

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

DISSERTAÇÃO

Influência da disponibilidade de hidrogênio (H_2) no desenvolvimento vegetativo do milho sob condições controladas.

Ediana Silva Araújo

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
FITOTECNIA**

**INFLUÊNCIA DA DISPONIBILIDADE DE HIDROGÊNIO (H₂) NO
DESENVOLVIMENTO VEGETATIVO DO MILHO SOB CONDIÇÕES
CONTROLADAS.**

EDIANA SILVA ARAÚJO

Sob a Orientação do Pesquisador
Segundo Urquiaga

Co-orientação da Pesquisadora
Norma Gouvêa Rumjanek

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no curso de Pós-graduação em Fitotecnia. Área de concentração em Agroecologia.

**Seropédica, RJ
Julho de 2013**

633.15

A663i

T

Araújo, Ediana Silva, 1983-

Influência da disponibilização de hidrogênio (H₂) no desenvolvimento vegetativo do milho sob condições controladas / Ediana Silva Araújo. - 2013.

ix, 38 f.: il.

Orientador: Segundo Urquiaga.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, 2013.

Bibliografia: f. 32-38.

1. Milho - Cultivo - Teses. 2. Plantas - Efeito do hidrogênio - Teses. 3. Plantas - Desenvolvimento - Teses. 4. Rotação de cultivos agrícolas - Teses. 5. Nitrogênio - Fixação - Teses. I. Urquiaga Caballero, Segundo Sacramento, 1950-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

EDIANA SILVA ARAÚJO

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no curso de Pós-Graduação em fitotecnia, área de concentração em Agroecologia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 17/07/2013

Segundo Urquiaga. Dr. Embrapa Agrobiologia
(Orientador)

Raul de Lucena Duarte Ribeiro. Dr. UFRRJ

Cláudia Pozzi Jantalia. Dra. Embrapa Agrobiologia

DEDICATÓRIA

*Aos meus amados pais Francisco Matias Araújo e Maria
Madalena Silva Araújo e aos meus queridos irmãos,
pelo grande amor e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus por está sempre ao meu lado proporcionando vitórias na minha vida.

A minha família pelo apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

Ao curso de Pós-Graduação em Agronomia - Fitotecnia por possibilitar a confecção desta dissertação.

À Embrapa Agrobiologia por oferecer todo suporte necessário.

Aos meus orientadores Dr. Segundo Urquiaga, Dra. Norma Gouvêa Rumjanek pela orientação, confiança, paciência, dedicação e preciosas sugestões para o desenvolvimento do trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Raul de Lucena Duarte Ribeiro, Cláudia Pozzi Jantalia pela contribuição.

Ao Dr. Robert Michael Boddey, Bruno Alves, Ednaldo da Silva Araújo, Fabiana de Carvalho Dias Araújo, Ana Paula Guimarães, Marcio dos Reis Martins pelas preciosas sugestões para o desenvolvimento do trabalho.

Aos laboratoristas da EMBRAPA Agrobiologia, Roberto Grégio, Renato, Ednelson e Altiberto pelo auxílio na realização do trabalho e análises.

Aos funcionários do campo experimental e casa de vegetação pela participação na condução do experimento.

Aos amigos pelo agradável e proveitoso convívio.

Resumo geral

Araújo, Ediana Silva. Influência da disponibilidade de hidrogênio (H_2) no desenvolvimento vegetativo do milho sob condições controladas. 2013. 38 p. Dissertação (Mestrado em agronomia, Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

O gás hidrogênio (H_2) é subproduto da fixação biológica de nitrogênio (FBN), produzido pela ação da nitrogenase e se difunde no solo. Algumas estirpes de rizóbio possuem a enzima hidrogenase (Hup^+) que oxida o H_2 . Diante disso, o gás não é liberado para o solo. As estirpes que não possuem esta enzima são chamadas de Hup^- , e o H_2 é liberado para o solo, onde é oxidado por alguns dos microrganismos presentes, que podem possuir potencial para estimular o crescimento de plantas, este efeito foi observado anteriormente. Para avaliar o efeito do H_2 em plantas de milho, foram utilizadas duas abordagens diferentes de disponibilização de H_2 . A primeira consistiu no tratamento do substrato com adição de gases (H_2 e ar comprimido) com vazão controlada por um período de 38 dias. A segunda consistiu no pré-cultivo de soja inoculada com estirpes de *Bradyrhizobium* (Hup^+ e Hup^-). No plantio subsequente do milho as plantas foram avaliadas quanto ao seu desenvolvimento vegetativo. Não houve efeito benefício sob o desenvolvimento vegetativo das plantas de milho cultivadas em substrato com adição de H_2 . No entanto as plantas de milho cultivadas em substrato com pré-cultivo de soja inoculada com a estirpe CPAC 15, Hup^- , apresentaram maior acúmulo de nitrogênio.

Palavras chaves: Rotação de culturas, *Glycine Max*, Hidrogênio, Hidrogenase, Fixação biológica de nitrogênio, *Zea mays*.

General abstract

Araújo, Ediana Silva. Influence of the availability of hydrogen (H₂) in maize plant development under controlled conditions. 2013. 38p. (Dissertation, Master of Agronomy/crop science). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Hydrogen (H₂) is a by-product of the symbiotic nitrogen fixation between legumes and root-nodule (rhizobia). Some rhizobium strains have an uptake hydrogenase enzyme (Hup⁺) that oxidizes H₂ and so do not emit H₂. Other rhizobia (Hup⁻) do not have the enzyme and H₂ is released into the soil where it is oxidised by microorganisms present which may have the potential to stimulate the growth of plants. The objectives were to examine the beneficial effect of H₂ on maize plants, two different approaches were used to expose the soil to H₂. Treatment of soil in the laboratory consisted of the addition of gas (H₂ and compressed air) at a flow rate controlled by a period of one month. In a further treatment the soil was planted with soybean plants inoculated with Hup⁺ or Hup⁻ strains of *Bradyrhizobium*. Subsequently maize plants were planted in both treatments to evaluate their performance. There was no confirmation of any beneficial effect of the treatments of these soils on the growth of maize as evaluated using the parameters of biomass and nitrogen content accumulated in plants.

Key words: Crop rotation, *Glycine Max*, Hydrogen, Hydrogenase, nitrogen fixation, *Zea mays*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO LITERATURA	2
2.1 Rotação de Culturas	2
2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio	2
2.2.1 Complexo nitrogenase.....	3
2.3 Sistema Enzimático de Captação Hidrogenase (Simbiose Hup+).....	4
2.4 Estirpes de Bradyrhizobium (Hup+ e Hup-)	4
2.5 Influência do Hidrogênio no Crescimento de Plantas Não Leguminosas.....	5
2.6 Bactérias Associadas às Plantas.....	5
3. CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO DE AMOSTRA DE TERRA COM H₂ NO DESENVOLVIMENTO VEGETATIVO DO MILHO (ZEA MAYS L.) SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS.....	8
3.1 Introdução	11
3.2 Material e Métodos	12
3.2.1 Tratamento do substrato com H ₂ e cultivo do milho.....	12
3.3 Resultados e Discussão.....	14
3.4 Conclusão.....	16
4. CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PRÉ-CULTIVO DE SOJA INOCULADA COM DIFERENTES ESTIRPES DE BRADYRHIZOBIUM (HUP+ OU HUP-) NO DESENVOLVIMENTO DO MILHO, SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS.....	17
4.1 Introdução	20
4.2 Material e Métodos	20
4.2.1 Cultivo da soja inoculada com estirpes de Bradyrhizobium Hup+ e Hup-.....	20
4.2.2 Pré-cultivo da soja colhida na fase de floração, 57 dias após o plantio (Experimento 1).....	23
4.2.3 Pré-cultivo da soja colhida na fase de formação de vagens, 70 dias após o plantio (Experimento 2).....	23
4.3 Resultados e Discussão.....	24
4.3.1 Efeito da inoculação com diferentes estirpes de Bradyrhizobium no crescimento da soja até a fase de formação das vagens.	24
4.3.2 Efeito do pré-cultivo da soja até a fase de floração sobre o crescimento vegetativo do milho subsequente.	27
4.3.3 Efeito do pré-cultivo da soja até a fase de formação das vagens sobre o crescimento vegetativo do milho subsequente.	28
4.4 Conclusão.....	31
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Efeito da disponibilidade de hidrogênio em substrato de terra sobre o crescimento vegetativo do milho (matéria seca e nitrogênio total), colhido aos 50 dias após o plantio. 14
- Tabela 2** - Característica das estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*, utilizadas no experimento. 21
- Tabela 3** - Acúmulo de matéria seca (MS) em plantas de soja não inoculada, sorgo e soja inoculada com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium*, colhidas aos 70 dias após o plantio. .. 24
- Tabela 4** - Efeito dos tratamentos de inoculação na cultura da soja, quanto ao acúmulo de nitrogênio total (N) e % de N derivado do ar (N_{dda}), aos 70 dias após o plantio..... 26
- Tabela 5** - Efeito da estirpe de *Bradyrhizobium* (Hup- e Hup+) utilizada no pré-cultivo da soja até a fase de floração sobre o crescimento vegetativo e acúmulo de nitrogênio nos tecidos de milho, aos 55 dias após o plantio..... 27
- Tabela 6** - Efeito da estirpe de *Bradyrhizobium* (Hup- e Hup+) utilizada no pré-cultivo da soja até a fase de formação das vagens sobre o crescimento vegetativo do milho e acúmulo de nitrogênio nos tecidos, aos 51 dias após o plantio..... 29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Procedimento utilizado para o tratamento do substrato com de H ₂ e ar comprimido.	12
Figura 2 - Desenvolvimento das plantas de milho, 20 dias após a germinação, crescendo em solo com ou sem tratamento com H ₂	14
Figura 3 - Plantas de soja com 25 dias, inoculadas com estirpes de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	22

1. INTRODUÇÃO GERAL

A rotação de cultura é entendida como o plantio alternado de culturas numa mesma área agrícola, podendo ser cultivadas em monocultura ou em consorciação. As espécies vegetais são exploradas comercialmente ou destinadas somente à cobertura do solo e adubação verde.

As vantagens da rotação de culturas, como equilíbrio biológico que contribui no controle de pragas e plantas espontâneas, favorecimento da ciclagem de nutrientes e melhoria da qualidade física do solo (PERIN et al., 2004; FOLONI et al., 2006; TOKURA e NÓBREGA, 2006). Deve-se dá-se preferência à inclusão de plantas fixadoras de nitrogênio na rotação de culturas anuais pela possibilidade de fornecer nitrogênio para a cultura subsequente.

O nitrogênio é o elemento cuja escassez mais limita a produtividade das culturas, devendo o solo ser enriquecido pelo mesmo. Desta forma, a cultura da soja assumiria um papel relevante no enriquecimento de nitrogênio, uma vez que é capaz de acumular mais de 150 kg N ha⁻¹ derivados da FBN (GILLER e WILSON, 1993; ZOTARELLI, 2000), sendo o principal componente das rotações de culturas para produção de grãos no País.

A resposta significativa de culturas de cereais em rotação com plantas fixadoras de nitrogênio é demonstrada em diversas pesquisas. Mais recentemente tem-se observado vantagem adicional das leguminosas fixadoras de nitrogênio, a qual está relacionada à liberação de H₂ no solo, gás que pode promover o desenvolvimento de microrganismos oxidantes de H₂ no solo. Estes microrganismos, por sua vez, favorecem o crescimento vegetal das culturas sucessoras, por possuírem potencial de promoção de crescimento vegetal.

