

SOBREVIVÊNCIA DE ESTIRPES DE *RHIZOBIUM JAPONICUM* NA SUPERFÍCIE DE SEMENTES DE SOJA INOCULADAS¹

JOSÉ ROBERTO R. PERES, ALLERT ROSA SUHET e MILTON A.T. VARGAS²

RESUMO - Objetivou-se neste trabalho estudar a possibilidade de recomendar a inoculação da soja com *Rhizobium* antes do plantio. Para isto, avaliou-se o efeito de formas de inoculação (água, solução de sacarose 25% e óleo diesel como adesivos) e do período de armazenamento (0, 1, 2, 4, 6 e 8 dias) na sobrevivência do rizóbio na superfície da semente inoculada. Foram conduzidos 4 experimentos: dois em casa de vegetação e dois no campo, em Latossolos Vermelho-Escuro e Vermelho-Amarelo, no Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, da EMBRAPA. De modo geral, não houve efeito do período de armazenagem na sobrevivência do rizóbio. Nos experimentos de casa de vegetação, a nodulação nos tratamentos com sacarose e água, mesmo no tempo zero de armazenamento, foi significativamente superior ao tratamento com óleo diesel. No tratamento com água, apesar de ter sido obtida uma boa nodulação, esta foi inferior à dos tratamentos com sacarose. Em condições de campo, foram confirmados os resultados de casa de vegetação, evidenciando a possibilidade de se estocar, à temperatura ambiente, sementes de soja inoculadas, isto é, revestidas com inoculante, por um período de até quatro dias, sem prejuízo para nodulação e produção de grãos.

Termos para indexação: fixação de nitrogênio, inoculação.

THE SURVIVAL OF *RHIZOBIUM JAPONICUM* ON THE SURFACE OF INOCULATED SOYBEAN SEED

ABSTRACT - The objective of this work was to study the possibility of recommending inoculation of soybean seeds before the planting time. For this purpose, the effect of inoculum formulation (water, sucrose solution (25%) and diesel oil as binders) and storage time (0, 1, 2, 4, 6 and 8 days) on the survival of *Rhizobium* on the surface of inoculated soybean seed was evaluated. Four experiments were carried out: two in the glasshouse and two in the field in Dark-Red and Yellow-Red Latossols at the Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados (CPAC) of EMBRAPA. In general, storage time did not affect *Rhizobium* survival. However, in the glasshouse experiments, nodulation in treatments with sucrose and water even with no storage period, were significantly greater than treatments with diesel oil. Although good nodulation was obtained with water alone, it was poorer than with sucrose. Results obtained under field conditions confirmed those from the glasshouse, indicating that if kept at an ambient temperature, inoculated soybean seeds can be stored for up to four days without affecting nodulation or grain production.

Index terms: nitrogen fixation, seed inoculation.

INTRODUÇÃO

Um dos problemas dos agricultores que cultivam a soja em grandes áreas é a dificuldade de se inocular - ou seja: revestir com inoculante - as sementes no mesmo dia do plantio. Tentativas de produzir industrialmente sementes pré-inoculadas não tiveram muito sucesso nos Estados Unidos (Erdman 1961, Date & Decker 1962, Schall et al. 1972) e na Austrália (Brockwell et al. 1975). Este processo envolve a produção em grande esca-

la de sementes inoculadas e peletizadas, que são armazenadas por algum tempo em condições ambientais na própria indústria e nos locais de venda.

Brockwell et al. (1975), em estudo efetuado com sementes pré-inoculadas na Austrália, observaram que quase todos os lotes coletados continham uma população de *Rhizobium* bem abaixo dos limites legais do País. Concluíram que o baixo número de *Rhizobium* observado nas sementes, foi devido a algum efeito letal surgido durante a fase de pré-inoculação e não a problemas de armazenagem por longos períodos em condições ambientais. Por outro lado, algumas firmas comerciais da Austrália, que efetuam a inoculação das sementes, apenas alguns dias antes de sua utilização pelo agricultor, têm obtido bons resultados. O sucesso de

¹ Aceito para publicação em 9 de dezembro de 1985.

