

## A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro



ISSN 1516-781X

Junho, 2007

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

## ***Documentos 283***

# **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**

Mariangela Hungria  
Rubens José Campo  
Iêda Carvalho Mendes

Embrapa Soja  
Londrina, PR  
2007

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 Dinali 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*

Fotos da capa: *Superiores: Danilo Estevão; inferiores: Fundação MT/PMA*

### **1ª edição**

1ª impressão (2007): tiragem 7000 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**

Hungria, Mariangela

A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro / Mariangela Hungria, Rubens José Campo, Iêda Carvalho Mendes. – Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados, 2007.

80p. -- (Documentos/Embrapa Soja, ISSN 1516-781X; n.283)

1.Fixação de nitrogênio - Soja. I.Campo, Rubens José. II.Mendes, Iêda Carvalho Mendes. Título. III.Série.

**CDD 572.545**

## ***Autores***

### **Mariangela Hungria**

Engenheira Agrônoma, Dra.  
Embrapa Soja  
Cx. Postal, 231  
86.001-970, Londrina, PR  
hungria@cnpso.embrapa.br

### **Rubens José Campo**

Engenheiro Agrônomo, Dr.  
Embrapa Soja  
Cx. Postal, 231  
86.001-970, Londrina, PR  
rjcampo@cnpso.embrapa.br

### **Iêda Carvalho Mendes**

Engenheira Agrônoma, Dra.  
Embrapa Cerrados  
Cx. Postal 08223  
73.310-970, Planaltina, DF  
mendesi@cpac.embrapa.br



## ***Apresentação***

A cultura da soja, no Brasil, seria inviabilizada economicamente se os produtores tivessem que aplicar todo o nitrogênio necessário para suprir as demandas da planta. Contudo, bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, que se associam ao sistema radicular da soja, estabelecem uma importante simbiose, capaz de suprir a soja em nitrogênio. A visão dos pesquisadores brasileiros em estabelecer um processo contínuo de seleção de estirpes de *Bradyrhizobium*, de cultivares com boa capacidade simbiótica, de novas tecnologias de inoculação e de mecanismos para melhoria da qualidade dos inoculantes resultou na independência da cultura da soja em fertilizantes nitrogenados. Em consequência, o processo de fixação biológica do nitrogênio representa um componente essencial para a viabilidade econômica da cultura da soja no Brasil.

A presente publicação, “**A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**”, representa uma versão atualizada e ampliada das Circulares Técnicas 35 (Embrapa Soja) e 13 (Embrapa Cerrados) sobre “A fixação biológica do nitrogênio com a cultura da soja”. Nesta nova versão, a Embrapa Soja e a Embrapa Cerrados apresentam, aos pesquisadores, à assistência técnica, aos professores, aos estudantes e aos produtores de soja, resultados de pesquisas que vêm sendo conduzidas para maximizar o processo de fixação biológica do nitrogênio com a cultura da soja. Espera-se, com a divulgação destes resultados, a difusão de uma tecnologia simples, mas altamente benéfica ao agricultor, uma vez que pode aumentar a produtividade a um baixo custo, além de preservar a qualidade do solo e das águas na propriedade.

### ***Alexandre José Cattelan***

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento  
Embrapa Soja

### ***José de Ribamar Nazareno dos Anjos***

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento  
Embrapa Cerrados



## Sumário

<b>Resumo</b> .....	11
<b>Abstract</b> .....	13
1 Qual a importância da fixação biológica do nitrogênio para o Brasil e para o planeta? .....	15
2 De modo sucinto, como ocorre o processo de fixação biológica do nitrogênio com a soja? .....	18
3 De quanto nitrogênio a cultura da soja precisa para atingir altos rendimentos? .....	20
4 Quando e por quanto tempo a soja consegue fixar N <sub>2</sub> ? .....	20
5 É necessário colocar uma dose inicial de fertilizante nitrogenado para suprimir sintomas de clorose? .....	24
6 A aplicação de fertilizante nitrogenado em outros estádios do crescimento da soja é necessária para a obtenção de altos rendimentos? .....	25
7 Por que é necessário inocular a soja em solos de primeiro cultivo? .....	28
8 Áreas que estavam sob pastagens, com cana-de-açúcar, ou com outras culturas, há vários anos, podem ser consideradas como de primeiro cultivo? .....	30
9 Em áreas tradicionalmente cultivadas, vale a pena reinocular? .....	32
10 Em uma área de cultivo recente, em que foi feito um trabalho cuidadoso de inoculação, ainda assim vale a pena reinocular? .....	35
11 Ganhos de rendimento pela reinoculação também ocorrem em solos sob o sistema de plantio direto? .....	35
12 Os incrementos no rendimento obtidos pela reinoculação compensam financeiramente? .....	37

13	A demanda elevada da soja por N pode causar um balanço negativo desse nutriente para a próxima cultura? .....	39
14	A soja transgênica também se beneficia da fixação biológica do nitrogênio? .....	41
15	Como deve ser o inoculante para a soja? .....	42
	Quais bactérias devem estar no inoculante? .....	43
	E o número de células, é importante? .....	44
	Como fazer o cálculo teórico do número de células de <i>Bradyrhizobium</i> por semente? .....	47
	Como saber se o número de células do inoculante é adequado? .....	48
	Quais as vantagens do inoculante turfoso e em que dose ele deve ser usado? .....	48
	É importante usar uma substância adesiva para o inoculante turfoso? .....	50
	Os inoculantes líquidos são tão eficazes quanto os turfosos? .....	50
	Que cuidados tomar na hora da compra do inoculante? .....	52
16	Como deve ser feita a inoculação das sementes? .....	53
	Inoculante turfoso e tambor rotatório, sem ou com fungicidas e os micronutrientes Co e Mo .....	53
	Inoculante turfoso e máquina de tratamento de sementes .....	55
	Inoculantes líquidos .....	56
	Qual o volume de água recomendado no caso de fungicidas e micronutrientes líquidos? .....	57
17	No campo, quais os principais fatores limitantes à fixação biológica do N <sub>2</sub> ? .....	58
	Fatores ambientais .....	58
	Fatores nutricionais .....	58
	Tratamento de sementes com fungicidas e inseticidas .....	60
18	Como compatibilizar o tratamento de fungicidas com a inoculação? .....	64

É possível deixar de usar o fungicida nas sementes para evitar prejudicar a fixação biológica do nitrogênio? .....	64
Se for necessário tratar as sementes com fungicidas, existe alguma alternativa para diminuir os efeitos prejudiciais ao <i>Bradyrhizobium</i> ? .....	65
19 Superando problemas nutricionais: como realizar a adubação com molibdênio e cobalto sem prejudicar a fixação biológica do N <sub>2</sub> ? .....	66
Adição de cobalto e molibdênio às sementes .....	66
E surgiram problemas pela aplicação de micronutrientes nas sementes? .....	68
Quais as alternativas para compatibilizar o fornecimento de cobalto e molibdênio com a inoculação das sementes? .....	68
20 Quando deve ser feita a inoculação no sulco? .....	70
Como fazer o cálculo teórico do número de células de <i>Bradyrhizobium</i> no caso de inoculação no sulco? .....	71
21 A capacidade de fixação do N <sub>2</sub> da soja brasileira é superior à verificada em outros países? .....	73
22 Considerações finais .....	75
<b>Agradecimentos</b> .....	76
<b>Referências</b> .....	76



# A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro

---

Mariangela Hungria; Rubens José Campo; Iêda Carvalho Mendes

## Resumo

O teor elevado de proteína dos grãos de soja (*Glycine max*) resulta em uma demanda de 80 kg de nitrogênio (N) para cada 1.000 kg de grãos produzidos, ou seja, rendimentos de 3.000 kg.ha<sup>-1</sup> implicam na necessidade de 240 kg de N; como a eficiência de utilização dos fertilizantes nitrogenados é, raramente, superior a 50%, seria necessário aplicar 480 kg de N para obter esse nível de produção. A soja, porém, pode suprir todas as necessidades em N pelo processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>), em que bactérias pertencentes às espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* se associam às raízes da planta formando estruturas específicas, os nódulos, conseguindo, então, capturar o N<sub>2</sub> e transformá-lo em formas nitrogenadas utilizáveis pela planta. Cultivares de soja e estirpes de *Bradyrhizobium* foram selecionadas para garantir a máxima atividade biológica em todas as regiões produtoras do Brasil e estão disponíveis para o agricultor; além disso, tecnologias visando maximizar o processo biológico são periodicamente lançadas. Vários ensaios foram conduzidos e concluíram que a complementação com fertilizantes nitrogenados na semeadura (20 a 40 kg de N.ha<sup>-1</sup>), no início do florescimento (R2) (50 kg a 100 kg de N.ha<sup>-1</sup>), ou no enchimento dos grãos (R4) (50 kg de N.ha<sup>-1</sup>) resulta em decréscimos na nodulação sem trazer benefícios ao rendimento, tanto no sistema de semeadura conhecido como plantio convencional, como no plantio direto, bem como em cultivares com diferentes ciclos de maturação. Os solos brasileiros são, originalmente, isentos de bactérias de *Bradyrhizobium* capazes de nodular de modo eficaz a soja, contudo, a

grande maioria das áreas cultivadas hoje já foi inoculada anteriormente e apresenta populações elevadas de estirpes introduzidas pelos inoculantes, estimadas em  $10^3$  a  $10^6$  células.g<sup>-1</sup> de solo. Contudo, em vários ensaios conduzidos nas principais regiões produtoras de soja, a reinoculação das sementes permitiu incrementos médios de 4,5% a 8% no rendimento dos grãos; além disso, na Região Sul, a soja com boa fixação de N<sub>2</sub> deixa N residual para a cultura de inverno, trigo (*Triticum aestivum*). A qualidade do inoculante é essencial para o sucesso da fixação biológica do N<sub>2</sub>, que deve ser produzido em suporte estéril, conter pelo menos 10<sup>9</sup> células.g<sup>-1</sup> ou mL<sup>-1</sup> de produto e ser recomendado em uma dose que resulte em, no mínimo, 600.000 células.semente<sup>-1</sup>. Os procedimentos para a inoculação adequada das sementes, com inoculantes turfosos ou líquidos, em tambor rotatório, em máquina de tratamento de sementes, ou diretamente no sulco de semeadura, são discutidos nesta publicação, bem como os principais fatores limitantes à fixação biológica do N<sub>2</sub> a campo. O tratamento de sementes deve compatibilizar o uso de fungicidas, micronutrientes e inoculantes. Os micronutrientes e, especialmente, os fungicidas podem diminuir drástica e rapidamente a viabilidade das células nas sementes e, nesta publicação, também são discutidas as estratégias e alternativas que o agricultor pode utilizar para evitar a toxicidade desses produtos ao *Bradyrhizobium*. O Brasil pode se orgulhar, hoje, de ocupar a posição de liderança em benefícios da fixação biológica do N<sub>2</sub> com a cultura da soja, o que resulta em uma economia estimada em cerca de 6,6 bilhões de dólares por safra, que deixam de ser utilizados para a compra de fertilizantes nitrogenados. A maximização do processo biológico é importante porque tetos de produtividade são alcançados com um menor custo para o agricultor. Além disso, o ambiente é favorecido pela menor poluição de rios, lagos, lençóis freáticos e reservatórios com fontes de N, bem como pela diminuição da emissão de gases com efeito estufa.

Palavras chave: *Bradyrhizobium*, fixação biológica do nitrogênio, inoculação, nitrogênio, soja, tratamento de sementes.

## Abstract

### **The importance of the biological nitrogen fixation with the soybean crop: major component to the competitiveness of the Brazilian product**

The high protein content of the soybean (*Glycine max*) grains demands an average of 80 kg of nitrogen (N) for each 1,000 kg of grains, or 240 kg of N for yields of 3,000 kg.ha<sup>-1</sup>; the N-fertilizer utilization efficiency rarely exceeds 50%, therefore it would be necessary to supply 480 kg of N to reach that yield. However, soybean N needs may be supplied by the process of biological nitrogen (N<sub>2</sub>) fixation, in which bacteria belonging to the species *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* associate with the plant roots resulting in specific organs, the nodules, where N<sub>2</sub> from the air is transformed into N compounds that can be utilized by the plants. Soybean cultivars and *Bradyrhizobium* strains were selected to guarantee the maximum biological activity in all Brazilian producing areas and are available to the farmers; furthermore, technologies aiming at the maximization of the biological process are periodically developed and released. Several experiments have been performed and have shown that a supply of N fertilizer at sowing (20 to 40 kg of N.ha<sup>-1</sup>), early flowering (R2) (50 kg to 100 kg of N.ha<sup>-1</sup>), or mid-pod-filling stage (R4) (50 kg of N.ha<sup>-1</sup>) decreases nodulation with no benefits to the grain yield, in both conventional and no-tillage systems and with cultivars with different maturation cycles. Brazilian soils are originally devoid of effective soybean *Bradyrhizobium*, however, most of the soils cropped today have been inoculated before and show a high population of naturalized strains, estimated at 10<sup>3</sup> to 10<sup>6</sup> cells.g<sup>-1</sup> soil. In several trials performed in the main soybean producing areas mean increases in grain yield due to seed reinoculation ranged from 4.5 to 8%; furthermore, in the South Region soybean showing good rates of N<sub>2</sub> fixation leave residual N to the winter crop, wheat (*Triticum aestivum*). The quality of the inoculants is also very important, thus inoculants should be produced in sterile vehicle and contain at least 10<sup>9</sup> cells.g<sup>-1</sup> or mL<sup>-1</sup> of the product and the dosage recommended should result in at least 600,000 cells.seed<sup>-1</sup>. Proper procedures for the seed inoculation, with peat or liquid inoculants, either manually, or using a seed-treatment machine, or straight in the furrow are

discussed in this publication, as well as the main factors limiting biological  $N_2$  fixation on the field. Fungicides, micronutrients and inoculants must show compatibility for the seed treatment. Micronutrients and especially fungicides may drastically and quickly decrease cell viability on the seeds, and in this publication alternatives and strategies to avoid the toxicity of the products to the *Bradyrhizobium* are discussed. Nowadays Brazil can be proud of occupying the leadership in taking advantage of the benefits of the biological  $N_2$  fixation process with the soybean crop, resulting in a National economy estimated at 6.6 billion dollars per crop season that otherwise would be used to buy N fertilizers. The maximization of the biological process is very important because higher yields are obtained at lower costs for the farmers. In addition, the environment is also benefited by the lower pollution of rivers, ground water, lakes and water reservoirs with mineral N, as well as by the lower emission of gases with greenhouse effects.

Key words: biological nitrogen fixation, *Bradyrhizobium*, inoculation, nitrogen, seed treatment, soybean.

## 1 Qual a importância da fixação biológica do nitrogênio para o Brasil e para o planeta?

O crescimento da população mundial, que deve atingir oito bilhões de pessoas em 2030, demanda maior oferta de alimentos, que vem sendo atendida tanto pelo cultivo em áreas novas, freqüentemente marginais e impróprias para a agricultura, como pelo aprimoramento da agricultura, incluindo o maior uso de insumos, a melhor exploração de recursos genéticos e o desenvolvimento de novas tecnologias. A necessidade de desenvolvimento e utilização de tecnologias que garantam a segurança alimentar, mas preservem o meio ambiente é evidenciada pela urgência em manter os recursos naturais, pois, somente nas últimas cinco décadas, estima-se que cerca de dois dos 8,7 bilhões de hectares de terras agricultáveis, pastagens permanentes e florestas do mundo tenham sido degradadas.

O nitrogênio (N), por ser um constituinte dos ácidos nucléicos e de proteínas, moléculas fundamentais para todos os processos biológicos é o nutriente requerido em maior quantidade pelas plantas. No caso da cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill], particularmente pelo teor elevado de proteínas nos grãos, a demanda em N é elevada, estimada em cerca de 80 kg de N para cada 1.000 kg de grãos produzidos. A soja pode obter esse N de quatro fontes: 1- o solo, principalmente pela decomposição da matéria orgânica; 2- a fixação não-biológica; 3- os fertilizantes nitrogenados; e 4- o processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>).

Em relação ao N do solo, o reservatório de N presente na matéria orgânica é limitado, podendo ser esgotado, rapidamente, após alguns cultivos. Além disso, as condições de temperatura e de umidade predominantes no território brasileiro aceleram os processos de decomposição da matéria orgânica, bem como de perdas gasosas e por lixiviação de N, resultando em solos com teores pobres desse nutriente, capazes de fornecer, em média, apenas 10 a 15 kg de N por cultura. Deve-se considerar, ainda, que a matéria orgânica é importante para a manutenção da biota do solo e para atingir a sustentabilidade dos sistemas agrícolas, portanto, preservá-la deve ser uma meta de todos os agricultores.

A fixação não-biológica, isto é, independente da ação de organismos vivos, resulta de processos naturais, como a reação de descargas elétricas com o

$N_2$ , a combustão e o vulcanismo. Essa fonte, porém, contribui com apenas cerca de 10% das entradas de N na Terra.

Os fertilizantes nitrogenados representam a forma assimilada com maior rapidez pelas plantas, mas a um custo elevado. O processo industrial que transforma o  $N_2$  em amônia ( $NH_3$ ) requer: 1- hidrogênio (derivado de gás de petróleo); 2- catalisador contendo ferro; 3- altas temperaturas (300° a 600°C); e 4- altas pressões (200 a 800 atm). Desse modo, o gasto de fontes energéticas por tonelada de amônia sintetizada é de, aproximadamente, seis barris de petróleo. Um agravante na utilização dos fertilizantes nitrogenados reside na baixa eficiência de sua utilização pelas plantas, raramente ultrapassando 50%. Isso significa que, se o agricultor colocar 100 kg de N no solo, 50 kg serão perdidos pelos processos de lixiviação (lavagem no perfil do solo por percolação ou escoamento superficial) e transformação em formas gasosas, tanto pela desnitrificação (redução, pela ação dos microrganismos, para formas gasosas,  $N_2$  e  $N_2O$ ), como pela volatilização (perdas gasosas na forma de  $NH_3$ ). Deve-se considerar, ainda, que os fertilizantes nitrogenados estão altamente relacionados à poluição ambiental, pois a lixiviação do N e o escoamento desse nutriente pela superfície do solo resultam em acúmulo de formas nitrogenadas, particularmente nitrato, nas águas dos rios, lagos e lençóis subterrâneos, podendo atingir níveis tóxicos aos peixes e ao homem. Diversas doenças, como câncer e problemas respiratórios, têm sido associadas ao consumo de águas contaminadas com nitrato, representando um problema sério em países da Europa. Já as perdas gasosas de  $N_2$ , particularmente o  $N_2O$ , contribuem para a formação e o crescimento do tão comentado “buraco” na camada de ozônio. No Brasil, a experiência dos países desenvolvidos deve servir para orientar uma política de uso racional de fertilizantes nitrogenados. Em termos globais, estima-se que a produção industrial da amônia contribua com, aproximadamente, 25% das entradas de N na Terra.

A terceira fonte de N para as plantas é representada pela fixação biológica do  $N_2$ , processo realizado por alguns microrganismos que habitam o solo. Embora o  $N_2$  constitua, aproximadamente, 80% dos gases atmosféricos, nenhum animal ou planta consegue utilizá-lo como nutriente, devido à tripla ligação que existe entre os dois átomos do  $N_2$ , que é uma das mais

fortes de que se tem conhecimento na natureza. Contudo, os gases atmosféricos também se difundem para o espaço poroso do solo e o  $N_2$  consegue ser aproveitado por alguns microrganismos (algumas arqueobactérias mas, principalmente, bactérias), que ali habitam, graças à ação de enzima chamada dinitrogenase, que é capaz de romper a tripla ligação do  $N_2$  e reduzi-lo a  $NH_3$ , a mesma forma obtida no processo industrial. Essas bactérias, também denominadas como diazotróficas ou fixadoras de  $N_2$ , se associam a diversas espécies de plantas em diferentes graus de especificidade, levando à classificação como bactérias associativas, endofíticas ou simbióticas.

A maior contribuição do processo de fixação biológica do  $N_2$  ocorre pela associação simbiótica de plantas da família Leguminosae com bactérias pertencentes a diversos gêneros [*Allorhizobium* (= *Rhizobium*), *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* (= *Ensifer*), *Rhizobium* e outros gêneros recentemente descritos como simbiontes, como *Burkholderia*, *Methylobacterium Devosia*, *Ochrobactrum Phyllobacterium*, *Ralstonia* (*Cupriavidus*)], mas costumam ser denominadas, de modo popular e coletivo, como rizóbios. A simbiose pode ser facilmente identificada, pois estruturas especializadas para o processo biológico, chamadas nódulos são formadas nas raízes das leguminosas. Nos nódulos, a amônia sintetizada são rapidamente incorporados íons hidrogênio ( $H^+$ ), abundantes nas células das bactérias, ocorrendo a transformação em íons amônio ( $NH_4^+$ ), que serão, então, distribuídos para a planta hospedeira e incorporados em diversas formas de N orgânico, como os ureídios, aminoácidos e amidas.

