPAC 15 ou CPAC 7? A RELARE é um fórum adequado para essa discussão.

*Financiado parcialmente pelo MCT/CNPq (CABBIO - 400710/2004-8, PRONEX, Instituto do Milênio, Edital Universal 471773/2004-2).

SEMIA 5080 (CPAC-7) E SEMIA 5079 (CPAC-15): RETROSPECTIVA DOS EXPERIMENTOS CONDUZIDOS NA EMBRAPA CERRADOS. PARTE I: OLHANDO PARA O PASSADO E PARA O FUTURO

Mendes, I.C.¹; Vargas, M.A.T.²; Peres, J.R.R.³; Suhet, A.R.⁴; Reis-Junior, F.B.¹. ¹Embrapa Cerrados, Cx. Postal 08223, 73310-970, Planaltina, DF, mendesi@cpac.embrapa.br; ²Bioagri; ³Embrapa Transferência de Tecnologia; ⁴Embrapa Informação Tecnológica.

Em novembro de 2005, o isolamento da estirpe 5079 completou 20 anos. Desde 1984, foram conduzidos na Embrapa Cerrados e/ou sob nossa coordenação, 28 experimentos de seleção de estirpes, sendo sete em solos de primeiro cultivo e os demais em solos com população estabelecida de rizóbios capazes de nodular a soja. Apesar das flutuações na composição dos tratamentos ao longo dessas duas décadas, verificamos que em 17 experimentos foi possível comparar o efeito da inoculação com as misturas 29w+587 e 5080+5079. Em média os ganhos obtidos em relação ao tratamento testemunha nesses 17 experimentos foram de 59 e 289 kg grãos/ha, respectivamente, para as misturas 29w+587 e 5080+5079, o que dá uma diferença de 230 kg grãos/ha a mais para a mistura 5080+5079. Em 11 experimentos foi possível comparar as estirpes 29w, 587, 5080 e 5079 separadamente. Os ganhos médios, nos 11 experimentos, em relação ao tratamento testemunha para as estirpes 29W, 587, 5080 e 5079 foram de: 158; 196; 353 e 349 kg grãos/ha, respectivamente. O ganho médio obtido com as estirpes 5080 e 5079 foi portanto de 351 kg grãos /ha, contra 177 kg grãos/ha obtidos em média nos tratamentos 29w e 587. As estirpes 5080 e 5079, separadamente, promoveram então um ganho adicional de 175 kg grãos/ha, em relação à média dos ganhos obtidos separadamente com as estirpes 29W e 587. No grupo de 4 experimentos onde foi possível realizar as comparações entre os tratamentos: nitrogênio, 29W+587; 5080+5079; 587+5080, 587+5079; 29W+5080 e 29W+5079, os ganhos em relação ao tratamento testemunha foram de: 462, 94, 234, 114, 145, -75 e 58 kg grãos/ha, respectivamente, evidenciando mais uma vez o melhor desempenho da combinação 5080 + 5079. Em um experimento de ecologia de rizóbio conduzido por seis anos, foi evidenciado que a inoculação com a 5079 é uma estratégia eficaz e que pode ser utilizada para prevenir que estirpes de baixa eficiência fixadora e de alta competitividade venham a predominar

nos nódulos da soja. Todos esses dados nos dão subsídios para insistir na recomendação das estirpes 5080 e 5079, para a região dos Cerrados. Considerando que o Brasil é um país de dimensões continentais, concordamos que o desempenho das estirpes possa ser diferenciado nas várias regiões brasileiras, onde imperam condições edafoclimáticas contrastantes. Entretanto, quanto à Região do Cerrado, com base em 22 anos de estudo, nossa posição é de que sejam mantidas na recomendação as estirpes 5080 e 5079 e de que sua utilização para a fabricação do inoculante comercial seja estimulada, principalmente quando em mistura.

SEMIA 5080 (CPAC-7) E SEMIA 5079 (CPAC-15): RETROSPECTIVA DOS EXPERIMENTOS CONDUZIDOS NA EMBRAPA CERRADOS. PARTE II: FIXAR N EFICIENTEMENTE É PRECISO MAS, COMPETIR PELOS SÍTIOS DE INFECÇÃO, TAMBÉM É

Mendes, I.C.¹; Vargas, M.A.T.²; Peres, J.R.R.³; Suhett,A.R⁴; Reis-Junior, F.B.¹. ¹Embrapa Cerrados, Cx. Postal 08223, 73310-970, Planaltina, DF. mendesi@cpac.embrapa.br; ²Bioagri; ³Embrapa Transferência de Tecnologia; ⁴Embrapa Informação Tecnológica.

Na V RELARE, realizada em 1992, as estirpes SEMIA 5080 (CPAC-7) e SEMIA 5079 (CPAC-15) foram incluídas na recomendação para a produção do inoculante comercial de soja. Os fatores que levaram á recomendação dessas estirpes foram a maior eficiência fixadora (na época comprovado estatisticamente pela análise conjunta de 16 experimentos em rede) e a maior capacidade de competição por sítios de infecção nodular, o que favorecia o estabelecimento nos nódulos, principalmente em áreas com população estabelecida. A SEMIA 5079 foi isolada em novembro de 1985, na Embrapa Cerrados, quando foi verificado, pela primeira vez, a dominância nos nódulos da soja de estirpes pertencentes ao sorogrupo da estirpe SEMIA 566 (que havia sido utilizada em inoculantes comerciais entre 1966 a 1978), mesmo em áreas onde essa estirpe jamais havia sido introduzida. Estirpes do sorogrupo SEMIA 566 também foram encontradas em diversos outros locais do Brasil nunca cultivados anteriormente, inclusive na Amazônia (Ferreira, 1999). Nos Estados Unidos e no Canadá, a dominância do sorogrupo USDA 123, que apresenta reação de aglutinação com a SEMIA 566 também é amplamente relatada. Todas essas observações foram motivos de preocupação entre os rizobiologistas brasileiros envolvidos nos trabalhos de seleção de estirpes para a soja uma vez que a disseminação, no solo, de estirpes de rizóbio de baixa eficiência fixadora e alta competitividade pelos sítios de infecção nodular, poderia reduzir os níveis de produtividade da cultura, comprometendo o seu cultivo no País. A idéia por trás do isolamento da 5079 era a de obter, a partir da população já estabelecida no solo, uma estirpe de elevada eficiência fixadora e que possuísse, simultaneamente, alta capacidade competitiva pelos sítios de infecção nodular e boa capacidade de sobrevivência saprofítica, capaz de fazer face à disseminação de estirpes de baixa eficiência fixadora no solo.

Estudos posteriores confirmaram que a 5079 era mais eficiente que a estirpe 566 original (Hungria et al.1998) e que também era mais competitiva (Hungria et al.1996 e 1998 e Scotti et al. 1997). Em um experimento conduzido na Embrapa Cerrados, foi verificado que após cinco anos, mesmo nos tratamentos onde a estirpe 5079 jamais foi inoculada, a ocorrência do sorogrupo SEMIA 566 (ao qual ela pertence) foi de 74% dos nódulos. Esse resultado mostra que a inoculação com a 5079 é uma estratégia eficaz e que pode ser utilizada para prevenir que estirpes de baixa eficiência fixadora e de alta competitividade venham a predominar nos nódulos da soja. O estabelecimento no solo de estirpes do serogrupo 566 de origem desconhecida pode ser uma penalidade, mas a colonização do solo com uma estirpe de elevada eficiência fixadora e de alta competitividade, como a 5079, é um benefício que não pode ser ignorado pelos rizobiologistas.

EFICIÊNCIA DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO PELA INOCULAÇÃO DE ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* EM SOJA, NO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL

Mercante, F.M.; Otsubo, A.A.; Staut, L.A.. Embrapa Agropecuária Oeste, Cx. Postal 661, 79804-970, Dourados, MS, mercante@cpao.embrapa.br, auro@cpao.embrapa.br e staut@cpao.embrapa.br

A elevada demanda de nitrogênio pela cultura da soja exige um eficiente funcionamento do sistema simbiótico com rizóbio, visando garantir elevados níveis de produtividade da cultura. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar a eficiência das estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas pela pesquisa para a produção comercial de inoculantes no Brasil, quando inoculadas em soja cultivada sob sistemas plantio direto, após cultivo de aveia preta ou trigo, ou convencional (aração e gradagem). Os experimentos foram conduzidos nas safras agrícolas 2000/2001, 2001/2002, 2002/2003, 2004/2005 e 2005/2006, nos municípios de Dourados e Ponta Porã, MS. Na safra 2000/2001, avaliaram-se os seguintes tratamentos: controle não inoculado; controle sem inoculação e com aplicação de 200 kg ha⁻¹ de N-uréia, sendo 50% no plantio e 50% no florescimento; estirpes SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 5080, inoculadas individualmente, e as combinações das estirpes SEMIA 587 + SEMIA 5019 e SEMIA 5079 + SEMIA 5080. Nas safras seguintes, foram acrescentados os tratamentos com 30 kg ha⁻¹ de N-uréia, aplicados no plantio, e 120 kg ha⁻¹ de N-uréia, em quatro aplicações (plantio, início de florescimento, florescimento pleno e enchimento de grãos). Os maiores ganhos de produtividade foram observados na safra 2001/2002, sob sistema plantio direto, onde a inoculação pela estirpe SEMIA 5019 promoveu um incremento de cerca de 22% no rendimento de grãos na cultura da soja em relação ao tratamento-controle não inoculado. Em todos os ensaios, não foram detectados incrementos no rendimento de grãos pela aplicação de adubo nitrogenado, independentemente da dose utilizada e da época de aplicação, quando comparado aos tratamentos com inoculante.

AVALIAÇÃO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN) NA CULTURA DA SOJA NO CERRADO DE RORAIMA

Zilli, J.E.¹; Campo, R.J.²; Gianluppi, V.¹; Smiderle, O.J.¹; Hungria, M.².
¹Embrapa Roraima, Cx. Postal 133, 69301-970, Boa Vista, RR, zilli@cpafrr.embrapa.br, vicente@cpafrr.embrapa.br, ojmsmider@cpafrr.embrapa.br; ²Embrapa Soja, Cx. Postal 231, 86001-970, Londrina, PR, rjcampo@cnpso.embrapa.br, hungria@cnpso.embrapa.br

Desde 1992, quatro estirpes de *Bradyrhizobium* (SEMIA 5019, SEMIA 587, SEMIA 5079, SEMIA 5080), selecionadas nas regiões Sul e Central do Brasil, vêm sendo recomendadas para a cultura da soja. Estas estirpes são utilizadas nos inoculantes aos pares de acordo com a escolha de cada empresa fabricante. Com a expansão da cultura para o Norte do país manteve-se a mesma recomendação de inoculação, embora não se conheça o desempenho das estirpes nas condições edafoclimáticas regionais. O objetivo do trabalho foi avaliar a contribuição das estirpes recomendadas, isoladamente e duas combinações (SEMIA 5019 + SEMIA 587 e SEMIA 5079 + SEMIA 5080) para a FBN na cultura da soja (cv BRS Tracajá). Os trabalhos foram realizados entre os meses de maio e setembro de 2005 em solo de primeiro e segundo ano de cultivo no Cerrado em Roraima, seguindo recomendação de adubação para a região. Os experimentos foram instalados em blocos ao acaso, com seis repetições e os tratamentos: inoculação com as estirpes recomendadas, isoladamente e as combinações, controle sem inoculação e 200 kg N ha⁻¹. Os parâmetros avaliados foram: nodulação e massa seca da parte aérea aos 35 e 60 após a emergência das plantas (DAE) e rendimento de grãos. Na área de primeiro cultivo observou-se que todos os tratamentos inoculados produziram massa seca de nódulos superior aos tratamentos sem inoculação e nitrogenado e, entre as estirpes, SEMIA 5019 e SEMIA 587 proporcionaram massa seca de nódulos superior às estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080, em ambas avaliações. Entretanto, para rendimento de grãos os tratamentos com as estirpes da espécie *B. japonicum* apresentaram valores superiores (4366 kg ha⁻¹ SEMIA 5079 e 4383 kg ha⁻¹ SEMIA 5080) às da espécie *B. elkanii*, embora a média de massa seca da parte aérea tenha sido estatisticamente igual. Ao contrário, na área de segundo ano todos os tratamentos inoculados apresentaram número e massa seca de nódulos iguais nas duas coletas

(médias de 275 mg planta⁻¹ aos 35 DAE e 660 mg planta⁻¹ aos 60 DAE), assim como o rendimento de grãos. Estes valores não diferiram do controle, sem inoculação e tratamento com N, pois o solo possuía uma população de rizóbio estabelecida (1 600 células g⁻¹ de solo). Isso ocorreu porque, ao contrário do que de anos anteriores, no período de outubro 2004 a abril 2005 houve chuvas na região, permitindo a sobrevivência da bactéria no solo. A média do rendimento de grãos dos tratamentos inoculados em área de primeiro cultivo foi 3932 kg ha⁻¹, cerca de 37% superior ao tratamento sem inoculação, enquanto na área de segundo ano não houve diferenças entre os tratamentos, sendo a média 4 675 kg ha⁻¹.

AVALIAÇÃO DE ESTIRPES OU COMBINAÇÕES DE ESTIRPES DE *Bradyrhizobium japonicum* E *B. elkanii* PARA A SOJA

CAMPO, R.J.; Hungria, M.. Embrapa Soja, Cx. Postal 231, 86001-970, Londrina, PR, rjcampo@cnpso.embrapa.br, hungria@cnpso.embrapa.br

A inoculação e a reinoculação da soja com estirpes eficientes e competitivas proporciona melhor nodulação da soja na coroa do sistema radicular e contribui para a melhoria da eficiência de fixação biológica do nitrogênio (FBN) e do rendimento da soja. Os solos cultivados com soja apresentam alta população de *Bradyrhizobium* que compete por sítio de infecção e formação nodular com as estirpes introduzidas pelos inoculantes. Uma alternativa para aumentar a competição da estirpe introduzida com a naturalizada é favorecer a nodulação primária através do aumento da população da estirpe introduzida. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar se a estirpe utilizada individualmente é mais eficiente que os pares de estirpes, atualmente recomendados. As estirpes testadas foram SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 5080 de modo isolado em comparação com as combinações SEMIA 587 + SEMIA 5019, SEMIA 5079 + SEMIA 5080 + SEMIA 587 + SEMIA 5080, mais os tratamentos testemunhas sem inoculação e aplicação de 200 kg de N/ha. O trabalho foi conduzido em solos com população estabelecida de Londrina (safras 2000/01 a 2003/04) e Ponta Grossa (safras 2000/01 a 2002/03) e em solos de primeiro ano de cultivo de soja de Lucas de Rio Verde, Jaciara, e Taciba (safras 2002/3 a 2003/04). Nos solos com população estabelecida, verificou-se que, entre os tratamentos inoculados com estirpes individuais, a estirpe SEMIA 587 apresentou melhores resultados que as demais estirpes, sendo, inclusive, superior às combinações de estirpes em que ela participa. Isso demonstra que os inoculantes para soja podem ser feitos com apenas uma estirpe. Nos solos sem população estabelecida, os resultados mostram, novamente, que a SEMIA 587 foi superior às demais estirpes, testadas individualmente e em combinações.

ISOLAMENTO, SELEÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ESTIRPES EFICIENTES PARA INOCULAÇÃO EM FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.)

Moreira, F.M.S.; Andrade, M.J.B.; Soares, A.L.L.; Oliveira, C.; Ferreira, P.A.A.; Pereira, J.P.A.R.; Vale, H.M.M.. Universidade Federal de Lavras, Cx. Postal 3037, 37200-000, Lavras, MG, fmoreira@ufla.br

Desde 1997 o setor de Microbiologia do Solo do DCS/UFLA vem trabalhando com estudos de biodiversidade de comunidades de bactérias que nodulam leguminosas na Amazônia e em Minas Gerais. Nestes estudos, uma das espécies de planta isca utilizada tem sido o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), não só por sua reconhecida promiscuidade e, conseqüente utilidade em estudos desta natureza, como também por ser uma espécie importante na alimentação humana, e no caso brasileiro, a principal fonte de proteína na dieta nacional. Através destes estudos, milhares de estirpes foram isoladas de vários ecossistemas e tipos de solo, constituindo se uma fonte valiosa de recursos genéticos, para diversos estudos, incluindo a seleção de estirpes inoculantes. A eficiência de várias estirpes foi estudada em condições controladas e posteriormente no campo. Em todos estes estudos a estirpe CIAT899 (SEMIA4077/BR322), recomendada como inoculante para feijão pela RELARE e estirpe tipo de *Rhizobium tropici*, tem sido usada como uma das referências. Será apresentado um histórico sucinto dos trabalhos realizados, assim como a lista de publicações sobre seleção que têm demonstrado que as estirpes UFLA 2-100 e UFLA 2-127, isoladas da Amazônia e testadas em Minas Gerais, apresentam produções similares a CIAT 899. Estas foram identificadas como *Rhizobium leguminosarum* e *R. mongolense* através do sequenciamento gene 16 S rDNA. As duas estirpes foram testadas nas variedades Perola e Talismã. Os experimentos de campo em MG foram conduzidos em condições de baixa aplicação de insumos (70-90 kg ha⁻¹ de superfosfato triplo e 20-40 P₂O₅ kg ha⁻¹ de cloreto de potássio) em solos com pH variando de 4.9 a 5.6. Foram obtidas produções de 910 a 3270 kg ha⁻¹, semelhantes à adubação nitrogenada de 70-80 kg ha⁻¹ N-uréia, e superiores ao controle sem inoculação e sem adubação nitrogenada.

EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ISOLADOS DE RIZÓBIO EM FEIJOEIRO NA PRESENÇA DE EXSUDATOS DE SEMENTES DE *Mimosa flocculosa* E/OU N-MINÉRAL

Mercante, F.M.¹; Otsubo, A.A.¹; Cavalheiro, J.C.¹; Gil, F.K.U.^{1,2}. ¹Embrapa Agropecuária Oeste, Cx. Postal 661, 79804-970, Dourados, MS; ²Universidade Federal da Grande Dourados; mercante@cpao.embrapa.br, auro@cpao.embrapa.br, juliana@cpao.embrapa.br, kenji@cpao.embrapa.br

Isolados de rizóbio nativos de Mato Grosso do Sul, previamente selecionados, foram inoculados em feijoeiro, cv. Carioca, na presença e ausência de exsudatos de sementes de *Mimosa flocculosa*, nas safras agrícolas de 2004 e 2005. No ensaio conduzido na safra agrícola de 2004, o efeito da adição de exsudatos no número de nódulos radiculares foi verificado principalmente nas plantas inoculadas com as estirpes CPAO 12.5 L2, CIAT 899 e com o uso do inoculante padrão (CIAT 899 + PRF 81). Quanto ao peso de nódulos secos, além dos tratamentos que demonstraram incrementos no número de nódulos, o efeito da adição de exsudatos de *M. flocculosa* também foi verificado nas plantas que receberam adubação nitrogenada (80 kg ha⁻¹ de N-uréia). Os efeitos positivos da adição destes exsudatos, na produção de matéria seca da parte aérea, foram verificados nas plantas inoculadas com as estirpes CPAO 12.5 L2, CPAO 2.11 L, CPAO 29.8 L, além dos tratamentos-controle com e sem adição de N mineral. Na safra 2005, o efeito da adição de exsudatos de sementes de *M. flocculosa* no número de nódulos das plantas mostrou-se mais expressivo nos tratamentos inoculados com as estirpes CPAO 49.3 L2, CPAO 56.4 L2 e com o produto padrão, além das plantas adubadas com N mineral. De modo geral, o efeito da adição dos exsudatos no número de nódulos, também mostrou-se positivo na massa seca de nódulos. Quanto à produção de matéria seca das plantas e o rendimento de grãos da cultura, não foram verificados efeitos significativos da adição de exsudatos. Deve-se, contudo, destacar que o efeito mais marcante dos exsudatos foi verificado na nodulação das plantas que receberam adubação com N mineral. Nesse caso, verificou-se que o N mineral não foi capaz de inibir a nodulação do feijoeiro, quando os exsudatos estavam presentes. A nodulação e fixação do N₂ no feijoeiro, na presença de N-mineral, representa uma grande im-

portância no manejo da cultura, já que a planta poderia beneficiar-se das duas fontes de N e, conseqüentemente, alcançar níveis mais elevados de produtividade.

SELEÇÃO DE ESTIRPES DE RIZÓBIO PARA INOCULAÇÃO EM FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)

Mercante, F.M.¹; Otsubo, I.M.N.^{1,2}; Pelegrin^{1,2}, R.; Tarasiuk¹, V.A.; Silva-Júnior¹, A.. ¹Embrapa Agropecuária Oeste, Cx. Postal 661, 79804-970, Dourados, MS. ²Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal/ UNIDERP. mercante@cpao.embrapa.br, ilda@cpao.embrapa.br, vladimir@cpao.embrapa.br e aroldo@cpao.embrapa.br

O presente estudo teve como objetivo selecionar estirpes de rizóbio nativas de diversas regiões de Mato Grosso do Sul, utilizando o banco de germoplasma da *Embrapa Agropecuária Oeste*, através de sua eficiência simbiótica quando inoculadas em feijoeiro. Inicialmente, a eficiência simbiótica de 380 isolados de rizóbio inoculados em feijoeiro, cv. Carioca, foi avaliada sob condições controladas de casa de vegetação, em nove experimentos, sendo comparada com tratamentos-controle sem inoculação e com adubação com N-uréia, sem inoculação. Além disso, a eficiência dos isolados obtidos foi comparada com a eficiência das estirpes CIAT 899 e PRF 81, recomendadas para produção do inoculante comercial para o feijoeiro no Brasil. Cerca de 51, 74 e 72% dos isolados de rizóbio nativos de solos de Mato Grosso do Sul foram mais eficientes do que a inoculação com a estirpe CIAT 899, quanto ao número de nódulos, peso de nódulos secos e produção de matéria seca da parte aérea das plantas, respectivamente. Do mesmo modo, a grande maioria dos isolados de rizóbio mostraram-se mais eficientes que a estirpe PRF 81, quando inoculados em sementes de feijoeiro. Posteriormente, os isolados mais eficientes foram avaliados em vasos com solo representativo da região (Latossolo Vermelho distrófico), sob condições controladas de casa de vegetação. Na etapa de experimentação a campo, foi utilizada a cultivar Carioca, inoculada com os isolados mais eficientes. Os resultados indicam a possibilidade de incrementos significativos na eficiência simbiótica com o feijoeiro.

EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DE ESTIRPES DE RIZÓBIO EM FEIJÃO-CAUPI

Rumjanek, N.G.¹; Xavier, G.R.¹; Martins, L.M.V.²; Morgado, L.B.³; Alcantara, R.M.C.M.⁴; Freire-Filho, F.R.⁴; Dantas, J.P.⁵; Santos, C.E.R.S.⁶; Zilli, J.É.⁷; Costa, J.R.¹. ¹Embrapa Agrobiologia, 23890-000, Seropédica, RJ, norma@cnpab.embrapa.br, gustavo@cnpab.embrapa.br; ²UNEB, Salvador, BA; ³Embrapa Semi-Árido, Petrolina, PE; ⁴Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI; ⁵UEPB, Campina Grande, PB; ⁶UFRPE, Recife, PE; ⁷Embrapa Roraima, Boa Vista, RR.

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) é uma cultura tradicional na região Nordeste brasileira e capaz de tolerar ao estresse térmico e salino. Com as novas demandas do setor de agroenergia, são esperados incrementos da área plantada com o feijão-caupi na região Semi-árida através do sistema de produção consorciado da mamona. Recentemente, além de ser cultivado por pequenos e médios agricultores, vêm sendo utilizado por agricultores na entressafra de culturas como a soja, exemplificado uma nova oportunidade para as indústrias de inoculantes. Neste estudo foram realizados experimentos em 4 locais na região Nordeste, Teresina (PI), Recife (PE), Petrolina (PE), Imbaúba (PB) e 2 locais na região Norte, Água Boa e Confiança (RR), utilizando as cultivares próprias de cada local. Além das estirpes recomendadas para feijão-caupi (SEMIA 6461 e SEMIA 6463) foram utilizadas a SEMIA 6462, recomendada em caráter provisório, outras duas estirpes (BR 3262 e BR3299), 2 doses com N (40 e 80 kg/ha) e um controle absoluto, com 6 repetições. De acordo com a interpretação dos resultados de produtividade do 1º ano de experimentação foi observado que as estirpes SEMIA 6462, BR3262 e BR3299 apresentaram resposta igual ou superior às estirpes já recomendadas, com exceção da BR3262 em Recife. Em relação ao teor de matéria seca, foi observado resultados estatisticamente iguais às estirpes já recomendadas e também superiores ao controle absoluto. As diferenças no desempenho das estirpes pode ser consequência da especificidade em relação as cultivares e das condições edafoclimáticas nos diferentes locais de experimentação.

ISOLAMENTO, SELEÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ESTIRPES EFICIENTES PARA INOCULAÇÃO EM CAUPI, RECOMENDADAS PELA XII RELARE (INPA3-11B E UFLA 3-84) E REFERENDADAS NA IN10 DE 21/3/2006

Moreira, F.M.S.¹ e colaboradores. Universidade Federal de Lavras, Cx. Postal 3037, 37200-000, Lavras, MG, fmoreira@ufla.br

Desde 1997 o setor de Microbiologia do Solo do DCS/UFLA vem trabalhando com estudos de biodiversidade de comunidades de bactérias que nodulam leguminosas na Amazônia e em Minas Gerais. Nestes estudos, uma das espécies de planta isca utilizada tem sido o caupi (*Vigna unguiculata*), não só por sua reconhecida promiscuidade e, conseqüente utilidade em estudos desta natureza, como também por ser uma espécie importante na alimentação humana, e no caso brasileiro, principalmente para as populações do norte e nordeste. Milhares de estirpes foram isoladas através destes estudos e sua eficiência estudada em condições controladas e posteriormente no campo para as estirpes mais eficientes. Em todos estes estudos a estirpe BR2001 (SEMIA6145), recomendada como inoculante para caupi até 2004 pela RELARE, foi usada como referência. No entanto, a BR2001 mostrou-se bastante ineficiente em todos os trabalhos. Pesquisas sobre os trabalhos realizados com esta estirpe que levaram a sua recomendação, nas atas da RELARE, em vários tipos de publicação (artigos, teses, etc.) e também em consultas a vários pesquisadores, foram infrutíferos no sentido de encontrar dados que justificassem sua indicação como estirpe eficiente. Será apresentado um histórico sucinto dos trabalhos realizados, assim como a lista de publicações sobre seleção que culminaram com a indicação das estirpes INPA3-11B (SEMIA6463/BR3301) isolada e selecionada em vasos de Leonard, em 1982 quando a autora pertencia ao INPA em Manaus e, em estádios posteriores na UFLA, MG) e UFLA3-84 (SEMIA6461), isolada de solo de pastagem em Rondônia, como inoculante para caupi na última RELARE (referendada recentemente na IN10 de 21/3/2006), assim como a identificação destas como *Bradyrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium* sp. através do sequenciamento gene 16 S rDNA. As duas estirpes foram testadas nas variedades BR14-Mulato, BR08-Caldeirão e Poços de Caldas. Os experimentos de campo em MG foram conduzidos em condições de baixa aplicação de insumos (70 kg ha⁻¹ de superfosfato

simples e 40 kg ha⁻¹ de cloreto de potássio) em solos com pH variando de 4,9 a 5,9. Foram obtidas produções de 950 a 1340 kg ha⁻¹ semelhantes a adubação nitrogenada de 70-80 kg ha⁻¹ N-uréia e superiores ao controle sem inoculação e sem adubação nitrogenada.

ESTUDOS DA EFICIÊNCIA DE ESTIRPES DE RIZÓBIO PARA ERVILHA EM CONDIÇÕES DE CAMPO

Brose, E.; Muniz, A.W.. EPAGRI, Cx. Postal 181, 88502-970, Lages, SC, brose@epagri.rct-sc.br, aleks@epagri.rct-sc.br

Com o objetivo de validar estirpes de rizóbio para ervilha que foram selecionadas em condições controladas de casa de vegetação, foi conduzido um experimento em solo de primeiro ano de plantio com ervilha. Foram testadas oito estirpes (SEMIA 3007, USA 212-7, EEL 5501, EEL 3001, EEL 7802, EEL 6802, EEL 1002 e EEL 13402) na variedade de ervilha Spence, mais duas testemunhas sem inoculação, sendo uma sem adubação nitrogenada e uma com 200 kg de N/ha na forma de uréia. O solo foi corrigido o adubado conforme as recomendações da análise de solo. Foram avaliados os seguintes parâmetros: nodulação aos 25 dias após a semeadura e no início do florescimento; matéria seca e N total no tecido no início do florescimento; no final foram avaliados produção de grãos e N total nos grãos. Aos 25 dias após a semeadura as estirpes SEMIA 3007 e USA 212-7 apresentaram a melhor nodulação e no início do florescimento as estirpes USA 212-7 e EEL 5501 apresentaram o maior peso de nódulos, confirmando resultados observados em vários experimentos anteriores em casa de vegetação. As diferenças na nodulação não se refletiram na produção de matéria seca no início do florescimento nem na produção de grãos. A maior produção de grãos se verificou com a estirpe EEL 7802 (1170 kg/ha) que representou 250 kg a mais comparado com a testemunha sem inoculação, mas não foi estatisticamente significativo. Da mesma forma o N total no tecido vegetal e nos grãos não foi estatisticamente significativo entre as estirpes.

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE RIZÓBIOS PARA TREVO BRANCO EM CONDIÇÕES DE ÁREAS DE VÁRZEA

Alves, J.B.¹; Sá, E.L.S. de². ¹Rizobacter do Brasil Ltda., 86044-290, Londrina, PR; jbredow@pop.com.br; ²Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91540-000, Porto Alegre, RS, enilson.sa@ufrgs.br

Devido à grande extensão das áreas de várzea no estado Rio Grande do Sul, a implantação de leguminosas forrageiras de inverno que possuam a capacidade de fixação simbiótica de nitrogênio (FBN), como o trevo branco, constitui-se em uma ótima alternativa aumentar os índices de produtividade destas áreas. Porém, esse benefício só pode ser obtido se a leguminosa estiver associada a estirpes de rizóbio que fixem nitrogênio nessas condições. O objetivo do trabalho foi isolar e selecionar, de solos do estado, rizóbios eficientes na FBN em simbiose com trevo branco, bem como avaliar a tolerância dessa simbiose às condições de alagamento do solo. Foram isolados 126 rizóbios de amostras de solos de 14 municípios do estado. A capacidade para fixar nitrogênio de 43 destes isolados foi avaliada em um experimento em casa de vegetação utilizando-se vasos Leonard. Os isolados de cada região considerados mais eficientes foram selecionados para a avaliação da capacidade de fixar nitrogênio em condições de alagamento do solo. Nesse experimento, cada tratamento foi mantido sob duas condições de umidade do solo, com alagamento e próximo à capacidade de campo (C.C.). O alagamento do solo reduziu significativamente o número e a massa de nódulos, assim como a produção de matéria seca e o acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas inoculadas com rizóbio. Observou-se a existência de variabilidade na sensibilidade da simbiose rizóbio/trevo branco ao alagamento do solo em função do rizóbio inoculado. Os isolados CVII, P₃4, T4 e VP16 foram os mais eficientes na fixação de nitrogênio em condições de alagamento do solo, superando o tratamento controle com adição de nitrogênio no acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas. Os resultados deste trabalho mostram que a fixação de nitrogênio pela simbiose rizóbio/trevo branco pode ocorrer em condições de alagamento do solo como as que ocorrem em áreas de várzeas.

IDENTIFICAÇÃO E RECOMENDAÇÃO DE BACTÉRIAS EFICIENTES NA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO PARA LEGUMINOSAS FLORESTAIS

Moreira, F.M.S.¹; Faria, S.M. de². Universidade Federal de Lavras, Cx. Postal 3037, 37200-000, Lavras, MG, fmoreira@ufla.br; Embrapa Agrobiologia, 23890-000, Seropédica, RJ, sdefaria@cnpab.embrapa.br

Um dos primeiros registros no Brasil sobre a fixação biológica de nitrogênio (FBN), em espécies arbóreas surgiu de Campêlo e Döbereiner (1969), relatando a especificidade hospedeira das bactérias junto às plantas e vice e versa. Na década de 80 iniciaram-se, levantamentos intensivos sobre a capacidade de nodulação de leguminosas florestais na Amazônia e na Mata Atlântica pelos autores deste trabalho. Por meio desses, foi possível o isolamento de milhares de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio que estão sendo mantidas nas respectivas coleções das Instituições de pesquisa. A seleção das mais eficientes na FBN, assim como, a sua caracterização, levaram à recomendação dessas bactérias para várias espécies de leguminosas, que são hoje avalizadas pela RELARE como inoculantes. Durante vários anos, as espécies identificadas de bactérias que nodulam leguminosas eram quase que exclusividade de isolados de leguminosas herbáceas de áreas temperadas. A identificação de várias estirpes de leguminosas florestais revelou que embora a maioria das espécies estabeleça simbiose com *Bradyrhizobium* spp., simbioses com *Rhizobium* spp., *Sinorhizobium* spp., *Mesorhizobium* spp., *Azorhizobium* spp., *Burkholderia* spp. e *Ochrobatrium* spp. também são encontradas. Hoje, pelo menos 4 espécies novas incluem isolados de leguminosas arbóreas tropicais, sendo três delas recomendadas como inoculantes pela RELARE para espécies florestais: *Mesorhizobium plurifarum* (BR3804/SEMIA6392), para *Chamaecrista ensiformis* e *Acacia salicina* e as espécies recentemente descritas- *Azorhizobium doebereineriae* (BR5401/SEMIA6401) para *Sesbania virgata* e *Burkholderia mimosarum* (BR3454/SEMIA6165) para *Mimosa scabrella*. O propósito deste trabalho é apresentar um histórico sucinto resgatando as publicações sobre seleção e identificação das bactérias que se associam com espécies florestais que refletem a experiência de mais de 20 anos de pesquisa.

METODOLOGIAS DE CARACTERIZAÇÃO PARA O MONITORAMENTO DAS ESTIRPES LIOFILIZADAS SEMIA, RECOMENDADAS NA PRODUÇÃO DE INOCULANTES*

Bangel, E.V.¹; Meyer, J.V.¹; Oliveira, A.M.R.¹; Silva, G.M.¹; Ávila, L.D.¹; Messa, L.¹; Aquino, A.S.¹; Hungria, M.²; Chueire, L.M.²; Menna, P.². ¹FEPAGRO, Porto Alegre, RS, Rua Gonçalves Dias nº 570, 90130-060, microbiologia@fepagro.rs.gov.br; ²Embrapa Soja, Londrina, PR.

Como centro distribuidor de estirpes, o controle de qualidade da Coleção SEMIA é extremamente importante. Este trabalho teve por objetivo monitorar as características culturais, fisiológicas, bioquímicas e genéticas das estirpes recomendadas de rizóbios SEMIA, a fim de garantir segurança ao material biológico transferido como matéria prima às indústrias produtoras de inoculantes e aos usuários da pesquisa e ensino. O projeto foi desenvolvido no período de fevereiro de 2003 a abril de 2006. As estirpes, após recuperação da liofilização e do óleo mineral, foram avaliadas quanto à pureza, com a anotação das características morfofisiológicas, mediante coloração de Gram, inoculação em meios diferenciais e testadas quanto à infectividade e eficiência simbiótica em casa de vegetação ou em câmara de crescimento. Nos testes de infectividade e eficiência simbiótica, foi constatada ineficiência das estirpes SEMIA 848 (el rincón) e SEMIA 3012 (ervilha), com indicação para a retirada da relação de estirpes recomendadas. Nesses mesmos testes, os resultados de alguns isolados demonstram potencial para a recomendação. No que diz respeito à caracterização genética, a análise do 16S rDNA por PCR-RFLP com as enzimas *HhaI*, *MspI* e *DdeI* mostram perfis de restrição distintos. Para se obter uma classificação taxonômica das estirpes SEMIA, está sendo desenvolvido, em parceria com o Laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja, o seqüenciamento do gene 16S rRNA das estirpes. As seqüências obtidas estão sendo analisadas para verificar alinhamentos significativos com outras bactérias, no GeneBank Data Library (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Algumas estirpes, como as SEMIAs 6398 e 6384, apresentaram um nível de similaridade de 97% com *Burkholderia* spp. As atividades desenvolvidas neste projeto são de importância fundamental para o monitoramento das estirpes SEMIA, possibilitando o controle de qualidade das estirpes distribuídas.

*Financiado parcialmente pelo MCT/CNPq (Edital Universal 471773/2004-2) e ANPIL.

UTILIZAÇÃO DE FORMULAÇÕES À BASE DE BIOPOLÍMEROS COMO SUPORTE PARA INOCULANTES DE LEGUMINOSAS¹

Schuh, C.A.²; Alves, J.B.³; Freire, J.R.J.⁴; Sá, E.L.S. de⁴. ¹Trabalho financiado pela Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII); ²Farmacêutico Bioquímico, Mestrando em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, UFRGS; ³Engenheiro-Agrônomo, Mestrando em Ciência do Solo, UFRGS; ⁴Departamento de Solos, UFRGS, Cx. Postal 776, 90001-970, Porto Alegre, RS, Brasil, enilson.sa@ufrgs.br

A utilização de inoculantes em culturas de leguminosas é uma prática conhecida e empregada há longo tempo e o substrato mais utilizado até o momento tem sido a turfa. Diversos tipos de formulações inoculantes que existem no mercado visam oferecer uma alternativa ao emprego da turfa, porém muitas apresentam baixa capacidade para manter a sobrevivência e eficiência dos rizóbios. Este trabalho avaliou a utilização de catorze misturas diferentes de polímeros naturais e/ou sintéticos como suportes para inoculantes, visando a produção de inoculantes comerciais para soja, e a capacidade de manter a sobrevivência e preservar as características de infectividade e de efetividade das estirpes SEMIA 587 de *Bradyrhizobium elkanii* e SEMIA 5079 de *Bradyrhizobium japonicum*. Avaliaram-se a sobrevivência dos rizóbios nas formulações armazenadas, a capacidade de aderência das formulações em sementes e a sobrevivência dos rizóbios em sementes a 40°C. As misturas contendo goma xantana, jataí e guar, tanto nas formulações em gel como líquidas, podem ser usadas como veículo para inoculantes proporcionando maior proteção aos rizóbios contra as condições de dessecação e temperatura. Todos os inoculantes mantiveram a sobrevivência da população de rizóbios durante um ano de armazenamento. Dentre as formulações líquidas, as que continham xantana e glicerol e com adição de PVP e a formulação que continha xantana, cmc e PVP, foram as mais promissoras para a formulação de inoculantes para soja.

NUTRIÇÃO NITROGENADA DA SOJA: CONTRIBUIÇÃO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO N₂ E DO FE RTILIZANTE NITROGENADO PARA O RENDIMENTO DE GRÃOS*

Hungria, M.^{1,3}; Franchini, J.C.¹; Campo, R.J.¹; Crispino, C.C.^{1,4}; Moraes, J.Z.¹; Sibaldelli, R.N.R.¹; Mendes, I.C.^{2,3}. ¹Embrapa Soja, Laboratório de Biotecnologia do Solo, Cx. Postal 231, 86001-970, Londrina, PR; ²Embrapa Cerrados, Planaltina, DF; ³Bolsista de PQ do CNPq; ⁴Bolsista do PRONEX. E-mail: hungria@cnpso.embrapa.br

O custo elevado dos fertilizantes nitrogenados no Brasil resultou em esforços da pesquisa para que a cultura da soja se beneficiasse do processo de fixação biológica do N₂ (FBN). Contudo, com frequência surgem dúvidas sobre a capacidade da simbiose de atender às demandas de cultivares mais produtivas, bem como sobre a necessidade de reinocular a soja. Visando estimar a contribuição do processo biológico e do fertilizante nitrogenado, 40 ensaios foram conduzidos por três anos, em latossolos contendo uma população de $\geq 10^3$ células viáveis de bradirizóbio g⁻¹ de solo, em Londrina e Ponta Grossa, Paraná. Os ensaios foram conduzidos sob os sistemas de semeadura direta e convencional, com as cultivares Embrapa 48 e BRS 134, dos grupos de maturação precoce e médio, respectivamente. Foram incluídos controles não inoculados, com ou sem a aplicação de 200 kg de N ha⁻¹ (50% na semeadura e 50% no florescimento). Os tratamentos inoculados receberam, ou não, N na semeadura (30 kg de N ha⁻¹), ou no estádio R2, ou no R4 (50 kg de N ha⁻¹). Quando comparada com o tratamento sem inoculação, a reinoculação incrementou significativamente a contribuição da FBN (em média, de 79% para 84%), o rendimento de grãos (em média, 127 kg ha⁻¹, ou 4,7%) e o N total acumulado nos grãos (em média, 6,6%). A aplicação de 200 kg de N ha⁻¹, ou de 30 kg de N ha⁻¹ na semeadura reduziu a nodulação e a contribuição da FBN diminuiu para 44% e 81%, respectivamente, sem resultar em ganhos no rendimento. A aplicação de N em R2 ou R4 resultou em decréscimos tanto na contribuição da FBN (em média, para 77%), como no rendimento. Os resultados enfatizam a importância do investimento em pesquisas visando maximizar a FBN.

*Financiado parcialmente pelo MCT/CNPq (CABBIO, 400710/2004-8 e PRONEX).

METODOLOGIA DE CONTAGEM DE *Bradyrhizobium* EM SEMENTE INOCULADA E/OU TRATADA COM FUNGICIDAS E MICRONUTRIENTES

Campo, R.J.; Miura, L.M.; Hungria, M.. Embrapa Soja, Cx. Postal 231, 86001-970, Londrina, PR, rjcampo@cnpso.embrapa.br, hungria@cnpso.embrapa.br

O número de células de um inoculante nem sempre caracteriza, por si só, a sua qualidade. O número de células recuperado após inoculação e a capacidade da bactéria sobreviver na semente são fundamentais para essa avaliação. Essa metodologia tem o objetivo de facilitar e padronizar essa análise, entre os laboratórios e abrange os seguintes passos: (1) tomar amostras de semente e efetuar a inoculação e/ou os tratamentos e deixar secar em laboratório por 30 minutos. Registrar a umidade do ar e a temperatura do local. Sugere-se efetuar essa operação com umidades do ar não inferior a 45% e temperaturas entre 20° e 30° C; (2) tomar sub-amostras de 100 sementes, aproximadamente 13 g, e colocar em erlenmeyers (Ers) estéreis **A**, com 90 ml de solução salina 0,85 % (SS); (3) adicionar duas a três gotas de TWEEN 20 (polioxietilenorbitano monolaurato), agitar por 15 min (1ª lavagem) e coletar soluções do Ers **A** em Ers estéril **B**, de volume 250 ml; (4) adicionar outros 90 ml de SS + duas a três gotas de Tween 20 aos Ers **A**, agitar por 15 minutos (2ª lavagem) e coletar as soluções nos Ers **B**; (5) completar os volumes dos Ers **B** com SS para 200 ml; (6) tomar alíquotas de 10 ml da suspensão (Ers **B**), colocar em Ers estéril **C** contendo 90 ml de SS e agitar para obter a diluição 10⁻¹; (7) tomar alíquotas de um ml da diluição 10⁻¹, e fazer diluições em tubos com 9 ml de SS até obter a diluição 10⁻⁶; (8) inocular, por gotejamento, as diluições 10⁻¹ a 10⁻⁴ em três repetições, as placas de Petri com meio semi-seletivo (Meio 79, enriquecido com fungicidas + antibióticos, conforme RELARE), preparadas com dois dias de antecedência; (9) inocular sementes desinfestadas e pré-germinadas nas diluições 10⁻¹ a 10⁻⁶, para leitura do NMP. Para as leituras em placas, deve-se tomar três sub-amostras e, em plantas, apenas uma; (10) efetuar a contagem das placas aos 10-12 dias e das plantas, aos 25-30 dias, após a inoculação; (11) calcular os números de células recuperadas, em placas e em plantas, conforme exemplo: (A) Placas de Petri: leitura das placas na diluição 10⁻² = 12 - 13 - 16 (média de 13,67 UFC). Resultado:

$13,67 \times 10^{-2}$ UFC x fator de correção (33,33) = $4,56 \times 10^4$ UFC/ml = $4,56 \times 10^4$ UFC/ml x 200 ml solução divididos por 100 sementes = $9,12 \times 10^4$ UFC por semente. Resultado final: 9,12 UFC recuperadas por semente. (B). Plantas: leitura de nodulação: 10^{-2} = 3 plantas +, 10^{-3} = 3 plantas + e 10^{-4} = 1 plantas + = 331×10^{-2} , Valor tabela = $46,208 \times 10^{-2}$ por ml de solução = $46,208 \times 10^{-2} \times 200$ ml solução + 100 sementes = $9,24 \times 10^{-3}$ NMP de células recuperadas capazes de nodular.