² Eng. - Agr., M.Sc., EMBRAPA/Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados (CPAC), Caixa Postal 70.0023, CEP 73300 Planaltina, DF.

tal método tem sido particularmente notável com sementes de leguminosas forrageiras, onde esse processo vem sendo utilizado por mais de dez anos (Brockwell et al. 1975).

Para as nossas condições, a inoculação de sementes com maior antecedência à semeadura pode facilitar muito o processo da inoculação. No entanto, há escassez de dados quanto à sobrevivência do *R. japonicum* na superfície da semente de soja.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito da forma de inoculação e do período de armazenagem na sobrevivência do *Rhizobium* na superfície da semente, medido pela nodulação e rendimento da soja.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos quatro experimentos no Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados (CPAC), Brasília, DF: um num Latossolo Vermelho-Escuro (LE), dois num Latossolo Vermelho-Amarelo (LV), cujas características químicas se encontram na Tabela 1, e um em areia e solução nutritiva.

Os inoculantes para os experimentos foram preparados com as estirpes de *Rhizobium japonicum* 5019 (29W, isolada na UAPNBS/EMBRAPA) e 587 (isolada no IPAGRO/Secretaria da Agricultura do Estado do Rio Grande do Sul, isolamento 107/53). Estas estirpes foram deixadas crescer em meio de cultura líquido manitol - extrato de levedura. Em seguida foram misturadas com turfa estéril, com pH próximo da neutralidade, até atingir uma umidade ao redor de 40%. A análise dos inoculantes revelou uma população de *R. japonicum* acima de 10^8 células/g, pela contagem em placas contendo meio sólido e pelo processo de infecção de plantas (Vincent 1970).

Experimento 1

Este experimento foi conduzido em casa de vegetação com um LV distrófico, textura argilosa, o qual foi secado à sombra, peneirado e corrigido para pH 5,5. Foi utilizado vaso com capacidade para 2,7 kg de solo e feita uma adubação básica de 200 ppm de P (superfosfato simples), 150 ppm de K (cloreto de potássio), 2 ppm de Zn ($ZnSO_4$), 0,2 ppm de Mo [$(NH_4)_6(Mo_7O_{24}) \cdot 4H_2O$] e 0,5 ppm de B [$(Na_2B_4O_7) \cdot 10H_2O$].

O delineamento experimental usado foi o de blocos ao acaso com três repetições. Foram testadas três formas de inoculação, utilizando-se água, solução de sacarose a 25% e óleo diesel, para preparar a pasta de inoculante. Para cada forma de inoculação foram testados os períodos de zero, um, dois, quatro e oito dias de armazenamento das sementes inoculadas. Estas sementes foram armazenadas a granel, em condições ambientais. Foram usadas três plantas, por vaso, das variedades IAC-2, Doko e Cristalina.

As plantas foram colhidas na floração para a avaliação do número de nódulos. A população de *R. japonicum* na superfície da semente foi estimada pelo método da diluição e infecção em plantas (NMP) descrito por Weaver & Frederick (1972).

Experimento 2

Este experimento foi conduzido em condições de campo num LE distrófico, textura argilosa. O preparo do solo incluiu as seguintes operações: aração, gradagem, catação manual de restos vegetais, calagem (4 t de calcário dolomítico/ha, PRNT = 100%), adubação corretiva a lanço (240 kg/ha de P_2O_5 , 100 kg/ha de K_2O e 40 kg/ha de FTE, nas formas de superfosfato simples, cloreto de potássio e BR 12, respectivamente), uma passagem do rotovalor, sulcagem mecânica e adubação no sulco com 60 kg/ha de P_2O_5 e 30 kg/ha de K_2O .