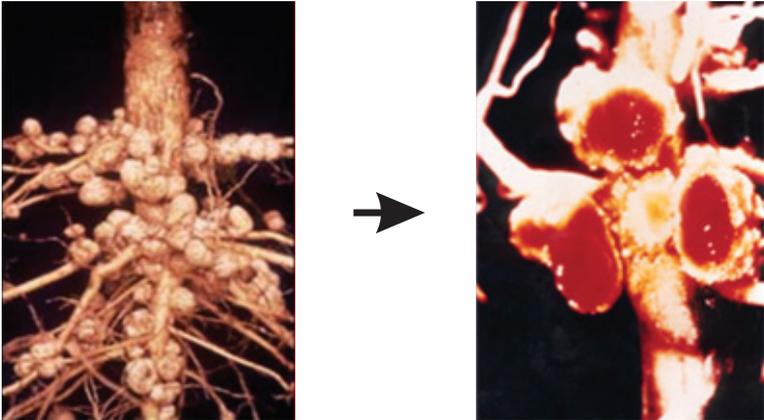
Estima-se que o processo biológico contribua com cerca de 65% de todas as entradas de N, sendo o maior provedor desse nutriente para a manutenção de vida na Terra. Ainda nesse contexto, quase 50% de toda a entrada de N na Terra são atribuídos à fixação biológica do  $N_2$  que ocorre pela simbiose de rizóbios com leguminosas. Investigar e utilizar as vantagens do processo de fixação biológica do  $N_2$  também favorece o cenário de uma agricultura moderna, que visa a obtenção de tetos máximos de produtividade, com a melhor relação custo/benefício e impacto ambiental mínimo.

## 2 De modo sucinto, como ocorre o processo de fixação biológica do nitrogênio com a soja?

No caso da soja, o processo de fixação biológica do  $N_2$  ocorre pelo estabelecimento de uma relação simbiótica, principalmente com bactérias que, pela taxonomia atual, estão classificadas no gênero *Bradyrhizobium* e nas espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*. Além disso, existe grande variabilidade dentro de cada uma dessas duas espécies e bactérias com diferentes propriedades morfológicas, fisiológicas e genéticas passam a ser classificadas como estirpes (ou cepas) distintas, o que, em termos comparativos, equivaleria a variedades/cultivares de plantas, ou raças de animais, ou raças de patógenos.

A formação de um simples nódulo resulta de um processo altamente complexo, envolvendo múltiplas etapas. Inicialmente, a semente em germinação exsuda diversas moléculas; umas atraem quimicamente os rizóbios, outras estimulam o crescimento das bactérias na rizosfera da planta hospedeira e outras, ainda, ativam diversos genes da bactéria, responsáveis pelo início da nodulação. Quando ativados, esses genes da nodulação induzem a bactéria a produzir outras moléculas, que, por sua vez, ativarão genes da planta hospedeira, responsáveis por dar continuidade ao processo de nodulação. Estabelece-se, então, um verdadeiro diálogo entre a bactéria e a planta hospedeira, envolvendo a ativação de vários genes e desencadeando processos específicos que permitem, à bactéria, penetrar na raiz, formar um cordão de infecção e provocar o crescimento das células do córtex da planta hospedeira, até resultar na formação de uma estrutura específica na planta, o nódulo, cuja função é alojar a bactéria e permitir que ela realize, em condições adequadas, o processo de fixação biológica do  $N_2$ . Com a formação do nódulo, a bactéria passa por uma série de transformações, uma delas sendo a perda dos flagelos, responsáveis pela sua mobilidade, pois a locomoção não é necessária dentro do nódulo. Diversas enzimas são sintetizadas, podendo-se destacar a nitrogenase, responsável pelo processo de fixação do  $N_2$  propriamente dito, além de proteínas necessárias para o funcionamento perfeito da nitrogenase e dos processos metabólicos da bactéria. Uma proteína característica da simbiose é a leghemoglobina, cuja função é semelhante à da hemoglobina do sangue humano, ou seja, de transporte do oxigênio nas concentrações

necessárias. Quando o nódulo está em plena atividade, a sua parte interna apresenta coloração rósea intensa, pela ação da leghemoglobina (Fig. 1). Já em nódulos senescentes, a degradação da leghemoglobina resulta em coloração esverdeada e, em nódulos formados por bactérias ineficientes, a coloração interna é branca ou esverdeada desde a sua formação.



**Figura 1.** Nódulos nas raízes de soja e coloração interna rósea, pela presença da leghemoglobina ativa. Dentro dos nódulos ocorre o processo de fixação biológica do nitrogênio, pela ação do complexo enzimático da nitrogenase, responsável pela redução do  $N_2$  atmosférico a amônia.

É importante salientar que o N do fertilizante é mais facilmente absorvido pela soja porque já está em uma forma prontamente disponível para as plantas, ao passo que, no caso do processo biológico, a planta precisa “investir um pequeno capital energético inicial”, representado pela formação dos nódulos. Além disso, o gasto energético da planta no processo de fixação biológica do  $N_2$  pode ser mais elevado do que para a absorção de fertilizantes nitrogenados. Desse modo, somente uma simbiose altamente eficiente resultará em desempenho igual, ou até superior, ao de uma planta recebendo fertilizante nitrogenado. Essa é a razão principal pela qual é tão importante que o agricultor adote todas as tecnologias desenvolvidas pela pesquisa, que são apresentadas nesta Circular, visando a maximização do processo biológico.

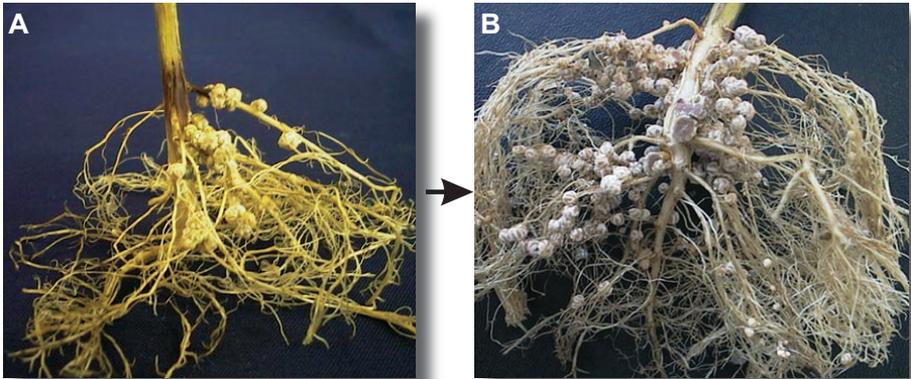
### **3 De quanto nitrogênio a cultura da soja precisa para atingir altos rendimentos?**

Para cada 1.000 kg de grãos de soja produzidos, com um teor médio de 6,5% N, são necessários cerca de 80 kg de N.ha<sup>-1</sup> (65 kg alocados nas sementes e 15 kg nas folhas, caule e raízes). Considerando um rendimento de 3.000 kg de grãos ha<sup>-1</sup>, a planta necessita, portanto, 240 kg de N ha<sup>-1</sup>. Os solos brasileiros são pobres em N, normalmente sendo capazes de fornecer somente de 10 a 30 kg de N.ha<sup>-1</sup> e, considerando a contribuição máxima de 30 kg de N, haveria uma pequena redução da demanda de N, para 210 kg de N.ha<sup>-1</sup>. Se forem utilizados fertilizantes nitrogenados, as perdas de N são elevadas, por lixiviação, escoamento superficial, desnitrificação e volatilização, raramente excedendo 50% do aplicado. Conseqüentemente, na verdade seriam necessários 420 kg de N.ha<sup>-1</sup>, ou 930 kg de uréia, a forma mais utilizada, que contém 45% de N. Esse exemplo mostra como a cultura é exigente em N. Cabe salientar, ainda, que o potencial genético da soja é estimado em, aproximadamente, 8.000 kg de grãos.ha<sup>-1</sup>, rendimento esse que demandaria mais de 1.100 kg de N. Para garantir que a fixação biológica do N<sub>2</sub> conseguirá suprir essas quantidades crescentes de N, a Embrapa investe em várias linhas de pesquisa, visando sempre a economia por parte do agricultor.

### **4 Quando e por quanto tempo a soja consegue fixar N<sub>2</sub>?**

Em condições de campo, entre cinco e oito dias após a emergência, já é possível observar a formação dos primeiros nódulos e, ao redor de 10 a 12 dias após a emergência, se o estabelecimento da simbiose for bem sucedido, cerca de quatro a oito nódulos medindo de 1 a 2 mm podem ser visualizados. Esses nódulos aparecem na chamada coroa da raiz, principalmente na raiz principal, em uma região de, aproximadamente, 4 cm de comprimento por 3 cm de largura, conforme pode ser visualizado na figura 2B, recebendo a denominação de nodulação primária.

Nessa etapa inicial, as plantas noduladas podem estar um pouco amareladas, quando comparadas com aquelas que receberam uma dose inicial



**Figura 2.** Nodulação inicial das raízes: (A) parcial ou “fraca” e (B) bem sucedida. A nodulação primária parcial pode ser atribuído à falta de rizóbios fisiologicamente aptos a infectar as raízes naquele momento, bem como a fatores limitantes da planta hospedeira e do ambiente.

de fertilizante nitrogenado, também conhecida como “dose de arranque”. Para entender esses sintomas, é necessário lembrar que um simples nódulo representa uma verdadeira “fábrica de fertilizante biológico” que deve estar em plena sintonia com a planta hospedeira, envolvendo uma complexidade de etapas e, inclusive, com a conexão dos nódulos com a planta pelos vasos do xilema e do floema. Toda a “produção da bactéria”, representada pelos compostos nitrogenados, será transportada para a planta pelo xilema e, como “pagamento”, a planta envia produtos de sua fotossíntese, via floema, para o nódulo. Os fotossintatos servirão como fonte de energia para os bacteróides e, também, como esqueletos de carbono para incorporar a  $\text{NH}_3$  produzida pela nitrogenase. Nos primeiros dias após a germinação, as plântulas utilizam, para o seu crescimento, o N que estava armazenado nos cotilédones. Muitas vezes, as reservas dos cotilédones terminam um pouco antes da “inauguração da fábrica”, resultando em clorose leve nas folhas. Contudo, se os nódulos forem visíveis, esses sintomas desaparecem após um a três dias, não trazendo prejuízo ao desenvolvimento das plantas. É importante salientar que a presença de um número elevado de bactérias em estado fisiológico adequado e de condições ambientais favoráveis ao estabelecimento da

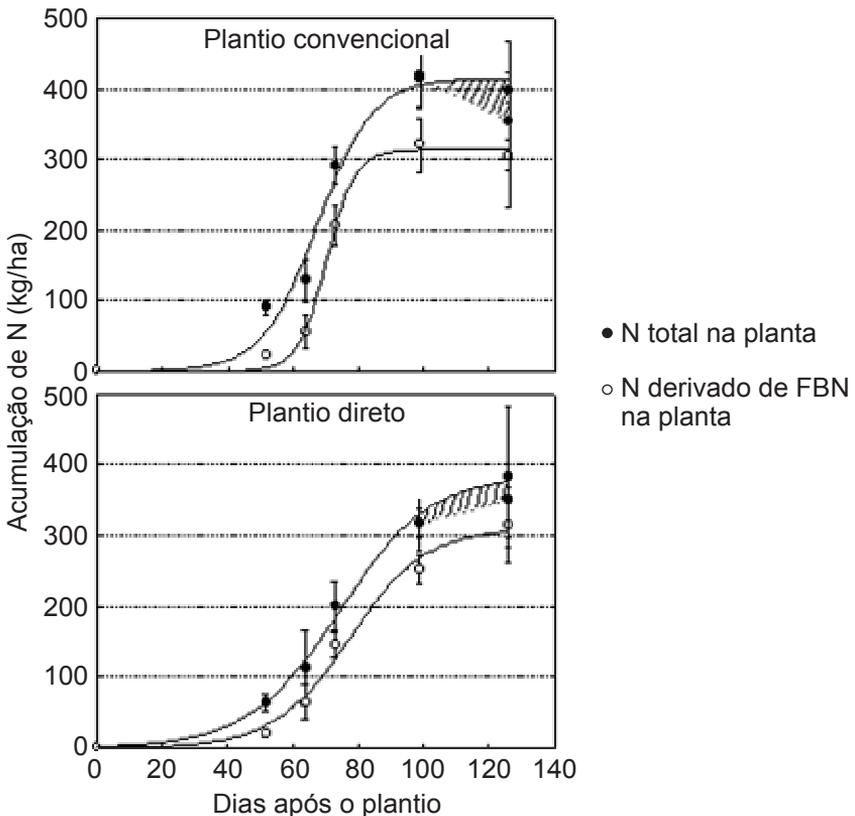
simbiose contribuirão para que a planta possa receber, mais prontamente, os produtos nitrogenados.

Após as duas primeiras semanas, as etapas de nodulação e de fixação do  $N_2$  são intensificadas até o período de formação e de início do enchimento das vagens. Frequentemente, observa-se uma formação secundária de nódulos após o florescimento e, hoje, sabe-se que esses nódulos contribuem, substancialmente, para o fornecimento de N para a planta. Essa nodulação, que ocorre nas raízes secundárias, em segmentos radiculares mais distantes da coroa da raiz, quase sempre resulta da infecção pelos rizóbios que já estão estabelecidos no solo, por inoculação realizadas em anos anteriores. Alguns estudos indicam que os rizóbios se locomovem muito lentamente no solo e, portanto, em uma mesma safra poucos rizóbios do inoculante utilizado naquele ano conseguirão formar nódulos em segmentos mais distantes da coroa radicular.

Ao analisar a raiz nodulada, é importante verificar, também, o tamanho dos nódulos, pois é desejável obter um bom número de nódulos com tamanho igual ou superior a 2 mm, que são os que apresentam maior capacidade de fixação de  $N_2$ . Na época do florescimento, uma planta de soja bem nodulada deve mostrar, no campo, entre 15 e 30 nódulos, ou 100 a 200 mg de nódulos secos por planta. Os nódulos podem continuar ativos mesmo durante o período de enchimento dos grãos, quando, então, começam a senescer. Com a leghemoglobina perdendo sua função, observa-se, inclusive, alteração da coloração interna dos nódulos para tons esverdeados ou marrons. É muito importante salientar que, após a formação das vagens, a senescência dos nódulos inicia em resposta a outra mensagem da planta, pois torna-se necessário desacelerar o processo biológico, evitando o desperdício de derivados da fotossíntese para manter a “fábrica de N”. A partir desse estágio, o processo preferencial passa a ser o da translocação de N das folhas e caules para as vagens, razão pela qual começa-se a observar o amarelecimento e a senescência das folhas, etapa natural e que não deve ser vista com preocupação pelos agricultores.

Particularmente na década de 1970, existia a preocupação de que o processo de fixação biológica do  $N_2$  caísse drasticamente após o florescimento, enquanto que a assimilação de N mineral pela nitrato redutase continuaria

ativa. Desse modo, em plantas supridas somente pelo processo biológico poderia haver deficiência de N. Nas cultivares brasileiras desenvolvidas desde então, porém, isso não ocorre e a atividade da nitrogenase se prolonga, com frequência, até o período de enchimento dos grãos. Resultados obtidos na estação experimental da Embrapa Soja, em Londrina, mostrados na figura 3, indicam, claramente, que a atividade biológica ocorre em quase todo o ciclo vegetativo e reprodutivo da soja. Colocar alguma fonte de N mineral na época em que ocorre a translocação de N das folhas e



**Figura 3.** Acúmulo de N total e do N proveniente da fixação biológica (avaliado pelo método de N-ureídeos) durante o ciclo da soja sob os sistemas de semeadura conhecidos por plantio direto e plantio convencional. Ensaio conduzido em Londrina (PR). Segundo Zotarelli (2000).

caule para as vagens somente implicará no acúmulo de N nas folhas o que, inclusive, dificulta a colheita.

## **5 É necessário colocar uma dose inicial de fertilizante nitrogenado para suprimir sintomas de clorose?**

A preocupação do agricultor em ver a plantação com sintomas de clorose no período de 14 a 20 dias após a emergência levou, por muitos anos, à recomendação de uma “dose de arranque” de N, de 10 a 30 kg de N.ha<sup>-1</sup>. O que significa essa quantidade de N para a planta? Praticamente nada, pois, se a eficiência de utilização do N é, raramente, superior a 50%, na verdade estão sendo aplicados somente 5 a 15 kg de N, que representariam cerca de 3,5% da demanda de uma cultura produzindo 3.000 kg.ha<sup>-1</sup>. Em caso de aplicação seguida por chuva, as perdas por lixiviação serão ainda mais elevadas, literalmente “lavando o dinheiro do agricultor”.

Nas duas primeiras semanas após a germinação, porém, a aplicação de uma pequena dose de N mineral é, proporcionalmente ao tamanho das plantas, elevada e suficiente para que uma “mensagem” seja enviada à planta, de que “não precisa se preocupar em fazer mais nódulos, pois aqui há N suficiente para o seu crescimento”. A soja não tem como saber que aquele N é apenas temporário e, então, desacelera o processo de formação de novos nódulos. Quando a planta “percebe” que o N acabou, reinicia a formação de nódulos, o que pode demorar alguns dias, inclusive trazendo prejuízos ao desenvolvimento da cultura. Além disso, as raízes da soja crescem rapidamente e somente os segmentos radiculares novos são suscetíveis à formação de nódulos, e por apenas um período de poucas horas. Desse modo, a presença de N mineral, ou de qualquer fator inibitório da nodulação resultará, irreversivelmente, na falta de nodulação no segmento radicular fisiologicamente apto naquele momento. Na figura 2B, por exemplo, pode-se visualizar uma raiz com abundância de nódulos na coroa principal e outra (2A), onde a nodulação inicial foi apenas parcialmente bem sucedida.

Infelizmente, existe uma grande pressão para que o sojicultor utilize fertilizantes nitrogenados e um dos motivos alegados, com frequência, é o de evitar a clorose inicial da cultura. Contudo, em diversos experimentos conduzidos

pela Embrapa, nas regiões Sul, Centro-Oeste e Norte, não foi constatado nenhum incremento no rendimento das plantas com a aplicação dessa dose de arranque, conforme exemplificado na Tabela 1, em ensaios conduzidos em Planaltina (DF) e Londrina (PR). Outro exemplo, na figura 4, mostra os rendimentos médios obtidos em 20 ensaios conduzidos, recentemente, em Londrina e Ponta Grossa (PR), com cultivares com alta capacidade produtiva, evidenciando que a aplicação de uma dose inicial de fertilizante nitrogenado (30 kg de N.ha<sup>-1</sup>) não resultou em incremento no rendimento de grãos.

**Tabela 1.** Efeito da complementação da inoculação (inoculante turfoso com as estirpes SEMIA 5079 + SEMIA 5080) com doses iniciais de fertilizante nitrogenado (kg de N.ha<sup>-1</sup>) no rendimento (kg de grãos.ha<sup>-1</sup>) da soja. Experimentos conduzidos em Planaltina (DF), com a cultivar Celeste (safra 1998/1999) e em Londrina (PR), com a cultivar BR 37 (safra 1997/1998), ambos em solos com população estabelecida de *Bradyrhizobium* (>10<sup>4</sup> células.g de solo).

Planaltina		Londrina	
Dose	Rendimento	Dose	Rendimento
Inoculação + 0	3.284 <sup>1</sup>	Inoculação + 0	3.328 <sup>2</sup>
Inoculação + 20	3.006	Inoculação + 10	3.070
Inoculação + 30	3.217	Inoculação + 20	3.165
Inoculação + 40	3.229	Inoculação + 30	3.232
CV(%) <sup>2</sup>	6,5		7,1

<sup>1</sup> Os dados representam médias de cinco (Planaltina) ou seis (Londrina) repetições e não diferem estaticamente (Duncan, 5%) em nenhum dos dois locais.

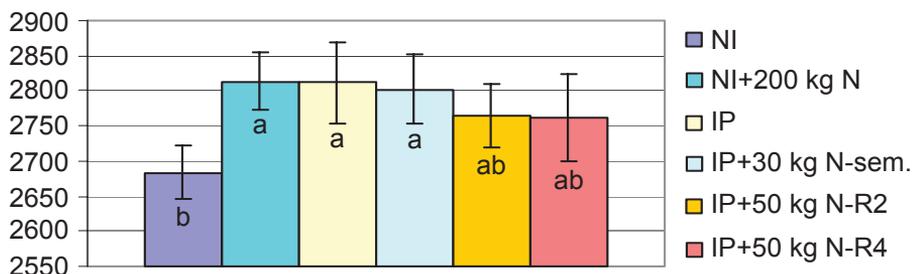
<sup>2</sup> CV, coeficiente de variação.

