

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**  
**CIÊNCIA DO SOLO**

**DISSERTAÇÃO**

**Efeito da Inoculação de Bactérias Diazotróficas em**  
**Sorgo Granífero, Forrageiro e Sacarino**

**Carlos Leandro Rodrigues dos Santos**

**2010**



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

**EFEITO DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS  
EM SORGO GRANÍFERO, FORRAGEIRO E SACARINO**

**Carlos Leandro Rodrigues dos Santos**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Veronica Massena Reis**

*e Co-orientação do Professor*  
**Segundo Urquiaga**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2010

633.174  
S237e  
T

Santos, Carlos Leandro Rodrigues dos,  
1983-

Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas em sorgo granífero, forrageiro e sacarino / Carlos Leandro Rodrigues dos Santos. - 2010.

66 f. : il.

Orientador: Veronica Massena Reis.

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

Bibliografia: f. 43-52.

1. Sorgo - Adubos e fertilizantes - Teses. 2. Fertilizante nitrogenado - Teses. 3. Crescimento (Plantas) - Teses. I. Reis, Veronica Massena, 1961- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em ciência do solo. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

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

**CARLOS LEANDRO RODRIGUES DOS SANTOS**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 22/02/2010

---

Veronica Massena Reis. Dra. Embrapa Agrobiologia  
(Orientadora)

---

Marcos Gervasio Pereira. Dr. UFRRJ

---

Ivanildo Evódio Marriel. Dr. Embrapa Milho e Sorgo

## **DEDICATÓRIA**

Dedico aos componentes da  
minha família e amigos, que  
compreenderam e relevaram o meu  
afastamento ao longo deste período  
de caminhada.

## AGRADECIMENTOS

A Deus todo poderoso por ter me proporcionado mais uma conquista.

Aos meus pais Carlos e Fátima pela criação e confiança depositada.

Às minhas irmãs Patrícia e Gisele pelo companheirismo e por nunca terem me deixado esquecer a existência do poder divino.

Aos componentes da minha família, em especial tia Emília por exercer o papel de mãe aqui no Rio.

À namorada Flávia pela cumplicidade e paciência durante as “tempestades”.

À doutora Veronica Massena Reis pelas oportunidades no período de graduação e atual orientação no desenvolvimento deste trabalho.

Ao doutor Segundo Urquiaga pelas valiosas dicas e contribuições no planejamento e condução dos experimentos.

À Embrapa Agrobiologia pelo apoio estrutural necessário para a realização deste trabalho e ao curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo (CPGA-CS) pela oportunidade.

À Embrapa Milho e Sorgo pelo fornecimento das sementes utilizadas no estudo, e em especial ao Doutor Ivanildo Evódio Marriel pela atenciosa orientação durante o treinamento realizado na unidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão da bolsa de estudo no primeiro ano do curso.

À Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ, pela Bolsa Nota 10 concedida no segundo ano até a conclusão do curso.

Ao técnico agrícola Ernani Correa Meirelles pelo empenho e profissionalismo demonstrado na logística das atividades no campo e casa de vegetação.

Aos funcionários do campo experimental da Embrapa Agrobiologia, pela execução de várias atividades imprescindíveis para a realização do projeto, agradeço a todos.

Aos técnicos de laboratório da Embrapa Agrobiologia Geraldo, Wilson e Antônio Lúcio pelo apoio em momentos críticos necessários ao desenvolvimento dos experimentos.

Aos funcionários sempre prestativos Luis Carlos, Altiberto, Claudinho e Aurélio

À doutora Janaina pelo auxílio nas análises estatísticas.

A todo pessoal do laboratório de gramíneas e em especial a Gabriela pela amizade e sua boa vontade em repassar conhecimentos.

Aos colegas Fabrício, Willian, Renan, Cecília e Valfredo pelas eventuais ajudas na condução dos experimentos.

Aos colegas Joilson, Sandy, Marinete, Dani e Liamara, que sempre deram aquela força.

Aos amigos do alojamento da Embrapa e os inesquecíveis companheiros do alojamento da Rural pelas conversas e trocas de experiências que muito contribuiu para a aquisição de conhecimentos.

Aos professores vinculados ao CPGA-CS pelo conhecimento compartilhado.

Ao professor João Pedro Pimentel pelas palavras de incentivo e apoio no início da minha vida acadêmica.

À sociedade, grande financiadora dos meus estudos, onde espero que das informações contida neste trabalho, alguma venha contribuir com a melhora da qualidade de vida de alguém.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigado!!!

## **BIOGRAFIA**

Carlos Leandro Rodrigues dos Santos nasceu em 19 de maio de 1983 na cidade de Lambari-MG, filho de Maria Fátima Rodrigues dos Santos e Antônio Carlos dos Santos. Coursou de 1990 a 1998 o ensino fundamental na Escola Estadual João de Almeida Lisboa em Lambari-MG. Ingressou, em 1999, na Escola Agrotécnica Federal de Machado-MG, obtendo o título em 2001 de Técnico em Agropecuária com Habilitação em Agricultura e Zootecnia. Em 2002 entrou para a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde cursou Agronomia, vindo a graduar-se em 2007. Durante o curso de graduação, participou de trabalhos desenvolvidos no Departamento de Entomologia e Fitopatologia da UFRRJ, e a partir de 2004, atuou como estagiário bolsista na Embrapa Agrobiologia, participando de projetos na área de Fixação Biológica de Nitrogênio em Plantas não Leguminosas. Em 2008, ingressou no curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo na UFRRJ, sendo bolsista de mestrado do CNPq no primeiro ano, e no restante do curso Bolsista Nota 10 da FAPERJ.

## RESUMO

SANTOS, Carlos Leandro Rodrigues. **Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas em sorgo granífero, forrageiro e sacarino.** 2010. 66f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

O sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) é colonizado por diversas bactérias diazotróficas, que podem melhorar sua nutrição através da fixação biológica de nitrogênio ou pela produção de fito-hormônios. Os objetivos foram selecionar estirpes que mais contribuíssem para o acúmulo de biomassa em sorgo, e avaliar o efeito da inoculação das estirpes selecionadas, quanto à capacidade de reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados, bem como, incrementar a produtividade da cultura. A primeira fase do estudo foi realizada em casa de vegetação, na qual foram cultivados três genótipos de sorgo. O cultivo foi realizado em substrato esterilizado, areia mais vermiculita, sendo testadas 24 estirpes dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia*. O delineamento utilizado foi em blocos casualizados com quatro repetições, sendo as plantas coletadas aos 40 a 45 dias, avaliando-se a matéria seca de parte aérea e raiz. Os resultados mostraram que algumas estirpes aumentaram a produção de biomassa seca do sorgo, sendo quatro delas selecionadas para os testes de campo (109, Ppe6, 16 e ZMS 176). Estas estirpes foram aplicadas de forma conjunta, em três experimentos individualizados para cada um dos tipos agronômicos de sorgo, testados na primeira fase. O delineamento foi em blocos ao acaso, com parcelas subdivididas, sendo cinco níveis de N distribuídos nas parcelas, e nas subparcelas, inoculação e não-inoculação com quatro repetições. Os experimentos foram colhidos aos 120 dias após o plantio. As variáveis avaliadas foram: altura aos 40 dias, biomassa seca de grãos e palha, e teor de N na biomassa. De acordo com os resultados obtidos, as estirpes que mais incrementaram biomassa seca total em condições de substrato esterilizado em sorgo granífero, forrageiro e sacarino, foram as ZAE 95, 109 e ZAE 94 com incrementos em relação ao controle adubado com a mesma dose de N, de 25; 103 e 53 % respectivamente. Nos experimentos de campo, as respostas produtivas derivadas da inoculação foram variáveis de acordo com o genótipo botânico testado. Sendo o genótipo granífero o que mais demonstrou ser beneficiado pela inoculação, apresentando incremento de quase 10 % na produtividade de grãos. Em contraste, os genótipos forrageiro e sacarino não se mostraram responsivos à inoculação com as bactérias testadas.

**Palavras-chave:** Promotores de crescimento vegetal. Acúmulo de nitrogênio. *Herbaspirillum*. *Burkholderia*.



## ABSTRACT

SANTOS, Carlos Leandro Rodrigues. **Effect of the inoculation of diazotrophic bacteria in grain sorghum, forage sorghum and sweet sorghum** 2010. 66f. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science) Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) is colonized by various diazotrophic that can improve their nutrition through biological nitrogen fixation or production of phyto-hormones. The goals were to select strains that contribute most to the biomass accumulation in sorghum and to evaluate the effect of inoculation of the strains selected, for their ability to reduce nitrogen fertilizer use and increase crop productivity. The first phase of the study was conducted in a greenhouse, where three sorghum genotypes were grown. The plants were grown in a mixture of sterilized sand and vermiculite; there were tested 24 strains of the genus *Herbaspirillum* and *Burkholderia*. The experimental design was a randomized block design with four replications, and the plants were collected at 40 to 45 days, for evaluation of the shoot and root dry matter. The results showed that some strains increased the sorghum dry biomass, and four strains were selected for field tests (109, Ppe6, 16, and ZMS 176). These mixture strains were applied in three individual experiments for each sorghum agronomic type tested in the first phase. The design used was randomized block with split plot, with five N levels distributed on the plots; and sub-plots, inoculation and no inoculation with four replications. The assays were harvested 120 days after planting. The variables were: height at 40 days, grain and straw dry weights, and N content in biomass. According to the results achieved, the strains that increased most the sorghum total dry biomass, in a greenhouse conditions, were the ZAE 95, 109 and ZAE 94, with increases of 25; 103 e 53 %, respectively, in relation to control fertilized with same N level. In the field assays, the productive responses derivate from the inoculation varied according the botanic genotypes tested. The grain sorghum was the one most beneficiated by inoculation, showing an increase in grain production of almost 10 %. In contrast, the forage and sweet sorghum did not show response to inoculation with the bacteria tested.