VOLUME DE CALDA COM DIFERENTES PRODUTOS PARA O TRATAMENTO DE SEMENTE DE SOJA E SEU EFEITO SOBRE A QUALIDADE FISIOLÓGICA

Krzyzanowski, F.C.¹; Henning, A.A.¹; França-Neto, J.B.¹; Lopes, I.O.N.¹; Zorita, M.D.². ¹Embrapa Soja, Cx. Postal 231, 86001-970, Londrina, PR, fck@cnpso.embrapa.br, henning@cnpso.embrapa.br, jbfranca@cnpso.embrapa.br, negrão@cnpso.embrapa.br; ²Nitragin Argentina S/A, Calle 10 y 11, Parque Industrial Pilar, 1629 Pilar, Buenos Aires, Argentina, mdzorita@speedy.com.ar

O objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos do tratamento de semente de soja com volume de calda acima do indicado, sobre as qualidades física e fisiológica. Os seguintes produtos e doses foram utilizados: fungicida [Nitragin Protreat (carbendazin + thiram) 200 ml / 100kg]; inseticida [Standak (fipronil) 200 ml / 100 kg]; micronutriente (CoMo, 240 ml / 100 kg); inoculante (Nitragin Optimize, 300 ml / 100 kg); aditivos protetores (Nitragin Power, formulado em dois componentes nas doses de 70 ml + 70 ml / 100 kg). Sementes de soja da cultivar MSoy 8001, com três níveis de vigor (alto, médio e baixo) determinados pelo teste de tetrazólio, foram avaliadas quanto aos tratamentos: 1) testemunha; 2) fungicida + micronutriente + inseticida + inoculante + aditivos protetores (calda de 1080 mL); 3) fungicida + inseticida + inoculante + aditivos protetores (calda 840 mL); 4) fungicida (calda 200 mL); 5) inoculante + aditivos protetores (calda 440 mL). A avaliação da qualidade da semente foi efetuada pelos testes de germinação, comprimento de plântulas, e emergência em areia. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, e as médias testadas pelo teste de Scott-Knot. Para germinação, apenas no lote de alto vigor, observou-se redução de 2% para o tratamento 2 (com maior volume de calda) em relação ao 1, redução essa que, em termos práticos, não representa perda de qualidade. Para emergência em areia, apenas o lote de baixo vigor mostrou redução significativa para todos os tratamentos químicos avaliados. Os testes de comprimento de plântula e de hipocótilo não detectaram diferenças entre os tratamentos, nos três níveis de vigor. Face aos dados obtidos, em lotes de alto e médio vigores, é possível utilizar o tratamento completo, com alto volume de calda, sem que ocorram danos físico e fisiológico à semente de soja.

TRES FACTORES QUE AFECTAN LA CALIDAD DE LA INOCULACIÓN

Olivieri, F.; Demares, D.; Penna, C.A.. NITRAGIN ARGENTINAS S.A., Parque Industrial Pilar, BA, Argentina, cpenna@nitragin.com.ar

La fijación biológica de nitrógeno en cultivos de soja, se ha establecido como el camino indiscutible para minimizar el uso de nitrógeno de otras fuentes. El tratamiento de semillas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) con inoculantes formulados con bacterias del género *Bradyrhizobium* es hoy una practica indispensable para el logro de cultivos de alto rendimiento.

Si bien son conocidas las propiedades biológicas que poseen los microorganismos de este género, menos se ha trabajado en las características que deben tener las formulaciones que los contienen. De ellas, nos pareció interesante analizar, por un lado, el volumen que contiene la dosis suficiente de bacterias y la concentración bacteriana en el inoculante.

Por otra parte, aun sin considerar la diferencia entre variedades, el estado del tegumento de la semilla tiene gran influencia en la absorción y distribución de los productos.

En condiciones de campo, cada partida de semilla posee diferente composición en cuanto a la integridad del tegumento, que si bien (dentro de ciertos límites) puede no afectar su calidad (en cuanto a simiente) cambia notablemente la velocidad de absorción de líquido.

Las semillas fueron clasificadas por el estado del tegumento y por tamaño. Se trabajó con semillas que poseían un área superficial de 6636 cm².kg⁻¹ (modelada asumiendo una forma esférica perfecta).

Se calculó la velocidad de absorción de inoculante en semillas con distinto nivel en el daño del tegumento (siempre dentro de valores aceptables para la calidad de la semilla) obteniéndose resultados entre 3 ml.kg⁻¹.min⁻¹ y 63 ml.kg⁻¹.min⁻¹ dependiendo del estado del tegumento.

Los valores obtenidos sugieren que las velocidad de absorción del inoculante líquido no permitirá una distribución homogénea cuando las dosis de producto se encuentran por debajo de 3 ml . kg⁻¹ ya que con sistemas de mezclado eficientes, semillas con tegumento intacto requieren de al menos 1 minuto para distribuir ese volumen de inoculante antes de su absorción completa.

En estudios realizados en nuestro laboratorio la recuperación sobre semillas

de bacterias del género *Bradyrhizobium* mostró una relación inversa a la concentración de los inoculantes analizados sugiriendo que el estado fisiológico en el que se encuentran los microorganismos en Inoculantes con alta concentración tal vez no sea el ideal para la aplicación sobre semillas. Estos tres parámetros, volumen de inoculante aplicado por semilla, estado del tegumento y concentración bacteriana del producto no son normalmente tenidos en cuenta para definir calidad de los inoculantes. Este trabajo pretende despertar el interés sobre el estudio de nuevas metodologías de evaluación que logren manifestar de forma mas concluyente la calidad de los inoculantes que se comercialicen en el futuro.

RECUPERAÇÃO DE CÉLULAS DE *Bradyrhizobium* EM SEMENTE DE SOJA INOCULADA, ARMAZENADA E TRATADA COM FUNGICIDAS E MICRONUTRIENTES

Campo, R.J.¹; Moretti, E.M.; Mostasso, F.L.; Miura, L.M.¹; Hungria, M.¹.
¹Embrapa Soja, Cx. Postal 231, 86001-970, Londrina, PR, rjcampo@cnpsa.embrapa.br

Normalmente, os agricultores fazem a inoculação e o tratamento da semente de soja e as armazenam em galpões, para, depois, efetuarem a semeadura. Diversos trabalhos têm mostrado que a aplicação de fungicidas e micronutrientes na semente, o armazenamento e a má distribuição do inoculante afetam a sobrevivência da bactéria, a nodulação e a fixação biológica do nitrogênio (FBN). O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da aplicação de fungicidas, micronutrientes, do armazenamento e da distribuição dos inoculantes na semente, sobre a sobrevivência da bactéria. Diversas formulações de inoculantes foram aplicadas na semente de soja, nas doses recomendadas, e armazenadas com e sem fungicidas e micronutrientes para avaliação em laboratório, em casa-de-vegetação e a campo. As inoculações foram feitas conforme recomendação do fabricante e a recuperação das células aplicadas na semente foi realizada em laboratório, contagem em placas com meio semi-seletivo e contagem em plantas em casa-de-vegetação (NMP). Os resultados mostraram que o percentual de células recuperadas em placas e em plantas independe do número inicial de células aplicadas e do inoculante utilizado. As aplicações de fungicidas, micronutrientes e o armazenamento de semente inoculada reduzem drasticamente a recuperação da bactéria, tanto pela contagem em placas como pela contagem em plantas. Em teste com seis inoculantes, três turfosos e três líquidos, os percentuais de recuperação de células em placas de Petri variaram de 5,2% a 81,4%, entre os inoculantes, duas horas após a aplicação, e de 0,4% a 26,8% três dias após a inoculação. Duas horas após a inoculação, os inoculantes turfosos apresentaram nodulação com desvio padrão médio de 7,2 e os inoculantes líquidos de 8,9, enquanto que para três dias após a inoculação, esses valores foram, respectivamente, 7,5 e 11,4. Para evitar essa variação no percentual de recuperação de células na semente, em plantas e na nodulação, torna-se indispensável que as empresas produtoras de inoculante apresentem, além de um inoculante

de boa qualidade informações técnicas adicionais de inoculação que permitam melhor distribuição dos inoculantes na semente e obtenção de uma nodulação mais uniforme entre plantas para maximizar a FBN.

TAXONOMIA DAS ESTIRPES DE RIZÓBIOS RECOMENDADAS PARA O USO EM INOCULANTES COMERCIAIS NO BRASIL*

Menna, P.^{1,2,4}; Barcellos, F.G.^{1,2,5}; Bangel, E.V.³; Hungria, M.^{1,2,6}. ¹Embrapa Soja, Laboratório de Biotecnologia do Solo, Cx. Postal 231, 86001-970, Londrina, PR, hungria@cnpso.embrapa.br; ²Universidade Estadual de Londrina - Depto. Microbiologia; ³FEPAGRO, Porto Alegre, RS; ⁴Bolsista de DTI do CNPq; ⁵Bolsista ProDoc da CAPES; ⁶Bolsista de PQ do CNPq; ⁴Bolsista do PRONEX.

A identificação de estirpes mais eficientes no processo de fixação biológica do N₂ para a inoculação de leguminosas de importância econômica e ambiental sempre foi uma meta dos rizobiologistas brasileiros. Na primeira RELARE, realizada em 1985, foi discutido e estabelecido o mecanismo de recomendação de estirpes, sendo decidido que caberia à “Coleção de Culturas SEMIA” (Seção de Microbiologia Agrícola), do Instituto de Pesquisas Agrônomicas (IPAGRO), hoje FEPAGRO, preservar e distribuir as estirpes aos pesquisadores e indústrias. Hoje, a coleção SEMIA, que é considerada, pela FINEP, como a coleção de referência nacional para rizóbio, é depositária das 142 estirpes que são recomendadas para a elaboração de produtos inoculantes comerciais para 96 leguminosas hospedeiras. A importância econômica e como fonte de bioprospecção de genes dessas estirpes é reconhecida internacionalmente, contudo, cientificamente, a coleção peca pela falta de estudos e informações taxonômicas, com base nos métodos moleculares aceitos atualmente. Nesta etapa inicial, a sequência completa do gene 16S rRNA de 69 estirpes comerciais foi determinada. A classificação taxonômica previamente disponível, com base em propriedades morfológicas e especificidade hospedeira, foi confirmada para somente 20 estirpes. Definiram-se as espécies de 26 estirpes previamente classificadas apenas como *Bradyrhizobium* sp. Os gêneros de cinco outras estirpes foram confirmados, mas não as espécies. Duas estirpes sem taxonomia determinada foram classificadas. Finalmente, 16 estirpes foram reclassificadas em novos gêneros e espécies. O sequenciamento das demais estirpes está sendo realizado e é fundamental para adicionar credibilidade científica à RELARE.

*Financiado parcialmente pelo MCT/CNPq (Instituto do Milênio, Universal 471773/2004-2, Coleções de Culturas 552393/2005-3, ANPII).

ESTUDOS DA VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE ESTIRPES DE RIZÓBIO PARA ERVILHA E LENTILHA POR MEIO DE RFLP

Brose, E.; Muniz, A.W.. EPAGRI, Cx. Postal 181, 88502-970, Lages, SC, brose@epagri.rct-sc.br, aleks@epagri.rct-sc.br

Com o objetivo de caracterizar molecularmente estirpes de rizóbio de ervilha e lentilha para experimentações a campo, foram utilizadas 25 estirpes (15 de ervilha e 10 de lentilha). Foram utilizados primers de fragmentos de 10mers da série OPERON e os fragmentos de DNA amplificados em termociclador com 5 ciclos iniciais nas temperaturas de desnaturação de 92 °C por 30 segundos, anelamento a 45 °C por 1 minuto e amplificação a 72 °C por 1 min. e 30 seg., seguido de mais 35 ciclos de desnaturação, anelamento e amplificação de 92 °C por 20 seg., 45 °C por 30 seg. e 72 °C por 1 min, respectivamente. O dendograma de similaridade foi calculado pelo coeficiente de Jaccard baseado em análise UPGMA no programa estatístico NTSYS. De 30 primers testados foram obtidos 14 que apresentaram amplificação de bandas e 9 destes foram utilizados para a construção do dendograma. O número de bandas polimórficas com estas marcas variou de 3 a 10, com uma média de 6,7. As estirpes puderam ser agrupadas em dois grandes grupos pelo dendograma, sendo que o grupo "A" apresentou mais 6 subgrupos e o "B" mais 3 subgrupos. Das 10 estirpes de lentilha, 50% se classificaram no grupo "B". A estirpe SEMIA 3012, que não está demonstrando mais eficiência na fixação, foi a que mais se distanciou dentre as demais. De oito estirpes para ervilha (SEMIA 3007, USA 212-7, EEL 5501, EEL 3001, EEL 7802, EEL 6802, EEL 1002 e EEL 13402) que estão sendo usados para testes a campo, foi possível obter marcas específicas para a SEMIA 3007, USA 212-7, EEL 5501 e EEL 7802.

ESPECIFICIDADE HOSPEDEIRA ENTRE ESTIRPES DE RIZÓBIO E VARIEDADES DE ERVILHA

Brose, E.; Muniz, A.W.. EPAGRI, Cx. Postal 181, 88502-970, Lages, SC, brose@epagri.rct-sc.br, aleks@epagri.rct-sc.br

Com o objetivo de avaliar se existe alguma especificidade hospedeira entre estirpes de rizóbio em processo de seleção para ervilha, foi conduzido experimento em areia estéril e solução nutritiva em condições de casa de vegetação. Foram testadas oito estirpes (SEMIA 3007, USA 212-7, EEL 5501, EEL 3001, EEL 7802, EEL 6802, EEL 1002 e EEL 13402) em seis variedades de ervilha representantes de três grupos por finalidade de uso: ervilha forrageira (EMBRAPA Forrageira 81/03, BRS Forrageira e IAPAR 74), grãos verdes (Grão Variedade Baixa 40 e Telefone Alta) e grãos secos (Spence). Nos tratamentos também foi acrescida de uma testemunha sem inoculação com adubação de nitrogênio mineral. Não houve especificidade hospedeira entre as oito estirpes de rizóbio e cinco variedades de ervilha, com exceção da variedade Telefone Alta com as estirpes EEL 6802 e EEL 13402 que apresentaram baixa nodulação; entretanto isso não se confirmou na produção de matéria seca da planta, sendo que estes resultados carecem de confirmação. As estirpes USA 212-7 e EEL 5501 apresentaram maior número e peso de nódulos em todas as variedades, no entanto não se refletiu em maior produção de matéria seca da parte aérea.

RESPOSTA DA SOJA À REINOCULAÇÃO EM SOLOS COM POPULAÇÃO ESTABELECIDADA DE *Bradyrhizobium*, EM GUARAPUAVA (PR) E CRUZ ALTA (RS)

Bayer, C.¹; Campos, B.C.²; Fontoura, S.M.V.³; Bangel, E.⁴; Giongo, A.⁵; Freire, J.R.J.¹. ¹UFRGS-Departamento de Solos, Porto Alegre, RS, cimelio.bayer@ufrgs.br; ²FUNDACEP, Cruz Alta, RS; ³FAPA, Guarapuava, PR; ⁴FEPAGRO, Porto Alegre, RS; ⁵UFRGS-PPG Genética e Biologia Molecular, Porto Alegre, RS.

Em solos com população estabelecida de *Bradyrhizobium* ($>10^3$ células g⁻¹ solo) avaliou-se o efeito da reinoculação sobre o rendimento de soja, entre outras variáveis, em Cruz Alta, RS (Fundacep) e Guarapuava, PR (Fapa). Dois experimentos foram conduzidos em cada local, na safra 2005/06, testando duas cultivares de ciclo diferente. Os experimentos constaram dos tratamentos (1) Testemunha, (2) Controle (200 kg ha⁻¹ N-uréia), e Doses de inoculante para (3) 600.000, (4) 1.200.00, e (5) 2.400.000 células/semente, os quais foram distribuídos segundo delineamento de blocos casualizados, com seis repetições. Todos os procedimentos referentes à inoculação, adubação, implantação e condução da cultura da soja seguiram as normas da RELARE. Excluindo-se o tratamento com N mineral, o rendimento de soja variou de 2866 a 3191 kg ha⁻¹ em Guarapuava e de 3670 a 3499 kg ha⁻¹ em Cruz Alta, não tendo sido verificado efeito significativo da reinoculação a um nível de significância de 20%. Entre os tratamentos sem (testemunha) e com reinoculação não houve diferença também em relação a massa (mg/planta), número (número/planta) e tamanho (mg/nódulo) de nódulos, bem como para a quantidade de N presente na biomassa da cultura no estágio V5. A ocupação nodular está sendo avaliada por soroaglutinação direta e o isolamento da bactéria dos nódulos está sendo realizado para verificação da população nodular através do perfil genético. Além de finalizar essas avaliações e realizar a interpretação conjunta dos resultados obtidos neste ano nos dois locais, os experimentos a campo serão conduzidos novamente na próxima safra visando consolidar a informação quanto a técnica de reinoculação e sua recomendação à cultura da soja.

**** Pesquisa realizada com auxílio financeiro da ANPIL.**

USO DE INOCULANTE COMERCIAL À BASE DE *Azospirillum brasilense* (NOCTIN AZO) COMO PROMOTOR DE CRESCIMENTO EM GRAMÍNEAS

Oliveira, W.S.¹; Bonfiglio, C.H.¹; Batista, R.B.²; Oliveira, P.P.A.³. ¹Síntesis Química SAIC wsolivei@gmail.com, prodbiolog@sintesisquimica.com.br; ²Microquímica Indústrias Químicas Ltda., roberto@microquimica.com; ³EMBRAPA Pecuária Sudeste, ppaolive@cnpqse.embrapa.br

Bactérias do gênero *Azospirillum* são microrganismos de vida livre de ocorrência natural nos solos brasileiros que habitam a rizosfera das plantas. Essas bactérias associativas podem beneficiar as plantas, principalmente gramíneas, por meio da liberação de compostos nitrogenados e/ou fitormônios que contribuem para o desenvolvimento radicular. Por uma série de razões essa associação não é constante, embora não existam registros de ser negativa para a planta. Uma das justificativas seria a existência de uma grande quantidade de estirpes de *Azospirillum* de baixa eficiência nos solos brasileiros; Outra seria o desconhecimento de processos agrônômicos que possam beneficiar essa interação durante o processo de desenvolvimento das plantas, principalmente adubação nitrogenada.

A existência de estirpes de reconhecida eficiência (sp 7) associada a um processo de fermentação que permite a produção de inoculante a base de *Azospirillum brasilense* com alta concentração de células viáveis (10^8 a 10^9 UFC/mL), nos permitiu avaliar o efeito da inoculação de alta concentração de *Azospirillum* em sementes de diferentes gramíneas (Milho, Trigo, Capim Tanzânia e *Brachiaria*).

Para Milho (Universidade Estadual do Oeste do Paraná) a inoculação com *Azospirillum* possibilitou aumento de produção de 10,1% quando as plantas receberam somente adubação de base. Quando realizada a cobertura com nitrogênio o efeito desapareceu.

Para *Brachiaria* e Tanzânia (EMBRAPA Pecuária Sudeste) a inoculação com *Azospirillum* foi suficiente para excluir a primeira adubação nitrogenada (50 kg de N/ha) do processo de adubação para formação da pastagem. Após 60 dias o efeito da inoculação desapareceu.

Para Trigo (FUNDA CEP e EMBRAPA Soja), que é uma cultura relativamente rápida e de baixo investimento em fertilizantes, os resultados são animadores e direcionam para a possibilidade de substituição da adubação

nitrogenada de base (20 kg de N/ha) pela inoculação com *Azospirillum* para produções acima de 3 Mg/ha.

Os resultados demonstram um efeito positivo inicial independente da cultura. Todos os estudos deverão ser repetidos para a obtenção de conclusões definitivas em relação à eficiência agronômica do inoculante para posterior solicitação junto ao MAPA do registro comercial do inoculante NOCTIN Azo.

DUPLA INOCULAÇÃO EM SEMENTES DE SOJA COM INOCULANTE COMERCIAL À BASE DE *Azospirillum brasilense* (NOCTIN AZO) E INOCULANTE COMERCIAL À BASE DE *Bradyrhizobium japonicum* (NOCTIN A)

Oliveira, W.S.¹; Bonfiglio, C.H.¹; Batista, R.B.². ¹Síntesis Química SAIC, wsolivei@gmail.com, prodbiolog@sintesisquimica.com.ar; ²Microquímica Indústrias Químicas Ltda., roberto@microquimica.com

Bactérias do gênero *Azospirillum* são microrganismos de vida livre de ocorrência natural nos solos brasileiros que habitam a rizosfera das plantas. Além da liberação de compostos nitrogenados, essas bactérias podem liberar na rizosfera fitormônios que contribuem para o desenvolvimento radicular. O aumento radicular de plantas leguminosas como a soja é de extrema importância para o melhor aproveitamento de fertilizantes e água no solo. Existe ainda a possibilidade de benefício sobre a simbiose *Bradyrhizobium*/Leguminosa, uma vez que o maior volume de raízes representa maior superfície radicular para contato, penetração e formação dos nódulos.

Baseado no protocolo para avaliação de inoculantes de plantas não leguminosas, elaborou-se um experimento para avaliação da dupla inoculação de *Bradyrhizobium* (SEMIA 5079 e 5080) e *Azospirillum* (sp 7) com os respectivos inoculantes comerciais Noctin A e Noctin Azo, em sementes de soja semeadas em vasos contendo solo mantidos sob condições de casa-de-vegetação. O mesmo experimento foi conduzido no CENA/USP, Piracicaba-SP e na EMBRAPA Agrobiologia, Seropédica-RJ.

A dupla inoculação proporcionou aumento da massa radicular sendo significativamente superior no experimento na Embrapa Agrobiologia. Com relação ao número de nódulos a dupla inoculação apresentou nodulação significativamente superior nos dois ambientes de estudo. Outro importante fator observado foi a distribuição dos nódulos por todo o sistema radicular nas plantas com dupla inoculação. Embora as plantas com dupla inoculação apresentassem maior número de nódulos, a massa nodular não se alterou.

Os dados demonstram efeito positivo da dupla inoculação sobre a nodulação e massa radicular, entretanto, novos estudos deverão ser conduzidos para a obtenção de conclusões definitivas em relação à eficiência agrônômica do inoculante para posterior solicitação junto ao MAPA do registro comercial do inoculante NOCTIN Azo.

Composição da Diretoria da RELARE

Biênio 2004/2006

Presidente: Rubens José campo
Vice Presidente: Mauricio Leon Lefcovich
Secretário: Arnaldo Colozzi Filho

Biênio 2006/2008

Presidente: Fábio Martins Mercante
Vice Presidente: Sólton cordeiro de Araújo
Secretário (a): Eliane G. de Macedo Lemos

Conselho Fiscal

1. Titulares: Fátima Maria de Souza Moreira
Roberto Berwanger Batisata
Enilson Luiz Sacool
2. Suplentes: Rubens C. Bushmann Junior
Mariângela Hungria
Diva Souza Andrade

Ata da XIII reunião da rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbianos de interesse agrícola (RELARE)

Aos 02 e 03 de junho de 2006, no Cedro Hotel, localizado à Avenida Juscelino Kubistchek, 200, em Londrina, Paraná, realizou-se a XIII RELARE sob a organização da comissão composta por: Rubens José Campo e Mariângela Hungria (Embrapa Soja) e Arnaldo Colozzi Filho (IAPAR - Instituto Agrônômico do Paraná). Conforme estabelece o estatuto, as Empresas e Instituições de Pesquisa credenciadas e representadas na XIII RELARE foram: Embrapa Soja Mariângela Hungria, CENTRO DE PROMOÇÃO DE NEGÓCIOS LTDA - Mauricio Leon Lefcovich; TURFAL Indústria e Comércio de Produtos Biológicos e Agrônômicos Ltda - Rubens C. Buschmann Junior; Embrapa Agrobiologia – Gustavo Ribeiro Xavier; Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Enilson Luiz Sacool; UNICASTELO - Dora-Inês Kozusny-Andreani; UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS – Fátima Maria de Souza Moreira; IAPAR - Diva Souza Andrade; Embrapa Agropecuária Oeste – Fabio Martins Mercante; FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PESQUISAAGROPECUÁRIA- Eliane Villamil Bangel; Katec-Agro-Técnica Ltda – Ricardo Silva Araújo; MICROQUÍMICA Indústrias Químicas Ltda - Roberto Berwanger Batista; BIOSOJA - Eli Sidney Lopes; Bioagro Ind. Com. Agrop. Ltda – Eli Sideny Lopes (representante) e a empresa Turbosolo Com. Imp. Produtos Agropecuários, cadastrada no lugar da Campo Verde Com. Imp. Produtos Agropecuários, representada por Sergio Claudino Badzinski. Além dessa, outras empresas ou instituições de pesquisa cadastrado ou não, estiveram representadas por diversos pesquisadores e representantes de empresas que fizeram sua inscrição para a XIII RELARE (vide lista anexa no final). A seguir, promoveu-se a composição da mesa composta por Dr. Rubens J. Campo (Presidente da RELARE), Prof. Dr. João Ruy Jardim Freire (Presidente honorário da RELARE) e Dr. Alexandre J. Cattelan (Chefe de P&D da Embrapa Soja). O Dr. Rubens abriu a reunião, agradecendo a presença de todos e passou a palavra ao Dr. Cattelan, que agradeceu a todos, em nome da Embrapa Soja, a oportunidade de sediar o evento. Disse também sobre a importância da RELARE, e do crescente mercado de oportunidades para os inoculantes microbianos, citando o exemplo da China, que não produz inoculantes e

pode vir a ser um importante parceiro comercial na área. A seguir, o presidente da RELARE leu a programação da reunião, e ressaltou a presença de mais de 87 pessoas e falou sobre a necessidade de mudanças no estatuto da RELARE. O Prof. João Ruy Jardim Freire ressaltou o trabalho da comissão organizadora. A seguir, deu-se início aos trabalhos com a apresentação dos trabalhos técnicos, conforme segue: Painei 1: Apresentação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. O Sr. Márcio de Arruda Queiroz, Fiscal Federal Agropecuário do MAPA, chefe da Divisão de Registro de Estabelecimentos e Produtos da Coordenação de Fertilizantes, Inoculantes e Corretivos, fez uma apresentação sobre o tema “Fiscalização da Produção, Importação e Comercialização de Inoculantes no Brasil”. Segundo o MAPA, existem, atualmente, 11 empresas produtoras registradas, a saber: Katec Agro Técnica (GO); Bio Soja, Bioarts e Stoller (SP); Nitral Urbana, Simbiótica, Total Biotecnologia e Turfal (PR); Bioagro, Dimicron e Milenia (RS). Existem, também, estabelecimentos Importadores Registrados (Importações 2004/2005), a saber: Rizobacter (MT); Nipon Agri (RS); Basf; Crompton Chemtura; Microquímica (SP); Centro de negócios; Forquímica; Rizobacter (PR). O número de registro de novos produtos inoculantes com rizóbio no último ano foi de 191, sendo um em Goiás, 22 em São Paulo, 161 no Paraná e 7 no Rio Grande do Sul. A fiscalização realizada no segundo semestre de 2005 mostrou que os inoculantes apresentaram 91% de conformidade, de um total de 114 amostras analisadas. O Sr. Márcio informou que a coleta de amostras é regida pelo Art. 30 da IN MAPA n 10/2004. Informou, também, que a importação de material para pesquisa deve obedecer à base legal definida pelo Decreto 24.114/1934 (regulamento), Lei 8171/1991, Lei 9712/1998, Instrução Normativa MAPA 01/1998. A pesquisadora Eliane V. Bangel perguntou sobre procedimentos para remessa oficial de microrganismos e o Sr. Márcio esclareceu que devem ser observadas a legislação do país de destino e as normas do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético – CGEN/MMA. A Prof. Fátima M. S. Moreira relatou que existem normas confusas e diferentes entre Ministérios. O MAPA reconheceu que há necessidade de melhor divulgação das regras vigentes e de revisão dos procedimentos no sentido de garantir agilidade no trâmite dos processos relacionados ao trânsito de material de pesquisa. Em seguida, o representante do MAPA apresentou os dados

de importação, produção e comercialização de inoculantes (2004/2005). Ao todo, entre produtos nacionais e importados, líquidos e turfosos, foram disponibilizados 32.000.000 de doses de inoculantes no mercado brasileiro em 2005. O MAPA destacou que há necessidade de pesquisa e de atualização da legislação em aspectos como: tolerância para resultados analíticos; taxonomia das estirpes recomendadas; associação de inoculantes com fertilizantes, aditivos e agrotóxicos; embalagem e rotulagem; recomendações de dosagens; e metodologias analíticas. Neste momento, iniciou-se, entre os participantes, uma discussão sobre a quantidade de estirpes que devem compor o inoculante. Participantes remetem a RELARE a discussão. Existe uma dúvida sobre isto. Um produtor de inoculante reclamou que tenta importar inoculante para ser testado na Embrapa e que a burocracia do MAPA dificulta e atrasa o processo, e aprofunda a crise na agricultura. O Ministério rebateu e se colocou à disposição. Às 10h30min, o Presidente Rubens agradeceu e pediu os dados para serem divulgados pela RELARE.

Painel 2: Discussão e aprovação do protocolo para análise e avaliação da eficiência agrônômica de inoculantes para não leguminosas. Conforme decidido na RELARE anterior, quando o "Protocolo para avaliação de inoculantes para não leguminosas" foi apresentado, as sugestões deveriam ser enviadas para a Dra. Vera Baldani, autora do protocolo, para serem consideradas, incorporadas quando pertinentes e apresentadas na RELARE seguinte. Uma cópia do protocolo com as sugestões incorporadas foi previamente distribuída aos credenciados. Na XIII RELARE, a nova versão do protocolo, já com as sugestões foi então relatada, iniciando-se nova discussão. O Dr. Eli S. Lopes sugere que se utilize o número de microrganismos como padrão e não a diluição. Sugeriu também a troca da tabela de Mac Grady por Crochan, por causa do intervalo de confiança. A sugestão foi aprovada. Outros participantes sugeriram alterações na metodologia de identificação, mas o consenso é de que se retire do protocolo esta parte, e que ele parta da estirpe identificada. Os itens do protocolo referente à de seleção de estirpes também devem ser retirados. Com relação ao tamanho de parcela, decidiu-se que o tamanho mínimo deva ser 15m² e que o número de repetições deva ser de seis. Com relação à área mínima não houve consenso e decidiu-se considerar os princípios

básicos de cada cultura. Quanto às variáveis ambientais, decidiu-se pela escolha de uma das possibilidades, a saber: testes por dois anos em dois ambientes distintos ou, teste por um ano em quatro ambientes distintos. O protocolo foi novamente aprovado e modificações poderão ser incorporadas em futuras RELARES.

Painel 3: Revisão do protocolo de testes de eficiência agronômica para leguminosas. A discussão sobre a necessidade de revisão do protocolo de testes para a eficiência agronômica de inoculantes para leguminosas iniciou-se com questionamentos sobre a composição do meio nutritivo. O Presidente Dr. Rubens relatou ser comum a ocorrência de contaminação do meio com *Bradirhizobium*. A Prof.^a Fátima M.S. Moreira questionou se o protocolo é para leguminosas ou para soja e sugeriu o uso do meio YMA ao contrário do agar-nutriente. O Presidente Dr. Rubens sugeriu eliminar o meio nutritivo e proceder a contagem de contaminantes via ágar manitol + vermelho congo, sendo aprovado pelo plenário. A Prof.^a Fátima M.S. Moreira sugeriu mudanças em relação ao tamanho do vaso, que está muito engessado. Sugeriu métodos novos para identificação de estirpes, que devem ser revistos. Para melhorar o protocolo, sugeriu inserir recomendações para outras leguminosas como feijão caupi (mudar a recomendação, tornando-a clara para outras leguminosas). Ficou claro, na análise da última versão do protocolo, que as alterações aprovadas em RELARES anteriores, exceção das aprovadas na 12^o RELARE, não foram incorporadas ao documento, e que estas deveriam ser incorporadas e publicadas. Ficou aprovado, ainda, que os testes de eficiência agronômica poderão ser realizados em dois ambientes por dois anos ou em quatro ambientes por um ano. Na seqüência, a Dra. Mariangela Hungria apresentou o trabalho: Validação dos parâmetros do protocolo da RELARE recomendados para a avaliação da eficiência agronômica com a cultura da soja, de autoria de Hungria, M.; Souza, R.A.; Campo, R.J.; Franchini, J.C.; Chueire, L.M.O.; Barcellos, F.G. Após a apresentação dos resultados, alterações complementares foram aprovadas no que se refere aos parâmetros a serem avaliados e considerados para a aprovação dos testes de eficiência agronômica. A nodulação, número e massa de nódulos secos por planta deverão ser efetuados em, no mínimo, cinco plantas por parcela aos 30 – 35 dias após emergência. Assim, os parâmetros obrigatórios a serem apresentados para discussão

dos resultados nas avaliações da eficiência agrônômica de inoculantes ou outras tecnologias passam a ser: número de nódulos por planta, massa de nódulos secos em grama/planta aos 30-35 dias após emergência, N nos grãos em (g/kg) e N total nos grãos em (g/kg) e rendimento de grãos em kg/ha.

Painel 4: Seção inoculantes. Inicialmente, o Sr. Eli Lopes, presidente da ANPII apresentou o mapa de comercialização de inoculantes, safras 2004/05 e 2005/06. Ele apresentou ainda, dados sobre o Fundo ANPII e sobre a produção de inoculantes no Brasil. Falou sobre as oportunidades recentes sobre transferência de tecnologia que nós não estamos usando e solicitou cuidado com os protocolos, para que eles não emperrem os processos. Na seqüência, Dra. Eliane V. Bangel apresentou o trabalho procedimentos para alterar a metodologia oficial de controle de qualidade de inoculantes MAPA/FEPAGRO, e o trabalho sobre controle de qualidade de produtos inoculantes realizados pela FEPAGRO no ano de 2005. Dando seqüência à apresentação dos resultados, a Prof^a. Dra. Eliana G. M. Lemos apresentou o trabalho: Qualidade dos inoculantes líquidos para soja comercializados no Brasil, de autoria de Lemos, E.G.M.; Carareto Alves, L.M.; Bento, M.C.; Val-Moraes, S.P.; Lemos, M.T.O. Em função dos trabalhos apresentados, algumas discussões merecem ser registradas. Dr. Eli S. Lopes reforçou a necessidade de se considerar um limite de confiança quando se usam duas amostras para fazer uma análise. Dra Mariangela Hungria sugeriu que, tendo vários dados, pode ser feito um estudo estatístico. Prof^o. Jardim Freire falou sobre a possibilidade de uso do Spacial plate para agilizar. Dr. Eli S. Lopes aconselhou usar o meio semi-seletivo. Dra. Eliana E. G. Lemos disse que meio semi-seletivo interfere no tempo de crescimento do rizóbio, sendo necessário esperar, no mínimo, 15 dias. Este procedimento atrasa o laudo e as empresas não querem esperar. O Presidente Dr. Rubens alertou que, quando houver contaminantes em meio agar manitol, deve-se usar o meio seletivo. O Sr. Solon C Araújo reforçou a necessidade de determinar o intervalo de confiança destas análises e sugeriu que alguém deveria, a partir de uma mesma amostra, fazer umas 100 repetições para se determinar o erro do método. O Sr. Moretti, afirmou sobre a existência de um trabalho sobre o assunto, foi-lhe então sugerido que este trabalho seja disponibilizado a todos. O Presidente Dr.

Rubens concordou com a alteração da metodologia de agitação manual para agitação em vórtex, sugerida pela Prof^a. Eliana G.M. Lemos, mas discordou que isso tenha que ser feito somente com volumes pequenos. O representante do MAPA disse que estão revisando os métodos e que isso pode ser feito, mas pede que os pesquisadores apresentem os dados para que as alterações possam ser seguras e subsidiem a alteração na legislação. Dr. Rubens sugeriu acordo entre laboratórios e empresas para que se façam as análises. O Sr. Solon C. Araújo sugeriu a nomeação de um coordenador. Dra Mariângela Hungria disse que já houve um indicado, mas o trabalho nunca foi feito. Segundo ela, se o MAPA coletar suficiente número de amostras o trabalho pode ser feito. A Profa. Eliana G.M.Lemos propôs coordenar o trabalho, apoiada pelas empresas. Dr. Eli S. Lopes sugeriu que o trabalho seja submetido à ANPIL para obtenção de financiamento. Profa. Fátima M. S. Moreira perguntou sobre as repetições das análises e a análise estatística. Profa. Eliana G.M.Lemos disse que todo o trabalho tem repetições e análises estatísticas. A Pesq. Dra Eliane V. Banguel se propôs a participar e sugeriu que os dados sejam checados ao final, entre os dois trabalhos. Na seqüência, o Presidente Dr. Rubens J. Campo apresentou o trabalho: Eficiência agrônômica do inoculante BIAGRO em pré-inoculação da soja, de autoria de Campo, R.J., Mostasso, F.L., Hungria, M. Na discussão dos resultados, o Presidente Dr. Rubens J. Campo propôs que se faça a pré-inoculação com até cinco dias. Dra. Mariângela Hungria questionou se os dados estão de acordo com o protocolo, que pede, no mínimo, 2000 kg/ha em cada ano. Profa. Fátima M.S. Moreira registrou que os dados têm que ter diferença estatística e que o protocolo diz que rendimentos devem ser superiores a 2000 kg/ha. Sr. Solon C. Araújo diz que há varias RELARES se diz que rendimentos devem ser compatíveis com o protocolo. Optou-se pela discussão do protocolo ao final. Após, a discussão e verificação de todos os resultados apresentados, verificou-se, que dos sete locais cujos resultados foram apresentados, em quatro deles os rendimentos ultrapassavam o exigido pela RELARE. A nova tecnologia de pré-inoculação INTA-BIAGRO, com até cinco dias de antecedência à semeadura sem uso de fungicidas foi, então, aprovada pelo plenário, cabendo à BIAGRO a responsabilidade pela divulgação e uso dessa nova tecnologia com seu inoculante.

Painel 5: Apresentação de resultados de experimentos de avaliação de estirpes (REDE). Discussão sobre possíveis alterações na recomendação atual. O primeiro trabalho desse painel foi apresentado pela Dra. Mariangela Hungria, como título: CPAC 15 ou CPAC 7? Eis a questão! de autoria de Hungria, M.; Mendes, I.C.; Batista, J.S., Barcellos, F.G.; Chueire, L.M.O., M.; Campo, R.J. Na seqüência, a Dra. Mariangela apresentou os trabalhos: SEMIA 5080 (CPAC-7) e SEMIA 5079 (CPAC-15): retrospectiva dos experimentos conduzidos na Embrapa Cerrados. Parte I: olhando para o passado e para o futuro, de autoria de Mendes, I.C.; Vargas, M.A.T.; Peres, J.R.R.; Suhel, A.R.; Reis-Junior, F.B. e o trabalho SEMIA 5080 (CPAC-7) e SEMIA 5079 (CPAC-15), retrospectiva dos experimentos conduzidos na Embrapa Cerrados. Parte II: Fixar N eficientemente é preciso, mas competir pelos sítios de infecção também é, de autoria de Mendes, I.C.; Vargas, M.A.T.; Peres, J.R.R.; Suhel, A.R.; Reis-Junior, F.B. Na discussão dos resultados foi proposta uma moratória de um ano para que a SEMIA 5080 não seja descartada da recomendação. Dr. Eli S. Lopes sugeriu retirar a 5080 da lista de recomendação, por causa da variabilidade e das estirpes de eficiência diferentes. O Sr. Solon C. Araújo disse que a Semia 5080 tem variabilidade alta que inviabiliza sua utilização como inoculante. Sonia M. S. Donadello diz que teve problemas com o inoculante e que só apareceu a 5080. Na seqüência, o Dr. Fábio M. Mercante apresentou o trabalho: Eficiência da fixação biológica de nitrogênio pela inoculação de estirpes de *Bradyrhizobium* em soja, no estado de Mato Grosso do Sul, de autoria de Mercante, F.M.; Otsubo, A.A.; Staut, L.A. - Na seqüência, o Dr. Jerri E. Zilli apresentou o trabalho: Avaliação da fixação biológica de nitrogênio (FBN) na cultura da soja no cerrado de Roraima, de autoria de J. E. Zilli; R. J. Campo; Gianluppi; O. J. Smiderle; M. Hungria. - Na seqüência, o Presidente Dr. Rubens J. Campo apresentou o trabalho: Avaliação de estirpes ou combinações de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* para a soja, de autoria de Campo, R.J., Hungria, M. Na discussão dos resultados o Presidente Dr. Rubens J. Campo propôs que a estirpe SEMIA 587 seja usada sozinha no inoculante. A Profa Fátima M. S. Moreira propôs que se continue usando duas estirpes. Dr. Rubens J. Campo argumenta que seja usada apenas uma e que a indústria apóia esta idéia porque é mais pratico e reduz custos. Sr. Cayo Garcia Blasquez Morote diz que a

maioria dos produtores é favorável a apenas uma estirpe porque a maioria dos inoculantes tem variações na quantidade das estirpes, predominando uma. Dr. Fabio M. Mercante argumentou que, se for uma estirpe, deve ser uma recomendação regional, porque uma recomendação nacional não garante a sobrevivência delas. O Dr. Rubens J. Campo disse que são sete anos de experimentação que mostram que pode ser uma única estirpe. O Professor Jardim Freire disse que se usavam 10 estirpes no começo. Dr. Rubens J. Campo pergunta: manteremos as 4 estirpes? Dr. Eli S. Lopes sugeriu que se retire a 5080. Dra. Mariangela Hungria discorda, porque ela se estabelece muito bem em áreas de primeiro ano e é muito eficiente. Como decisão final ficou a recomendação das quatro estirpes e a indústria decide se usa uma ou duas das quatro recomendadas em seu inoculante. O presidente da RELARE comunicará oficialmente o ministério.

Painel 6: Avaliação e/ou recomendação de estirpes. - O primeiro trabalho deste painel foi apresentado pelo Dr. Fábio M. Mercante, com o título Seleção de estirpes de rizóbio para inoculação em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), de autoria de Mercante, F.M.; Otsubo, I.M.N.; Pelegrin, R.; Tarasiuk, V.A.; Silva-Júnior, A. Na seqüência, o Dr. Fábio M. Mercante apresentou o trabalho: Eficiência simbiótica de isolados de rizóbio em feijoeiro na presença de exsudatos de sementes de *Mimosa flocculosa* e/ou N-mineral, de autoria de Mercante, F.M.; Otsubo, A.A.; Cavalheiro, J.C.; Gil, F.K.U. O sr. Solon C. Cordeiro questionou sobre a forma de obtenção do exsudato e como usar. O Dr. Fábio M. Mercante explicou que usou o exsudato de semente a 10% do inoculante, e que este foi obtido em água após uma noite em agitação. Na seqüência, a Profa Fátima M.S. Moreira apresentou o trabalho: Isolamento, seleção, caracterização e identificação de estirpes eficientes para inoculação em feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), de autoria de Moreira, F.M.S.; Andrade, M.J.B.; Soares, A.L.L.; Oliveira, C.; Ferreira, P.A.A.; Pereira, J.P.A.R.; Vale, H.M.M. Na seqüência, a Profa. Fátima M.S. Moreira apresentou o trabalho: Isolamento, seleção, caracterização e identificação de estirpes eficientes para inoculação de caupi, recomendadas pela RELARE 2004 (INPA 3-11B e UFLA 384) e referendadas na IN10 de 21/3/2006, de autoria de Moreira, F.M.S. e colaboradores. Com base nos resultados a Profa Fátima M.S. Moreira recomendou substituir a BR2001 pelas UFLA-384 e INPA 3-11 B, na produção de inoculantes de

caupi. Na seqüência, foi apresentado trabalho: Eficiência agrônômica de estirpes de rizóbio em feijão-caupi, de autoria de Rumjanek, N.G.; Xavier, G.R.; Martins, L.M.V.; Morgado, L.B.; Alcantara, R.M.C.M.; Freire-Filho, F.R.; Dantas, J.P.; Santos, C.E.R.S.; Zilli, J.E. Costa, J.R; O Dr Gustavo R. Xavier sugere a manutenção do caráter provisório da BR 3267, recomendada na XII RELARE. O pesquisador Dr. Jerri E. Zilli solicitou que se defina qual espécie deve ficar. O Presidente Dr. Rubens J. Campo sugeriu que deva ser recomendada. Sugeriu, ainda, que Profa. Fátima M.S. Moreira e Dra. Norma G. Rumjanek troquem e testem as estirpe. Dra Norma G. Rumjanek solicitou que não se retire a 167, mas sim usem as duas. Dr. Rubens J. Campo disse que, para caupi, não existe protocolo RELARE, somente para soja e feijão. Dra Veronica M. Reis disse que várias partes do protocolo para outras foram cumpridas e como não há protocolo definido ela pode ser recomendada. Profa Fatima M. S. Moreira concordou com Dr Gustavo R. Xavier que inoculantes não são só para soja e feijão, devido à utilização de leguminosas na agricultura. Dr. Fábio Mercante ressalta que, devido aos resultados extremamente positivos, as estirpes devem ser recomendadas. Sr. Solon C. Araujo disse que os dados estão super consistentes e afirma pela recomendação. Dr. Jerri E. Zilli afirmou que tres estirpes devam ficar, a saber, semia 6461, BR3262 e BR3267. Estes pesquisadores se propoem a se reunir para preparar um protocolo para o próximo ano, e testar estas estirpes em conjunto. Ao final, mantém-se a recomendação oficial das estirpes BR 3301 (SEMIA 6463) BR 3302 (SEMIA 6461). Na seqüência, o Senhor Caio G. Blasquez apresentou o trabalho: Esterilização da turfa, de autoria de Blasquez, C.G; Hutzler, B.W; Vizeu D.M.