## 6 A aplicação de fertilizante nitrogenado em outros estádios do crescimento da soja é necessária para a obtenção de altos rendimentos?

As pesquisas desenvolvidas com a soja no Brasil permitiram um acréscimo fantástico no rendimento da cultura, com a média nacional passando de 1.166 kg.ha<sup>-1</sup>, em 1968/1969, para 2.637 kg.ha<sup>-1</sup>, em 2000/2001. Para

fornecer N a cultivares com alta produtividade, os rizobiologistas têm trabalhado na seleção de estirpes com maior capacidade de fixação de  $N_2$  e melhorias na técnica de inoculação. Assim, com freqüência, patamares superiores a  $4.000 \text{ kg.ha}^{-1}$  são obtidos exclusivamente pela inoculação, não sendo necessária nenhuma complementação com fertilizantes nitrogenados. Como exemplo, nos 20 ensaios conduzidos em Londrina e Ponta Grossa (PR), cujas médias de rendimento são apresentadas na figura 4, a aplicação de fertilizante nitrogenado em R2 (início do florescimento) ou R4 (enchimento de grãos) prejudicou a atividade dos nódulos que ainda estavam ativos, diminuindo a contribuição da fixação do  $N_2$  e prejudicando o rendimento da soja.

Também nos Cerrados brasileiros, a condução de dez ensaios, em cinco safras, com a suplementação de fertilizantes nitrogenados em R2 e R4, em semeadura convencional ou direta (Tabela 2), resultou em incremento no rendimento de grãos em apenas um dos ensaios (safra 2000/2001, sob semeadura direta).



**Figura 4.** Rendimento de soja ( $\text{kg.ha}^{-1}$ ) em solo com população estabelecida de *Bradyrhizobium* ( $>10^3$  células.g<sup>-1</sup> de solo) em função dos tratamentos: não inoculado (NI), sem e com  $200 \text{ kg de N.ha}^{-1}$  ( $100 \text{ kg na semeadura e } 100 \text{ kg no início do florescimento - R2}$ ) e inoculado (IP, inoculante turfoso padrão, com as exigências de qualidade da legislação, contendo as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5080), sem e com fertilizante nitrogenado aplicado na semeadura ( $30 \text{ kg de N}$ ), em R2, ou no enchimento de grãos - R4 ( $50 \text{ kg de N}$ ). Colunas com a mesma letra não diferem estatisticamente (Duncan, 5%). Médias de 20 ensaios, conduzidos por três safras, em Londrina e Ponta Grossa (PR), com as cultivares Embrapa 48 (ciclo curto) e BRS 134 (ciclo médio), sob semeadura direta ou convencional, com seis repetições por tratamento. Adaptado de Hungria et al. (2006b).

**Tabela 2.** Rendimento de grãos ( $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) de soja em função da reinoculação e da aplicação suplementar, em R2 (início do florescimento) ou R4 (enchimento de grãos), de diferentes fontes de fertilizante nitrogenado (uréia, sulfato e nitrato de amônio). Os experimentos foram conduzidos na Embrapa Cerrados, em Latossolo Vermelho Amarelo argiloso, cultivado sob os sistemas de semeadura conhecidos como plantio direto ou convencional. Todos os tratamentos foram inoculados com as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5080 e a cultivar EMGOPA 316 (ciclo curto) foi utilizada em todos os experimentos, com exceção do ano agrícola 2004/2005, quando foi utilizada a EMGOPA 313. Ensaios conduzidos pela Dra. Ieda C. Mendes e pelo Dr. Fábio Bueno dos Reis Junior (dados não publicados).

Tratamento	Safrá					Média
	2000/2001	2001/2002	2002/2003	2003/2004	2004/2005	
	Grãos $\text{kg}/\text{ha}$					
Inoculação						
50kg nitrato R2	3.282 <sup>1</sup>	2.868	3.245 b	3.482	2.971	3.170
50kg sulfato R2	3.520	2.999	3.236 b	3.640	3.185	3.316
50kg nitrato R4	3.431	3.042	3.214 b	3.614	3.147	3.290
50 kg sulfato R4	3.398	2.956	3.330 ab	3.670	2.759	3.222
200 kg de N (uréia)	3.405	3.186	3.318 ab	3.711	3.213	3.366
CV (%) <sup>2</sup>	3.491	3.116	3.442 a	3.660	3.052	3.352
	7,0 ns <sup>3</sup>	7,1 ns	2,6	7,3 ns	9,6 ns	n.a. <sup>3</sup>
	Plantio direto					
Inoculação						
50kg nitrato R2	3.466 bc	2.827	2.871	3.187	2.976	3.065
50kg sulfato R2	3.607 abc	2.772	2.889	3.009	3.361	3.128
50kg nitrato R4	3.571 abc	2.826	2.952	3.210	3.381	3.188
50 kg sulfato R4	3.796 ab	2.878	2.787	3.394	3.051	3.181
200 kg de N (uréia)	3.872 a	2.919	2.818	3.247	3.279	3.227
CV (%) <sup>2</sup>	3.764 ab	3.017	2.791	3.075	3.261	3.182
	6,7	7,4 ns	6,5 ns	13,5 ns	8,2 ns	n.a.

<sup>1</sup>Médias de seis repetições e, quando seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Duncan (5%); <sup>2</sup> CV, coeficiente de variação; <sup>3</sup> ns, diferença estatisticamente não significativa; n.a., não analisado estatisticamente.

Cabe salientar, ainda, que, em mais de 50 ensaios de inoculação conduzidos por pesquisadores participantes da “Rede Nacional de Ensaios de Inoculação da Soja”, o tratamento com soja não inoculada recebendo 200 kg de N.ha<sup>-1</sup>, parcelados em 100 kg na semeadura e 100 kg no florescimento não resultou, na maioria dos ensaios, em incremento no rendimento de grãos em relação ao tratamento inoculado e sem fertilizante. Em outros ensaios conduzidos na Região Sul e nos Cerrados, não foram constatados incrementos no rendimento de grãos pela aplicação de 120 a 150 kg de N, no florescimento, ou de até 400 kg de N.ha<sup>-1</sup>, parcelados em dez vezes durante todo o ciclo da soja (Hungria et al., 2001).

## **7 Por que é necessário inocular a soja em solos de primeiro cultivo?**

A soja é originária da China e é considerada uma das culturas mais antigas do mundo. Essa leguminosa foi trazida para o Brasil, provavelmente em 1882, mas somente a partir da década de 1960 passou a ser utilizada com maior intensidade na Região Sul e, na década seguinte, nos Cerrados. A simbiose resulta de um processo de evolução de milhões de anos, entre a planta hospedeira e a bactéria; desse modo, como a soja não ocorre naturalmente no Brasil, também não existem rizóbios nativos capazes de nodulá-la de modo eficaz. Os solos brasileiros são, em sua grande maioria, muito pobres em N e, na ausência dos rizóbios compatíveis, as plantas não conseguem se desenvolver. A figura 5 mostra um caso típico de ensaio conduzido em área de primeiro ano, conduzido na época de abertura dos Cerrados, em que se observa a diferença entre um tratamento inoculado e outro não inoculado. Conseqüentemente, em áreas de primeiro cultivo, justifica-se a obrigatoriedade da inoculação.

Ainda em solos de primeiro ano sob vegetação de cerrado, foram relatados vários insucessos da inoculação. Algumas vezes, a falta de nodulação está relacionada a fatores biológicos e químicos do solo, ou devido a problemas com o inoculante, com o processo da inoculação, ou com o tratamento de sementes. Na Embrapa Cerrados, foram feitos vários ensaios, buscando alternativas para minimizar o problema. Uma das soluções encontradas



**Figura 5.** Ensaio conduzido em área de primeiro cultivo de soja nos Cerrados. No primeiro plano, está o tratamento não inoculado e, no segundo, a soja inoculada com uma estirpe eficiente (Embrapa Cerrados, foto cedida pelo Dr. Milton A. T. Vargas).

foi a de inocular a cultura do arroz que precede a da soja, seguida pela reinoculação da semente de soja. Essa técnica pode ser utilizada, hoje, em situações semelhantes, por exemplo, em áreas que não são cultivadas com soja há muito tempo.

Em outros locais, cobertos por vegetação nativa mais rica em N, em que a soja é colocada como primeira cultura, a taxa de mineralização do N pode ser bastante elevada. Nesses casos, o tratamento não inoculado pode ser visualmente semelhante ao inoculado e o mesmo pode ocorrer com o rendimento. Além disso, poucos ou nenhum nódulo é observado nas raízes, pois a nodulação é inibida pelo N mineralizado. Nesses casos, a inoculação pode não resultar em incrementos no rendimento, mas auxilia no estabelecimento da população de rizóbios no solo, o que favorecerá as plantas nas próximas safras, quando se esgotarem as reservas de N do solo. Contudo, é importante salientar que, nessa situação, as plantas também não respondem à aplicação do fertilizante nitrogenado, pois o N do solo já é suficiente para satisfazer as necessidades da soja.

Se o agricultor quiser tirar maior proveito do processo de fixação biológica do N<sub>2</sub>, ele precisa aprender a fazer a análise crítica de cada caso, o que

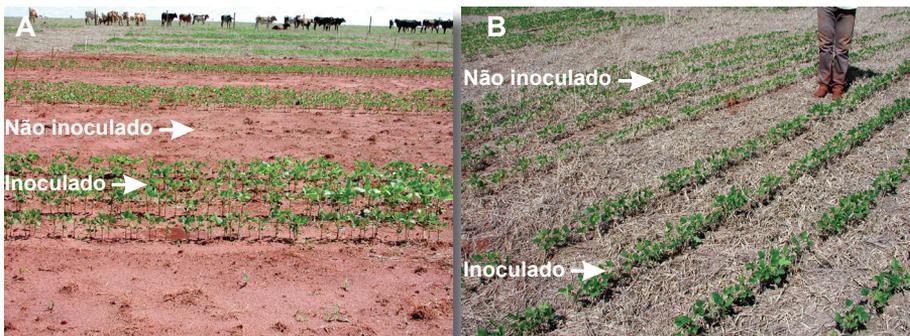
ficará mais fácil com os fundamentos teóricos deste comunicado. No caso de áreas de primeiro cultivo, ou áreas que não são cultivadas com soja há vários anos, caso, ao redor dos 25-30 dias, não houver nódulos e as plantas apresentarem coloração verde, a indicação é de que a mineralização do N está sendo suficiente para suprir as necessidades da planta. Contudo, se não houver nódulos e as plantas estiverem amarelas é porque houve algum problema com o inoculante, ou com a inoculação. Há relatos de que, em casos semelhantes, a pulverização aérea de inoculante líquido resultou em formação de novos nódulos recuperando, pelo menos parcialmente, a cultura (consultor Orlando Martins, comunicação pessoal). Essa pode ser uma solução emergencial, contudo, é mais fácil, barato e seguro tomar as precauções antes da semeadura, incluindo a compra de um bom inoculante e seguir as recomendações de inoculação deste comunicado, particularmente no que se refere à concentração de células por semente e, caso o agricultor precise tratar as sementes com fungicidas em áreas de primeiro ano, optar pela inoculação no sulco. Finalmente, a soja pode não nodular pela mineralização do N, mas esse N pode não ser suficiente para todo o ciclo da planta. Nesse caso, os sintomas de deficiência de N aparecerão mais tarde, a área já estará fechada com a soja, não havendo possibilidade de pulverização aérea; além disso, poderá ser muito tarde para a formação de novos nódulos. Muitos agricultores perguntam sobre a viabilidade de, nesses casos, aplicar fertilizante nitrogenado. Cada caso é específico e o agricultor deve fazer uma análise econômica criteriosa, considerando as estimativas de rendimento, o preço do fertilizante e os ganhos esperados. Nessas estimativas o agricultor deve sempre lembrar que, para cada 1.000 kg de grãos, a soja necessita 80 kg de N que, com as perdas que são inevitáveis, sobem para 160 kg de N. Retirando o N que a planta já acumulou, o agricultor pode estimar quanto N será necessário aplicar em cada caso e, principalmente, se isso trará retorno econômico.

## **8 Áreas que estavam sob pastagens, com cana-de-açúcar, ou com outras culturas, há vários anos, podem ser consideradas como de primeiro cultivo?**

Nos últimos anos, o cultivo da soja tem se expandido para áreas que

estavam sob pastagens, algumas bastante degradadas, bem como para áreas sob cultivo com cana-de-açúcar, ou outras culturas perenes ou semi-perenes. Algumas dessas áreas nunca foram cultivadas com soja e, portanto, não apresentam população naturalizada de rizóbios. Ainda que algumas delas tenham recebido inoculante e sido cultivadas com soja anteriormente, a população de rizóbios pode ser baixa ou pouco eficiente. Essas áreas podem ser consideradas como de primeiro cultivo, com todos os cuidados mencionados no item 7.

A expansão da soja em solos arenosos e com baixo teor de matéria orgânica também tem sido cada vez mais freqüente. Nessas condições, a sobrevivência dos rizóbios é baixa, pois as bactérias ficam expostas a temperaturas elevadas, críticas para a formação e funcionamento dos nódulos, e com baixa disponibilidade de carbono para a sua sobrevivência. Além dos cuidados para garantir uma população elevada de rizóbios na semente, a redução nos estresses térmicos e hídricos no solo é crítica e bons resultados têm sido obtidos pela adoção do sistema de plantio direto. As vantagens do plantio direto são evidenciadas na figura 6, referentes à implementação de um ensaio em área de pastagem degradada, em Taciba (SP).



**Figura 6.** Estabelecimento de um ensaio com soja inoculada em área de pastagem degradada e solos arenosos, em Taciba (SP), sob (A) plantio convencional ou (B) plantio direto.

## **9 Em áreas tradicionalmente cultivadas, vale a pena reinocular?**

Atualmente, restam poucas áreas que ainda não receberam inoculantes e a população de rizóbios estabelecida nos solos é, em geral, bastante elevada, da ordem de  $10^3$  (1.000), podendo chegar a  $10^6$  (1.000.000) bactérias por g de solo. Essas bactérias conseguem formar nódulos e fixar  $N_2$  e, em solos com população estabelecida, o agricultor não perderá a sua safra por falta de reinoculação. As informações de outros países eram de que a reinoculação em áreas com população estabelecida não traria incrementos no rendimento de grãos, contudo, não existiam informações para as condições brasileiras.

Desde a safra de 1992/1993, uma rede de pesquisadores pertencentes a instituições de pesquisa estaduais e federais tem conduzido ensaios em solos com população estabelecida de rizóbios, nos estados de Roraima, do Maranhão, do Mato Grosso, do Mato Grosso do Sul, de Goiás, de Tocantins, do Paraná, do Rio Grande do Sul e no Distrito Federal, visando verificar se existem benefícios pela reinoculação da soja.

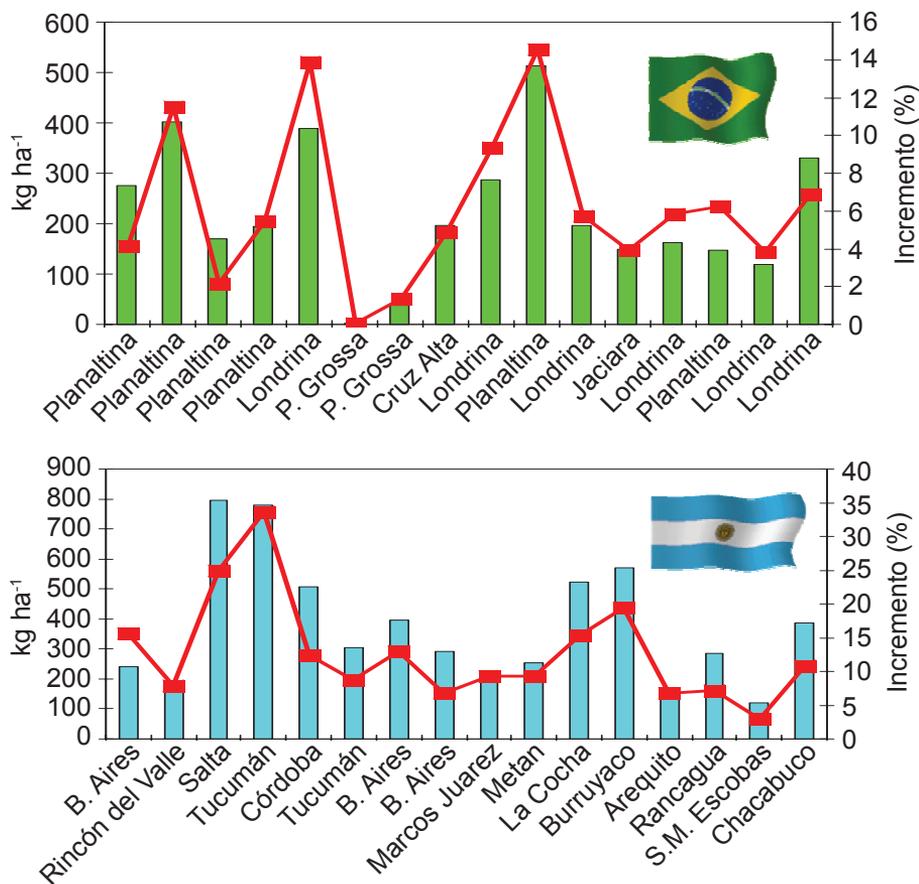
Como exemplo, em experimentos conduzidos por três safras pela Embrapa Cerrados, somente na primeira não houve efeito benéfico da reinoculação e, nos demais anos, os ganhos no rendimento variaram de 80 a 291 kg.ha<sup>-1</sup>, correspondendo a incrementos de 4% a 12,5%. Nos experimentos conduzidos durante cinco safras em Londrina e Ponta Grossa (PR), os incrementos no rendimento, pela reinoculação, variaram de 3,2% a 15,2%.

Em 2000, foi realizada uma análise conjunta dos resultados obtidos em 13 experimentos conduzidos nos principais estados produtores de soja, com diversas cultivares e sob diferentes sistemas de cultivo. Constataram-se incrementos médios, no rendimento de grãos, de 7,8%, nos ensaios da Região Sul, e de 3,8%, na Região Centro-Oeste. Em média, para todos os ensaios, o incremento foi de 4,5%, estatisticamente significativo em relação ao tratamento não inoculado. Além disso, em alguns experimentos foram constatados incrementos de até 23% no rendimento e de 25% no teor de N dos grãos, resultado relevante, uma vez que o baixo teor de proteínas nos grãos pode ser um problema crítico para a indústria de farelo e de alimentos. Mais uma vez, a ação das bactérias fixadoras de  $N_2$

desempenha um papel fundamental para a solução desse problema, pois o N proveniente do processo biológico é mais facilmente translocado para os grãos do que o N mineral.

Uma nova análise foi realizada em 2006, desta vez considerando 30 ensaios, todos com rendimentos superiores a 2.000 kg.ha<sup>-1</sup>. Os incrementos resultantes da reinoculação foram superiores aos constatados na análise prévia, 8% em média, estatisticamente superiores ao rendimento do tratamento sem reinoculação (Hungria et al., 2006a). Também foi realizado um levantamento dos resultados obtidos em 74 ensaios conduzidos na Argentina, sendo constatado, de modo semelhante ao Brasil, que a reinoculação garante incrementos no rendimento. Na análise desses ensaios o incremento médio obtido foi de 14% (Hungria et al., 2006a), mas, segundo experiência de mais de 20 anos de pesquisa (Dr. Roberto Racca e Dra. Norma González, comunicação pessoal), os incrementos, em geral, são da ordem de 8% a 12%. Na figura 7, podem ser visualizados os ganhos de rendimento de grãos obtidos pela reinoculação da soja, em alguns ensaios conduzidos no Brasil e na Argentina. É importante comentar, porém, que a reinoculação não resulta, necessariamente, em incrementos no rendimento de grãos em todos os ensaios conduzidos, tanto no Brasil, como na Argentina. Contudo, isso também ocorre com os demais nutrientes, por exemplo, fósforo, potássio e cálcio, pois a recomendação é baseada na análise estatística de um conjunto de ensaios.

E por que a reinoculação é importante, se no solo já existem tantas bactérias? O que ocorre é que, no solo, essas bactérias estão limitadas por diversos fatores ambientais e, principalmente, nutricionais. Estima-se que, de toda a população microbiana do solo, no máximo 10% dos microrganismos se encontrem no estágio ativo. Conforme já mencionado, com a germinação da soja, moléculas são liberadas pelas sementes e raízes, atraindo as bactérias para a rizosfera, estimulando a sua multiplicação e resultando na formação dos nódulos. Como somente os segmentos radiculares novos são suscetíveis à formação de nódulos, e por um intervalo de tempo curto, muitas vezes as bactérias conseguem entrar em contato com as raízes somente quando essas já apresentam algum crescimento e não haverá nódulos nos segmentos radiculares já formados. Ao contrário, nas sementes inoculadas, carregando dezenas de milhares de bactérias, a



**Figura 7.** Ganhos (em kg ha<sup>-1</sup> e em %) no rendimento de grãos pela reinoculação da soja. Ensaios conduzidos no Brasil e na Argentina, em solos com população estabelecida de rizóbios com, no mínimo, 1.000 células de *Bradyrhizobium* por g de solo. Adaptado de Hungria et al. (2006a).