**Key words:** Plant growth promoter. Nitrogen accumulation. *Herbaspirillum*. *Burkholderia*.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1	A Cultura do Sorgo .....	2
2.1.1	Origem e importância do sorgo .....	2
2.1.2	Tipos agronômicos de sorgo e possibilidades de uso .....	2
2.1.3	Nitrogênio na cultura do sorgo .....	3
2.2	Fixação Biológica de Nitrogênio Atmosférico .....	4
2.3	Principais Grupos de Bactérias Diazotróficas .....	4
2.4	Benefícios das Bactérias Diazotróficas em Gramíneas .....	6
2.5	Bactérias Diazotróficas na Cultura do Sorgo .....	9
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	11
3.1	Etapa 1: Seleção de Estirpes em Substrato Esterilizado .....	11
3.1.1	Experimento com sorgo granífero .....	11
3.1.2	Experimento com sorgo forrageiro .....	14
3.1.3	Experimento com sorgo sacarino .....	14
3.2	Etapa 2: Avaliações em Condições de Campo .....	15
3.2.1	Experimento com sorgo granífero .....	15
3.2.2	Experimentos com sorgo forrageiro e sorgo sacarino .....	18
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	19
4.1	Seleção de Estirpes em Substrato Esterilizado .....	19
4.2	Experimentos Conduzidos em Condições de Campo .....	23
4.2.1	Avaliações no experimento com sorgo granífero .....	23
4.2.2	Avaliações no experimento com sorgo forrageiro .....	30
4.2.3	Avaliações no experimento com sorgo sacarino .....	36
5	CONCLUSÕES .....	41
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	42
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43
8	ANEXOS .....	53

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre os problemas da agricultura brasileira, um dos principais, refere-se ao uso inadequado de insumos que promovam a melhoria da fertilidade do solo. Dessa forma, existe um grande interesse em práticas alternativas que visem a redução na aplicação de insumos ou mesmo da melhoria da absorção destes. Dentre os vários processos biológicos que ocorrem na natureza, a fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN) é realizada por um grupo restrito de bactérias denominadas diazotróficas.

O potencial de ganho de N via FBN depende da cultura e do genótipo botânico utilizado. Em geral, as plantas da família *Poaceae* (gramíneas) são capazes de se associar a diversas espécies de bactérias diazotróficas, que colonizam desde a rizosfera até o interior do tecido vegetal. A FBN, o efeito promotor de crescimento, e outros benefícios proporcionados pelas bactérias diazotróficas exercem o importante papel, de reduzir custos e atenuar as agressões ao meio ambiente. Pesquisas apontam que o aproveitamento destes benefícios na cultura do sorgo permitirá a redução parcial da adubação nitrogenada. Neste sentido, a maior eficiência do processo de FBN, e sua inserção nos sistemas de produção atende à atual demanda da sociedade por tecnologias ambientalmente sustentáveis. Para a otimização deste processo, faz-se necessário, a seleção de estirpes mais eficientes quanto ao ganho de N para a cultura, além do estudo dos potenciais efeitos proporcionados pela sua utilização. Este trabalho teve como estratégia de ação, a seleção e aplicação de estirpes de bactérias diazotróficas em três genótipos de interesse econômico, visando a redução da aplicação de N-fertilizante.

Portanto, a hipótese deste trabalho é que bactérias diazotróficas selecionadas para a cultura do sorgo podem beneficiar a cultura através da FBN.

Os objetivos foram selecionar estirpes que mais contribuam para o acúmulo de biomassa em plantas de sorgo, e avaliar o efeito da inoculação das estirpes selecionadas, quanto à capacidade de reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados, bem como incrementar a produtividade da cultura.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A Cultura do Sorgo

#### 2.1.1 Origem e importância do sorgo

O sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) MOENCH) é uma monocotiledônea da família *Poaceae* cultivada em diversas regiões do mundo. Algumas evidências apontam que seu centro de origem é na África oriental, mais precisamente na Etiópia e Sudão, sendo aparentemente difundido pelo mundo através de nativos africanos, que pela ocasião do regime de escravidão no século XVII e XVIII foram levados para diversas partes do mundo, e consigo carregaram as sementes (MARTIN, 1975).

Apesar de ser uma cultura muito antiga, somente a partir do fim do século XIX é que apresentou grande expansão em muitas regiões agrícolas do mundo. No Brasil, a cultura do sorgo começou a se desenvolver a partir da década de 70 (RUAS et al., 1988), tornando-se uma das mais versáteis, em termos de possibilidades de utilização (RIBAS, 2008).

Atualmente no Brasil, a área cultivada com sorgo granífero é de cerca de 800 mil hectares, o que gerou uma produção de quase 2 milhões de toneladas de grãos. Sendo a região Centro-oeste responsável por 70 % da produção (IBGE, 2008), advinda em maior parte de plantios de sucessão à cultura da soja. Mas, as projeções feitas sobre o potencial de expansão da produção indicam aumento, de até 4,5 milhões de toneladas, ainda nesta década sem risco de excesso de oferta (RIBAS, 2008).

Quanto ao sorgo forrageiro, a área cultivada é de cerca de 410 mil hectares, sendo 65 % da área localizada nas regiões Sul e Sudeste, onde, o estado de Minas Gerais foi o maior produtor deste tipo agrônômico, com 115 mil hectares plantados na safra de 2008 (APPS, 2009). Já a cultura do sorgo sacarino ainda não é tão expressiva no Brasil, mas se despontou como alternativa para a produção de etanol em regiões marginais, com baixa precipitação e solos ácidos, como o Nordeste e norte de Minas Gerais (PARRELLA, 2009).

#### 2.1.2 Tipos agrônômicos de sorgo e possibilidades de uso

O sorgo, de maneira geral, constitui-se de um vasto grupo de plantas de extrema variabilidade genética, que ao longo do tempo, para a aquisição das características peculiares atuais conhecidas, foram sendo selecionados continuamente pelo valor que ofereciam para distintos aspectos de utilização, de tal modo, que estas plantas se agruparam em diversas categorias agrônômicas, baseadas nos seus principais produtos e utilidades (RIBAS, 2008).

Devido à maior tolerância do sorgo a condições edafoclimáticas, comparado a outros cereais (LANDAU & SANS, 2008), a cultura se mostra promissora para o plantio em áreas, onde a produção de outras culturas energéticas é limitada, podendo exercer o importante papel de garantir a produção em meio às adversidades climáticas.

Atualmente, são utilizados na agricultura brasileira, quatro tipos agrônômicos de sorgo: granífero, forrageiro, sacarino e vassoura.

O sorgo granífero é o que apresenta maior expressão em termos de cultivo no Brasil, podendo ser utilizado em diversos ramos da indústria alimentícia, sendo importante principalmente na produção de ração animal (RIBAS, 2008). Em países como a Etiópia e Somália na África, constitui uma importante fonte energética para humanos, podendo chegar a até 100 kg anuais o consumo per capita (FAO, 1995). Em se tratando de alimentação animal, o sorgo granífero pode ser usado em substituição parcial ao milho nas rações. De acordo com

AMIRA (1992), pode ser feita a substituição de até 60 % do milho em rações de aves poedeiras, 20 a 40 % em rações para suínos e 89 % em rações para ruminantes, sem prejuízos na nutrição.

O sorgo forrageiro além de ser utilizado na forma de feno, capineira e pastejo direto, pode ser utilizado como alternativa ao milho na elaboração de silagem para alimentação animal, possuindo alto potencial produtivo, com elevada disponibilidade de matéria seca e bom valor nutritivo (SIMON et al., 2008).

O sorgo sacarino pode ser utilizado na alimentação animal, apresentando grande potencial para produção de biocombustíveis (WANG & LIU, 2009). Em estudos realizados na China, o sorgo sacarino demonstrou ser de 10 a 20 vezes mais rentável que o milho e o trigo, em um sistema sustentável proposto por DAJUE (2002), com alto potencial de aproveitamento das sementes como alimento animal e humano, as folhas como forragem para gado ou alimentação de peixes, o colmo para produção de biocombustíveis ou bebidas alcoólicas, e o resíduo aproveitado na produção de biogás ou biofertilizantes.

