

## **ANEXO à IN SDA 13, de 25/03/2011**

### **PROTOCOLOS OFICIAIS PARA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DE CEPAS PRODUTOS E TECNOLOGIAS RELACIONADA ÀS BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS.**

#### **1. DEFINIÇÕES**

Para os fins deste protocolo considera-se:

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

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

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

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

2.1. Apresentação de Relatório Técnico-Científico conclusivo, conforme item 4.3.6. O(s) pesquisador(es) coordenador(es) pela avaliação da viabilidade e eficiência agronômica deve(m) necessariamente pertencer a instituição de pesquisa oficial ou credenciada e possuir expertise em microbiologia.

2.2. Os testes devem contemplar a avaliação de qualidade do produto em laboratório de acordo com os métodos oficiais quando existentes. Nos testes de novas tecnologias que envolvam a exposição das células a condições estressantes deve ainda ser conduzido ensaio laboratorial de sobrevivência de células sobre sementes, de acordo com método oficial.

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

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

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

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

Eventuais desvios do protocolo mínimo aqui apresentado deverão ser justificados tecnicamente no Relatório Técnico-Científico conclusivo (item 4.3.6)

### 3. CONDIÇÕES BÁSICAS PARA RECOMENDAÇÃO DE NOVAS CEPAS.

Apresentação de Relatório Técnico-Científico conclusivo, conforme item 4.3.6, que atenda a todos os requisitos especificados para avaliação de cepas.

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

#### 4.1. Avaliação em laboratório

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

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

Tecnologias: Na avaliação de novas tecnologias que envolvam a sobrevivência da bactéria nas sementes deverão ser conduzidos testes laboratoriais de sobrevivência, de acordo com método oficial. A sobrevivência das bactérias no final do prazo limite especificado pelo proponente para o produto em teste deverá ser comparada com o tratamento testemunha que reproduza a recomendação técnica, ou seja, determinação da sobrevivência do micro-organismo no mesmo dia da inoculação, sendo as bactérias protegidas dos fatores estressantes.

#### 4.2. Testes de seleção de cepas (tubos de ensaio)

Colocar as sementes pré-germinadas em tubos, contendo solução autoclavada de Hoagland agarizada a 0,6%<sup>1</sup> ou similar. Inocular a suspensão das cepas em fase de crescimento e concentração de células compatíveis com o objetivo do estudo em cada tubo. Devem ser empregados no mínimo quatro repetições para cada tratamento.

4.2.1. Os testes de seleção de cepas em tubos de ensaios deverão conter, no mínimo, os seguintes tratamentos

Tratamento 1. Ausência de inoculação e de fertilizante nitrogenado;

Tratamento 2. Controle sem inoculação, com suprimento de nitrogênio na concentração recomendada para a cultura;

Tratamentos 3. Inoculação de cepas já recomendadas para a cultura, testadas separadamente, quando existentes;

Tratamentos 4. Cepas a serem testadas.

4.2.2. Parâmetros mínimos a serem avaliados: número (NMP) das bactérias diazotróficas, massa fresca e seca da parte aérea, superfície ou volume radicular e N total até no máximo 40 dias após a inoculação.

Registrar as condições de condução dos experimentos, como por exemplo temperatura, luminosidade, umidade, etc.

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

4.3. Avaliação de cepas, inoculantes e tecnologias em casa de vegetação e testes de eficiência agronômica a campo

Antes de realizar o ensaio em casa de vegetação ou a campo devem ser levadas em conta as seguintes considerações: a) o veículo usado na formulação do inoculante, b) adição de aditivos ou adjuvantes para eficiência de adesão do inoculante as sementes, c) cuidados essenciais após o preparo das sementes inoculadas durante as fases pré e pós-semeadura.

Cuidados devem ser tomados com as sementes inoculadas como, por exemplo, evitar exposição ao sol e contato com agrotóxicos e garantir condições adequadas de armazenamento.

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

4.3.1. Princípios básicos para o preparo do solo ou área experimental

Análise química do solo utilizado nos experimentos em casa de vegetação ou da área escolhida deverá ser realizada para determinação da necessidade de correção e de adubação, de acordo com os requerimentos da cultura. Sempre que possível, fazer análise foliar da cultura anterior para avaliar a demanda de adubação com micronutrientes.