Os trabalhos do dia 03 de junho se iniciaram às 8 horas, dando seqüência à apresentação de trabalhos ainda relacionados ao Painel 6: Avaliação e/ou recomendação de estirpes. O primeiro trabalho deste dia foi apresentado pelo Pesquisador Dr. Edegar Brose, intitulado Estudos da eficiência de estirpes de rizóbio para ervilha em condições de campo, de autoria de Brose, E.; Muniz, A. W. - Na seqüência, o mesmo pesquisador apresentou o trabalho: Estudos da variabilidade genética entre estirpes de rizóbio para ervilha e lentilha por meio de RFLP, de autoria de Brose, E.; Muniz, A. W. Na seqüência, novamente o Dr. Edegar Brose apresentou o trabalho: Especificidade hospedeira entre estirpes de rizóbio e variedades de ervi-

lha, de autoria de Brose, E.; Muniz, A. W. Na discussão dos resultados, o Dr. Edemar Brose pede decisão sobre a recomendação da SEMIA 3012. Dra Eliane V. Banguel relatou que, quando se recupera esta estirpe diretamente do nódulo, ela nodula, mas de repiques sucessivos ela não nodula. Concorda com Dr. Edemar Brose e pede, também, que se retire a 3012 da recomendação. A 3012 fica, então, indicada para ser incluída nos testes de eficiência, nível 3 de recomendação. Sr. Solon C. Araújo diz que deve ser recomendada a EEL 7802 para uso juntamente com a SEMIA 3007. O último trabalho deste painel foi apresentado pelo Sr. Jonatas B. Alves, com o título: Isolamento e seleção de rizóbios para trevo branco em condições de áreas de várzea, de autoria de Alves, J.B.; Sá, E.L.S. de.

Painel 7: Apresentações de trabalhos relacionados à tecnologia de inoculação. - O primeiro trabalho deste dia foi apresentado pelo Prof. Francisco C. Krzyzanowski, intitulado: Volume de calda com diferentes produtos para o tratamento de semente de soja e seu efeito sobre a qualidade fisiológica, de autoria de Krzyzanowski, F.C., Henning, A.A., França-Neto, J.B., Lopes, I.O.N., Zorita, M.D. Segundo o Prof. Francisco C. Krzyzanowski, no Brasil Central se questiona o uso de volume máximo de 300 ml. Ele alertou que a quantidade de água está relacionada a qualidade da semente. Assim, em lotes de alto e médio vigor é possível utilizar o tratamento completo, com alto volume de calda. Na seqüência, o Sr. C.A. Penna apresentou o trabalho: Tres factores que afectan la calidad de la inoculación, de autoria de Olivieri, F.; Penna, C.A.; Demares, D. Na seqüência, o Dr. Rubens J. Campo apresentou o trabalho: Recuperação de células de *Bradyrhizobium* em semente de soja inoculada, armazenada e tratada com fungicidas e micronutrientes, de autoria de Campo, R.J.; Moretti, E. M.; Mostasso, F. L.; Miura, L. M.; Hungria, M. Na discussão dos resultados, Profa. Fátima M.S. Moreira ressaltou que o inoculante turfoso permite melhor recuperação de células. Dr. Rubens J. Campo alertou que é difícil homogeneizar o inoculante com apenas 3 ml/kg de semente. Citou que o ideal seriam 6 ml. Ele alertou que a tecnologia de inoculação precisa ser melhorada, porque os inoculantes melhoraram, mas sua metodologia de aplicação continua ruim. Dr. Rubens acredita que seja por falta de orientação aos agricultores. Sr. Solon C. Araújo concordou que, hoje, os inoculantes têm alta qualidade, mas realmente a tecnologia de aplicação precisa ser melhorada. A

distribuição do inoculante na semente precisa ser melhorada. Sr. Sergio Bdzinski perguntou o que a pesquisa tem a dizer sobre o uso de protetores de sementes. Dr. Rubens J. Campo argumentou que não existe nenhum registro destes produtos. Ele acha ainda que cada empresa deveria fazer a orientação técnica do inoculante que ela produz. Esta orientação deveria estar descrita no rótulo da embalagem do produto. Isso pode aumentar a eficiência da inoculação. Dra Mariangela Hungria acha que é preciso uma recomendação técnica da pesquisa para que se faça uma recomendação do volume mínimo de inoculante líquido e o nível mínimo de peso para o inoculante turfoso. Segundo ela, o agricultor internalizou os 300 ml. Ladislau Paes alerta que os agricultores têm dificuldade de praticar outros volumes. Ele acha que o agricultor usa os 300ml para sementes. João Francisco Berton Junior acha que nem sempre se tem boa semente, e por mais que a recomendação esteja descrita no pacote, o agricultor só lê na hora em que ocorre o problema. Sr. Solon C. Araújo diz que a indústria tentou reduzir o volume de inoculante de alta concentração para uso em quantidade menor. Ele acha que não dá para aumentar o volume por um fator custo, porque a turfa representa custos. A alternativa é usar um diluente, ou seja, uma calda. Solon diz que concorda com Ladislau que o agricultor aceitou bem os 300 ml. Sobre o uso conjunto de inoculantes, fungicidas e micronutrientes na semente, segundo Dr. Rubens J. Campo os micronutrientes não precisam ser aplicados na semente. Eles exercem um efeito salino grave sobre a sobrevivência dos rizóbios, por isso, Dr. Rubens sugere que a aplicação seja via foliar, na mesma dose a aplicar nas sementes. No RS a dose recomendada para aplicação via foliar é o dobro da dose, porque aproximadamente as plantas nessa idade ocupam 50% da área, embora não haja resultados de pesquisa que justifiquem essa recomendação. Alberto diz que a legislação brasileira mudou e que agora é exigido que se coloque o índice salino no produto e faz a pergunta: Qual índice salino que mata o rizobio? Ninguém tem a resposta. Dr. Rubens acha que a empresa que informar o grau de sobrevivência da bactéria, do seu produto, na semente vai ganhar mercado em relação às demais. Professora Eliana G.M. Lemos disse que já evoluímos em inoculantes líquidos, mas disse que temos que buscar novas tecnologias com a turfa, porque ela vai acabar. Ela acha, ainda, que os trabalhos usando inoculan-

tes no sulco precisam ser repetidos. Dr. Rubens J. Campo alertou que a inoculação do sulco aumenta a quantidade de inoculante que precisa ser utilizada. Ele sugeriu que cada empresa deve ser responsável pela sua própria técnica de inoculação, especificando no rótulo. Sr. Solon C. Araújo concorda que cada empresa deve assumir a responsabilidade pelos seus produtos, e reverter a situação de ter informações pouco detalhadas nos seus rótulos. A recomendação de uma quantidade mínima de inoculante vai frear a criatividade das empresas. Com relação ao Mo e Co, as empresas estão trabalhando muito no sentido de ter inoculantes menos agressivos à semente. Senhor Cayo Garcia Blasquez concordou que, hoje, temos diferentes produtos e que cada um deve ser responsável por seu produto. A seguir, Senhor Presidente, Rubens José Campo, apresentou uma sugestão para as empresas que produzem e comercializam inoculantes, "Cada empresa precisa oferecer inoculante de boa qualidade e as informações técnicas adicionais de inoculação que permitam a melhor distribuição e sobrevivência das células de *Bradyrhizobium* nas sementes inoculadas para maximizar a FBN". A sugestão foi aprovada por todos, de forma que os inoculantes comercializados deverão conter na embalagem as informações técnicas adicionais para melhorar a distribuição e a sobrevivência do inoculante nas sementes.

Painel 8: Trabalhos em metodologia de estudos. O primeiro trabalho deste painel foi apresentado pela pesquisadora Pâmela Menna com o título taxonomia das estirpes de rizóbios recomendadas para o uso em inoculantes comerciais no Brasil, de autoria de Menna, P.; Barcellos, F.G.; Bangel, E.V.; Hungria, M. Na seqüência, o Dr. Enilson L.S. de Sá apresentou o trabalho: Utilização de formulações à base de biopolímeros como suporte para inoculantes de leguminosas, de autoria de Schuh, C.A.; Alves, J.B.; Freire, J.R.J.; SÁ, E. L. S. De. Na seqüência, a Dra Mariangela Hungria apresentou o trabalho: Nutrição nitrogenada da soja: contribuição da fixação biológica do N₂ e do fertilizante nitrogenado para o rendimento de grãos, de autoria de Hungria, M.; Franchini, J.C.; Campo, R.J.; Crispino, C.C.; Moraes, J.Z.; Sibaldelli, R.N.R.; Mendes, I.C. Na seqüência, o Dr. Rubens J. Campo apresentou o trabalho: Metodologia de contagem de *Bradyrhizobium* em semente inoculada e/ou tratada com fungicidas e micronutrientes, de autoria de Campo, R.J., Miura, L. M. , Hungria, M. Na discussão dos resultados,

Dra Mariangela Hungria disse que, hoje, não existe um método padronizado de contagem de células. Propõe testar este e outros para se ver quanto de células tem nas sementes. O Sr. Claudio Penna disse na sessão que o método mais eficiente é a agitação magnética, por quatro hs. Sr. Cayo G. B. Morote disse que usa por duas horas e que a umidade do ar é suficiente para alterar a sensibilidade do método.

Painel 9: Apresentação de outros trabalhos. O primeiro trabalho deste painel foi apresentado pela Dra Elaine V. Banguel, com o título: Metodologias de caracterização para o monitoramento das estirpes liofilizadas SEMIA, recomendadas na produção de inoculantes, de autoria de Bangel, E.V.; Meyer, J.V.; Oliveira, A.M.R.; Silva, G.M.; Ávila, L.D.; Messa, L.; Aquino, A.S.; Hungria, M.; Chueire, L.M.; Menna, P. - Na seqüência, o Dr. Cimélio Bayer apresentou o trabalho: Resposta da soja à reinoculação em solos com população estabelecida de *Bradyrhizobium*, em GUARAPUAVA (PR) e CRUZ ALTA (RS), de autoria de Bayer, C.; Campos, B. C.; Fontoura, S. M. V.; Bangel, E.; Giongo, A.; Freire, J. R. J. - Na seqüência, o Dr. Wladecir S. de Oliveira apresentou o trabalho: Uso de inoculante comercial à base de *Azospirillum brasilense* (NOCTIN AZO) como promotor de crescimento em gramíneas, de autoria de Oliveira, W.S.; Bonfiglio, C.H.; Batista, R.B.; Oliveira, P.P.A. Na seqüência, o Dr. Wladecir S. de Oliveira apresentou o trabalho: Dupla inoculação em sementes de soja com inoculante comercial à base de *Azospirillum brasilense* (NOCTIN AZO) e inoculante comercial à base de *Bradyrhizobium japonicum* (NOCTIN A), de autoria de Oliveira, W.S.; Bonfiglio, C.H.; Batista, R.B.; Na seqüência, a Professora Fátima M. S. Moreira apresentou o trabalho: identificação e recomendação de bactérias eficientes na fixação de nitrogênio para leguminosas florestais, de autoria de MOREIRA, F.M.S.¹ e FARIA, S.M., ficando assim encerrados a apresentação dos trabalhos da 13^o RELARE.

Conforme aprovado na 12^o RELARE e constante em ata aprovada e publicada, os resultados de pesquisa e a divulgação das estirpes de *Azospirillum* apresentados e aprovados naquela ocasião para uso da pesquisa e indústria naquela RELARE, por estarem à época em negociação entre as instituições envolvidas, não foram inclusos na ATA da 12^o RELARE mas seriam, na ATA da RELARE seguinte, cumprindo assim as exigências da RELARE e MAPA.

A seguir, relatam-se os resultados apresentados referentes ao teste de eficiência agrônômica de inoculantes turfosos e líquidos contendo *Azospirillum*, para as culturas do milho e do trigo, apresentados na RELARE de 2004 por Mariangela Hungria (Embrapa Soja). Os estudos foram conduzidos por Mariangela, Fábio O. Pedrosa (UFPR), Rubens J. Campo (Embrapa Soja), Julio Cezar Franchini (Embrapa Soja), Emanuel M. Souza (UFPR) e Fábio L. Mostasso, na época estudante de especialização na Embrapa Soja. Inicialmente, foram conduzidos ensaios em laboratório e casa de vegetação, visando selecionar subestirpes de *Azospirillum* com maior capacidade de promoção de crescimento das plantas. A metodologia de seleção tomando por base a variabilidade natural existente dentro de uma mesma estirpe foi descrita pelos pesquisadores da Embrapa Cerrados (Peres et al. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.8, p.193-196, 1984). As subestirpes selecionadas diferem geneticamente das parentais sem, contudo, ser geneticamente modificadas. A eficiência agrônômica das estirpes e inoculantes contendo *Azospirillum* foi avaliada em ensaios a campo, conduzidos por três safras, em dois ecossistemas representativos das culturas do milho e do trigo, em Londrina (campo experimental da Embrapa Soja) e em Ponta Grossa (campo experimental do Serviço de Produção de Sementes Básicas da Embrapa). Os ensaios foram conduzidos tomando, como base, o protocolo recomendado para leguminosas, uma vez que os protocolos para avaliação de bactérias diazotróficas e de bactérias promotoras do crescimento de plantas ainda não haviam sido elaborados. Foram testadas oito variantes de *A. brasilense* (Ab-V1 a Ab-V8) e duas variantes de *A. lipoferum* (Al-V1 e Al-V2). Foram preparados dois tipos de inoculante: 1) turfa estéril com adição de um aditivo que permite maior concentração de células e incrementa a viabilidade do *Azospirillum* no substrato; como adesivo, foi utilizada solução açucarada a 10%; 2) inoculante líquido desenvolvido na fase preliminar do estudo. O delineamento experimental dos ensaios foi em blocos ao acaso, com parcelas de 3 m (4 linhas de 0,8 m = 12 m²) X 4 m, distanciadas por 1 m e com corredores de 2 m, resultando em uma área útil com 1,6 m (2 linhas de 0,8 m) X 3 m, totalizando 4.8 m². Todos os ensaios receberam adubação conforme a análise do solo e incluíram controles sem *Azospirillum* (inoculado apenas com turfa estéril contendo aditivo e solução açucarada a 10%), com a dose

de fertilizante nitrogenado recomendada para cada cultura. De modo geral, não houve efeito consistente da inoculação no teor de nutrientes nas folhas coletadas no florescimento, contudo, também não houve relação entre o teor de nutrientes nas folhas no florescimento e o rendimento de grãos. Os inoculantes turfosos contendo as estirpes Ab-V4, Ab-V5, Ab-V6 ou Ab-V7 resultaram em incrementos estatisticamente significativos (Duncan, 5%) no rendimento do milho, em duas regiões representativas do cultivo, por pelo menos duas safras. Os incrementos médios no rendimento do milho variaram de 696 a 859 kg/ha, correspondendo a 24,8% a 30,6%, em relação ao tratamento não inoculado. O Eli Lopes questionou a baixa produtividade do milho, inferior a 3.500 kg/ha, mas a Mariangela respondeu que esse inoculante visava atender às demandas da agricultura familiar, agricultura orgânica, ou aqueles produtores que desejassem esses patamares de produtividade. Os inoculantes turfosos contendo as estirpes Ab-V1, Ab-V5, Ab-V6 ou Ab-V8 resultaram em incrementos no rendimento do trigo em duas regiões representativas do cultivo, por duas safras. Os incrementos médios no rendimento do trigo variaram de 201 a 236 kg/ha, ou de 8,2 a 11,3%, em relação ao tratamento não inoculado. O inoculante líquido contendo a estirpe Ab-V5 foi testado com a cultura do milho por duas safras, em Londrina e por uma safra, em Ponta Grossa. Para a cultura do trigo, o mesmo inoculante foi testado por uma safra em Londrina e uma em Ponta Grossa. Nos cinco ensaios, foram constatados incrementos nos rendimentos do trigo e do milho, em relação ao controle não inoculado, estatisticamente significativos (Duncan, 5%) e semelhantes ao obtido com o inoculante turfoso. Ao terminar a apresentação, Mariangela solicitou aprovação do teste de eficiência agrônômica do inoculante turfoso contendo aditivo e as estirpes Ab-V4, Ab-V5, Ab-V6 ou Ab-V7, para a cultura do milho e as estirpes Ab-V1, Ab-V5, Ab-V6 ou Ab-V8, para a cultura do trigo. Quanto ao inoculante líquido contendo a estirpe Ab-V5, embora o comportamento tenha sido semelhante ao do inoculante turfoso com aditivo, Mariangela comunicou que irá conduzir os ensaios por mais uma safra, para que os resultados obedeçam ao critério de duas safras em dois ecossistemas. Após os debates da plenária, os resultados foram colocados em votação para aprovação dos representantes das instituições credenciadas, com as seguintes propostas: 1) Aprovar o inoculante

turfoso contendo as bactérias acima mencionadas para as culturas do milho e do trigo; 2) Quanto às estirpes, propor uma comissão de cinco pessoas para, no prazo de 60 dias, analisar a proposta e dar um parecer; 3) Esperar até a próxima RELARE e incluir mais resultados dos estudos que estão em andamento. Essas propostas foram feitas por Mariangela Hungria, Vera L. Baldani e Arnaldo Colozzi-Filho, respectivamente. Das 18 instituições votantes, 16 foram a favor da primeira proposta (MIRCEN, IAPAR, Embrapa Cerrados, FUNDACEP, Rizobacter, Biosoja, Turfal, Nital, BASF, Centro de Negócios, Unicastelo, EPAGRI, FEPAGRO, Microquímica, Embrapa Agropecuária Oeste e Embrapa Soja), uma a favor da segunda proposta (Embrapa Agrobiologia) e uma abstenção do representante do Ministério da Agricultura, que pediu para se abster de toda e qualquer votação. Encerrada a votação, foi aprovado que: "O inoculante turfoso com aditivo contendo as estirpes de *A. brasilense* Ab-V4, Ab-V5, Ab-V6 ou Ab-V7 utilizado para a cultura do milho, e o inoculante turfoso com aditivo contendo as estirpes de *A. brasilense* Ab-V1, Ab-V5, Ab-V6 ou Ab-V8 utilizado para a cultura do trigo, foram aprovados em votação pela RELARE, para fins de registro e utilização nessas culturas, tendo obedecido aos critérios de eficiência agrônômica a campo". Ficou decidido, ainda, que esses inoculantes não precisam ser utilizados como padrão em testes futuros para essas culturas.

Com isso, encerraram-se os trabalhos técnicos as 13^o RELARE e nada mais havendo eu, Arnaldo Colozzi Filho, lavrei a presente ata que vai assinada por mim e pelo Presidente.

Relação de participantes que preencheram a ficha de inscrição:

- Adolfo Rugai
ARCA - Adolfo Rugai Cons. Agro.
adolfo.rugai@ajato.com.br
- Aguinaldo Parussolo
MAPA
aguipar@agricultura.gov.br
- Alexandre Jose Catellan
Embrapa Soja

- catellan@cnpso.embrapa.br
- Alexandre Tramontini
Ceptron
tramontini@centronegocios
- Alfredo Balina
Nitragin
abalina@nitrogin.com.az
- André Floriani Kniphoff
Total Biotecnologia
totalbiotecnologia@totalbiotecnologia.com.br
- Antonio Nelson Ballen
Bioagro
bioagro@terra.com.br
- Antonionelson Joner
Bioagro Ind. Com. de Produtos Agropecuarios Ltda.
bioagro@terra.com.br
- Armando Saretto Parducci
Bioarto
armando.parducci@bcoarts.com.br
- Arnaldo Colozzi
IAPAR
- Cayo Garcia-Blásquez Morote
Stoller do Brasil Ltda.
cayo@stoller.com.br
- Cfarlos Garcia
Laboratorios Biagro S.A.
cgarcia@biagrosa.com
- Cirlene Aparecida Pescador
MAPA
cirlene@agricultura.gov.br
- Claudio Penna
Nitragin Argentina S.A.
cpenna@nitrgin.com.ar
- Daniel Gorlero
Nitrasoil Argentina S.A.

- dgorlero@lageycia.com
- Diva Souza Andrade
IAPAR
diva@iapar.br
 - Dora Inês Kozusny-Andreani
Universidade Camilo Castelo Branco – UNICASTELO
doraines@unicastelo.br
 - Eli Sidney Lopes
Bio Soja Indústrias Químicas e Biológicas Ltda.
elilopes@biosoja.com.br
 - Eliana G. de Macedo Lemos
Univ. Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP
egerle@fcav.br
 - Eliane Villamil Bangel
Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária - FEPAGRO
eliane-bangel@fepagro.rs.gov.br
 - Elizabeth Druzian Marçal
Marchand Agrícola e Pecuária Ltda.
marchand.agri@terra.com.br
 - Emanuel M. de Souza
Universidade Federal do Paraná
souzaem@ufpr.br
 - Enrique Moretti
BIAGRO
directorio@biagrosa.com
 - Fábio Luís Mostasso
Embrapa Soja
mostasso@cnpso.embrapa.br
 - Fábio Martins Mercante
Embrapa Agropecuária Oeste
mercante@cpao.embrapa.br
 - Francisco Carlos Krizzizanosvk
Embrapa Soja
fck@cnpso.embrapa.br
 - Francisco Motta Bicca

MAPA/SFA/RS

fbicca@agricultura.gov.br

- Gustavo Adolfo Masera
Rizobacter do Brasil Ltda.
ribrag@yahoo.com
- Janaina Rigonato
IAPAR
jana_rigonato@yahoo.com.br
- Janksyn Bertozzi
IAPAR
jbortozzi@bol.com.br
- Jerri Édson Zilli
Embrapa Roraima
zilli@cpafrr.embrapa.br
- João Francisco Berton Junior
Turfal Ind. e Com. de Prod. Biol. e Agron. Ltda.
- Jonatas Bredow Alves
Rizobacter do Brasil Ltda.
jbredow@pop.com.br
- Jorge Meyer
Cepron Agro.
jorgemeyer@centronegocios.com.br
- Jorge Prado
Cepron
- Jorge Roberto Talamini
MAPA
talamini@agricultura.gov.br
- Julio Alberto Campos Joner
Bioagro Indústria Comércio de Produtos Agropecuários Ltda.
jcjoner@yahoo.com.br
- Juscélio Donizete Cardoso
IAPAR
jusceliocardoso@hotmail.com
- Kelly Campos Guerra P. Goes
IAPAR

- kellycgp@hotmail.com
- Kennedy Fernandes Martins
MAPA
kennedy@agricultura.gov.br
 - Kevin H. Freyburg
Suinocultura Eurotec Ltda.
kevin_hf@terra.com.br
 - Leticia Andreguetto Maciel
Sibiottica Indústria e Com. de Prod. Agric.
leguetto@hotmail.com
 - Loislan Paes
Nitral Urbana
 - Maecelo Kerkhoff
Turfal
marcelo@turfal.agr.br
 - Marcelo de Godoy Oliveira
Cepron Agro.
marcelo@centronegócios.com.br
 - Marcio de Arruda Queiroz
Ministerio da Agricultura, Pecuaria e Abastecimento
marcioqueiroz@agricultura.gov.br
 - Maria Aparecida de Matos
IAPAR
mariadematos@iapar.br
 - Maria Candida Bento
Bioarts Indústria e Comércio de Biotecnologia Ltda.
candida.bento@gmail.com
 - Maria Elena Munhoz Bambiche
Turbosolo
 - Mariangela Hungria
Embrapa Soja
hungria@cnpso.embrapa.br
 - Martin Lage
Nitrasoil Argentina S/A
lage@lageycia.com

- Mauricio Jose Candido
Faculdade de Ciencias Agrarias
robson@yahoo.com.br
- Maurício Leon Lefcovich
Cepcon
mauricio@centronegocios
- Mauro S. Parra
IAPAR
maurosp@iipar.br
- Orazilia França Dorigo
IAPAR
orazilia@iipar.br
- Oswaldo Machineski
IAPAR
omachine@iipar.br
- Pâmela Menna
Embrapa Soja/Uel
pamela_menna@yahoo.com.br
- Pedro Lage
Nitrasoil Argentina S/A
lage@nitrasoil.com.br
- Poliana Thaissa Soares
IAPAR
polianathaissa@bol.com.br
- René Pedro Grando
Microquímica Indústrias Químicas Ltda.
renegrando@pop.com.br
- Ricardo Nobuo Ishida
MAPA
ricardoishida@ig.com.br
- Ricardo Silva Araújo
Katec Agro Técnica Ltda.
rsarsa@gmail.com
- Roberto Berwanger
Microquímica Indústrias Químicas Ltda.

- roberto@microquimica.com
- Robson Bergamaschi
Cepron
robsonbergamaschi@yahoo.com.br
 - Robson Cavalcante de Lima
Faculdade de Ciências Agrárias/Univ. Camilo Castelo
robson@yahoo.com.br
 - Rubens Carlos Buschmann Junior
Turfal Ind. e Com. de Prod. Biol. e Agronômicos Ltda.
turfal@turfal.agr.br
 - Rubens José Campo
Embrapa Soja
rjcampo@cnpso.embrapa.br
 - Sergio C. Badzinski
Turbosolo
 - Sidnéia dos Santos
IAPAR
sidneia_bio@yahoo.com.br
 - Solon Cordeiro de Araujo
Stoller do Brasil Ltda.
solon@tmh.com.br
 - Sonia Maria Sava Donadello
Total Biotecnologia
totalbiotecnologia@totalbiotecnologia.com.br
 - Tânia Teresinha Sava
Total Biotecnologia
totalbiotecnologia@totalbiotecnologia.com.br
 - Tássia Stori de Aquino
IAPAR
tas_aquino@hotmail.com
 - Vera Lúcia Divan Baldani
Embrapa Agrobiologia
vera@cnpab.embrapa.br
 - Veronica Massena Reis
Embrapa Agrobiologia

veronica@cnpab.embrapa.br
• Wladecir Salles de Oliveira
Sintesis Química Saic
wsolivei@gmail.com

Rubens José Campo
Presidente

Arnaldo Colozzi Filho
Secretário

Ata da XIII RELARE

Aos três de junho de 2006, no Cedro Hotel localizado à Av. Juscelino Kubistchek, 200, em Londrina, Paraná, sob a coordenação do presidente em exercício da RELARE, Rubens José Campo (Embrapa Soja), e do secretário, Arnaldo Colozzi Filho (IAPAR - Instituto Agrônômico do Paraná) estiveram reunidos os membros da RELARE: CENTRO DE PROMOÇÃO DE NEGÓCIOS LTDA - Mauricio Leon Lefcovich; TURFAL INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE PRODUTOS BIOLÓGICOS E AGRONÔMICOS LTDA - Rubens C. Buschmann Junior; EMBRAPA AGROBIOLOGIA – Gustavo Ribeiro Xavier; UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – Enilson Luiz Sacool; UNICASTELO- Dora-Inês Kozusny-Andreani; UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS – Fátima Maria de Souza Moreira; EMBRAPA SOJA – Mariângela Hungria; IAPAR - Diva Souza Andrade; EMBRAPAAGROPECUÁRIA OESTE – Fabio Martins Mercante; FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - Eliane Villamil Bangel; KATEC-AGRO-TÉCNICA LTDA – Ricardo Silva Araújo; MICROQUÍMICA INDÚSTRIAS QUÍMICAS LTDA - Roberto Berwanger Batista; BIOSOJA - Eli Sidney Lopes; BIOAGRO IND. COM. AGROP. LTDA – Eli Sidney Lopes (representante) e a empresa TURBOSOLO COM. IMP. PRODUTOS AGROPECUÁRIOS, cadastrada no lugar da empresa Campo Verde Com. Imp. Produtos Agropecuários, representada por Sergio Claudino Badzinski, devidamente cadastrados e diversos outros membros da RELARE não cadastrados para participar da 13ª RELARE e deliberar sobre os seguintes assuntos: promover alterações no Estatuto Social; instituir e atribuir funções ao Conselho Fiscal; eleger a diretoria da RELARE para o biênio junho de 2006 a maio de 2008; eleger um Conselho gestor para o fundo RELARE; eleger o conselho fiscal para o biênio junho de 2006 a maio de 2008; outros assuntos.

1. Alterações estatutárias propostas e aprovadas:

1.1. Art. 8º

DE: - A Assembléia Geral é o órgão máximo da associação e se reunirá em caráter ordinário de dois em dois anos, sempre na segunda quinzena do mês de maio.

PARA: - A Assembléia Geral é o órgão máximo da associação e se reunirá em caráter ordinário, de dois em dois anos. Por sugestão das empresas produtoras de inoculantes recomenda-se que a Assembléia Geral seja realizada na 2ª quinzena de maio.

1.2. Art. 14

DE: - A Diretoria da RELARE será composta por:

Presidente;

Vice Presidente;

Secretário.

PARA: A Diretoria da RELARE será composta por:

Presidente;

Vice Presidente;

Secretário e

Conselho Fiscal

1.3. Art. 17 - São atribuições do Presidente, "alínea f"

DE: Assinar cheques bancários

PARA: Em conjunto com o secretário ou o vice-presidente, assinar cheques bancário.

1.4. Art. 18

DE: - Compete ao vice-presidente assistir as reuniões da Diretoria e substituir o titular nos impedimentos legais.

PARA: - Compete ao vice-presidente assistir as reuniões da Diretoria e substituir o titular nos impedimentos legais, inclusive assinar cheques bancários em conjunto com o presidente ou o secretário.

1.5. Art. 19

Art. - Compete ao Secretário:

INCLUIR a "alínea e": em conjunto com o Presidente ou Vice Presidente, assinar cheques bancários.

1.6. Incluir o Art. 20 com a seguinte redação:

Art. 20 - O conselho fiscal será constituído de seis membros da RELARE, três titulares e três suplentes.

Parágrafo 1º - O conselho fiscal será eleito juntamente com a diretoria da RELARE e terá mandato de dois anos, sem direito a reeleição de seus membros titulares.

Parágrafo 2º - Compete ao conselho fiscal:

- fazer cumprir o presente estatuto;
- fiscalizar as contas da RELARE; e
- fiscalizar as aplicações dos recursos da RELARE.

1.7. Art. 23 - Para atender a despesas administrativas ou de outra natureza, a Assembléia Geral poderá determinar a cobrança de taxas dos associados, estipulando seu valor, bem como receber contribuições, doações ou rendimentos de outras fontes, permanentes ou eventuais.

INCLUIR

Parágrafo 1º - Para atender aos objetivos a que se destinam, as Empresas que comercializam Inoculantes no Brasil deverão contribuir para o Fundo RELARE com um centavo por dose de inoculante comercializado.

Parágrafo 4º - O aporte dos recursos por parte das empresas será em junho de cada ano e o valor a depositar será de um centavo de cada dose comercializada declarado ao MAPA, descontadas as devoluções;

Art. 24 - Fica instituído o comitê gestor do fundo RELARE, que será constituído de seis membros, três das empresas que comercializam inoculantes e três membros da pesquisa. São membros natos do fundo comitê gestor, os presidentes da RELARE e da ANPII.

2. Eleição dos membros da diretoria e do conselho fiscal da RELARE e do conselho gestor para o fundo RELARE biênio junho de 2006 a maio de 2008.

Não havendo mais que uma chapa concorrente a diretoria da RELARE para o biênio junho de 2006 a maio de 2008 foi eleita por aclamação ficando assim constituída:

Presidente: Fábio Martins Mercante;

Vice-Presidente: Solon Cordeiro de Araújo;

Secretário: Eliana G. M. Lemos.

Membros do conselho fiscal titulares: Fátima Maria de Souza Moreira; Roberto Berwanger Batista; Enilson Luiz Sacool.

Membros do conselho fiscal suplentes: Rubens C. Buschmann Junior, Mariângela Hungria e Diva Souza Andrade.

Membros do conselho gestor do fundo RELARE: da Pesquisa, Mariângela Hungria e Enilson Luiz Sacool; da indústria, José Roberto Sttoller e Gustavo Pinto Silva.

3. Outros assuntos

Em discussão sobre o protocolo para leguminosas, deliberou-se pela aceitação dos resultados de eficiência agrônômica quando os quatro ensaios forem realizados num mesmo ano desde que em condições ecológicas distintas, ou dois ensaios por dois anos, em condições ecológicas distintas. Também deliberou-se e foi aprovada a contagem e pesagem de nódulos de no mínimo cinco plantas por parcela. Para os testes de eficiência agrônômica manteve-se a aprovação anterior de que os ensaios só serão aceitos se a produtividade mínima, em áreas de população estabelecida da bactéria, for superior a 2000 kg/ha, tanto para tratamentos inoculados como para aqueles com nitrogênio. Para áreas de primeiro ano de cultivo, a produtividade mínima é de 1500 kg/ha.

Moção apresentada e aprovada: Necessidade de melhor caracterização das estirpes recomendadas, especialmente para a soja e o feijão. Dados necessários: 1) estabilidade genética; 2) características culturais, absorção de vermelho, produção de ácidos; 3) tolerância a antibióticos, estresse hídrico e temperatura; 4) no inoculante, tolerância à baixa umidade e a alta temperatura, dos inoculante turfoso e líquido; 5) no solo, tolerância à baixa umidade e a alta temperatura, dos inoculante turfoso e líquido; 6) agrupamento sorológico; 7) comportamento simbiótico, isoladamente, nos inoculantes.

Nada mais havendo para relatar deu-se por encerrada a 13º RELARE.

Londrina, 03 de junho de 2006

Rubens José Campo
Presidente

Arnaldo Colozzi Filho
Secretario

Protocolo para análise da qualidade e da eficiência agrônômica de inoculantes, estirpes e outras tecnologias relacionados ao processo de fixação biológica do nitrogênio em leguminosas

Protocolo apresentado, inicialmente, pelos pesquisadores da Embrapa Soja, Rubens José Campo e Mariângela Hungria, na IX RELARE. A partir desta, comissões foram criadas para futuras discussões e diversas alterações ocorreram na RELARES subsequentes até chegarmos a esse documento.

Introdução

As bactérias dos gêneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (referidos, genericamente, como "rizóbio") possuem a capacidade de infectar as raízes das plantas leguminosas, formar pequenas estruturas denominadas nódulos, estabelecendo assim uma associação com estas plantas, denominada simbiose. No interior dos nódulos, ocorre a formação de um complexo enzimático que consegue quebrar a ligação tripla do nitrogênio do ar (N_2), transformando-o em amônia (NH_3). A amônia é então incorporada em diversas formas de N orgânico para a utilização pela planta hospedeira.

A eficiência do processo de fixação biológica do N_2 (FBN) depende de vários fatores inerentes ao ambiente, à planta e à bactéria. Entre estes, destacam-se os fatores físicos do solo como temperatura, umidade e luz solar, os fatores genéticos e nutricionais ligados à planta e a eficiência e a capacidade das estirpes de formar nódulos. Além destes fatores, estudos de competitividade de estirpes introduzidas com as naturalizadas no solo têm mostrado que, aumentando a população da bactéria nas sementes, ocorre um melhor estabelecimento das estirpes no solo, permitindo, assim, uma maior ocupação dos nódulos com a estirpe introduzida o que, por consequência, pode proporcionar maior eficiência de fixação biológica de N_2 . Assim, a má qualidade do inoculante, sistemas inadequados de inoculação, a aplicação de certos fungicidas e/ou micronutrientes nas sementes, entre outros, podem implicar numa redução do número de células viáveis nas sementes ou no solo e podem resultar em decréscimo da eficiência da fixação biológica do N_2 .

Definições

- Recomendação de estirpes de rizóbio – Para que uma determinada estirpe de rizóbio possa fazer parte de inoculantes comerciais está terá que ser testada por órgãos de pesquisa oficiais, segundo os protocolos aqui descritos, com os resultados discutidos em reunião da RELARE e por esta recomendada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para produção de inoculantes.
- Inoculantes – Todo produto que contenha microrganismos com ação estimulante para o crescimento das plantas.
- Outras tecnologias – Novos processos de veiculação de microrganismos fixadores de nitrogênio para leguminosa ou novo produto contendo microrganismos promotores de crescimento para plantas leguminosas e não leguminosas.

Novos produtos, contendo estirpes, tecnologia e outras recomendações discutidas e aprovadas nas reuniões da RELARE, deverão receber parecer provisório para fins de registro pelo MAPA. Para obtenção do parecer definitivo deverão ser submetidos aos testes de eficiência agrônômica, conduzidos no mínimo em dois ecossistemas de importância para a cultura, durante duas safras agrícolas. Estes testes deverão ser conduzidos por instituições de pesquisa credenciadas junto ao MAPA e obedecer às normas definidas pela RELARE (ou publicadas em portaria). A aprovação ou não do produto ou tecnologia se dará após análise dos resultados pela RELARE. Para evitar que o produto seja testado várias vezes e que os resultados negativos sejam desconsiderados, o fabricante terá que comunicar a RELARE cada teste a campo no início da safra. Testes não comunicados com a devida antecedência não serão considerados pela RELARE.

A proposta de recomendação de novas estirpes para leguminosas que já tiverem estirpes recomendadas deverá apresentar resultados comparativos entre essas estirpes. Os resultados devem contemplar testes de laboratório, casa de vegetação e a campo, obedecendo aos critérios descritos na metodologia de avaliação de estirpes.

1. Análise da qualidade de inoculantes

1.1. Preparo da amostra

A amostra do produto a ser testado deverá ser composta por duas subamostras "A" e "B", que deverão ser individualmente identificadas, homogeneizadas e posteriormente higienizadas externamente, com álcool etílico a 75%, em sala asséptica, a fim de evitar contaminantes. As análises serão compostas por exames decisórios, quanto ao aspecto do enquadramento às exigências mínimas (teste de pureza, teste quantitativo, teste de avaliação de sementes pré-inoculadas e teste de caracterização), e identificativos, quanto ao aspecto do enquadramento às exigências mínimas, e complementares (potencial de hidrogênio – pH – e umidade), que servirão para dar subsídios ao resultado do exame quantitativo empregado.

1.2. Teste de pureza dos inoculantes

A fim de proporcionar uma cobertura adequada para a expressão e quantificação dos microrganismos diferentes dos especificados na rotulagem dos produtos inoculantes, serão empregados os meios diferenciais ágar nutritivo (AN) e batata-dextrose-ágar (BDA). Deverão ser utilizadas, para o teste de pureza, as mesmas diluições elaboradas para o exame analítico das amostras dos produtos inoculantes. Para testar a presença de microrganismos não especificados serão inoculadas placas de Petri com alíquotas de 0,1 ml das diluições 10^{-5} e 10^{-6} , em triplicatas, com os meios diferenciais.

Após a absorção do inóculo, as placas deverão ser colocadas invertidas em estufa à 28°C e observadas pelo período de 10 dias, quando então, será efetuada a leitura final. Os resultados serão expressos para cada um dos meios diferenciais (AN e BDA), de acordo com a média do número de unidades formadoras de colônia por mililitro de inóculo (UFC/ml).

Resultado final: O cálculo para o resultado final será a média originada da subamostra "A" com a subamostra "B".

Diluição seriada decimal: A diluição seriada é empregada para possibilitar a contagem através da semeadura em placas de Petri, ou através do método do número mais provável (NMP) em plantas e possibilitar, com segurança, a determinação do número de células viáveis dentro dos intervalos de segurança propostos por cada uma das técnicas empregadas. Para formar a diluição 10^{-1} , retirar 10,0 g ou 10,0 ml do produto inoculante

e adicionar em um frasco Erlenmeyer com 90,0 ml de solução fisiológica (NaCl a 0,85%), colocando para homogeneizar a solução em um agitador orbital pelo período de tempo de 10 minutos. No caso de inoculante turfo, adicionar pérolas de vidro para a homogeneização. Logo em seguida, retirar uma alíquota de 1,0 ml desta solução e acrescentar em um tubo de ensaio com 9,0 ml de solução fisiológica, procedendo à homogeneização desta solução em um agitador de tubos, formando, assim, a diluição 10^{-2} . Da diluição 10^{-2} , retirar 1,0 ml e adicionar em outro tubo de ensaio com 9,0 ml de solução fisiológica, formando, na seqüência, a diluição 10^{-3} . E assim sucessivamente, usando sempre a última diluição, até formar as diluições desejadas (Figura 1). O uso da solução fisiológica para a diluição decimal em série é importante para a estabilidade osmótica das células dos microrganismos que estão sendo testados. No caso de inoculantes não solúveis em água, os fabricantes deverão informar qual o diluente a ser usado.

Meio ágar nutritivo (AN): Meio indicado para o desenvolvimento de bactérias. Este meio favorece o crescimento de contaminantes em detrimento do crescimento dos rizóbios. A esterilização deve ser feita por autoclavagem a 121°C e 1,0 atmosfera por 10 minutos, a fim de evitar reações secundárias com a glicose. O pH final deverá estar em torno de 6,8.

Meio ágar nutritivo (AN)	Quant./L
01- Extrato de carne	3,0 g
02- Peptona	1 0,0 g
03- Glicose	2,5 g
04- Agar	15,0 g
05- Água	1.000 ml

Meio batata-dextrose-ágar (BDA): Este meio é indicado principalmente, para o desenvolvimento de fungos e tem a propriedade de retardar a esporulação de alguns microrganismos. O pH final do meio deverá ficar em torno de 5,6.

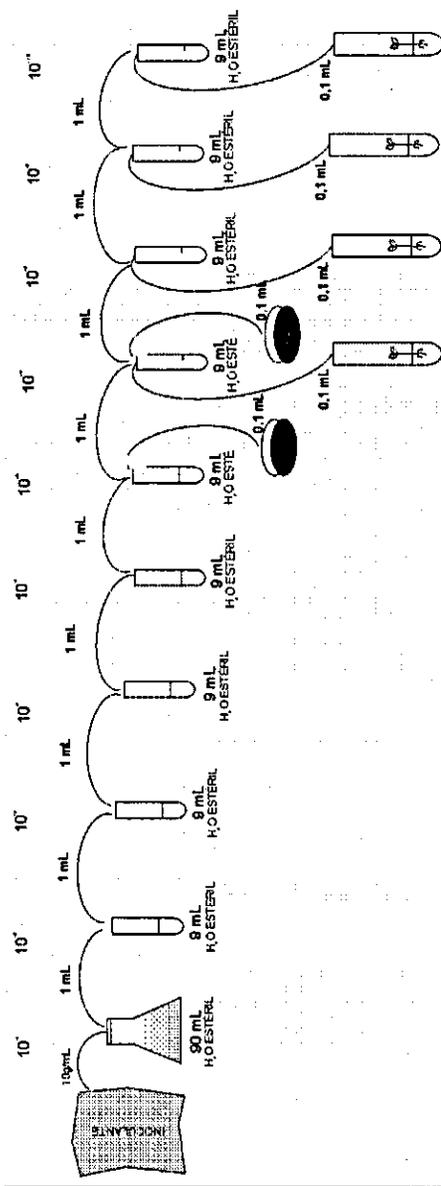


Figura 1. Esquema da diluição seriada decimal.

Meio batata-dextrose-ágar (BDA)	Quant.
01- Batata descascada*	200,0 g
02- Dextrose	20,0 g
03- Agar	15,0 g
04- Água	1.000 ml

* Fazer infusão de 200 g de batata fatiada em 1.000 ml de água; peneirar ou filtrar para retirar a batata.