A disponibilidade do gás no solo depende do tipo de estirpe de *Bradyrhizobium* contida no inoculante das sementes das leguminosas, as estirpes podem ou não possuir a enzima hidrogenase ('hydrogen uptake' – Hup), que tem a finalidade recuperar o H₂ proveniente do processo de fixação biológica de nitrogênio, não o liberando para o ambiente.

Nódulos formados com estirpes contendo hidrogenase chamadas de estirpes Hup⁺, normalmente não liberam H₂, pois este é utilizado como fonte de energia no próprio processo de FBN. Por outro lado na inoculação feita com estirpes que não possuem esta enzima denominada estirpes Hup⁻ observa-se a liberação de H₂ para o meio, já que não ocorre a reciclagem do H₂, representando assim uma fonte de energia para os microrganismos do solo. Desta forma, em nódulos com estirpes sem hidrogenase, pela disponibilização do gás H₂, acarreta uma tendência ao desenvolvimento de bactérias oxidantes deste gás, podendo otimizar a mineralização de nutrientes e promover o crescimento das plantas em cultivo subsequente.

A busca de inoculantes bacterianos como biofertilizantes eficazes é um passo importante para o desenvolvimento de sistema de agricultura mais sustentável.

A hipótese deste trabalho foi a de que o gás H₂, liberado durante o processo de fixação biológica de nitrogênio quando disponível pode ser utilizado por bactérias oxidantes que atuam como promotoras de crescimento vegetal.

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento vegetativo de plantas de milho em substrato com adição de H₂, em laboratório (Capítulo I) ou em sucessão ao cultivo da soja inoculada com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium*, Hup⁺ ou Hup⁻ (Capítulo II).

2. REVISÃO LITERATURA

2.1 Rotação de Culturas

A utilização de rotação de culturas às vezes é responsável pelo aumento da oferta de nitrogênio, melhorias na disponibilidade de água, nutrientes, estrutura, atividade microbiana do solo e controle de plantas espontâneas, redução de insetos e a incidência de doença, bem como a presença de compostos fitotóxicos e/ou substâncias promotoras do crescimento proveniente de resíduos da cultura também foram identificados como fatores que contribuem (KARLÉN et al., 1994).

O sucesso de culturas de cereais neste sistema de cultivo é relatado na literatura. O efeito da rotação de cultura tem sido demonstrado independentemente da rotação com culturas ou plantas contendo leguminosas ou não leguminosas (BERZSENYI et al., 2000). No entanto com a utilização de leguminosas pode-se ter o efeito residual do nitrogênio para a cultura seguinte, possuindo assim, maior potencial de produção em relação à rotação sem o uso de leguminosa. Este efeito foi observado por Rehm et al. (2012) em aumento significativo de 45% na produção de grãos de trigo em rotação com leguminosa forrageira, comparado com a produção de trigo em sucessão ao cultivo de não leguminosa. Sendo que a maior produção se deu quando a leguminosa foi cultivada por um período maior.

Zotarelli et al. (2012) observaram aumento na produção de grãos de milho em sistema de rotação de culturas utilizando soja. Este aumento na produção foi atribuído à utilização da adubação verde, a qual pode adicionar nitrogênio, proteção do solo contra erosão, eliminação de ervas espontânea e preservação da água no solo.

Soon et al. (2007) observaram maior mineralização de carbono em rotação com leguminosas de adubo verde seguida de culturas de cereais em relação ao pousio seguido de rotação com culturas de cereais e a agricultura convencional. Segundo Bellido et al. (1997) a necessidade de um período superior a três anos com cultivo em rotação incluindo leguminosa para observar quaisquer mudanças significativas no teor de matéria orgânica e N no solo.

O efeito benéfico das leguminosas tem sido observado também em sistemas de cultivo consorciado ou múltiplos usado por pequenos produtores. Este sistema de cultivo consiste no plantio de mais de uma cultura, na mesma área, num mesmo período. Sendo assim, tem-se o uso da terra mais eficiente (SOARES et al., 2000).

Em manejo convencional, Soares et al. (2000) obtiveram tanto em consórcio com fileira simples de milho e dupla de feijão quanto em fileira dupla de milho e dupla de feijão, uma taxa indireta de retorno e benefícios líquidos superiores aos sistemas de monocultivo do feijão e milho.

Hodtke et al., (1997) observaram que o balanço de nitrogênio no consórcio de milho com caupi e posterior incorporação do caupi ao solo chega perto do equilíbrio, demonstrando que a utilização de adubo verde é capaz de retribuir todo o nitrogênio que sai do sistema pelos produtos colhidos.

2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio

O nitrogênio molecular (N_2) representa grande parte dos gases da atmosfera que, no entanto, não é aproveitado diretamente por parte significativa dos seres vivos, exceto alguns procaríotos, devido à alta estabilidade do N_2 , por isso, há escassez de forma disponível para as plantas (NEVES e RUMJANEK, 1992). Diante disso, por meio de seleção e inoculação de bactérias diazotróficas eficientes, há o aproveitamento das grandes reservas de N_2 (HUNGRIA, 2011). Sendo o nitrogênio fixado transferido através do xilema, no caso das

plantas superiores (NEVES e RUMJANEK, 1992).

O processo de FBN tem como vantagens o aumento da produção vegetal, por receber nitrogênio via simbiose. Esta principal vantagem, em curto prazo, leva a economia no uso de fertilizantes nitrogenados industrializados, contribuindo para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas (RUMJANEK et al., 2005).

Para a estimativa da FBN em leguminosas existem diferentes métodos, destacando-se a diferença de N-total, o balanço de nitrogênio no sistema solo-planta, a redução de acetileno, abundância relativa de ureídeos e as técnicas isotópicas baseadas no uso do ^{15}N (BODDEY, 1987). Dentre estas técnicas de quantificação da FBN, as baseadas no uso do isótopo do ^{15}N têm sido largamente empregadas, e mais recentemente, a que utiliza a abundância natural de ^{15}N por não necessitar de previa marcação com ^{15}N no local do experimento, podendo ser utilizada para a estimativa da FBN em culturas anuais no campo.

O uso de ^{15}N baseia-se no fato de que na natureza existem dois isótopos estáveis do nitrogênio, o de massa 14 e o de massa 15. No ar, são encontrados na proporção de 99,6337 e 0,3663 % de átomos de ^{14}N e ^{15}N , respectivamente, sendo a proporção de ^{15}N denominada abundância natural de ^{15}N (JUNK e SVEC, 1958).

A técnica que utiliza N_2 enriquecido com ^{15}N é a única prova direta da contribuição da FBN para as culturas, porém as técnicas baseadas na diluição isotópica de ^{15}N são consideradas as mais adequadas para produzir resultados confiáveis em condições de campo (BODDEY e URQUIAGA, 1992).

A quantificação da FBN pela técnica de diluição isotópica é realizada por meio do cultivo de planta fixadora de N_2 e uma planta referência não fixadora de N_2 em solo com N mineral marcado com ^{15}N acima da abundância natural. Plantas que obtenham além do N do solo, o N atmosférico (não marcado), sofrem uma diluição no seu enriquecimento em ^{15}N . Quanto maior a diluição, maior a quantidade de N atmosférico incorporado, ou seja, maior a contribuição da FBN. Nesta técnica é fundamental que a leguminosa e a planta referência absorvam nitrogênio do solo com a mesma marcação com ^{15}N , sendo assim necessária uma marcação de ^{15}N constante em profundidade e tempo, ou que a planta fixadora e referência tenham marchas de absorção de nitrogênio idênticas (BODDEY, 1987).

A quantificação da FBN pelo método da abundância natural de ^{15}N tem como premissa básica o fato de que o N mineral do solo é normalmente um pouco enriquecido com ^{15}N como resultado de fracionamento isotópico entre ^{14}N e ^{15}N que ocorre durante os processos físicos, químicos e biológicos. Os quais levam em consideração o N da matéria orgânica do solo (SHEARER e KOHL, 1986). Desta forma, planta não fixadora de N_2 terá sua composição em ^{15}N semelhante ao do N disponível no solo. Enquanto plantas fixadoras de N_2 apresentarão menores teores de ^{15}N , devido ao efeito da diluição proveniente do N_2 do ar. Visto que não há excesso de ^{15}N na atmosfera, a taxa de fixação de nitrogênio pode ser determinada pela proporção de diluição de ^{15}N (SHEARER e KOHL, 1986).

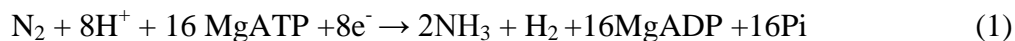
Este método tem como vantagem o fato de não haver necessidade de adição de N marcado, evitando os problemas de inibição da fixação de N_2 e de estabilidade da marcação ao longo do tempo (SHEARER e KOHL, 1986).

2.2.1 Complexo nitrogenase

Segundo Yates (1980), a transformação química do nitrogênio atmosférico em amônia exige temperatura e pressão muito elevadas para romper a ligação tripla covalente entre os dois átomos de nitrogênio. A energia para atingir essas condições pode ser suprida por meio de fontes de energia não renováveis. Por outro lado, a presença do complexo caracterizado como nitrogenase capaz de fixar biologicamente o nitrogênio existente nos microrganismos diazotróficos utiliza energia proveniente de processos foto ou quimiossintéticos ou obtida a

partir de carboidratos (fermentação ou respiração) e armazenada sob a forma de ATP (NUNES et al., 2003).

A estequiometria da reação de redução do N_2 até NH_3 é apresentada na equação 1, a qual é catalisada pelo complexo nitrogenase.



Foram caracterizados pelo menos quatro tipos de nitrogenase que se diferenciam pela composição do metal e de seus sítios ativos. A mais estudada é a composta por duas proteínas, a Fe proteína e a MoFe proteína, que trabalham juntas para catalisar a redução de N_2 . Apesar do expressivo número de pesquisas que já foram realizadas, ainda há muito a ser esclarecido sobre o mecanismo de redução de N_2 efetuado pela nitrogenase (BARNEY et al., 2006).

2.3 Sistema Enzimático de Captação Hidrogenase (Simbiose Hup⁺)

A enzima hidrogenase catalisa o equilíbrio redox, $2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2$. Esta enzima é um complexo de proteínas de metal multidomínio de elevado peso molecular. É capaz de oxidar parcialmente ou completamente o hidrogênio produzido em nódulos. Esta oxidação simbiótica de hidrogênio reduz as perdas de energia associadas com a fixação de nitrogênio e aumenta a produtividade em hospedeiros de certas leguminosas (ALBRECHT et al., 1979). Esta enzima é comumente encontrada em *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium sp.* (Lupinus) e *Bradyrhizobium sp.* (Vigna) (SCHUBERT et al., 1977).

Embora não tenha sido completamente elucidada, vários mecanismos têm sido usados para explicar o efeito benéfico associado com a atividade simbiótica da hidrogenase. Entre eles, a reação hidrogenase pode proteger a nitrogenase a partir da diminuição do efeito prejudicial do oxigênio, prevenir inibição da reação de nitrogenase por hidrogênio ou fornecer uma fonte adicional de energia, em que as estirpes que oxidam hidrogênio esteja acoplado na utilização da energia para a geração de ATP (ARP, 1977).