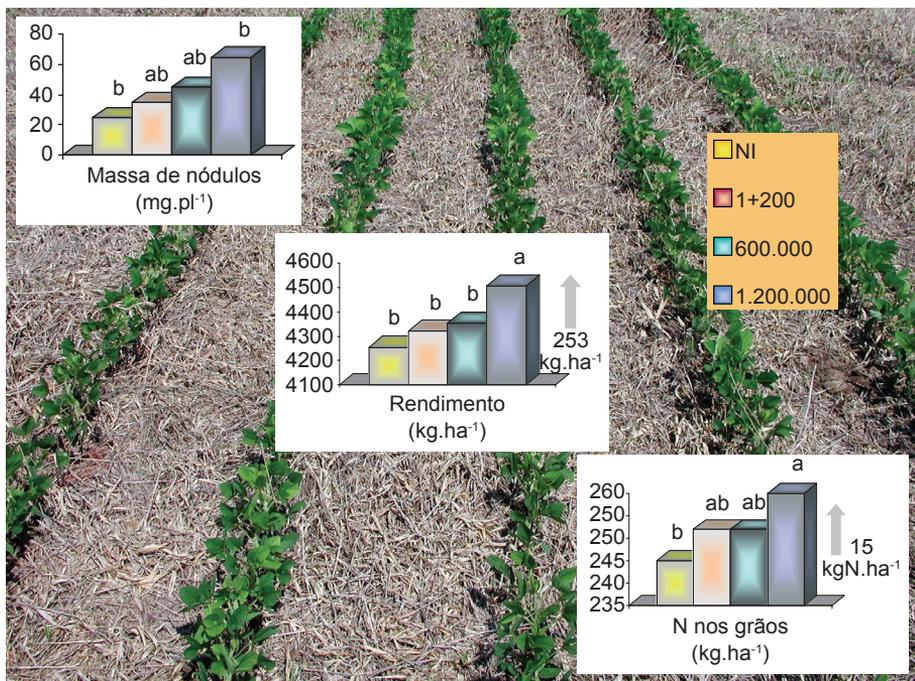
formação de nódulos ocorre prontamente, havendo abundância de nódulos na coroa da raiz principal (Fig. 2B). Esses nódulos são muito importantes para o estabelecimento do processo de fixação biológica e para que a planta não sofra deficiência inicial de N. A divulgação dos benefícios da reinoculação resulta em que, hoje, entre 60% e 70% dos agricultores brasileiros utilizem essa prática.

## 10 Em uma área de cultivo recente, em que foi feito um trabalho cuidadoso de inoculação, ainda assim vale a pena reinocular?

Os resultados do nosso grupo de pesquisa têm mostrado que reinocular vale a pena sempre. Com as tecnologias disponíveis hoje, com as novas cultivares mais produtivas, com a adoção de sistemas conservacionistas, como é o caso do plantio direto, tudo isso vai resultar em altos rendimentos. Mas, com isso, as plantas necessitarão doses elevadas de N e, portanto, obterão benefícios pela reinoculação com estirpes eficientes. Como exemplo, nos solos arenosos sob pastagem degradada de Taciba (SP), improdutivos mesmo para o ganho de peso animal (Fig. 6), para surpresa do agricultor rendimentos superiores a 4.500 kg ha<sup>-1</sup> foram obtidos já no segundo ano de implementação de soja inoculada e sob plantio direto. Além disso, embora tenha sido realizada uma inoculação cuidadosa das sementes e com alta concentração de células nos dois primeiros anos, a reinoculação no terceiro ano ainda foi fundamental para a obtenção de rendimentos elevados (Fig. 8). Esse é apenas um exemplo das várias situações que já foram verificadas pelos pesquisadores da Embrapa e que dão confiança à recomendação de que a reinoculação anual é uma prática que beneficia o agricultor.

## 11 Ganhos de rendimento pela reinoculação também ocorrem em solos sob o sistema de plantio direto?

O sistema de plantio direto tem-se mostrado extremamente favorável à biomassa microbiana do solo e a diversos microrganismos de importância agrícola, como bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> de vida livre ou simbióticas e fungos micorrízicos. Quando experimentos sob os sistemas de plantio direto ou convencional foram comparados, constatou-se que, para a soja, ocorrem incrementos no número de células viáveis de *Bradyrhizobium* no solo, na diversidade genética de *Bradyrhizobium*, na nodulação, no crescimento das plantas, nas taxas de fixação biológica do N<sub>2</sub> e no rendimento de grãos. Essas informações têm gerado, às vezes, dúvidas sobre a necessidade de reinoculação no sistema de plantio direto. Contudo, nos



**Figura 8.** Nodulação, rendimento e N total nos grãos de soja não inoculada (NI), inoculada (I) e recebendo 200 kg de N.ha<sup>-1</sup> (parcelados em 100 kg na semeadura e 100 kg no florescimento) ou inoculadas com 600.000 ou 1.200.000 células de *Bradyrhizobium*.semente<sup>-1</sup>. Terceiro ano de um ensaio conduzido em solo arenoso sob pastagem degradada em Taciba (SP).

ensaio conduzido em rede nacional sob plantio direto, também foram constatados incrementos no rendimento da soja pela reinoculação, justificando a utilização dessa tecnologia para maximizar a produtividade da cultura.

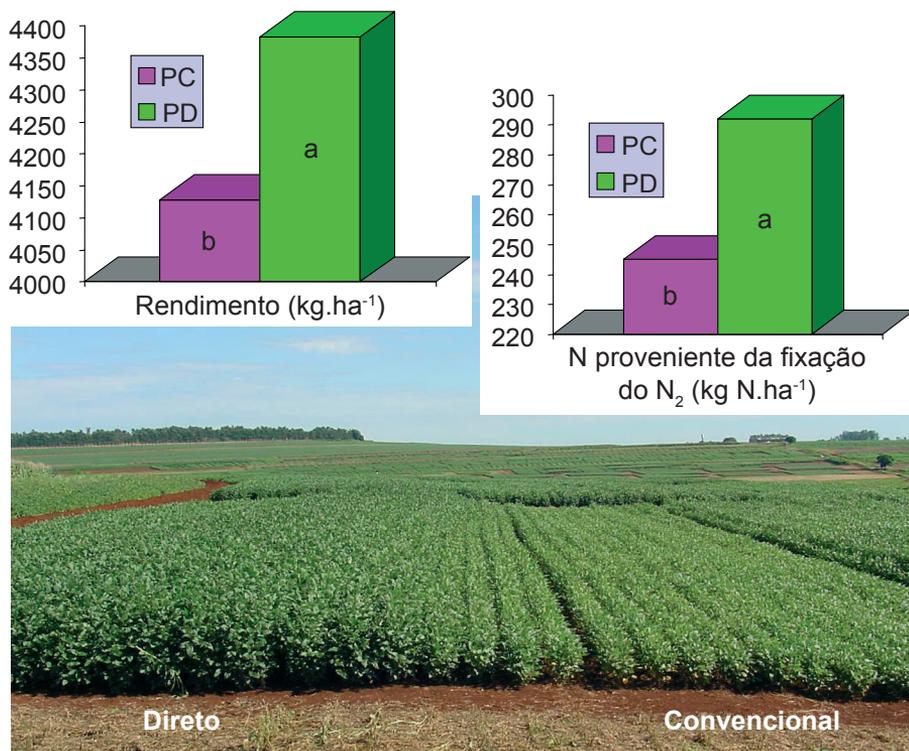
Ainda em relação ao sistema de plantio direto, já surgiram dúvidas sobre a necessidade de complementação com uma dose inicial de fertilizante nitrogenado, visto que pode ocorrer imobilização elevada do N do solo pela palhada, causando deficiência desse nutriente na cultura. Contudo, quanto menor for o teor de N do solo, maior será a contribuição do processo biológico e, mesmo em solos recebendo grande quantidade de

resíduos vegetais, até 26 toneladas de matéria seca.ha<sup>-1</sup>, com alta relação C/N, não houve resposta à aplicação de até 30 kg de N.ha<sup>-1</sup>. Em outros ensaios conduzidos com soja em plantio direto, nas safras 1998/1999 e 1999/2000, nos Cerrados, também não houve resposta à aplicação de até 40 kg de N.ha<sup>-1</sup>.

Hoje, não restam dúvidas sobre as vantagens de adoção do sistema de plantio direto para as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo. Os efeitos positivos na fixação biológica do N<sub>2</sub>, conforme mostrado na figura 9, estão entre as dezenas de benefícios constatados e que justificam a expansão desse sistema, que já ocupa cerca de 24 milhões de ha no Brasil.

## **12 Os incrementos no rendimento obtidos pela reinoculação compensam financeiramente?**

O inoculante é um insumo barato, mas muitos agricultores reclamam que o processo da inoculação é laborioso. Podem, então, pairar dúvidas sobre as vantagens da reinoculação da soja, nos casos de incrementos no rendimento ao redor de 4,5% a 8%. Contudo, vários pontos precisam ser considerados. Em um programa de melhoramento bem sucedido, esperam-se incrementos no rendimento da ordem de 5% a cada cinco anos de pesquisas intensivas e, portanto, ao deixar de inocular, o agricultor pode estar perdendo os ganhos que teria, por exemplo, por estar usando uma nova cultivar de soja mais produtiva. Deve-se considerar, ainda, que, com a globalização do mercado, a diferenciação entre agricultores bem ou mal sucedidos estará em pequenos incrementos no rendimento e na redução do custo da produção. Além disso, para se manter no mercado e preservar o valor de sua terra, o agricultor não pode ser imediatista. Assim, poderá ser retirado N do solo durante algumas safras mas, com o empobrecimento do solo, as produtividades cairão. Por outro lado, a competitividade do agricultor é estabelecida pela máxima relação custo/benefício, justificando a reinoculação e não o uso de um insumo caro, como é o caso do fertilizante nitrogenado. A longo prazo, evitando o uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados, o agricultor estará contribuindo, ainda, para a preservação



**Figura 9.** Rendimento e N proveniente da fixação biológica do N<sub>2</sub> em soja inoculada sob os sistemas de plantio convencional ou direto (modificado de Hungria et al., 2006a). Os valores diferem estatisticamente para cada parâmetros (Duncan, 5%). Ao fundo, foto de um ensaio conduzido há 10 anos na Embrapa Soja, em Londrina (PR), pelo Dr. Eleno Torres.

das águas dos rios e lagos e economizando derivados de petróleo, uma fonte energética não-renovável.

Os retornos econômicos obtidos pela reinoculação podem ser muito importantes para o agricultor. Nos 16 ensaios conduzidos no Brasil e representados na figura 7, por exemplo, os incrementos pela reinoculação da soja variaram de 38 a 1.118 kg.ha<sup>-1</sup> e, em média, foram de 304 kg de grãos.ha<sup>-1</sup>, ou 5 sacas.ha<sup>-1</sup> (de 60 kg). Considerando o custo aproximado de inoculação das sementes de US\$ 3,50.ha<sup>-1</sup> (preço do inoculante + custo

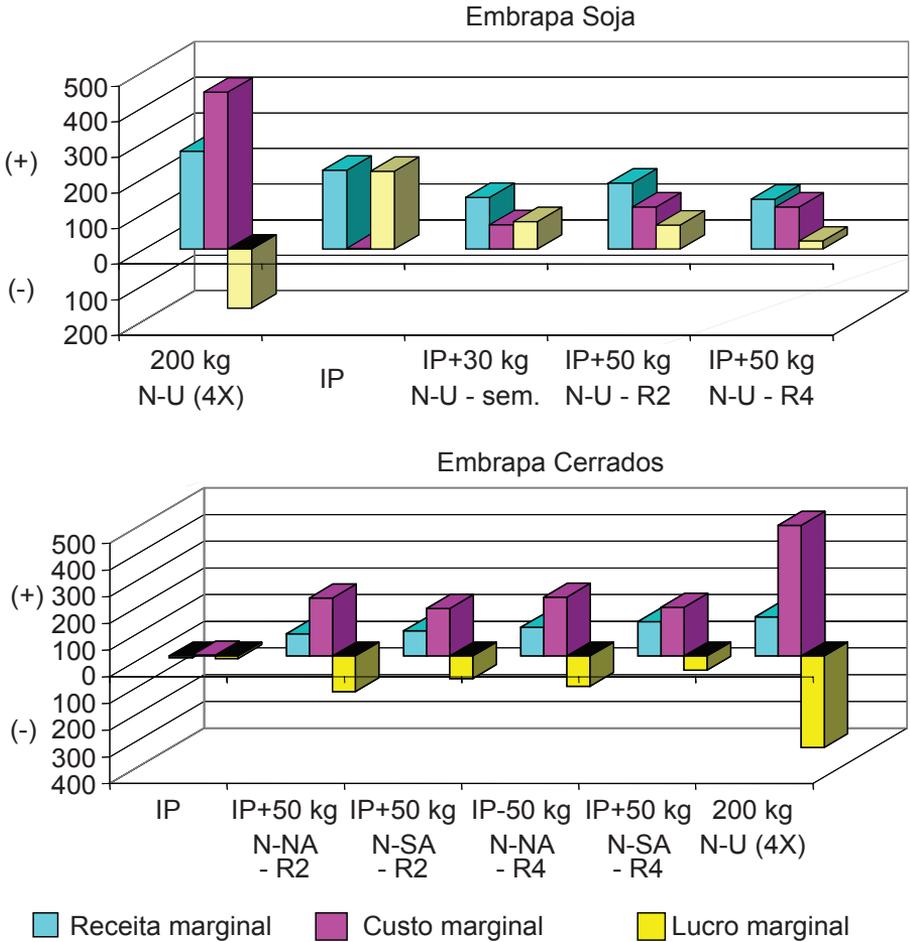
da aplicação), este equivaleria a, aproximadamente, de 0,45% (DF) a um máximo de 0,68% (RS) do custo atual de produção da soja, não restando dúvidas de que essa tecnologia tem um retorno econômico elevado.

Outro exemplo importante de economia para o agricultor vem da análise dos ensaios em que, além da reinoculação, foi avaliado o efeito da suplementação com fertilizante nitrogenado. Nos 20 ensaios conduzidos em Londrina e Ponta Grossa (Fig. 4), a reinoculação garantiu um incremento médio de 127 kg.ha<sup>-1</sup>, ou seja, 2 sacas.ha<sup>-1</sup>. A análise econômica desses ensaios indica, claramente, os lucros marginais superiores obtidos pela reinoculação (Fig. 10). Ainda nesse ensaio, considerando somente o caso da recomendação de 30 kg de N.ha<sup>-1</sup> na semeadura, isso implicaria, ao preço médio de US\$ 1,0.kg<sup>-1</sup> de N, em um custo de US\$ 30,0.ha<sup>-1</sup> para o agricultor. Se essa recomendação fosse adotada nos 22 milhões de ha cultivados em 2005/2006, isso representaria um custo de quase US\$ 660 milhões para o país em apenas uma safra.

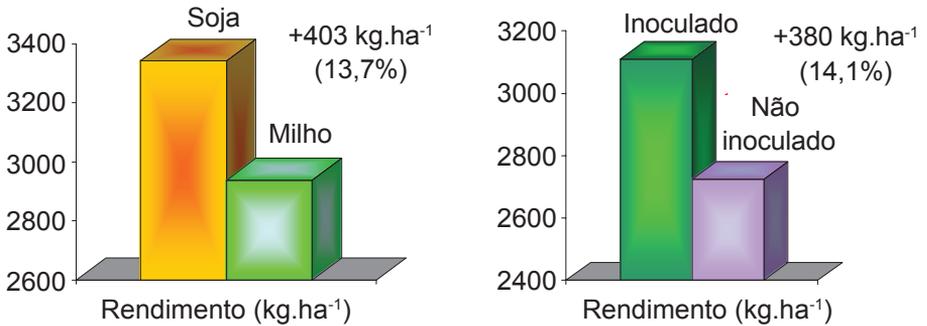
Nos ensaios conduzidos pela Embrapa Cerrados (Tabela 2), embora o lucro marginal pela reinoculação tenha sido menor do que na Região Sul, os prejuízos resultantes da aplicação de fertilizantes nitrogenados são ainda mais evidentes (Fig. 10) e, embora a aplicação de N tenha, em alguns casos, resultado em maior produção de grãos (Tabela 2), esse ganho nunca foi economicamente viável (Fig. 10).

### **13 A demanda elevada da soja por N pode causar um balanço negativo desse nutriente para a próxima cultura?**

Existem relatos, na literatura, de que, em condições favoráveis de fixação do N<sub>2</sub>, a cultura poderá enriquecer o solo com seus restos culturais. Não existem muitas observações feitas no Brasil, mas os resultados já obtidos indicam que não só a soja é capaz de obter todo o N necessário ao seu crescimento pela fixação biológica, como também a planta deixa resíduos de N para a cultura seguinte. A figura 11 mostra os resultados obtidos na Embrapa Trigo, em Passo Fundo (RS), em que o trigo cultivado após a soja produziu, em média, 403 kg.ha<sup>-1</sup> a mais do que quando cultivado após o



**Figura 10.** Receita, custo e lucro marginais (R\$.ha<sup>-1</sup>) da reinoculação (IP, inoculante turfoso padrão, com as exigências de qualidade da legislação), com ou sem a aplicação de fertilizante, fornecido como uréia (U), nitrato de amônio (NA), ou sulfato de amônio (SA), fornecidos na semeadura (sem.), em R2 (início do florescimento) ou em R4 (enchimento dos grãos). No tratamento controle, os 200 kg de N-uréia foram parcelados em quatro vezes. Análise dos ensaios conduzidos pela Embrapa Soja (Fig. 4) e pela Embrapa Cerrados (Tabela 2). (Dra. Jozeneida L.P. Aguiar e Dr. Tito C.R. Sousa, Embrapa Cerrados, dados não publicados).



**Figura 11.** (A) Rendimento médio (kg.ha<sup>-1</sup>) de trigo em Passo Fundo (RS), cultivado após as culturas da soja ou do milho; médias de oito anos de ensaios e o trigo não recebeu nenhum fertilizante nitrogenado (Wiethölter, 2000). (B) Rendimento médio de trigo em Londrina (PR), cultivado após a cultura da soja, em parcelas cujas sementes haviam sido inoculadas no verão; médias de nove anos de ensaios e o trigo não recebeu fertilizante nitrogenado.

milho. Em Londrina (PR), a reinoculação da soja garantiu não só benefícios à própria cultura, como também ao trigo, que produziu, em média, 380 kg.ha<sup>-1</sup> a mais quando cultivado nas parcelas que haviam sido inoculadas (Fig. 11). Em outro estudo conduzido em Londrina, foi constatado que a soja deixou, aproximadamente, 30 kg de N.ha<sup>-1</sup> para a cultura seguinte (Dr. Bruno R.J. Alves, Embrapa Agrobiologia, dados não publicados).

## 14 A soja transgênica também se beneficia da fixação biológica do nitrogênio?

O cultivo comercial da soja tolerante ao herbicida glifosato (também denominada *Round up Ready*, ou soja RR) teve início em 1996 nos E.U.A., abrindo novas oportunidades para o controle de ervas daninhas na cultura e possibilitando a substituição, e/ou redução, no uso de herbicidas de pós-emergência nessa cultura. Em 2003, o cultivo da soja RR ocupou 81% da área cultivada com essa cultura nos E.U.A. e, já na safra 2004/2005, estima-se que cerca 9,4 milhões de hectares tenham sido semeados com soja transgênica resistente ao herbicida glifosato no Brasil.

O uso de herbicidas pode afetar a fixação biológica do  $N_2$  diretamente, através de efeitos sobre a bactéria ou na simbiose, ou indiretamente, através de efeitos na leguminosa hospedeira. O glifosato é um herbicida pós-emergente, pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas, classificado como não seletivo e de ação sistêmica. Controla uma ampla variedade de plantas invasoras e apresenta inativação rápida. Atua como um potente inibidor da atividade da 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), que é catalisadora de uma das reações de síntese dos aminoácidos aromáticos essenciais (fenilalanina, tirosina e triptofano) e está presente em plantas e microrganismos, porém, ausente em animais (explicando sua baixa toxicidade em mamíferos). A base de resistência das plantas de soja transgênica ao glifosato é a inserção de um gene EPSPS, oriundo da bactéria *Agrobacterium* estirpe CP4, que é insensível a esse herbicida e que permite a expressão funcional da via do ácido chiquímico na sua presença.

