

PROTOCOLO OFICIAL PARA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DE CEPAS, INOCULANTES E TECNOLOGIAS RELACIONADOS AO PROCESSO DE FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO EM LEGUMINOSAS.

1. DEFINIÇÕES

Para os fins deste protocolo considera-se:

Inoculante – produto que contenha micro-organismos com atuação favorável ao crescimento de plantas.

Tecnologias – conjunto de procedimentos adotados no uso e aplicação de inoculantes.

Cepas – grupo de micro-organismos com características genéticas idênticas, distinto de outros grupos dentro da mesma espécie.

2. CONDIÇÕES BÁSICAS PARA RECOMENDAÇÃO DE PRODUTOS INOCULANTES E TECNOLOGIAS.

2.1. Apresentação de Relatório Técnico-Científico conclusivo conforme item 4.3.5. O(s) pesquisador(es) coordenador(es) deve(m) necessariamente pertencer a instituição de pesquisa oficial ou credenciada e possuir expertise em microbiologia agrícola.

2.2. Os testes devem contemplar a avaliação de qualidade do produto em laboratório de acordo com os métodos oficiais.

Os ensaios de avaliação de eficiência devem ser conduzidos em casa de vegetação e viveiro ou campo, a depender do modo de ação e da finalidade de uso do inoculantes. Quando as avaliações dos produtos forem realizadas apenas em casa de vegetação ou viveiro, os ensaios deverão ser conduzidos por pelo menos quatro vezes, com o emprego de diferentes cultivares, quando aplicável.

As avaliações de campo deverão ser conduzidas em, pelo menos, dois locais em condições edafoclimáticas distintas, tecnicamente adequadas à cultura, por no mínimo duas safras agrícolas ou, pelo menos em quatro locais em condições edafoclimáticas distintas tecnicamente adequadas à cultura em questão em uma única safra. Deve ser dada prioridade à condução dos experimentos em locais representativos da cultura.

Os ensaios que forem implantados mas não puderem ser colhidos por questões que fujam ao controle dos envolvidos com a pesquisa não serão considerados na totalização de ensaios realizados.

A critério do MAPA poderão ser exigidos ensaios de campo para comprovação de eficiência de novas tecnologias de inoculação.

Eventuais desvios do protocolo mínimo aqui apresentado deverão ser justificados tecnicamente no Relatório Técnico-Científico conclusivo (item 4.3.5).

3. CONDIÇÕES BÁSICAS PARA RECOMENDAÇÃO DE NOVAS CEPAS.

Apresentação de Relatório Técnico-Científico conclusivo, conforme item 4.3.5, que atenda a todos os requisitos especificados para avaliação de cepas.

4. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DE CEPAS, INOCULANTES E TECNOLOGIAS DE INOCULAÇÃO.

A metodologia aqui descrita é própria para soja, feijão, caupi e outras leguminosas, com as devidas adaptações técnicas e metodológicas para cada cultura como, por exemplo, exigência climática, espaçamento, época de plantio, cultivar recomendada, adubação e calagem.

4.1. Testes de Laboratório

Cepas: As cepas apresentadas para oficialização deverão ser identificadas geneticamente e caracterizadas morfofisiologicamente.

Produtos: Os produtos formulados utilizados nos testes deverão ser caracterizados em laboratório quanto à identidade, pureza e concentração de microrganismos, conforme métodos oficiais.

Tecnologias: Na avaliação de novas tecnologias que envolvam a exposição das células a condições estressantes deverá ser conduzido ensaio laboratorial de sobrevivência de células sobre sementes, de acordo com método oficial. Os tratamentos que reproduzam condições estressantes como pré-inoculação ou exposição do inoculante a agentes daninhos às células deverão ser comparados com o tratamento controle. O tratamento controle deverá reproduzir a recomendação técnica, ou seja, determinação da sobrevivência do micro-organismo no mesmo dia da inoculação, sendo as bactérias protegidas dos fatores estressantes.

4.2. Ensaio em Casa de Vegetação

Os ensaios em casa de vegetação devem ser conduzidos na avaliação de cepas e de produtos que se destinam ao uso em ambiente protegido.

A apresentação de resultados de avaliação em casa de vegetação de outros produtos inoculantes e de tecnologias é opcional.

4.2.1. Tratamentos

1. Tratamento sem inoculação;
2. Tratamento sem inoculação, com N na concentração recomendada para a cultura*
3. Tratamentos com inoculação de cepas já recomendadas para a cultura, testadas separadamente, quando existentes;
4. Tratamentos com inoculação das cepas a serem testadas separadamente.

* O nitrogênio deverá ser parcelado semanalmente.