2.4 Estirpes de *Bradyrhizobium* (Hup⁺ e Hup⁻)

Durante o processo de fixação de nitrogênio a enzima nitrogenase produz como subproduto, o gás H_2 (SCHUBERT e EVANS, 1976). Em uma leguminosa que fixa 200 kg N ha^{-1} , cada hectare seria capaz de produzir cerca de 240000 L de H_2 por temporada (DONG et al., 2003). As estirpes Hup⁺ possuem a enzima hidrogenase que recupera grande parte da energia despendida na produção de H_2 (BAGINSHY et al., 2005). Estirpes usadas para nodulação de soja como 29 W, DF 395 e SM₁b (grupo I) são conhecidas por produzir nódulos com baixa eficiência de FBN, enquanto as estirpes 965, CB 1809 e DF 383 (grupo II) produzem nódulos menores, porém mais eficientes. Os resultados obtidos nesses experimentos relacionavam à eficiência dos nódulos a presença da hidrogenase; as estirpes ineficientes do grupo I eram Hup⁻, enquanto, as estirpes eficientes do grupo II, Hup⁺ (NEVES et al., 1985).

Neves et al. (1985) observaram também que o nitrogênio na seiva das plantas inoculadas com as estirpes do grupo II era composto em sua maioria por 64 a 94% de ureídeos enquanto que as estirpes do grupo I por 38 a 72% e ainda que não houvesse diferença significativa nas taxas de translocação de nitrogênio durante o enchimento de grãos, as estirpes do grupo II pareciam translocar um pouco mais de nitrogênio. Plantas inoculadas com as estirpes do grupo II tiveram maior índice de colheita. Segundo Kuykendall et al. (1992), as estirpes pertencentes ao grupo I são chamadas de *Bradyrhizobium elkanii* e estirpes do grupo

II de *Bradyrhizobium japonicum*. A evolução de hidrogênio apesar de variável ao longo do ciclo foi sempre maior para o grupo I em relação ao grupo II, no mesmo período.

Mais recentemente, Golding e Dong (2010) rediscutiram o papel de genes *hup* nos parâmetros relacionados à fixação do N₂ e rendimento da planta de cereais em rotação e concluíram que ainda não é clara esta correlação, apesar dos resultados apresentados que demonstraram o sucesso da simbiose relacionada com as bactérias Hup⁺.

Nessa nova interpretação, segundo Maimait et al. (2007) as estirpes Hup⁻ que não possuem a enzima hidrogenase enriquecem o solo com H₂ que é consumido pelas bactérias oxidantes de H₂ que atuam como promotoras de crescimento nas plantas por meio da inibição da biossíntese de etileno.

2.5 Influência do Hidrogênio no Crescimento de Plantas Não Leguminosas

Alguns autores constataram incremento no crescimento de plantas, como trigo e cevada, em solos pré-tratados com H₂. Dong et al. (2003) avaliaram o efeito do crescimento de plantas de soja não nodulada, trigo, cevada e canola frente à exposição de H₂ em casa de vegetação e campo e observaram que houve um aumento significativo da biomassa seca total das plantas.

Resultados semelhantes foram confirmados também por Maimaiti et al. (2007) que isolaram bactérias do solo tratado com H₂. Os isolados foram 19 estirpes identificadas como do gênero *Variovorax*, *Flavobacterium* e *Burkholderia*. As estirpes de *Variovorax* e *Flavobacterium* apresentaram atividade de ACC (ácido 1-carboxílico-1-amino ciclopropano) sintetase que tem sido associada à promoção de crescimento. As mudas de trigo obtiveram aumento significativo no comprimento das raízes principais em 54 a 254%. Contudo, Peoples et al. (2008) examinando as relações entre a fixação de N₂ e a liberação de H₂ e as alterações da influência deste gás sobre o solo durante o cultivo da soja no desempenho da safra de milho em sucessão, não observaram resposta significativa em virtude do efeito benéfico do H₂ no crescimento do milho, mas apenas uma evidência nos dados sugerindo um possível benefício da emissão de H₂.

Golding et al. (2012) estão de acordo com Dong et al. (2003), pois ao inocular estirpes oxidantes de H₂ em sementes de trigo e cevada encontraram diferenças significativas entre os tratamentos e controle nos perfilhos e na produção de grãos. Segundo estes autores a fertilização com H₂ para as culturas de cereais é um dos principais contribuintes para o benefício em rotação com culturas, após observar o rendimento das plantas.

Osborne et al. (2010) observaram a exposição de hidrogênio sobre as bactérias em configuração de sistema fechado e ao redor de nódulos de soja cultivada no campo, em ambos houve aumento no tamanho da comunidade bacteriana oxidante de hidrogênio de uma linhagem da ordem *Actinomycetales*. Porém, neste estudo, os autores não examinaram o papel desta ordem quanto ao estímulo ao crescimento das plantas.

2.6 Bactérias Associadas às Plantas

Várias espécies de bactérias diazotróficas são de vida livre. Diante disso, a disponibilidade de carbono do solo é fundamental, para tanto, o manejo adequado do solo pode favorecer estas espécies.

Muitos diazotróficos endofíticos podem produzir fitohormônios que consequentemente são capazes de promover o crescimento de plantas (MARIANO et al., 2004). Segundo Verna et al. (2001), bactérias que possuem mais de uma característica que promove o crescimento vegetal possuem potencial para aumentar a produção da cultura. Estes, por sua vez identificaram bactérias endofíticas que promoveu o crescimento de plantas

de arroz por fixar nitrogênio, produzir ácido indolacético e mineralização de fosfatos insolúveis.

Microrganismos endofíticos têm apresentado a capacidade de estimular o crescimento das plantas por mecanismos diretos (fixação de nitrogênio e/ou produção de fitohormônios) e por mecanismos indiretos (antagonismo contra patógenos ou resistência a drogas).

Dentre os fitohormônios, a auxina possui o efeito de promover o crescimento de raízes e caule através do alongamento das células recém-formadas nos meristemas. A principal auxina encontrada nas plantas é o ácido indol acético (AIA), que por sua vez é produzida principalmente no meristema apical do caule e transportada para as raízes (MARCHIORO, 2005).

As bactérias pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, e *Rhizobium* bem como as *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Acetobacter diazotrophicus* e *Bradyrhizobium japonicum* apresentam produção de auxinas (PATTEN e GLICK, 1996). Contudo, Pedrinho (2009) notou isolados pertencentes aos gêneros *Burkholderia*, *Bacillus*, *Sphingobacteria*, *Pantoea*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* positivos para a produção de AIA e solubilização de fosfato.

A solubilização de fosfato inorgânico pelas bactérias endofíticas tem sido alvo de grande interesse por parte dos microbiologistas agrícolas, pois esta característica apresenta um grande potencial para a promoção de crescimento vegetal. Segundo Rodríguez e Fraga (1999) a solubilização de fosfato pode ser realizada pelos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* e *Erwinia*. A atividade microbiana promove a solubilização de fosfato insolúvel possivelmente devido à produção de ácidos orgânicos (VAZQUEZ et al., 2000). Segundo Oliveira et al. (2009), a diversidade funcional e genética de bactérias da rizosfera de cultivares de milho quanto ao uso de fósforo é maior em solos com baixa disponibilidade deste nutriente.

Segundo Maimaiti et al., (2007) a ação da enzima ACC-sintetase pelas bactérias endofíticas possui potencial para a promoção de crescimento vegetal. Estes pesquisadores identificaram bactérias oxidantes de H₂ recuperadas a partir de solo tratado com H₂ pertencentes ao gênero *Variovorax* e *Flavobacterium* com atividade de ACC sintetase, as quais promoveram o aumento no alongamento das raízes. Segundo Shaharoon et al. (2006) a enzima ACC sintetase reduz os níveis de ACC, precursor do etileno em plantas superiores, implicando no aumento do comprimento de plântulas e alongamento de raiz.

Pedrinho (2009) encontrou isolados com capacidade de redução de acetileno pertencentes aos gêneros *Burkholderia sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Herbaspirillum* e *Sphingomonas sp.*

Bactérias do gênero *Azospirillum* possuem a capacidade de fixar nitrogênio em associação com gramíneas (Döbereiner e Day, 1976) e estimula o crescimento de raízes por meio da síntese de ácido indol-acético (AIA), giberelinas e citocininas (Tien et al., 1979).

Bactérias endofíticas ou associativas como *Azospirillum* spp. possuem o mesmo complexo da dinitrogenase e realiza a conversão do N₂ em amônia, porém excretam somente uma parte do nitrogênio fixado diretamente para a planta associada. Posteriormente, a mineralização das bactérias pode contribuir para a ação de nitrogênio disponível para as plantas. Diante disso, a inoculação de não leguminosa supre apenas parcialmente as necessidades em nitrogênio das plantas (Hungria, 2011).

Roesch (2007) identificou vários gêneros de bactérias no solo da rizosfera, raiz e colmo de plantas de milho, tais como: *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Ideonella*, *Klebsiella*, *Azoarcus*, *Azorhizobium*, *Azohydromonas*, *Azonexus*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Dechloromonas*, *Delftia*, *Derxia*, *Herbaspirillum*, *Methylobacterim*, *Methylocella*, *Methylocystis*, *Methylosinus*, *Paenibacillus*, *Pelomonas*, *Pseudomonas*, *Raoutella*, *Rhizobium*, *Rhodoblastus*, *Rhodovulum*, *Sinorhizobium* e

Xanthobacter.

Em ambiente onde anteriormente houve o cultivo de leguminosas pode haver maior disponibilidades de bactérias promotoras de crescimento de plantas, por serem estimuladas pelo H₂ liberado durante o processo de fixação.

Segundo Golding et al. (2012) é possível utilizar bactérias oxidantes de H₂, como inoculantes em sementes de culturas de cereais para promover os efeitos benéficos da rotação de culturas.

3. CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO DE AMOSTRA DE TERRA COM H₂ NO DESENVOLVIMENTO VEGETATIVO DO MILHO (*Zea mays L.*) SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS.

Resumo

O bom desempenho de cereais em rotação com leguminosa é bem relatado na literatura. Em estudos recentes foi observado que o H_2 liberado a partir dos nódulos durante o processo de fixação biológica de nitrogênio é oxidado por bactérias do solo, as quais podem ser promissoras no desenvolvimento de plantas, uma vez inoculadas em sementes de não leguminosas. Estas bactérias contribuem para o aumento da produção de matéria seca (MS) e grãos de cereais. Com o objetivo de avaliar o efeito da disponibilização do H_2 , no desempenho do milho quanto ao crescimento (MS) e acumulação de nitrogênio (N) nas plantas, foi realizado um experimento na Embrapa Agrobiologia em Seropédica – RJ. Foram utilizados vasos com 5 kg de substrato de terra com entrada para adição de H_2 e ar comprimido (controle), com vazão controlada durante um mês. Em seguida foi realizado o plantio do milho híbrido, cv. AG1051 em casa de vegetação. As plantas foram coletas aos 50 dias após o plantio. Não houve indicação de efeito benéfico do H_2 na cultura do milho referente à biomassa e teor de nitrogênio acumulado nas plantas. A hipótese para o efeito da disponibilização de H_2 foi rejeitada neste estudo.