Após autoclavagem, adicionar solução estéril de sulfato de estreptomicina, na dose de 30 µg por litro (3ml de uma solução 1%, por litro) no meio BDA para evitar o crescimento bacteriano.

Limite de contaminantes: O desenvolvimento de microrganismos não especificados a partir da diluição empregada $1,0 \times 10^{-5}$ considera o lote ou partida da amostra fora dos padrões para comercialização, mesmo que apresente as garantias mínimas estabelecidas do número de rizóbio por grama ou mililitro.

Meio semi-seletivo: No caso da avaliação de produtos inoculantes específicos para soja (*Glycine max*), que contenham um número elevado de contaminantes, o número de células do inoculante será contado através do meio semi-seletivo (Ikuta, 1995) acrescido de vermelho Congo, que permite o crescimento de *Bradyrhizobium* spp. e inibe o crescimento de contaminantes. O meio semi-seletivo será preparado em duas fases. A primeira, quando o meio é distribuído em frascos Erlenmeyer e esterilizado em autoclave a 121°C e 1,0 atmosfera por cerca de 15 minutos, sem os antimicrobianos. Na segunda fase, partindo de soluções estoques de 10 ml de cada antimicrobiano, serão adicionados as quantidades abaixo especificadas para o volume de 1000 ml quando, após a autoclavagem, o meio estiver num intervalo de temperatura de 40 a 45°C. Na seqüência, o meio será vertido em placas de Petri, no volume de 15 a 20 ml de meio por placa.

Meio semi-seletivo - Primeira fase	Quant./L
01- Manitol	5,0 g
02- K_2HPO_4	0,5 g
03- NH_4NO_3	0,5 g
04- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
05- Vermelho Congo (0,25 g/100 ml)	10 ml
06- Agar	12-15 g
07- Água destilada e deionizada - q.s.p.	1000 ml

Antimicrobianos - segunda fase*

Produtos	Solução estoque/10 ml	Adicionar
01- Ácido Nalidíxico (20mg/ml)	0,2 g (em NaOH 0,1N)	0,5 ml
02- Neomicina (20mg/ml)	0,2 g (em água)	1,5 ml
03- Cloranfenicol (20mg/ml)	0,2 g (etanol:água, 1:1; v:v)	1,5 ml
04- Actidione (10mg/ml)	0,1 g (em água)	0,1 ml
05- Triazol (2,5%)	0,25 g (em água)	0,4 ml

*As soluções antimicrobianas estoques deverão ser esterilizadas por passagem em filtro de 0,2 μ m antes de serem adicionadas ao meio autoclavado.

1.3. Método quantitativo para contagem de rizóbio

Deverá ser seguido por um dos métodos a seguir:

- a) o método da diluição e contagens em placas ou
- b) o método do número mais provável de diluição e infecção em plantas.

1.3.1. Diluição e contagem em placas

A contagem de microrganismos em placas é também denominada direta. Para a contagem do número de células de rizóbio poderá ser empregada a contagem pelo método da gota ("Drop plate") ou método do espalhamento. Como meio de cultura, será utilizado o extrato de levedura- manitol com ágar (ELMA, também conhecido como "YMA - yeast extrat, manitol and agar") com vermelho Congo (corante), no volume de 15 a 20 ml de meio por placa.

Meio de cultura extrato de levedura-manitol-ágar (ELMA) – vermelho Congo: O meio de cultura para contagem dos rizóbios em placas deverá ser esterilizado em autoclave a 121°C e 1,0 atmosfera por 20 minutos.

Meio de cultura ELMA - vermelho Congo	Quant./L
01- K_2HPO_4	0,5 g
02- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
03- NaCl	0,1 g
04- Manitol	10,0 g
05- Extrato de levedura	0,4 g
06- Vermelho Congo (0,25 g/100 ml)	10 ml
07- Agar	12,0 a 15,0 g
08- Água	1.000 ml
PH ajustado para cerca de 6,8.	

1.3.1.1. Contagem pelo método da gota ("Drop plate")

Consiste em semear uma gota de aproximadamente 30µl, por setor, das diluições seriadas 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} das soluções dos inoculantes na superfície do meio ELMA- vermelho Congo em placas de Petri. As placas deverão ser divididas em seis setores, utilizando-se dois setores da placa por diluição. A semeadura é realizada através da gota de cada diluição, obtendo-se seis repetições por diluição em três placas distintas (figura 2). Após a semeadura e absorção do inoculo, as placas deverão ser colocadas invertidas em estufa a 28°C pelo período de 5 a 8 dias, quando então, será efetuada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) da diluição que apresentar de 10 a 30 UFC por gota.

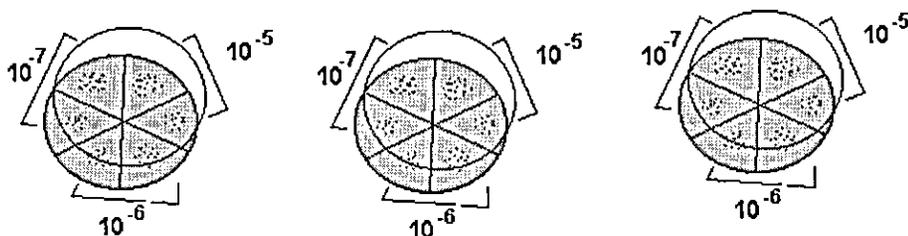


Figura 2. Esquema da inoculação em placa pelo método da gota.

Cálculo: Multiplicar a média do número de UFC/gota dos seis setores pela diluição que proporcionou a leitura no intervalo de 10 a 30 UFC/gota e pelo fator de correção 33,33 da alíquota de 30 μ l empregada.

Exemplo: Admitindo-se que a média dos seis setores foi 20 UFC/gota na diluição 10^{-6} , então, calcula-se:

Dados: Média = 20

Fator de correção = 33,33

Diluição de leitura = 10^{-6}

Logo,

Nº de células do microrganismo = $20 \times 33,33 \times 10^6 \Rightarrow 6,66 \times 10^8$ UFC/g

1.3.1.2. Contagem pelo método do espalhamento

Semear 0,1 ml das diluições seriadas 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} das soluções dos inoculantes na superfície do meio de cultura em placas de Petri (Figura 1). Cada diluição terá três repetições em placas distintas e será espalhada sobre o meio de cultura com alça de Drigalski. Após a semeadura e absorção do inóculo, as placas deverão ser colocadas invertidas em estufa a 28°C pelo período de 5 a 8 dias, quando, então, será efetuada a contagem das UFC da diluição que apresentar de 30 a 300 UFC por 0,1 ml.

Cálculo: Multiplicar a média do número de UFC/0,1 ml das três placas de Petri pela diluição que proporcionou a leitura no intervalo de 30 a 300 UFC/0,1 ml e pelo fator de correção 10 da alíquota empregada de 0,1 ml.

Exemplo: Admitindo-se que a média das três placas foi 75 UFC/0,1 ml na diluição 10^{-6} , calcula-se:

Dados: Média = 75

Fator correção = 10

Diluição de leitura = 10^{-6}

Logo,

Nº de células do microrganismo = $75 \times 10 \times 10^6 \Rightarrow 7,5 \times 10^8$ UFC/g

1.3.2. Método do número mais provável (NMP) – Diluição e infecção em plantas

O método do número mais provável em planta é um processo indireto de contagem que envolve a inoculação de diluições crescentes do produto inoculante em plantas testes específicas, cultivadas em condições assépticas. Este método pressupõe que a infectividade e a formação de nodulação conferem caráter positivo ao teste, enquanto que a ausência de nodulação confere caráter negativo ao mesmo.

A partir da semeadura do inoculo, o teste demanda 25 a 30 dias para sua conclusão e se vale da Tabela 1 adaptada de Andrade & Hamakawa (1994), para a estimativa do número de bactérias no produto inoculante.

Os testes do NMP em plantas constarão de uma plântula por unidade teste e poderão ser conduzidos em tubos de ensaio, sacos plásticos de polietileno, frascos de vidro ou vasos Leonard, com três repetições.

Testes positivos e negativos: Os controles positivos e negativos são indicativos da não interferência de fatores externos, que podem ocorrer na técnica de contagem do NMP em planta. Para compor o teste positivo, utiliza-se uma cultura pura da bactéria específica, onde serão utilizadas alíquotas e repetições das mesmas diluições empregadas nos exames dos produtos inoculantes. O controle negativo será composto, unicamente, de plântulas e solução nutritiva, com o número de vasos do teste positivo. Os controles deverão ser incluídos simultaneamente aos testes analíticos examinados.

Assepsia e desinfecção de sementes: Para sementes com tegumento duro como soja perene (*Neonotonia wightii*) e siratro (*Macroptilium atropurpureum*), que necessitam escarificações, a assepsia, desinfecção e escarificação podem ser feitas simultaneamente, usando ácido sulfúrico concentrado. Colocar as sementes em um copo tipo Becker e adicionar o ácido sulfúrico em quantidade que permita a cobertura das sementes. Agitar durante três a cinco minutos, drenar o ácido e lavar com água esterilizada por, no mínimo, seis vezes. A drenagem do ácido é importante, caso contrário dar-se-á violenta reação. Há despreendimento de calor durante o processo, porém, este calor não é suficiente para prejudicar a germinação da semente. Após a última lavagem, deixar as sementes em água, por cerca de cinco minutos, para intumescimento, o que facilita a germinação homogênea.

Tabela 1. Estimativa do número de células de rizóbio pelo número mais provável (NMP) em plantas (adaptado de Andrade & Hamakawa, 1994).

Diluições			Fator NMP	Prob. %	Intervalo de confiança	
D1	D2	D3			mínimo	máximo
0	0	1	0,300	0,332	0,073	1,675
0	0	2	0,601	0,001	0,186	2,176
0	0	3	0,904	0,000	0,329	2,645
0	1	0	0,305	3,365	0,074	1,698
0	1	1	0,611	0,045	0,189	2,208
0	1	2	0,917	0,000	0,334	2,684
0	1	3	1,224	0,000	0,498	3,140
0	2	0	0,620	0,156	0,192	2,239
0	2	1	0,930	0,004	0,338	2,722
0	2	2	1,242	0,000	0,505	3,185
0	2	3	1,555	0,000	0,686	3,636
0	3	0	0,944	0,004	0,343	2,762
0	3	1	1,261	0,000	0,512	3,233
0	3	2	1,579	0,000	0,695	3,693
0	3	3	1,898	0,000	0,890	4,141
1	0	0	0,357	39,203	0,087	2,058
1	0	1	0,723	0,624	0,225	2,711
1	0	2	1,098	0,006	0,399	0,336
1	0	3	1,482	0,000	0,601	3,948
1	1	0	0,736	6,445	0,228	2,765
1	1	1	1,118	0,179	0,407	3,401
1	1	2	1,510	0,002	0,612	4,026
1	1	3	1,911	0,000	0,838	4,644
1	2	0	1,138	0,627	0,414	3,468
1	2	1	1,538	0,025	0,623	4,108
1	2	2	1,950	0,000	0,854	4,740
1	2	3	2,370	0,000	1,104	5,356
1	3	0	1,568	0,030	0,635	4,194
1	3	1	1,988	0,002	0,871	4,842
1	3	2	2,418	0,000	1,126	5,486

Continua...

Tabela 1. Continuação...

Diluições			Fator NMP	Prob.%	Intervalo de confiança	
D1	D2	D3			mínimo	máximo
1	3	3	2,860	0,000	0,397	6,126
2	0	0	0,917	31,927	0,288	3,773
2	0	1	1,432	1,120	0,522	4,791
2	0	2	1,990	0,019	0,802	5,832
2	0	3	2,600	0,000	1,123	6,887
2	1	0	1,469	11,963	0,535	4,951
2	1	1	2,046	0,632	0,823	6,037
2	1	2	2,680	0,015	1,156	7,143
2	1	3	3,359	0,000	1,529	8,261
2	2	0	2,106	2,318	0,847	6,261
2	2	1	2,763	0,170	1,191	7,420
2	2	2	3,478	0,005	1,579	8,598
2	2	3	4,240	0,000	2,009	9,782
2	3	0	2,855	0,216	1,229	7,726
2	3	1	3,602	0,021	1,632	8,966
2	3	2	4,408	0,001	2,082	10,217
2	3	3	5,254	0,000	2,574	11,478
3	0	0	2,312	34,098	0,871	12,822
3	0	1	3,850	3,099	1,511	17,662
3	0	2	6,348	0,158	2,434	22,749
3	0	3	9,538	0,004	3,706	27,927
3	1	0	4,272	37,433	1,664	21,327
3	1	2	11,520	0,649	4,380	35,159
3	1	3	15,878	0,032	6,485	42,502
3	2	0	9,324	32,817	3,331	38,555
3	2	1	14,938	12,507	5,569	50,581
3	2	2	21,470	2,470	8,652	64,067
3	2	3	29,170	0,235	12,543	79,220
3	3	0	23,970	36,594	9,128	139,550
3	3	1	46,208	42,767	17,836	240,763
3	3	2	109,849	44,442	38,227	478,767
3	3	3				

No caso de sementes que não necessitam escarificação, como soja e feijão a assepsia e desinfecção podem ser feitas com solução de hipoclorito de sódio de 3 a 6%, durante 4 a 5 minutos. Decorrido o tempo, as sementes devem ser lavadas, no mínimo, por seis vezes com água esterilizada.

Para ambos os métodos, é conveniente efetuar uma imersão prévia das sementes em álcool etílico a 95% por 30 a 60 segundos, para facilitar o contato do tegumento com a solução de hipoclorito.

Pré-germinação das sementes: A pré-germinação das sementes destina-se a garantir o desenvolvimento de plântulas homogêneas para o transplante em tubos de ensaio, sacos plásticos ou vasos Leonard no teste NMP. Após a assepsia e desinfecção das sementes, elas deverão ser distribuídas de forma individualizada sobre a superfície de um conjunto de duas folhas de papel germiteste, que servirão de base, esterilizadas e umedecidas com água estéril. Recobrir as sementes com mais uma folha de papel germiteste umedecida, com o devido cuidado para manter a distribuição das sementes. O material deverá ser acondicionado em saco plástico e conduzido a um germinador à temperatura de 20 a 25°C por 48 horas.

Solução Nutritiva: A solução nutritiva de Norris indicada deve ser usada para os sistemas de cultivo em tubos de ensaio agarizados, em sacos plásticos, em frascos de vidro com papel germiteste, em vasos Leonard e na avaliação, em cultivo, das sementes pré-inoculadas que estão descritas no item 1.4.

Os sais devem ser adicionados à água na ordem em que estão indicados a fim de evitar reações secundárias e precipitação. A solução nutritiva deve ser constantemente agitada no momento de sua distribuição. O pH final da solução nutritiva deve ser de 6,5.

Solução nutritiva de Norris (Norris & Date, 1976)

Ingrediente	Sol. Stock/L	Quant./L
01- KCl	29,8 g	2,5 ml
02- K_2HPO_4	69,6 g	2,5 ml
03- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	98,6 g	2,5 ml
04- $CaSO_4 \cdot 2H_2O$	-	0,344 g*
05- Solução Stock nº 1	-	0,5 ml

Continua...

... Continuação

Ingrediente	Sol. Stock/L	Quant./L
06- Solução Stock nº 2	-	1,0 ml
07- Água	p/ 1.000 ml	p/ 1.000 ml

* preparar em cadinho com suficiente água para formar uma pasta e moer muito bem.v

Solução estoque nº	Quant./L
01- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,078 g
02- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,22 g
03- $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2,03 g
04- $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
05- H_3BO_3	1,43 g
06- Água	p/1.000 ml

Solução estoque nº 2	Quant./L
01- Citrato de Fé ($\text{C}_8\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{Fe} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	1,795 g
02- Água (H_2O)	p/ 1.000 ml

Ágar (10 g/L) - A inclusão do ágar na solução nutritiva de Norris se destina aos meios semi-sólidos para os testes em tubos de ensaio.

1.3.2.1. Método do número mais provável em tubos com plantas

Para sementes pequenas, como trevos (*Trifolium* spp.) e alfafa (*Medicago sativa*), recomenda-se conduzir o teste NMP em tubos de ensaio de 200 X 25 mm, com uma plântula por tubo.

Cada tubo deve receber 15 a 20 ml da solução nutritiva de Norris agarizada, ser fechado (algodão ou tampa plástica) adequadamente e esterilizado a 121°C e 1,0 atmosfera por 20 minutos. Em cada tubo esterilizado, deve ser colocada uma semente pré-germinada, com a raiz imersa na solução agarizada, corretamente orientada. É conveniente que o plantio seja efetuado próximo à parede do tubo, de forma a possibilitar a observação dos nódulos sem necessidade de desfazer o sistema. Os tubos serão acomodados em suportes adequados, de forma que toda extensão da solução agarizada (parte das raízes) fique protegida da luz, e os mesmos serão conduzidos para câmara de crescimento ou casa de vegetação.

A inoculação deverá ocorrer do segundo ao quinto dia após a colocação das sementes pré-germinadas nos tubos (Figura 3). A diluição seriada decimal será preparada no momento do uso e os tubos serão inoculados com quatro (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} e 10^{-9}) ou cinco (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} e 10^{-10}) diluições. A inoculação consistirá na adição de alíquotas de 1,0 ml de cada diluição por tubo (unidade teste), em triplicatas.

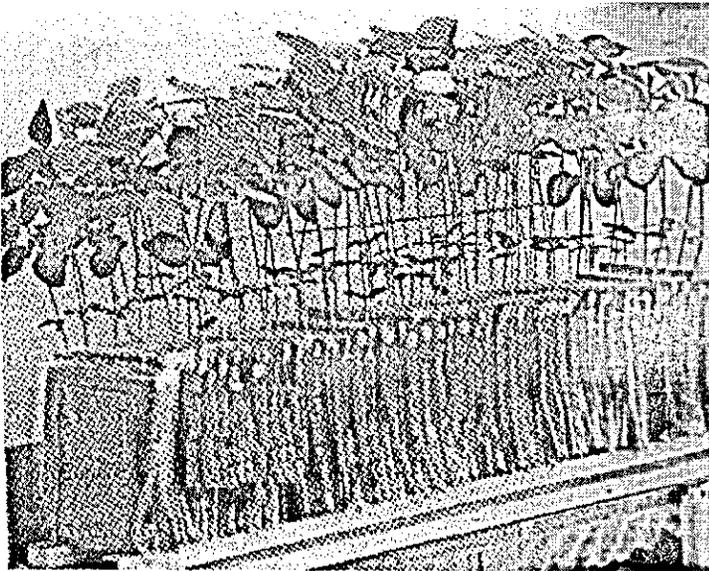


Figura 3. Esquema para preparo das unidades teste para contagem de células de rizóbio através do método no número mais provável em plantas cultivadas em sacos plásticos.

Deverão ser incluídos tubos controles positivos e negativos e o crescimento dar-se-á em câmara de crescimento ou casa de vegetação.

1.3.2.2. Teste do número mais provável em sacos plásticos com plantas

Os cultivos em sacos plásticos para o teste NMP são recomendados para sementes de leguminosas de tamanho médio, como a leucena (*Leucaena leucocephala*) e ervilhaca (*Vicia sativa*), e grande, como a soja e o feijão. Consiste em acomodar uma plântula pré-germinada da cultura leguminosa específica em sacos plásticos contendo papel germiteste.

Os sacos plásticos deverão ter uma espessura adequada (em torno de 0,12 mm), para que se sustentem e as dimensões médias de base e altura de 130 X 140 mm. O papel germiteste deverá ter uma média de comprimento e largura de 230 X 120 mm e será dobrado e perfurado para abrigar as sementes pré-germinadas. Os sacos plásticos contendo o papel germiteste com a plântula serão dispostos em uma grade e adicionados volumes de 80 a 100 ml da solução nutritiva de Norris. A grade com o material (Figura 3) será conduzida à câmara de crescimento para posterior inoculação, que deverá ser feita ao redor de cinco dias após a transferência das plântulas.

As diluições seriadas decimais, a inoculação, os controles e a condução dos testes seguirão conforme descrito no item 1.3.2.1.

Conforme as plantas leguminosas forem se desenvolvendo, adicionar solução nutritiva de Norris, a fim de manter o nível da necessidade de consumo dos vegetais.

A avaliação poderá ser efetuada com segurança entre 25 e 30 dias após a inoculação. O sistema deverá ser desfeito para avaliação da nodulação.

1.3.2.3. Teste do número mais provável em frascos de vidro

Devem ser usados frascos de vidro de, aproximadamente, 400 ml a 600 ml, que permitem a adição de 300 a 400 ml de solução nutritiva de Norris, suficiente para atender às exigências das plantas (Figura 4). Utilizar frascos com diâmetro aproximado de 7 cm a 8 cm e altura de 15 cm a 20 cm. O papel germiteste utilizado como suporte deve ter 5 cm a mais do que a altura do frasco e, de largura, 15 cm a mais. A folha de papel dobrada deve ter duas abas fixadas às bordas do frasco com o auxílio de um fio de látex com 100% de elástico ou barbante de algodão. A parte superior do papel deverá conter um canal, para segurar as sementes pré-germinadas, que será formado entre duas folhas do papel. Colocar a solução nutritiva nos frascos, inserir o papel já dobrado, cobrir o frasco com uma folha de papel alumínio e fixar as duas abas do papel germiteste e as bordas do papel de alumínio ao frasco, utilizando o fio de látex ou barbante de algodão. Esterilizar os frascos em autoclave a 121°C e 1,0 atmosfera durante 30 minutos. Após o resfriamento, fazer um pequeno orifício no papel alumínio, na mesma posição do já existente no papel germiteste, onde será colocada a semente pré-germinada. Os frascos devem ser de vidro âmbar ou

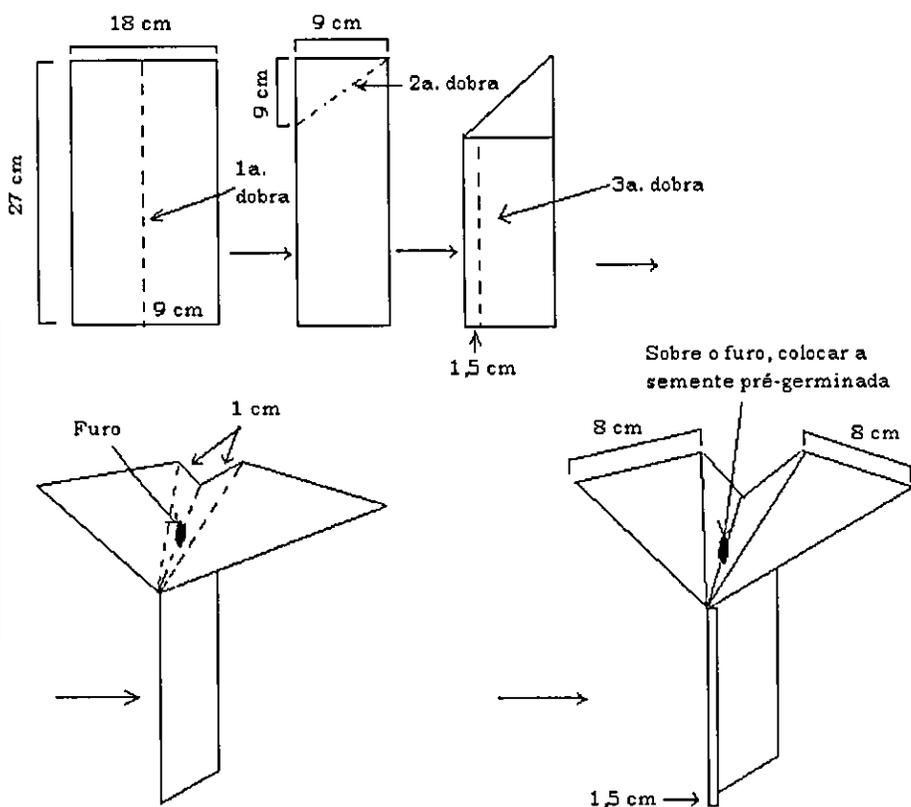


Figura 4. Esquema para preparo das unidades testes para contagem de células de rizóbio através do método no número mais provável em plantas cultivadas em frascos de vidro.

envoltos com papel opaco, a fim de evitar a incidência de luz na região das raízes. Os vasos serão dispostos sobre balcões em câmara de crescimento ou casa de vegetação.

As diluições seriadas decimais, a inoculação, os controles e a condução dos testes serão conforme descrito no item 1.3.2.1. A avaliação poderá ser efetuada, com segurança, dos 25 aos 30 dias após a inoculação.

1.3.2.4. Teste do número mais provável em vasos Leonard

Os vasos, que constam de um reservatório para solução nutritiva e outro

suporte para as plantas, podem ser improvisados com garrafas comerciais comuns (Figura 5).

Para o reservatório da solução nutritiva, as garrafas são cortadas a cerca de 12 cm de altura a partir da base. Para obtenção da parte suporte, que conterá o substrato com a planta, são cortados o fundo das garrafas e realizado um fechamento com rede plástica de malha reduzida, ou tecido de algodão fino, a fim de manter o substrato no vaso.

O substrato usado para o preparo dos vasos poderá ser areia, vermiculita ou a mistura de areia com carvão e de areia com vermiculita. Após a adição do substrato, os vasos devem ser cobertos com saco de papel e esterilizados a 121°C e 1,0 atmosfera durante 90 minutos. Após a esterilização, os vasos são dispostos sobre balcões em casa de vegetação preparada para cultivo "asséptico".

Adicionam-se 500 ml da solução nutritiva de Norris por vaso. Essa solução

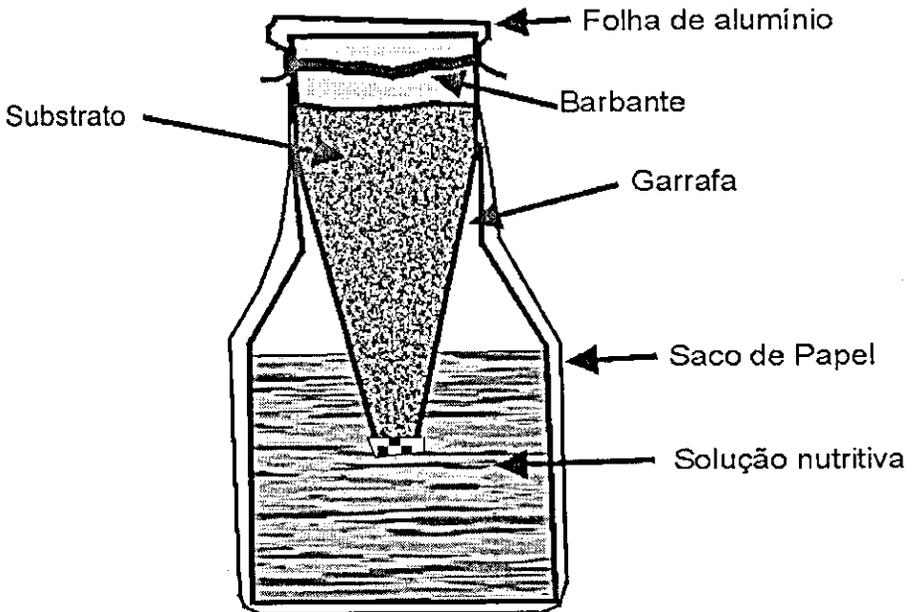


Figura 5. Esquema da montagem das unidades teste para contagem de células de rizóbio através do método no número mais provável em plantas cultivadas em vasos Leonard.

atinge a parte superior por capilaridade, sendo conveniente, no preparo dos vasos, adicionar 250 ml no reservatório e o restante no substrato. No momento da distribuição, a solução nutritiva deve ser constantemente agitada, para manter o sulfato de cálcio em suspensão. Nos vasos, devidamente preparados, fazer o plantio das sementes pré-germinadas e irrigar por cima conforme necessário para um bom desenvolvimento das plântulas.

As diluições seriadas decimais, a inoculação, os controles e a condução dos testes seguirão conforme descrito no item 1.3.2.1.

Substrato:

Areia: A areia a ser usada nos vasos de Leonard deve estar isenta de nitrogênio ou de qualquer elemento que possa causar toxidez às plantas. Toxidez de manganês já foi observada em areias de diversas procedências. É conveniente, portanto, que, nestes casos, se efetue uma lavagem com ácido clorídrico. Preliminarmente, a areia deve ser lavada com água corrente até que esta saia límpida. Faz-se, a seguir, lavagem com HCl a 5%, durante cerca de cinco horas, com agitação ocasional. Lava-se, a seguir, com água até completa eliminação do excesso de ácido. A areia lavada e seca pode ser armazenada em sacos plásticos, para uso oportuno.

Vermiculita: A vermiculita é um argilomineral 2:1 com capacidade de expansão e contração, que lhe confere uma elevada plasticidade e pegajosidade. Dependendo da origem, algumas vermiculitas são muito alcalinas. Recomenda-se a lavagem com água corrente por cerca de 8 horas e secagem de 90 a 100°C por 24 horas ou à temperatura ambiente, por cerca de uma semana. A vermiculita para os vasos deve ser peneirada com malhas entre ASTM nº 20 (1,0 mm) e nº 7 (3,0 mm). Corrigir o pH para cerca de 6,5. Para uma boa umidade inicial do substrato, deve-se adicionar, antecipadamente à introdução das sementes, 2,5 ml de solução nutritiva por grama de vermiculita.

Mistura: Os vasos poderão ser preparados com uma mistura de areia e vermiculita (1:1, v:v) ou areia e carvão (3:1, v:v).

Condições de Cultivo:

Câmara de crescimento: A câmara de crescimento constitui-se em uma sala asséptica com: refrigeração com controle automático da temperatura;

luminosidade de 100 a 1000 lumens, fornecida por lâmpadas fluorescentes Gro-Lux e Branca-Fria, controladas, automaticamente, por "timer" para fotoperíodo (correspondente a cada cultura); sistema automático de manutenção da umidade para 70% e estantes para receber as grades com os testes dos produtos inoculantes.

Casa de vegetação: A manutenção da limpeza da casa de vegetação é crucial para o sucesso dos testes desenvolvidos. Deve ser lembrado que o processo de nodulação é prejudicado por temperaturas elevadas (acima de 28-30°C nos vasos), sendo, portanto, necessário que a casa de vegetação disponha de sistema de refrigeração. A pintura de seus vidros com tinta branca ou uso de sombrites 65-70% permite suficiente luminosidade e atenua o problema da temperatura elevada durante o verão.

Cálculo do número de células de rizóbio

Uma vez decorrido o prazo para formação de nódulos, no sistema de cultivo em tubos, sacos plásticos, frascos de vidro ou vasos Leonard, verifica-se o número de unidades com resultado positivo de nodulação. A presença de pelo menos um nódulo no sistema radicular da unidade teste, confere resultado positivo. Adotar-se-á para fins de cálculo, três diluições (D1, D2 e D3), sendo que as diluições subseqüentes à última não deverão apresentar nenhuma unidade teste positiva. Com o número de unidades teste positivas de cada diluição, através da Tabela 1, observando a coluna para D1, D2 e D3, obter-se-á o fator NMP de células de rizóbio.

O número de rizóbio por grama ou ml de inoculante é calculado pela média das duas subamostras, através da seguinte fórmula:

$$\text{Número de rizóbio/g} = f \times d$$

Onde: f = fator NMP da Tabela 1.

d = menor diluição da série empregada.

O inoculante será considerado fora do padrão (deficiente) se uma das contagens, aplicando-se o intervalo de confiança para o NMP, for inferior a $1,0 \times 10^8$ bactérias/g ou ml, mesmo que a média seja superior a este mínimo. Nesse caso, recomenda-se repetir a contagem em, pelo menos, mais uma amostra para garantir que o resultado é devido à baixa qualidade do inoculante e não a um erro do laboratório.

Intervalo de confiança para o NMP: O intervalo de confiança será determinado através do cálculo multiplicando-se a menor diluição adotada (D1) pelos valores correspondentes do intervalo de confiança mínimo (IC mín.) e intervalo de confiança máximo (IC máx.).

1.4. Metodologia de avaliação de sementes pré-inoculadas

Porcentagem de plantas noduladas – Método de Burton modificado

Tendo em vista o intervalo de tempo do preparo da pré-inoculação ao plantio e os materiais utilizados, o método objetiva avaliar a potencialidade da infectividade das sementes pré-inoculadas comerciais.

Para sementes pequenas, pré-inoculadas, serão adotados os seguintes procedimentos:

- Depositar uma semente pré-inoculada por tubo, de forma a romper levemente a superfície da solução;
- Cinquenta tubos de ensaio contendo de 15 a 20 ml da solução de Norris, agarizada e esterilizada;
- Incluir seis tubos de teste positivo e seis de teste negativo;
- Conduzir à câmara de crescimento, conforme descrito no item 1.3.2.1;
- Fazer avaliação entre o 25º e 30º dia de crescimento das plantas.

Para sementes médias e grandes pré-inoculadas serão adotados os seguintes procedimentos:

- Cinquenta vasos com substrato areia ou vermiculita esterilizados receberão uma semente pré-inoculada cada, que deverá ser enterrada de 1,0 a 2,0 cm de profundidade;
- Adicionar sobre o plantio solução nutritiva de Norris para uma boa acomodação da semente;
- Introduzir seis testes positivos e seis negativos aos exames implantados;
- Conduzir à câmara de crescimento ou casa de vegetação;
- Adicionar solução nutritiva conforme a necessidade da cultura estabelecida.

Avaliação: Para a contagem final, nos dois casos, que acontecerá entre o vigésimo quinto e o trigésimo dia de crescimento das plantas, deverão

haver pelo menos 30 tubos ou vasos com plantas bem estabelecidas e sadias.

Serão tomadas como positivas aquelas plantas que possuírem, no mínimo, três nódulos estabelecidos dentro de um cilindro imaginário na coroa da raiz principal, ou seja, num diâmetro de 2,5 cm por um comprimento de 2,5 cm a contar do colo radicular (nível do solo). A fim de facilitar a identificação, recomenda-se cortar as raízes no comprimento de 2,5 cm do colo radicular.

Os resultados serão expressos em porcentagem e considerados satisfatórios os exames que apresentarem, no mínimo, 80% das plantas noduladas nestas condições.

Preparo dos vasos: Os vasos deverão ter, em média, 8,0 cm de diâmetro por 15,0 cm de profundidade e base mínima de 5,0 cm, contendo orifício para o fluxo da umidade. Os vasos serão acomodados em bandejas plásticas com altura mínima de 5,0 cm, que receberão água esterilizada para a manutenção do substrato úmido.

O substrato usado poderá ser vermiculita e areia, vermiculita e carvão ou areia e carvão, que, após envasado, deverá ser esterilizado para o plantio das sementes (descritos no item 1.3.2.4).

1.5. Metodologia de identificação das estirpes recomendadas

1.5.1. Método baseado na sorologia

Para a verificação da estirpe usada no inoculante, a técnica recomendada, por ser a mais simples e de fácil execução, é a tipificação sorológica por aglutinação, descrita por Vincent (1970).

A possibilidade de caracterização rápida das estirpes dos nódulos baseia-se no fato de que uma suspensão de bacterióides dos nódulos, que seria o antígeno, aglutina especificamente com o antissoro da estirpe que deu origem ao nódulo.

O laboratório de controle deverá dispor das estirpes de rizóbio recomendadas para a fabricação de inoculantes.

Preparo do Antígeno: O antissoro será conseguido pela inoculação de cultura pura da estirpe (antígeno) em coelhos.

A estirpe para a qual se deseja produzir o antissoro é transferida para um tubo com meio ELMA, inclinado, substituindo-se o indicador vermelho-Congo pelo azul de bromotimol, 5 ml/l de solução alcoólica 0,5%.

Quando a cultura atingir um bom crescimento, adicionar 10-12 ml de soro fisiológico (solução de NaCl, 0,85% em água destilada), esterilizado, raspar o crescimento assepticamente, tomando cuidado para não ferir o meio. A suspensão de rizóbios deve estar comprovadamente pura.

Obtenção do antissoro: A injeção é feita na veia grande da periferia da orelha do coelho, usando-se seringa e agulha esterilizadas. Injetam-se doses crescentes da suspensão de bactérias, sendo 1 ml no primeiro dia, 2 ml no segundo, 3 ml no terceiro e 4 ml no quarto dia.

Entre sete e dez dias após a última injeção, tira-se uma amostra de sangue do coelho e verifica-se o título do soro. O soro pode ser obtido por centrifugação ou incubação do sangue a 28-30°C por uma hora e repouso em geladeira até separação do plasma e soro. Este pode ser usado imediatamente ou conservado para uso posterior.

Verificação do Título: A verificação do título consiste em fazer reagir diluições sucessivas do antissoro com o antígeno homólogo (Figura 6).

O esquema das diluições para a determinação do título pode ser observado na Figura 2. Os tubos são colocados em estantes e levados para banho-maria a 52°C por cinco horas.

O título do soro é dado pela maior diluição em que a reação de aglutinação se verificou. O coelho será sangrado se o título do soro for superior a 1:3.200. Se for inferior, reinocula-se o coelho, observando-se um período de dois dias para a recuperação do animal. Há casos em que o título desejado não é alcançado, devendo-se descartar o coelho. Também deverão ser feitos testes de reação cruzada.

A coleta de sangue é normalmente feita por punção cardíaca.

Conservação do Soro: O soro poderá ser conservado liofilizado ou diluído em glicerina (anticongelante) 1:1 (v:v) e conservado em "freezer" até o momento do uso.

Obs.: Outros protocolos para obtenção do antígeno, antissoro e para as

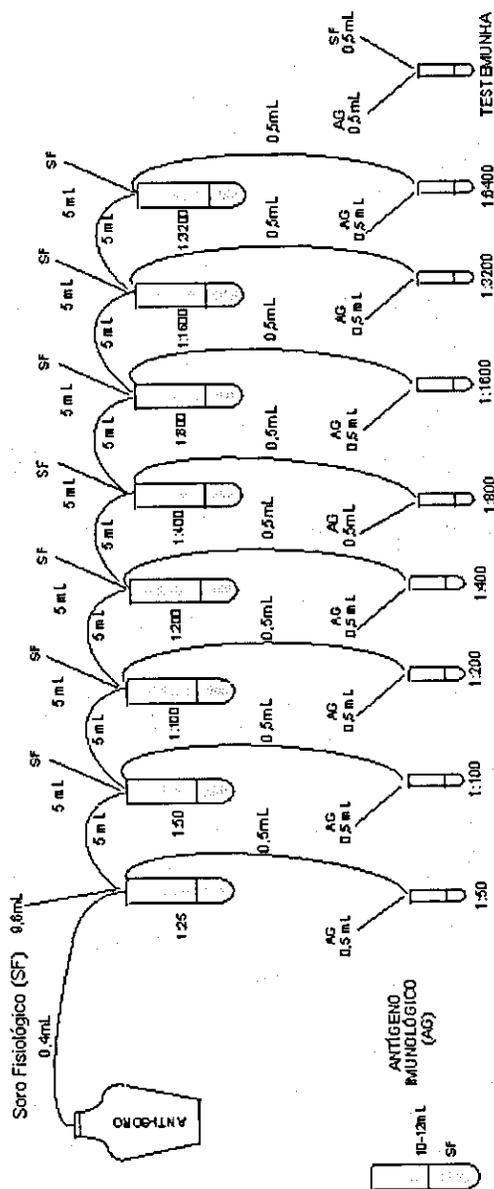


Figura 6. Esquema das diluições para determinação do título do antissoro.

reações sorológicas encontram-se na literatura e poderão ser usados, alternativamente.

Caracterização das Estirpes dos Nódulos: Suspensões de bacterióides dos nódulos serão usadas como antígenos. Esses nódulos serão obtidos de plantas cultivadas assepticamente em vasos Leonard ou outro recipiente, inoculados com a amostra a ser controlada. A técnica de cultivo asséptico está descrita no item 1.3.2. Colhem-se dez nódulos ao acaso, por amostra, lavando-os com água esterilizada. Os nódulos obtidos nas plantas usadas para fazer a contagem no NMP poderão eventualmente ser usados como antígeno. Para isso, depois de verificada a formação dos nódulos, esse material deverá ser mantido, até que os nódulos atinjam um tamanho suficiente para reação de aglutinação.

Podem ser usados nódulos frescos ou secos (60-65°C), que são colocados individualmente em tubos de ensaio, com 4 ml de soro fisiológico, e esmagados. Deve-se evitar a contaminação da suspensão de um tubo com a de outro, pois os nódulos poderão ser de estirpes diferentes. No caso de nódulos secos, esmagá-los depois que estejam túrgidos.

A suspensão de nódulos é aquecida a 100°C e pipetada para os tubos de reação, sem fragmentos de nódulos.

O esquema das diluições para caracterização dos nódulos está na Figura 7. Notar que a figura considera como ponto de partida o soro diluído 1:1 (v: v) em glicerina, tomando, portanto, na primeira alíquota, 0,4 ml de soro.

Feitas as diluições, os tubos são colocados nas estantes e levados para banho-maria a 52°C por cinco horas.

Quando o número de nódulos for muito grande, pode-se deixar em uma sala com temperatura aproximada de 28°C, por 24 horas.

É raro, mas acontece às vezes, a auto-aglutinação. A bactéria fica tão sensível que aglutina em presença de um eletrólito, no caso do soro fisiológico contendo NaCl. Nesse caso, a aglutinação vai ser observada em todas as diluições e, até mesmo, na testemunha.

1.5.1. Método baseado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para verificação da estirpe usada no inoculante, poderá ser utilizada a técnica da amplificação do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase

(PCR) com oligonucleotídeos (“primers”) específicos, que serão definidos, para cada estirpe de rizóbio, pela RELARE. Os perfis padrões para cada estirpe recomendada, obtidos com os respectivos oligonucleotídeos específicos definidos, serão distribuídos, pela FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul), aos laboratórios credenciados.

Preparo da bactéria: A reação de amplificação poderá ser realizada utilizando DNA extraído das bactérias ou a partir de culturas obtidas em meio líquido ou sólido ou, ainda, diretamente, a partir dos nódulos.

DNA extraído das bactérias: As bactérias deverão crescer em meio ELMA modificado para o teor de manitol (5,0 g/l) por três dias para rizóbio de crescimento rápido e cinco dias para rizóbio de crescimento lento. As bactérias serão, então, centrifugadas a 12.000 rpm e lavadas com solução salina tamponada de fosfato (PBS, 1X contendo, em 500 ml, 4,383 g de NaCl 150 mM; 0,1793 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2,6 mM; 1,36 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 7,6 mM). As bactérias serão ressuspensas em 400 μl de TE 50/20 (contendo Tris HCl 50 mM e pH 8,0; Na_2EDTA 20 mM, pH 8,0) e receberão 50 μl de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10%; 5,0 μl de proteinase K (20 mg/ml); 10,0 μl de lisozima (5,0 mg/ml); 2,0 μl de RNase (10 mg/ml); a seguir, as amostras serão incubadas a 37°C por 1h. As amostras serão passadas por seringa por três vezes, para retirar a viscosidade, seguindo-se a adição de NaCl e acetato de sódio em concentrações finais de 250 mM e 300 mM, respectivamente. As amostras poderão ser armazenadas por quatro meses a -20°C.

A metodologia para extração do DNA poderá ser modificada para as condições de cada laboratório credenciado, desde que seja reconhecida pela RELARE e o perfil de DNA resulte no mesmo perfil padrão estabelecido com a metodologia de extração descrita.

Culturas de bactérias: As bactérias serão inoculadas em meio extrato de levedura-manitol líquido (ELML) modificado, conforme descrito no item anterior, ou, no caso de colônias, riscadas no mesmo meio acrescido de 12 a 15 g de ágar/l. O crescimento ocorrerá por dois dias, para rizóbio de crescimento rápido e por três dias, para rizóbio de crescimento lento. No caso de meio sólido, a colônia será tocada com um palito estéril. Transferir

10 µl da cultura líquida, ou a ponta de um palito estéril tocado nas colônias do meio sólido, para 20 µl de solução contendo NaOH 0,05 M: SDS 0,25% (1:1, v:v). Aquecer a 95°C por 15 minutos, adicionar 20 µl de água bidestilada estéril, ressuspender em vórtex e centrifugar por 5 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante pode ser armazenado por seis meses a -20°C. Outra alternativa é utilizar 50 µl da cultura ou transferir colônias para 50 µl de água bidestilada estéril e homogeneizar em vórtex. As suspensões serão submetidas, então, a três ciclos alternados, cada um de um minuto, de congelamento em nitrogênio líquido e aquecimento a 65°C. A seguir, centrifugar a 12.000 rpm por dois minutos. O sobrenadante pode ser armazenado por quatro meses a -20°C. Outros métodos podem ser utilizados, desde que produzam o mesmo perfil padrão de DNA estabelecido.