O sorgo vassoura é cultivado principalmente no sul do país, sendo suas panículas empregadas na fabricação de vassouras e escovas domésticas. Seu cultivo é apontado como atividade alternativa para geração de renda, tanto nos sistemas de agricultura familiar, como para artesãos fabricantes de vassouras (FARIA et al., 2000).

### **2.1.3 Nitrogênio na cultura do sorgo**

O nitrogênio é o elemento mais requerido pela cultura do sorgo. De acordo com ROSOLEM & MALAVOLTA (1980), para a produção de 1000 kg de grãos, a extração total de N feita pela planta de sorgo granífero foi de 54 kg em média.

Em vários estudos realizados, dentre os macronutrientes, o nitrogênio foi o que mais se acumulou em sorgo, sendo que as plantas que cresceram com sua falta foram as mais atingidas em relação ao acúmulo de biomassa (ZHAO et al., 2005; SANTI et al., 2006).

Considerando o rendimento médio por hectare de 2500 kg de grãos no Brasil (IBGE, 2008), a necessidade seria de 135 kg de nitrogênio. Mas a quantidade variável de nitrogênio derivado da matéria orgânica; adubações residuais; e FBN nas áreas de plantio; além de fatores econômicos, levaram na prática a recomendação técnica de 60 kg de N ha<sup>-1</sup>, sendo aplicado geralmente 1/3 da dose no sulco de semeadura, e o restante aos 30 dias a lanço (ALMEIDA et al., 1988; COELHO et al., 2002).

A recuperação do N proveniente do fertilizante pelas plantas é dependente de diversos fatores ligados às condições de manejo do solo, bem como fatores climáticos, podendo ser minimizada, a ponto de tornar a prática da adubação não efetiva em situações mais extremas. Grande parte do N aplicado na forma mineral é perdida através dos processos de desnitrificação, volatilização e lixiviação. Em estudos com a cultura da cana-de-açúcar, TRIVELIN et al. (2002) observaram perdas de 50 % quando adubadas com uréia em superfície, e grande parte das perdas foi atribuída à volatilização de amônia.

Por outro lado, SANGOI et al. (2003), verificaram que a incorporação da uréia, em terra coletada em áreas de Nitossolo e Neossolo, favoreceu as perdas por lixiviação, em relação a sua aplicação superficial, independentemente do teor de matéria orgânica e da classe textural do solo.

De forma geral, as plantas são beneficiadas quando o nitrogênio é aplicado na forma de fertilizante, entretanto, a adubação além de gerar impactos negativos ao meio ambiente, quando feito de forma indiscriminada, também faz com que o custo de produção seja aumentado, o que não acontece quando se prioriza o uso de biofertilizantes (SAIKIA & JAIN, 2007).

## 2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio Atmosférico

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é a conversão do N<sub>2</sub> atmosférico em amônia, uma forma passível de ser utilizada por organismos superiores. O grupo de bactérias, que tem a capacidade de fixar N, denominado diazotróficos é bastante restrito em relação a outros grupos de microrganismos, contudo, a importância é inquestionável, uma vez que são responsáveis pela ciclagem de mais de 110 toneladas de N ano (EADY, 1996).

Para que a redução do N<sub>2</sub> em meio biológico aconteça, é necessário um catalisador denominado nitrogenase, um complexo enzimático presente em bactérias diazotróficas, composto de uma ferro-proteína (Fe-proteína) e uma molibdênio-ferro-proteína (MoFe-proteína) (NUNES et al., 2003). Porém, sabe-se hoje que várias espécies diazotróficas são capazes de fixar nitrogênio em condições de deficiência de molibdênio, utilizando sistemas enzimáticos alternativos, como a nitrogenase de vanádio e ferro (REHDER, 2000).

Acredita-se que a redução biológica de N<sub>2</sub> processa-se em três etapas: 1) a redução da Fe-proteína por ferredoxinas ou flavodoxinas, 2) a transferência multieletrônica da Fe-proteína para a MoFe-proteína, (em que um elétron é transferido de cada vez) acoplada à hidrólise de até duas moléculas de MgATP por elétron transferido e 3) a redução propriamente dita do substrato no sítio ativo da MoFe-proteína (NUNES et al., 2003). Sob condições ótimas, a redução de N<sub>2</sub> catalisada pela nitrogenase de molibdênio pode ser representada pela equação:  $N_2 + 8 e^- + 8 H^+ + 16 MgATP \rightarrow 2 NH_3 + H_2 + 16 MgADP + 16 Pi$ .

## 2.3 Principais Grupos de Bactérias Diazotróficas

As bactérias diazotróficas estão distribuídas no ambiente (bactérias de vida livre) e associadas à plantas (rizosféricas e endofíticas). O grupo das bactérias de vida livre é representado pela maioria das bactérias fixadoras como *Beijerinckia* spp., *Derxia* spp., *Azotobacter* spp., entre outras (REIS et al., 2006). Algumas destas, principalmente as do grupo dos rizóbios, e do gênero *Frankia* estabelecem relação simbiótica com o hospedeiro, que utilizam fotoassimilados da planta, e esta por sua vez, aproveita o N fixado pelas bactérias. Esse processo ocorre no interior de nódulos formados nas raízes das plantas geralmente leguminosas (REIS et al., 2006).

Outro grupo de bactérias, comumente associado a plantas não leguminosas, é denominado rizosféricas, formando associações superficiais aos tecidos radiculares, sendo capaz de sobreviver bem no solo, neste grupo, estão principalmente bactérias do gênero *Azospirillum* (BALDANI & BALDANI, 2005).

Outras bactérias são capazes de colonizar os tecidos internos das plantas sem emitir nenhum sintoma de patogenicidade, sendo denominadas bactérias diazotróficas endofíticas. Dentre as principais bactérias representantes deste grupo estão: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azoarcus* spp, *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp., que geralmente possuem baixa sobrevivência no solo e um espectro restrito de plantas hospedeiras (BALDANI et al. 1997).

Em países como Argentina, México, Índia, Bélgica e Estados Unidos, a maioria dos inoculantes comerciais, desenvolvidos para gramíneas são à base de espécies compreendidas no gênero *Azospirillum*, o mais estudado até o momento. Porém, o número de trabalhos com inoculação de *Azospirillum* vêm reduzindo nos últimos anos, e isto se deve, aos resultados experimentais muito variáveis, em função da interferência causada pelo ambiente externo. DÖBEREINER (1997), relatou que bactérias endofíticas podem apresentar maior potencial em termos de contribuição que as rizosféricas, por serem menos vulneráveis ao efeito competitivo exercido pela microbiota nativa, e outros fatores bióticos e abióticos, além de

realizarem a FBN mais eficientemente no interior dos tecidos vegetais. Com isso, o interesse por pesquisas com bactérias endofíticas, como as dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, vem crescendo junto à comunidade científica.

No Brasil, pesquisas recentes desenvolvidas na Embrapa Agrobiologia, propiciaram o desenvolvimento de um inoculante à base da mistura de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Burkholderia tropica* e *Azospirillum amazonense*, que mostrou ser capaz de substituir parte do nitrogênio mineral aplicado na cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2006). Estudos desenvolvidos na Embrapa Soja e Universidade Federal do Paraná, também levaram a produção de um inoculante comercial à base de estirpes de *Azospirillum brasilense* para as culturas do milho e arroz.

O gênero *Herbaspirillum* foi descrito em 1986 por BALDANI et al. (1986), que relataram como principais características, células Gram-negativas, vibróides as vezes helicoidal, não fermentativas, flageladas (1 a 3 flagelos em um ou ambos os pólos), que utilizam de preferência ácidos orgânicos como fonte de carbono, embora possam utilizar glucose, galactose, L-arabinose, manitol, sorbitol e glicerol.

Este gênero apresenta até o momento 10 espécies, das quais quatro foram descritas como diazotróficas. A primeira espécie diazotrófica a ser identificada foi a *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI et al., 1986), que é uma espécie considerada endofítica obrigatória por não sobreviver em condições naturais no solo, sendo encontrada nos tecidos de várias plantas tais como, milho, sorgo, arroz, cana-de-açúcar e várias gramíneas forrageiras cultivadas no Brasil, além de plantas não leguminosas como abacaxizeiro e bananeira (BALDANI et al., 1997; WEBER et al., 1999).

Posteriormente, outras espécies foram incluídas ao gênero, como a espécie *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BALDANI et al., 1996a), até então descrita como *Pseudomonas rubrisubalbicans*, que embora fixadora de nitrogênio, foi considerada fitopatogênica fraca em sorgo e variedades suscetível de cana-de-açúcar (PIMENTEL et al., 1991; JAMES et al., 1997; OLIVARES, et al., 1997). Outra espécie descrita foi a *Herbaspirillum frisingense*, que foi isolada de plantas de *Miscanthus* spp. e *Spartina pectinata* cultivadas na Alemanha, e *Pennisetum purpureum* cultivados no Brasil (KIRCHHOF et al., 2001).