Teoricamente, a introdução do gene EPSPS não deveria afetar a fixação biológica do  $N_2$ , contudo, a introdução de qualquer gene pode afetar o equilíbrio genético e apresentar outros efeitos não esperados. Como a fixação biológica do  $N_2$  é essencial para a cultura da soja no Brasil, a Embrapa implementou, em 2003, um projeto visando avaliar a simbiose das estirpes comerciais com cultivares transgênicas. Pode-se constatar, até o presente momento, que as cultivares transgênicas avaliadas, BRS242RR, BRS244RR, BRS245RR, BalizaRR, Valiosa e SilvâniaRR foram altamente produtivas, apresentaram boa nodulação e fixação do  $N_2$  e também responderam à reinoculação. Somente no final do quarto ano, porém, será possível fazer uma análise cautelosa de todos os dados obtidos para verificar se existem diferenças nas taxas de fixação do  $N_2$  entre os materiais transgênicos e os convencionais.

## 15 Como deve ser o inoculante para a soja?

Para que a inoculação dê retorno econômico ao agricultor, o inoculante precisa ser de boa qualidade. Para isso, alguns critérios precisam ser observados:

## Quais bactérias devem estar no inoculante?

Os pesquisadores da área de microbiologia do solo procuram selecionar estirpes cada vez mais eficientes, principalmente porque, como as novas cultivares de soja são mais produtivas, as bactérias devem apresentar taxas mais elevadas de fixação do  $N_2$ . A determinação das estirpes recomendadas é complexa, pois deve considerar diversos fatores, como a eficiência com todas as cultivares recomendadas, a capacidade de competir com os organismos do solo, a fermentação adequada na indústria e, principalmente, a capacidade de se adaptar aos solos, sem nenhum prejuízo à microflora natural do mesmo. Desse modo, para definir as melhores estirpes, os pesquisadores se reúnem, a cada dois anos, em um fórum denominado RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola) e, após a análise dos resultados obtidos, uma lista com o nome das melhores estirpes é enviada ao Ministério da Agricultura. As indústrias de inoculante recebem, sem nenhum custo tecnológico, essas bactérias. Inoculantes provenientes de outros países também podem ser comercializados no Brasil, desde que atendam às exigências da legislação nacional, inclusive a de utilizar somente estirpes recomendadas pela pesquisa brasileira.

Hoje, são recomendadas quatro estirpes para a cultura da soja, duas da espécie *Bradyrhizobium elkanii*, SEMIA 587 e SEMIA 5019 (=29W), que vêm sendo utilizadas em inoculantes comerciais desde 1979 e duas da espécie *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 ou CPAC 15 e SEMIA 5080 ou CPAC 7), utilizadas desde 1992. Em 1994, ficou decidido, na RELARE, que os inoculantes para a cultura da soja comercializados no Brasil deveriam conter duas dessas quatro estirpes, em qualquer combinação. Essas estirpes constam da “Relação de Microrganismos Autorizados para a Produção de Inoculantes no Brasil”, no Anexo II, da Instrução Normativa nº 10, de 21 de março de 2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA, 2006).

As combinações de estirpes mais utilizadas têm sido a SEMIA 587 + SEMIA 5019, em áreas já cultivadas no sul do País e a SEMIA 5079 + SEMIA 5080, nos Cerrados. Em 2006, a RELARE decidiu que, a partir de 2007, os inoculantes poderão conter, também, somente uma das quatro

estirpes recomendadas. Isso ocorre porque cada uma das quatro estirpes é bastante eficiente e consegue fornecer N para as cultivares mais produtivas atualmente disponíveis, permitindo rendimentos superiores a 4.000 kg.ha<sup>-1</sup>. A recomendação de inoculantes com duas estirpes tem origem nos anos 1960, quando a soja era cultivada em muitas áreas novas e visava aumentar a possibilidade de nodulação frente a várias cultivares e condições ambientais. Isso já não se justifica hoje, pois a maioria dos solos cultivados com a soja já apresenta uma população estabelecida por inoculações anteriores. Desse modo, a introdução de apenas uma estirpe altamente eficiente já garante os benefícios da reinoculação. Em termos industriais, é mais fácil produzir um inoculante de alta qualidade e sem contaminação com uma única estirpe.

### **E o número de células, é importante?**

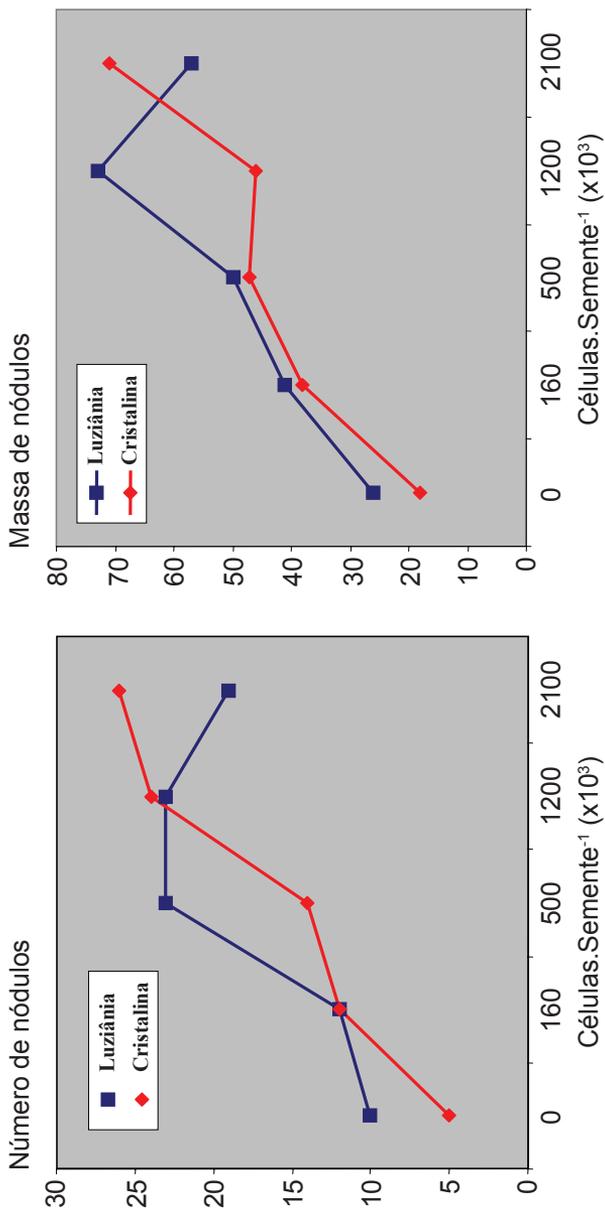
O controle de qualidade dos inoculantes sempre foi uma preocupação dos pesquisadores, desde os primórdios de comercialização dos inoculantes no Brasil. Assim, os pesquisadores demandaram, em 1975, que o Ministério da Agricultura realizasse o controle oficial de qualidade dos inoculantes, que deveria conter, no mínimo, 10<sup>7</sup> células.g<sup>-1</sup> de inoculante. Nessa época, os relatos são de que doses “normais” de inoculantes resultariam em cerca de 7.000 células.semente<sup>-1</sup>. Em 17 de dezembro de 1980 foi publicada a primeira lei sobre inspeção e fiscalização de inoculantes (Lei Nº 6894 do Ministério da Agricultura), que recebeu uma ementa e foi regulamentada pelo Decreto Nº 86955 de 18 de fevereiro de 1982, passando a exigir a concentração de número superior a cem milhões (10<sup>8</sup>) de células viáveis de rizóbio por grama de produto na indústria e a dez milhões (10<sup>7</sup>) em inoculantes amostrados no comércio, estabelecendo, também, multas para os inoculantes com concentração inferior à exigida.

Apesar da legislação em vigor, a fiscalização foi pequena na década de 1980 e meados de 1990; além disso, não havia controle sobre o número de contaminantes no inoculante. Infelizmente, nessa época muitos inoculantes analisados possuíam mais contaminantes do que rizóbios. Com a criação do Mercosul, o mercado brasileiro foi aberto para inoculantes de outros países, desde que fossem produzidos com as estirpes brasileiras,

e foi discutida uma legislação mínima comum para os países integrantes. Desde então, o MAPA passou a investir no treinamento dos seus técnicos, para realizar fiscalização adequada. Além disso, no fórum da RELARE, novos padrões de qualidade dos inoculantes passaram a ser discutidos, visando melhorar a qualidade dos produtos comercializados.

Finalmente, em 2004, foi publicada a Instrução Normativa Nº 5, indicando que os inoculantes devem apresentar **concentração mínima de  $1,0 \cdot 10^9$  células viáveis por g ou mL do produto até a data de vencimento**, que deve ser de, no mínimo, seis meses. Além disso, os inoculantes devem ser elaborados em suporte estéril e estar isentos de microrganismos não especificados na diluição de  $1 \cdot 10^{-5}$  (MAPA, 2004). No caso da soja, a dosagem recomendada deve, ainda, resultar em, no mínimo, **600.000 células por semente** (cálculo teórico) e, no caso de aplicação no sulco de semeadura, deverá ser utilizada, por hectare, **seis vezes a dose recomendada** para a aplicação nas sementes (MAPA, 2006). É importante salientar, porém, que a pesquisa já recomenda  $1.200.000 \text{ células.semente}^{-1}$  (cálculo teórico).

À primeira vista, parece um número elevado de células por semente, contudo, abaixo desse número, a probabilidade de sucesso é muito pequena, principalmente em solos já cultivados com a soja. Isso ocorre porque alguns estudos determinaram que, para conseguir competir com a população estabelecida do solo, é necessária uma vantagem numérica de, pelo menos, 1.000 vezes. Como a população estabelecida nas áreas tradicionais de soja atinge, freqüentemente,  $10^3$  a  $10^5$  bactérias.g<sup>-1</sup> de solo, isso justifica a necessidade de utilização de inoculantes ricos em bactérias. Finalmente, deve-se considerar que a sobrevivência das bactérias difere com o tipo de solo e com as condições ambientais. Como exemplo, a sobrevivência é muito baixa em solos arenosos, sob temperaturas elevadas e com baixa umidade e mais elevada em solos com teores elevados de matéria orgânica, de argila e com cobertura. Como a soja é cultivada de Roraima ao Rio Grande do Sul, em uma grande diversidade de solos, a recomendação deve procurar atender a maioria das áreas. Contudo, sob condições menos favoráveis é desejável colocar um número ainda mais elevado de células. Como exemplo, na figura 12, pode ser visualizado que, em um ensaio conduzido em Cristalina, a aplicação de 2,1 milhões de células.semente<sup>-1</sup> resultou em maior nodulação da soja e, em outros



**Figura 12.** Número (no.pl<sup>-1</sup>) e massa de nódulos (mg.pl<sup>-1</sup>) em soja, em função da concentração de células de *Bradyrhizobium* na semente. Ensaios a campo conduzidos em Luizânia e Cristalina (GO) e os dados representam médias de seis repetições. Segundo Dr. Rubens J. Campo & Dra. Mariângela Hungria (dados não publicados).

ensaios (dados não mostrados), incrementos na nodulação ainda foram verificados com 3 milhões de células semente<sup>-1</sup>.

O agricultor não pode se esquecer de que, quanto maior o número de células na semente, maior será a probabilidade de nodulação bem sucedida, especialmente na coroa da raiz, iniciando prontamente a fixação biológica e o fluxo de N para a planta. Por isso, o agricultor deve considerar, cuidadosamente, algumas recomendações de diluição de produtos com altas concentrações de células, que podem ser desvantajosas para a planta.

### **Como fazer o cálculo teórico do número de células de *Bradyrhizobium* por semente?**

Para fazer esse cálculo, é necessário conhecer apenas a concentração do inoculante, o que deve vir no rótulo do produto, e o peso da semente que será utilizada, o que pode ser obtido a partir da descrição das cultivares (peso de 100 sementes). A seguir, será dado um exemplo de cálculo

#### Informações disponíveis

População desejada → 600.000 células por semente

1 kg de sementes da cultivar → 7.000 sementes

Concentração do inoculante adquirido →  $2,4 \cdot 10^9$  células por g (turfa) ou mL (líquido) do produto

#### Cálculo

O agricultor deseja 600.000 células X 7.000 sementes →  $4,2 \cdot 10^9$  células por kg de semente

Tendo um inoculante com  $2,4 \cdot 10^9$ , será necessário fazer a divisão →  $4,2 \cdot 10^9 / 2,4 \cdot 10^9 = 1,75$  mL ou g de produto por kg de semente

Para uma saca de 50 kg de sementes serão necessários, portanto → 1,75 g ou mL do produto X 50 kg de semente = 87 g ou 87 mL do produto.

É muito importante salientar, porém, que as sementes devem receber uma cobertura uniforme do inoculante. Na prática, embora a concentração de células possa ser adequada, dificilmente se obtém uma boa distribuição com volumes inferiores a 100 mL por 50 kg de sementes.

## **Como saber se o número de células do inoculante é adequado?**

Os fiscais do MAPA recebem treinamento intensivo na área de inoculantes. Em caso de dúvida sobre a qualidade de um inoculante, o fiscal do MAPA responsável pela região deverá ser acionado para retirar amostras do local de armazenagem, ou de venda, onde o armazenamento sob condições adequadas é obrigatório. Essas amostras serão enviadas para a análise em um laboratório credenciado pelo MAPA, atualmente, na FEPAGRO, em Porto Alegre (RS). Quando o agricultor quiser conhecer a qualidade de um produto, ou decidir sobre a compra de produtos, ele pode enviar inoculantes para a análise em qualquer laboratório de microbiologia especializado. Contudo, é muito importante salientar que, em caso de questionamento jurídico sobre a qualidade do produto, a análise só terá validade se for retirada pelo fiscal do MAPA e enviada ao laboratório oficial.

## **Quais as vantagens do inoculante turfoso e em que dose ele deve ser usado?**

Os inoculantes à base de turfa, cujo pH é previamente corrigido a 6,5-7,0, têm sido utilizados há décadas, no Brasil e no exterior, com excelentes resultados. Representam um excelente veículo para o rizóbio, visto que a turfa é rica em matéria orgânica, resultante da decomposição de restos vegetais, portanto, uma fonte importante de nutrientes para as bactérias. Contudo, a turfa deve apresentar textura fina, baixo teor de argila e ser isenta de areia e partículas grosseiras. Essas características podem ser avaliadas tomando uma amostra de inoculante, adicionando água e pressionando essa mistura entre o indicador e o polegar, quando não deverá ser sentida a presença de areia. Cabe também comentar que, a longo prazo, a retirada de turfa, um recurso natural não renovável, pode ser limitada e, inclusive, já está proibida na Europa. Por isso há necessidade de investir em novas formulações de inoculantes.

A turfa apresenta diversas propriedades que resultam em proteção física às bactérias e, por sua capacidade de retenção de umidade, permite maior sobrevivência em condições de deficiência hídrica, bem como sob temperaturas elevadas. Além disso, o teor elevado de matéria orgânica da turfa representa uma boa fonte de nutrientes para os rizóbios. A dose

de inoculante turfoso usada deve ser recomendada por cada fabricante e deve permitir concentração adequada de células na semente. Contudo, respostas favoráveis à reinoculação da soja pelo uso de 500 g de inoculante.50 kg<sup>-1</sup> de semente, conforme pode ser constatado na Tabela 3, são, freqüentemente, observadas e, provavelmente, ocorrem, em grande parte, devido à proteção física fornecida por essa maior quantidade de turfa. Entretanto, doses superiores a 500 g resultarão em acúmulo de turfa na caixa de sementes, dificultando a operação de semeadura e aumentando o desgaste das máquinas por abrasão mecânica.

**Tabela 3.** Efeito de doses de inoculante turfoso na aderência às sementes e no rendimento de soja, cv. BR-37. O inoculante contendo 10<sup>8</sup> células.g<sup>-1</sup> foi aderido às sementes com 300 mL de solução açucarada a 15%. Segundo Brandão Junior & Hungria (2000b).

Dose do inoculante (g.50 kg <sup>-1</sup> )	Inoculante aderido		Rendimento (kg.ha <sup>-1</sup> )
	(%)	(g)	
0	-	-	2.878 bc <sup>2</sup>
250	92,2 a <sup>1</sup>	230,4	2.804 c
500	88,5 a	442,8	3.044 a
750	80,0 b	600,0	2.884 bc
1000	66,2 c	666,2	2.954 ab
CV(%) <sup>2</sup>		31,0	6,7

<sup>1</sup> Os dados representam médias de seis repetições e, quando seguidos pela mesma letra, em cada coluna, não diferem estatisticamente (Duncan, 5%).

<sup>2</sup> CV, coeficiente de variação.

A nova legislação exige, obrigatoriamente, a esterilização da turfa, de modo que não possam ser detectados contaminantes na diluição de 10<sup>-5</sup>. Essa necessidade surgiu porque, na indústria, o rizóbio é multiplicado em grandes fermentadores industriais e um determinado volume é injetado nos saquinhos com turfa. Em turfa não esterilizada, o rizóbio terá que competir com os outros microrganismos presentes nela, como fungos, actinomicetos e outras bactérias, o que prejudicará o seu crescimento, dificultando a obtenção do número adequado de células. Quando a turfa é esterilizada,

não existe competição, contribuindo, de um modo decisivo, tanto para o maior número de células, quanto para a sobrevivência das bactérias por um tempo maior. Além disso, a esterilização visa evitar a introdução de patógenos no solo, que podem estar presentes na turfa. A grande maioria dos inoculantes turfosos comercializada atualmente no Brasil é esterilizada por radiação gama, contudo, pela natureza da turfa, é extremamente difícil conseguir a esterilização total, razão pela qual, até o presente momento, é dada uma tolerância à presença de contaminantes.

### **É importante usar uma substância adesiva para o inoculante turfoso?**

A aderência do inoculante turfoso às sementes depende das propriedades físicas e químicas de cada turfa, contudo, é geralmente baixa. Desse modo, é de extrema importância usar uma substância que permita a adesão do inoculante às sementes. Essa substância pode ser goma arábica a 20%, ou outros produtos recomendados pelos fabricantes, contudo, pela facilidade, a maior utilização é de solução açucarada a 10%. A importância da utilização do adesivo fica evidenciada pelos dados mostrados na Tabela 4, onde se constata um incremento de 90% na percentagem de inoculante aderido às sementes pelo uso de solução açucarada a 10%, resultando em maior produtividade a campo. Desse modo, se somente água fosse utilizada como aderente, o agricultor estaria deixando, na caixa de sementes, 259 g de cada 500 g de inoculante. É importante salientar, ainda, que a pesquisa constatou que o uso de solução açucarada a 10% não resulta em doenças nas sementes, nem altera o vigor das mesmas.

### **Os inoculantes líquidos são tão eficazes quanto os turfosos?**

Em geral, o agricultor prefere fórmulas líquidas, pela facilidade no tratamento da semente e pelo menor desgaste das máquinas. Particularmente com a criação do Mercosul, a eficiência agrônômica de diversos inoculantes líquidos, a maioria proveniente da Argentina, passou a ser verificada para as condições brasileiras, até que, em 2000, foi definido, na RELARE, que caísse a restrição à tecnologia do inoculante líquido. Desse modo, qualquer

**Tabela 4.** Efeito de diferentes concentrações de solução açucarada na aderência do inoculante turfoso às sementes e no rendimento da soja, cv. BR-37. Aderente e inoculante ( $10^8$  células.g<sup>-1</sup> de inoculante) foram aplicados na dose de 300 mL de solução açucarada por 500 g de inoculante em cada 50 kg de semente, com as estirpes de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 e SEMIA 5019. Ensaios conduzidos em solos com população estabelecida de *Bradyrhizobium*. Segundo Brandão Junior & Hungria (2000a).

Concentração de açúcar	Inoculante aderido		Rendimento (kg.ha <sup>-1</sup> )	
	(%)	(g)	Londrina	Ponta Grossa
0	48,2 b <sup>1</sup>	241,0	2.692 ab <sup>2</sup>	2.312 a <sup>2</sup>
10%	91,5 a	457,4	2.952 a	2.290 a
15%	92,0 a	460,0	2.568 b	2.460 a
20%	88,0 a	440,0	2.680 ab	2.393 a
25%	80,9 a	404,5	2.710 ab	2.363 a
CV(% <sup>2</sup> )		13,0	10,7	13,7

<sup>1</sup> Os dados representam médias de dois ensaios, cada um com seis repetições e, quando seguidos pela mesma letra, em cada coluna, não diferem estatisticamente (Duncan, 5%).