Nódulos: Os nódulos serão desinfetados superficialmente com álcool etílico a 95% por três minutos e hipoclorito de sódio a 10% por três minutos e, então, lavados com água deionizada estéril por cinco vezes. A seguir, dois a três nódulos serão macerados em 50 µl de água destilada estéril usando um bastão estéril. As suspensões serão submetidas, então, a três ciclos alternados, cada um de um minuto, de congelamento em nitrogênio líquido e aquecimento a 65°C. A seguir, centrifugar a 12.000 rpm por dois minutos. O sobrenadante poderá ser armazenado por quatro meses a -20°C. Outros métodos podem ser utilizados, desde que produzam o mesmo perfil padrão de DNA estabelecido.

Reação de amplificação: A amplificação por PCR será realizada com oligonucleotídeos específicos para cada estirpe de bactéria, definidos pela RELARE. O sistema para reação constará de uma mistura constituída por água mili-Q-estéril, dNTPs, tampão, MgCl₂, enzima TaqDNA polimerase, oligonucleotídeos específicos e colônia/bactéria/nódulo a ser analisado. Os ciclos de amplificação ficarão definidos, pela RELARE, para cada oligonucleotídeo recomendado e serão disponibilizados, pela FEPAGRO, aos laboratórios credenciados. Os fragmentos obtidos serão analisados em gel de eletroforese horizontal com agarose. As bandas serão coradas, visualizadas e os perfis comparados com o padrão para aquela estirpe, disponibilizado pela FEPAGRO.

1.6. Determinação do ph e umidade

Tanto o grau de acidez como o percentual de umidade (substratos sólidos, no último caso) têm determinado uma maior ou menor sobrevivência dos microrganismos no produto inoculante. Estes exames complementares subsidiarão o resultado final do exame quantitativo empregado.

pH – O grau de acidez é definido através da escala de pH que determina a concentração de íons hidrogênio na solução. O pH dos produtos inoculantes será determinado através de potenciômetro, que deverá ser calibrado com soluções tampão de pH conhecidas. O pH ótimo para a estabilidade dos rizóbios no produto encontra-se no intervalo de 6,5 a 7,0

Umidade – O percentual de umidade será expresso em base de substrato seco à temperatura de 105° a 110° C, pelo período de tempo de duas horas, quando atingido o equilíbrio de invariabilidade da massa. Os produtos inoculantes com substrato turfoso de origem brasileira têm apresentado uma estabilidade adequada dos rizóbios quando a umidade se apresenta no intervalo entre 35 e 45%.

Pesando-se uma alíquota de 10 a 15 gramas de cada subamostra, tomado inicialmente o peso inicial do recipiente, avalia-se a massa final do substrato. A umidade da amostra será a determinada pela média das duas subamostras através da seguinte fórmula:

$$Ug (\%) = \frac{(m_1 - m_f) \times 100}{m_1 - tar}$$

Onde: Ug = umidade gravimétrica, em %

m_1 = massa inicial

m_f = massa final

tar = tara do recipiente

2. Avaliação de estirpes e testes de eficiência agrônômica de novos inoculantes ou tecnologias de inoculação

Os experimentos de avaliação de novas estirpes e testes de eficiência agrônômica de novos inoculantes ou tecnologias de inoculação devem ser conduzidos em laboratório, casa de vegetação e a campo. No caso de campo, os experimentos deverão ser conduzidos em, pelo menos, dois ecossistemas de importância para a cultura em questão e por duas safras agrícolas.

2.1. Avaliação em laboratório

A qualidade dos inoculantes deverá ser testada de acordo com os itens 1.2 e 1.3.

2.2. Testes de seleção de estirpes (casa de vegetação)

Colocar as sementes pré-germinadas em vasos Leonard autoclavados preenchidos com um dos substratos descritos no item 1.3.2.4 e 500 ml de solução nutritiva de Norris. Pode-se usar uma dose baixa de N-mineral (1 mM de NH_4NO_3) para promover o crescimento inicial das plantas. Inocular 1 ml da suspensão das estirpes de rizóbios em fase de crescimento exponencial por vaso, recomendando-se no mínimo seis repetições para cada tratamento. Além do tratamento com as estirpes já recomendadas para uso em inoculantes comerciais, usar dois tratamentos controles sem inoculação, sendo um sem nitrogênio e um com 700 mg de N (NO_3NH_4) parcelado semanalmente. Após 35 a 40 dias, proceder à avaliação dos seguintes parâmetros: número e massa seca de nódulos, massa seca da parte aérea e N total.

Observação: Cuidados normais de assepsia devem ser observados durante o preparo dos vasos, inoculação e condução dos testes.

2.3. Avaliação a campo das estirpes selecionadas em casa de vegetação e testes de eficiência agrônômica de produtos inoculantes e outras tecnologias

Nos inoculantes que usam como substrato a turfa, em geral, uma substância adesiva é adicionada para assegurar a aderência das partículas às sementes. Quando essa substância é constituída por carboidratos, além de servir como adesivo, também estimula o crescimento da bactéria inoculada na semente.

Cuidados devem ser tomados com as sementes inoculadas: não devem ser expostas ao sol e devem ser armazenadas em local fresco e seco caso não possam ser semeadas no mesmo dia. A maioria dos produtos químicos são tóxicos quando em contato direto com a bactéria, tais como os adubos nitrogenados e fosforados e muitos agroquímicos usados para tratamento de sementes (fungicidas, micronutrientes e inseticidas) ou mesmo, herbicidas. Nesse caso, evitar o contato direto com esses produtos tanto

na semeadura quanto na própria semente. No caso de ser necessária a aplicação de micronutrientes, recomenda-se que a aplicação seja feita por pulverização foliar antes da floração na mesma dose recomendada para as sementes ou segundo as recomendações técnicas para cada região.

A metodologia aqui descrita é própria para soja e feijão e deverá sofrer as adaptações necessárias para outras culturas.

Princípios básicos para o preparo da área experimental

Análise de solo da área para proceder à adubação recomendada de acordo com a cultura. Sempre que possível, fazer análise foliar da cultura anterior para decidir sobre a adubação com micronutrientes. O solo poderá ter uma população de rizóbio estabelecida.

Sementes de soja ou feijão da(s) cultivar(es) recomendada(s) para a região, depois de inoculadas ou não, serão semeadas de forma manual. As parcelas experimentais deverão ter no mínimo 4,0 x 6,0 m e serão distanciadas em 1,0 m, com 12 linhas espaçadas em 0,5 m. A colheita da produção de grãos será feita nas seis linhas centrais de cada parcela, dispensando-se 1 m em cada cabeceira (área útil = 6,0 m²). O delineamento experimental utilizado deverá ser o de blocos ao acaso, com, no mínimo, seis repetições.

Tratamentos

O experimento de campo deverá conter os produtos comerciais ou estirpes a serem testados e controles: (a) ausência de fertilizante nitrogenado e inoculação; (b) controle com N-mineral (200 kg de N/ha para a soja, sendo 50% no plantio e 50% na floração e 80 kg de N para o feijão, sendo 20 kg no plantio e 60 kg aos 20-25 dias após emergência, tendo como fonte de N a uréia); (c) inoculação padrão. A inoculação padrão consiste em umedecer as sementes com água açucarada a 10%, usando no máximo 300 ml por 50 kg de sementes, e aplicação de aproximadamente 600.000 células por semente de um inoculante turfoso com população mínima de 1×10^9 células/g de inoculante. O cálculo do número de células por semente deve tomar por base que um kg de semente tem 7000 sementes. Como a turfa possui um efeito físico de proteção das células contra dessecação e temperaturas elevadas, sugere-se ajustar a concentração de células do inoculante padrão e a quantidade de turfa para que a dose final fique com

600.000 células/semente num total de 400 a 500 g de inoculante turfoso por 50 kg de semente. No caso do feijão a testemunha inoculação padrão consiste de aplicação de 400 a 500 g de inoculante turfoso por 50 kg de semente.

Sempre usar a mesma população de células para a inoculação padrão e para os inoculantes ou estirpes em teste assim como a dose recomendada pelo fabricante (dois tratamentos por produto, caso a recomendação do fabricante resulte em diferente número de células por semente). A aplicação do inoculante deve ser precedida da aplicação de 300 ml de água açucarada (10%) por 50 kg de sementes, para o caso dos inoculantes em pó ou turfa. No caso de inoculantes líquidos, o total de líquido a ser aplicado nas sementes não deve ultrapassar 300 ml por 50 kg de sementes.

Análises e parâmetros a serem avaliados

- **Caracterização química do solo**

Deverão ser analisadas as características químicas dos solos, como pH, macro e micronutrientes. Para os micronutrientes, analisar apenas aqueles para os quais existirem métodos de extração adequados e análises de calibração.

- **População de rizóbio**

Tanto as amostras do solo da área experimental quanto dos inoculantes testados deverão ter a população de rizóbio determinada através dos testes descritos no item 1.3. em solos com população de rizóbio estabelecida, sugere-se fazer identificação das estirpes nos nódulos formados através das técnicas descritas no item 1.5.

- **Nodulação**

Coletar cinco plantas com as raízes intactas, da terceira linha de cada lado da parcela, aos 30 - 35 dias após emergência. Apresentar resultados para número (nº/planta) e massa seca (mg/planta) de nódulos por planta.

- **Parte aérea (parâmetro obrigatório para avaliação de estirpes)**

Separar a parte aérea (usar o ponto de inserção cotiledonar com ponte de corte) e apresentar os resultados para massa seca (g/planta) e N total na massa seca (mg N/planta).

- Grãos

O rendimento de grãos deve ser corrigido para 13% de umidade e expresso em kg/ha. Determinar o N total nos grãos e expressar em mg/kg e em kg de N/ha.

- Eficiência dos nódulos (parâmetro obrigatório para avaliação de estirpes)

Apresentar os resultados de eficiência dos nódulos em mg de N-total na parte aérea/mg de nódulo.

- Análise estatística

Os resultados devem ser submetidos à análise de variância e, quando o teste "F" for significativo a 5%, as médias dos tratamentos deverão ser comparadas pelo teste "t" ou teste de Duncan, também ao nível de 5% de significância. Quando a ANOVA apresentar teste de "F" significativo a 10%, as médias dos tratamentos deverão ser comparadas pelo teste "t" ou teste de Duncan, também ao nível de 10% de significância.

- Interpretação dos resultados

Para recomendação de inoculantes, estirpes e/ou outras tecnologias, estes devem apresentar resposta igual ou superior à inoculação padrão e/ou às estirpes e tecnologias já recomendadas, respectivamente, e superior ao controle sem inoculação nos locais e safras testados. No caso da soja, a produtividade mínima deve ser de 2000 kg/ha, para que o teste seja considerado válido.

- Apresentação dos Resultados de Testes de Eficiência Agronômica na RELARE

A apresentação dos resultados na RELARE deverá ser sucinta e esquemática e deverá, obrigatoriamente, conter:

- a) Caracterização química e biológica (população do rizóbio em estudo) do solo;
- b) Adubação e correção do solo;
- c) Tabela contendo, para cada tratamento: número e massa seca dos nódulos, nitrogênio total nos grãos e rendimento de grãos. Todos os resultados devem ser analisados estatisticamente.

- Relatório Técnico-Científico

O relatório técnico-científico deve seguir estritamente as orientações deste protocolo, contendo a descrição completa da metodologia, dos resultados obtidos, da conclusão clara sobre a eficiência do produto testado, assim como a(s) assinatura (s) do(s) pesquisador(es) responsável(is).

3. Referências

ANDRADE, D. S.; HAMAKAWA, P. J. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (Eds.) **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 63-94.

ANÁLISE de corretivos, fertilizantes e inoculantes. Métodos oficiais. In: Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária (LANARV / DICOV / SNAD) **Laboratório Nacional de Referência Vegetal – LANARV**. Brasília, 1988. 104 p. (MÉTODOS PADRÕES, OFICIAIS para análise de corretivos, fertilizantes e inoculantes definidos pela Portaria/SNAD nº 31, de 08 de junho de 1982).

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 542 p.

IKUTA, N. **Desenvolvimento de métodos de identificação e quantificação de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum***. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1995. 90 p. Tese de doutorado.

LUPWAYI, H. P.; OLDEN, P. E.; SANDE, E. S.; KEYSER, H. H.; COLLINS, M. M.; SINGLETON, P. W.; RICE, W. A. Inoculant quality and its evaluation. **Field Crops Research**, v. 65, p. 259-270, 2000.

NORRIS, D. O.; DATE, R. A. Legume Bacteriology. In: (SHAM, N. H.; BRYAN, W. W. ed. **Tropical Pasture Research – Principles and Methods**. Hurley: Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crops, 1976. p. 134-174. (Bulletin, 51).

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, E. T.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Handbook for rhizobia: methods in legume-*Rhizobium* technology**. New York: Springer-Verlag, 1994. 450 p.

SPAINK, H. P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, P. J. J. **The Rhizobiaceae. Molecular biology of model plant-associated bacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. 566p.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164 p. (IBP Handbook No. 15).

Protocolo para a análise da qualidade e da eficiência agrônômica de inoculantes, estirpes e outras tecnologias relacionadas ao processo de fixação biológica do nitrogênio em plantas não leguminosas

Protocolo apresentado pela pesquisadora Vera Baldani da Embrapa Agrobiologia na XI RELARE e aprovado na XIII RELARE.

Introdução

As bactérias diazotróficas associativas possuem a capacidade de se multiplicar, colonizar e infectar as raízes e/ou a parte aérea das plantas não leguminosas, penetrando nos tecidos das plantas através de feridas, aberturas naturais (estômatos) ou por ocasião da ruptura da raiz principal, na emergência das raízes secundárias e pêlos radiculares, não formando estruturas visíveis, como os nódulos das plantas leguminosas, podendo assim estabelecer uma associação endofítica ou não com estas plantas. Essas bactérias diazotróficas possuem o complexo enzimático, nitrogenase, que consegue quebrar a ligação tripla do nitrogênio do ar (N_2), transformando-o em amônia (NH_3). A amônia é então incorporada em diversas formas de N orgânico para ser então utilizada pela planta hospedeira.

A eficiência do processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN) depende de fatores bióticos e abióticos. Isto é, vários fatores inerentes ao ambiente, à fisiologia e à biologia da planta, da cultivar e da bactéria. Entre estes, destacam-se os fatores físicos do solo, como temperatura, pH, umidade, etc., os fatores genéticos e nutricionais ligados à planta e a eficiência da estirpe utilizada. Além desses fatores, estudos de competitividade entre as estirpes introduzidas com as nativas no solo têm mostrado que aumentando a população da bactéria, introduzida nas sementes através de inoculação, ocorre um melhor estabelecimento da estirpe no solo, permitindo assim, uma melhor competitividade da estirpe introduzida, o que por consequência, pode proporcionar maior eficiência de FBN. Assim, a má qualidade do inoculante, sistemas inadequados de inoculação, armazenamento do inoculante e a aplicação de certos fungicidas ou inseticidas nas sementes, entre outros fatores, podem implicar na redução do número de células viáveis nas sementes ou no solo, e podem resultar em uma menor eficiência da FBN.

Definições

- **Recomendação de estirpes** – Para que uma determinada estirpe de bactéria diazotrófica possa fazer parte de inoculantes comerciais está terá que ser testada por órgãos de pesquisa oficiais, segundo os protocolos aqui descritos, com os resultados discutidos em reunião da RELARE e por esta recomendada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para produção de inoculantes.
- **Inoculantes** – Todo produto que contenha microrganismos com ação estimulante para o crescimento das plantas.
- **Outras tecnologias** – Novos processos de veiculação de microrganismos fixadores de nitrogênio para gramíneas, ou novo produto contendo microrganismos promotores de crescimento para plantas leguminosas e não leguminosas. Ou ainda novos produtos oriundos dos microrganismos, que possam beneficiar o crescimento das plantas não leguminosas.

Novos produtos, contendo estirpes, tecnologia e outras recomendações discutidas e aprovadas nas reuniões da RELARE, deverão receber parecer provisório para fins de registro pelo MAPA. Para obtenção do parecer definitivo, deverão ser submetidos aos testes de eficiência agrônômica, seguindo as orientações do presente protocolo. Esses testes deverão ser conduzidos por instituições de pesquisa credenciadas junto ao MAPA e obedecer às normas definidas pela RELARE (ou publicadas em portaria). A aprovação ou não do produto ou tecnologia se dará após análise dos resultados pela RELARE. Para evitar que um produto seja testado inúmeras vezes e que os resultados negativos sejam desconsiderados, o fabricante ou responsável pelo inoculante terá que comunicar a RELARE cada teste a campo no início da safra. Testes não comunicados com a devida antecedência não serão considerados pela RELARE.

A proposta de recomendação de novas estirpes de bactérias fixadoras de N_2 para determinada cultura, que já tenha estirpes recomendadas, deverá apresentar resultados comparativos em relação às estirpes já recomendadas.

Avaliação de estirpes e testes de eficiência agrônômica de novos inoculantes ou tecnologias de inoculação.

Os experimentos de avaliação de novas estirpes e testes de eficiência agrônômica de novos inoculantes ou tecnologias de inoculação devem contemplar testes de laboratório, casa de vegetação e a campo. No caso de campo, os experimentos deverão ser conduzidos em, pelo menos duas regiões ou ecossistemas de importância para a cultura em questão e em duas safras agrícolas, ou ainda em 4 regiões em uma única safra desde que obedeça aos critérios descritos na metodologia de avaliação de estirpes, apresentados neste protocolo.

1. Análise da Qualidade de Inoculantes

1.1. Preparo da amostra

A amostra do produto a ser testado deverá ser composta por duas subamostras "A" e "B", que deverão ser individualmente identificadas, homogeneizadas e posteriormente higienizadas externamente, com álcool etílico a 75%, em sala asséptica, a fim de evitar contaminantes. As análises serão compostas por exames decisórios, quanto ao aspecto do enquadramento às exigências mínimas (teste de germinação das sementes, teste de pureza das estirpes utilizadas para a inoculação, teste quantitativo, número de células viáveis e culturáveis em seu respectivo meio de cultura e teste de avaliação de sementes pré-inoculadas), e identificativos, quanto ao aspecto do enquadramento às exigências mínimas, e complementares (temperatura, pH e umidade), que servirão para dar subsídios ao resultado do exame quantitativo empregado.

1.2. Teste de Pureza dos Inoculantes

A fim de proporcionar uma cobertura adequada para a expressão e quantificação dos microrganismos, diferentes dos especificados na rotulagem dos produtos inoculantes (contaminantes), serão empregados os meios diferenciais (ágar nutritivo (AN), Dygs e/ou batata). Deverão ser utilizadas, para o teste de pureza, as mesmas diluições elaboradas para o exame analítico das amostras dos produtos inoculantes. Para testar a presença de microrganismos contaminantes serão inoculadas placas de Petri com alíquotas de 0,1 mL das diluições seriadas 10^{-3} a 10^{-6} , em triplicatas com meios diferenciais.

Após a absorção do inóculo, as placas deverão ser colocadas invertidas em

estufa a 30°C e observadas pelo período de 5 a 7 dias, quando então, será efetuada a leitura final. Os resultados serão expressos para cada um dos meios diferenciais (NA, Dygs ou Batata), de acordo com a média do número de unidades formadoras de colônia por mililitro de inóculo (UFC/mL).

Resultado Final: O cálculo para o resultado final será a média originada da sub amostra "A" com a sub amostra "B".

Diluição seriada decimal: A diluição seriada é empregada para possibilitar a contagem através da semeadura em placas de Petri, contendo meio sólido, ou através do método do Número Mais Provável (NMP) em frascos contendo meio semi-sólido, semi-seletivo para cada bactéria utilizada como inóculo, possibilitando a determinação do número de células viáveis dentro dos intervalos de segurança propostos por cada uma das técnicas empregadas. Para formar a diluição 10^{-1} , retirar 10,0 g ou 10,0 mL do produto inoculante e adicionar em um frasco Erlenmeyer com 90,0 mL de solução salina (1/4 dos sais do meio de cultura NFb), colocando para homogeneizar a solução em agitador orbital pelo período de tempo de 1 minuto. Logo em seguida, retirar uma alíquota de 1,0 mL desta solução e acrescentar em um tubo de ensaio com 9,0 mL de solução salina, procedendo à homogeneização desta solução em um agitador de tubos, formado assim, a diluição 10^{-2} . Da diluição 10^{-2} , retirar 1,0 mL e adicionar em outro tubo de ensaio com 9,0 mL de solução salina, formando na seqüência, a diluição 10^{-3} . E assim sucessivamente, usando sempre a última diluição, até formar as diluições desejadas (figura 1). O uso da solução salina para a diluição decimal em série é importante para a estabilidade osmótica das células dos microrganismos que estão sendo testados. No caso dos inoculantes não solúveis em água, os fabricantes deverão informar qual o diluente a ser usado.

Meio ágar nutritivo (AN): Meio indicado para o desenvolvimento de bactérias viáveis e culturáveis. Este meio favorece o crescimento de contaminantes em detrimento do crescimento das bactérias diazotróficas, que demoram mais tempo para se multiplicar. A esterilização deve ser feita por autoclavagem a 121°C e 1 atmosfera por 10 minutos, a fim de evitar reações secundárias com a glicose. O pH final deverá estar em torno de 6,8.

- Meio ágar nutritivo (AN)

- 3,0 g Extrato de Carne
- 10,0g peptona
- 2,5 g Glicose
- 15,0 g Agar
- 1000 mL Água destilada
- Meio de cultura Batata (*Herbaspirillum* spp. e *Azospirillum* spp.)
 - 200 g de batata
 - 2,5 g de ácido málico
 - 2,5 g de açúcar cristal
 - 2 ml de solução de micronutrientes*
 - 1 ml de solução de vitaminas**
 - 15,0g Agar
- Solução de micronutrientes
 - $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,200g
 - $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$0,235g
 - H_3BO_30,280g
 - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,008g
 - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,024g
 - Completar o volume para 200 ml com água destilada.
- ** Solução de vitamina (dissolver em banho maria)
 - Biotina.....10mg
 - Pyridoxol-HCl.....20mg
 - Água destilada.....100mL

Modo de Preparo: Pesar 200 g de batata inglesa, descascar, lavar e ferver durante 30 minutos. Em seguida, filtrar em funil com algodão. Misturar as quantidades de ácido málico e açúcar cristal dissolvendo-as em água destilada, até 50 mL e ajustando o pH para 6,5 a 7,0 com KOH. Adicionar ao filtrado essa solução e as soluções de micronutrientes e vitaminas. Completar o volume para 1000 mL, com água destilada.

- Meio Dygs
 - 2,0g Glicose
 - 2,0g Ácido Málico
 - 1,5g Peptona bacteriológica

- 2,0g Extrato de levedura
- 0,5g $K_2 HPO_4$
- 0,5g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- 1,5g Ácido glutâmico
- 1000ml água destilada

Ajustar o pH de acordo com o metabolismo da bactéria em teste. Por exemplo: *Azospirillum* spp. pH 6.8 e *Herbaspirillum* spp. pH 6.0. Para meio sólido acrescentar 15g/l de agar

1.2.1. Limite dos contaminantes: O desenvolvimento de microrganismos não especificados a partir da diluição $1,0 \times 10^{-5}$ considera o lote ou partida da amostra fora dos padrões para comercialização, mesmo que apresente as garantias mínimas estabelecidas do número de bactérias diazotróficas por grama ou mililitro da amostra.

1.3. Método quantitativos para contagens de bactérias diazotróficas

Deverá ser observado um dos métodos a seguir, para a contagem das células do inóculo:

o método da diluição e contagens em placas ou o método do Número Mais Provável (NMP) utilizando-se a tabela de Mc Crady. Para isso deverá ser utilizado meio semi sólido para o microrganismo em questão.

Exemplo: meio JNFb para *Herbaspirillum seropedicae*
meio NFb para *Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum*

1.3.1. Diluição e contagem em placas

Para a contagem do número de células do inóculo poderá ser empregada a contagem pelo método de contagem direta "surface" ou método do espalhamento. Como meio de cultura, será utilizado o meio nutriente agar, Dygs ou batata, no volume de 15 a 20 mL de meio por placa de petri.

1.3.1.1. Contagem pelo método "Surface" ou espalhamento

Consiste em semear 0,1mL das diluições seriadas 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} das soluções dos inoculantes na superfície do meio nutriente ágar, Dygs ou batata, distribuídos em placas de Petri que deverão ser semeadas, após solidificação do agar. Cada diluição terá três repetições em placas distintas e será espalhada sobre o meio de cultura com alça de Drigalski, de

modo que não toque a lateral da placa, a fim de distribuir uniformemente as células do microrganismo. As placas, após a semeadura e absorção do inóculo, deverão ser colocadas invertidas em estufa a 30°C pelo período de 5 a 7 dias, quando então, será efetuada a contagem. A média das UFC da diluição que apresentar um número de colônias entre 30 a 200 UFC por mililitro será considerada na avaliação final.

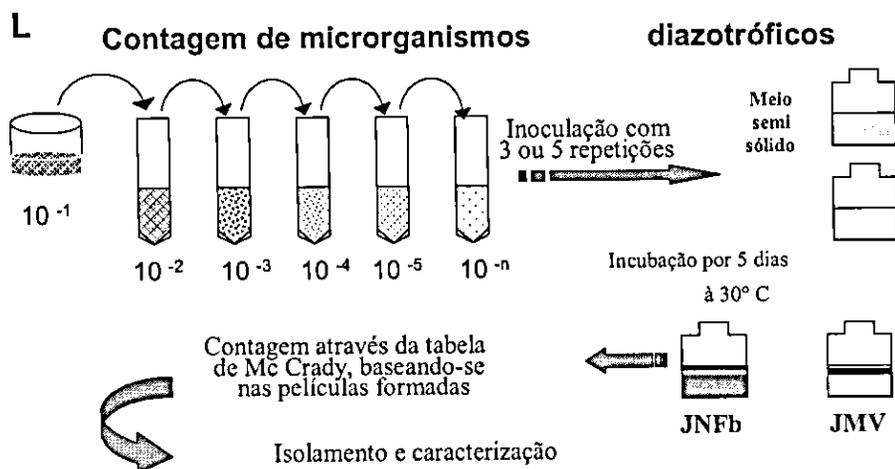
Cálculo: Multiplicar a média do número de colônias (UFC/0,1mL) das três placas de petri pela diluição que proporcionou a leitura no intervalo de 30 a 200 UFC/0,1mL e pelo fator de correção 10 da alíquota empregada de 0,1mL

Exemplo: Admitindo-se que o número médio de colônia das três placas foi de 50 UFC/0,1mL e a diluição que proporcionou esta leitura foi a 10^{-6} . Então, calcula-se:

Dados: Média = 50

Fator de correção = 10; Diluição de leitura = 10^{-6} ; Logo: Número de células do microrganismo = $50 \times 10 \times 10^{-6} = 5,0 \times 10^{-8}$ UFC/g ou mililitro de inoculante.

1.3.2. Método do número mais provável (NMP)



O método do NMP é um processo indireto de contagem que envolve a inoculação, em triplicata de 0,1mL de cada solução diluída crescente a diluição seriada decimal. A solução deverá ser preparada no momento do uso e os tubos serão inoculados com quatro ou cinco (10^{-6} a 10^{-9} ou 10^{-10}) diluições. A inoculação consistirá na adição de alíquotas de 1,0 mL de cada diluição por tubo (unidade teste) que constarão em triplicatas.

Deverão ser incluídos tubos controles positivos e negativos e o crescimento se dará em câmara de crescimento.

A contagem do NMP em meio semi específico deverá ser feita da seguinte forma: 0,1mL de cada solução diluída crescente do produto inoculante deverá ser colocado em frascos contendo meio de cultura semi-sólidos e semi-específicos de acordo com o diazotrófico a ser testado, utilizando-se as diluições de 10^{-6} a 10^{-9} ou 10^{-10} . Este método pressupõe que a formação de película no meio semi-sólido, confere caráter positivo ao teste, enquanto que a ausência de película implica em caráter negativo do mesmo. A partir da contagem do inoculo, no meio de cultura, o teste demanda 5 a 7 dias para a sua conclusão e se vale da tabela de Mc Crady (Dobereiner et al., 1995), para a estimativa do número de células presentes no inoculante.

Testes positivos e negativos: O controle positivo ou negativo é indicativo da não interferência de fatores externos, que podem ocorrer na técnica de contagem do NMP. Para compor o teste positivo, utiliza-se uma cultura pura de bactéria específica, onde serão utilizadas alíquotas e repetições das mesmas diluições empregadas nos exames dos produtos inoculantes. O controle negativo será composto, unicamente, do substrato utilizado para a produção do inoculante, com o número de frascos do teste positivo e nas mesmas diluições utilizadas no controle positivo. O teste negativo, poderá também ser utilizado como controle.

Meio semi-seletivo: No caso da avaliação de produtos inoculantes específicos para determinadas culturas, que contenham um número elevado de contaminantes, o número de células estabelecidas como garantia, será verificado utilizando-se o meio semi-seletivo (Dobereiner et al., 1995), que permitam o crescimento do inoculo em uso e inibam o crescimento de contaminantes. O meio semi-seletivo será preparado em duas fases. A primeira, quando o meio é distribuído em frascos tipo penicilina ou tubo de

Tabela de McCrady para cálculo do Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas em contagem com três e cinco frascos/diluição.

A - 3 tubos/diluição					
Diluição com crescimento	Nº de diazotróficos	Diluição com crescimento	Nº de diazotróficos	Diluição com crescimento	Nº de diazotróficos
000	0,0	201	1,4	302	6,5
001	0,3	202	2,0	310	4,5
010	0,3	210	1,5	311	7,5
011	0,6	211	2,0	312	11,5
020	0,6	212	3,0	313	16,0
100	0,4	220	2,0	320	9,5
101	0,7	221	3,0	321	15,0
102	1,1	222	3,5	322	20,0
110	0,7	223	4,0	323	30,0
111	1,1	230	3,0	330	25,0
120	1,1	231	3,5	331	45,0
121	1,4	232	4,0	332	110,0
130	1,6	300	2,5	333	140,0
200	0,9	301	4,0	-	-

B - 5 tubos/diluição							
Diluição com cresc.	Nº diazo-tróficos	Diluição com cresc.	Nº diazo-tróficos	Diluição cresc.	Nº Diazo-tróficos	Diluição cresc.	Nº de diazo-tróficos
000	0,0	203	1,2	400	1,3	513	8,5
001	0,2	210	0,7	401	1,7	520	5,0
002	0,4	211	0,9	402	2,0	521	7,0
010	0,2	212	1,2	403	2,5	522	9,5
011	0,4	220	0,9	410	1,7	523	12,0
012	0,6	221	1,2	411	2,0	524	15,0
020	0,4	222	1,4	412	2,5	525	17,5
021	0,6	230	1,2	420	2,0	530	8,0
030	0,6	231	1,4	421	2,5	531	11,0
100	0,2	240	1,4	422	3,0	532	14,0
101	0,4	300	0,8	430	2,5	533	17,5
102	0,6	301	1,1	431	3,0	534	20,0
103	0,8	302	1,4	432	4,0	535	25,0
110	0,4	310	1,1	410	3,5	540	13,0
111	0,6	311	1,4	441	4,0	541	17,0
112	0,8	312	1,7	450	4,0	542	25,0
120	0,6	313	2,0	451	5,0	543	30,0
121	0,8	320	1,4	500	2,5	544	35,0
122	1,0	321	1,7	501	3,0	545	45,0
130	0,8	322	2,0	502	4,0	550	25,0
131	1,0	330	1,7	503	6,0	551	35,0
140	1,1	331	2,0	504	7,5	552	60,0
200	0,5	340	2,0	510	3,5	553	90,0
201	0,7	341	2,5	511	4,5	554	160,0
202	0,9	350	2,5	512	6,0	555	180,0

ensaio e esterilizado em autoclave a 121°C a 1 atmosfera por cerca de 15 minutos. A segunda fase, partindo dos meios semi-seletivos sólidos, após a autoclavagem e imediatamente antes da solidificação do agar (temperatura entre 45 e 50°C) serão vertidos em placas de Petri, no volume de 15 a 20 mL de meio por placa.

Meios semi seletivos

- Meio de cultura JMV (para *Burkholderia* spp.)
 - 5 g de manitol
 - 6 mL de K_2HPO_4
 - 18 mL de KH_2PO_4
 - 2 mL de $Mg SO_4 \cdot 2 H_2O$
 - 2 mL de $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$
 - 1 mL de NaCl
 - 2 mL de azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2 N KOH)
 - 2 mL de solução de micronutrientes*
 - 4 mL FeEDTA (solução 1,64%)
 - 1 mL solução de vitaminas**
 - Ajustar o pH para 4,5 a 5,0 e completar o volume para 1000 mL com água destilada.
 - Para o meio semi-sólido, adicionar 1,8 g de ágar/L
 - Para o meio sólido, acrescentar 20 g de ágar/L e 100 mg/L de extrato de levedura.
- Meio de cultura LGI (*Azospirillum amazonense*)
 - 5 g de sacarose ou açúcar cristal
 - 0,2 g de K_2HPO_4
 - 0,6 g de KH_2PO_4
 - 0,2 g de $Mg SO_4 \cdot 2 H_2O$
 - 0,02 g de $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$
 - 0,002 g de $Na_2Mo_4 \cdot 2 H_2O$
 - 5 mL de azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2 N KOH)
 - 4 mL FeEDTA (solução 1,64%)
 - 1 mL solução de vitaminas**
 - Ajustar o pH para 6,0 a 6,2 com H_2SO_4 e completar o volume para 1000 mL com água destilada.
 - Meio semi-sólido, adicionar 1,8 g de ágar/L
 - Meio sólido, adicionar 17 g de ágar/L e 50 mg/L de extrato de levedura.
- Meio de cultura JNFb (*Herbaspirillum* spp.)
 - 5,0g de ácido málico
 - 0,6g de K_2HPO_4
 - 1,8 g de KH_2PO_4

- 0,2 g de $Mg SO_4 \cdot 7 H_2O$
 - 0,1g de NaCl
 - 0,02 g de $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$
 - 2 mL de azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2 N KOH)
 - 2 mL de solução de micronutrientes
 - 4 mL FeEDTA (solução 1,64%)
 - 1 mL solução de vitaminas
 - 4,5g de KOH
 - Ajustar o pH para 5,8 com KOH e completar o volume para 1000 mL, com água destilada.
 - Para o meio semi sólido adicionar 1,8 de agar/L
 - Para o meio sólido adicionar 17g de agar/L e 50 mg/L de extrato de levedura.
- Meio de cultura NFb (*Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum*.)
- 5,0 g de ácido málico
 - 0,5g de K_2HPO_4
 - 0,2 g de $Mg SO_4 \cdot 7 H_2O$
 - 0,1g de NaCl
 - 0,02 g de $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$
 - 2 mL de azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2 N KOH)
 - 2 mL de solução de micronutrientes*
 - 4 mL FeEDTA (solução 1,64%)
 - 1 mL solução de vitaminas**
 - 4,5g de KOH
 - Ajustar o pH para 6,5 ou 6,8 com NaOH e completar o volume para 1000 mL, com água destilada.
 - Meio semi-sólido, adicionar 1,8g de agar/L
 - Meio sólido, adicionar 17g/L de agar e 50 mg/L de extrato de levedura

1.4. Assepsia e desinfecção de sementes: para avaliações em condições gnotobióticas

Este processo é necessário para evitar possíveis microrganismos que estejam na semente e possam interferir na germinação da semente e competir com o microrganismo teste.

Os métodos de assepsia e desinfestação para sementes de não leguminosas (milho, trigo, arroz, cevada, aveia, etc.) variam de acordo com a cultura a ser utilizada. Entretanto, a imersão das sementes após a desinfestação, por 2 horas em água destilada e estéril se faz necessário. Este processo facilita o intumescimento e a germinação da semente.

1.5. Pré-germinação das sementes

A pré-germinação das sementes destina-se a garantir o desenvolvimento de plântulas homogêneas para o transplante em tubos de ensaio, utilizados na primeira fase do teste de seleção de estirpe, etc.

As sementes deverão ser pré-germinadas em papel de germinação ou placas de petri contendo 20 a 25mL de solução estéril agarizada a 1% (10g agar/1000mL de água). Após a solidificação do agar, as sementes desinfestadas deverão ser distribuídas uniformemente na superfície das placas. As placas deverão ser incubadas a 25-30°C por 2 dias ou até que o aparecimento da radícula e visualizadas diariamente já que o tempo de germinação difere de cultura para cultura.

1.6. Condições de Cultivo

Câmara de crescimento: A câmara de crescimento deve se constituir em uma sala asséptica com: refrigeração, controle de temperatura; luminosidade de 100 a 1000 lumens, fornecido por lâmpadas fluorescentes Gro-Lux e Branca-fria, controladas, automaticamente, por "timer" para fotoperíodo (correspondente a cada cultura); sistema automático de manutenção da umidade para 70% e estantes para receber as grades com os tubos testes dos produtos inoculantes.

Casa de vegetação: A manutenção da limpeza da casa de vegetação é crucial para o sucesso dos testes desenvolvidos. Deve ser lembrado que o processo de colonização e infecção das raízes das plantas por bactérias diazotróficas é prejudicado por temperaturas elevadas (acima de 28-30°C), sendo, portanto, necessário que a casa de vegetação disponha de sistema de refrigeração. A pintura de seus vidros com tinta branca ou uso de sombrite 65-70% permite suficiente luminosidade e atenua o problema da temperatura elevada durante o verão.

1.7. Metodologia para avaliação da eficiência da colonização das plântulas pela estirpe utilizada nos inoculantes comerciais

Porcentagem de plantas colonizadas

Tendo em vista o intervalo de tempo do preparo do inoculante ao plantio e os materiais utilizados, o método objetiva avaliar a potencialidade da infectividade da bactéria a partir do plantio de sementes (desinfestadas segundo o item 1.4) inoculadas.

Dez tubos de ensaio, com capacidade de 120ml, contendo de 50 a 60 mL da solução de Hoagland sem nitrogênio, agarizada e esterilizada. Após a solidificação do agar deverá ser colocada uma semente pré-inoculada por tubo, de forma a romper levemente a superfície do agar.

Incluir três tubos de teste positivo e três de teste negativo.

Conduzir à câmara de crescimento, conforme descrito no item 1.3.2.1.

Fazer a avaliação entre o 25° e 30° dia de crescimento das plântulas.

Avaliação: Para a contagem final, as plântulas serão coletadas entre o vigésimo quinto e o trigésimo dia de crescimento. Um grama dessas raízes deverá ser macerado em 9 ml de água ou solução salina estéril e proceder-se-á então a diluição seriada 10^{-3} a 10^{-8} no meio de cultura semi-específico do microrganismo em questão. Os resultados serão expressos em LOG do número de células por grama de material fresco. Serão considerados satisfatórios os exames que apresentarem no mínimo 80% das plantas colonizadas nestas condições.

• Solução de Hoglands

- KH_2PO_4 sol.1 M 1 ml
- K_2HPO_4 sol.1 M 1 ml
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sol.1 M 2 ml
- $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,172g
- Solução de micronutrientes* 1 ml
- Sol. de Ferro (**) 1 ml
- Completar o volume com água destilada para 1000 ml e ajustar o pH 6,5 – 7,0
- (***) 1,21 g $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ /100 ml de água destilada, misturar bem e adicionar 0,6 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

1.8. Metodologia de identificação das estirpes recomendadas

As estirpes deverão ser, primeiramente identificadas através da formação de película característica na superfície do meio semi sólido pertencente ao microrganismo em questão. Testes complementares, como ELISA, PCR, etc. poderão ser utilizados a critério do laboratório teste.

1.9. Determinação do pH e umidade

Tanto o grau de acidez como o percentual de umidade (substratos sólidos, no último caso) tem determinado uma maior ou menor sobrevivência dos microrganismos no produto inoculante. Estes exames complementares subsidiarão o resultado final do exame quantitativo empregado.

pH – O pH dos produtos inoculantes será determinado através de potenciômetro, que deverá ser calibrado com soluções tampão de pH conhecidas. O pH ótimo para a estabilidade e sobrevivência das bactérias no produto encontra-se no intervalo de 6,2 a 7,0.

Umidade – O percentual de umidade será expresso em base de substrato seco ou úmido, desde que especificado. As amostras deverão ser secas à temperatura de 105° a 110°C, pelo período de tempo necessário para atingir o equilíbrio de invariabilidade da massa. Os produtos inoculantes com substrato turfoso têm apresentado boa estabilidade quando a umidade se apresenta no intervalo entre 30 a 60%.

Pesando-se uma alíquota de 10 a 15 gramas de cada sub-amostra, tomado inicialmente o peso inicial do recipiente, avalia-se a massa final do substrato. A umidade da amostra será determinada pela média das duas sub-amostras através da seguinte fórmula:

$$Ug (\%) = (mi - mf) \times 100 / (mi - tar)$$

Onde, Ug = umidade gravimétrica, em %; mi = massa inicial; mf = massa final; tar = tara do recipiente

2. Avaliação de estirpes e testes de eficiência agronômica de novos inoculantes ou tecnologias de inoculação

Os experimentos de avaliação de novas estirpes e testes de eficiência agronômica de novos inoculantes ou tecnologias de inoculação devem

ser conduzidos em laboratório, casa de vegetação e a campo. No caso de campo, os experimentos deverão ser conduzidos em, pelo menos, dois ecossistemas de importância para a cultura em questão e por duas safras agrícolas.

2.1 Avaliação em laboratório

A qualidade dos inoculantes deverá ser testada de acordo com os itens 1.2 e 1.3.

2.2 Testes de seleção de estirpes (tubos de ensaio)

Colocar as sementes pré-germinadas em tubos com capacidade para 120 mL, contendo 60 mL de solução de Hoagland agarizado e autoclavados. Inocular 1 mL da suspensão das estirpes em fase de crescimento exponencial por tubo. Recomenda-se no mínimo quatro repetições para cada tratamento. Além do tratamento com as estirpes recomendadas para uso em inoculantes comerciais, usar também dois tratamentos: controles sem inoculação, sendo um sem nitrogênio e outro com N, dependendo da cultura ser utilizada. Após 35 a 40 dias, proceder à avaliação dos seguintes parâmetros: número (NMP) das bactérias diazotróficas, massa fresca e seca da parte aérea e N total.

Observação: Cuidados normais de assepsia devem ser observados durante o preparo dos tubos, inoculação e condução dos testes.

2.3 Avaliação a campo das estirpes selecionadas em casa de vegetação e testes de eficiência agrônômica de produtos inoculantes e outras tecnologias

Atualmente, o substrato mais usado para a produção de inoculantes tem sido a turfa. Porém, outros substratos inertes ou protetores bacterianos têm sido pesquisados e utilizados. Em geral, um material adesivo é adicionado para assegurar a aderência das partículas nas sementes; este adesivo pode conter carboidratos para estimular o crescimento da bactéria inoculada na semente.

Cuidados devem ser tomados com as sementes inoculadas: não devem ser expostas ao sol e devem ser armazenadas em local fresco e seco, caso não possam ser semeadas no mesmo dia. A maioria dos produtos químicos é tóxica quando em contato direto com a bactéria, tais como os

adubos nitrogenados e fosforados e muitos agroquímicos usados para tratamento de sementes (fungicidas e inseticidas) ou mesmo, herbicidas. Neste caso, evitar o contato direto com esses produtos tanto na semeadura quanto na própria semente.

A metodologia aqui descrita é própria para uma grande maioria de plantas não leguminosas (cereais) e deverá sofrer as adaptações necessárias para outras culturas.

2.3.1. Princípios básicos para o preparo da área experimental

Análise de solo da área para proceder à adubação recomendada de acordo com a cultura. Sempre que possível, fazer análise foliar da cultura anterior para decidir sobre a adubação com micronutrientes. O solo poderá ter uma população nativa de bactérias diazotróficas já estabelecida.

Sementes do(s) cereal (ais) ou da cultura alvo da(s) cultivar(es) recomendada(s) para a região, depois de inoculadas ou não, serão semeadas de forma manual. As parcelas experimentais deverão ter no mínimo 4,0 x 6,0 m e serão distanciadas em 1,0 m, com 12 linhas espaçadas em 0,3 a 0,5 m ou de acordo com a cultura alvo. A colheita da produção de grãos será feita nas quatro linhas centrais de cada parcela, dispensando-se 1m em cada cabeceira (área útil de no mínimo 12 m²). O delineamento experimental utilizado deverá ser o de blocos ao acaso, com, no mínimo, quatro repetições.