Exemplos de requerimento do nutriente por planta: Soja: 700mg; Feijão e Caupi: 350mg

4.2.2. Estágios de avaliação: as cepas ou produtos devem ser avaliados em vasos de Leonard e vasos com solo, com no mínimo quatro repetições para cada tratamento, conforme descrito:

4.2.2.1. Vasos de Leonard ou sistemas semelhantes que permitam o cultivo sob condições de substratos estéreis: Colocar sementes desinfestadas e ou plântulas em vasos Leonard autoclavados preenchidos com um substrato e solução nutritiva de Norris ¹, ou solução equivalente. Inocular conforme os objetivos de cada estudo.

4.2.2.2. Vasos com solo: Plantar as sementes desinfestadas em vasos com solo, preferencialmente livre ou com baixas populações de rizóbios e baixo teor de nitrogênio. Em solos com teores elevados de matéria orgânica adicionar palha de arroz ou milho na proporção de 1 a 3 gramas de palha por quilograma de solo seco, ou realizar outro procedimento para imobilização do N de fonte orgânica. Inocular conforme os objetivos de cada estudo.

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

4.2.3. Parâmetros mínimos a serem avaliados:

Especificamente para seleção de cepas deve-se avaliar o número e a massa de nódulos secos (g/planta ou vaso). Na seleção de cepa e na avaliação de inoculantes devem também ser avaliados a massa seca da parte aérea (g/planta) de plantas cortadas no ponto de inserção dos cotilédones e nitrogênio total na massa seca (mg de N/planta). A eficiência nodular (mg de N da massa seca de planta/mg de nódulos secos) pode ser calculada a partir dos parâmetros determinados. Opcionalmente pode ser medido o teor de clorofila nas folhas.

Aos 35-40 dias após emergência fazer o corte das plantas e separar as raízes da parte aérea no ponto de inserção dos cotilédones. Separar os nódulos das raízes, contar, secar em estufa a 65° até atingir massa constante, apresentado o resultado em g/planta ou vaso. Secar a parte aérea das plantas, como descrito anteriormente, pesar, moer e determinar os teores de N na massa seca. Apresentar os resultados da massa seca das plantas em g/planta ou vaso, N total na massa seca em mg de N/planta. De posse dos parâmetros N total na massa seca (mg) e massa seca de nódulos (mg) determinar a eficiência nodular que é igual a mg de N total da massa seca dividido por mg de nódulos secos.

4.3. Ensaio no Campo

A área a ser utilizada para instalação do experimento deve ser preparada e ter suas características químicas e físicas determinadas. Se possível fazer análise foliar da cultura anterior para facilitar a adubação com os macro e micronutrientes necessários.

O solo a ser utilizado não deverá apresentar população estabelecida do rizóbio em estudo. Na impossibilidade de atendimento deste requisito a população deverá ser quantificada e incluída no relatório técnico-científico.

Os experimentos deverão ser delineados a campo em blocos ao acaso com no mínimo quatro repetições. A semeadura das parcelas deverá ser feita de forma a evitar contaminação entre as parcelas experimentais. As parcelas experimentais deverão ter uma dimensão que possibilite uma área útil experimental suficientemente representativa. No caso específico da soja e feijão as parcelas deverão ter tamanho mínimo de 24,0 e 10 m², área útil mínima de 6,0 e 4,0 m², respectivamente, observados distância mínima entre parcelas de um metro para evitar contaminações. Sugere-se para soja: parcelas de 4 x 6 m (oito linhas espaçadas de 0,5 m) colhendo as 4 linhas centrais ou 5 x 5 m (dez linhas espaçadas 0,5 m) colhendo as seis linhas centrais, deixando sempre um metro de bordadura nas cabeceiras.

4.3.1. Tratamentos:

O experimento de campo deverá conter, no mínimo, os seguintes tratamentos:

Tratamento 1. Ausência de fertilizante nitrogenado e de inoculação;

Tratamento 2. Controle com N-mineral;

Tratamento 3. Inoculação padrão com inoculante turfoso contendo ao menos uma das cepas recomendadas para a cultura, quando existente.

Tratamento 4. Demais tratamentos a serem testados – seguir a recomendação técnica do proponente.