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com três repetições. Foi utilizada a cultivar de soja IAC-2. Foram testadas duas formas de inoculação, utilizando-se água e solução de sacarose a 25%, para o preparo da pasta de inoculante. Para cada forma de inoculação foram testados os períodos de zero, dois, quatro e oito dias de armazenagem das sementes inoculadas.

A semeadura foi feita manualmente, num espaçamento de 50 cm entre sulcos, deixando-se 30 plantas por metro linear. As parcelas mediram 7 m de comprimento por 3 m de largura. Foi avaliado o número de nódulos por planta, coletando-se seis plantas por parcela na época da floração. Para avaliação do peso de grãos foi colhida uma área de 6 m² em cada parcela.

Experimento 3

Este experimento foi conduzido em condições de campo, num LV argiloso distrófico. No preparo do solo incluíram-se as seguintes operações: roçagem e rastelagem mecânicas, aração, catação de restos vegetais, gradagem com grade pesada, calagem (3 t de calcário dolomítico/ha, PRNT = 100%), adubação corretiva a lanço (300 kg/ha de P_2O_5 e 100 kg/ha de K_2O nas formas de superfosfato simples e cloreto de potássio, respectivamente), incorporação dos adubos com rotovalor, sulcagem mecânica e adubação no sulco com 60 kg/ha de P_2O_5 (superfosfato simples), 50 kg/ha de K_2O (cloreto de potássio) e 20 kg/ha de FTE (BR 12).

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições. Foi utilizada a cultivar IAC-2. Foram testados os períodos de zero, um, dois, quatro e oito dias de armazenagem das sementes inoculadas, usando-se solução de sacarose a 25% para o preparo da pasta de inoculante.

A semeadura foi feita manualmente, num espaçamento de 50 cm entrelinhas, deixando-se 30 plantas por metro. As parcelas mediram 4 m de largura por 7 m de comprimento.

TABELA 1. Características químicas dos solos.

Solo	pH H ₂ O	Al ³⁺ (meq/100 g)	Ca ⁺⁺ + Mg ⁺⁺ (meq/100 g)	P ppm	K ppm
Latossolo Vermelho-Amarelo	5,0	0,27	0,12	0,6	19
Latossolo Vermelho-Escuro	4,5	1,0	0,50	0,5	28

Para avaliação do peso e número de nódulos foram colhidas seis plantas por parcela na época da floração. Para avaliação do peso de grãos, foi colhida uma área de 12 m² por parcela.

Experimento 4

Este experimento foi conduzido em casa de vegetação em areia e solução nutritiva (Norris 1964), com a cultivar IAC-2, utilizando-se os mesmos tratamentos do experimento 3. Neste caso, porém, foram utilizadas sementes tratadas com Rhodiuram, na dosagem de 300 g do produto por 100 kg de sementes. Na época da floração foi avaliado o número de nódulos por planta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Fig. 1 mostra os resultados do experimento 1, conduzido em casa de vegetação. Como o comportamento das cultivares (IAC-2, Cristalina e Doko) foi o mesmo em função dos tratamentos aplicados, estão apresentadas as médias do número de nódulos das três cultivares. Como pode ser observado, a nodulação nos tratamentos com sacarose e água foi significativamente superior à observada no tratamento com óleo diesel, mesmo quando as sementes não foram armazenadas. No tratamento em que se fez a inoculação com água, apesar de se ter obtido uma boa nodulação, esta foi inferior à do tratamento com sacarose. Nesse tratamento, o número de nódulos aumentou com o tempo de armazenamento, chegando a 70 nódulos por planta. Burton (1976) mostra a superioridade da mistura inoculante-solução de sacarose em relação ao inoculante com água, na sobrevivência do *Rhizobium* na superfície das sementes. Este autor evidencia que, entre outros efeitos, os açúcares possibilitam a aderência de maior número de células de *Rhizobium* às sementes.