2.3.2. Tratamentos

Os experimentos de campo e vasos deverão conter os produtos comerciais ou estirpes a serem testados e controles negativos (ausência de fertilizante nitrogenado e inoculação), controle com N-mineral (usar duas doses: a recomendada para a cultura alvo e metade desta dose, sendo 50% no plantio e 50% na floração, tendo como fonte de N a uréia, além da inoculação padrão. A inoculação padrão consiste em umedecer as sementes com goma arábica ou polvilho a 3% usando no máximo 300 mL por 50 kg de sementes, e aplicação de aproximadamente $1,0 \times 10^5$ células por semente, de um inoculante turfoso com população mínima de 1×10^9 células por g ou mL de inoculante.

Sempre usar a mesma população de células para a inoculação padrão e

para os inoculantes ou estirpes em teste assim como a dose recomendada pelo fabricante (dois tratamentos por produto, caso a recomendação do fabricante resulte em diferente número de células por semente). A aplicação do inoculante deve ser precedida da aplicação de goma arábica ou polvilho a 3% por 50 kg de sementes, por exemplo arroz, para o caso dos inoculantes em pó ou turfa. No caso de inoculantes líquidos, o total de líquido a ser aplicado nas sementes não deve ultrapassar 300 mL por 50 kg de sementes. Inoculantes líquidos, com doses inferiores a 300 mL por 50 kg de sementes, devem ser diluídos com água açucarada a 10% para se atingir uma aplicação de 300 mL por 50 kg de sementes e ter outro tratamento que é recomendação do fabricante.

Nota: Esta aplicação é diretamente dependente do tamanho das sementes.

2.3.3. Análises e parâmetros a serem avaliados

Deverão constar dos resultados a serem apresentados as características químicas dos solos e o número mais provável de células (NMP) nos inoculantes utilizados e nas amostras do solo da área experimental usando os testes descritos no item 1.3.

Os parâmetros a serem avaliados são: Massa seca da parte aérea (g/planta) e N-total na massa seca (mg N/planta) e nos grãos (kg N/ha). Apresentar, também os resultados de eficiência das estirpes na produção e qualidade dos grãos (teor de N), além do rendimento da cultura a 13% de umidade em kg/ha). Os resultados devem ser analisados estatisticamente pela análise de variância e as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Duncan ou teste T ao nível de 10% de significância.

2.3.4. Interpretação dos Resultados

Para recomendação de inoculantes, estirpes e/ou outras tecnologias, estes devem apresentar resposta igual ou superior à inoculação padrão e/ou às estirpes e tecnologias já recomendadas, respectivamente, nos locais e safras testadas.

3. Requisitos para credenciamento das Instituições de Pesquisa

As instituições de pesquisa que quiserem se credenciar para a realização dos testes aqui descritos terão de fazer a solicitação junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e satisfazer as seguintes condições mínimas:

- a) Ter engenheiro agrônomo ou profissional de área afim com formação em microbiologia do solo, capazes de responsabilizar-se pelos testes.
- b) Possuir instalações laboratoriais, de casa de vegetação e de campo experimental, compatíveis com os testes e análises necessárias.
- c) Não poderão ser produtores de inoculantes comerciais por caracterizar conflito de interesse.

Observações: As instituições poderão credenciar-se parcialmente, ou seja, para realizar apenas alguns tipos de teste. Duas ou mais instituições credenciadas poderão trabalhar em forma de parceria para a execução dos testes necessários a um determinado laudo.

As instituições credenciadas serão periodicamente fiscalizadas pelo MAPA.

Protocolo para análise da qualidade e da eficiência agrônômica de inoculantes de cianobactérias para arroz irrigado

Protocolo apresentado pela pesquisadora Maria Laura Turino Mattos, da Embrapa Clima Temperado e aprovado na X RELARE.

Introdução

As Cianobactérias (algas verde-azuladas) são microrganismos procarióticos fotossintéticos e fototróficos de vida-livre, alguns dos quais são capazes de fixar nitrogênio. É comum a sua ocorrência em ambientes aquáticos, como lavouras de arroz irrigado ou pequenas lagoas, com níveis moderados de nutrientes. Também podem ocorrer na superfície do solo ou somente abaixo desta, especialmente naqueles que recentemente foram expostos à erosão ou desmoronamentos. As cianobactérias são os únicos procarióticos que exibem mecanismos fotossintéticos característicos de plantas superiores, que contêm fotossistema II e se desenvolvem na presença de O_2 , podendo, ainda, sobreviver em ambientes com baixa luminosidade e oxigênio (Paul & Clark, 1988).

Os principais pigmentos fotossintéticos produzidos pelas cianobactérias são clorofila a, carotenos e xantofilas juntamente com ficobiliproteínas, c-ficocianin (azul) e c-ficoeritrin (vermelho). Devido à presença desses últimos pigmentos e mucilagens, a coloração das algas verde-azuladas (BGA=*blue-green algae*), na natureza, pode variar de amarelo-queimado, passando por vários tons de azul- esverdeado, até marrom ou preto. As formas vegetativas podem variar de unicelulares simples até filamentosas. As cianobactérias dos gêneros *Anacystis*, *Microcystis*, *Aphanothece*, *Gloeocapsa*, *Merismopedia* e *Eucapsis* são organismos unicelulares; *Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Spirulina*, *Microcoleus*, *Nostoc*, *Anabaena*, *Cylindrospermum*, *Calothrix*, *Rivularia*, *Gloeotrichia*, *Plectonema*, *Scytonema*, *Tolypothrix*, *Mastigocladus*, *Hapalosiphon*, *Fischerella* e *Stigonema*, são filamentosas (Roger & Kulasooriya, 1980). A capacidade para fixar N_2 é apresentada, principalmente, pelas cianobactérias filamentosas que contêm células especializadas chamadas de heterocistos, dentro dos quais ocorre a fixação de N_2 . Na presença de nitrogênio (nitrato ou amônia), não ocorre a formação

de heterocistos (Stanier et al., 1986). A espessa parede dos heterocistos, a qual ocorre a cada 10 a 15 células nos filamentos, protege a nitrogenase de danos provocados pelo O_2 por meio de meios físicos, como as membranas, para prevenir a difusão gasosa (Paul & Clark, 1988).

O ecossistema de arroz irrigado é um ambiente favorável para o crescimento e a fixação de N_2 pelas cianobactérias, atendendo as suas exigências quanto à luz, água, temperatura alta e disponibilidade de nutrientes. Neste ambiente, os gêneros mais encontrados são *Anabaena*, *Gleotrichia* e *Scytonema* (Paul & Clark, 1988).

A eficiência do processo de fixação de N_2 pelas cianobactérias depende de fatores físicos: luz, temperatura do ar, chuvas, ventos e períodos secos e úmidos; bióticos: patógenos, antagonistas e predadores; das propriedades do solo: pH e potencial redox; e das práticas agrônômicas: preparo e manejo do solo, fertilizantes inorgânicos (nitrogênio, fósforo, carbonato de cálcio, molibdênio), matéria orgânica, pesticidas (fungicidas, herbicidas, inseticidas e algicidas). Alta intensidade luminosa, temperaturas baixas, pH ácido e baixos níveis de fósforo disponível são fatores limitantes para o crescimento de cianobactérias em lavouras de arroz irrigado. Pesticidas — dependendo da natureza molecular, concentração e cepas cianobacterianas — podem causar efeito inibitório, seletivo ou estimulatório sobre as cianobactérias. Práticas de manejo (correção do solo, adubação fosfatada e outras...) podem acelerar o crescimento e a atividade de populações indígenas de cianobactérias fixadoras de N_2 . No entanto, mesmo que cepas indígenas fixadoras de N_2 estejam presentes no solo, sua eficiência pode ser baixa, sendo benéfico introduzir novas cepas (Roger & Kulasooriya, 1980). Esta introdução pode ser praticada, utilizando culturas puras ou misturas de cepas, dependendo do tipo de solo, da competição pela flora local e o uso de diferentes cultivares de arroz.

Como em todas as medidas de fixação de N_2 , a quantidade fixada dependerá das condições ambientais, como umidade, disponibilidade de nutrientes e o período no qual a fixação se efetiva. Estimativas de fixação de N_2 variam, em média, de 30-70 kg ha⁻¹ ano⁻¹ (Paul & Clark, 1988).

1. Análise da qualidade de inoculantes

1.1. Preparo da amostra

A amostra do produto a ser testado deverá ser composta por duas subamostras "A" e "B", que deverão ser individualmente identificadas, homogeneizadas e, posteriormente, higienizadas, externamente, com álcool etílico a 75%, em sala asséptica, a fim de evitar contaminantes. As análises serão compostas por exames decisórios, quanto ao enquadramento às exigências mínimas (teste de pureza, teste quantitativo e teste de caracterização), e indentificativos, quanto ao enquadramento às exigências mínimas, e complementares (pH e umidade), que darão subsídios ao resultado do exame quantitativo empregado.

1.2. Teste de pureza dos inoculantes

A fim de proporcionar uma cobertura adequada para a expressão e a quantificação dos microrganismos diferentes dos especificados na rotulagem dos produtos inoculantes, serão empregados os meios diferenciais ágar nutritivo (AN) e batata-dextrose-ágar (BDA). Deverão ser utilizadas, para o teste de pureza, as mesmas diluições elaboradas para o exame analítico das amostras dos produtos inoculantes. Para testar a presença de microrganismos não especificados serão inoculadas placas de Petri com alíquotas de 0,1 mL das diluições 10^{-5} e 10^{-6} , em triplicatas, com os meios diferenciais.

Após a absorção do inóculo, as placas deverão ser colocadas invertidas em estufa a 28°C e observadas pelo período de 10 dias, quando, então, será efetuada a leitura final. Os resultados serão expressos, para cada um dos meios diferenciais (AN e BDA), de acordo com a média do número de unidades formadoras de colônia por mililitro de inóculo (UFC/mL).

Resultado final: O cálculo para o resultado final será a média de UFC originada da subamostra "A" com a subamostra "B".

Diluição seriada decimal: A diluição seriada é empregada para possibilitar a contagem por meio de semeadura em placas de Petri e a determinação com segurança do número de células viáveis dentro dos intervalos propostos para a técnica empregada. Para formar a diluição 10^{-1} , retirar 10,0 g ou 10,0 mL do produto inoculante e adicionar em um frasco Erlenmeyer

com 90,0 mL de solução fisiológica (NaCl 0,85%), colocando, para homogeneizar, a solução em um agitador orbital por 10 minutos. No caso de inoculante turfoso, adicionar pérolas de vidro para a homogeneização. Logo em seguida, retirar uma alíquota de 1,0 mL desta solução e transferi-la para um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução fisiológica, procedendo à homogeneização desta solução em um agitador de tubos, formando, assim, a diluição 10^{-2} . Da diluição 10^{-2} , retirar 1,0 mL e adicionar em outro tubo de ensaio com 9,0 mL de solução fisiológica, formando, na seqüência, a diluição 10^{-3} . Repetir este procedimento sucessivamente, usando sempre a última diluição, até formar as diluições desejadas. O uso da solução fisiológica para a diluição decimal em série é importante para a estabilidade osmótica das células dos microrganismos que estão sendo testados. No caso de inoculantes não solúveis em água, os fabricantes deverão informar qual o diluente a ser utilizado.

Meio ágar nutritivo (AN): Meio indicado para o desenvolvimento de bactérias. Ele favorece o crescimento de contaminantes em detrimento das cianobactérias. A esterilização deve ser feita por autoclavagem a 121°C e 1,0 atmosfera, por 10 minutos, a fim de evitar reações secundárias com a glicose. O pH final deverá estar em torno de 6,8.

• Meio ágar nutritivo (AN):

- 01- Extrato de carne 3,0 g
- 02- Peptona 10,0 g
- 03- Glicose..... 2,5 g
- 04- Ágar..... 15,0 g
- 05- Água destilada..... 1000 mL

Meio batata-dextrose-ágar (BDA): Este meio é indicado, principalmente, para o desenvolvimento de fungos e tem a propriedade de retardar a esporulação de alguns microrganismos. O pH final do meio deverá ficar em torno de 5,6.

• Meio batata-dextrose-ágar (BDA):

- 01- Batata descascada* 200,0 g
- 02- Dextrose 20,0 g
- 03- Ágar..... 15,0 g

- 04- Água destilada..... 1000 mL
- *Fazer infusão a quente de 200,0 g de batata fatiada em 1000 mL de água destilada; peneirar ou filtrar para retirar a batata.

Limite de contaminantes: O desenvolvimento de microrganismos não especificados, a partir da diluição empregada $1,0 \times 10^{-5}$, considera o lote ou a partida da amostra fora dos padrões para comercialização, mesmo que apresente as garantias mínimas estabelecidas do número de cianobactérias por grama ou mililitro.

Meio semi-seletivo: No caso da avaliação de produtos inoculantes específicos para arroz irrigado (*Oryza sativa* L.), que contenham um número elevado de contaminantes, o número de células estabelecido como garantia será verificado utilizando-se o meio semi-seletivo BG11 (Stein, 1975). Esse meio é usado, com êxito, por muitas cianobactérias. Pode-se adicionar vitamina B₁₂ ao meio para as espécies que a requeiram. O meio semi-seletivo será preparado em duas fases. A primeira, quando será preparada uma solução-estoque em frasco Erlenmeyer que, posteriormente, será esterilizada em autoclave a 121°C e 1,0 atmosfera, por cerca de 15 minutos. O pH do meio deve ser ajustado para 7,5. Em meio sólido, adicionar 15,0 g L⁻¹ de ágar bacteriológico. Na segunda fase, será preparada uma solução estéril de micronutrientes e, após a autoclavagem da solução-estoque, quando o meio estiver num intervalo de temperatura entre 40 e 45°C, deve-se adicionar 1,0 mL da mesma para o volume de 1000 mL. Após, o meio será vertido em placas de Petri, no volume de 15 a 20 mL por placa.

• Meio semi-seletivo (BG-11) – Primeira fase

- 01- NaNO₃ 150,0 g
- 02- K₂HPO₄..... 30,0 g
- 03- MgSO₄.7H₂O..... 75,0 g
- 04- CaCl₂.2H₂O..... 36,0 g
- 05- Ácido Cítrico 6,0 g
- 06- Citrato de Amônia 6,0 g
- 07- EDTA 1,0 g
- 08- Na₂CO₃ 20,0 g
- 09- Solução de Micronutrientes..... 1,0 mL
- 10- Água destilada..... 1000 mL

- Composição da solução de micronutrientes – Segunda fase
 - 01- H_3BO_3 2,86 g
 - 02- $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 1,81 g
 - 03- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,222 g
 - 04- $NaMoO_4 \cdot 5H_2O$ 0,390 g
 - 05- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,079 g
 - 06- $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 0,0494 g

Dissolver, em água destilada cada uma das substâncias listadas na segunda fase, separadamente. Esterilizá-las, por passagem em filtro de 0,2 μm , antes de serem adicionadas ao meio (BG11) autoclavado.

1.3. Métodos quantitativos para contagens de cianobactérias

1.3.1. Diluição e contagem em placas

A contagem de cianobactérias pode ser feita em placas, pelo método do espalhamento. Como meio de cultura, é utilizado o BG11 e ágar nutritivo, descritos no item 1.2, no volume de 15 a 20 mL por placa.

1.3.1.2. Contagem pelo método do espalhamento

Semear 0,1 mL das diluições seriadas 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} das soluções dos inoculantes na superfície do meio de cultura, em placas de Petri. Cada diluição terá três repetições em placas distintas e será espalhada, sobre o meio de cultura, com alça de Drigalski. Após a semeadura e absorção do inóculo, as placas deverão ser colocadas, invertidas, em estufa BOD, na presença de luz, com um fotoperíodo de 12 horas, incubadas por 14 dias a $30^\circ C$, quando, então, será efetuada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) da diluição que apresentar de 30 a 300 UFC por 0,1 mL.

Cálculo: Multiplicar a média do número de UFC/0,1 mL das três placas de Petri pela diluição que proporcionou a leitura no intervalo de 30 a 300 UFC/0,1 mL e pelo fator de correção 10 da alíquota empregada de 0,1 mL.

Exemplo: Admitindo-se que a média das três placas foi 75 UFC/0,1 mL e a diluição que proporcionou esta leitura foi de 10^{-6} , calcula-se:

Dados: Média = 75

Fator correção = 10

Diluição de leitura = 10^{-6} Logo,

Número de células do microrganismo = $75 \times 10 \times 10^6 \Rightarrow 7,5 \times 10^8$ UFC/g

1.5. Metodologia de identificação das cianobactérias recomendadas

1.5.1. Métodos Bioquímicos

A caracterização das estirpes de cianobactérias deverá ser feita com base nas características morfológicas, propriedades fisiológicas e reações bioquímicas. A identificação deverá ser baseada na classificação sistemática descrita em *Bergey's Manual of Systematic* (Holt et al., 1994).

1.6. Determinação do pH e da umidade

Tanto o grau de acidez como o percentual de umidade (substratos sólidos, no último caso) têm determinado uma maior ou menor sobrevivência dos microrganismos no produto inoculante. Estes exames complementares subsidiarão o resultado final do exame quantitativo empregado.

pH – O grau de acidez é definido utilizando a escala de pH, que determina a concentração de íons hidrogênio na solução. O pH dos produtos inoculantes será determinado por intermédio de potenciômetro. O pH ótimo, para a estabilidade das cianobactérias no produto, encontra-se no intervalo de 7,5 a 10,0.

Umidade – O percentual de umidade será expresso em base de substrato seco à temperatura de 105° a 110° C, pelo período de tempo de duas horas, quando atingido o equilíbrio de invariabilidade da massa. Pesando-se uma alíquota de 10 a 15 gramas de cada subamostra, tomado inicialmente o peso inicial do recipiente, avalia-se a massa final do substrato. A umidade da amostra será a determinada pela média das duas subamostras utilizando a seguinte fórmula:

$$Ug (\%) = \frac{(m_1 - m_f) \times 100}{m_1 - tar}$$

Onde, Ug = umidade gravimétrica, em %

m_1 = massa inicial

m_f = massa final

tar = tara do recipiente

2. Avaliação de estirpes e testes de eficiência agronômica de novos inoculantes ou tecnologias de inoculação

Novos produtos ou tecnologias de inoculação deverão ser trazidos para discussão no âmbito da RELARE e, uma vez aprovados, receberão parecer provisório para fins de registro pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Para obtenção do parecer definitivo deverão ser submetidos aos testes de eficiência agronômica, conduzidos no mínimo em dois ecossistemas de importância para a cultura, durante três safras agrícolas. Estes testes deverão ser conduzidos por instituições de pesquisa credenciadas junto ao MAPA e obedecer às normas definidas pela RELARE (ou publicadas em portaria). A aprovação ou não do produto ou tecnologia se dará após análise dos resultados pela RELARE. Para evitar que um produto seja testado inúmeras vezes e que os resultados negativos sejam desconsiderados, o fabricante terá que comunicar à RELARE cada teste a campo no início da safra. Testes não comunicados com a devida antecedência não serão considerados pela RELARE.

2.1. Avaliação em laboratório

A qualidade dos inoculantes deverá ser testada de acordo com os itens 1.2 e 1.3.

2.2. Testes de seleção de estirpes (casa-de-vegetação)

Cultivar plantas de arroz em vasos com solo autoclavado e irrigados com uma solução nutritiva com baixa concentração de N. Manter uma lâmina de água em torno de 10 cm de altura até cerca de 15 dias antes da colheita. Pode-se usar uma dose baixa de N-mineral (1 mM de NH_4NO_3) para promover o crescimento inicial das plantas. Inocular 1,0 mL da suspensão das estirpes de cianobactérias em fase de crescimento exponencial por vaso; recomendando-se no mínimo seis repetições para cada tratamento, após a formação da lâmina de água. Além do tratamento com as estirpes já recomendadas para uso em inoculantes comerciais, usar dois tratamentos controles sem inoculação, sendo um sem nitrogênio e um com 700 mg de N (NO_3NH_4) parcelado semanalmente. Após 35 a 40 dias, proceder à avaliação das seguintes variáveis: peso seco da biomassa, massa seca da parte aérea e N total.

Observação: Cuidados normais de assepsia devem ser observados durante o preparo dos vasos, inoculação e condução dos testes.

2.3. Avaliação em campo das estirpes selecionadas em casa-de-vegetação e testes de eficiência agrônômica de produtos inoculantes e outras tecnologias

A maioria dos produtos químicos, tais como os adubos nitrogenados e fosforados e muitos agroquímicos usados para tratamento de sementes (fungicidas, micronutrientes e inseticidas) ou mesmo, herbicidas são tóxicos, quando em contato direto com as cianobactérias. Neste caso, deve ser evitado o contato direto das cianobactérias com esses produtos na lavoura.

Princípios básicos para o preparo da área experimental

As parcelas experimentais deverão ter no mínimo 4,0 x 6,0 m e serão distanciadas em 1,0 m, com 12 linhas espaçadas em 0,5 m. A colheita da produção deverá ser realizada com umidade média dos grãos em torno de 22%, colhendo-se manualmente uma área central da parcela de 2,0 x 2,0 m (área útil = 4,0 m²), com auxílio de foice apropriada. O delineamento experimental utilizado deverá ser o de blocos ao acaso, com, no mínimo, cinco repetições.

A semeadura da área deverá ser feita no sistema convencional de cultivo, utilizando-se 150 kg ha⁻¹ de sementes, visando obter uma população inicial de 350 plantas por metro quadrado. A adubação de base deverá ser realizada junto com a semeadura, de acordo com a análise química do solo. O controle químico das plantas daninhas deve ser evitado e a irrigação definitiva deverá ocorrer aos 20-30 dias após a emergência do arroz.

A irrigação e a drenagem das parcelas deverão ser feitas de forma individual, visando evitar a contaminação entre elas. Utilizar canos de PVC de 100 mm de diâmetro e mangueira de uma polegada, associados a bóias reguladoras, para manter a lâmina de água em torno de 10 cm de altura. A inundação deverá ser mantida até cerca de 15 dias antes da colheita, ocasião em que será feita a drenagem da área.

Tratamentos

O experimento de campo deverá conter os produtos comerciais ou estirpes

a serem testados e controles negativos (ausência de fertilizante nitrogenado e inoculação), controle com N-mineral (45,0 kg de N por ha, tendo como fonte de N a uréia, aplicado no início da diferenciação da panícula), além da inoculação padrão. A inoculação padrão consiste em aplicar o produto comercial com um equipamento de pulverização terrestre, usando 100–200 L ha⁻¹ de água contendo 50 g de inoculante (12% de cianobactérias), 24-48 horas depois da inundação. Usar sempre a mesma população de células para a inoculação padrão e para os inoculantes ou estirpes em teste, assim como a dose recomendada pelo fabricante (dois tratamentos por produto, caso a recomendação do fabricante resulte em diferente número de células por semente).

Análises e parâmetros a serem avaliados

Caracterização química do solo: deverão ser analisadas as propriedades químicas como pH, macro e micronutrientes. Para os micronutrientes, analisar apenas aqueles para os quais existirem métodos de extração adequados e análises de calibração;

Rendimento de grãos: o rendimento de grãos deve ser corrigido para 13% de umidade e expresso em kg/ha. Determinar o N nos grãos e expressar em g/kg.

População de cianobactérias: tanto as amostras do solo da área experimental quanto dos inoculantes testados deverão ter a população de cianobactérias determinada por meio dos testes descritos no item 1.3. No caso de o solo apresentar a população de cianobactéria estabelecida, sugere-se fazer a identificação das estirpes presentes utilizando as técnicas descritas no item 1.5.

Parte aérea: separar a parte aérea (usar o ponto de inserção cotiledonar com o ponto de corte) e apresentar os resultados para massa seca (g/planta). Calcular a absorção de N pela planta e expressar os resultados em kg/ha.

Análise estatística

Os resultados devem ser submetidos à análise de variação e, quando o teste F for significativo a 5%, as médias dos tratamentos deverão ser comparadas pelo teste “t” ou teste de Duncan, também ao nível de 5%.

Interpretação dos Resultados

Para recomendação de inoculantes, estirpes e/ou outras tecnologias, estes devem apresentar resposta igual ou superior à inoculação padrão e/ou às estirpes e tecnologias já recomendadas, respectivamente, e superior ao controle sem inoculação nos locais e safras testados.

3. Referências

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore, Williams & Wilkins, 1994. 824 p.

PAUL, E. A.; CLARK, F. E. **Soil microbiology and biochemistry**. San Diego, Academic Press, 1989. 275 p.

STANIER, R. Y.; INGRAHAM, J. L.; WHEELIS, M. L.; PAINTER, P. R. **General microbiology**. London, Macmillan Education LTD, 1986. 689 p.

STEIN, J. R. **Handbook of phycological methods; cultural and growth measurements**. Cambridge, Cambridge University Press, 1973. 456 p.

ROGER, P. A.; KULASOORIYA, S. A. **Blue-green algae and rice**. Philippines, The International Rice Research Institute, 1980. 112 p.

Protocolo para análise da qualidade e da eficiência agrônômica de inoculantes, estirpes e outras tecnologias relacionadas a bactérias promotoras do crescimento vegetal

Protocolo apresentado pelo pesquisador Alexandre José Cattelan da Embrapa Soja com a colaboração da Dra. Alicia Grassano, da Universidade Nacional de La Pampa, Argentina e aprovado na XII RELARE.

Introdução

O custo com fertilizantes químicos, devido à baixa disponibilidade de alguns nutrientes essenciais, e a quebra de safras devido a estresses abióticos, especialmente seca, podem ser minimizados fazendo-se com que as plantas tenham sistema radicular mais desenvolvido, capaz de explorar melhor os nutrientes e a água do solo, assim como um crescimento mais rápido, o que confere melhores condições de competição com as plantas invasoras. Isso é possível, pelo menos em parte, através da inoculação com bactérias rizosféricas promotoras do crescimento vegetal (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* – PGPR, em inglês) (Kloepper and Schroth, 1978).

A promoção do crescimento vegetal através da inoculação dessas bactérias nas sementes ou no solo pode ocorrer através de diferentes mecanismos. Esses mecanismos se diferenciam em diretos, quando os microrganismos provêm à planta compostos que sintetizam ou facilitam aos vegetais o acesso a determinados nutrientes essenciais que estão pouco disponíveis no solo e, indiretos, quando a promoção advém de melhoria na fitossanidade. Entre os primeiros, estão os seguintes mecanismos: produção de substâncias semelhantes aos hormônios vegetais, solubilização de nutrientes minerais do solo, produção de sideróforos e efeito sinérgico com a fixação biológica do nitrogênio, especialmente no caso das leguminosas (a fixação biológica do nitrogênio, em função de sua importância, é tratada em protocolo próprio). Dentre os mecanismos do segundo tipo, tem-se a proteção das plantas contra microrganismos patogênicos ou deletérios (controle biológico), especialmente aqueles do solo, mediada pela produção de antibióticos, sideróforos, resistência sistêmica induzida e competição com fitopatógenos.

Muitas PGPR aumentam o comprimento das raízes e o número dos pêlos radiculares. Esse efeito é atribuído à produção microbiana de hormônios vegetais ou reguladores do crescimento vegetal. Tien et al. (1979) observaram que o número de raízes laterais em milho (*Pennisetum americanum* L.), crescido em condições axênicas, aumentou e que as raízes laterais ficaram altamente cobertas por pêlos radiculares com a inoculação de *Azospirillum brasilense*. Os autores observaram que as substâncias produzidas por essa bactéria, responsáveis por esses efeitos, foram ácido indolacético (AIA), giberelinas e citocininas. Efeitos semelhantes foram observados em tomate (*Lycopersicon esculentum* L.; Hadas & Okon, 1987) e em soja inoculada com diferentes isolados de *Pseudomonas* spp. (Cattelan, 1995). Em 1995, Glick et al. propuseram um método para seleção de PGPR baseado na utilização microbiana do composto 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) como única fonte de nitrogênio, através da ação da enzima ACC deaminase. ACC é o precursor imediato do hormônio etileno. Segundo os autores, essa enzima pode estimular o crescimento vegetal e o comprimento das raízes, em particular, seqüestrando e hidrolizando ACC das sementes em germinação. Isso diminui a concentração de ACC e, conseqüentemente, a de etileno nas sementes. Para a maioria das espécies vegetais, o etileno estimula a germinação e quebra a dormência das sementes (Esashi, 1991) mas se a concentração desse hormônio após a germinação for muito alta, a elongação das raízes assim como a fixação simbiótica do nitrogênio, em plantas leguminosas, é inibida (Jackson, 1991). O maior desenvolvimento do sistema radicular possibilita a exploração de maior volume de solo, com isso, as plantas ficam menos suscetíveis ao déficit hídrico e à escassez de nutrientes.

Parte significativa do fósforo no solo (20 a 80%) está na forma orgânica e, portanto, sua disponibilidade depende, em grande parte, da atividade microbiana (Richardson, A.E., 1994). O restante do fósforo encontra-se na forma inorgânica, muitas vezes insolúvel e, portanto, não prontamente disponível para as plantas.

Estudos realizados com *Bacillus megaterium* e *Pseudomonas fluorescens* mostraram que estas bactérias podem incrementar a disponibilidade de fósforo (Kloepper et al, 1988) e que um grande número de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* são capazes de solubilizar fosfato inorgânico (Halder and Chakrabarty, 1993). Abd-Alla (1994) demonstrou que algumas estirpes de

Rhizobium leguminosarum bv. *viceae* contribuem significativamente para a liberação de fósforo orgânico por ação das fosfatases ácidas e alcalinas. Chabot et al. (1996) observaram que a solubilização de fosfatos por estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* poderia ser um mecanismo importante na promoção do crescimento de milho (*Zea mays* L.) e alface (*Lactuca sativa* L.). Também foi observado que *Bacillus brevis*, *B. polymyxa*, *B. thurigiensis* e *Stenotrophomonas (Xantomonas) maltophilia* obtidas de rizosfera de milho, trigo (*Triticum aestivum* L.) e amendoim (*Arachis hypogaea* L.) são capazes de solubilizar fosfato ácido de cálcio com altos níveis de fosfatase (De Freitas et al, 1997).

Os principais mecanismos de solubilização de fósforo inorgânico são produção de ácido carbônico a partir do CO₂ e outros ácidos orgânicos, reduzindo compostos de Fe³⁺ para compostos de Fe²⁺, e produção de H₂S sob baixos níveis de O₂. Os principais ácidos orgânicos envolvidos são hidroxiácidos, como ácido láctico, glicólico, cítrico e succínico, que possuem a capacidade de quelatar Ca²⁺ e Fe³⁺ (Sperber, 1958; Kucey, 1983).

A disponibilidade de P é essencial para a fixação biológica do nitrogênio atmosférico. Estudos recentes (Grassano et al., 2002 e Rosas et al., 2002) mostram que a coinoculação de rizóbio com *Pseudomonas* sp. solubilizadoras de P aumentam os rendimentos e a eficiência da fixação biológica.

Alguns microrganismos, além de solubilizar fosfatos, mobilizam outros nutrientes do solo. Jiang & Sato (1994) estudaram bactérias rizosféricas de trigo com 26 a 68 dias de crescimento e observaram que havia uma correlação linear positiva entre o crescimento das plantas e o número da bactérias solubilizadoras de P (r=0,73), *Pseudomonas* fluorescentes (r=0,68) e bactérias celulolíticas (r=0,72). Em outro estudo também com trigo, quando este foi inoculado com um isolado do fungo *Penicillium radicum*, com capacidade para solubilizar fosfato *in vitro*, houve um aumento de 14% na produção de grãos no experimento de campo e aumentos tanto na absorção de P (10%) e na produção de grãos (9%) no experimento em casa-de-vegetação (Whitelaw et al., 1997).

O ferro é um dos elementos mais abundantes no solo e essencial para o desenvolvimento vegetal pois atua como cofator em reações enzimáticas redox. Sua disponibilidade, no entanto, é baixa pois sua forma oxidada

(Fe^{3+}), que normalmente ocorre nos solos bem drenados, é pouco solúvel. Os microrganismos capazes de produzir sideróforos (compostos capazes de complexar Fe^{3+} com grande afinidade) podem atuar com um mecanismo duplo. Por um lado, de forma direta, esses quelatos biossintéticos de baixo peso molecular têm uma alta afinidade para complexar o Fe^{3+} e servem de veículo para o transporte do íon dentro das células (Atlas & Bartha, 1993; Raaijmakers et al., 1995) através de receptores específicos para o complexo localizados fora da membrana celular da bactéria (Glick, 1995). De outra forma, indireta, ao produzir-se a complexação pelos sideróforos, a concentração do íon livre diminui, podendo suprimir o desenvolvimento de microrganismos fitopatogênicos ou deletérios menos eficientes quanto ao metabolismo do ferro.

Outra forma de controle de organismos deletérios é a produção de antibióticos. Kloepper & Schroth (1981) observaram que cinco isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes aumentaram o crescimento de batata (*Solanum tuberosum* L.) e que isso se deveu, em parte, à produção de antibióticos na rizosfera. Em outro estudo semelhante, um isolado de *Pseudomonas* sp., proveniente da rizosfera de beterraba açucareira inibiu uma série de fungos fitopatogênicos através da produção do antibiótico 2,4-diacetil-floroglucinol (Shanahan et al., 1992).

Outro mecanismo de possível envolvimento no antagonismo a patógenos é a produção de compostos metabólicos volatéis como o ácido cianídrico (HCN; Nehl et al., 1996). Um isolado com alta produção de HCN, mutante construído a partir de *Pseudomonas putida* BK8661, resultou num pequeno mas significativo aumento na supressão de sintomas causados por *Septoria tritici* e *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* em trigo sob condições axênicas. Cattelan et al. (1999) observou que compostos volatéis produzidos por isolados de rizobactérias foram responsáveis pela inibição *in vitro* do crescimento dos fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotium rolfsii*.

Enzimas tais como quitinase e β -1,3-glucanase podem ser importantes no controle de fungos fitopatogênicos devido à sua habilidade em degradar quitina e β -1,3-glucano, respectivamente, componentes da parede celular dos fungos (Schroth & Hancock, 1981). Fridlender et al. (1993) observaram

que um isolado de *Pseudomonas cepacia* controlou *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Pythium ultimum* e que isso relacionou-se à produção de β -1,3-glucanase.

Um número reduzido de microrganismos, especialmente bactérias, possui a capacidade de fixar nitrogênio simbioticamente, como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* spp. e outros gêneros de bactérias fixadoras (aqui designados pelo termo geral “rizóbio”), ou assimbioticamente, como *Azospirillum* e *Azotobacter* spp. Algumas PGPR podem inibir ou estimular a fixação simbiótica. Fuhrmann & Wollum (1989a) isolaram 115 bactérias da rizosfera de soja e observaram que 23 delas apresentavam antagonismo *in vitro* contra uma ou mais entre cinco estirpes de *B. japonicum* testadas. Quando esses isolados foram testados em soja, cultivada em meio artificial com baixa concentração de ferro, para a habilidade de afetar a competição entre três estirpes de *B. japonicum*, três deles alteraram a competição pela ocupação nodular entre as estirpes testadas (Fuhrmann & Wollum, 1989b).

Uma outra estratégia consiste na co-inoculação de rizóbios resistentes a antibióticos produzidos pelo microrganismo co-inoculado. A co-inoculação de uma estirpe de *Bacillus* sp. com *Rhizobium meliloti* e *B. japonicum*, resistentes ao antibiótico, aumentou a nodulação de alfafa e soja, respectivamente (Li & Alexander, 1988, 1990). Os autores atribuíram esse efeito ao fato de que o antibiótico inibe o crescimento de bactérias na rizosfera que competem com *Brady/Rhizobium* pelo suprimento de nutrientes orgânicos prontamente disponíveis excretados pelas raízes e, por isso, as estirpes resistentes são capazes de se multiplicar mais facilmente. Araújo & Hungria (1995) utilizaram uma estratégia semelhante em soja e também obtiveram resultados similares.

Esses estudos demonstram o potencial que a co-inoculação de rizóbios e certas PGPR têm no sentido de aumentar a ocupação nodular com as estirpes da bactéria fixadora desejadas (mais eficientes) em leguminosas e, conseqüentemente, a fixação de nitrogênio.

2. Definições

Recomendação de estirpes – Para que uma determinada estirpe de bactéria promotora do crescimento vegetal possa fazer parte de inoculantes

comerciais no Brasil esta terá que ser testada por órgãos de pesquisa oficiais, segundo o protocolo aqui descrito, com os resultados discutidos e aprovados pela RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola) e por esta recomendadas ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA para produção de inoculantes.

Inoculantes – Todo produto que contenha microrganismos com ação estimulante ou benéfica para o crescimento das plantas.

Outras tecnologias – Novos processos ou produtos para veiculação de bactérias promotoras do crescimento vegetal.

Novos produtos, contendo estirpes, tecnologia e outras recomendações discutidas e aprovadas nas reuniões da RELARE, deverão receber parecer provisório para fins de registro pelo MAPA. Para obtenção do parecer definitivo, deverão ser submetidos aos testes de eficiência agrônômica, seguindo as orientações do presente protocolo. Esses testes deverão ser conduzidos por instituições de pesquisa credenciadas junto ao MAPA e obedecer às normas definidas pela RELARE (ou publicadas em portaria). A aprovação ou não do produto ou tecnologia se dará após análise dos resultados pela RELARE. Para evitar que um produto seja testado inúmeras vezes e que os resultados negativos sejam desconsiderados, o fabricante ou responsável pelo inoculante terá que comunicar a RELARE cada teste a campo no início da safra. Teste não comunicados com a devida antecedência não serão considerados pela RELARE.

A proposta de recomendação de novas estirpes de bactérias promotoras para espécies vegetais que já tiverem estirpes recomendadas deverá apresentar resultados comparativos entre essas estirpes. Os resultados devem contemplar testes de laboratório, casa de vegetação e a campo, obedecendo aos critérios descritos na metodologia de avaliação de estirpes.

3. Avaliação de estirpes e testes de eficiência agrônômica de novos inoculantes ou tecnologias de inoculação

Os experimentos de avaliação de novas estirpes e testes de eficiência agrônômica de novos inoculantes ou tecnologias de inoculação devem ser conduzidos em laboratório, casa de vegetação e a campo. No caso

de campo, os experimentos deverão ser conduzidos em, pelo menos, dois ecossistemas de importância para a cultura em questão e por duas safras agrícolas.

3.1. Avaliação em laboratório

No caso de nova(s) estirpe(s), esta(s) deverá(ão) ser caracterizada(s) *in vitro* quanto aos mecanismos de promoção do crescimento que apresenta(m) (aqueles apresentados na introdução mais outros que porventura venham a ser descobertos e descritos na literatura). Ou seja, para recomendação de uma determinada estirpe como promotora do crescimento vegetal, os mecanismos envolvidos nessa promoção deverão estar discriminados. Os principais métodos usados para esses testes estão descritos nos anexos deste protocolo. Outros métodos poderão ser utilizados, desde que estejam descritos na literatura especializada.

Obs.: Para que um microrganismo possa ser usado em inoculantes comerciais deve-se certificar que o mesmo não é patogênico para o homem, plantas ou animais (que não sejam alvo do tratamento). É importante ressaltar que um grupo importante de bactérias importantes para a agricultura e que têm sido usadas para produção de inoculantes em vários países estão na mira da medicina. São as bactérias do complexo *Burkholderia cepacia* (ex *Pseudomonas cepacia*). Essas bactérias têm sido encontradas associadas à várias doenças em seres humanos, especialmente em pacientes com fibrose cística. Por isso, a área médica tem solicitado uma moratória no uso dessas bactérias em inoculantes agrícolas (Holmes et al., 1998). Segundo Biddick et al. (2003) esse grupo compreende, atualmente, nove espécies: *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilids*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. anthina* e *B. pyrrocinia*. Uma forma de eliminar essas bactérias durante a fase de isolamento é testar o crescimento dos isolados de interesse no meio BCSA, seletivo para esse grupo de bactérias (ver anexos).

Cuidado importante a ser tomado é quanto à conservação e preservação da estirpe. Toda estirpe, uma vez isolada e purificada, deve ser criopreservada (e.g., -80° C) ou liofilizada para evitar alterações em suas características genéticas.

3.2. Testes de seleção de estirpes em casa de vegetação

Os testes deverão ser feitos usando-se a espécie vegetal para a qual pretende-se recomendar a estirpe e em vasos contendo solo não-esterilizado com as características mais próximas possível das áreas para as quais pretende-se usar o inoculante com a estirpe em questão. Por exemplo, se uma determinada estirpe será recomendada para controle biológico de um determinado patógeno ou doença em soja, o teste deverá ser feito utilizando-se cultivares que sejam suscetíveis a esse determinado patógeno/doença, solo com a presença (natural ou artificial do patógeno) e em condições de ambiente (temperatura, umidade, nutrição, pH, luminosidade, etc.) que favoreçam o desenvolvimento do patógeno/doença, com os devidos tratamentos controles.

Deverá ser apresentada análise química do solo. Cuidados normais de assepsia devem ser observados durante a preparação dos vasos, inoculação e condução do ensaio.

3.3. Avaliação a campo das estirpes selecionadas em casa de vegetação e testes de eficiência agrônômica de produtos inoculantes e outras tecnologias

3.3.1. Princípios básicos para o preparo da área experimental

Análise de solo da área para proceder à adubação recomendada de acordo com a cultura. Sempre que possível, fazer análise foliar da cultura anterior para decidir sobre a adubação com micronutrientes.

Sementes da cultura em questão, da(s) cultivar(es) recomendada(s) para a região, depois de inoculadas ou não (tratamento controle), serão semeadas de forma manual. As parcelas experimentais deverão ter no mínimo 4,0 x 6,0 m e serão distanciadas em, pelo menos, 1,0 m, com linhas espaçadas conforme recomendação para a cultura e a região. Da mesma forma, os tratamentos culturais deverão ser feitos de acordo com o recomendado para a cultura naquela determinada região. A colheita da produção de grãos será feita na área central de cada parcela, descartando-se, pelo menos, 1 m em cada cabeceira, não devendo, no entanto, ser essa área útil menor do que 6,0 m²). No caso de haver necessidade de avaliação destrutiva de plantas, essa deverá ser feita na área situada entre a bordadura (1 m de cada lado da parcela) e a área útil para colheita. No caso de parcelas de 4,0 x 6,0 m, onde a área destinada para a colheita seja de 6,0 m², sobrar

uma área de 2,0 m² para as avaliações destrutivas. Caso essa área não seja suficiente, a parcela deverá ter dimensões maiores. O delineamento experimental utilizado deverá ser o de blocos ao acaso, com, no mínimo, cinco repetições.

3.3.2. Tratamentos

O experimento de campo deverá conter as estirpes a serem testadas, produtos e/ou tecnologia a serem testados e os controles negativo (ausência de PGPR e do produto químico equivalente) e positivo (sem PGPR mas com o produto químico que a estirpe de PGPR se propõe a substituir parcial ou totalmente, se for o caso, como adubos fosfatados, fungicidas, estimulantes do crescimento ou outros). As doses ou concentrações deverão ser as mesmas que serão recomendadas para o uso comercial. A área escolhida para instalação dos ensaios deve apresentar condições para aparecimento do problema a ser contornado, como baixa disponibilidade de fósforo, no caso de teste de solubilizadores; presença de patógenos, no caso de controle biológico, etc.

Quando o uso do inoculante com PGPR for recomendado para acompanhar outras tecnologias como, por exemplo, coinoculação com rizóbio, deve ser testada a compatibilidade dessas práticas. Sempre que for utilizada a inoculação com rizóbio, essa deverá seguir as orientações específicas da RELARE.

3.3.3. Análises e parâmetros a serem avaliados

a) Caracterização química do solo

Deverão ser analisadas as características químicas dos solos, como pH, macro e micronutrientes. Para os micronutrientes, analisar apenas aqueles para os quais existirem métodos de extração adequados e análises de calibração.

b) Concentração dos inoculantes

Os inoculantes com as estirpes testadas deverão ter sua concentração e pureza determinadas, conforme item 4.

c) Nodulação

No caso de leguminosas, a avaliação da nodulação é importante. Para

tanto, coletar dez ou mais plantas com as raízes intactas da área destinada a coletas destrutivas, próximo ao florescimento. Apresentar os resultados quanto ao número (nº/planta) e massa seca (mg/planta) de nódulos por planta.

d) Desenvolvimento vegetativo

Para avaliar o desenvolvimento vegetativo da cultura, cortar a parte aérea das plantas coletadas para avaliação radicular, secar o material em estufa ao redor de 50 °C (lavar antes se for necessário) e apresentar os resultados relativos à massa seca (g/planta). Caso outras variáveis como altura, porcentagem de emergência, sintomas de doenças, etc., sejam importantes, também deverão ser avaliados.

e) Rendimento de Grãos

Para avaliação do rendimento de grãos, as plantas deverão ser colhidas da área útil da parcela (conforme item 3.3.1) no estágio de maturação fisiológica. O rendimento de grãos deve ser corrigido para 13% de umidade e expresso em kg/ha. Determinar o teor de macronutrientes (N, P e K) nos grãos e expressar em mg kg⁻¹ e em kg ha⁻¹.