A última espécie descrita como diazotrófica foi a *Herbaspirillum lusitanum*, isolada de nódulos de feijão coabitando com rizóbio em Portugal (VALVERDE et al., 2003). DING & YOKOTA (2004), ao descrever a espécie *Herbaspirillum putei*, verificaram que a estirpe padrão 7-2<sup>T</sup> possuía o gene *nif-H*, um dos genes que codifica a MoFe-proteína componente da nitrogenase, porém não demonstrou atividade de fixação de nitrogênio.

O gênero *Burkholderia* foi descrito por YABUUCHI et al. (1992), sendo composto por bactérias Gram-negativas, não fermentativas, móveis ou não, com flagelos simples ou em tufo quando móveis. A estirpe tipo, *B. cepacea*, é capaz de oxidar adonitol, D-xilose, galactose, inositol, manose, sorbitol e sucrose, além de ácidos orgânicos e aminoácidos como fonte de carbono e energia.

Há uma grande diversidade de espécies no gênero *Burkholderia*, e estas ocorrem em diversos ambiente como solo, água e em associação com vários organismos vivos (COENYE & VANDAMME, 2003). Desde a criação do gênero em 1992 por YABUUCHI et al. (1992) até a mais recente descrição (VANLAERE et al., 2009), foram incorporadas ao gênero 15 espécies até então pertencentes a outros gêneros, e várias outras foram descobertas, somando até o momento 63 espécies com nomes validados (EUZÉBIO, 2009), e mais três espécies *candidatus* (OEVELEN et al., 2002; 2004).

Algumas destas espécies são patogênicas para humanos, animais e plantas, no entanto, a maioria apresenta o potencial de ser utilizada na agricultura como biocontrole de doenças, promotoras de crescimento e biorremediadoras (PARKE & GURIAN-SHERMAN, 2001),

além de solubilizadoras de fosfato (PEIX et al., 2001) e fixadoras de nitrogênio (GILLIS et al., 1995).

Quinze das 66 espécies de *Burkholderia* conhecidas atualmente são consideradas diazotróficas. A primeira espécie descrita como diazotrófica foi a *Burkholderia vietnamiensis*, isolada de solos cultivados com arroz no Vietnã (GILLIS et al., 1995). Em seguida, a *Burkholderia kururiensis* foi isolada de aquífero poluído no Japão (ZHANG et al., 2000).

Isolados pertencentes ao gênero *Burkholderia* foram denominados por BALDANI et al. (1996b) como uma nova espécie, *B. brasilense*, encontrada associada a gramíneas no Brasil, no entanto, ESTRADA DE LOS SANTOS et al. (2001) observaram que estes isolados na verdade eram idênticos a *B. kururiensis*, após verificarem 99,9 % de similaridade da região 16s rDNA entre as estirpes padrão, mesmo perfil de proteínas, morfologia, e outros testes genéticos.

Outra espécie isolada de milho, café e cana-de-açúcar cultivados no México, foi a descrita como *Burkholderia unamae* (CABALLERO-MELLADO et al., 2004). Também são conhecidas as espécies *Burkholderia tropica*, isolada de plantas de cana-de-açúcar no Brasil e África do sul, e milho no México (REIS et al., 2004), a *Burkholderia xenovorans*, isolada de solo contaminado com policlorinato bifenil coletado em New York, amostra de sangue humano recolhido na Suécia e rizosfera de planta de café no México (GORIS et al., 2004). Outras descritas como diazotróficas, foram a *Burkholderia silvatlantica*, isolada de milho e cana-de-açúcar no Brasil (PERIN et al., 2006) e *Burkholderia terrae* isolada de solo coletado de floresta na Coreia do Sul (YANG et al., 2006).

Alguns isolados de *Burkholderia dolosa* e *Burkholderia caribensis*, após inoculação em *Mimosa pudica* formaram nódulos eficientes em estudo realizado em Taiwan (CHEN et al., 2003). As estirpes padrões de *Burkholderia phymatum* e *B. tuberum*, isoladas de nódulos de *Machaerium lunatum* na Guiana Francesa e *Aspalathus carnosa* na África do Sul (VANDAMME et al., 2002), quando inoculadas em *Mimosa pudica* promoveram a nodulação, e demonstraram alta atividade da nitrogenase, estabelecendo assim uma eficiente relação simbiótica com esta espécie (ELLIOTT et al., 2007). Outras espécies capazes de fixar nitrogênio, isoladas de nódulos de leguminosas mais recentemente, foram a *Burkholderia mimosarum*, *Burkholderia nodosa*, *Burkholderia sabiae* (CHEN et al., 2006, 2007, 2008).

Contudo, estudos relataram que algumas estirpes isoladas de nódulos de leguminosas demonstraram alta atividade da nitrogenase, mas parecem apresentar especificidade na simbiose com o gênero *Mimosa* (CHEN, et al., 2003; ELLIOTT et al., 2007). No geral, algumas espécies de *Burkholderia* são capazes de nodular leguminosas, porém os nódulos observados são ineficientes na fixação de nitrogênio (MOULIN et al., 2001; VANDAMME et al., 2002). Este gênero é bastante complexo, e as perspectivas para a identificação de novas espécies diazotróficas são grandes.

## 2.4 Benefícios das Bactérias Diazotróficas em Gramíneas

As pesquisas com bactérias diazotróficas relacionadas a gramíneas no Brasil tiveram início na década de 50, com o isolamento de *Azotobacter* a partir de solos ácidos da Baixada Fluminense (DÖBEREINER, 1953). Desde então, vários trabalhos foram desenvolvidos pela comunidade científica mundial, com o intuito de identificar novas bactérias, consolidar técnicas para esclarecer os mecanismos pelo qual estas se associam às gramíneas e conhecer seu potencial para o possível aproveitamento nas principais gramíneas de interesse econômico (BALDANI et al., 1986; SHEARER & KOHL, 1986; FALLIK & OKON, 1996; GOVINDARAJAN et al., 2008).

Atualmente, sabe-se que diversas espécies de bactérias são capazes de estabelecer associações com várias espécies de gramíneas (BHATTACHARJEE et al., 2008). Os



mecanismos pelo qual essas bactérias atuam nas plantas estão relacionados à diminuição, ou prevenção dos efeitos negativos de fitopatógenos devido à síntese de antibióticos, à síntese de fito-hormônios, redução do potencial de membrana das raízes, síntese de algumas enzimas tais como, ACC deaminase, que regula os níveis de hormônios na planta, assim como, solubilização de fosfato inorgânico e a mineralização de fosfato orgânico (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999), além da fixação biológica de nitrogênio (JAMES, 2000).

No entanto serão ressaltadas nesta revisão, somente as contribuições advindas da FBN e/ou, efeito promotor de crescimento, pela síntese de fito-hormônio nas principais gramíneas de importância econômica.

Em estudos realizados no Brasil, URQUIAGA et al. (1992), observaram nos híbridos comerciais de cana-de-açúcar CB45-3 e SP70-1143, e na cultivar Krakatau de *Saccharum Spontaneum*, 68 e 74 % de contribuição da FBN respectivamente. OLIVEIRA et al. (2006), estudando dois genótipos de cana-de-açúcar micropropagadas inoculadas com várias combinações de estirpes de bactérias diazotróficas, constataram que a FBN e a produção de colmos foi influenciada pela combinação de estirpes, genótipo botânico utilizado, e nível de fertilização nitrogenada, observando-se maior contribuição da inoculação, em solos de baixa e média fertilidade.

Na Índia, GOVINDARAJAN et al. (2006) realizaram um experimento em vaso e dois em condições de campo, onde inocularam em cana-de-açúcar micropropagada, o isolado MG43 pertencentes a espécie *Burkholderia vietnamiensis* apto em fixar N pela técnica de redução de acetileno. Comparando com as estirpes padrões de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* e a mistura de todas as estirpes, os mesmos autores verificaram o incremento de 20 % na biomassa no campo sendo melhor que os outros tratamentos testados que incrementaram de 5 a 16 %, no entanto a FBN não foi quantificada.

Na Argentina, GARCÍA DE SALAMONE et al. (1996) testaram quatro genótipos de milho quanto à contribuição da FBN, inoculado com *Azospirillum* e utilizando solo marcado com  $^{15}\text{N}$ , e observaram uma contribuição significativa da FBN nos genótipos Dekalb 4D 70 e CMS 22 em 58,3 e 48,0 % respectivamente.

Em estudo realizado no Uruguai (MONTAÑEZ et al., 2009), 19 cultivares comerciais de milho foram testadas em condições controladas de casa de vegetação, verificando-se nas dez mais utilizadas no país, que a porcentagem de nitrogênio derivada do ar variou entre 12 e 33 %, não sendo a FBN afetada pela adubação nitrogenada em oito cultivares. No mesmo trabalho, 178 isolados endofíticos foram obtidos de tecidos das 19 cultivares, onde através da técnica de redução de acetileno, verificou-se que onze destes foram hábeis em fixar nitrogênio, e esta habilidade foi confirmada pela técnica de PCR que constatou a presença do gene *nif-H* em seus genomas. As bactérias isoladas pertenciam aos gêneros *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhanella*, *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Rhizobium* e *Brevundimonas*. O estudo demonstrou que o milho pode obter significativas quantidades de N proveniente da FBN, variando principalmente com a cultivar (MONTAÑEZ et al., 2009).