Abstract

The performance of cereals in rotation with legumes is well reported in the literature. In recent studies it has been observed that H_2 released from the nodules during the process of biological nitrogen fixation is oxidized by soil bacteria, which may be promising for the development of plants inoculated seeds in non-legumes. These bacteria may contribute to increased production of dry matter (DM) and cereal grains. With the objective of evaluating the effect of pretreatment with H_2 on the dry matter (DM) and nitrogen (N) accumulation of maize plants, an experiment was conducted at Embrapa Agrobiologia in Seropédica - RJ. Pots were filled with 5 kg of soil and sparged with the H_2 and or compressed air (control) with the flow rate controlled over a month. Hybrid maize cv. AG1051 was subsequently planted in the pots. Plants were collected at 50 days after planting and there was no indication of any beneficial effect of soil pretreated with H_2 on the biomass or total N accumulation of maize plants. The hypothesis for the positive effect of H_2 emission that simulates the nodules of legumes was rejected in this study.

3.1 Introdução

Somente a fixação biológica de nitrogênio em leguminosas não explica os benefícios para as culturas de cereais cultivados em rotação com leguminosas (MYATT, 2010). O gás hidrogênio, subproduto da FBN, tem favorecido o crescimento de plantas de cereais, devido ao efeito sobre as bactérias do solo e tem sido demonstrado com a exposição de H₂ no solo em laboratório (DONG et al., 2003; MAIMAITI et al.; 2007).

O milho (*Zea mays L.*) é um cereal originário do México (BULL e CANTARELLA, 1993) e pertence à divisão Angiospermae, grupo das monocotiledôneas, família Poaceae, ordem Poales, subclasse Commelinidae e classe Liliopsida. O gênero *Zea* é considerado monotípico e constituído por uma única espécie, ou seja, *Zea mays L.* (SOUZA e LORENZI, 2005).

Nas últimas décadas, devido à diminuição de subsídio do trigo, houve um crescimento no consumo de produtos derivados de milho no Brasil (CALLEGARO et al., 2005).

Ao adotar tecnologia adequada, a cultura poderá ter altos rendimentos variando ao redor de 10 t ha⁻¹ de grãos (CARVALHO et al., 2004).

A temperatura ideal para o plantio é em médias acima de 20 °C diurnas e acima de 13°C noturnas. Temperatura acima de 35 °C por períodos prolongados podem prejudicar a polinização, formando espigas mal granadas. Além disso, temperaturas e umidade elevadas favorecem o aparecimento de doenças foliares. Diante disso, o uso de variedade resistente torna-se indispensável em regiões que apresentam estas condições climáticas (FORNAZIERI JUNIOR et al., 1999).

A fase de emergência é uma das mais importantes para a lavoura ser bem sucedida, pois nesta fase é determinado o número de plantas, sendo este, um fator importante para o rendimento (WEISMANN, 2007).

As quantidades de nutrientes extraídas pelas culturas dependem da produtividade, variedade ou das condições climáticas, fertilidade do solo, adubação e tratos culturais. As maiores exigências do milho referem-se ao potássio e nitrogênio, seguindo-se o magnésio, cálcio, fósforo e enxofre (FORNAZIERI JUNIOR et al., 1999).

Algumas necessidades nutricionais do milho podem ser supridas em parte por meio da inoculação com bactérias que fazem associação com gramíneas. Hungria (2011) obteve rendimentos médios de grãos de milho em plantas inoculadas com *Azospirillum brasilense* superior ao não inoculado. Segundo Roesch (2007), as plantas de milho podem associar-se com diferentes bactérias independentes do ambiente ou em função das condições geográficas e ambientais.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do substrato pré-tratado com H₂ no desenvolvimento vegetativo do milho e acúmulo de nitrogênio.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Tratamento do substrato com H₂ e cultivo do milho

O solo foi coletado no campo experimental da Embrapa Agrobiologia (Terraço), na profundidade de 0 a 20 cm. Este solo se manteve em pousio por 10 anos, e é classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico, e apresenta as seguintes características químicas: pH em H₂O, 5,24; Al, 0,12 cmol_c dm⁻³; Ca, 1,25 cmol_c dm⁻³; Mg, 0,74 cmol_c dm⁻³; P e K, 1,23 e 32 mg dm⁻³, respectivamente.

O tratamento com H₂ teve início em 30 de novembro de 2012 e o processo foi conduzido na Embrapa Agrobiologia. Antes do tratamento com o gás H₂ foi feita a correção do solo com aplicação de calcário dolomítico na dose de 1,0 g kg solo⁻¹. O solo foi então peneirado e misturado com areia na proporção dois para um, foram utilizados 6 vasos plásticos preenchidos com 5 kg de solo e colocado em recipientes contendo entrada para conectar tubos para fornecer o gás.

O pré-tratamento do solo foi feito de acordo com a metodologia adotada por Dong e Layzell (2001), em que o sistema de tratamento do solo que consistiu na adição de gases com vazão controlada. Neste sistema foi usado 4 mL min⁻¹ de uma mistura de nitrogênio com hidrogênio a 7%, mais 16 mL min⁻¹ de ar comprimido e o controle 20 mL min⁻¹ de ar comprimido, sendo que, este fluxo de gás passou através do solo durante 38 dias (figura 1). Foi usado um sensor de gás para medir a sua concentração. O solo foi mantido neste sistema por um período de um mês.



Figura 1 - Procedimento utilizado para o tratamento do substrato com de H₂ e ar comprimido.

O substrato tratado com gás foi utilizado para o plantio do milho. No momento do plantio foi feita adubação com 340 mg kg⁻¹ de superfosfato triplo e 100 mg kg⁻¹ de cloreto de potássio. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições, e as médias foram comparadas pela análise de variância e teste t de Student a 5% de probabilidade.

Utiliza-se o milho híbrido AG 1051, sendo semeadas quatro sementes por vaso, efetuando-se o desbaste após a emergência e deixando-se apenas duas plantas por vaso.

As plantas foram regadas diariamente e após 50 dias de cultivo foram cortadas rente ao solo e o material vegetal separado em parte aérea e sistema radicular. Em seguida, procedeu-se à secagem da parte aérea e da raiz em estufa a 65 °C para determinação da proporção de MS.

Após esse procedimento, as amostras foram processadas em moinho tipo Wiley (peneiras de 2 mm). Em seguida, pesaram-se sub-amostras da parte aérea e raiz para determinação do N total, por meio da digestão Kjeldahl, em mistura digestora contendo ácido sulfúrico e catalisadores, com posterior destilação a vapor e titulometria com ácido sulfúrico (ALVES et al., 1994).

3.3 Resultados e Discussão

Observando-se o aspecto geral das plantas de milho, percebe-se que o tratamento que não recebeu H₂ apresenta plantas visivelmente de melhor desenvolvimento (Figura 2).

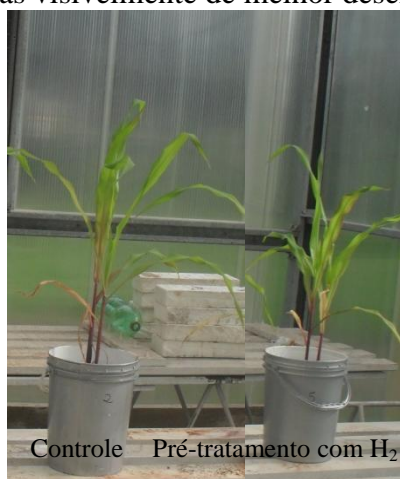


Figura 2- Desenvolvimento das plantas de milho, 20 dias após a germinação, crescendo em solo com ou sem tratamento com H₂.

As plantas de milho tratadas com H₂ ao contrário do que se esperava não indicaram uma evidência para o efeito positivo da emissão de H₂, no entanto, as plantas controle apresentaram um aumento significativo a 5% quanto ao acúmulo de matéria seca e teor de nitrogênio, na parte aérea, entretanto, o mesmo não ocorreu na raiz e planta inteira (Tabela 1). Este aumento pode ter ocorrido por haver um fluxo maior de ar, ocasionando alterações biológicas no substrato e conseguinte seleção de bactérias, sobressaindo ao efeito do H₂. O adequado fornecimento de oxigênio é fundamental para que os microrganismos possam realizar os processos metabólicos de utilização e estabilização da matéria orgânica.

Tabela 1- Efeito da disponibilidade de hidrogênio em substrato de terra sobre o crescimento vegetativo do milho (matéria seca e nitrogênio total), colhido aos 50 dias após o plantio.

Plantas	Parte Aérea ¹	Raiz ¹	Planta Inteira ¹
	-----gMS vaso ⁻¹ -----		
Com influencia de H ₂	8,46 b	5,07 a	13,52 a
Controle	10,57 a	6,31 a	16,89 a
CV (%)	0,98	16,91	6,72
	----- mgN vaso ⁻¹ -----		
Com influencia de H ₂	42,85 b	53,49 a	96,34 a
Controle	47,93 a	62,88 a	110,81a
CV (%)	2,63	17,49	8,89

¹médias de 3 repetições. Médias com letras diferentes na coluna são diferente significativamente (p≤0,05), pelo teste t de Student. CV= coeficiente de variação.

Apesar do aumento da concentração de nitrogênio na parte aérea nas plantas controle, nenhum tratamento apresentou a concentração considerada adequada para a cultura do milho, aos 55 dias de cultivo, que, segundo Jones Junior et al. (1991), está na faixa de 3,0 – 3,5 dag

kg⁻¹. Estando ao contrário de um estudo de Dong et al. (2003) em que o solo tratado com hidrogênio promoveu um aumento na matéria seca e número de perfilhos de trigo e cevada de primavera. O mesmo efeito foi observado em um estudo de Maimaiti et al. (2007) que ao isolar bactérias oxidantes de solo tratado com H₂, e inocular em sementes de trigo, todos os isolados aumentaram o comprimento das raízes entre 21 e 254% em comparação com o controle. No entanto, trigo e cevada são plantas com metabolismo de carbono C₃, diferente do milho que é C₄.

3.4 Conclusão

Com a metodologia empregada não foi possível demonstrar qualquer efeito positivo do H₂ no desenvolvimento vegetativo do milho, pelo contrário, a disponibilidade do gás acarretou significativa redução da biomassa e acúmulo de nitrogênio da planta.

4. CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PRÉ-CULTIVO DE SOJA INOCULADA COM DIFERENTES ESTIRPES DE *BRADYRHIZOBIUM* (HUP⁺ OU HUP⁻) NO DESENVOLVIMENTO DO MILHO, SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS.