3.3.4. Análise estatística

Os resultados deverão ser submetidos à análise de variância e, quando o teste F for significativo a 5%, as médias dos tratamentos deverão ser comparadas pelo teste de Duncan ou teste "t", também ao nível de 5% de significância. Caso não haja significância ao nível de 5%, usar 10%.

3.3.5. Interpretação dos resultados

Para recomendação de estirpes, inoculantes comerciais e/ou outras tecnologias, estes devem apresentar resposta igual ou superior à inoculação com estirpes, inoculantes ou tecnologias já recomendados, respectivamente, em relação a todas ou, pelo menos, em relação à maioria das variáveis avaliadas. O rendimento de grãos é sempre a variável mais importante. No caso de ainda não haver recomendação, esses tratamentos deverão ser necessariamente superiores ao controle negativo (testemunha) e, preferencialmente, mas não obrigatoriamente, equivalentes ou superiores ao controle positivo.

Para que o ensaio de campo seja considerado válido, a produtividade mé-

dia de cada ensaio não deverá ser menor do que a produtividade mínima esperada para a cultura em questão em condições normais. Para a soja, essa produtividade é de 2000 kg de grãos por ha e, para o feijão, de 1200 kg de grãos por ha, por exemplo.

3.3.6. Apresentação dos resultados de testes de eficiência agrônômica na RELARE

A apresentação dos resultados na RELARE deverá ser sucinta e esquemática e deverá, obrigatoriamente, conter:

- d) Caracterização química e biológica (quando for o caso) do solo;
- e) Adubação e correção do solo;
- f) Tabela(s) contendo, para cada tratamento, todas as variáveis avaliadas com a respectiva análise estatística.

3.3.7. Relatório técnico-científico

O relatório técnico/científico deve seguir estritamente as orientações deste protocolo, contendo a descrição completa da metodologia, dos resultados obtidos, da conclusão clara sobre a eficiência do produto testado, assim como a(s) assinatura (s) do(s) pesquisador(es) responsável(is) e o número de registro no respectivo órgão de classe.

4. Análise da qualidade de inoculantes comerciais

4.1. Preparo da amostra

A amostra do produto a ser testado deverá ser composta por duas subamostras "A" e "B", que deverão ser individualmente identificadas, homogeneizadas e posteriormente higienizadas externamente, com álcool etílico a 75%, em sala asséptica, a fim de evitar contaminantes. As análises serão compostas por exames decisórios, quanto ao aspecto do enquadramento às exigências mínimas (teste de pureza, teste quantitativo e teste de caracterização), e identificativos, quanto ao aspecto do enquadramento às exigências mínimas, e complementares (potencial de hidrogênio – pH – e umidade), que servirão para dar subsídios ao resultado do exame quantitativo empregado.

4.2. Teste de concentração e pureza dos inoculantes

A fim de proporcionar uma cobertura adequada para a expressão e quantificação dos microrganismos diferentes dos especificados na rotulagem dos produtos inoculantes (contaminantes), deverá ser empregado um meio que permita o crescimento generalizado de microrganismos como, por exemplo o meio tripticaseína de soja ágar (*tryptic soy agar*), diluído dez vezes (0,1X TSA) e um meio seletivo, na medida do possível, para a(s) estirpe(s) de PGPR em questão.

4.2.1. Contagem em placas, método do espalhamento (sugerido):

Semear 0,1 ml das diluições seriadas 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} das soluções dos inoculantes na superfície dos meios de cultura em placas de Petri. Cada diluição terá três repetições em placas distintas e será espalhada sobre o meio de cultura com alça de Drigalski. Após a sementeira e absorção do inóculo, as placas deverão ser colocadas invertidas em estufa a 28°C pelo período de 5 a 8 dias, quando, então, será efetuada a contagem das UFC dos contaminantes e da(s) estirpe(s) da diluição que apresentar de 30 a 300 UFC por 0,1 ml.

a) Resultado final: O cálculo para o resultado final será a média originada da subamostra "A" com a subamostra "B". Multiplicar a média do número de UFC/0,1 ml das três placas de Petri pela diluição que proporcionou a leitura no intervalo de 30 a 300 UFC/0,1 ml, de cada subamostra, e pelo fator de correção 10 da alíquota empregada de 0,1 ml.

Exemplo: Admitindo-se que a média das três placas foi 75 UFC/0,1 ml e a diluição que proporcionou esta leitura foi a 10^{-6} , calcula-se:

Dados: Média = 75

Fator correção = 10

Diluição de leitura = 10^{-6}

Logo,

Número de células do microrganismo = $75 \times 10 \times 10^6 \Rightarrow 7,5 \times 10^8$ UFC/g

b) Limite de contaminantes: O desenvolvimento de microrganismos não especificados a partir da diluição empregada $1,0 \times 10^{-5}$ considera o lote ou partida da amostra fora dos padrões para comercialização, mesmo que apresente as garantias mínimas estabelecidas do número de células da(s) estirpe(s) de PGPR por grama ou mililitro.

Obs.: O uso de solução fisiológica (solução de cloreto de sódio a 0,85%) para a diluição decimal em série é importante para a estabilidade osmótica das células dos microrganismos que estão sendo testados. No caso de inoculantes não solúveis em água, os fabricantes deverão informar qual o diluente a ser usado.

4.3. Métodos moleculares

Contagem através da amplificação do gene 16S rRNA. Em termos gerais, uma subamostra de peso conhecido é suspendida ou diluída, da mesma forma que para a contagem em placas. No caso de inoculantes turfosos é recomendável que a solução diluente contenha um agente quelante de cátions e um agente antioxidante para evitar a inativação da polimerase. Aliquotas de volume conhecido das diferentes diluições são sujeitas à lise celular através de aquecimento (geralmente a 95° C por 5-15 min) sob agitação constante. Após o resfriamento, procede-se à amplificação com PCR, utilizando aliquotas conhecidas, sob condições estabelecidas. O produto da amplificação deve corresponder ao tamanho do fragmento esperado quando se utilizam oligonucleotídeos espécie-específicos ou ao tamanho do gene completo quando se utilizam fitas moldes (*templates*) para este fim. No caso da amplificação do gene 16S rDNA completo deve esperar-se um produto de 1500 kb, aproximadamente. A visualização do gene ou produtos parciais é obtida em géis de agarose a 3% sob condições de eletroforese estabelecidas. No caso de produtos de amplificação do gene completo, procede-se à restrição com endonucleases e à comparação dos perfis espécie-específicos da bactéria de interesse. O número de bactérias corresponde à diluição mais alta na qual se obteve amplificação do fragmento específico do gene ou o perfil espécie-específico. Como desvantagem do método, está a possibilidade de se fazer a contagem de bactérias não viáveis, o que é mais sério em inoculantes elaborados há vários meses do que naqueles de elaboração recente. De qualquer maneira, esse problema parece não ser tão sério já que a degradação do DNA é relativamente rápida.

4.3. Determinação do pH e umidade

Tanto o grau de acidez como o percentual de umidade (substratos sólidos, no último caso) têm determinado uma maior ou menor so-

brevivência dos microrganismos no produto inoculante. Estes exames complementares subsidiarão o resultado final do exame quantitativo empregado.

a) pH – O pH dos produtos inoculantes será determinado através de potenciômetro. Para inoculantes líquidos, a determinação será direta. Para inoculantes turfosos, deverá se adicionar água na proporção de 10 ml de água para cada 1 g de turfa. O pH ótimo para a estabilidade dos rizóbios no produto encontra-se no intervalo de 6,5 a 7,0

b) Umidade – O percentual de umidade será expresso em base de substrato seco à temperatura de 105° a 110° C, pelo período de tempo de duas horas, quando atingido o equilíbrio de invariabilidade da massa. Os produtos inoculantes com substrato turfoso de origem brasileira têm apresentado uma estabilidade adequada dos rizóbios quando a umidade se apresenta no intervalo entre 35 e 45%.

Pesando-se uma alíquota de 10 a 15 gramas de cada subamostra, tomado inicialmente o peso inicial do recipiente, avalia-se a massa final do substrato. A umidade da amostra será a determinada pela média das duas subamostras através da seguinte fórmula:

$$Ug (\%) = \frac{(m_i - m_f) \times 100}{m_i - tar}$$

Onde, Ug = umidade gravimétrica, em %

m_i = massa inicial

m_f = massa final

tar = tara do recipiente

4.4. Metodologia de identificação das estirpes recomendadas

Para o controle da qualidade e concentração de inoculantes comerciais (com estirpe já recomendada), os mesmos deverão ter sua concentração e pureza determinadas. É de suma importância conhecer com exatidão a bactéria empregada na elaboração de um inoculante. Para esse fim, primeiramente, as características fenotípicas são fundamentais, particularmente quando se conta com ampla experiência no manejo de uma estirpe em particular. Não obstante e apesar da experiência, é recomendável utilizar métodos moleculares para identificação da espécie em questão e para a

obtenção de perfis padrões de DNA, através de técnicas de PCR, para cada estirpe empregada na elaboração dos inoculantes.

Características fenotípicas. É recomendado empregar meios de cultivo seletivos ou diferenciais que permitam reconhecer com facilidade a bactéria em questão. Por exemplo, para *Pseudomonas* do grupo fluorescente, pode-se empregar o meio B de King (King et al., 1954) (ver Anexo I, meios de cultivo). Recomenda-se analisar pelo menos 5 características que podem incluir características microscópicas, bioquímicas e/ou fisiológicas que sejam diferenciais em relação a outras espécies. Como exemplo, tem-se mobilidade sob observação microscópica, uso de diferentes fontes de carbono e/ou nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de determinadas enzimas, acúmulo de materiais de reserva (e.g. poli-*B*-hidroxibutirato, PHB), crescimento a determinada temperatura, pH, etc. De maneira alternativa e mais confiável, pode-se recorrer aos perfis de proteínas (SDS-PAGE), ou eletroforese de enzimas multifocus ou metabólicas (MLEE), podendo-se empregar esta última prova como perfil padrão em nível de estirpe quando só se tratar de diferenciar a estirpe particular de outras previamente caracterizadas. É importante ter em mente que na natureza podem existir clones com o mesmo perfil eletroforético da estirpe em questão.

Características genotípicas. Em nível de espécie é recomendável o uso da reação em cadeia de polimerase (PCR) para a amplificação do gene 16S rRNA empregando oligonucleotídeos específicos (e.g., rD1/fD1; Weisburg et al., 1991) e cortando com enzimas de restrição específicas o produto da amplificação. De forma alternativa, pode-se empregar oligonucleotídeos espécie-específicos que amplifiquem regiões conservadas do gene 16S rRNA da espécie bacteriana de interesse. O perfil padrão de uma estirpe pode ser obtido através da eletroforese direta dos produtos amplificados por PCR, por exemplo, os baseados em seqüências repetidas (BOX-PCR, ERIC-PCR, REFI-PCR).

5. Referências

- ABD-ALLA, M. H. Use of organic Phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* phosphatases. Biol. Fertil. Soil 8: 216-218, 1994.
- ARAÚJO, F. F.; HUNGRIA, M. Comportamento a campo e casa de vege-

tação de soja coinoculada com *Bacillus* e *Bradyrhizobium*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3., 1995, Londrina. *Proceedings...* Londrina: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1995. p. 456- 461.

ATLAS, R.; BARTHA, R. *Microbial Ecology. Fundamentals and Applications*. Third Edition. Ch. 4: 69- 97, 1993.

BIDDICK, R.; SPILKER, T.; MARTIN, A.; LIPUMA, J. J. Evidence of transmission of *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia dolosa* among persons with cystic fibrosis. *FEMS Microbiology Letters*, v. 228. p. 57-62, 2003.

BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONE, S. E. Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.57, p. 535-538, 1991.

CATTELAN, A. J. Aumento no número de pêlos radiculares em plântulas de soja inoculadas com bactérias promotoras do crescimento. In: SIMPOSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3.; REUNIAO DE LABORATORIOS PARA RECOMENDACAO DE ESTIRPES DE RHIZOBIUM E BRADYRHIZOBIUM, 6., 1994, Londrina. *Microbiologia do solos: desafios para o seculo XXI - anais*. Londrina: IAPAR / EMBRAPA-CNPSO, 1995. p. 393-397.

CATTELAN, A. J.; HARTEL, P. G.; FUHRMANN, J. J. *Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth*. *Soil Science Society of America Journal*, v. 63. p. 1670-1680, 1999.

CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli*. *Plant and Soil* 184: 311-321, 1996.

DE FREITAS, J.; BANERJEE, M.; GERMIDA, J. Phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol. Fertil. Soils* 24:358-364, 1997.

ESASHI, Y. Ethylene and seed germination. In: MATOO, A.K. & SUTTLE, J.C., ed. *The plant hormone ethylene*. Boca Raton, CRC Press, 1991. p. 133-157.

FRIDLENDER, M.; INBAR, J.; CHET, I. Biological control of soilborne plant

- pathogens by a β -1,3- glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biololy & Biochemistry*, Oxford, v. 25, p. 1211-1221, 1993.
- FUHRMANN, J.; WOLLUM II, A. G.. *In vitro* growth responses of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean rhizosphere bacteria. *Soil Biol. Biochem.*, 21:131-135, 1989a.
- FUHRMANN, J.; WOLLUM II, A. G. Nodulation competition among *Bradyrhizobium japonicum* strains as influenced by rhizosphere bacteria and iron availability. *Biololy and Fertility of Soils*, Berlin, v. 7, p. 108-112, 1989b.
- GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 41:107-120, 1995.
- GLICK, B. R.; KARATUROVIĆ, D. M.; NEWELL, P. C. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 41, p. 533-536, 1995.
- GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 26, p. 192-195, 1951.
- GRASSANO, A.; RONCHI, A.; SCARONE, J.; GARCÍA, P.; CORREA, N.; ROSAS, S. Phosphorus solubilizing bacteria: its effects on the symbiosis *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago sativa*. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Salamanca. España. 2002.
- HADAS, R.; OKON, Y. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation of root morphology and respiration in tomato seedlings. *Biololy and Fertility of Soils, Berlin*, v. 5, p. 241-247, 1987.
- HALDER, A.; CHAKRABARTLY, P. Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. *Foli. Microbiol.* 38: 325-330, 1993.
- HENRY, D. A.; CAMPBELL, M. E.; LIPUMA, J. J.; SPEERT, D. P. Identification of *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, p. 614-619, 1997.
- HOLMES, A.; GOVAN, J.; GOLDSTEIN, R. Agricultural use of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: a threat to human health? *Emerging Infectious Diseases*, v. 4. p. 221-227, 1998.

- JACKSON, M. B. Ethylene in root growth and development. In: MATOO, A. K.; SUTTLE, J. C., eds. The plant hormone ethylene. Boca Raton, CRC Press, 1991. p. 159-181.
- JIANG, H-Y.; SATO, K. Interrelationships between bacterial populations on the root surface of wheat and growth of plant. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 40:683-689, 1994.
- KATZNELSON, H.; BOSE, B. Metabolic activity and phosphate-dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere, and non-rhizosphere soil. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 5, p. 79-85, 1959.
- KING, E. O.; M. K. WARD; RANEY. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301-307, 1954.
- KLOEPPER, J. W; SCHROTH, M. N. Plant-Growth Promoting Rhizobacteria in Radish Proceedings of the 4th International Conference of Plant Pathogenic Bacteria. Gilbert-Clarey, Tours, France. pp. 879-882, 1978.
- KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Relationship of *in vitro* antibiosis of plant growth-promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology*, St. Paul, v. 71, p. 1020-1024, 1981.
- KLOEPPER, J.; LIFSHITZ, R.; SCHROTH, M. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. In: ISI Atlas of Science: Animal and Plant Science. 60-64, 1988.
- KUCEY, R. M. N. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Can. J. Soil Sci.*, 63:671-678, 1983.
- LI, D-M.; ALEXANDER, M. Co-inoculation with antibiotic-producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. *Plant Soil*, 108:211-219, 1988.
- LI, D-M.; ALEXANDER, M. Factors affecting co-inoculation with antibiotic-producing bacteria to enhance rhizobial colonization and nodulation. *Plant Soil*, 129: 195-201, 1990.
- MILLER, J. H. *Experiments in molecular genetics*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Lab., 1974. 468p.
- NEHL, D. B.; ALLEN, S. J.; BROWN, J. F. Deleterious rhizosphere bac-

- teria: an integrating perspective. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v. 5, p. 1-20, 1996.
- RAAIJMAKERS, J. M.; VAN DER SLUIS, L.; KOSTER, M.; BAKKER, P.; WEISBEEK, P.; SCHIPPERS, B. Utilization of heterologous siderophores and rhizosphere competence of fluorescent *Pseudomonas spp.* *Can. J Microbiol.* 41: 126-135, 1995.
- REID, J. D.; OGRYDZIAK, D. M. Chitinase-overproducing mutant of *Serratia marcescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.41, p. 664-669, 1981.
- RENNIE, R. J. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 27, p. 8-14, 1981.
- RENWICK, A.; CAMPBELL, R.; COE, S.. Assessment of *in vivo* screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathology*, London, v. 40, p. 524-532, 1991.
- RICHARDSON, A. E. Soil microorganisms and phosphorus availability. In *Soil biota. Management in sustainable farming systems*. Ed. C.E. Pankhurst, 50-62. CSIRO. Melbourne. Australia. 1994.
- ROSAS, S.; ROVERA, M.; ANDRÉS, J.; CORREA, N. Effect of Phosphorus-solubilizing bacteria on the rhizobia-legume symbiosis. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Salamanca. España. 2002.
- SCHROTH, M. N.; HANCOCK, J. G. Selected topics in biological control. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v. 35, p. 453-476, 1981.
- SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, New York, v. 160, p. 47-56, 1987.
- SHANAHAN, P.; O'SULLIVAN, D. J.; SIMPSON, P.; GLENNON, J. D.; O'GARA, F. Isolation of 2,4-Diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Applied of Environmental Microbiology*, Washington, v. 58, p. 353-358, 1992.

SPERBER, J. I. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. *Aust. J. Agric. Res.*, 9:782-787, 1958.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, Vigésima edição, 1980.

TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H.. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Applied of Environmental Microbiology*, Washington, v. 37. p. 1016-1024, 1979.

WHITELAW, M. A.; HARDEN, T. J.; BENDER, G. L.. Plant growth promotion of wheat inoculated with *Penicillium radicum* sp. nov. *Australian Journal of Soil Resesearch*, Victoria, v. 35, p. 291-300, 1997.

Anexos

1. Meio de cultura B de King (King et al., 1954)

Meio usado para isolamento de *Pseudomonas* do grupo fluorescente. Esse meio possibilita a produção de pigmentos fluorescentes pelas colônias de bactérias. Essa fluorescência é mais facilmente visualizada sob luz ultravioleta de 366 nm de comprimento de onda.

Composição:

- Proteose peptona nº 3: 20,0 g
- Glicerol: 10,0 ml
- K_2HPO_4 : 1,5 g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 1,5 g
- Ágar bacteriológico: 15,0 g
- Água destilada (H_2O_d): 1.000 ml
- pH 7,2

2. Meio de cultura BCSA seletivo para *Burkholderia cepacia* (Henry et al., 1997)

Composição:

- Sacarose: 10,0 g
- Lactose: 10,0 g
- NaCl: 5,0 g
- Fenol vermelho¹: 0,08 g
- Cristal violeta¹: 0,002 g
- Triptona (*trypticase peptone*): 10,0 g
- Extrato de levedura: 1,5 g
- Ágar bacteriológico: 14,0 g
- H_2O_d : 1.000 ml
- Polimixina²: 600.000 U
- Gentamicina²: 10 mg
- Vancomicina²: 2,5 mg
- pH 7,0

¹ Preparados como solução aquosa concentrada 10x, sendo adicionados 10 ml por litro de meio de cada solução.

² Os antibióticos devem ser adicionados ao meio após autoclavagem.

O crescimento das bactérias ocorre dentro de 24 a 48 hs. A temperatura de incubação deve ser de 32 a 37° C. No estudo realizado pelos idealizadores do método (Henry et al., 1997), a quase totalidade (99,7%) dos isolados de *B. cepacia* testados cresceram nesse meio enquanto que outras espécies de bactérias tiveram seu crescimento fortemente inibido (crescimento de apenas 3,7%).

3. Meio Tripticaseína de soja – 1X TSA (The United States Pharmacopeia, 1980)

Esse meio, quando diluído 10 vezes (0,1X TSA), é de propósito geral pois permite o crescimento de uma grande gama de microrganismos (no caso de diluição, corrigir a quantidade de ágar para manter 15 g por litro de meio). Normalmente é adquirido como meio pré-pronto.

Composição:

- Triptona: 15 g
- Peptona papáinica de soja (*Soytone*): 5,0 g
- NaCl: 5,0 g
- Ágar bacteriológico: 15,0 g
- Água destilada (H₂O): 1.000 ml
- pH 7,3

4. Meio Completo Universal – MCU

Esse meio foi modificado de Rennie (1981), onde o objetivo era ser um meio livre de nitrogênio, e está aqui descrito pois serve de base para vários testes descritos a seguir.

Composição:

- fontes de C (g L⁻¹): sacarose, 5,0; manitol, 5,0; lactato de sódio (60%, p/p), 0,5 ml;
- fonte de N (g L⁻¹): NH₄NO₃, 0,78;
- tampão (g L⁻¹): K₂HPO₄, 0,80 e KH₂PO₄, 0,20;
- macronutrientes¹ (g L⁻¹): (g L⁻¹):, 0,20; CaCl₂, 0,06; NaCl, 0,10;
- micronutrientes (mg L⁻¹): Na₂MoO₄.2H₂O, 2,00; ZnSO₄.7H₂O, 0,24; -

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,04; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10,00; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 3,00; Na_2FeEDTA , 28,00; H_3BO_3 , 5,00;

- fatores de crescimento ($\mu\text{g L}^{-1}$): biotina, 5,00; ácido *p*-aminobenzóico, 10,00;
- ágar bacteriológico (g L^{-1}): 15.

Obs.: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e CaCl_2 devem ser autoclavados separadamente. Biotina e ácido *p*-aminobenzóico devem ser esterilizados por filtração em filtro bacteriológico e adicionados ao meio já autoclavado.

¹ Recomenda-se preparar solução estoque de micronutrientes.

5. Detecção de Sideróforos através de Cromo Azurol em Meio Líquido

Neste método, adaptado de Schwyn & Neilands (1987), é utilizado um complexo corante-ferro altamente colorido. Quando um ligante forte sequestra e complexa o Fe, o corante é liberado, o que causa mudança de cor. No caso, o corante é o cromo azurol S (CAS) e o ligante é um ou mais sideróforos produzidos pelas bactérias.

Cultivar as bactérias em frascos Erlenmeyer de 50 ml contendo 10 ml de 0,1X TSL (ou outro meio líquido com baixo teor de Fe). Incubar a 28°-30°C por 24h ou mais, sob agitação. Centrifugar a suspensão de células a 12.000 g por 10 min. Transferir 1 ml do sobrenadante para um tubo de ensaio. Adicionar 1 ml da solução de CAS.

Os isolados que convertem a cor azul da solução CAS para amarelo, dentro de 15 min, são considerados produtores de sideróforos. O tempo de transformação e a intensidade do amarelo são indicativos de maior ou menor produção de sideróforos.

Meios e soluções

- a) Meio líquido de tripticaseína de soja (meio TSA sem ágar) diluído 10 vezes (0,1X TSL): diluir 3 a 4 g do meio, dependendo do fabricante, em 1 litro de H_2O . A diluição do meio original, além de propiciar crescimento de uma gama maior de microrganismos, também diminui o teor de Fe, especialmente importante na determinação de sideróforos.
- b) Solução indicadora de cromo azurol S (CAS): Em um balão volumétrico

de 100 ml, adicionar 6 ml da solução de HDTMA 10 mM e um pouco de H₂O_d. Adicionar, lentamente, sob agitação, 9 ml da mistura de 1,5 ml da solução férrica ácida e 7,5 ml da solução aquosa de cromo azurol S 2 mM (pré-misturadas). Dissolver, separadamente, 4,307 g de piperazina anidra em, aproximadamente, 20 ml de H₂O_d e adicionar 6,25 ml de HCl_{conc} (12 M), com cuidado. Essa solução tampão (pH=5,6) é, então, transferida para o balão volumétrico (após transferir o volume da solução, adicionar H₂O_d para lavar o restante da solução que sobrou no frasco e transferir para o balão volumétrico) e o volume é completado para 100 ml com H₂O_d. Essa solução tem validade de alguns meses, desde que acondicionada em frascos de polietileno.

- b.1. Solução de HDTMA (brometo hexadeciltrimetilamônio) 10 mM: em um balão volumétrico de 1000 ml dissolver 3,645 g de HDTMA em um pouco de H₂O_d, agitar e completar o volume.
- b.2. Solução férrica ácida (FeCl₃.6H₂O 1 mM e HCl 0,01 N): em um balão volumétrico de 1000 ml, dissolver 0,270 g de FeCl₃.6 H₂O em um pouco de HCl 0,01 N, agitar e completar o volume com o ácido.
- b.3. Solução de HCl 0,01 N: em balão volumétrico de 1000 ml, adicionar um pouco de H₂O_d, em seguida, adicionar 0,82 ml de HCl_{conc} (36,5% a 38%), agitar e completar o volume com H₂O_d.
- b.4. Solução aquosa de cromo azurol S 2 mM: em balão volumétrico de 1000 ml, adicionar um pouco de H₂O_d, em seguida, adicionar 1,211 g de cromo azurol S, agitar e completar o volume com H₂O_d.

6. Detecção de Sideróforos através de Cromo Azurol em Meio Sólido

Este método, também adaptado de Schwyn & Neilands (1987), utiliza o mesmo princípio do método anterior, no entanto, é mais simples pois as bactérias são cultivadas diretamente no meio sólido indicador. A desvantagem é que esse meio, em função da presença de HDTMA, é tóxico para muitas bactérias, que não conseguem crescer no mesmo.

Meios e soluções

Para preparar 1000 ml do meio CAS ágar adicionam-se 30,24 g de PIPES (*buffer free acid*, pH 6,8), 15 g de ágar bacteriológico, 3,0 ml da solução estoque de triptofano a 1%, 0,16 g de triptona e H₂O para completar o volume para 800 ml. Após autoclavagem, adicionar as seguintes soluções estéreis:

- 100 ml da solução estoque do meio MM9 10X
 - 100 ml da solução estoque CAS 10X
 - 10 ml de manitol 1M (ou outra fonte de carbono adequada para o organismo em teste)
 - 1 ml de MgSO₄.7H₂O 1M
 - 10 ml de CaCl₂ 0,01M
 - 0,5 ml da solução estoque de vitaminas
- a) Solução estoque do meio MM9 [meio M9 (Miller, 1974) modificado] 10X: 60 g de Na₂HPO₄; 30 g de KH₂PO₄; 5 g de NaCl, 10 g de NH₄Cl, 1000 ml de H₂O. Autoclavar e estocar.
- b) Solução de triptofano a 1% (0,05 M): Dissolver 1 g de triptofano em 100 ml de H₂O (ou 0,1 g em 10 ml).
- c) Solução estoque CAS 10X (100 ml): Adicionar 60,5 g de cromo azurolo S em 50 ml de H₂O. Após agitação, adicionar 10 ml da solução férrica ácida (FeCl₃.6H₂O 1 mM e HCl 0,01 N, ver anexo 4.b.2 acima). Separadamente, dissolver 72,9 mg de HDTMA em 40 ml de H₂O. Adicionar, lentamente, a primeira solução na segunda sob agitação constante, o que resultará em uma solução de cor azul intensa. Autoclavar e armazenar em geladeira.
- d) Solução de manitol 1 M: Dissolver 18,22 g de manitol em 100 ml de H₂O.
- e) Solução de MgSO₄.7H₂O 1M: Dissolver 2,465 g de MgSO₄.7H₂O em 10 ml de H₂O.
- f) Solução de CaCl₂ 50 mM: Dissolver 0,056 g de MgSO₄.7H₂O em 10 ml de H₂O).
- g) Solução estoque de vitaminas: Em 100 ml de H₂O dissolver 20 mg de riboflavina, ácido *p*-aminobenzóico, ácido nicotínico, D-biotina, D-pantotinato de cálcio e piridoxal hidrocloreto e 200 mg de tiamina hidrocloreto. Esterilizar por filtração em filtro bacteriológico e armazenar.

O meio final tem cor azul intensa. Caso isso não ocorra, deve-se checar o pH, que deve ficar em torno de 6,8.

Os isolados são repicados para o meio e as placas são incubadas a 28°C por 5 dias. Aqueles que produzirem um halo alaranjado ao redor da colônia são considerados produtores de sideróforos.

7. Detecção de ácido indol acético (AIA)

Este método colorimétrico foi adaptado de Bric et al. (1991). Transferir as bactérias para placas contendo 0,1X TSA enriquecido com 5 mM de L-triptofano (1,021 g por L). O triptofano é o precursor do AIA. Até 25 isolados podem ser testados por placa. Após a transferência, cobrir o meio com membrana de nitrocelulose e incubar a 28°-30°C por 24h. Remover a membrana para outra placa e saturá-la com a solução de Salkowski (Gordon & Weber, 1951) e incubar à temperatura ambiente.

Os isolados que formam halo avermelhado na membrana, no período entre 30 min e 2 h, são produtores de AIA. A membrana deve ser marcada de tal forma que se possa voltar à placa e identificar o(s) isolado(s) positivo(s).

Meios e soluções

- a) Meio de tripticaseína de soja diluído 10 vezes, acrescido de 15 g de ágar por litro de H₂O_d (0,1X TSA).
- b) Solução de Salkowski: diluir 1 ml da solução de FeCl₃.6H₂O 0,5 M, em 50 ml de HClO₄ 35%.
 - b.1. Solução de FeCl₃.6H₂O 0,5 M: em um balão volumétrico de 1000 ml, dissolver 135,1 g de FeCl₃.6H₂O em um pouco de H₂O_d, agitar e completar o volume.

8. Detecção de quitinase

Este método baseia-se no fato de que a adição de quitina torna o meio turvo. Os organismos que são capazes de degradar a quitina produzem um halo claro ao redor de suas colônias.

Adicionar 8 g de quitina coloidal (base seca; Renwick et al., 1991), como única fonte de C, por litro de meio MCU. Transferir até 25 isolados por

placa com esse meio e incubar a 28°-30°C, por até 10 dias. Os isolados que formam halo claro são considerados produtores de quitinase e são chamados quitinolíticos.

Meios e soluções

a) Quitina coloidal: Como a quitina pura é muito mais cara do que a quitina não purificada, aconselha-se a obtenção dessa, fazendo a purificação no próprio laboratório. Com esse método de purificação, descrito por Reid & Ogrydziak (1981), obtém-se quitina coloidal. Pulverizar 25 g de quitina em moinho de bolas e utilizar a fração que ficar retida entre as peneiras de 0,150 e 0,075 mm. Suspender essa fração em 250 ml de H₃PO₄ 85% e armazenar em refrigerador (4°C) por 24 h. Diluir a suspensão com 2 litros de H₂O_d e homogeneizar em liquidificador. Lavar a quitina seguidas vezes com H₂O_d até que o pH atinja 5,0 a 5,5. Adicionar, então, a solução de NaOH 1N até elevar o pH para 7,0. Centrifugar a mistura a 8.000 g por 10 min e suspender em 1 litro de H₂O_d. Centrifugar novamente. A quitina peletizada é então armazenada em refrigerador até sua utilização. O pelet contém, geralmente, de 7% a 10% de quitina coloidal. A concentração correta deve ser determinada através de secagem de uma amostra em estufa, a 50°C, até peso constante.

Solução de NaOH 1N: em um balão volumétrico de 1000 ml, adicionar ±500 ml de H₂O_d, em seguida, adicionar 40 g de NaOH, agitar e completar o volume.

9. Detecção de β-1,3-glucanase

Este método, adaptado de Renwick et al. (1991), baseia-se na detecção da hidrólise do β-1,3-glucano através da reação colorimétrica com o corante vermelho Congo.

Adicionar 5 g de β-1,3-glucano, como única fonte de C, por litro do meio MCU. A incubação deve ser feita a 28°-30°C, por três dias. Após esse tempo, adicionar solução de vermelho Congo até cobrir o meio completamente. Deixar à temperatura ambiente por 90 min e, após, drenar o excesso do corante. A formação de zona amarelo-alaranjada ao redor das colônias

indica a hidrólise do β -1,3-glucano e, portanto, que as colônias são produtoras de β -1,3-glucanase.

Solução de vermelho Congo: em um balão volumétrico de 1000 ml, diluir 0,6 g de vermelho Congo em um pouco de H_2O_d , agitar e completar o volume.

10. Detecção de 1-aminociclopropano-1-carboxylato (ACC) deaminase

Este método, adaptado de Glick et al. (1995), baseia-se no fato de que alguns isolados conseguem crescer com ACC como única fonte de N no meio, pelo fato de possuírem a enzima ACC deaminase.

Esterilizar por filtração, em filtro bacteriológico, uma solução aquosa de ACC (aproximadamente 10%) e adicionar o equivalente a 0,3033 g, como única fonte de N, em 1 litro de MCU previamente autoclavado. Preparar o mesmo meio sem ACC e nenhuma outra fonte de N. Transferir até 25 isolados por placa, para cada um dos dois meios, e incubar a 28°-30°C, por dois dias. Transferir os isolados que cresceram no meio com ACC para nova placa e incubar novamente.

Os isolados que crescerem bem na segunda transferência no meio com ACC, mas que não tenham crescido bem no meio sem ACC, são capazes de utilizar ACC como fonte de N e, portanto, são produtores de ACC deaminase.

11. Detecção da Solubilização de Fosfatos

Este método, adaptado de Katznelson & Bose (1959), baseia-se no fato de que a adição de fosfato insolúvel torna o meio turvo. Os organismos capazes de solubilizar esse fosfato produzem halo claro ao redor de suas colônias.

Para uma seleção preliminar, utilizar o meio 0,1X TSA acrescido de 4 g de $CaHPO_4$ por litro de meio (0,03 M). Ajustar o pH do meio para 7,0. A incubação deverá ser feita a 28°-30°C, por sete dias. As colônias que formam halo claro ao seu redor são consideradas solubilizadoras de fosfatos.

Protocolo para análise da qualidade e da eficiência agrônômica de inoculantes contendo fungos micorrízicos arbusculares

Protocolo apresentado pelo pesquisador em Microbiologia do Solo Arnaldo Colozzi Filho do IAPAR, aprovado na XII RELARE.

Introdução

Inoculantes contendo propágulos de fungos micorrízicos arbusculares FMA deverão receber parecer positivo da RELARE para fins de registro do Ministério da Agricultura e do Abastecimento e comercialização. Para obtenção deste parecer e do registro, estes produtos deverão ser submetidos a testes de eficiência agrônômica, cuja normalização e regulamentação começam agora a serem discutidos por profissionais da área no âmbito da RELARE, com o objetivo de embasar tecnicamente governo, produtores de inoculantes e consumidores visando relações de pleno direito entre estes agentes da sociedade. Após a definição das normas pela RELARE, estas serão publicadas em portaria e deverão orientar a realização dos testes, que deverão ser conduzidos por instituições de pesquisa credenciadas junto ao Ministério da Agricultura e do Abastecimento. A aprovação ou não do produto ou tecnologia se dará após análise dos resultados pela RELARE. Para evitar que um produto seja testado inúmeras vezes e que os resultados negativos sejam desconsiderados, o fabricante terá que comunicar a RELARE cada teste a campo no início da safra. Testes não comunicados com a devida antecedência não serão considerados pela RELARE. Propostas para recomendação de novas espécies de FMAs deverão apresentar resultados comparativos de testes de laboratório, casa de vegetação e a campo, obedecendo aos critérios descritos na metodologia de avaliação que agora se propõe.

Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são fungos da ordem Glomales, de ocorrência natural nos solos da maioria dos ecossistemas. São simbiotes obrigatórios que colonizam raízes da maioria das plantas, e através do micélio externo lançado no solo após a colonização das raízes, promove absorção facilitada de P e água pela planta, conferindo-lhe maior resistência a doenças e adversidades de solo e clima. Em contrapartida, o fungo recebe

desta carboidratos e fotoassimilados de que necessita. Entretanto sob algumas circunstâncias relacionadas a efeitos antropogênicos, a simbiose pode ser deprimida ou mesmo eliminada dos ecoagrossistemas. Também, plantas cultivadas em substrato sem propágulos ou mesmo em solo com baixo potencial de inoculo natural apresentam pouca ou nenhuma micorrização. Em tais casos, é desejável restabelecer a micorrização, reintroduzindo FMAs através da inoculação. O restabelecimento do potencial de inoculo de FMA pode estimular a micorrização e reduzir o uso de agroquímicos, suprimindo parte das necessidades da plantas em energia e nutrientes que as possibilita desenvolver resistência à ocorrência de pragas, doenças e fatores ambientais adversos.

A inoculação de FMAs difere das inoculações com outros tipos de microrganismos ou bioestimulantes porque visa, primeiramente, o restabelecimento da simbiose e, secundariamente, o efeito principal da simbiose que é a promoção da absorção mais equilibrada de nutrientes pelas plantas. Como consequência, a resistência das plantas é aumentada, mas não em resposta à produção de toxinas ou mesmo micoparasitismo pelo FMA inoculado mas sim pela nutrição mais equilibrada das plantas. Portanto, embora a inoculação com FMA seja uma inoculação microbiana, ela deve ser considerada de forma diferente quanto à regulamentação e avaliação de risco. O risco maior pode estar relacionado à eficiência agrônômica do inoculante e ao retorno econômico do consumidor, e não à ocorrência de danos ambientais, uma vez que se objetiva apenas o restabelecimento dos fungos e da simbiose na natureza, e eles são de ocorrência generalizada não produzem nenhuma substancia prejudicial a outros organismos

Definições

MICROORGANISMO: qualquer unidade microbiana, celular ou não-celular, capaz de trocar material genético ou se reproduzir.

INOCULANTE: todo produto que contenha microrganismos com ação estimulante para o crescimento das plantas.

FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES - FMA: fungos da ordem Glomales que formam simbiose mutualística com plantas.

PROPÁGULOS: estruturas de reprodução de um determinado organismo.

PROPÁGULOS DE FMA: estruturas de reprodução dos fungos micorrízicos arbusculares, aqui consideradas como esporos, fragmentos de hifas e de raízes colonizadas.

1. Análise da qualidade dos inoculantes

As análises serão compostas por testes de pureza, testes quantitativos dos propágulos de FMAs, testes qualitativos visando a identificação morfológica e/ou caracterização molecular dos FMAs rotulados, teste de caracterização com relação ao potencial de hidrogênio (pH) e umidade do inoculante, testes de eficiência simbiótica e agrônômica e teste de viabilidade ao final do período de validade.

1.1. Preparo da amostra para realização dos testes

O lote do inoculante a ser analisado será representado por uma amostra composta de duas subamostras "A" e "B", que deverão ser individualmente identificadas, homogeneizadas e posteriormente higienizadas externamente, com álcool etílico a 75%, em sala asséptica, a fim de evitar contaminação.

1.2. Teste de pureza dos inoculantes

Para analisar a ocorrência de fungos e bactérias não especificados na rotulagem do inoculante, serão realizadas diluições seriadas do inoculo e plaqueamento em meios diferenciais para crescimento microbiano ágar nutritivo (AN) e batata-dextrose-ágar (BDA), conforme especificados nos anexos 1,2 e 3. Os meios diferenciais serão inoculados com alíquotas de 0,1 ml das diluições 10^{-5} e 10^{-6} dos inoculantes, em triplicatas, em placas de Petri. Após a absorção do inoculo pelo meio, as placas deverão ser colocadas invertidas em estufa à 28°C e incubadas por 10 dias, efetuando-se então a leitura final.

Os resultados serão expressos para cada um dos meios diferenciais (AN e BDA), de acordo com a média do número de unidades formadoras de colônia por mililitro de inóculo (UFC ml⁻¹).

O resultado final será a média obtida dos resultados originados da subamostra "A" e subamostra "B".

- Valor limite para a ocorrência de contaminação: será considerado fora

de padrão para comercialização o lote ou partida de inoculante que apresentar desenvolvimento de microrganismos não especificados a partir da diluição $1,0 \times 10^{-5}$ mesmo que este apresente as densidades mínimas estabelecidas para o número de propágulos de FMAs por grama ou mililitro do inoculante.

1.3. Testes quantitativos: avaliação da densidade de propágulos de FMA no inoculante

São considerados propágulos, esporos, fragmentos de hifas e de raízes colonizadas. A avaliação da densidade de propágulos presentes no inoculante (número de propágulos por unidade de inoculante) será feita através da contagem direta dos esporos e da estimativa do NMP de propágulos infectivos, segundo Daniels & Skipper (1982).

Serão considerados como valores de referencia ideais, densidade de no mínimo 50 esporos por 50 g do inoculante e X? (valor a ser discutido) NMP de propágulos viáveis por g de inoculante.

1.3.1. Determinação da densidade de esporos de FMA

A densidade de esporos no inoculante será determinada através da contagem direta dos esporos em placa de petri raiada sob microscópio estereoscópico. Os esporos serão extraídos do inoculante por peneiramento úmido e centrifugação diferencial em água e sacarose, conforme descrito por Gerdemann e Nicolson (1973) e sumarizado em Colozzi Filho & Balota (1994).

A extração será feita em uma amostra correspondente a 20% do volume total da amostra do inoculante a ser analisada, independente do tipo do inoculante (sólido ou líquido) e do veículo utilizado (solo ou substrato, gel ou água, etc).

1.3.1.1. Método para extração de esporos

- Homogenizar bem o inoculante a ser analisado, através de agitação.
- Retirar uma amostra de 20% (v/v) do material. Em caso de inoculante líquido ou gel, cuidar para que o material não sofra decantação no momento da amostragem.
- Diluir a amostra do inoculante em dois litros de água, e agite em círculos vigorosamente.

- Verter o conteúdo em um conjunto de peneiras de malhas de 710 μ m e 45 μ m de abertura, colocadas sobrepostas nesta ordem, respectivamente.
- Repetir por 4 vezes o procedimento de diluição em água, agitação vigorosa e passagem através do conjunto de peneiras, do material remanescente da primeira diluição.
- Descartar o material recolhido na peneira de 710 μ m
- O material retido na peneira de 45 μ m deve ser recolhido em tubos de centrifuga de 50ml, com aproximadamente 20ml de água.
- Completar o volume (50 ml) com uma solução de sacarose (açúcar comercial) na concentração de 60% (w/v) Deverá haver uma interface clara visível entre a água (sobre) e fase de açúcar (abaixo).
- Centrifugar tubos a aproximadamente 3000 rpm durante 2 minutos, em uma centrifuga de bancada
- Verter o sobrenadante em uma peneira pequena com malha de 45 μ m e lavar para remover resíduos da solução de sacarose
- Coletar o conteúdo em placa de petri raiada.
- Observar e contar os esporos sob estereomicroscópio.
- O esquema de extração de esporos é sumarizado na Figura 1.

1.3.1.2. Método direto de contagem de esporos

No método direto de contagem, os esporos, depois de extraídos do inoculante, são transferidos em solução aquosa para placas de petri raiadas (Figura 2), e observados em microscópio estereoscópico, no aumento de 40 vezes. A contagem é feita através da observação dos esporos nas raias e anotação do número de esporos em contadores mecânicos ou digitais. As raias no fundo da placa de petri podem ser feitas com canetas próprias para escrita em vidro. Mais detalhes desta metodologia são encontrados em Colozzi Filho & Balota (1994).