Sementes do(s) cereal(ais) ou da cultura alvo, cultivar(es) recomendada(s) para a região, cultivar(es) recomendada(s) para a região da cultura alvo, depois de inoculadas ou não, serão semeadas de forma manual em casa de vegetação ou a campo. Em grandes áreas também poderão ser usados equipamentos adequados à semeadura das sementes inoculadas, desde que respeitado as condições de assepsia entre seu uso com os diferentes tratamentos.

As parcelas experimentais deverão ter no mínimo 4,0 x 6,0 m e serão distanciadas em 1,0 m, com espaçamento de acordo com a recomendação técnica para cultura em questão. A colheita da produção de grãos será feita nas quatro linhas centrais de cada parcela, dispensando-se 1m em cada cabeceira. O delineamento experimental utilizado deverá ser o de blocos ao acaso, com, no mínimo, quatro repetições.

4.3.2. Tratamentos

Os experimentos em vasos e de campo deverão conter, no mínimo, os seguintes tratamentos:

Tratamento 1. Ausência de fertilizante nitrogenado e de inoculação;

Tratamento 2. Controle com suprimento de nitrogênio mineral na dose recomendada para a cultura

Tratamento 3. Metade da dose de nitrogênio mineral recomendada para a cultura

Tratamento 4. Inoculação padrão contendo ao menos uma das cepas recomendadas para a cultura, quando existente.

Observação: Nos tratamentos 2 e 3 empregar como fonte de N a uréia ou outra fonte recomendada para a cultura e parcelar a dose total em duas aplicações, sendo 50% no plantio e 50% na floração.

Outros tratamentos envolvendo outras porcentagens de redução na dose de N aplicada e associando doses de nitrogênio com a inoculação poderão ser incluídos, a depender do modo de uso que se pretenda indicar para o produto.

Para a maioria dos grãos, a inoculação padrão consiste em umedecer as sementes com goma arábica ou polvilho a 3% ou solução açucarada 10%, usando no máximo 300 mL por 50 kg de sementes, e aplicação de aproximadamente  $1,0 \times 10^5$  células por semente, de um inoculante turfoso com população mínima de  $1 \times 10^8$  células por g ou mL de inoculante. Nos casos em que esta recomendação não for seguida, especificar o procedimento de inoculação e concentração de células no material propagativo.

Sempre usar a mesma população de células para a inoculação padrão e para os inoculantes ou cepas em teste, assim como a dose recomendada pelo fabricante (dois tratamentos por produto, caso a recomendação do fabricante resulte em diferente número de células por semente).

#### 4.3.3. Análises e parâmetros a serem avaliados

##### 4.3.3.1. Caracterização química e física do solo

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

##### 4.3.3.2. População de bactérias diazotróficas

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

##### 4.3.3.3. Parâmetros relacionados à cultura

Devem ser avaliados: produção de biomassa vegetal seca (parte aérea e/ou raízes) (g/planta) e N-total na massa seca (mg N/planta) e nos grãos (kg N/ha), bem como outros parâmetros inerentes à cultura em questão. No caso de grãos, apresentar, também os resultados de eficiência das cepas na produção, representada pelo teor de N nos grãos, rendimento da cultura a 13% de umidade em kg/ha. Os dados de rendimento devem ser apresentados também para outras culturas.

#### 4.3.4. Análise estatística

Os resultados devem ser submetidos à análise de variância e, quando o teste “F” for significativo a 5%, as médias dos tratamentos deverão ser comparadas por um teste de média adequado, também ao nível de 5% de significância. Se o teste de “F” não for significativa a 5% mas apresentar significância a 10%, as médias dos tratamentos deverão ser comparadas pelo teste de média, também ao nível de 10% de significância.

#### 4.3.5. Interpretação dos Resultados

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

#### 4.3.6. Relatório Técnico-Científico

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

<sup>1</sup> BALDANI, V. L. D. ; BALDANI, José Ivo ; DÖBEREINER, Johanna . Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp.. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v. 30, p. 485-491, 2000.

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