Resumo

A soja pode ser benéfica em rotação de culturas considerando seu potencial de incorporar nitrogênio ao solo por meio da fixação biológica de nitrogênio (FBN), o que, por sua vez depende do uso de inoculantes. O presente trabalho teve como objetivo verificar se a inoculação da soja com estirpes de *Bradyrhizobium* que liberam H₂ para o solo (Hup⁻), possui um efeito positivo no desempenho de plantas de milho cultivadas em sucessão à soja. Foi realizado um experimento com soja cv. BRS 133 inoculada com quatro estirpes de *Bradyrhizobium*, duas Hup⁺ (USDA 110 e CPAC 7) e duas Hup⁻ (29 W e CPAC 15) e plantas referência para quantificar a FBN por meio da abundância natural de ¹⁵N. A soja foi cultivada em vasos com 10 kg de solo (Argissolo Vermelho distrófico). Dois experimentos foram conduzidos e foram colhidos em épocas distintas (início da floração ou da formação de vagens). Após a coleta das plantas, o solo dos vasos foi peneirado para remover todo o resto de plantas de soja. Logo após, 6 kg desse solo foram utilizados para o plantio de milho híbrido cv. AG1051 e posterior avaliação de seu desempenho. O tratamento 29 W proporcionou maior %N derivado do ar (%N_{da}) na parte aérea de soja em comparação aos demais tratamentos. No caso do milho, não houve diferença significativa na produção de matéria seca e acúmulo de N entre os tratamentos quando se conduziu o pré-cultivo de soja até a floração. Porém, quando se fez o pré-cultivo de soja até a formação de vagens, a inoculação da soja com a estirpe CPAC 15 (*B. japonicum*), a qual emite H₂ durante o processo de FBN, ocasionou maior acúmulo significativo de nitrogênio na planta inteira de milho.

Abstract

Soybean can be beneficial in crop rotations considering its potential of nitrogen incorporation to the soil through the biological nitrogen fixation (BNF), which depends on the use of inoculants. The aim of this study was to investigate if the inoculation of soybean with strains of H₂-producing *Bradyrhizobium* influences the growing of maize in succession to soybean. An experiment was conducted using the soybean cv. BRS 133 inoculated with four strains of *Bradyrhizobium*, two Hup⁺ (USDA 110 and CPAC 7) and two Hup⁻ (29W and CPAC 15), and a reference plant to quantify the BNF in soybean using natural abundance of ¹⁵N in tissues. The soybean plants were grown in pots containing 10 kg of soil (Typic Paleudalf) and were harvested at the beginning of the flowering and pod formation. After soybean harvest, the soil in the pots were sieved aiming to remove soybean residues and then 6 kg of this soil was used for planting a maize cv. AG1051. Maize plants were harvested 55 d after seeding for determination of DM and N content. The inoculation with strain 29 W provided higher soybean root DM. Nitrogen content in soybean tissues was significantly higher with USDA 110 inoculant, except in nodules, in which N content was not influenced by inoculants. The inoculation with 29 W provided the highest N derived from atmospheric N₂ (Ndfa%) in soybean shoots. In the case of maize, no significant difference was observed for dry mass yield accumulated N among treatments after soybean pre-cultivated until flowering. However, when soybean was pre-cultivated until pod formation, the inoculation of soybean with the strain CPAC 15 (*B. japonicum*), which is H₂ emitting during BFN, resulted in greater accumulation of nitrogen in entire plant of maize.

4.1 Introdução

O uso de rotação de culturas contribui para a fertilidade do solo, por conservar a matéria orgânica do solo. A matéria orgânica melhora a estrutura do solo, mantendo-o friável e permeável ao ar, água, e facilitar o desenvolvimento das raízes; fornece composto de carbono, ciclos de nutrientes e processos microbianos que mantêm a produtividade do solo (SOON et al., 2007).

As leguminosas nodulantes são usadas em rotação de cultura, pois possuem potencial para diminuir a quantidade de fertilizantes nitrogenados aplicados ao solo (FAGERIA, 1998). Desta forma, devem-se adotar medidas eficientes, tais como, maximizar a fixação biológica de nitrogênio nestas plantas.

A espécie *Glycine max* pertence a família Fabaceae (Leguminosae), é uma planta herbácea anual que apresenta caule ereto, ramificado e piloso, normalmente com altura variando de 30 a 150 cm (Gomes, 1990). Apresenta duas fases de desenvolvimento: vegetativa e reprodutiva. A completa maturação da soja pode variar de 75 dias para as variedades precoces a 200 dias para as variedades tardias (VARGAS e HUNGRIA, 1997).

A fixação biológica de nitrogênio é capaz de suprir toda demanda de nitrogênio da cultura da soja. Hoje se tem estirpes de rizóbio eficientes disponíveis para a produção de inoculantes comerciais produzidos na Argentina e no Brasil e exportados para outros países da América do Sul que possibilitam o fornecimento de N, dispensando a adubação nitrogenada (HUNGRIA, 2011).

No Brasil, as estirpes de rizóbio registradas no Ministério da Agricultura recomendadas como inoculantes para a cultura da soja são: SEMIA 587 (BR 96), SEMIA 5019 (29 W), SEMIA 5079 (CPAC 15) e SEMIA 5080 (CPAC 7), sendo que o inoculante comercial deve conter ao menos duas das quatro estirpes recomendadas.

Das estirpes recomendadas a SEMIA 587 e SEMIA 5019 são *B. elkanii* e a SEMIA 5079 e SEMIA 5080 são *B. japonicum* (Sato et al., 1999; Rumjanek et al., 1993).

O presente trabalho teve como objetivo verificar se a inoculação da soja com estirpes de *Bradyrhizobium* que libera H_2 no solo (Hup⁻) possui um efeito positivo no desempenho de plantas de milho cultivadas em sucessão à soja.

4.2 Material e Métodos

Para avaliar o efeito do cultivo da soja inoculada com estirpes de *Bradyrhizobium*, Hup⁺ e Hup⁻ (que libera H_2 durante o processo de FBN) sobre o desenvolvimento do milho plantado em sucessão, foram instalados dois experimentos. No primeiro experimento, quando a soja atingiu o pleno florescimento, todo o material vegetal (parte aérea, raízes e nódulos) foi removido e o solo utilizado para o plantio do milho. No segundo experimento, a remoção do material da soja se deu quando esta atingiu a formação das vagens.

4.2.1 Cultivo da soja inoculada com estirpes de *Bradyrhizobium* Hup⁺ e Hup⁻

Os experimentos foram instalados em 27 de dezembro de 2012, na área experimental da Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ. No primeiro experimento, foram usados vasos plásticos cada um preenchido com 10 kg de solo. O solo foi coletado no campo experimental da Embrapa Agrobiologia (Terraço), classificado como Argissolo Vermelho Amarelo distrófico na profundidade de 0 a 20 cm, apresentava as seguintes características químicas: pH em H_2O , 5,16; Al, 0,13 $cmol_c dm^{-3}$; Ca, 0,60 $cmol_c dm^{-3}$; Mg, 0,31 $cmol_c dm^{-3}$; P e K, 7,56 e

54 mg dm⁻³, respectivamente.

Cinco dias antes do plantio foi feita a correção do solo com aplicação de calcário dolomítico na dose de 0,7 g kg solo⁻¹ e adubação com 200 mg solo⁻¹ de superfosfato simples e 85 mg solo⁻¹ de cloreto de potássio. Utilizou-se sementes da cultivar BRS 133 de soja (*Glycine max* L.). Antes da semeadura as sementes foram previamente desinfestadas em etanol 70 %, por 3 min, seguido por 2 min de imersão em hipoclorito de sódio e depois lavada 10 vezes com água esterilizada.

Os tratamentos consistiram em soja inoculada com duas estirpes (Hup⁻): 1) CPAC 15/BR 86 ou 2) 29W/BR 29; e como controle soja inoculada com duas estirpes (Hup⁺): 1) CPAC 7/BR 85 ou 2) BR 116, como mostra a (Tabela 22). No primeiro experimento o delineamento foi em blocos casualizados com três repetições, totalizando 12 unidades experimentais. Foram semeadas cinco sementes por vaso, efetuando-se o desbaste após a emergência, deixando-se duas plantas por vaso. No segundo experimento, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com seis repetições. Além dos tratamentos com soja inoculada com estirpes Hup⁻ e controle Hup⁺, foi usado soja não inoculada e sorgo como planta referencia (Figura 3). O inoculante utilizado foi turfa; durante os primeiros 15 dias as plantas foram irrigadas com água destilada autoclavada, para garantir o estabelecimento da estirpe inoculada. Depois, utilizou-se água potável de torneira na quantidade necessária para o desenvolvimento das plantas.

Tabela 2 - Característica das estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*, utilizadas no experimento.

Estirpe / Nomenclatura		Características
<i>B. japonicum</i>		
SEMIA 5079 ^{ab}	CPAC 15/BR 86	Hup ⁻
SEMIA 5080 ^{ab}	CPAC 7/BR 85	Hup ⁺
USDA 110 ^c	BR 116	Hup ⁺
<i>B. elkanii</i>		
SEMIA 5019 ^b	29 W /BR 29	Hup ⁻

^aFERREIRA et al., 2002; ^bBODDEY, 1995; ^cSOUZA et al., 1999;



Figura 3 - Plantas de soja com 25 dias, inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*.

Na floração (experimento 1) e no início de formação das vagens (experimento 2), aos 57 dias e 70 dias após o plantio, respectivamente, os experimentos foram colhidos separando-se a parte aérea, as raízes e os nódulos (quando presente). Em seguida, procedeu-se a secagem da parte aérea, raízes e nódulos em estufa a 65 °C até estabilização do peso para a determinação da proporção de matéria seca (MS). No experimento 2, após esse procedimento, as amostras foram processadas em moinho tipo Wiley (peneiras de 2 mm), e posteriormente em moinho de rolo similar ao descrito por Smith e Myung (1990), até formar pó.

Em seguida, pesaram-se sub-amostras da parte aérea, das raízes e dos nódulos, para determinação do N total, por meio de digestão Kjeldahl, em mistura digestora contendo ácido sulfúrico e catalisadores, com posterior destilação a vapor e titulometria com ácido sulfúrico (ALVES et al., 1994). Também foram retiradas alíquotas para análises da razão isotópica de ^{15}N nos tecidos da planta pelo método de Dumas (BODDEY et al., 1994) em um analisador automático de C e N (Carlo Erba EA 1108), acoplado a um espectrômetro de massas (Finnigan MAT, Bremen, Alemanha), conforme descrito por RAMOS *et al.* (2001).

A abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$) do material vegetal foi expressa como partes por milhão (‰) em relação ao N_2 atmosférico (0,3663 % átomo de ^{15}N), utilizando a seguinte equação (Peoples e Herridge 1990):

$$\delta^{15}\text{N da amostra (‰)} = (\% \text{ átomo de } ^{15}\text{N da amostra} - 0,3663) / 0,3663 \quad (2)$$

A técnica de abundância natural de ^{15}N foi utilizada para fornecer a estimativa da proporção N derivado da FBN. As estimativas da FBN foram calculadas a partir do $\delta^{15}\text{N}$ da parte aérea da leguminosa e da planta não fixadora sorgo granífero híbrido (*Sorghum vulgare* cv. BRS 310), utilizando a seguinte equação (Peoples e Herridge 1990):

$$\text{FBN\%} = ((\delta^{15}\text{N não fixadora} - \delta^{15}\text{N leguminosa}) / (\delta^{15}\text{N não fixadora} - B)) \times 100 \quad (3)$$

Onde o valor *B* representa o $\delta^{15}\text{N}$ da planta de soja totalmente dependente da FBN para o seu crescimento. Foi usado o valor *B* (-1,3 ‰) calculado para a parte aérea de soja inoculada com *Bradyrhizobium japonicum*, estirpe CB1809 (Bergersen et al., 1989). O valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ da planta referência usada na equação foi 4,75 ‰.

4.2.2 Pré-cultivo da soja colhida na fase de floração, 57 dias após o plantio (Experimento 1).

O plantio do milho foi realizado em 01 de março de 2013, com o solo utilizado para o cultivo da soja, colhida durante o período de floração, aos 57 dias após o plantio. Foram retiradas cuidadosamente todas as raízes e nódulos quando presentes, após isso, foi feita análise da fertilidade do solo.