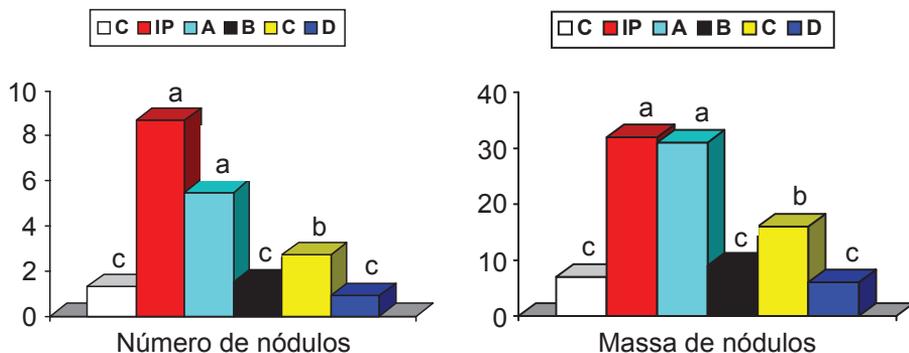
<sup>2</sup> CV, coeficiente de variação.

inoculante poderia ser registrado no Brasil, independente da formulação, desde que apresentasse qualidade dentro dos padrões legais e eficiência agrônômica comprovada em ensaios que tenham, como controle, o inoculante turfoso.

O bom desempenho de um inoculante não turfoso depende das moléculas protetoras dos rizóbios presentes nas formulações. Conforme já discutido, a turfa oferece boa proteção física e nutricional ao rizóbio e as novas formulações precisam ser testadas, também, quanto à compatibilidade com fungicidas e micronutrientes.

Uma vantagem dos inoculantes líquidos é a facilidade de esterilização do meio de cultura em que serão crescidos os rizóbios, evitando a presença de contaminantes. Em consequência, é possível obter um maior número de células de rizóbios no produto e na semente. Contudo, o agricultor, ao comprar o produto, deve solicitar os resultados dos testes de eficiência

agronômica do produto, conduzidos por uma instituição pública e credenciada pelo MAPA, pois somente a concentração de células no inoculante não é garantia de boa sobrevivência no solo. Na figura 13, estão representados, como exemplo, os resultados obtidos em um ensaio a campo em que quatro inoculantes líquidos foram comparados com o turfoso padrão e onde foi demonstrado que apenas o inoculante “A” era eficaz na formação de nódulos. Com a abertura do mercado para as formulações líquidas, já em 2001 eles representaram 48% de todos os inoculantes comercializados no mercado brasileiro.



**Figura 13.** Número de nódulos ( $n^{\circ}$ .planta $^{-1}$ ) e massa de nódulos secos (mg.planta $^{-1}$ ) em soja, cv. BR-37, não inoculada (controle, C), recebendo inoculante turfoso padrão, com as exigências de qualidade da legislação (IP), ou com quatro inoculantes líquidos. Todos os inoculantes foram padronizados com a mesma concentração de células. Experimento conduzido em solo de primeiro ano de cultivo, com menos de 100 células.g $^{-1}$  de solo, em Ponta Grossa (PR). Médias de seis repetições e valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste “t” (5%).

### Que cuidados tomar na hora da compra do inoculante?

1. Verificar se o produto apresenta o número de registro do MAPA pois, freqüentemente, entram no País produtos de origem e qualidade duvidosas, com estirpes que não são as recomendadas pela pesquisa;
2. Verificar o prazo de validade do inoculante, que deve constar da embalagem. Jamais comprar inoculante vencido;

3. Certificar-se de que o produto, antes de ser comprado, era conservado em condições adequadas de umidade e temperatura (no máximo 30°C). Após a aquisição, conservar o inoculante em local protegido do sol e arejado até o momento da utilização. Não esquecer que o inoculante contém seres vivos, sensíveis ao calor; e
4. Em caso de dúvida, contactar um fiscal do MAPA.

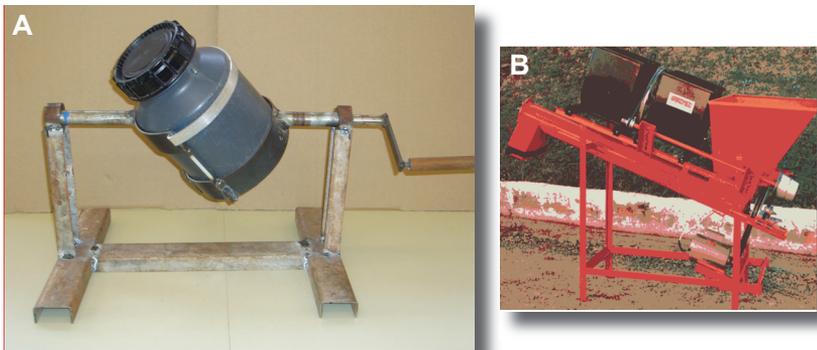
## 16 Como deve ser feita a inoculação das sementes?

### Inoculante turfoso e tambor rotatório, sem ou com fungicidas e os micronutrientes Co e Mo

O processo de tratamento das sementes com inoculantes deve ser sempre feito à sombra e, preferencialmente, pela manhã. Manter a semente inoculada protegida do sol e do calor excessivos.

No caso de **inoculante turfoso, com tambor rotatório** (Fig. 14A) com eixo excêntrico, proceder da seguinte maneira:

1. dissolver 100 g de açúcar (cinco colheres de sopa, de qualquer tipo ou marca, de açúcar) em um litro de água. O açúcar pode ser substituído por outras substâncias adesivas recomendadas pelos fabricantes;



**Figura 14.** (A) Tambor rotatório adaptado e (B) máquina que pode ser acoplada à tomada do trator - ambos utilizados para inoculação e tratamento das sementes.

2. adicionar a solução açucarada às sementes, na proporção de 300 mL de solução para 50 kg de sementes. Misturar no tambor rotatório, dando algumas voltas com a manivela;
3. adicionar o inoculante turfoso, conforme recomendação do fabricante, na proporção máxima de 500 g por 50 kg de sementes, e misturar no tambor rotatório;

(Alternativamente, também é possível misturar 300 mL da solução açucarada a 500 g de inoculante e, então, adicionar essa mistura a 50 kg de sementes);

4. espalhar as sementes inoculadas em camadas de 10 a 30 cm sobre uma superfície seca, à sombra. Deixar secar por pelo menos uma hora;
5. semear logo após a inoculação ou, no máximo, após dois dias, desde que as sementes fiquem em ambiente protegido do sol e da umidade;
6. durante a semeadura, se o depósito de sementes na máquina ficar muito aquecido (temperatura superior a 35°C), deve-se interromper a atividade e resfriar a caixa, pois o calor pode matar as bactérias; e
7. é imprescindível que a distribuição do inoculante turfoso seja uniforme em todas as sementes, para garantir os benefícios da fixação biológica do N<sub>2</sub>.

Quando também for realizado o **tratamento de sementes com fungicidas**:

1. adicionar a solução açucarada às sementes (300 mL de solução açucarada a 10% para 50 kg de sementes) e misturar no tambor rotatório;
2. adicionar o fungicida e misturar no tambor rotatório;
3. em seguida, adicionar o inoculante turfoso e misturar no tambor rotatório;
4. deixar secar à sombra, por pelo menos uma hora;
5. fazer a semeadura logo após a inoculação; caso não seja possível semear em até 24 horas, repetir a inoculação no dia da semeadura. Para inoculantes acompanhados ou possuidores de protetores específicos, que garantam a viabilidade da bactéria na semente, seguir a orientação do fabricante;

6. durante a semeadura, se o depósito de sementes na máquina ficar muito aquecido (temperatura superior a 35°C), deve-se interromper a atividade e resfriar a caixa, pois o calor pode matar as bactérias; e
7. é imprescindível que a distribuição do inoculante turfoso seja uniforme em todas as sementes, para garantir os benefícios da fixação biológica do N<sub>2</sub>.

Caso seja necessário **tratar as sementes com micronutrientes**, seguir as mesmas recomendações descritas para o “tratamento com fungicidas”, deixando a aplicação do inoculante por último. Ou, preferencialmente, fazer a **aplicação foliar de micronutrientes**, conforme será especificado adiante.

A **inoculação diretamente na caixa semeadora** não é aconselhável, pois resulta em pouca aderência e cobertura pouco uniforme das sementes com o inoculante.

### **Inoculante turfoso e máquina de tratamento de sementes**

Existem, no mercado nacional, máquinas simples, eficientes e baratas que realizam o tratamento de sementes e a inoculação (Fig. 14B). Nessas máquinas, os fungicidas são utilizados via líquida, diminuindo o risco de intoxicação do operador. Outra vantagem é a de que a máquina pode ser levada ao campo, pois possui engate para a tomada de força do trator. Com a máquina, é possível fazer a inoculação de 60 a 70 sacas.h<sup>-1</sup>.

Com a **máquina de tratamento de sementes**, proceder da seguinte maneira:

1. preparar a solução açucarada a 10% e colocar no primeiro compartimento. Quando for necessário, fazer o tratamento com fungicida e adicionar a calda do fungicida com solução açucarada no primeiro compartimento. Nesse caso, o volume da solução açucarada pode ser diminuído, de acordo com o volume da calda de fungicida. Nesse mesmo compartimento poderiam ser adicionados, ainda, micronutrientes, contudo, caso seja necessário fazer o tratamento com fungicidas, deve-se dar preferência para a aplicação de micronutrientes via foliar;

2. no segundo compartimento da máquina, colocar o inoculante turfoso, sem excesso de umidade, sem adicionar água ou solução açucarada; e
3. considerar as mesmas recomendações sobre armazenagem e semeadura citadas para a inoculação com tambor rotatório.

## **Inoculantes líquidos**

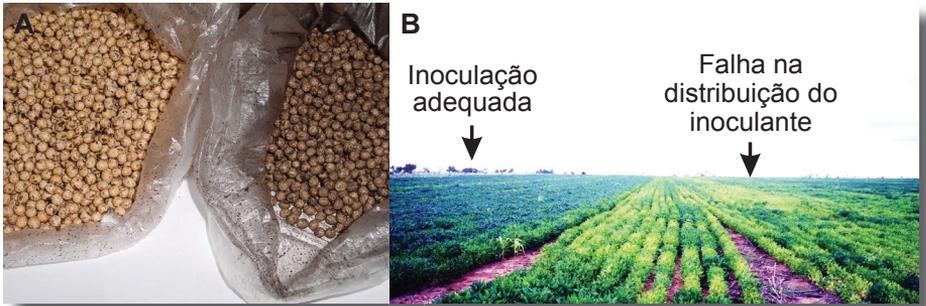
Para a inoculação com esses produtos, devem ser utilizadas as recomendações de cada fabricante. Alguns inoculantes líquidos são comercializados com adesivos, enquanto outros já possuem, em sua formulação, substâncias aderentes.

O inoculante líquido pode ser misturado às sementes do mesmo modo que o turfoso, com tambor rotatório, ou com a máquina de tratamento de sementes, ou, ainda, pode ser aplicado por aspersão na semente, no sulco de semeadura. No caso dos inoculantes líquidos é importante salientar que:

1. a temperatura na hora da semeadura, ou no depósito de sementes na máquina de semeadura, é ainda mais crítica do que no caso dos inoculantes turfosos. Evitar, ao máximo, deixar as sementes expostas ao sol e dobrar a atenção quanto à temperatura no depósito de sementes;
2. o cuidado para que a distribuição do inoculante líquido nas sementes seja uniforme deve ser ainda maior do que no caso dos inoculantes turfosos, pois é mais difícil verificar a distribuição dos inoculantes no caso de formulações líquidas; e
3. também não se recomenda a inoculação diretamente na caixa semeadora, que dificulta a cobertura uniforme das sementes.

Para qualquer tipo de inoculante, turfoso ou líquido, a cobertura uniforme das sementes e a distribuição homogênea do inoculante são essenciais para obter nodulação bem sucedida e para garantir os benefícios da fixação biológica do  $N_2$ .

Essa importância pode ser constatada na figura 15A,B, que mostra duas situações que podem resultar em má distribuição do inoculante nas sementes.



**Figura 15.** (A) soja tratada com um inoculante turfoso com quantidade elevada de areia, o que não permitiu a boa aderência mesmo com solução açucarada (esquerda), em contraste com a distribuição homogênea com um inoculante turfoso de boa qualidade (direita). (B) contraste, em um ensaio a campo, entre parcelas que foram inoculadas adequadamente, com boa cobertura do inoculante nas sementes e parcela com falha na distribuição do inoculante.

### **Qual o volume de água recomendado no caso de fungicidas e micronutrientes líquidos?**

O excesso de água pode provocar danos sérios às sementes, razão pela qual, nos últimos anos, a recomendação tem sido para que seja tomado muito cuidado, para que o volume final de líquido não exceda 300 mL por 50 kg de sementes. Assim, quando forem utilizados fungicidas ou micronutrientes líquidos, a água pode ser diminuída, para que o volume final não ultrapasse os 300 mL. Contudo, em pesquisas recentes que buscaram avaliar possíveis efeitos do tratamento de sementes de soja com volume de calda superior a 300 mL, houve a indicação de que a aplicação de até 1 L de calda (fungicida + micronutriente + inseticida + inoculante + aditivos protetores) não causou danos físicos e fisiológicos às sementes, em lotes de alto e médio vigor (Krzyzanowski et al., 2006). Novos estudos devem ser conduzidos, nos próximos anos, buscando validar essa recomendação.

## 17 No campo, quais os principais fatores limitantes à fixação biológica do N<sub>2</sub>?

### Fatores ambientais

As temperaturas elevadas e o estresse hídrico, muitas vezes atuando juntos, são os principais fatores ambientais limitantes à fixação biológica do N<sub>2</sub> nos trópicos, afetando todas as etapas da simbiose. O período mais crítico, porém, é o inicial, quando o solo está descoberto, podendo atingir temperaturas superiores a 40°C nos primeiros 5 cm, prejudicando a sobrevivência do rizóbio e a infecção das raízes. Nesse contexto, o sistema conhecido como plantio direto, conforme já discutido, é extremamente favorável, pois a cobertura do solo reduz as temperaturas e mantém a umidade por mais tempo.

### Fatores nutricionais

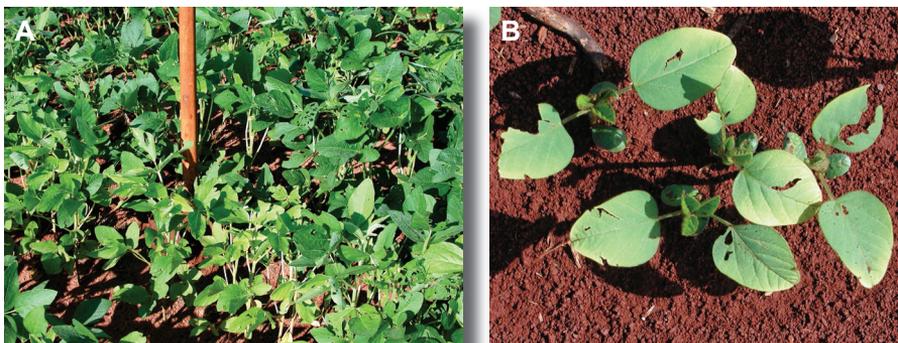
As leguminosas que fixam N<sub>2</sub> são, nutricionalmente, mais exigentes do que aquelas que recebem N mineral, pois é necessário atender às demandas da planta hospedeira, do rizóbio e do sistema simbiótico. Desse modo, todo o trabalho de inoculação pode ser perdido se o agricultor não realizar calagem na dose adequada e com antecedência mínima para a reação do calcário. O mesmo ocorre se houver deficiência de qualquer macro nutriente; além disso, a nodulação e a fixação biológica do N<sub>2</sub> são drasticamente afetadas pela presença de quaisquer fontes de N.

Em relação aos macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S), as exigências da cultura são elevadas, conforme pode ser verificado na Tabela 5. Brevemente, serão mencionados alguns dos principais papéis desses macronutrientes no processo de fixação biológica do N<sub>2</sub>. O fósforo (P) é de extrema importância para a formação e o funcionamento dos nódulos, bem como no processo de transferência de energia para a atividade da nitrogenase, permitindo a redução do N<sub>2</sub> a amônia. Plantas de soja fixando N<sub>2</sub> transportam o N para a planta hospedeira sob a forma de compostos denominados ureídeos (alantoína e ácido alantóico) e um dos papéis do potássio (K) é o de transportar esses compostos na forma de alantoato de potássio. O cálcio (Ca) é muito importante para a bactéria e, no caso da planta, afeta o crescimento das

**Tabela 5.** Teor médio de macronutrientes (kg) nos grãos e nos restos culturais da soja para cada 1.000 kg de grãos produzidos.

Nutriente	Grãos	Restos culturais	Total
N	51,0	32,0	83,0
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	10,0	5,4	15,4
K <sub>2</sub> O	20,0	18,0	38,0
Ca	3,0	9,2	12,2
Mg	2,0	4,7	6,7
S	5,4	10,0	15,4

raízes e, por consequência, os sítios de nodulação. Além disso, o papel do Ca na sinalização molecular, que resulta na formação dos nódulos, tem sido evidenciado. A deficiência de Ca e o efeito na fixação do N<sub>2</sub>, em geral, são verificados já no início da cultura, com plantas mostrando sintomas típicos de deficiência de N, conforme pode ser visualizado na Figura 16A. O magnésio (Mg) desempenha papel indireto muito importante, pois faz parte da clorofila e participa na transferência de energia para o processo de fotossíntese. Como os nódulos dependem diretamente dos fotossintatos enviados pela planta hospedeira, a deficiência de Mg afeta prontamente a eficiência da fixação biológica do N<sub>2</sub>. O enxofre (S) é um importante ativador de enzimas e coenzimas e, no caso da fixação do N<sub>2</sub>, é um componente

**Figura 16.** (A) deficiência de cálcio e (B) deficiência de ferro causada por excesso de cobalto.

da enzima nitrogenase, responsável pela redução do  $N_2$  a amônia. Nos últimos anos, sintomas de deficiência de S têm sido comunicados com mais frequência e podem prejudicar drasticamente o processo biológico.

Papéis igualmente importantes são desempenhados pelos micronutrientes (B, Cu, Cl, Zn, Fe, Mn e Mo), e aqui, serão mencionados os papéis de três micronutrientes específicos para a fixação do  $N_2$ , o ferro (Fe), o molibdênio (Mo) e o cobalto (Co). O Fe participa da composição da leghemoglobina e da nitrogenase, sendo indispensável para a formação e o funcionamento dos nódulos, mas, pela composição e pela reação química dos solos brasileiros, a deficiência de Fe é rara.

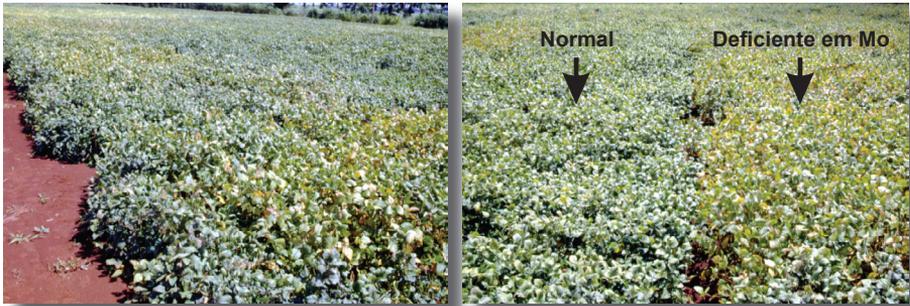
Os teores de Co no solo variam de 10 a 40  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de solo, contudo, solos ácidos podem apresentar concentrações inferiores a 10  $\mu\text{g.g}^{-1}$ , além disso, solos ricos em óxidos de manganês (Mn) podem resultar em deficiência de Co. A importância do Co na fixação biológica do  $N_2$  está relacionada ao seu papel como componente da coenzima cobamida, precursora da leghemoglobina e, portanto, indispensável ao processo biológico. O Co pode ser fornecido sob as formas de cloreto, sulfato ou nitrato de cobalto. Contudo, cuidado especial deve ser dado ao fornecimento desse micronutriente, pois qualquer excesso resulta, facilmente, em toxicidade, conforme pode ser visualizado na figura 16B.

O Mo é um componente da enzima nitrogenase e, portanto, essencial ao processo de fixação de  $N_2$ . Esse papel do Mo faz com que, em plantas noduladas, a deficiência do nutriente resulte em sintomas semelhantes aos de deficiência de N, com o amarelecimento típico das folhas (Fig. 17). O Mo pode ser fornecido nas formas de molibdato de sódio, molibdato de amônio, ácido molíbdico ou trióxido de molibdênio

Deficiências de Co e, principalmente, de Mo têm sido relatadas com maior frequência, tornando-se um dos principais fatores limitantes à fixação do  $N_2$  na cultura da soja.