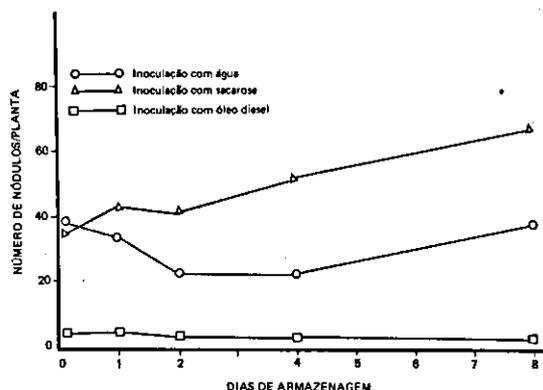


FIG. 1. Efeito de formas de inoculação e do período de armazenagem no número de nódulos da soja (média das variedades IAC-2, Doko e Cristalina), plantada em vaso, num LV de cerrado.

Neste trabalho, o número de células/semente, determinado através do número mais provável por inoculação em planta, foi de 10⁵, 10⁴ e 10³ para sacarose, água e óleo diesel, respectivamente. De acordo com Burton & Curley (1965), para se obter uma ótima nodulação da soja cultivada em solos com boa umidade foram necessários 2 x 10⁵ células/semente. Por outro lado, Peres & Vidor (1980) sugerem que, do ponto de vista prático, não se pode generalizar um número ótimo de células para inoculação, sendo necessário ter informação mais precisa sobre os fatores do solo que influenciam a simbiose.

Em condições de campo, trabalhando-se com um solo LE, houve uma diminuição no número de nódulos nos tratamentos com oito dias de armazenagem (Tabela 2). Esta redução foi mais pronunciada quando se utilizou água, com reflexo negativo na produção de grãos, apesar de não ter sido estatisticamente significativa. Pode-se verificar, no

entanto, que não houve efeito da armazenagem até os quatro dias nas duas formas de inoculação.

Com a finalidade de confirmar os resultados do experimento anterior, foi conduzido outro experimento num LV, cujos resultados se encontram na Tabela 3. Como pode ser observado, não houve efeito significativo dos períodos de armazenagem na nodulação e nem na produção de grãos. As diferenças observadas, tanto na nodulação como na produção, em relação ao experimento anterior (Tabela 2), são atribuídas às diferenças entre os solos e ao ano agrícola.

Tendo em vista o uso crescente de defensivos para o tratamento de semente, foi conduzido mais um experimento, em casa de vegetação, em que foram utilizadas sementes tratadas com Rhodiu-

ram, fungicida largamente utilizado na região dos cerrados. Na Tabela 4 estão apresentados os dados de nodulação deste experimento. Não se verificou efeito letal do fungicida sobre o *Rhizobium*, e não houve efeito do período de armazenagem na sua sobrevivência, medida pelo número de nódulos por planta. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Curley & Burton (1975), que observaram que o tratamento de semente de soja com este mesmo fungicida não afetou a população de *R. japonicum* na superfície das sementes.

Em todos os experimentos conduzidos, a utilização da solução de sacarose na inoculação não apresentou nenhum efeito negativo na germinação e nem favoreceu a incidência de doenças fúngicas nas sementes. As plântulas apresentaram desenvolvimento normal.

TABELA 2. Efeito da forma de inoculação e do período de armazenagem no número de nódulos e na produção da soja IAC-2, cultivada num solo LE argiloso de cerrado.

Tratamento	Dias de armazenagem	Número de nódulos/planta	Peso do grão (kg/ha)
Inoculação com água	0	38 ab ¹	2.124 a
	2	59 ab	2.048 a
	4	43 ab	2.010 a
	8	6 c	1.793 a
Inoculação com sacarose	0	63 a	2.230 a
	2	64 a	2.194 a
	4	66 a	2.255 a
	8	27 bc	2.182 a

¹ Os números seguidos pela mesma letra não diferenciam estatisticamente entre si pelo teste de Duncan a 5%.

TABELA 3. Efeito do período de armazenagem de sementes de soja (IAC-2) inoculadas, na nodulação e produção da soja cultivada num LV de Cerrado.