No Brasil, com o objetivo de testar o efeito de estirpes pertencentes aos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em genótipos de milho, foi desenvolvido um estudo no qual dentre 49 estirpes, selecionou-se a partir de experimentos em casa de vegetação a ZAE 94 de *Herbaspirillum seropedicae*. E esta foi avaliada em experimentos de campo (safra e safrinha). Os resultados mostraram que a aplicação da estirpe selecionada incrementou a produtividade de milho não significativamente em até 34 %, dependendo do genótipo de milho e da dose de N-mineral. No mesmo estudo, através da técnica da abundância natural de  $^{15}\text{N}$ , observou-se contribuição de até 67 % do N proveniente da FBN no híbrido SHS 5050, sendo este mais promissor do que as variedades testadas em termos de respostas positivas a inoculação (ALVES, 2007).

SALA et al. (2005), estudando a ocorrência e o efeito de bactérias diazotróficas em três genótipos de trigo, obtiveram oito e doze isolados com característica de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* respectivamente, sendo que a quantidade de microrganismos diazotróficos observada nas raízes foi influenciada pela interação do genótipo da planta com a adubação nitrogenada. No mesmo trabalho, estes isolados foram testados *in vitro* nos mesmos genótipos dos quais foram originalmente isolados, e como resultado observaram que todos os tratamentos inoculados tiveram o comprimento de raízes aumentado em relação ao controle, e que apenas um isolado com características de *Herbaspirillum* aumentou significativamente o N na parte aérea.

Em outro estudo, a inoculação com *Azospirillum*, em trigo, não proporcionou aumento no rendimento de grãos, mas houve um aumento na eficiência da translocação do nitrogênio da palha para os grãos, produzindo grãos mais pesados e cheios na avaliação da massa de mil grãos (DIDONET et al., 2000). Contudo, EL-KOMY et al. (2003), através da técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  quantificaram a FBN em plantas de trigo inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78 em condições de casa de vegetação, e verificaram o acúmulo de 24,6 e 26,5 % de nitrogênio derivado da FBN nas folhas e grãos respectivamente, e observaram que o tratamento com 180 kg N ha<sup>-1</sup> inibiu a FBN.

No intuito de identificar dentre 80 isolados de *Herbaspirillum* e *Burkholderia* quais eram os mais promissores, e testar o quanto contribuem com a FBN em arroz, foi desenvolvido um estudo em condições gnotobióticas, onde foram observadas contribuições de 19 a 54 % de FBN quando inoculado com as estirpes selecionadas, porém quando testadas em solo, o decréscimo do total da contribuição foi de 30 % dos valores observados, tal fato foi atribuído, à baixa capacidade competitiva com os microrganismos nativos presentes no solo (BALDANI et al., 2000). GUIMARÃES et al. (2007) estudaram o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas em arroz, onde as estirpes BR11417 (ZAE 94) da espécie *Herbaspirillum seropedicae*, e BR11340 (M 130) do gênero *Burkholderia* promoveram acúmulo de matéria seca nas plantas de arroz das cultivares IR42 e IAC4440 em condições gnotobióticas, bem como, contribuíram para o aumento na produção de grãos e para o acúmulo de nitrogênio nos grãos em condições de casa de vegetação.

GOVINDARAJAN et al. (2008), em estudo com arroz na Índia obtiveram de raízes e folhas superficialmente esterilizadas, vários isolados pertencentes ao gênero *Burkholderia*, sendo que todos foram capazes de fixar nitrogênio e produzir AIA. No mesmo trabalho, o mais promissor dos isolados obtidos (MGK3) foi caracterizado, e verificou-se que o mesmo pertencia à espécie *B. vietnamiensis*, então, após a inoculação das sementes de arroz com este isolado foi observada a colonização das raízes, e através do uso de técnicas isotópicas, observou-se 40 % em vaso e 42 % no campo de contribuição da FBN. Ainda no mesmo trabalho, este isolado foi comparado com *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Azospirillum lipoferum*, estirpe padrão de *B. vietnamiensis* e mistura de todas as estirpes, resultando no incremento de até 23,6 % na produção de grãos quando inoculados com a mistura de estirpes, e até 12,16 % quando inoculado exclusivamente com o isolado (MGK3).

As bactérias diazotróficas que colonizam os tecidos de plantas apresentam ainda, o potencial de serem usadas na engenharia genética, na área da transgenia. Um estudo feito com as bactérias diazotróficas endofíticas *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe BR11281 e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe BR11335, sugere que as mesmas podem ser usadas como vetores para expressar genes com atividade entomopatogênica, visando o controle de pragas na cultura da cana-de-açúcar e outras plantas de interesse econômico (SALLES et al., 2000).

## 2.5 Bactérias Diazotróficas na Cultura do Sorgo

O sorgo é uma gramínea que apresenta ótimas perspectivas quanto à capacidade de respostas positivas à interação com bactérias diazotróficas, e/ou promotoras de crescimento (DÖBEREINER, 1997). Até o momento, pouco se tem em resultados consistentes para o desenvolvimento de inoculantes comerciais à base dessas bactérias para a cultura no Brasil, contudo, estudos vêm sendo desenvolvidos ao longo dos anos nesse segmento.

Várias espécies de bactérias diazotróficas são capazes de estabelecer relações com a planta de sorgo, e alguns trabalhos demonstraram isso ao longo do tempo. No Brasil, BALDANI et al (1986), estudando o isolamento de *Azospirillum* em algumas gramíneas, dentre elas o sorgo, observaram que 17 de 119 isolados obtidos a partir de raízes esterilizadas pertenciam a um gênero até então desconhecido, o *Herbaspirillum*.

JAMES et al. (1997), estudando a colonização por bactérias diazotróficas em sorgo variedade BR 303 crescido em substrato esterilizado, testaram as espécies *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*, que foram inoculadas por injeção sub epidérmica aos 14 dias após a semeadura, e verificaram que as duas espécies puderam ser re-isoladas de tecidos de folhas aos 5 e 14 dias após a inoculação. Com o uso de microscopia eletrônica, observaram que a espécie *Herbaspirillum seropedicae* foi visualizada em menor número colonizando o interior dos tecidos vasculares, sem a presença de sintomas da doença estria mosqueada do sorgo, enquanto que *H. rubrisubalbicans* foi visto colonizando abundantemente a parede dos xilemas primários, causando os sintomas. O que foi atribuída a uma resposta de defesa da planta, que com o intuito de impedir a colonização dos xilemas primários, produziu a partir das células da parede dos vasos, uma camada de substância gomosa talvez exopolissacarídeo ou lipopolissacarídeo, que aparentemente bloqueou a entrada das células bacterianas no interior dos vasos.

CHIARINI, et al. (1998), estudando o efeito da co-inoculação em sorgo crescido em substrato esterilizado, com combinações de *Burkholderia cepacea* (estirpe PHP7) e *Pseudomonas fluorescens* (A23/T3c) ou *Enterobacter* sp. (BB23/T4d), observaram que as estirpes de forma isolada, e em combinação foram aptas a colonizar as raízes, não diferindo entre si no tamanho da população observada, com exceção das estirpes PHP7 e BB23/T4d individualizadas e em combinação, onde a população da estirpe BB23/T4d foi inferior a estirpe PHP7. No entanto, verificou-se que todas as combinações foram capazes de incrementar a biomassa fresca de folha e raiz, aos 60 dias significativamente em relação ao controle, independente do tamanho da população observada nas raízes, não sendo a co-inoculação mais efetiva que a inoculação simples.

BERGAMASCHI et al. (2007), estudando a ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a 14 genótipos de sorgo forrageiro, constataram a ocorrência em todos, sendo que 76 isolados obtidos tiveram 100 % de similaridade com as estirpes padrão de algumas espécies dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, e todos foram aptos a fixar nitrogênio e produzir ácido indol-acético *in vitro*.

Em um estudo desenvolvido no Texas (EUA), foi observado, que plantas de *Sorghum halepense* crescidas em área com solo mais pobre em nitrogênio apresentavam maiores incrementos de biomassa, comparando com plantas crescidas em solos com teores mais elevados de N, e após testes em casa de vegetação, vários isolados foram obtidos das raízes e folhas, da qual alguns apresentaram taxas positivas na atividade da nitrogenase, sugerindo assim que o *Sorghum halepense* (considerado planta invasora) é capaz de se beneficiar com a FBN (ROUT & CHRZANOWSKI, 2009).