Foi feita adubação com 200 mg P_2O_5 kg terra⁻¹ e 85 mg K_2O kg terra⁻¹ em todos os tratamentos, não houve necessidade de fazer a correção do solo. Utilizaram-se sementes de milho híbrido da cultivar AG 1051, foram semeadas quatro sementes por vaso, efetuando-se o desbaste após a emergência, deixando-se duas plantas por vaso.

As plantas foram regadas diariamente e após 55 dias de cultivo, as plantas foram cortadas rente ao solo e o material vegetal separado em parte aérea e sistema radicular. Em seguida, procedeu-se à secagem da parte aérea e da raiz em estufa a 65 °C para a determinação da proporção de matéria seca (MS) e teor de nitrogênio.

Após esse procedimento, as amostras foram processadas em moinho tipo Wiley (peneiras de 2 mm). Em seguida, pesaram-se sub-amostras da parte aérea e raiz, para determinação do N total, por meio de digestão Kjeldahl, em mistura digestora contendo ácido sulfúrico e catalisadores, com posterior destilação a vapor e titulometria com ácido sulfúrico (ALVES et al., 1994).

4.2.3 Pré-cultivo da soja colhida na fase de formação de vagens, 70 dias após o plantio (Experimento 2).

O plantio do milho foi realizado em 23 de março de 2013, com solo utilizado no cultivo da soja, experimento anterior, colhida durante o período de formação das vagens, aos 70 dias após o plantio. Foram retirados cuidadosamente todas as raízes e nódulos quando presentes, após isso, foi feita análise de solo e posteriormente adubação com 200 mg.solo⁻¹ de superfosfato simples e 85 mg.solo⁻¹ de cloreto de potássio em todos os tratamentos, não houve necessidade de fazer a correção do solo. Utilizaram-se quatro sementes de milho híbrido por vaso, cultivar AG 1051, efetuando-se o desbaste após a emergência, deixando-se três plantas por vaso.

As plantas foram regadas diariamente e após 52 dias de cultivo foram cortadas rente ao solo e o material vegetal foi separado em parte aérea e sistema radicular. Em seguida, procedeu-se à secagem da parte aérea e da raiz em estufa a 65 °C para a determinação da proporção de matéria seca (MS).

Após esse procedimento, as amostras foram processadas em moinho tipo Wiley (peneiras de 2 mm). Em seguida, pesaram-se sub-amostras da parte aérea e raiz, para determinação do N total, por meio de digestão Kjeldahl, em mistura digestora contendo ácido sulfúrico e catalisadores, com posterior destilação a vapor e titulometria com ácido sulfúrico (ALVES et al., 1994).

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Efeito da inoculação com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* no crescimento da soja até a fase de formação das vagens.

As plantas de soja não inoculada e as plantas referências (não fixadoras de N₂), como esperado, apresentaram quantidades inferiores de matéria seca e nitrogênio quando comparado com as plantas de soja inoculada (Tabela 3 e 4).

As plantas de soja inoculadas não apresentaram diferença significativa quanto ao acúmulo de matéria seca na parte aérea (Tabela 3), o mesmo ocorreu na planta inteira. Porém, nas raízes as plantas inoculadas com a estirpe 29 W apresentaram maiores valores médios, diferindo estatisticamente das plantas inoculadas com a estirpe CPAC 15.

Cruz et al. (2010) ao avaliarem o desempenho vegetativo de cinco cultivares de soja em quatro época de semeaduras, observaram que a matéria seca das plantas semeadas anterior ao mês de dezembro foi menor, sendo que a matéria seca aumentou conforme a antecedência da semeadura.

Nas plantas inoculada com as estirpes de *B. japonicum* (CPAC 7, CPAC 15 e USDA 110) não diferiram quanto ao peso dos nódulos. Entretanto, nas plantas de soja inoculadas com a estirpe de *B. elkanii* (29 W) o peso dos nódulos foi significativamente mais alto (Tabela 3). Este resultado está de acordo com Neves et al., (1985), ao avaliar os nódulos observaram que as estirpes de *B. japonicum* promoveram nódulos menores e com menor evolução de hidrogênio em relação as estirpes de *B. elkanii*.

Tabela 3 - Acúmulo de matéria seca (MS) em plantas de soja não inoculada, sorgo e soja inoculada com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium*, colhidas aos 70 dias após o plantio.

Tratamentos	Parte Aérea ¹	Raíz ¹	Planta Inteira ¹	Nódulo ¹
	-----gMS vaso ⁻¹ -----			
Soja não inoculada	8,00 b	2,73 c	10,54 b	
Sorgo	6,50 b	4,34 b	10,76 b	
Soja inoculada/ Estirpe				
CPAC 15 (Hup ⁻)	14,77 a	4,46 b	19,23 a	1,31 b
29 W (Hup ⁻)	17,52 a	5,50 a	22,94 a	2,09 a
CPAC 7 (Hup ⁺)	16,69 a	5,13 ab	21,70 a	1,43 b
USDA 110 (Hup ⁺)	17,41 a	5,42 ab	22,92 a	1,48 b
CV (%)	20,78	14,59	18,78	28,80

¹médias de 6 repetições. Médias com letras iguais nas colunas não difere significativamente (p≤0,05), pelo teste t de Student. CV= coeficiente de variação.

De acordo com a análise do solo feita na ocasião da colheita, aos 70 dias após o plantio, os teores de Ca, Mg e P apresentaram valores mais elevados no solo com soja inoculada com a estirpe 29W, a qual apresentou uma tendência maior quanto ao crescimento da raiz e planta inteira. O Ca, K, Mg e P presentes no solo com soja inoculada com a estirpe CPAC 7 também apresentou-se elevado em relação aos demais tratamento, porém a massa seca das plantas foi inferior a MS das plantas inoculadas com a estirpe 29 W (Tabela 3).

Quanto ao acúmulo de nitrogênio as plantas de soja que alcançaram maiores valores médios na parte aérea foram as inoculada com a estirpe USDA 110 (266,00 mg N vaso⁻¹), seguido das estirpes 29 W (198,00 mg N vaso⁻¹) e CPAC 7 (195,23 mg N vaso⁻¹). O mesmo

ocorreu na planta inteira, já nas raízes as plantas inoculadas com as estirpes 29 W e USDA 110 que apresentaram maiores acúmulos de nitrogênio, não diferiram entre si (Tabela 4).

Nos nódulos, todas as estirpes de *B. japonicum* (CPAC 7, CPAC 15 e USDA 110) não diferiram quanto ao acúmulo de nitrogênio, no entanto, nas plantas inoculadas com a estirpe de *B. elkanii*, 29W, apresentou significativamente mais altos, 2,09 g MS vaso⁻¹ (Tabela 4). Esse resultado foi observado anteriormente por Neves et al., 1985.

Tabela 4 - Efeito dos tratamentos de inoculação na cultura da soja, quanto ao acúmulo de nitrogênio total (N) e % de N derivado do ar (Ndda), aos 70 dias após o plantio.

Tratamentos	Parte Aérea	Raiz	Planta Inteira	Nódulo	Parte Aérea
	-----mgN vaso ⁻¹ -----				% Ndda
Sorgo	57,23 d	32,10 c	88,41 c		
Soja não inoculada	95,58 cd	21,03 c	116,62 c		
Soja inoculada/ Estirpe					
CPAC 15 (Hup ⁻)	171,80 bc	72,86 b	244,65 b	34,94 b	66,84 ab
29 W (Hup ⁻)	198,00 ab	88,03 a	286,03 ab	75,64 a	82,12 a
CPAC 7 (Hup ⁺)	195,23 ab	84,94 ab	280,17 ab	45,69 b	67,70 ab
USDA 110 (Hup ⁺)	266,00 a	92,77 a	359,17 a	47,48 b	63,25 b
CV (%)	39,32	17,13	31,53	29,05	18,43

[†]médias de 6 repetições. Médias com letras iguais na coluna não difere significativamente ($p \leq 0,05$), pelo teste t de Student. CV= coeficiente de variação.

Houve diferença significativa entre os status Hup quanto a % N_{dda} na parte aérea, as plantas inoculadas com a estirpe 29 W (Hup⁻) foi maior e menor com a estirpe USDA 110 (Hup⁺). As demais plantas inoculada não diferiram entre si (Tabela 4).

A simbiose planta x bactéria diazotróficas aumenta a capacidade da planta em incorporar C e N no solo, sendo mais eficiente na absorção de nutrientes tornando-se mais resistentes a estresses ambientais (Siqueira e Franco, 1988).

As plantas de soja não inoculada não apresentaram nódulos, desta forma o solo não apresentava uma distribuição naturalizada de Rizóbios.

4.3.2 Efeito do pré-cultivo da soja até a fase de floração sobre o crescimento vegetativo do milho subsequente.

Em função da estirpe de *Bradyrhizobium* utilizada no pré-cultivo da soja colhida na floração não houve diferença significativa no desenvolvimento vegetativo do milho ou acúmulo de nitrogênio (Tabela 5). No entanto, apesar de não ter diferido estatisticamente, percebe-se que o pré-cultivo da soja com a estirpe CPAC 15 que em teoria libera H₂ indicou um aumento na MS e acúmulo de N.

Apesar do processo de peneiramento realizado para remover grande parte do N, por meio da eliminação dos restos culturais, os resíduos restantes provavelmente contribuíram com pouco N diretamente à cultura do milho. Segundo McNeill e Fillery (2008) 30 a 50 % do N total em cultura de leguminosa pode estar associado com raízes noduladas e rizodeposição de N durante o crescimento. No entanto, este procedimento pode ter contribuído para a não observação do efeito do H₂, por interferência na disponibilidade dos microrganismos na rizosfera do milho. Segundo Dong e Layzell (2001) a maior parte do H₂ é consumido pela microflora dentro de poucos centímetros dos nódulos dentro de um curto período após a exposição inicial.

Tabela 5 - Efeito da estirpe de *Bradyrhizobium* (Hup⁻ e Hup⁺) utilizada no pré-cultivo da soja até a fase de floração sobre o crescimento vegetativo e acúmulo de nitrogênio nos tecidos de milho, aos 55 dias após o plantio.

Soja inoculada/ Estirpes	Parte Aérea	Raiz	Planta Inteira
	-----gMS.vaso ⁻¹ -----		
CPAC 15 (Hup ⁻)	11,64 a	6,52 a	18,16 a
29 W (Hup ⁻)	10,28 a	6,03 a	16,62 a
USDA 110 (Hup ⁺)	9,85 a	5,94 a	15,79 a
CPAC 7 (Hup ⁺)	11,01 a	6,34 a	17,04 a
CV (%)	15,41	9,86	12,13
	-----mgN.vaso ⁻¹ -----		
CPAC 15 (Hup ⁻)	71,31 a	24,28 a	95,59 a
29 W (Hup ⁻)	62,03 a	25,59 a	87,62 a
USDA 110 (Hup ⁺)	59,73 a	25,21 a	84,93 a
CPAC 7 (Hup ⁺)	64,88 a	22,96 a	87,84 a
CV (%)	16,16	15,38	13,86

Médias (6 repetições) seguida de letras iguais nas colunas não diferem entre si (p≤0,05), pelo teste t de Student. CV= coeficiente de variação.