### **Tratamento de sementes com fungicidas e inseticidas**

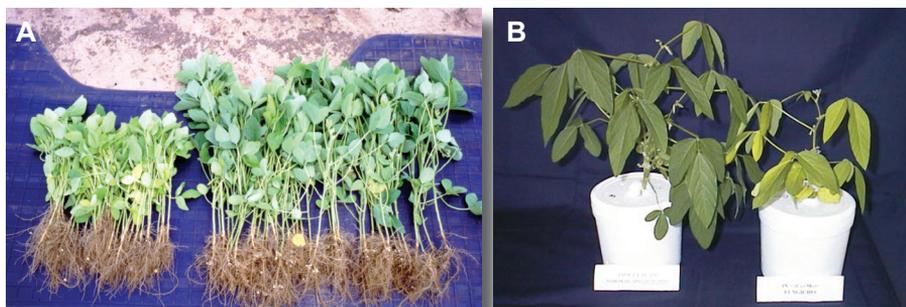
Há muito se conhece que os rizóbios são sensíveis a fungicidas, herbicidas e nematocidas que, por isso, devem ser usados com cautela. Com



**Figura 17.** (A) Soja nodulada apresentando sintomas de deficiência de molibdênio; e (B) soja sem (esquerda) e com (direita) deficiência de molibdênio. Os sintomas são típicos de deficiência de N, resultantes da deficiência em molibdênio.

a expansão da soja e a falta de cuidados fitossanitários, tem-se observado um incremento na incidência de fitopatógenos em todas as áreas cultivadas, resultando em aumento no número de princípios ativos dos fungicidas recomendados. Além disso, para evitar problemas na emergência da soja, passou-se a recomendar as combinações de fungicidas sistêmico + fungicida de contato. Contudo, com as alterações ocorridas nas formulações dos fungicidas e pelo uso da mistura de fungicidas, os efeitos tóxicos desses no processo de fixação biológica do  $N_2$  agravaram-se. Em consequência, nos últimos anos tem-se observado mortalidade elevada de células de *Bradyrhizobium* nas sementes tratadas com fungicidas, reduzindo a nodulação, o crescimento (Fig. 18) e, muitas vezes, o rendimento das culturas.

Em várias avaliações feitas em laboratório, a presença de fungicidas nas sementes resultou, em apenas duas horas após o tratamento, na mortalidade de até 98% das bactérias (Campo & Hungria, 1999, 2000a, 2000b, 2004; Campo et al., 2001, 2002, 2003, 2004a). O mesmo ocorre a campo e a Tabela 6 exemplifica os efeitos drásticos que os fungicidas podem ter na população de *Bradyrhizobium* nas sementes, reduzindo a nodulação. Esses efeitos mais drásticos ocorrem em solos de primeiro cultivo com a soja e, também, variam com o tipo de solo, particularmente em função de seu poder tampão e do teor elevado de areia, por exemplo, os efeitos em



**Figura 18.** (A) Soja a campo inoculada e tratada (esquerda) ou não (direita) com fungicida. Cortesia do consultor Orlando Martins; (B) em casa de vegetação, efeito de fungicida em uma planta inoculada.

Terra Roxa (PR) foram superiores aos de Vera Cruz (PR). O decréscimo drástico na nodulação, conforme observado em Terra Roxa (Tabela 6), em solos pobres em N, pode resultar em perda total da lavoura. Em solos com população estabelecida, também ocorre mortalidade das células e, em Cristalina (GO), foi constatado decréscimo de 25% na nodulação. Contudo, nesses solos dificilmente ocorre perda da cultura, pois existem muitas bactérias já estabelecidas por inoculações anteriores e, em geral, haverá a formação dos nódulos, embora os ganhos de rendimento resultantes da reinoculação sejam perdidos. É importante salientar que o efeito tóxico do fungicida não é reduzido nem pelo tratamento prévio, nem pela secagem das sementes. Até o presente momento, infelizmente, não existe nenhum fungicida, no mercado brasileiro, com baixa toxicidade às estirpes utilizadas nos inoculantes comerciais para a cultura da soja.

A toxicidade ao rizóbio torna o problema mais grave quando se considera que, além de cerca de 95% dos agricultores utilizarem, hoje, o tratamento das sementes de soja com fungicidas, vários deles também tratam as sementes com micronutrientes.

Finalmente, é importante comentar que, nos últimos anos, tem havido incremento no uso de sementes tratadas com inseticidas. Contudo, em ensaios conduzidos pela Embrapa Soja em Jaciara (MT) e Lucas do Rio Verde (MT), por duas safras, com sementes inoculadas de soja e os inseticidas Standak (200 mL.50 kg<sup>-1</sup> de semente), Cruiser (150 mL.50 kg<sup>-1</sup>) e

**Tabela 6.** Efeito do tratamento das sementes com fungicidas com nódulos no número de nódulos e na porcentagem de redução de nódulos de soja em relação à inoculação padrão, em experimentos conduzidos em solos de primeiro cultivo com soja (Terra Roxa do Oeste e Vera Cruz do Oeste, PR), ou em solos com população estabelecida de *Bradyrhizobium* (Cristalina, GO). Segundo Campo & Hungria (2000a).

Tratamento	Terra Roxa		Vera Cruz		Cristalina	
	Número (n°.pl <sup>-1</sup> )	Redução (%)	Número (n°.pl <sup>-1</sup> )	Redução (%)	Número (n°.pl <sup>-1</sup> )	Redução (%)
Testemunha sem inoculação	1	-	5	-	34	-
Inoculação padrão (IP) <sup>1</sup>	23	0	34	0	44	0
IP + Benomyl + Captan	6	74	26	24	-	-
IP + Benomyl + Thiram	5	78	27	21	-	-
IP + Benomyl + Tolyfluand	5	78	25	27	-	-
IP + Carbendazin + Captan	11	52	33	3	-	-
IP + Carbendazin + Thiram	5	78	28	18	38	14
IP + Carbend. + Tolyfluand	4	83	26	24	-	-
IP + Carboxin + Thiram	14	39	29	15	33	25
IP + Difenoconazole + Thiram	13	43	30	12	-	-
IP + Thiabendazole + Captan	3	87	25	27	-	-
IP + Thiabendazole+ Thiram	7	70	23	32	-	-
IP + Thiabend. + Tolyfluand	5	78	32	6	34	23
IP + Tegram + Co + Mo	3	87	20	41	-	-
IP + Co + Mo	21	9	21	38	-	-
DMS <sup>2</sup>	3,6	n.a.	6,2	n.a.	n.a.	n.a.

<sup>1</sup>IP, inoculante turfoso padrão, com padrão de qualidade exigido pela legislação; <sup>2</sup>Os dados representam médias de seis repetições e o DMS indica diferença mínima significativa entre tratamentos em cada coluna (Teste "t", 5%); n.a. = não avaliado.

Gaúcho (175 mL.50 kg<sup>-1</sup>), para controle do inseto *Sternechus subsignatus*, a nodulação não foi prejudicada.

## 18 Como compatibilizar o tratamento de fungicidas com a inoculação?

### É possível deixar de usar o fungicida nas sementes para evitar prejudicar a fixação biológica do nitrogênio?

Nos estudos conduzidos por nossa equipe, constatou-se que, quando a semeadura foi realizada em solo com boa umidade, a emergência das sementes a campo não foi favorecida pela aplicação de fungicidas, assim, sugere-se que os agricultores só utilizem os fungicidas nas sementes quando eles forem indispensáveis, ou seja, quando a semente, ou o solo, estiverem efetivamente contaminados por patógenos. Para isso, Campo & Hungria (2000a) sugerem que o agricultor observe alguns procedimentos:

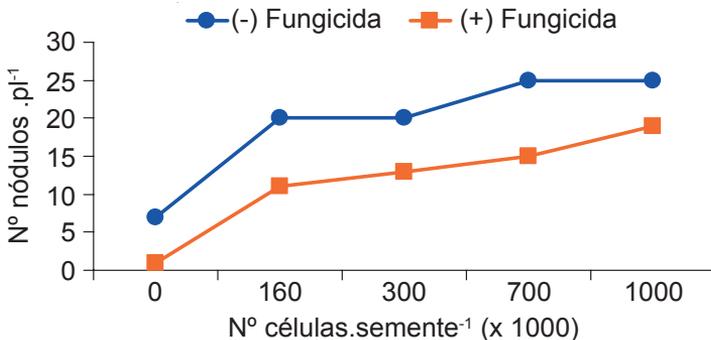
1. utilizar sementes de soja de boa qualidade fisiológica e sanitária e efetuar a semeadura em solo com umidade adequada;
2. antes de efetuar a semeadura, fazer um teste de emergência dos lotes de sementes a campo, no mesmo solo onde a lavoura será implantada. Tomar duas amostras de sementes de cada lote, efetuar o tratamento com fungicida em uma delas e fazer a semeadura de 100 sementes de cada amostra, em quatro repetições e em solo com boa umidade. Após a emergência, contar o número médio de plântulas obtidos nas duas situações, avaliar os resultados e tomar a decisão de tratar, ou não, os seus lotes de sementes com fungicidas. A semeadura da lavoura deverá ser feita quando o solo estiver em condições similares de umidade em que o teste foi efetuado; e
3. a maior frequência de efeitos negativos do tratamento de sementes com fungicidas na fixação biológica do N<sub>2</sub> ocorre em solos de primeiro ano de cultivo com soja, ou em solos que não são cultivados há vários anos com soja e, portanto, apresentam baixa população de *Bradyrhizobium*. Nessas condições, para garantir melhores resultados com a inoculação

e o estabelecimento da população de *Bradyrhizobium* no solo, o agricultor deve evitar o tratamento de sementes com fungicidas. Para isso, é essencial dar preferência às sementes de melhor qualidade sanitária e fisiológica, certificadas, bem como efetuar a semeadura em solos com boa disponibilidade hídrica.

### Se for necessário tratar as sementes com fungicidas, existe alguma alternativa para diminuir os efeitos prejudiciais ao *Bradyrhizobium*?

Quando o tratamento das sementes de soja com fungicidas for indispensável, existem algumas alternativas para diminuir os prejuízos à fixação biológica do  $N_2$ :

1. colocar uma grande concentração de células nas sementes e semear o mais depressa possível. Essa é uma estratégia numérica, pois visa que um número suficiente de células de *Bradyrhizobium* sobreviva ao contato com o fungicida. A figura 19 mostra um exemplo obtido em um ensaio conduzido em Jaciara (MT), em que, na ausência de fungicidas, 700.000 células de *Bradyrhizobium* por sementes resultaram no número máximo de nódulos naquele ambiente. Já na presença de fungicidas, seria necessário adicionar uma população superior a 1.000.000 células por semente;



**Figura 19.** Número de nódulos em soja, no estágio V4, em função do número de células de *Bradyrhizobium* colocadas por semente tratada, ou não, com fungicida. Ensaio conduzido em Jaciara (MT).

2. em vista dos problemas de mortalidade de *Bradyrhizobium* nas sementes tratadas com fungicidas e micronutrientes, foi desenvolvida a tecnologia de inoculação no sulco, apresentada com mais detalhes no item 20. Contudo, é importante salientar que, no caso de inoculação no sulco, a dose recomendada de inoculante é de seis vezes aquela recomendada para a inoculação de sementes;
3. dar preferência às formulações menos tóxicas ao *Bradyrhizobium*, que podem ser consultadas nas publicações de recomendações técnicas para a cultura da soja. Deve-se considerar, porém, que os resultados apresentados se referem a, no mínimo, uma safra anterior e que, a cada ano, muitas das formulações de cada princípio ativo são modificadas, podendo alterar, também, o nível de toxicidade; e
4. como será discutido no item 19, caso haja necessidade de tratamento das sementes com fungicidas e com os micronutrientes Co e Mo, fazer a aplicação dos micronutrientes via foliar.

## **19 Superando problemas nutricionais: como realizar a adubação com molibdênio e cobalto sem prejudicar a fixação biológica do N<sub>2</sub>?**

### **Adição de cobalto e molibdênio às sementes**

Mesmo em solos onde não ocorria deficiência de Mo e Co, com a intensificação da agricultura tem sido constatado o empobrecimento e, com freqüência, deficiência desses nutrientes. Assim, grandes incrementos no rendimento da soja vêm sendo obtidos com a suplementação desses micronutrientes em solos deficientes. Como exemplo, a Tabela 7 mostra ganhos de rendimento de 492 kg.ha<sup>-1</sup> pela aplicação de Mo e Co ao tratamento inoculado em um Latossolo Roxo de Londrina que, tradicionalmente, não respondia à aplicação de micronutrientes após a calagem.

As exigências da soja nesses micronutrientes conduziram à indicação de recomendação que, atualmente, é de 2 a 3 g de Co.ha<sup>-1</sup> e de 12 a 30 g de Mo.ha<sup>-1</sup>. Foi constatado, também, que qualquer uma das fontes de Mo

**Tabela 7.** Resposta da soja, cv. BR 37, à aplicação de Mo e Co na semente. Ensaio conduzido em um Latossolo Roxo de Londrina (PR). Segundo Hungria et al. (2001).

Tratamento	Rendimento	
	(kg.ha <sup>-1</sup> )	(%)
Sem inoculação	2.310 c <sup>1</sup>	95
Inoculação padrão (IP) <sup>2</sup>	2.420 bc	100
IP + Co	2.277 c	94
IP + Mo	2.562 b	106
IP + (Co + Mo)	2.912 a	120
IP + 200 kg de N	3.051 a	126
CV(%) <sup>3</sup>	11,0	-

<sup>1</sup> Os dados representam médias de seis repetições e, quando seguidos pela mesma letra, em cada coluna, não diferem estatisticamente (teste "t", 5%).

<sup>2</sup> IP, inoculante turfoso padrão, com as exigências de qualidade da legislação.

<sup>3</sup> CV, coeficiente de variação.

disponíveis é adequada para fornecer o micronutriente às plantas (Tabela 8). É importante comentar, ainda, que, algumas vezes, é evidente o efeito sinérgico do Co e do Mo (Tabela 7), mas outras vezes não (Tabela 8).

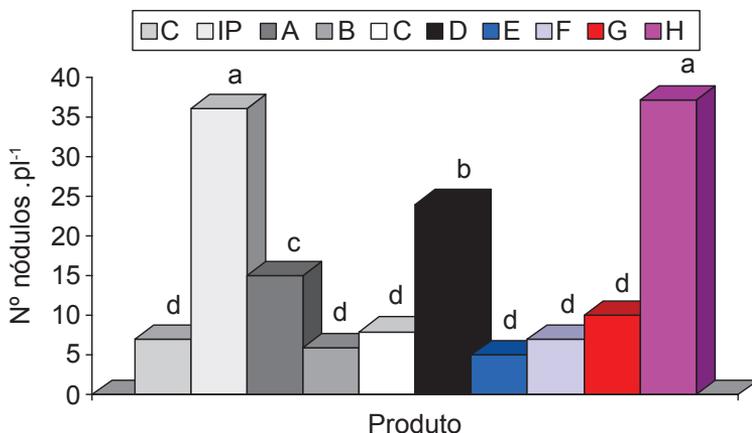
**Tabela 8.** Efeito de fontes molibdênio na nodulação e no rendimento da soja, cv BR 37, em um ensaio conduzido em um Latossolo Roxo de Londrina (PR), com população de estabelecida de *Bradyrhizobium*.

Tratamento	Número de nódulos.planta <sup>-1</sup>	Rendimento (kg.ha <sup>-1</sup> )
Sem inoculação	18	2.722
200 kg N	13	3.596
IP <sup>1</sup>	19	2.490
IP + molibdato de sódio	20	3.727
IP + molibdato de amônio	16	3.977
IP + ácido molíbdico	18	3.845
IP + trióxido de molibdênio	18	3.929
IP + molibdato de sódio + Co	17	3.960

<sup>1</sup> IP, inoculante turfoso padrão, com as exigências de qualidade da legislação.

## E surgiram problemas pela aplicação de micronutrientes nas sementes?

Com a aplicação de micronutrientes no tratamento de sementes, porém, surgiram alguns problemas. Isso porque a aplicação, às sementes, de formulações salinas, ou com pH baixo, ou inadequadas, pode afetar drasticamente a sobrevivência da bactéria, a nodulação e a eficiência da fixação do  $N_2$ . Como exemplo, o teste de diversas fontes de Co e Mo mostrou diferenças, entre as mesmas, no nível de toxicidade ao *Bradyrhizobium*, conforme pode ser constatado na Figura 20.



**Figura 20.** Efeito de diversos produtos comerciais contendo Mo e Co no número de nódulos em soja, cv. BR-37, cultivada em um solo de primeiro cultivo, sem população estabelecida de *Bradyrhizobium*, em Vera Cruz do Oeste (PR), na safra 1998/99. C refere ao tratamento controle não inoculado e IP ao inoculante turfoso padrão, com as exigências de qualidade da legislação.

## Quais as alternativas para compatibilizar o fornecimento de cobalto e molibdênio com a inoculação das sementes?

1. do mesmo modo que no caso dos fungicidas, colocar uma grande concentração de células nas sementes e semear o mais depressa possível;

2. uma série de ensaios conduziu à recomendação de que o Co e o Mo podem ser fornecidos por pulverização foliar, sozinha ou em conjunto com herbicidas, baculovirus ou inseticidas (para evitar gastos adicionais do agricultor com pulverização), nas mesmas doses recomendadas para as sementes. Contudo, quando Mo e Co são aplicados via foliar, a aplicação deve ser realizada entre V3 e V5, no máximo, 20-30 dias após a emergência das plântulas, pois as sementes atualmente comercializadas possuem reservas capazes de sustentar o crescimento das sementes por, no máximo, esse período e poderão ser constatadas deficiências caso seja programada uma aplicação mais tardia;
3. o agricultor poderá, também, utilizar a inoculação no sulco (seis vezes a dose recomendada para as sementes), apresentada com mais detalhes no item 20; e
4. outra alternativa é a utilização de sementes ricas em Mo, conforme vem sendo demonstrado pelos pesquisadores da Embrapa Soja. Vários ensaios, em mais de cinco safras, foram conduzidos e os resultados foram conclusivos em indicar os benefícios de utilizar sementes enriquecidas em Mo. Essa tecnologia seria recomendada para os produtores de sementes, que deveriam receber um valor adicional pelas suas sementes. Para a obtenção de sementes enriquecidas, devem ser utilizados 800 g de Mo, em duas pulverizações foliares de 400 g de Mo, aplicados entre os estágios R3 e R4-5, espaçadas por, no mínimo, dez dias entre elas (Campo et al., 2004a).

Os resultados obtidos indicam que as sementes de soja enriquecidas em Mo: *i*) possuem maior eficiência de fixação biológica de  $N_2$ ; *ii*) produzem grãos com teores médios de proteína superiores em 4%; *iii*) apresentam incrementos médios no rendimento de grãos de 9,2%. Além disso, também mostram maior resistência à seca e melhor capacidade de metabolizar e translocar N e S na planta.

Os rendimentos obtidos nos ensaios mostrados na Tabela 9 mostram, claramente, os benefícios de utilização de sementes enriquecidas em Mo, sendo superiores, mesmo sem a aplicação de nenhum Mo nas sementes, aos das sementes regulares encontradas no mercado (pobres em Mo), ainda que recebendo a dose máxima recomendada para a cultura (20 g Mo.ha<sup>-1</sup>).

**Tabela 9.** Efeito do enriquecimento em molibdênio de sementes de soja, cv BR 16, no rendimento de grãos. Ensaios conduzidos com seis repetições em um Latossolo Roxo de Londrina (PR), por três safras consecutivas. (Dr. R. J. Campo e colaboradores, dados não publicados).

Semente	Mo adicionado (g.ha <sup>-1</sup> )		
	0	10	20
Safra 1997/1998.....			
Semente pobre (0,0 µg.g <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	2.766	3.075	3.020
Semente média (0,3 µg.g <sup>-1</sup> )	3.049	3.217	3.045
Semente rica (7,6 µg.g <sup>-1</sup> )	3.378	3.508	3.641
Safra 1998/1999.....			
Semente pobre (0,73 µg.g <sup>-1</sup> )	2.314	2.645	2.793
Semente média (7,5 µg.g <sup>-1</sup> )	3.167	3.794	3.790
Semente rica (13,3 µg.g <sup>-1</sup> )	3.602	3.892	3.823
Safra 1999/2000.....			
Semente pobre (2,4 µg.g <sup>-1</sup> )	2.398	2.684	2.649
Semente média (9,8 µg.g <sup>-1</sup> )	2.592	2.596	2.603
Semente rica (15,6 µg.g <sup>-1</sup> )	2.561	2.670	2.630
Semente muito rica (31,6 µg.g <sup>-1</sup> )	2.750	2.701	2.753

<sup>1</sup> As sementes encontradas no mercado brasileiro apresentam a concentração que as classifica como pobres nestes ensaios.