IDRIS et al. (2009), avaliando a eficiência de isolados rizobacterianos de sorgo na Etiópia, observaram que dentre vários isolados, a bactéria *Serratia marcescens* estirpe KBS6-H colonizou as raízes estimulando o crescimento das plantas de sorgo sob condições de

casa de vegetação, constatando-se efeito positivo quando testado para a produção de siderofóros, a produção de fito-hormônio (AIA) e solubilização de fosfato.

A fim de testar o efeito destes microrganismos na cultura, já que foi confirmada a capacidade da colonização da rizosfera e/ou tecidos internos das plantas foram desenvolvidos em âmbito mundial, experimentos na tentativa de quantificar os possíveis benefícios.

Nos Estados Unidos, a inoculação com a estirpe Cd de *Azospirillum brasilense* em três anos de experimento, proporcionou um aumento de 11 a 24 % na produção (TIEN et al., 1979 citado por BALDANI et al., 1999). Em Israel, utilizando a mesma estirpe, OKON et al. (1988) citado por BALDANI et al., (1999), observaram aumentos advindos da inoculação em 15 a 20 % dos experimentos implantados durante 7 anos de testes, sendo que em 100 % destes foram observados incrementos de produção. Na Índia, o uso de um inoculante comercial a base de bactérias diazotróficas também proporcionou acréscimos próximos de 20 % (RAO et al., 1986 citado por BALDANI et al., 1999).

No Brasil, PEREIRA et al. (1988), estudando a inoculação de estirpes dos gêneros *Herbaspirillum* e *Azospirillum* em sorgo granífero e sacarino, embora não tenha observado resultados positivos para sorgo com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe H 25, observaram que a inoculação com *Azospirillum lipoferum* estirpe S 82, em sorgo granífero, aumentou significativamente o peso seco da planta, peso seco de panícula e N total aos 90 dias em condições de campo em 37, 54 e 66 %, em relação ao controle respectivamente, porém não quantificaram a produtividade de grãos devido a danos causados por pássaros.

A inoculação com *Azospirillum brasilense* em sorgo, cultivado em solo esterilizado em condições de casa de vegetação, exerceu impacto direto na fisiologia e nutrição, promovendo o crescimento das plantas (PACOVSKY, 1990). Inoculando a estirpe BH 72 de *Azoarcus* sp., em plantas de sorgo para avaliar a FBN, STEIN et al. (1997) observaram considerável atividade de FBN usando a técnica de diluição isotópica de <sup>15</sup>N, estimando-a em 10,7 % na parte aérea e 2 % no sistema radicular.

Embora já se tenham alguns resultados experimentais, os estudos sobre aplicação de bactérias diazotróficas, como alternativa para a redução do uso de fertilizantes nitrogenados na cultura, estão em fase inicial, e muito se tem para estudar ainda.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo consistiu de duas etapas: na primeira foram realizados três experimentos sequenciais em casa de vegetação, sendo cada um, com um tipo agrônomo de sorgo (granífero, forrageiro e sacarino), inoculados com estirpes de bactérias diazotróficas. A segunda etapa foi realizada em condições de campo, onde três experimentos individualizados foram montados com os mesmos genótipos cultivados na primeira etapa, inoculados com as estirpes que proporcionaram melhores respostas no acúmulo de biomassa.

#### 3.1 Etapa 1: Seleção de Estirpes em Substrato Esterilizado

##### 3.1.1 Experimento com sorgo granífero

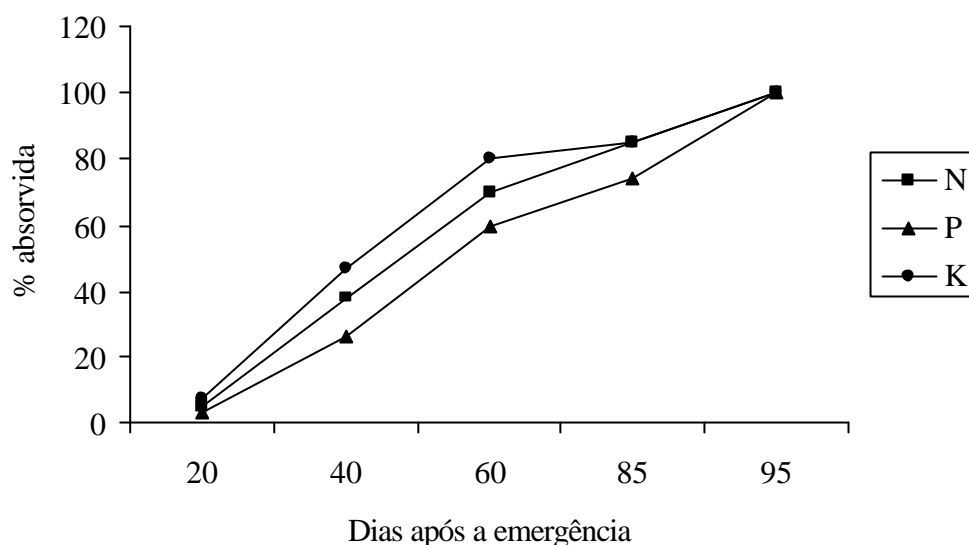
###### a) Localização

O experimento foi conduzido de dezembro de 2007 a fevereiro de 2008, na casa de vegetação n° 2 na área experimental anexa a sede da Embrapa Agrobiologia, no município de Seropédica-RJ, que geograficamente está situada na latitude 22° 45' sul, longitude 43° 41' oeste e altitude 33 metros.

###### b) Preparo do substrato e condições experimentais

As plantas foram cultivadas em caixas plásticas com capacidade para 15 L, sendo estas lavadas com detergente e em seguida preenchidas com mistura de areia e vermiculita esterilizada. Para o preparo do substrato, a areia foi previamente lavada em tanque de concreto, com o intuito de retirar sais e fragmentos de matéria orgânica que por ventura poderiam conter N. Com auxílio de uma betoneira, a areia foi misturada a vermiculita expandida na proporção de 2:1 (v/v) respectivamente. Cada porção de 5 kg da mistura foi acondicionada em recipientes esmaltados vedados com papel, em seguida esses recipientes foram submetidos à esterilização em autoclave por 1 hora a 120° C, por duas vezes, num intervalo de 24 horas, com o intuito de eliminar os microrganismos contaminantes. Uma amostra do substrato foi separada para as determinações químicas, que foram efetuados no laboratório de solos da Embrapa Agrobiologia, utilizando a metodologia descrita em EMBRAPA (1997). O substrato utilizado apresentava os valores apresentados no Anexo I.

Para a correção da fertilidade, realizou-se a adubação levando em consideração a curva de absorção de nutrientes pela planta de sorgo (Figura 1), onde se observou que até os 40 dias, (período correspondente a duração do experimento), 26 % de fósforo poderiam ser absorvidos pela planta de sorgo. Partindo desse princípio, o cálculo de adubação fosfatada foi feito com base na porcentagem do total de P recomendado para a cultura (ALMEIDA et al., 1988), além de considerar para o cálculo 20 % de aproveitamento do P. Com isso, a dose de 1,8 g de super fosfato simples foi incorporada de forma homogênea a cada caixa.



**Figura 1.** Porcentagem de nutrientes requeridos em diferentes estádios de crescimento do sorgo (dias), adaptado de TISDALE et al. (1984)

O genótipo avaliado foi o híbrido 9920044 desenvolvido pelo programa de melhoramento genético de sorgo da Embrapa-CNPMS.

No intuito de simular condições de baixa disponibilidade de N, todas as plantas inoculadas receberam 450 mg de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  por caixa (equivalente a 20 kg ha<sup>-1</sup> de N), sendo metade aplicada aos 10 e a outra aos 20 dias após a germinação. Os controles foram uma testemunha sem inóculo e sem N (T0) e duas testemunhas não inoculadas, mas adubadas com 450 (T20) e 900 mg de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (T40) por caixa.