Observações:

Tratamento 2. As seguintes doses e formas de aplicação de nitrogênio são recomendadas:

Soja - 200 kg de N/ha, sendo 50% na semeadura e 50% na floração ou aos 35 dias após emergência, por ocasião da coleta de plantas;

Feijão - 80 kg de N/ha, sendo 20 kg no plantio e 60 kg aos 20-25 dias após emergência;

Caupi - 70 kg de N/ha, sendo 35 kg no plantio e 35 kg aos 20-25 dias após emergência;

Tratamento 3. 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 acordo com a recomendação técnica (em número de UFC por semente) de um inoculante turfoso com população mínima legalmente estabelecida. O cálculo do número de células por semente deve tomar por base que um kg de semente de soja tem 7000 sementes e um kg de feijão ou de caupi tem 5000 sementes. Para outras espécies, considerar o número de sementes por quilograma. As sementes inoculadas devem secar em local fresco e arejado e a semeadura deve ser feita imediatamente após a secagem, em período não superior a duas horas. Como a maioria dos produtos químicos pode ser tóxica quando em contato direto com a bactéria, os insumos usados para tratamento de sementes (micronutrientes, fungicidas e inseticidas) devem ser evitados ou, se utilizados, não devem ter contato direto com o inoculante. 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 cultura e região.

Recomendação Geral: Sempre usar a mesma população de células para a inoculação padrão e para os inoculantes ou cepas em teste. No caso de inoculantes líquidos, o total de líquido a ser aplicado nas sementes não deve ultrapassar 300 ml por 50 kg de sementes.

4.3.2. Parâmetros mínimos a serem avaliados a campo:

4.3.2.1. Caracterização química e física do solo

Devem ser realizadas as análises químicas necessárias à verificação do requerimento de adubação. A classificação do solo e sua classe textural deverão ser informadas.

4.3.2.2. População de rizóbio

O solo da área experimental deverá ter a população de rizóbios determinada.

4.3.2.3. Nodulação

Coletar cinco plantas com as raízes intactas, da área central da segunda linha de cada parcela, imediatamente antes da floração (no caso da soja aos 30 - 35 dias após emergência). Apresentar resultados para número de nódulos por planta (nº/planta) e massa de nódulos seca por planta (mg/planta).

4.3.2.4. A avaliação da biomassa e nitrogênio total da parte aérea das plantas

Deve ser feita por ocasião da coleta de nódulos.

4.3.2.5. Rendimento de Grãos

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

4.3.2.6. Demais parâmetros

Culturas florestais: Produção de biomassa de plantas (parte aérea e/ou raízes), conforme especificação da cultura, altura de plantas, diâmetro de caule, sobrevivência das mudas e concentração do(s) nutriente(s).

Forrageiras: Produção de biomassa de plantas (parte aérea e/ou raízes), conforme especificação da cultura, altura de plantas, concentração do(s) nutriente(s) em estudo.

4.3.3. 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 por um teste de média adequado, também ao nível de 5% de significância. Se o teste de “F” não for significativa a 5% mas apresentar significância a 10%, as médias dos tratamentos deverão ser comparadas pelo teste de média, também ao nível de 10% de significância.

4.3.4. Interpretação dos Resultados

Para recomendação de inoculantes e/ou outras tecnologias, estes devem apresentar resposta igual ou superior à inoculação padrão e/ou às tecnologias já recomendadas,

respectivamente, e superior ao controle sem inoculação nos quatro ensaios. Para recomendação de nova cepa, esta deve apresentar resposta igual ou superior a pelo menos uma cepa já recomendada para a mesma cultura, e superior ao controle sem inoculação nos quatro ensaios. No caso da condução de um maior número de experimentos, o número de casos positivos deve representar pelo menos 70% do total.

A produtividade mínima a ser considerada para que o resultado do experimento seja considerado válido deve ser de 2000 kg/ha para soja, de 1000 kg/ha para feijão e de 500kg/ha para Caupi,.

4.3.5. Relatório Técnico-Científico

O relatório técnico-científico deve ser redigido em língua portuguesa, em papel timbrado da instituição e seguir as orientações deste protocolo contendo: revisão bibliográfica enfatizando o objetivo do trabalho, descrição completa da metodologia, resultados obtidos e conclusão clara sobre a eficiência e recomendação do produto ou tecnologia testada, assim como a(s) assinatura (s) do(s) pesquisador(es) responsável(is). Análise dos custos variáveis entre os controles e o produto ou a tecnologia testada poderá ser incluída, a critério da requerente.

¹NORRIS, D.O., DATE, R.A. 1976. Legume bacteriology. In: SHAW, N.H., BRYAN, W.W. (Eds.) Tropical pasture research - principles and methods. Brisbane: CAB. p.134-173.

Protocolo elaborado com base no “Protocolo para análise da qualidade e da eficiência agrônômica de inoculantes, cepas e outras tecnologias relacionada ao processo de fixação biológica do nitrogênio em leguminosas” descrito nos Anais da 13ª Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE). Londrina: EMBRAPA SOJA, 2007. 212 p. – (Documento/Embrapa Soja, n.290).