## 20 Quando deve ser feita a inoculação no sulco?

Conforme comentado, as estimativas são de que, hoje, cerca de 98% dos agricultores tratam as sementes de soja com fungicidas, inclusive, muitas cooperativas já estão comercializando as sementes tratadas para os associados. Mas, conforme consta no item 17, alguns fungicidas podem matar, em poucas horas, quase todas as bactérias colocadas via inoculação nas sementes. O problema pode ser agravado se o agricultor também tratar as sementes com micronutrientes. Para os agricultores que não conseguirem seguir as recomendações citadas nos itens 18 e 19, foi desenvolvida a técnica de inoculação no sulco.

Vários ensaios foram realizados, durante cinco safras, para o desenvolvimento da tecnologia da inoculação no sulco, sempre em parceria com indústrias que procuravam desenvolver e adaptar máquinas para essa finalidade. Era importante, nesse período, avaliar qual seria o volume de água e o número de células necessário para que a resposta à inoculação fosse tão eficiente quanto a aplicação nas sementes. As pesquisas concluíram que a dose de inoculante necessária para a aplicação no sulco deve ser, no mínimo, seis vezes superior à dose indicada para a inoculação das sementes. Essa nova tecnologia passou a ser recomendada para a cultura da soja, na safra 2003/2004, e já consta da exigência de qualidade dos inoculantes pelo MAPA (MAPA, 2006).

A importância da tecnologia de inoculação no sulco é que ela viabiliza a aplicação de fungicidas nos tratamentos de sementes, sem reduzir as taxas de fixação do  $N_2$  e os rendimentos da soja. As desvantagens incluem o maior custo, uma vez que é necessário aplicar seis vezes mais inoculante, e o transporte de água, que não deve ser inferior a  $50 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$ . A Tabela 10 mostra os resultados de um ensaio conduzido em Taciba (SP), com as doses recomendadas para aplicação nas sementes e no sulco e onde também fica evidenciado que a inoculação no sulco foi uma solução para o caso de sementes tratadas com fungicidas. Na figura 21 é mostrada, como exemplo, uma máquina com adaptador para a inoculação no sulco.

Existem, no mercado, atualmente, adaptações que podem ser acopladas nas semeadoras, permitindo a aplicação do inoculante por aspersão no sulco, por ocasião da semeadura. Esse método pode ser utilizado em solos com ou sem população de *Bradyrhizobium* estabelecida. A desvantagem do método é que a dose de inoculante a ser utilizada deve ser, no mínimo, seis vezes superior à dose indicada para as sementes. Por outro lado, esse método tem a vantagem de reduzir os efeitos tóxicos do tratamento de sementes com fungicidas e micronutrientes no *Bradyrhizobium*.

### **Como fazer o cálculo teórico do número de células de *Bradyrhizobium* no caso de inoculação no sulco?**

#### **Informações disponíveis**

População desejada → 600.000 células por semente

**Tabela 10.** Comparação da aplicação de inoculante líquido na semente, ou no sulco, com ou sem fungicida. Experimento conduzido em Taciba (SP), em solo sem população estabelecida *Bradyrhizobium*, na safra 2002/2003. Segundo Campo et al. (2004b).

Tratamentos	N de nódulos (n°.pl <sup>-1</sup> )	Massa de nódulos (g.pl <sup>-1</sup> )	N total na parte aérea (mgN.pl <sup>-1</sup> )	N total nos grãos (kg N.ha <sup>-1</sup> )	Rendimento (kg.ha <sup>-1</sup> )
Sem inoculação (SI)	0,2c <sup>1</sup>	1,7c	125a	205bc	3.560bc
SI + 200 kg de N.ha <sup>-1</sup>	0,1c	0,3c	158a	199c	3.296c
Inoculação das sementes com 1.000.000 células.semente <sup>-1</sup>	14,1b	60,9b	100a	232abc	3.985ab
I. sementes + fungicida	0,2c	1,6c	121a	225abc	3.870ab
Inoculação no sulco com 6.000.000 células.semente <sup>-1</sup>	26,0a	118,8a	149a	250a	4.244a
I. sulco + fungicida	19,2b	79,7b	109a	240ab	4.036ab
C.V.(%) <sup>2</sup>	51,5	48,3	34,1	10,8	9,6

<sup>1</sup> Os dados representam médias de seis repetições e, quando seguidos pela mesma letra, em cada coluna, não diferem estatisticamente (Duncan, 5%).

<sup>2</sup> CV, coeficiente de variação.



**Figura 21.** Semeadura de soja a campo com adaptador para inoculação no sulco.

1 kg de sementes da cultivar → 7.000 sementes

Concentração do inoculante adquirido →  $2,4 \cdot 10^9$  células por mL do produto

Condições de semeadura → 60 kg de semente.ha<sup>-1</sup>

### **Cálculo**

O agricultor deseja 600.000 células X 7.000 sementes →  $4,2 \cdot 10^9$  células por kg de sementes

Tendo um inoculante com  $2,4 \cdot 10^9$ , será necessário fazer a divisão →  $4,2 \cdot 10^9 / 2,4 \cdot 10^9 = 1,75$  mL do produto por kg de semente

Para 60 kg de sementes.ha<sup>-1</sup> serão necessários, portanto → 1,75 g ou mL do produto X 60 kg de semente = 105 mL do produto

Como a inoculação no sulco requer seis vezes a dose recomendada → 105 mL X 6 = 630 mL do inoculante.ha<sup>-1</sup> (que devem se diluídos em, pelo menos, 50 litros de água de boa qualidade).

## **21 A capacidade de fixação do N<sub>2</sub> da soja brasileira é superior à verificada em outros países?**

Todas as indicações são de que os agricultores e a pesquisa brasileira podem se orgulhar, pois o Brasil desponta como o país de maior liderança em obter benefícios da fixação biológica do N<sub>2</sub> com a cultura da soja. Sem dúvida, esse panorama atual resulta da ênfase que vem sendo dada à pesquisa em fixação biológica do N<sub>2</sub> desde a expansão dessa cultura no Brasil. É essencial lembrar que a pesquisa não parou e continua atuante em várias linhas para que, a longo prazo, as cultivares mais produtivas possam continuar a atender completamente às demandas da planta em N, via processo biológico. Qualquer mudança de prioridade nas pesquisas pode levar, em poucos anos, a um retrocesso nas vantagens que os agricultores estão obtendo hoje, em comparação com outros países. Desse modo, agricultores e pesquisadores devem continuar a caminhar juntos, enfatizando a importância da fixação biológica do N<sub>2</sub> para a cultura da soja.

Alguns exemplos podem ser citados e que destacam a posição privilegiada do Brasil. Na China, centro de origem genética da soja, a fixação biológica

do  $N_2$  não consegue suprir todas as necessidades da planta, sendo recomendado o uso de 50 kg de  $N.ha^{-1}$  nos estádios V4, V6 ou R1, mesmo para a obtenção de rendimentos inferiores aos do Brasil (Gan et al., 2003).

Outro bom exemplo resulta da análise, realizada por van Kessel & Hartley (2000), de 196 ensaios com soja, conduzidos principalmente nos E.U.A. (líder mundial de produção de soja) e na Austrália, anteriormente a 1984, sendo constatado que a fixação biológica do  $N_2$  contribuía, em média, com 64% do N total da planta. Posteriormente, com os subsídios aos fertilizantes nitrogenados fornecidos nesses países e com a baixa utilização de inoculantes pelos agricultores, esses autores constataram que, em 166 ensaios conduzidos após 1985, a contribuição da fixação biológica diminuiu para 54% das necessidades da soja em N. Nos E.U.A., as estimativas são de que apenas 15% dos agricultores inoculem a soja (Hungria et al., 2005), mas os preços crescentes dos fertilizantes nitrogenados podem alertar os agricultores norte-americanos para que voltem a se beneficiar do processo biológico. Em outro ensaio, comparando 33 culturas comerciais de soja na Austrália, a estimativa foi de que a porcentagem de N proveniente da fixação biológica do  $N_2$  representava, em média, 53% do N total da planta, contribuindo com 178 kg de  $N.ha^{-1}$  (Unkovich & Pate, 2000).

Na Argentina, a porcentagem de agricultores que inoculam a soja é semelhante, ou até superior, à do Brasil. Contudo, os solos argentinos tradicionalmente cultivados com soja são mais ricos em matéria orgânica do que os solos brasileiros, o que poderia explicar os resultados de falta de resposta à adubação nitrogenada (Hungria et al., 2006b), embora a fixação biológica do  $N_2$  contribua com apenas 50% das necessidades da planta (Dr. Roberto Racca, dados não publicados). Ao contrário do Brasil, porém, aparentemente a soja argentina deixa um balanço negativo de N no solo e existe a necessidade de adicionar fertilizantes nitrogenados ao trigo que sucede à soja (Dr. Roberto Racca, comunicação pessoal). Em conjunto, esses resultados podem indicar que a capacidade de fixação biológica do  $N_2$  das cultivares argentinas seja inferior à das cultivares brasileiras.

Já no Brasil, em um levantamento dos ensaios conduzidos a campo de quantificação da contribuição da fixação biológica do  $N_2$ , Hungria et al. (2005) relatam valores entre 72% e 94% do N total da planta, contribuindo com até 300 kg de  $N.ha^{-1}$ , superando, e muito, os valores relatados nos

demais países produtores. Além disso, conforme já comentado, não existe nenhuma resposta ao fertilizante nitrogenado e a soja deixa N para a cultura que a sucede. Em conjunto, esses resultados indicam que o Brasil é, sem dúvida, líder no aproveitamento dos benefícios proporcionados pela fixação biológica do  $N_2$  com a cultura da soja.

## 22 Considerações finais

Para que a soja não consuma o N do solo, e para que o agricultor não aumente o seu custo de produção com a compra de fertilizantes, basta utilizar inoculantes de boa qualidade e seguir as recomendações descritas neste comunicado. O inoculante possui bactérias do gênero *Bradyrhizobium* que, quando associadas às raízes de soja, conseguem converter o  $N_2$  em compostos nitrogenados, fornecendo todo o N necessário para atingir tetos máximos de produtividade. **Os fertilizantes nitrogenados prejudicam a fixação biológica do  $N_2$  e, mesmo uma dose inicial, não resultam em incrementos no rendimento de grãos.** Em solos inoculados anteriormente, a reinoculação adiciona bactérias em estágio fisiológico mais adequado à formação dos nódulos e em maior concentração junto às sementes, resultando em incrementos na nodulação e no rendimento de grãos, além de apresentar efeitos residuais, pela adição de restos culturais com teores mais elevados de N, que servirão para as próximas culturas. **Inocular o solo é, portanto, enriquecê-lo com microrganismos que trabalharão para fornecer, a um baixo custo, grandes quantidades de N à soja, além de contribuírem para melhorar os níveis de matéria orgânica do solo.**

**Em um cálculo teórico, se forem consideradas as necessidades da cultura da soja em N ( $300 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$ ), o preço do N-fertilizante e a área cultivada com essa leguminosa, verifica-se que a fixação biológica do  $N_2$  representa, hoje, uma economia estimada em cerca de US\$ 6,6 bilhões por safra para o Brasil.** Deve-se adicionar, ainda, o valor ainda não estimado pela menor poluição dos lagos e rios pelo nitrato, evitando futuros investimentos na área de despoluição ambiental e, possivelmente, menor emissão de gases de efeito estufa.

Finalmente, deve-se considerar que, na safra 2005/2006, foram comercializados 30,4 milhões de doses de inoculantes no Brasil, 98,83% para a cultura da soja. Contudo, existem estirpes selecionadas e eficientes para outras culturas, por exemplo, a do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Conseqüentemente, o agricultor precisa expandir o uso de inoculantes para outras culturas de leguminosas.

## Agradecimentos

Os microbiologistas da Embrapa Soja e Embrapa Cerrados também são apoiados, em sua pesquisa, pelo CNPq/FINEP/MCT, Instituto do Milênio. M. Hungria agradece ao auxílio de bolsas e financiamento de projetos pelo CNPq (400710/2004-8, 301241/2004-0). Na Embrapa Soja, o auxílio técnico de José Zucca Moraes, Rubson N. R. Sibaldelle, Miguel Pereira de Souza, Rinaldo B. Conceição, Lígia Maria de O. Chueire, Leny M. Miura, e o apoio dos operários rurais Jorge J. Azevedo, Laércio Volpato, José S. Oliveira e Reginaldo B. dos Santos é essencial ao andamento das pesquisas. O agradecimento é estendido, na Embrapa Cerrados, ao auxílio técnico de Osmar T. de Oliveira, Maria das Dores Silva e Odete Justino dos Santos. Os autores agradecem, ainda, à revisão cuidadosa deste comunicado pelos Dr. Léo P. Ferreira, Dr. José M. Silveira e Dr. Odilon F. Saraiva. O grupo de pesquisadores é associado à rede BIOFAG do CYTED.

## Referências

BRANDÃO JUNIOR, O.; HUNGRIA, M. Efeito de concentrações de solução açucarada na aderência do inoculante turfoso às sementes, na nodulação e no rendimento da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 515-526, 2000a.

BRANDÃO JUNIOR, O.; HUNGRIA, M. Efeito de doses de inoculante turfoso na fixação biológica do nitrogênio pela cultura da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 527-535, 2000b.

CAMPO, R. J.; ALBINO, U. B; HUNGRIA, M. **Métodos de aplicação de micronutrientes na nodulação e na fixação biológica do N<sub>2</sub> em soja**. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 7 p. (Embrapa Soja. Pesquisa em Andamento, 19).

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. **Compatibilidade do uso de inoculantes e fungicidas no tratamento de sementes de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2000a. 32 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 26).

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Efeito da aplicação de fungicidas, micronutrientes e inoculantes nas sementes de soja sobre a fixação biológica do nitrogênio. In: SIMPÓSIO SOBRE CULTURA DA SOJA, 1., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA/Bayer, 2004. 1 CD-ROM.

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. **Efeito do tratamento de sementes com fungicidas na nodulação e fixação simbiótica N<sub>2</sub>**. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 8 p. (Embrapa Soja. Pesquisa em Andamento, 21).

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Importância dos micronutrientes na fixação biológica do nitrogênio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 2.; MERCOSOJA 2002, 2002, Foz do Iguaçu. **Perspectivas do agronegócio da soja**: anais. Londrina: Embrapa Soja, 2002. p. 355-366. (Embrapa Soja. Documentos, 180). Organizado por Odilon Ferreira Saraiva, Clara Beatriz Hoffmann-Campo.

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Inoculação da soja em sistema plantio direto. In: SIMPÓSIO SOBRE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS NO SISTEMA PLANTIO DIRETO, 1., 2000, Ponta Grossa. **Anais...** Ponta Grossa: Associação dos Engenheiros Agrônomos, 2000b. p. 146-160.

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M.; LAURETO, E.; MIURA, L. M.; SIBALDELLI, R. N. R.; MORAIS, J. Z.; SOUZA, M. P.; OLIVEIRA, M. C. N. Compatibilidade de aplicação de inoculantes com defensivos agrícolas e micronutrientes (04.2001.340-02). In: SARAIVA, O.F.(Org.). **Resultados de pesquisa da Embrapa Soja – 2003**: microbiologia de solos. Londrina: Embrapa Soja, 2004a. p. 45-57. (Embrapa Soja. Documentos, 243).

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M.; LAURETO, E.; MIURA, L. M.; SIBALDELLI, R. N. R.; MORAIS, J. Z.; SOUZA, M. P. Compatibilidade de aplicação de

inoculantes com defensivos agrícolas e micronutrientes (04.0.94.332-02). In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; SARAIVA, O. F. (Org.). **Resultados de pesquisa da Embrapa Soja - 2002** : microbiologia de solos. Londrina: Embrapa Soja, 2003. p. 20-38. (Embrapa Soja. Documentos, 216).

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M.; MIURA, L. M.; MORAES, J. Z.; SIBALDELE, R. N. R.; SOUZA, M. P.; OLIVEIRA, M. C. N. Avaliação de estirpes de *Bradyrhizobium*, inoculantes microbianos e métodos de inoculação, em diferentes regiões do Brasil (04.2001.340-01). In: SARAIVA, O. (Org.). **Resultados de pesquisa da Embrapa Soja - 2003** : microbiologia de solos. Londrina: Embrapa Soja, 2004b. p. 32-44. (Embrapa Soja. Documentos, 243).

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M.; MORAIS, J. Z.; SIBALDELLI, R. N. R. Compatibilidade de aplicação conjunta nas sementes de fungicidas, micronutrientes e inoculantes, sobre a sobrevivência do *Bradyrhizobium* e a eficiência de fixação biológica do nitrogênio (04.0.94.332-18). In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; SARAIVA, O. F. (Org.). **Resultados de pesquisa da Embrapa Soja – 2000** : microbiologia de solos. Londrina: Embrapa Soja, 2001. p. 29-39. (Embrapa Soja. Documentos, 163).

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M.; ZANOTI, M. S.; LAURETO, E.; MIURA, L. M.; MORAIS, J. Z.; SIBALDELLI, R. N. R. Compatibilidade de aplicação de inoculante com defensivos agrícolas e micronutrientes (04.0.94.340-02). In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; SARAIVA, O. F., orgs. **Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja – 2001**: microbiologia de solos. Londrina: Embrapa Soja, 2002. p. 36-42. (Embrapa Soja. Documentos, 197).

GAN, Y.; STULEN, I.; POSTHUMUS, F.; VAN KEULEN, H.; KUIPER, P. J. C. Effects of N management on growth, N<sub>2</sub> fixation and yield of soybean. **Nutrient Cycling Agroecosystems**, v. 62, p. 163-174, 2003.

HUNGRIA, M. Características biológicas em solos manejados sob plantio direto. In: REUNIÓN BIENAL DE LA RED LATINOAMERICANA DE AGRICULTURA CONSERVACIONISTA, 5., 1999, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: EPAGRI, 2000. 15 p. 1 CD -ROM.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J. A. fixação biológica do nitrogênio em sistemas agrícolas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO,

30., 2005, Recife. **Anais...** Recife: SBCS/URFPE/Embrapa Solos, 2005. 30 p. 1 CD -ROM

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 48 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica , 35/ Embrapa Cerrados. Circular Técnica,13).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C.; GRAHAM, P. H. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. In: SINGH, R. P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P. K. (Ed.). **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Houston: Studium Press, LLC, 2006a. p. 43-93.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J.; CRISPINO, C. C.; MORAES, J. Z.; SIBALDELLI, R. N. R.; MENDES, I. C.; ARIHARA, J. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N<sub>2</sub> fixation and of N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Sciences**, v. 86, n. 4, p. 927-939, 2006b.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J.; GRAHAM, P. H. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In: WERNER, D.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and environment**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2005. p. 25-42.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v. 65, p. 151-164, 2000.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 9-89.

KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; FRANÇA NETO, J. de B.; LOPES, I. O. N.; ZORITA, M. D.; COSTA, N. P. da. Volume de calda com diferentes produtos para o tratamento de semente de soja e seu efeito sobre a qualidade fisiológica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 4., 2006, Londrina. **Resumos...** Londrina: Embrapa Soja, 2006. p. 190. Organizado por Odilon Ferreira Saraiva, Simone Ery Grosskopf.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Instrução Normativa Nº 5, de 06 de agosto de 2004**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=8590>>. Acesso em abril 2006.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Instrução Normativa Nº 10, de 21 de março de 2006**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16735>>. Acesso em abril 2006.

MENDES, I. C.; HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. **Resposta da soja à adubação nitrogenada na semeadura, em sistemas de plantio direto e convencional na Região do Cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2000. 15 p. (Embrapa Cerrados. Boletim de Pesquisa, 12).

MENDES, I. C.; HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Soybean response to starter nitrogen and *Bradyrhizobium* inoculation on a Cerrado oxisol under no-tillage and conventional tillage systems. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 81-87, 2003.

UNKOVICH, M. J.; PATE, J. S. An appraisal of recent field measurements of symbiotic N<sub>2</sub> fixation by annual legumes. **Field Crops Research**, v. 65, p. 211-228, 2000.

VAN KESSEL, C.; HARTLEY, C. Agricultural management of grain legumes; has it led to an increase in nitrogen fixation? **Field Crops Research**, v. 65, p. 165-181, 2000.

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do N<sub>2</sub> na cultura da soja. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M., eds. **Biologia dos solos de Cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p. 297-360.

WIETHÖLTER, S. Características químicas de solo manejado no sistema plantio direto. In: REUNIÓN BIENAL DE LA RED LATINOAMERICANA DE AGRICULTURA CONSERVACIONISTA, 5., 1999, Florianópolis. Anais... Florianópolis: EPAGRI, 2000. 1 CD- ROM.

ZOTARELLI, L. **Balço de nitrogênio na rotação de culturas em sistemas de plantio direto e convencional na região de Londrina, PR**. 2000. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

**Embrapa**

---

**Soja**

CGPE 6350

Patrocínio:

Fundo ANPII / RELARE

**Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento**