Tratamento	Peso de grãos (kg/ha)	Nodulação/planta	
		Peso (mg)	Número
Dias de armazenagem			
0	1.828 a	725 a	104 a
1	1.742 a	677 a	87 a
2	1.810 a	574 a	85 a
4	1.838 a	704 a	86 a
6	1.723 a	530 a	70 a
8	1.841 a	672 a	67 a

Obs.: A inoculação foi feita usando-se uma solução de sacarose (25%) e as estirpes de *R. japonicum* 29W e 587.

TABELA 4. Efeito do período de armazenagem de semente de soja (IAC-2), inoculada e tratada com Rhodiuram, na nodulação da soja cultivada em areia e solução nutritiva em casa de vegetação.

Tratamento	Número de nódulos/planta
Dias de armazenagem	
0	60 a ¹
1	52 a
2	45 a
4	57 a
6	50 a
8	55 a

¹ Os números seguidos pela mesma letra não se diferenciam estatisticamente entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Obs.: A inoculação foi feita usando-se uma solução de sacarose (25%) e as estirpes de *R. japonicum* 29W e 587.

CONCLUSÕES

1. Usando-se solução de sacarose a 25% para preparar a pasta de inoculante, é possível estocar a semente de soja inoculada, à temperatura ambiente, por um período de até quatro dias, sem prejuízos para a nodulação e para a produção de grãos.

2. O tratamento de semente com o fungicida Rhodiuram, na dosagem de 300 g do produto por 100 kg de semente de soja não tem efeito letal sobre o *Rhizobium japonicum*.

3. O óleo diesel não deve ser empregado para o preparo da pasta de inoculante.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos técnicos de Laboratório Ademildo Santos da Silva e Vilderete de Cas-

tro Alves, ao Auxiliar de Laboratório Emílio Taveira e ao Técnico Agrícola Osmar Teago, pelo valioso auxílio na instalação e condução dos experimentos.

REFERÊNCIAS

- BROCKWELL, J.; HERRIDGE, D.F.; ROUGHLEY, R.F.; THOMPSON, F.A. & GAULT, R.R. Examination of preinoculated seed. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.*, 15(77):780-7, 1975.
- BURTON, J.C. Methods of inoculating seeds and their effect on survival of rhizobia. In: NUTMAN, P.S., ed. *Symbiotic nitrogen fixation in plants*. Cambridge, G.B., Cambridge Univ. Press, 1976. p. 175-89.
- BURTON, J.C. & CURLEY, R.L. Comparative efficiency of liquid and peat-base inoculants on field grown soybeans (*Glycine max*). *Agron. J.*, 57:379-81, 1965.
- CURLEY, R.L. & BURTON, J.C. Compatibility of *Rhizobium japonicum* with chemical seed protectants. *Agron. J.*, 67:807-8, 1975.
- DATE, R.A. & DECKER, A.M. Vacuum preinoculation only partly effective. *Crops Soils*, 14(9):22-4, 1962.
- ERDMAN, L.W. The future of preinoculated seed. *Seed World*, 8:5-12, 1961.
- NORRIS, D.O. Techniques used in works with *Rhizobium*. In: SOME concepts and methods in subtropical pasture research. Berkshire, Commonw. Bur. Pastures Field Crops, 1964. p.186. (Bulletin, 47)
- PERES, J.R.R. & VIDOR, C. Relação entre concentração de células no inoculante e competição por sítios de infecção nodular entre estirpes de *Rhizobium japonicum* em soja. *R. bras. Ci. Solo*, 4:139-43, 1980.
- SCHALL, E.D.; SHENBERGER, L.C. & SWOPE, A. Inspection of legume inoculants and preinoculated seeds. s.l., Purdue Univ., 1972. (Insp. Rep. Indiana Agric. Exp. Stn., 92)
- VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Oxford, Blackwell Scientific, 1970. 164p.
- WEAVER, R.W. & FREDERICK, L.R. A new technique for most-probable number counts of *Rhizobium*. *Plant Soil*, 36:219-22, 1972.