Foram testadas 24 estirpes de bactérias diazotróficas. As bactérias escolhidas para os testes de seleção foram dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia*. As estirpes testadas foram escolhidas em função de terem proporcionado maior incremento de biomassa em experimento com milho sob condições controladas (ALVES, 2007), sendo provenientes da coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia e são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Estirpes de bactérias diazotróficas inoculadas no genótipo de sorgo granífero linhagem 9920044 da Embrapa Milho e Sorgo, seguido de suas respectivas espécies e origem dos isolados

Estirpes	Código	Gênero	Espécie	Origem
35	BR12234	<i>Burkholderia</i>	sp.	arroz
PPCR-8	BR12166	<i>Burkholderia</i>	<i>silvatlantica</i>	cana-de-açúcar
109	BR11818	<i>Burkholderia</i>	sp.	arroz
Ppe6	BR11364	<i>Burkholderia</i>	<i>tropica</i>	cana-de-açúcar
Ppe7	BR11365	<i>Burkholderia</i>	<i>tropica</i>	cana-de-açúcar
120	BR11821	<i>Burkholderia</i>	sp.	arroz
90 m	BR11915	<i>Burkholderia</i>	<i>silvatlantica</i>	milho
M 130	BR11340	<i>Burkholderia</i>	<i>kururiensis</i>	arroz
PPCR-1	BR12164	<i>Burkholderia</i>	<i>silvatlantica</i>	cana-de-açúcar
M 209	BR11345	<i>Burkholderia</i>	<i>kururiensis</i>	arroz
41	BR12149	<i>Burkholderia</i>	<i>vietnamiensis</i>	arroz
Ppe5	BR11363	<i>Burkholderia</i>	<i>tropica</i>	cana-de-açúcar
ZAE 78	BR11177	<i>Herbaspirillum</i>	<i>seropedicae</i>	milho
*B-4362	BR12229	<i>Herbaspirillum</i>	<i>rubrisubalbicans</i>	cana-de-açúcar
**HCC 103	BR11504	<i>Herbaspirillum</i>	<i>rubrisubalbicans</i>	cana-de-açúcar
ZMS 176	BR11179	<i>Herbaspirillum</i>	<i>seropedicae</i>	milho
M1	BR11191	<i>Herbaspirillum</i>	<i>rubrisubalbicans</i>	cana-de-açúcar
16	BR12233	<i>Herbaspirillum</i>	<i>rubrisubalbicans</i>	arroz
HRC 54	BR11335	<i>Herbaspirillum</i>	<i>seropedicae</i>	cana-de-açúcar
ZAE 94	BR11417	<i>Herbaspirillum</i>	<i>seropedicae</i>	arroz
ZAE 67	BR11175	<i>Herbaspirillum</i>	<i>seropedicae</i>	arroz
ZMS 152	BR11178	<i>Herbaspirillum</i>	<i>seropedicae</i>	milho
ZAE 95	BR11181	<i>Herbaspirillum</i>	<i>seropedicae</i>	arroz
GSF 28	-	<i>Herbaspirillum</i>	<i>frisingense</i>	<i>Miscanthus sacchariflorus</i>
ZA 10	BR11765	<i>Herbaspirillum</i>	<i>rubrisubalbicans</i>	arroz

Código - Numeração relativa ao depósito das estirpes na coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia.

\* Estirpe testada no experimento com sorgo granífero. \*\* estirpe testada nos experimentos com sorgo forrageiro e sacarino.

### c) Preparo do inóculo

As estirpes utilizadas estavam liofilizadas conforme (PITARD, 2000), num primeiro momento, foi verificada a capacidade das estirpes em formarem a película característica de bactérias diazotróficas (em forma de véu), nos meio de cultura semi-sólido JNFb (DÖBEREINER et al. 1995) (Anexo III), utilizado para crescer bactérias do gênero *Herbaspirillum* e JMV para *Burkholderia* (BALDANI, 1996b) (Anexo III).

Confirmado o caráter diazotrófico, as estirpes de *Herbaspirillum* foram riscadas em placas contendo o meio sólido NFb com três vezes a quantidade do indicador (DÖBEREINER et al., 1995), e as estirpes de *Burkholderia* em meio sólido JMV, a fim de verificar a pureza das colônias. Após o crescimento em placa, fez-se um pré-inóculo, onde uma colônia pura foi retirada e colocada em tubo contendo 5 mL de meio de cultura líquido Dyg's modificado (RODRIGUES-NETO et al. 1986) (Anexo III).

Decorrido 24 horas sob homogeneização, uma alíquota de 20 µL foi transferida para 25 mL do mesmo meio. Após 24 horas foi medida a absorbância do inóculo no comprimento de onda de 436 nm, a densidade óptica da suspensão foi ajustada para o valor 1, através do acréscimo de meio Dyg's modificado líquido. Para se obter o número de unidades formadoras

de colônia por mL (UFC mL<sup>-1</sup>), aplicou-se o método de plaqueamento em gotas para a contagem de microrganismos, adaptado de (MILES & MISRA, 1938).

No intuito de preservar para os próximos experimentos as estirpes utilizadas, uma alíquota da suspensão bacteriana usada como pré-inóculo, foi transferida para frascos de 1 mL do tipo Eppendorf, em seguida foi submetida à centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado, acrescentando-se água estéril. Posteriormente o frasco foi vedado com parafilme e mantido em temperatura ambiente.

O delineamento utilizado foi em blocos ao acaso com 4 repetições. No momento da semeadura, 1 mL do inóculo contendo de 10<sup>8</sup> a 10<sup>9</sup> UFC mL<sup>-1</sup> foi adicionado sobre as sementes, que imediatamente foram cobertas com substrato umedecido. No décimo dia após a semeadura, realizou-se o desbaste deixando-se quatro plantas por unidade experimental.

As avaliações consistiram de pesagem da matéria seca das raízes e parte aérea das plantas, além da quantificação do teor e conteúdo de nitrogênio na parte aérea aos 40 dias após a germinação. Para se obter a massa seca da parte aérea, fez-se o corte basal das plantas de sorgo, já para a quantificação da massa seca do sistema radicular, as raízes foram separadas do substrato por cuidadosa lavagem em água corrente. As amostras obtidas foram colocadas em sacos de papel e levadas para a estufa de circulação fechada, na qual permaneceram sob a temperatura de 65° C até os valores ficarem constantes nas pesagens. As análises do teor total de nitrogênio na parte aérea foram realizadas no laboratório de análise de nitrogênio da Embrapa Agrobiologia, utilizando os métodos semi-micro Kjeldahl e destilação à vapor de extratos em amostras de tecidos de plantas descritos em ALVES et al. (1999).

Os procedimentos estatísticos constaram de análise de variância, com aplicação do teste F para testar significância com 5 % de probabilidade. Para os valores médios dos caracteres estudados foi aplicado o teste de Scott-Knott (SCOTT & KNOTT, 1974). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2003).

### **3.1.2 Experimento com sorgo forrageiro**

O experimento foi conduzido nos meses de fevereiro e março de 2009 em condições parecidas com o descrito no item 3.1.1, as diferenças estão na análise química do substrato (Anexo I); no genótipo avaliado que foi o híbrido forrageiro BRS 655 (Embrapa-CNPMS) recomendado para a produção de silagem de alta qualidade (RODRIGUES et al., 2008); na origem das estirpes, desta vez provenientes de estoque em água; além da substituição da estirpe BR12229 *Herbaspirillum rubrisubalbicans* isolada de folha de cana-de-açúcar, pela BR11504, também da espécie *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, porém isolada de colmo de cana-de-açúcar, devido a dificuldades encontradas na sua obtenção.

Outra mudança realizada foi no método de contagem, feito desta vez em câmara de Neubauer através da microscopia ótica comum, com o intuito de obter uma contagem mais precisa. Além da aplicação de 135 mg de FTE BR12 por caixa (equivalente a 30 kg ha<sup>-1</sup>), a fim de suprir eventual deficiência de micronutrientes.

Nas avaliações após a coleta das plantas, não foi realizada a análise de N total nos tecidos, uma vez que a quantificação da biomassa, no primeiro experimento (item 3.1.1) foi um parâmetro considerado suficiente para a seleção das estirpes que mais beneficiaram o sorgo.

### **3.1.3 Experimento com sorgo sacarino**

O experimento foi conduzido nos meses de julho e agosto de 2009 em condições parecidas com o descrito no item 3.1.2. Porém, a correção da fertilidade foi diferenciada, não



sendo considerado no cálculo, conforme os experimentos anteriores, a curva de absorção para os primeiros 40 dias, haja vista que nos experimentos anteriores, observaram-se sintomas característicos de deficiência de fósforo nas plantas conforme COELHO et al. (2001), o que pode estar relacionado à alcalinidade do substrato, que pode ter causado uma reação, que precipitou o fósforo com o cálcio trocável ( $\text{Ca}^{+2}$ ), tornando-o insolúvel ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), com isso, a observação dos sintomas nas plantas (MEURER et al., 2006). Por isso, usou-se a dose total de  $\text{P}_2\text{O}_5$  recomendada para os resultados da análise química no Anexo I. Além do mais, foi feita a aplicação de 150 mg de cloreto de potássio por caixa, devido ao baixo teor de  $\text{K}_2\text{O}$  observado na análise química do substrato (Anexo I).

O genótipo botânico utilizado foi o sorgo sacarino, variedade BR 501 (Embrapa-CNPMS), que é indicado para pastejo direto, fenação e ensilagem.