1.3.2. Determinação da densidade de propágulos infectivos de FMA.

Esta determinação se aplica somente a inoculantes que contem outros tipos de propágulos de FMAs além de esporos, podendo ser inoculantes de base sólida ou líquida. Para inoculantes que utilizam outras formas de

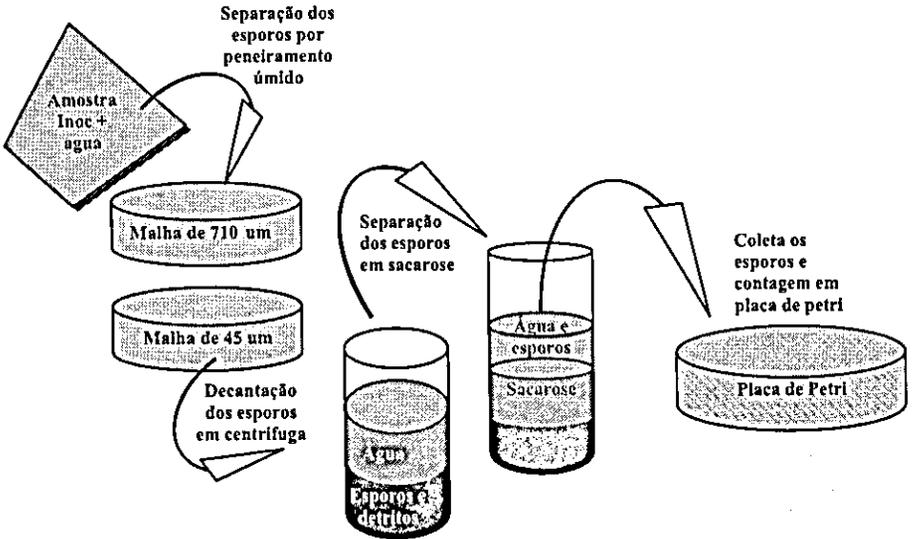


Figura 1. Esquema para extração e contagem de esporos de Fungos Micorrízicos Arbusculares de inoculantes.

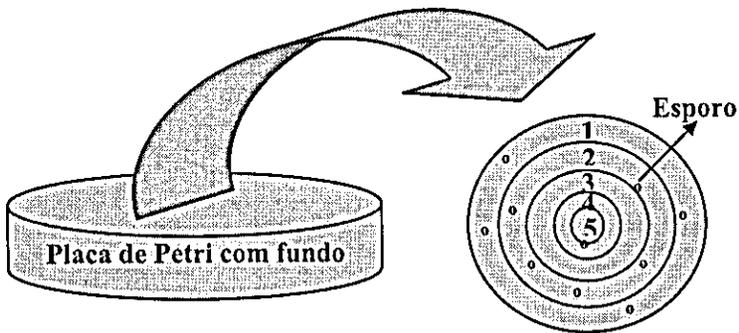


Figura 2. Ilustração de placa de petri com fundo raiado usada para contagem direta de esporos.

veículo, como por exemplo gel, o fabricante devesa informar a maneira de diluição. A realização deste teste não exclui a determinação da densidade de esporos, conforme descrito em 1.3.1 deste protocolo

A densidade de propágulos infectivos de FMA (esporos, hifas e segmentos de raízes colonizadas) pode ser estimada pela técnica do NMP, conforme proposto por Daniels & Skipper (1982). Nesta metodologia, realizam-se diluições sucessivas do inoculante em substrato estéril e inoculação em planta indicadora cultivada em substrato estéril fertilizado com solução nutritiva. A presença de colonização radicular na planta indicadora e a conversão destes resultados através das tabelas de Fischer & Yates (1966) indicarão o número mais provável de propágulos infectivos presentes no inoculante.

1.3.2.1. Determinação do número mais provável (NMP) de propágulos infectivos de FMA em inoculantes (Modificado de Daniels & Skipper, 1982).

Para inoculantes de base sólida:

Diluir 20 ml do inoculante em 180 ml de substrato estéril, e a partir daí, diluir 20 ml de cada substrato inoculado em 180 ml de substrato estéril, sucessivas vezes ate obter-se a diluição de 10^{-8} , conforme ilustrado na Figura 4A.

Para inoculantes de base líquida:

Realizar a diluição serial do mesmo modo que o citado anteriormente, porém utilizando água estéril como diluente, Figura 4B.

Colocar 180 ml do substrato em recipientes de plástico escuro.

Detalhes sobre a desinfecção da areia, vermiculita e composição do substrato são apresentados no Anexo 7.

Inocular com 20 ml dos inoculantes (sólidos ou líquidos) previamente diluídos, de maneira localizada no centro do recipiente, conforme ilustrado na Figura 4A.

Usar 4 repetições para cada diluição.

Como planta teste pode ser usada *Brachiaria decumbens* ou milho (*Zea mays*), que são plantas altamente micorrízicas e boas indicadoras de colonização. Desinfestar as sementes conforme descrito no anexo 4.

Pregerminar em papel conforme descrito no anexo 5.

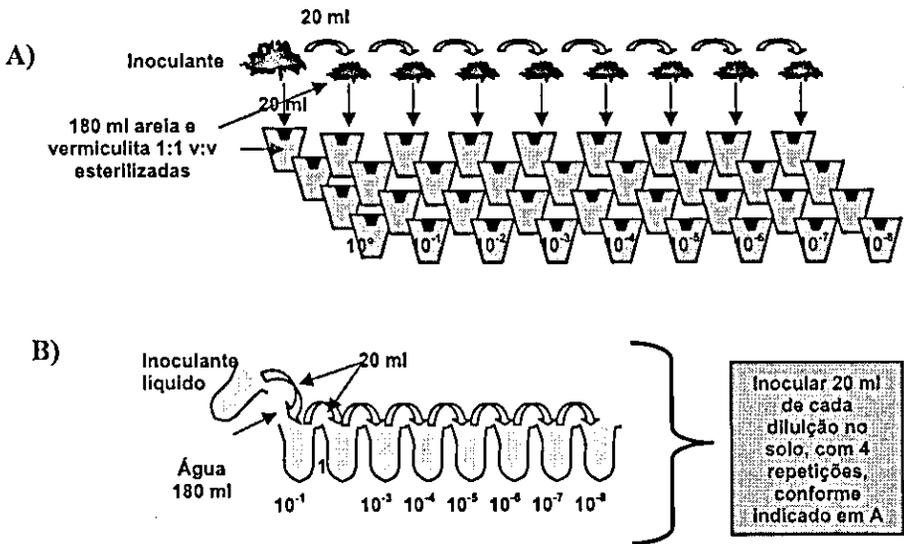


Figura 4. Esquema de diluição serial do inoculante no substrato e inoculação. A) para inoculante sólido; B) para inoculante líquido.

Selecionar as plântulas pelo vigor e uniformidade de desenvolvimento e efetuar seu plantio no substrato.

Conduzir as plantas por 8 semanas em câmara de crescimento com luminosidade, temperatura e irrigação controlada (Ver detalhes no Anexo 8).

Ao final deste período, tempo suficiente para que ocorra colonização radicular por FMA na planta hospedeira, coletar as raízes, lavar com água corrente e corar, conforme descrito no Anexo 6, para a determinação da colonização.

Após a coloração as raízes deverão serem colocadas em placa de Petri com 5 ml de água, e observadas ao microscópio estereoscópico com aumento de até 40x, determinando-se a presença a ausência de colonização.

O número mais provável (NMP) de propágulos infectivos será obtido segundo a formula proposta por Sieverding (1991):

$$\text{Log } \Omega = x.\text{log } a-k$$

onde: Ω é o número de propágulos infectivos.

x é a média do número de plantas colonizadas
 x = número total de plantas colonizadas
número de repetições por diluição

$$y = s - x$$

Onde: y é necessário para definir o valor de K da tabela VIII de Fisher & Yates (1963),

S é o número de níveis de diluição,

a é o fator de diluição,

K é encontrado na tabela VIII por meio dos valores de x e/ou y .

O inoculante será considerado fora do padrão (com baixo número de propágulos infectivos) se o valor de NMP, for inferior a $X?$ (valor a ser discutido) propágulos/g ou ml de inoculante. Nesse caso, recomenda-se repetir a contagem em, pelo menos, mais uma amostra para garantir que o resultado é devido à baixa qualidade do inoculante e não a um erro experimental.

1.4. Identificação morfológica e caracterização molecular das espécies de FMAs presentes no inoculante

1.4.1. Identificação baseada na morfologia dos esporos

A identificação dos esporos será baseada em critérios morfológicos dos mesmos, conforme descrito em Schenck e Perez (1987) e segundo as descrições contidas no INVAM (<http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/classification.htm>.)

1.4.1.1. Obtenção dos esporos:

A extração dos esporos do inoculante será feita como descrito em 1.3.1.1 deste protocolo.

1.4.1.2. Preparo de lâminas microscópicas com esporos de FMA:

Depois de extrair os esporos do inoculante (conforme descrito em 1.3.1.1) e realizar a contagem (conforme descrito em 1.3.1.2), sob microscópio estereoscópico, separe-os em lotes de até 20, e transfira-os para gotas de PVLG (Polyvinyl lactoglycerol) e do reagente de Melzer colocados sobre uma mesma lâmina de vidro para microscopia, conforme ilustrado na Figura 5.

Cuidadosamente, cubra a gota com uma lâminula de vidro, colocada em

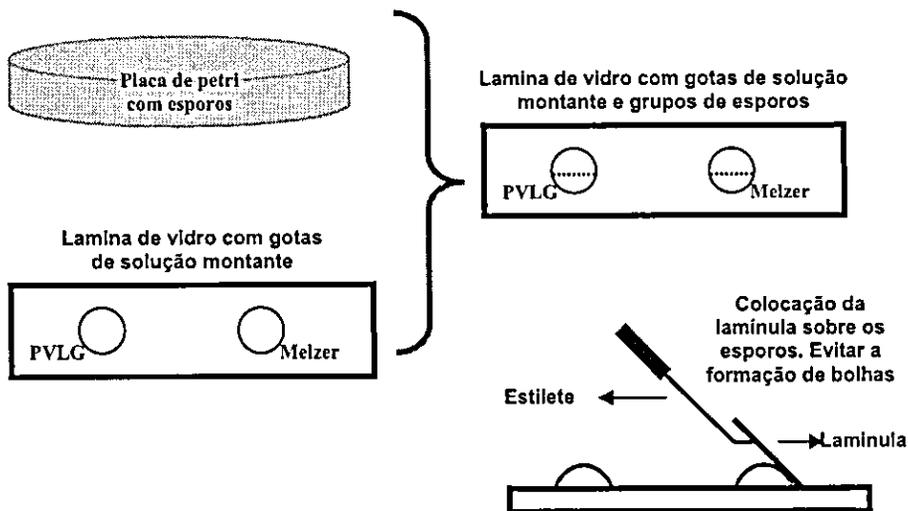


Figura 5. Esquema da montagem de lâminas microscópicas com esporos para identificação de FMAs.

ângulo de 30 graus para prevenir a formação de bolhas de ar.

Espere 30 segundos e então aplique uma pressão suave sobre a lâminula com um lápis macio, para quebrar os esporos. Isto deve ser feito sob microscópio estereoscópico para evitar vazamentos devido a pressão aplicada.

Selar a lamina com verniz para unhas.

Etiquetar a lamina com um código referencia, data e nome.

1.4.1.3 Caracterização molecular das espécies:

1.4.2. Caracterização molecular dos FMAs baseada na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para caracterização das espécies de FMAs contidas no inoculante, poderá ser utilizada a técnica da amplificação do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com oligonucleotídeos ("primers") específicos, que serão definidos pela RELARE, para cada espécie de FMA.

1.4.2.1. Preparo dos FMAs para extração de DNA:

1.4.2.2. Extração de DNA: A metodologia para extração do DNA poderá ser modificada para as condições de cada laboratório credenciado, desde que seja reconhecida pela RELARE e o perfil de DNA resulte no mesmo perfil padrão estabelecido com a metodologia de extração descrita.

1.4.2.3. Reação de amplificação: A amplificação por PCR será realizada com oligonucleotídeos específicos para cada estirpe de FMA, definidos pela RELARE. O sistema para reação constará de uma mistura constituída por água mili-Q-estéril, dNTPs, tampão, $MgCl_2$, enzima TaqDNA polimerase, oligonucleotídeos específicos e DNA a ser analisado. Os ciclos de amplificação ficarão definidos, pela RELARE. Os fragmentos obtidos serão analisados em gel de eletroforese horizontal com agarose. As bandas serão coradas, visualizadas e os perfis comparados com o padrão para aquela estirpe, disponibilizado pela RELARE.

1.5. Determinação do pH e umidade do inoculante

Tanto a acidez quanto o percentual de umidade dos inoculantes sólidos são determinantes para o tempo de sobrevivência dos propágulos. Entretanto, ambas as características podem ser alteradas em função do tempo e das condições de armazenamento, com reflexos diretos sobre a eficiência agrônômica do produto. Portanto, a avaliação destas propriedades e sua comparação com aquelas descritas no rótulo pelo fabricante servirão como forma de analisar as condições do inoculante antes de seu uso, durante o período de comercialização e armazenamento.

1.5.1. pH: O grau de acidez é definido através da escala de pH que determina a concentração de íons hidrogênio na solução. O pH dos produtos inoculantes será determinado através de potenciômetro, que deverá ser calibrado com soluções tampão de pH conhecidas. O pH ótimo para os propágulos de FMAs pode variar em função da espécie contida no inoculo, mas deve estar em uma faixa compreendida entre 5,5 a 7,0. Entretanto, será considerado pH ideal aquele informado pelo fabricante na rotulagem do produto.

1.5.2. Umidade: O valor de umidade será expresso em percentagem, com base no substrato seco. Será considerado como valor de umidade referencial aquele , informado pelo fabricante na rotulagem do produto.

Procedimento para avaliação da umidade do inoculante:

- toma-se o peso do recipiente,
- pesa-se uma alíquota de 10 a 15 gramas de cada subamostra,
- seca-se à temperatura de 105° a 110° C, pelo período de tempo de duas horas, quando deverá ser atingido o equilíbrio de invariabilidade da massa.
- avalia-se a massa final do substrato.

A umidade da amostra será a determinada pela média das duas subamostras através da seguinte fórmula:

$$Ug (\%) = \frac{(m1 - mf) \times 100}{m_1 - tar}$$

Onde: Ug = umidade gravimétrica, em %

m_1 = massa inicial

m_f = massa final

tar = tara do recipiente

2. Testes de eficiência agronômica de inoculantes

Os testes de eficiência agronômica dos inoculantes contendo propágulos de FMAs deverão ser realizados através de experimentos conduzidos em casa de vegetação e a campo. Em ambos os casos, os experimentos deverão ser orientados no sentido de se testar parâmetros que permitam concluir sobre a eficiência do inoculante em promover efeitos para quais culturas e condições de uso ele esta sendo indicado, segundo instruções gravadas no rotulo pelo fabricante. Por exemplo: inoculante indicado para mais de uma cultura, devera ser testado para todas as culturas indicadas, devendo-se observar a aptidão de cultivo da região onde estiver sendo realizado o teste. Neste caso, também devera ser utilizado o solo mais representativo daquela região. Para experimentos a campo, além da observância destas condições, estes deverão ser conduzidos em pelo menos dois ecossistemas de importância para a cultura e em duas safras agrícolas.

2.1. Testes de eficiência agronômica em casa de vegetação

Os testes de eficiência agronômica em casa de vegetação têm como objetivo avaliar o inoculante sob condições controladas. Não existe um

único delineamento estatístico modelo para a realização destes testes, porque eles podem variar em função da grande diversidade de tipos de inoculantes e também em função da grande variedade de situações de campo e culturas para as quais são recomendados. Entretanto, existem regras básicas de experimentação em casa de vegetação que devem ser observadas. Alguns pontos considerados importantes para orientar estes experimentos são listados a seguir.

2.1.1. Condições gerais para realização dos experimentos: os experimentos deverão ser realizados em solo apropriado para cultivo da cultura, e em níveis de fertilidade e pH corrigidos para valores próximos aos sugeridos pelo fabricante para a máxima eficiência do inoculante.

- O inoculante poderá ser testado para uma ou mais culturas e para um ou mais tipos de solo em um único experimento, mas deverá sempre ter entre os tratamentos, um com solo desinfestado e outro com solo natural.

Recomenda-se no mínimo seis repetições para cada tratamento.

- Nos tratamentos sem inoculação sempre deveser feita a inoculação negativa (aplicação do inoculante sem propágulos viáveis), em massa ou volume igual ao utilizado para a inoculação. A eliminação dos propágulos no inoculante poderá ser feita em autoclave.
- A inoculação deveser sempre ser feita observando-se as instruções do fabricante quanto a dosagem e modo de aplicação do inoculante.
- Sempre que possível, utilizar sementes desinfestadas e pré-germinadas, conforme descrito respectivamente nos Anexos 4 e 5 deste protocolo.

Os experimentos deverão ser conduzidos até o estágio de máximo desenvolvimento vegetativo das plantas, que será variado para cada espécie testada. Cuidados de assepsia devem ser observados durante o preparo dos vasos, inoculação e condução dos testes, evitando-se contaminações cruzadas.

Cuidado especial deve ser dedicado à irrigação dos vasos, que pode ser fonte de variação dos resultados e de contaminação de experimentos em casa de vegetação.

Produtos químicos (corretivos de solo, fertilizantes e defensivos agrícolas)

podem ter efeito sobre a eficiência do inoculante. Portanto, devem ser usados somente quando estritamente necessários á condução do experimento, e dentro das normas técnicas recomendadas.

2.1.2. Avaliações: serão avaliadas as características químicas do solo, a colonização radicular por FMAs, a concentração de P nos tecidos e a produção, conforme descritos a seguir.

2.2.2.1. Caracterização química do solo: deverão ser analisadas as características químicas dos solos, determinadas através da análise de rotina convencional.

2.2.2.2. Colonização radicular por FMAs: ao final do período de cultivo (na fase de máximo desenvolvimento vegetativo) as raízes deverão ser colhidas, lavadas em água limpa e então retirado 1g das raízes mais finas para proceder-se a avaliação da colonização radicular por FMAs. Para avaliar a colonização radicular, as raízes deverão ser coradas conforme descrito no Anexo 6 deste protocolo e avaliadas pelo método das intersecções em placa quadriculada (Giovannetti & Mosse, 1980), conforme sumarizado em Colozzi Filho & Balota (1994).

2.2.2.2. Massa seca da parte aérea e raízes: ao final do período de cultivo (na fase de máximo desenvolvimento vegetativo), parte aérea e raízes de cada parcela deverão ser colhidas, separadas na altura do caule, lavadas em água limpa e secas em estufa a 65 graus, até peso constante, determinando-se então a massa seca ($g\ planta^{-1}$).

2.2.2.3. Determinação da concentração de P na planta e do P absorvido. A concentração de P na parte será determinada por digestão sulfúrica segundo Miyasawa et al, (1992), e o P total absorvido determinado multiplicando-se a concentração de P pela quantidade de massa seca produzida, expressa em $mg\ planta^{-1}$

2.1.3. Análises estatísticas

Os resultados devem ser submetidos à análise de variância e, quando o teste F for significativo a 10%, as médias dos tratamentos deverão ser comparadas pelo teste "t" ou teste de Duncan, também ao nível de 10% de significância.

2.1.4. Interpretação dos resultados

Será considerado eficiente o produto que, inoculado em solo natural, promover na planta aumento de crescimento e maior concentração de P em relação ao observado nas plantas crescendo em solo natural sem inoculação.

2.2 Testes de eficiência agrônômica a campo

Os testes de eficiência agrônômica a campo objetivam avaliar o inoculante nas condições mais próximas possíveis àquelas para as quais sua utilização é recomendada, como forma de endossar as relações comerciais entre os fabricantes, que desenvolvem o produto, e os consumidores, que o utilizam segundo as recomendações do fabricante. Neste sentido, os testes a campo deverão observar rigorosamente as instruções do fabricante, quanto à dosagem, modo de aplicação, culturas e situações de cultivo apropriadas para uso. Entretanto, regras e princípios básicos para a realização de experimentos a campo devem ser observadas. Os principais pontos são relacionados abaixo

2.2.1. Princípios básicos a serem observados

A área experimental deve ser protegida de erosão, alagamentos, trânsito de animais e de pessoas.

O solo deve ser representativo da região e próprio para a cultura.

O solo devera ser corrigido e fertilizado de acordo com análise prévia de rotina e considerando a adubação recomendada para a cultura. Neste caso, é importante observar que inoculantes com FMA normalmente são recomendados para solos com baixa concentração de P disponível, devendo portanto ser evitadas fertilizações com P que elevem sua disponibilidade a níveis muito acima do mínimo exigido pela cultura.

A cultura a ser inoculada deve, obrigatoriamente, estar incluída na recomendação do fabricante, e ser adaptada para cultivo na região.

Utilizar sempre sementes ou cultivares recomendadas para a região.

2.2.2. Arranjo das parcelas e delineamento experimental: as parcelas deverão ter no mínimo 4,0 x 6,0 m e distanciadas entre si em no mínimo 1,0 m. O espaçamento entre linhas e entre plantas será variável, definido em função das exigências de cada cultura. A avaliação devera ser feita nas seis linhas centrais de cada parcela, dispensando-se 1 m em cada cabeceira

(área útil = 6,0 m²). O delineamento experimental utilizado deverá ser o de blocos ao acaso, com, no mínimo, seis repetições.

2.2.3. Tratamentos

O experimento de campo deverá conter tratamentos com o/os produtos comerciais a serem testados e um controle negativo, sem inoculação. Para os ensaios de campo, a acidez e a fertilidade natural devem ser corrigidas para os níveis mínimos exigidos pela cultura, e deve estar indicada na rotulagem do produto.

2.2.4. Inoculação

Devido à grande variedade de tipos de inoculantes, o processo de inoculação assim como as dosagens utilizadas devem rigorosamente seguir a recomendação do fabricante. Evitar o uso de máquinas para fazer a inoculação, porque elas não são específicas e podem ser fontes de variação dos resultados. Preferencialmente, faça a inoculação manual.

2.2.5. Plantio e condução do ensaio.

O plantio deve ser realizado no menor tempo possível após a inoculação, quando ambos não puderem ser realizados simultaneamente.

A semeadura do ensaio deve ser manual.

Todas as parcelas devem ser plantadas no mesmo dia.

Realizar os tratos culturais manualmente, e nas épocas conforme recomendado para a cultura. O tráfego de máquinas no experimento pode ser fonte de variação, e deve ser evitado.

2.2.6. Avaliações: serão avaliadas as características químicas do solo, a colonização radicular por FMAs, a concentração de P nos tecidos e a produção, conforme descritos a seguir.

2.2.6.1. Caracterização química do solo: deve ser realizada conforme descrito em 2.2.3.1. deste protocolo.

2.2.6.2. Colonização radicular por FMAs: na fase de máximo desenvolvimento vegetativo das culturas deverá ser feita uma amostragem de raízes a campo, coletando-se 3g de raízes finas coletadas na projeção da copa de dez plantas, alternando-se a coleta em pontos situados nas regiões da linha e entrelinha de cultivo da área útil da parcela. Depois de colhidas as

raízes deverão ser lavadas em água limpa e então retirado 1g de raízes mais finas para proceder-se a avaliação da colonização radicular por FMAs. Para avaliar a colonização radicular, as raízes deverão ser coradas conforme descrito no Anexo 6 deste protocolo e avaliadas pelo método das intersecções em placa quadriculada (Giovannetti & Mosse, 1980), conforme sumarizado em Colozzi Filho & Balota (1994).

2.2.6.3. Determinação da concentração de P na planta. No estágio de máximo desenvolvimento vegetativo será feita uma amostragem de material vegetal (folhas) para a determinação da concentração de P nos tecidos. Esta amostragem será realizada em dez plantas escolhidas ao caso no centro da área útil da parcela. O local de coleta das folhas na planta deverá ser definido em função da cultura a ser amostrada. O material será lavado, seco em estufa a 65 graus e moído. A concentração de P será determinada por digestão sulfúrica segundo Miyasawa et al, (1992).

2.2.6.4. Produção: será avaliada de acordo com o objetivo de cada cultura (grãos, massa verde, frutos, etc) e o resultado expresso em kg há⁻¹. Para grãos, o rendimento deve ser corrigido para 13% de umidade.

2.2.6.5. Análise estatística: os resultados devem ser submetidos à análise de variância e, quando o teste F for significativo a 5%, as médias dos tratamentos deverão ser comparadas pelo teste "t" ou teste de Duncan, também ao nível de 5% de significância.

2.2.6.6. Interpretação dos resultados: será considerado eficiente o produto que, inoculado em solo natural, promover maior concentração de P e maior produção em relação ao observado nas plantas crescendo em solo natural sem inoculação.

3. Teste de viabilidade do inoculante no período de validade.

O inoculante deve manter sua eficiência desde a produção até sua utilização a campo. Entretanto, as condições de armazenamento (temperatura, luminosidade, etc) e também o tempo de armazenagem pode reduzir sua viabilidade, porque se trata de material biológico e portanto, perecível. O prazo de validade define o período de tempo em que o inoculante pode manter sua viabilidade, sob condições adequadas de armazenamento,

e deve ser indicado pelo fabricante na rotulagem do produto. O teste de viabilidade devera ser aplicado no final do prazo de validade estabelecido pelo fabricante.

3.1. Teste de viabilidade

Para testar a viabilidade do inoculante ao final do prazo de validade, será aplicado o teste para determinação do NMP de propágulos viáveis, conforme descrito no item 1.3.2.1 deste protocolo.

Será considerado viável o inoculante que apresentar, ao final do período de validade, pelo menos 80% de propágulos viáveis quando comparado pelo mesmo teste a um lote do mesmo inoculante no início do prazo de validade.

4. Seleção de espécies de fungos micorrízicos arbusculares eficientes para introdução em novos inoculantes.

Esta seleção devera ser realizada por laboratórios credenciados, através de experimentação tradicional, com o objetivo de fornecer o inoculante básico para a multiplicação e produção do inoculante comercial pelas firmas. As firmas deverão, em contrapartida, manter um fundo de pesquisa para financiar parte deste trabalho.

5. Referências

- COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E. L. Micorrizas arbusculares. In: HUNGRIA, M., ARAÚJO, R.S., eds., **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. EMBRAPA-SPI, Brasília, p. 383-418. 1994.
- COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E. L. Micorrizas arbusculares: práticas agrônômicas e manejo de fungos nativos em sistemas agrícolas. In: **Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, XXVI**, Rio de Janeiro - RJ., 25 p., 1997. (CD ROM)
- DANIELS, B. A.; SKIPPER, H. D. Methodes for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In: SCHENCK, N.C. (ed.) **Methodes and Principles of Mycorrhizal Research**. The American Phytopathological Society, St Paul, p. 22-35, 1982.

FISHER, R. A.; YATES, F. **Statistical Tables for Biological Agricultural and Medical Research**. Ed.6, Hafner Publ. Comp., Davien, p. 66, 1963.

GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decating. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 46, p. 235-44, 1963.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular micorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, London v. 84, p. 484-500, 1980.

MIYASAWA et al, (1992)

PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasite and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British of Mycological Society**, London, n. 55, v. 1, p. 158-61, 1970.

SCHENCK, N. C.; PÉREZ, Y. **Manual for the identification of mycorrhizal fungi**. INVAN, Flórida, 245 p, 1987.

SIEVERDING, E. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Deutsche, GTZ, Eschborn, Germany. 371 p. 1991

Anexos

1. Diluição seriada decimal: A diluição seriada é empregada para possibilitar a contagem através da semeadura em placas de Petri, ou através do método do número mais provável (NMP) em plantas e possibilitar, com segurança, a determinação do número de células viáveis dentro dos intervalos de segurança propostos por cada uma das técnicas empregadas. Para formar a diluição 10^{-1} , retirar 10,0 g ou 10,0 ml do produto inoculante e adicionar em um frasco Erlenmeyer com 90,0 ml de solução fisiológica (NaCl a 0,85%), colocando para homogeneizar a solução em um agitador orbital pelo período de tempo de 10 minutos. No caso de inoculante que utilizam como veículo solo, substrato misto (solo+vermiculita) ou turfa, adicionar pérolas de vidro para a homogeneização. Logo em seguida, retirar uma alíquota de 1,0 ml desta solução e acrescentar em um tubo de ensaio com 9,0 ml de solução fisiológica, procedendo à homogeneização

desta solução em um agitador de tubos, formando, assim, a diluição 10^{-2} . Da diluição 10^{-2} , retirar 1,0 ml e adicionar em outro tubo de ensaio com 9,0 ml de solução fisiológica, formando, na seqüência, a diluição 10^{-3} . E assim sucessivamente, usando sempre a última diluição, até formar as diluições desejadas. O uso da solução fisiológica para a diluição decimal em série é importante para a estabilidade osmótica das células dos microrganismos que estão sendo testados.

2. Meio ágar nutritivo (AN): Meio indicado para o desenvolvimento de bactérias. A esterilização deve ser feita por autoclavagem a 121°C e 1,0 atmosfera por 10 minutos, a fim de evitar reações secundárias com a glicose. O pH final deverá estar em torno de 6,8.

Meio ágar nutritivo (AN):

01- Extrato de carne	3,0 g
02- Peptona	10,0 g
03- Glicose	2,5 g
04- Ágar.....	15,0 g
05- Água.....	1.000 ml

3. Meio batata-dextrose-ágar (BDA): Este meio é indicado principalmente, para o desenvolvimento de fungos e tem a propriedade de retardar a esporulação de alguns microrganismos. O pH final do meio deverá ficar em torno de 5,6.

Meio batata-dextrose-ágar (BDA):

01- Batata descascada*	200,0 g
02- Dextrose	20,0 g
03- Ágar.....	15,0 g
04- Água.....	1.000 ml

* Fazer infusão de 200 g de batata fatiada em 1.000 ml de água; peneirar ou filtrar para retirar a batata.

4. Desinfecção de sementes: a assepsia, desinfecção e escarificação podem ser feitas simultaneamente, usando ácido sulfúrico concentrado. Colocar as sementes em um Becker e adicionar o ácido sulfúrico em quantidade que permita a cobertura das sementes. Agitar durante três a cinco minutos, drenar o ácido e lavar com água esterilizada por, no mínimo, seis

vezes. Após a última lavagem, deixar as sementes em água, por cerca de cinco minutos, para intumescimento, o que facilita a germinação.

No caso de sementes que não necessitam escarificação, como o milho, a assepsia e desinfecção podem ser feitas com solução de hipoclorito de sódio de 3 a 6%, durante 4 a 5 minutos. Decorrido o tempo, as sementes devem ser lavadas, no mínimo, por seis vezes com água esterilizada.

Em ambos os casos é conveniente efetuar uma imersão prévia das sementes em álcool etílico a 95% por 30 a 60 segundos, para facilitar o contato do tegumento com a solução de hipoclorito.

5 Pré-germinação das sementes: destina-se a garantir o desenvolvimento de plântulas homogêneas para transplante no substrato. Após a assepsia e desinfecção das sementes, elas deverão ser distribuídas de forma uniforme e individualizadas sobre a superfície de um conjunto de duas folhas de papel germiteste esterilizadas e umedecidas com água estéril. Recobrir as sementes com mais uma folha de papel germiteste umedecida, com o devido cuidado para manter a distribuição das sementes. O material deverá ser acondicionado em saco plástico e colocado em germinador à temperatura de 20 a 25°C por 48 horas.

6. Coloração de raízes para a determinação da colonização radicular por FMA: após coletadas e lavadas em água as raízes deverão ser clarificadas através de imersão em solução fervente de KOH 10% durante 10 minutos. Após, lavar várias vezes, acidificar em água com HCl 1% por 2 minutos, drenar e aquecer a 100°C durante 10 minutos em solução de glicerol-ácido + tripan-blue 0,05%, conforme Phillips & Hayman (1970).

7. Substrato: Areia: A areia a ser usada deve estar isenta de qualquer elemento que possa causar toxidez às plantas. Toxidez de manganês já foi observada em areias de diversas procedências. É conveniente, portanto, que, nestes casos, se efetue uma lavagem com ácido clorídrico. Preliminarmente, a areia deve ser lavada com água corrente até que esta saia límpida. Faz-se, a seguir, lavagem com HCl a 5%, durante cerca de cinco horas, com agitação ocasional. Lava-se, a seguir, com água até completa eliminação do excesso de ácido. A areia lavada e seca pode ser armazenada.

Vermiculita: é um argilomineral 2:1 com capacidade de expansão e con-

tração, que lhe confere elevada plasticidade e pegajosidade. Dependendo da origem, algumas vermiculitas são muito alcalinas. Recomenda-se a lavagem com água corrente por cerca de 8 horas e secagem de 90 a 100°C por 24 horas ou à temperatura ambiente, por cerca de uma semana. Para uso nos vasos a vermiculita deve ser peneirada com malhas entre ASTM nº 20 (1,0 mm) e nº 7 (3,0 mm) e ter o pH corrigido para cerca de 6,5. Para uma boa umidade inicial do substrato, deve-se adicionar, antecipadamente à introdução das sementes, 2,5 ml de solução nutritiva por grama de vermiculita.

Composição do substrato: O substrato deverá ser composto por uma mistura de areia e vermiculita (1:1, v:v).

8. Câmara de crescimento: constitui-se em uma sala asséptica, com refrigeração, controle automático de temperatura; luminosidade de 100 a 1000 lumens fornecida por lâmpadas fluorescentes Gro-Lux e Branca-Fria, controladas, automaticamente, por "timer" para ajuste de fotoperíodo (correspondente a cada cultura). Deve possuir também um sistema automático de manutenção da umidade para 70% e estantes para receber os vasos com os testes dos inoculantes.

Relação de participantes que preencheram a ficha de inscrição da 13^o RELARE

- Adolfo Rugai
ARCA - Adolfo Rugai Cons. Agro.
adolfo.rugai@ajato.com.br
- Aguinaldo Parussolo
MAPA
aguipar@agricultura.gov.br
- Alexandre Jose Catellan
Embrapa Soja
catellan@cnpso.embrapa.br
- Alexandre Tramontini
Cepron
tramontini@centronegocios
- Alfredo Balina
Nitragin
abalina@nitrogin.com.az
- André Floriani Kniphoff
Total Biotecnologia
totalbiotecnologia@totalbiotecnologia.com.br
- Antonio Nelson Ballen
Bioagro
bioagro@terra.com.br
- Antonionelson Joner
Bioagro Ind. Com. de Produtos Agropecuarios Ltda.
bioagro@terra.com.br
- Armando Saretto Parducci
Bioarto
armando.parducci@bcoarts.com.br
- Arnaldo Colozzi
IAPAR
- Cayo Garcia-Blásquez Morote
Stoller do Brasil Ltda.
cayo@stoller.com.br

- Carlos Garcia
Laboratorios Biagro S.A.
cgarcia@biagrosa.com
- Cirlene Aparecida Pescador
MAPA
cirlene@agricultura.gov.br
- Claudio Penna
Nitragin Argentina S.A.
cpenna@nitrgin.com.ar
- Daniel Gorlero
Nitrasoil Argentina S.A.
dgorlero@lageycia.com
- Diva Souza Andrade
IAPAR
diva@iapar.br
- Dora Inês Kozusny-Andreani
Universidade Camilo Castelo Branco – UNICASTELO
doraines@unicastelo.br
- Eli Sidney Lopes
Bio Soja Indústrias Químicas e Biológicas Ltda.
elilopes@biosoja.com.br
- Eliana G. de Macedo Lemos
Univ. Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP
egerle@fcav.br
- Eliane Villamil Bangel
Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária - FEPAGRO
eliane-bangel@fepagro.rs.gov.br
- Elizabeth Druzian Marçal
Marchand Agrícola e Pecuária Ltda.
marchand.agri@terra.com.br
- Emanuel M. de Souza
Universidade Federal do Paraná
souzaem@ufpr.br
- Enrique Moretti
BIAGRO

- directorio@biagrosa.com
- Fábio Luís Mostasso
Embrapa Soja
mostasso@cnpso.embrapa.br
 - Fábio Martins Mercante
Embrapa Agropecuária Oeste
mercante@cpao.embrapa.br
 - Francisco Carlos Krizzizanosvk
Embrapa Soja
fck@cnpso.embrapa.br
 - Francisco Motta Bicca
MAPA/SFA/RS
fbicca@agricultura.gov.br
 - Gustavo Adolfo Masera
Rizobacter do Brasil Ltda.
ribrag@yahoo.com
 - Janaina Rigonato
IAPAR
jana_rigonato@yahoo.com.br
 - Janksyn Bertozzi
IAPAR
jbertozzi@bol.com.br
 - Jerri Édson Zilli
Embrapa Roraima
zilli@cpafrr.embrapa.br
 - João Francisco Berton Junior
Turfal Ind. e Com. de Prod. Biol. e Agron. Ltda.
 - Jonatas Bredow Alves
Rizobacter do Brasil Ltda.
jbredow@pop.com.br
 - Jorge Meyer
Cepron Agro.
jorgemeyer@centronegocios.com.br
 - Jorge Prado
Cepron

- Jorge Roberto Talamini
MAPA
talamini@agricultura.gov.br
- Julio Alberto Campos Joner
Bioagro Indústria Comércio de Produtos Agropecuários Ltda.
jcjoner@yahoo.com.br
- Juscélio Donizete Cardoso
IAPAR
jusceliocardoso@hotmail.com
- Kelly Campos Guerra P. Goes
IAPAR
kellycgp@hotmail.com
- Kennedy Fernandes Martins
MAPA
kennedy@agricultura.gov.br
- Kevin H. Freyburg
Suinocultura Eurotec Ltda.
kevin_hf@terra.com.br
- Leticia Andreguetto Maciel
Sibiottica Indústria e Com. de Prod. Agric.
leguetto@hotmail.com
- Loislan Paes
Nitral Urbana
- Maecelo Kerkhoff
Turfal
marcelo@turfal.agr.br
- Marcelo de Godoy Oliveira
Cepron Agro.
marcelo@centronegócios.com.br
- Marcio de Arruda Queiroz
Ministerio da Agricultura, Pecuaria e Abastecimento
marcioqueiroz@agricultura.gov.br
- Maria Aparecida de Matos
IAPAR
mariadematos@iapar.br

- Maria Candida Bento
Bioarts Indústria e Comércio de Biotecnologia Ltda.
candida.bento@gmail.com
- Maria Elena Munhoz Bambiche
Turbosolo
- Mariangela Hungria
Embrapa Soja
hungria@cnpso.embrapa.br
- Martin Lage
Nitrasoil Argentina S/A
lage@lageycia.com
- Mauricio Jose Candido
Faculdade de Ciencias Agrarias
robson@yahoo.com.br
- Maurício Leon Lefcovich
Cepron
mauricio@centronegocios
- Mauro S. Parra
IAPAR
maurosp@iapar.br
- Orazilia França Dorigo
IAPAR
orazilia@iapar.br
- Oswaldo Machineski
IAPAR
omachine@iapar.br
- Pâmela Menna
Embrapa Soja/UEL
pamela_menna@yahoo.com.br
- Pedro Lage
Nitrasoil Argentina S/A
lage@nitrasoil.com.br
- Poliana Thaíssa Soares
IAPAR
polianathaissa@bol.com.br

- Maria Candida Bento
Bioarts Indústria e Comércio de Biotecnologia Ltda.
candida.bento@gmail.com
- Maria Elena Munhoz Bambiche
Turbosolo
- Mariangela Hungria
Embrapa Soja
hungria@cnpso.embrapa.br
- Martín Lage
Nitrasoil Argentina S/A
lage@lageycia.com
- Mauricio Jose Candido
Faculdade de Ciências Agrárias
robson@yahoo.com.br
- Maurício Leon Lefcovich
Cepron
mauricio@centronegocios
- Mauro S. Parra
IAPAR
maurosp@iapar.br
- Orazilia França Dorigo
IAPAR
orazilia@iapar.br
- Oswaldo Machineski
IAPAR
omachine@iapar.br
- Pâmela Menna
Embrapa Soja/UEL
pamela_menna@yahoo.com.br
- Pedro Lage
Nitrasoil Argentina S/A
lage@nitrasoil.com.br
- Poliana Thaíssa Soares
IAPAR
polianathaissa@bol.com.br

- René Pedro Grando
Microquímica Indústrias Químicas Ltda.
renegrando@pop.com.br
- Ricardo Nobuo Ishida
MAPA
ricardoishida@ig.com.br
- Ricardo Silva Araújo
Katec Agro Técnica Ltda.
rsarsa@gmail.com
- Roberto Berwanger
Microquímica Indústrias Químicas Ltda.
roberto@microquimica.com
- Robson Bergamaschi
Cepron
robsonbergamaschi@yahoo.com.br
- Robson Cavalcante de Lima
Faculdade de Ciências Agrárias/Univ.Camilo Castelo
robson@yahoo.com.br
- Rubens Carlos Buschmann Junior
Turfal Ind. e Com. de Prod. Biol. e Agronômicos Ltda.
turfal@turfal.agr.br
- Rubens José Campo
Embrapa Soja
rjcampo@cnpso.embrapa.br
- Sergio C. Badzinski
Turbosolo
- Sidnéia dos Santos
IAPAR
sidneia_bio@yahoo.com.br
- Solon Cordeiro de Araujo
Stoller do Brasil Ltda.
solon@tmh.com.br
- Sonia Maria Sava Donadello
Total Biotecnologia
totalbiotecnologia@totalbiotecnologia.com.br

- Tânia Teresinha Sava
Total Biotecnologia
totalbiotecnologia@totalbiotecnologia.com.br
- Tássia Stori de Aquino
IAPAR
tas_aquino@hotmail.com
- Vera Lúcia Divan Baldani
Embrapa Agrobiologia
vera@cnpab.embrapa.br
- Veronica Massena Reis
Embrapa Agrobiologia
veronica@cnpab.embrapa.br
- Wladecir Salles de Oliveira
Síntesis Química Saic
wsolivei@gmail.com

Empresas produtoras e/ou comercializados de inoculantes instaladas no Brasil (ordem alfabética) que contribuíram financeiramente para a realização da XIII REALARE realizada em, Londrina, PR, nos dias 02 e 03 de junho de 2006

BIOARTS

Rua Dr. Heitor Pentado, 853 - Taquaral
13075-185 - Campinas, SP
Fone: 19 3213-2301
Contato: www.bioarts.com.br

Centro de Promoções de Negócios - BIAGRO S.A.

Rua Nicolau Maeder, 39 Alto da Glória
80030-330 - Curitiba, PR
Contato: mauricio@centronegocios.com.br

Incobras Com. Imp. e Exportação Ltda.

Caixa Postal 535-195 - Estrada do Cerne PR/090 nº 20681
83 535-000 - Campo Magro, PR
Fone: 41 3677-1203
Contato: www.inocbras.com

Microquímica Indústrias Químicas Ltda.

Rua Eduardo Edargê Badaró, 430, Jd. Eulina
13063-140 - Campinas, SP
Fone: 19 3242-4699 - Fax: 3242-4667
Contato: roberto@microquimica.com

Nitragin - Argentina

Calle 10 y 11
Parque Industrial Pilar
Unidade Postal 1 - B1629MXA Pilar
Prov. de Buenos Aires - Argentina
Fone: 02322-496100 - Fax: 02322-496666
Contato: clientesntg@nitragin.com.ar

Nitral Urbana Laboratórios Ltda.

Rua Rio Piquiri, 650 - Jd. Weissopolis
83322-010 – Pinhais, PR
Fone: 41 3667-3456 - Fax: 3667-1505
Contato: www.nitralurbana.com.br

Rizobacter do Brasil Ltda.

Rodovia Celso Garcia Cid, 6545
86044-290 - Londrina, PR
Fone/Fax: 43 3341-8737
E-mail: rizobacter@rizobacterdobrasil.com.br

Síntesis Química S.A.I.C.

Paraná 755
1017, Buenos Aires - Argentina
Fone: 54 11 4223-0584 - Fax: 4223-6527
E-mail: prodbiolog@sintesisquimica.com.ar

Stoller do Brasil Ltda.

Rod. SP 332 s/n, km 138 - Caixa Postal 55
13150-000 - Cosmópolis, SP
Tel: 19 3872-8288 - Fax: 3872-1200
www.stoller.com.br

Turbosolo Com. e Imp. de Produtos Agrícolas Ltda.

Endereço: Avenida Arthur Thomas 1834 Jardim Delta
86065-000 – Londrina, PR
Fone: 43 3347-3754 - Fax: 3347-3754
E-mail: turbosolo@turbosolo.com.br

Turfal Ind. e Com. de Prod. Biológicos e Agronômicos Ltda.

Endereço: Rua Aristeu Luciano Adamosiki, 12
83 420-000 - Quatro Barras, PR
Fone: 41 3672-1292 - Fax: 3672-1292
E-mail: turfa@turfal.agr.br

Embrapa

Soja

CGPE 6354

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