Desta forma não houve evidências do efeito positivo da emissão de H₂ sobre o desempenho do milho com a soja colhida no período de florescimento, estando de acordo com

o estudo de campo de Peoples et al. (2008) no qual as condições ambientais foram semelhantes, com temperatura noturna e diurna elevadas, em ambos foi utilizada a cultura do milho que possui metabolismo de carbono (C_4) diferente do metabolismo (C_3) das culturas de cevada e trigo utilizadas nos trabalhos anteriores, que pode ter influenciado nos resultados finais.

Peoples et al. (2008) confirmaram em estudo de campo que os nódulos da safra de soja inoculada com uma estirpe de *B. japonicum*, USDA442, Hup⁻ emitiu elevadas quantidades de H_2 molecular, estimativa de cerca de 215000 L de H_2 ha⁻¹ para o ecossistema ao longo do ciclo da cultura, já a soja inoculada com a estirpe Hup⁺, CB1809 contribuiu com um volume de H_2 de apenas 6% desse emitido pela USDA442, no entanto não observaram resultados satisfatório do efeito benéfico do H_2 sobre o cultura subsequente.

4.3.3 Efeito do pré-cultivo da soja até a fase de formação das vagens sobre o crescimento vegetativo do milho subsequente.

Não houve diferenças significativas entre os status Hup quanto à matéria seca contida no milho subsequente ao pré-cultivo da soja. No entanto, quanto ao acúmulo de nitrogênio o pré-cultivo da soja inoculada com a estirpe CPAC 15, que em teoria emite H_2 para o solo diferiu estatisticamente do pré-cultivo da soja inoculada com a estirpe 29 W e apresentou-se superior aos demais pré-cultivo, controle, no que se refere à quantidade de nitrogênio acumulado na planta inteira. Nas demais variáveis não diferiu estatisticamente (Tabela 6). Desta forma as plantas de milho subsequente ao pré-cultivo da soja inoculada com a estirpe CPAC 15 indicaram possuírem um melhor desempenho em relação ao demais pré-cultivos da soja.

Era parte de nossa hipótese de que a emissões de H_2 a partir de nódulos de soja inoculada com estirpes de *Bradyrhizobium*, Hup⁻, (CPAC 15 e 29 W) teria efeitos benéficos residuais sobre a cultura subsequente de milho. Isso não foi confirmado pelos dados (Tabela 6), pois mesmo o pré-cultivo da soja inoculada com a estirpe CPAC 15 ter apresentado acúmulo de nitrogênio superior aos pré-cultivos que possuem as estirpes que não emitem H_2 sobre o solo, somente diferiu estatisticamente quanto ao nitrogênio acumulado considerando a planta inteira. Apesar de não ter feito a estimativa da emissão de H_2 ao ambiente é de se esperar o impacto do H_2 sobre o crescimento da cultura subsequente (Dong et al., 2003 e Dean et al., 2006). A outra estirpe a 29 W que também libera H_2 sobre o solo não indicou nenhum efeito benéfico para as plantas subsequentes.

As plantas de soja não inoculadas cresceram menos, com isso, menos N foi extraído do solo, por outro lado, o sorgo por ser gramíneas pode ter extraído mais N do solo afetando as plantas subsequentes. Diante disso, as plantas de milho destes pré-cultivos não estão sendo consideradas na análise estatística.

O milho é uma planta C_4 , e estas plantas utilizam menos nitrogênio para a síntese de suas enzimas de carboxilação do que as plantas C_3 (MARSCHNER, 1995).

Tabela 6 - Efeito da estirpe de *Bradyrhizobium* (Hup⁻ e Hup⁺) utilizada no pré-cultivo da soja até a fase de formação das vagens sobre o crescimento vegetativo do milho e acúmulo de nitrogênio nos tecidos, aos 51 dias após o plantio.

Pré-cultivo	Parte Aérea	Raiz	Planta Inteira
	-----gMS vaso ⁻¹ -----		
Plantas referências			
Soja não inoculada	6,51	4,30	10,81
Sorgo	5,04	3,61	8,65
Soja inoculada/ Estirpes			
CPAC 15 (Hup ⁻)	5,86 a	4,26 a	10,12 a
29 W (Hup ⁻)	5,39 a	3,68 a	9,07 a
USDA 110 (Hup ⁺) controle	5,31 a	4,19 a	9,51 a
CPAC 7 (Hup ⁺) controle	5,30 a	4,02 a	9,33 a
CV (%)	11,27	13,92	9,92
Plantas referências			
-----mgN vaso ⁻¹ -----			
Soja não inoculada	40,46	26,64	67,10
Sorgo	32,02	22,93	54,95
Soja inoculada/ Estirpes			
CPAC 15 (Hup ⁻)	37,89 a	29,58 a	67,48 a
29W (Hup ⁻)	34,80 a	25,21 a	60,02 b
USDA 110 (Hup ⁺) controle	34,06 a	28,75 a	62,82 ab
CPAC 7 (Hup ⁺) controle	33,65 a	27,99 a	61,65 ab
CV (%)	10,35	16,88	8,38

Médias de 6 repetições. Médias com letras diferentes na coluna são diferente significativamente ($p \leq 0,05$), pelo teste t de Student. CV= coeficiente de variação.

Mudanças significativas no teor de matéria orgânica e N no solo são observadas em cultivo em rotação incluindo leguminosa em período superior a três anos (BELLIDO et al. 1997). Neste estudo o milho subsequente ao pré-cultivo de soja inoculada com a estirpe CPAC 15 colhida durante a floração apresentou uma indicação de aumento da MS e N nas plantas de milho e observou-se que o mesmo pré-cultivo proporcionou acúmulo de N superior ao controle, com a soja colhida durante o período de formação das vagens. Rehm et al. (2012) observou que a produção de trigo em sucessão a leguminosa forrageira foi maior quando a leguminosa foi cultivada por um período maior.

Em teoria a estirpe CPAC 15 por ser Hup⁻ libera H₂ a partir dos nódulos de soja para o solo. Dean et al. (2006) observaram em condições de campo, um aumento de 48% na produtividade dos grãos de cevada, proveniente da promoção do crescimento vegetal devido o efeito benéfico do H₂ liberado a partir dos nódulos de soja inoculada com estirpe Hup⁻.

Golding et al (2012) observaram aumento no rendimento no perfilho e produção de grãos semelhante ao de rotação com cultura de trigo e cevada inoculadas com estirpes oxidantes de H₂ recuperada de solo tratado com H₂ e solo adjacente a soja inoculada com estirpe Hup⁻, (JM63 e JM162a) respectivamente, em casa de vegetação e campo.

4.4 Conclusão

Nas condições do estudo, demonstra-se diferenças significativa entre estirpes de *Bradyrhizobium* com resposta ao desenvolvimento da soja cv. BRS 133 inoculada.

A inoculação da soja em pré-cultivo com a estirpe CPAC 15 (Hup⁻) de *B. japonicum* induz resposta positiva do milho em sucessão, induzida pelo aumento significativo de nitrogênio acumulado nas plantas do cereal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, B. J. R.; SANTOS, J. C. F.; BODDEY, R. M. Métodos de determinação do nitrogênio em solo e planta. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília, DF: EMBRAPA/SPI, p. 449-470, 1994. (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 46).

AMBER-LEIGH GOLDING, YINAN ZOU, XUAN YANG, BRYAN FLYNN, ZHONGMIN DONG. Plant growth promoting H₂-oxidizing bacteria as seed inoculants for cereal crops. **Agricultural Sciences**, v.3, n.4, p. 510-516, 2012.

ALBRECHT, S. L., MAIER, R. J., HANUS, F. J., RUSSELL, S.A., EMERICH, D.W.; EVANS, H.J. Hydrogenase in *Rhizobium japonicum* increases nitrogen fixation by nodulated soybeans. **Science**, v. 203, 1255–1257, 1979.

ARP, D. (1992) in Biological Nitrogen Fixation (Stacey, G., Burris, R.H. and Evans, H.J., eds.), pp. 432–460, Chapman and Hall, New York 4 Schubert, K.R., Engelke, J.A., Russell, S.A. and Evans, H.J. **Plant Physiology**, v.60, 651–654, 1977.

BARNEY, B.M.; LEE, H-I; DOS SANTOS, P.C.; HOFFMAN, B.M.; DEAN, D.R.; SEEFELDT, L.C. Breaking the N₂ triple bond: insights into the nitrogenase mechanism. **Dalton Transactions**, v. 21, n. 190, p. n. 19, p. 2277–2284, 2006.

BAGINSKY, C.; BRITO, B.; IMPERIAL J.; RUIZ-ARGÜESO T.; PALACIOS, J. M. Symbiotic hydrogenase activity in *Bradyrhizobium* sp. increases nitrogen content in *Vigna unguiculata* plants. **Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7536–7538, 2005.

BELLIDO, L. L., GARRIDO, L. F. J., FUENTES, M. CLASTILLO, J. E., FERNHNDEZ, E. J. Influence of tillage, crop rotation and nitrogen fertilization on soil organic matter and nitrogen under rain-fed Mediterranean conditions. **Soil & Tillage Research**, v. 43 p.277-293, 1997.

BERGERSEN F.J., BROCKWELL J., GAULT R.R., MORTHORPE L.J., PEOPLES M.B., TURNER G.L. Effects of available soil nitrogen and rates of inoculation on nitrogen fixation by irrigated soybeans and evaluation of the $\delta^{15}\text{N}$ methods for measurement. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 40, p.763–780, 1989.

BERZSENYI, Z.; GYORFFY, B.; LAP, DQ. Effect of crop rotation and fertilisation on maize and wheat yields and yield stability in a long-term experiment. **European Journal of Agronomy**, v. 13 p.225–244, 2000.

BODDEY, L. H. **Determinação das características das espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* nas estirpes brasileiras noduladoras de soja**. 1995. 128 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

BODDEY, R. M. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 6, p. 209-266, 1987.

BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Quantificação da fixação biológica de nitrogênio associada a plantas utilizando o isótopo ^{15}N . In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (Ed.). **Manual de métodos em estudo de microbiologia agrícola**. Brasília, DF: EMBRAPA/SPI, 1994. p. 471-494.

BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Calculations and assumptions involved in the use of the value and ^{15}N isotope dilution techniques for the estimation of the contribution of plant-associated biological N_2 fixation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 145, p. 151-155, 1992.

BULL, L.T.; CANTARELLA, H. **Cultura do milho**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: POTAFOS, 1993. 301p.

CALLEGARO, M. G. K.; DUTRA, C. B.; HUBER, L. S.; BECKER, L. V.; ROSA, C. S.; KUBOTA, E. H.; HECKTHEUR, L. H. Determinação da fibra alimentar insolúvel, solúvel e total de produtos derivados do milho. **Ciência e Tecnologia e Alimentos**, v. 25, n. 2, p.271-274, abr.-jun. 2005.

CARVALHO, M. A.C.; SORATTO, R. P.; ATHAYDE, M. L. F.; ORIVALDO ARF, O.; SÁ, M. E. Produtividade do milho em sucessão a adubos verdes no sistema de plantio direto e convencional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.1, p.47-53, 2004.

CRUZ, T.V.; PEIXOTO, C. P.; MARTINS, M. C. Crescimento e produtividade de soja em diferentes épocas de semeadura no oeste da Bahia. **Scientia Agraria**, v.11, n.1, p.033-042, 2010.

DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON W.E.; NYMAN, C.T. (Ed.) INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION, vol. 2. **Proceedings...** Pullman, USA: Washington State University Press, p.518-538, 1976.

DÖBEREINER, J.; FRANCO, A. A.; GUZMAN, I. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 5, p. 155-161, 1970.

DONG, Z.; LAYZELL D.B., H_2 Oxidation, O_2 uptake and CO_2 fixation in hydrogen treated soils. **Plant and Soil**, v.12, n. 1, p.2291-2912, 2001.

DONG, Z.; WU L.; KETTLEWELL, B.; CALDWELL, C.D.; LAYZELL, D.B. Hydrogen fertilization of soils is this a benefit of legumes in rotation? **Plant, Cell & Environment**, v. 26, p. 1875-1879, 2003.

DEAN, C.A; SUN, W.; DONG, Z.; CALDWELL, C.D. Soybean nodule hydrogen metabolism affects soil hydrogen uptake and the growth of rotation crops. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86, p.1355-1359, 2006.

FAGERIA, N. K. Otimização da eficiência nutricional na produção das culturas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 2, p. 6-16, 1998.

FERREIRA, M. C.; HUNGRIA, M. Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 79, p. 139-152, 2002.

FORNAZIERI JUNIOR, A.; KASSAB, A. L.; BARRERA, P.; ANSEMI, R.; BASTOS, E.; PELEGRINI, B.; MATOS, M. P.; SCHMIDT, A.P.; PADOVANI, M. I. **Manual Brasil Agrícola**, Principais produtos agrícolas. São Paulo, p.525, 1999.

FOLONI, J. S. S.; LIMA, S. L.; BÜLL, L. T. Crescimento aéreo e radicular da soja e de plantas de cobertura em camadas compactadas de solo. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.30, p.49-57, 2006.

GILLER, K. E.; WILSON, K. F. Nitrogen fixation in tropical cropping systems. **Wallinford: CAB International**, p.313, 1993.

GOLDING, A. L.; ZOU, Y. YANG, X. FLYNN, B. DONG, Z. Plant growth promoting H₂-oxidizing bacteria as seed inoculants for cereal crops. **Agricultural Sciences**, v.3, n.4, p.510-516, 2012.

GOLDING, A.L.; DONG, Z. hydrogen production by nitrogenase as a potential crop rotation benefit. **Environmental Chemistry Letters**, v. 8, p. 101-121, 2010.

GOMES, P. A. soja. São Paulo: Nobel: 5 2d. p.152, 1990.

HÖDTKE, M.; ALMEIDA, D. L. de; KOPKE, U.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; UNKOVICH, M. Balanço de nitrogênio em diferentes sistemas de produção orgânica para milho e caupi. In: **Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**, 25, 1997, Rio de Janeiro. Anais... Rio de Janeiro: SBCS, 1997. Seção temática 4. 1 CD-ROM.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum* brasilense: inovação em rendimento a baixo custo **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Soja), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Documentos 325, Londrina, PR, ISSN 2176-2937, 2011.

JUNK, G.; SVEC, H. J. The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gas from various sources. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, Oxford, v. 14, p. 234-243, 1958.

KARLEN, D. L., VARVEL, D. G., BULLOCK, D. G., CRUSE, R. M. Crop rotation for the 21st century. **Advances in Agronomy**. V.53, p.1-45, 1994.

KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T.E.; UDELL, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, p.501-505, 1992.

MAIMAIT, J.; ZHANG, Y.; YANG, J.; CEN, Y. P.; LAYZELL, D. B.; PEOPLE, M.; DONG, Z. Isolation and characterization of hydrogen-oxidizing bacteria induced following exposure of soil to hydrogen gas and their impact on plant growth. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 2, p.435-444, 2007.

MYATT, L. "Review: reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta," *Placenta*, v. 31, p. S66–S69, 2010.

MCNEILL A. M, FILLERY I. R. P. Field measurement of lupin belowground nitrogen accumulation and recovery in the subsequent cereal-soil system in a semi-arid Mediterranean-type climate. *Plant and Soil*, v. 302, p.297–316, 2008.

MARCHIORO, L.E.T. Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio. Curitiba-PR. 2005. 75p. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia Parasitologia e Patologia) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR.

MARSCHNER, H. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic press Inc. San Diego, CA, USA, 2^o ed. p.902, 1995.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, Recife, v. 1, p.89-111, 2004.

NEVES, M. C. P.; DIDONET, A. D.; DUQUE, F. F.; DÖBEREINER, J. *Rizobium* strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 36, p. 1179-1192, 1985.

NUNES, F. S.; RAIMONDI, A. C.; NIEDWIESKI, A. C. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. *Química Nova*, v. 26, n. 6, p.872-879, 2003.

OLIVEIRA, C. A.; MARRIEL, I.E.; ELIANE APARECIDA GOMES. A.; LANA, U. G. P.; SCOTTI, M. R.; ALVES, V. M. C. Diversidade bacteriana da rizosfera de genótipos de milho contrastantes na eficiência de uso de fósforo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.44, n.11, p.1473-1482, 2009.

OSBORNE, C. A.; PEOPLES, M.B.; JANSSEN, P. H. Detection of a reproducible, single-member shift in soil bacterial communities exposed to low levels of hydrogen. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n.5, p. 1471–1479, 2010.

PERIN, A.; SANTOS, H. R. S.; URQUIAGA, S.; GUERRA, J. G. M.; CECON, P. R. Produção de fitomassa, acúmulo de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio por adubos verdes em cultivo isolado e consorciado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 39, n. 1, p. 35-40, 2004.

PEOPLES, M. B.; McLennan, P. D; BROCKWELL, J. Hydrogen emission from nodulated soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.) and consequences for the productivity of a subsequent maize (*Zea mays* L.) crop. *Plant and Soil*, v. 307, p. 67-82, 2008.

PEOPLES, M. B., HERRIDGE, D. F. Nitrogen fixation by legumes in tropical and subtropical agriculture. *Adv Agron*, v.44, p.155–223, 1990.

PATTEN C., GLICK B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.207-220, 1996.

PEDRINHO, E. A. N. Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho. Jaboticabal – SP. 2009. 74p. **Tese** (Doutor em Microbiologia). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP.

RAMOS, M. G.; VILLATORO, M. A. A.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Quantification of the contribution of biological nitrogen fixation to tropical green manure crops and the residual benefit to a subsequent maize crop using ¹⁵N-isotope techniques. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, p. 105-115, 2001.

REHMUT, M., SCHOENAU, J., JEFFERSON, P. Effect of Forage Legumes on Phosphorus Availability to the Following Wheat Crop in a Black Chernozem. http://www.usask.ca/soilscrops/conference-proceedings/pdf/Day_1_Poster_Session/024-Mikrigul_Rehmut.pdf. acesso 10/08/2013.

RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. Fixação biológica de nitrogênio In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. DE A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF. Embrapa Informação Tecnológica, Teresina: Embrapa Meio-Norte, p. 281-355, 2005.

RUMJANEK, N. G.; DOBERT, R. C.; VAN BERKUN, P.; TRIPLETT, E. W. Common soybean inoculant strains in Brazil are member of *B. Elkanii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 4371-4371, 1993.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, p.319-339, 1999.

ROESCH, L. F. W. Diversidade de bactérias diazotróficas associadas a plantas de milho cultivadas no estado do Rio Grande do Sul. 2007. 143p. **Tese** (Doutor em Ciências do Solo) Universidade Federal Rural do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

SATO, M. L.; GARCÍA-BLÁSQUEZ, C.; VAN BERKUM, P. Verification of strain identity in Brazil soybean inoculants by using the polymerase chain reaction. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 15, p. 387-391, 1999.

SOON, Y.K.; ARSHAD, M.A.; HAQ, A.; LUPWAYI, N. The influence of 12 years of tillage and crop rotation on total and labile organic carbon in a sandy loam soil. *Soil & Tillage Research*, v. 95, p.38–46, 2007.

SCHUBERT, K. R.; EVANS, H. Hydrogen evolution: a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. **Proceedings of National Academy of Science**, v. 73, p.1207–1211, 1976.

SHEARER, G.; KOHL, D.H. N₂ fixation in field setting: estimations based on natural ¹⁵N abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.13, n.6, p.699-756, 1986.

SMITH, J. L.; MYUNG, H. U. Rapid procedures for preparing soil and KCL extracts for ¹⁵N analysis. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 21, p. 2173-2179, 1990.

SCHUBERT, K. R., ENGELKE, J. A., RUSSELL, S. A., EVANS, H. J. Hydrogen reactions of nodulated leguminous plants. I. Effect of rhizobial strain and plant age. **Plant Physiology**, v. 60, p. 651-654, 1977.

SOARES, D. M.; DEL PELOSO, M. J.; KLUTHCOUSKI, J.; GANDOLFI, L. C.; FARIA, D. J. Tecnologia para o sistema consórcio de milho verde com feijão no plantio de inverno. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000. 51 p. (Embrapa Arroz e Feijão. **Boletim de pesquisa**, 10).

SOUZA, A. A.; BURITY, H. A.; FIGUEIREDO, M. V. B.; SILVA, M. L. R. B.; MELOTTO, M.; MUI TSAI, S. Eficiência simbiótica de estirpes Hup⁺, Hup^{hr} e Hup⁻ de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* em cultivares de caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.10, p.1925-1931, 1999.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005. p.640.

SHAHAROONA, B.; ARSHAD, M.; ZAHIR A. Z.; KHALID, A. Performance of *Pseudomonas* spp. Containing ACC-deaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, n. 9, p. 2971-2975, 2006.

SIQUEIRA, J. O. & FRANCO, A. A. **Biotechnologia do Solo: Fundamentos e Perspectiva**. Brasília: MEC. Ministério da Educação, ABEAS: Lavras: ESAL/FAEPE, p. 236, 1988.

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

TOKURA, L. K.; NÓBREGA, L. H. P. Alelopatia de cultivos de cobertura vegetal sobre plantas Infestantes. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 3, p. 379-384, 2006.

WEISMANN, M. **Fases de desenvolvimento da cultura do milho**: tecnologia e produção - culturas: safrinha e inverno, 2007. Disponível em: www.fundacaoms.org.br/request.php?32 acesso em 24 jan. 2012.

YATES, M. G. Biochemistry of nitrogen fixation. In: The biochemistry of plants, 5, New York, academic Press, 1980. p.1-64.

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. In: VARGAS, M. A. T; HUNGRIA, M. (Eds.) **Biologia dos solos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, p.297-360, 1997.

VAZQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, M. E.; LOPEZ-CORTES, A.; BASHON, Y. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils**, vol.30, p. 460-468, 2000.

VERNA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evolution of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p.127-141, 2001.

ZOTARELLI, L. Balanço de nitrogênio na rotação de culturas em sistemas de plantio direto e convencional na região de Londrina-PR. 2000. 128 p. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia, área de Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

ZOTARELLI, L., ZATORRE, N. P., BODDEY, R. M., URQUIAGA, S., JANTALIA, C. P., JULIO C. FRANCHINI, J. C., ALVES, B. J. R. Influence of no-tillage and frequency of a green manure legume in crop rotations for balancing N outputs and preserving soil organic C stocks. **Field Crops Research**, v.132, p.185–195, 2012.