### 3.2 Etapa 2: Avaliações em Condições de Campo

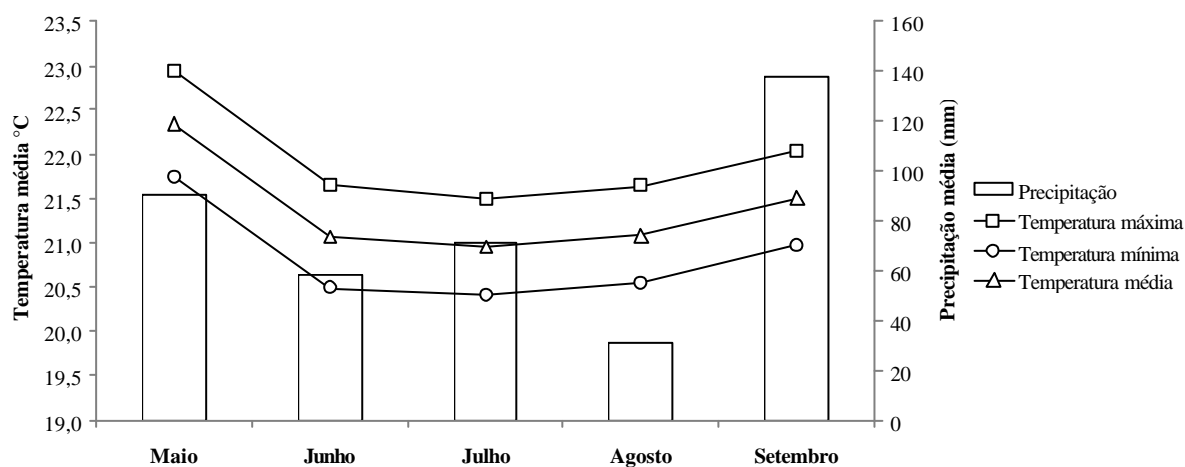
Dentre as 24 estirpes testadas nos experimentos em condições de casa de vegetação, as BR11179, BR12233, BR11818 e BR11364 apresentaram resultados mais consistentes, embora não significativo estatisticamente (item 4.1), no acúmulo de biomassa seca de parte aérea e raiz nos sorgos granífero e forrageiro. Portanto, foram selecionadas para teste em condições de campo, sendo aplicadas de forma conjunta nos ensaios com sorgo granífero, forrageiro e sacarino.

Devido ao atraso na implantação do experimento com sorgo sacarino, não foi possível utilizar os resultados gerados neste para auxiliar no processo de seleção das estirpes, com isso, a escolha foi baseada nos dois primeiros (granífero e forrageiro).

#### 3.2.1 Experimento com sorgo granífero

##### a) Localização da área de estudo

O experimento foi implantado em maio de 2009, sobre um Planossolo Háplico (série Ecologia) (RAMOS et al., 1973), localizado na área experimental da Embrapa Agrobiologia no município de Seropédica-RJ. As temperaturas médias e precipitações ocorridas no intervalo de condução dos experimentos são apresentadas na Figura 2.



**Figura 2.** Dados meteorológicos no período de maio a setembro de 2009 na região de Seropédica-RJ (INMET, 2009).

## **b) Preparo da área de plantio e condições e xperimentais**

Para a implantação dos experimentos, a área escolhida foi preparada de modo convencional, sendo mecanizada com uma aração, duas gradagens, além do destorroamento com enxada rotativa. A amostragem de solo da área foi feita na profundidade de 0 a 20 cm, conforme metodologia descrita em COELHO et al. (2003). A amostra composta foi analisada no laboratório de solos da Embrapa Agrobiologia, utilizando a metodologia descrita em EMBRAPA (1997). Os resultados da análise química são apresentados no Anexo I. O solo recebeu em pré-semeadura a adubação recomendada para o sorgo em função da fertilidade, que foi feita com base no Manual de Adubação do Estado do Rio de Janeiro (ALMEIDA et al., 1988). Onde foi aplicado no sulco de plantio o equivalente a 60 kg de  $P_2O_5$  mais 20 kg de  $K_2O$   $ha^{-1}$ , na forma de superfosfato simples e cloreto de potássio respectivamente. O genótipo de sorgo granífero utilizado foi o mesmo da etapa de seleção em substrato esterilizado (9920044).

Os tratamentos estudados foram: presença e ausência de inoculação com mistura das estirpes pré-selecionadas, (BR11179, BR12233, BR11818 e BR11364), quatro tratamentos de fertilização nitrogenada (equivalentes a: 30; 60; 90 e 120 kg  $ha^{-1}$ ), e uma testemunha não adubada com N. O delineamento foi em blocos ao acaso com parcelas subdivididas, sendo os quatro níveis de fertilização nitrogenada e o controle, distribuídos nas parcelas, e nas subparcelas, inoculação e não-inoculação com quatro repetições (Anexo II). Cada parcela foi constituída de 7 linhas de 5 m de comprimento espaçadas de 0,8 m, sendo que as linhas das extremidades, foram consideradas também bordaduras das parcelas adjacentes. Cada parcela foi dividida em duas subparcelas, tendo como área útil duas linhas com 0,5 m excluídos das duas extremidades.

## **c) Preparo do inóculo**

O preparo do inóculo foi realizado em condições laboratoriais, onde as estirpes selecionadas foram crescidas individualmente em placas de Petri, contendo meio sólido NFB com três vezes a quantidade de indicador (Anexo III), para as estirpes BR11179 e BR12233 do gênero *Herbaspirillum*, e meio sólido JMV (Anexo III) para as estirpes BR11818 e BR11364 do gênero *Burkholderia*. Após esta etapa, colônias puras de cada estirpe foram transferidas para meio semi-sólido JNFb (*Herbaspirillum*) e JMV (*Burkholderia*) (Anexo III), a fim de confirmar o caráter diazotrófico das mesmas. Em seguida, cresceram por 48 horas nos respectivos meios, desta vez líquidos.

Após o crescimento foi feita a contagem em câmara de Neubauer, e a quantidade de células foi ajustadas para aproximadamente  $10^8$  células por mL de suspensão bacteriana para cada estirpe, estas foram misturadas em iguais proporções onde 15 mL da mistura foram inoculados em cada saco plástico contendo 35 g de turfa, preparada conforme metodologia descrita por STRALIOTTO (2000). A mistura foi então incubada a 30° C por 24 horas. Sendo mantidas 72 horas em temperatura ambiente para posterior uso. Para melhor aderência do inoculante, as sementes foram umedecidas com solução açucarada a 10 %, e a proporção de inoculante e sementes foi de 26,5 g e 500 g respectivamente, o que garante que cada semente contenha aproximadamente  $10^6$  células bacterianas recomendadas pela RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícolas) (BUCHER & REIS, 2008). Após a homogeneização, as sementes inoculadas permaneceram por 16 horas em ambiente sombreado protegido de eventuais contaminantes. A título de confirmação do número mais provável (NMP) de células contidas no inoculante, foi feita a contagem em meio semi-sólido JNFb e JMV (Anexo III), observando-se a presença ou ausência de película (DÖBEREINER et al., 1995). Constatando-

se uma quantidade superior a  $10^9$  células por grama de inoculante em ambos os meios utilizados, uma vez que as estirpes estavam misturadas.

#### **d) Implantação, condução e avaliação do experimento**

A semeadura foi efetuada em sulcos, sendo as sementes cobertas com uma camada de 5 cm de terra. A aplicação dos tratamentos nitrogenados foi realizada dez dias após a semeadura, estando as plantas com cerca de 7 cm de altura. Como fonte de N foi utilizada a uréia comercial (45 % de N), aplicada ao lado das plantas na linha de plantio.

Com o intuito de minimizar as perdas do adubo, as doses recomendadas foram divididas em duas aplicações, sendo a primeira com 1/3 da dose e a segunda aos trinta dias com o restante da adubação. Nas micro-parcelas tratadas com  $^{15}\text{N}$ , a primeira aplicação de N foi feita colocando-se no solo 100 mL de solução com concentração de  $71,1 \text{ g L}^{-1}$  de uréia marcada, e a segunda com 200 mL da mesma solução, o que foi equivalente a  $60 \text{ kg de N ha}^{-1}$ .

Durante o ciclo da cultura foram realizadas três capinas, sendo a primeira aos 15 dias, a segunda aos 25 e a última aos 45 dias. A cultura foi ainda suplementada com irrigação quando necessário. Aos 26 dias, estando as plantas com aproximadamente 25 cm de altura, procedeu-se o desbaste, deixando-se 14 plantas por metro linear, o que equivale a  $200.000 \text{ plantas ha}^{-1}$ , população recomendada para sorgo granífero pela literatura. Em decorrência do ataque de *Spodoptera frugiperda* J. E. SMITH (lagarta do cartucho) e *Rhopalosiphum maidis* FITCH (pulgão do milho), aos 40 dias foi realizada a aplicação de óleo de nim comercial (princípio ativo Azadiractina), na concentração de 1 %. Aos 85 dias, as panículas foram cobertas com sacos confeccionados com tela de náilon tipo mosquiteiro, que foram fixados com grampos à planta, visando a proteção contra o ataque de pássaros.

Os experimentos foram colhidos no fim de setembro estando as plantas com 120 dias. Para se realizar a coleta, após a contagem das plantas presentes na área útil, retiraram-se cuidadosamente os sacos de tela de mosquiteiro, fazendo em seguida o corte das panículas bem próximo aos grãos.

Para a quantificação da biomassa fresca de colmos e folhas (palha), fez-se o corte basal de todas as plantas da área útil de cada subparcela, com posterior pesagem em balança eletrônica. Para a determinação da biomassa seca da palha, coletou-se ao acaso 5 plantas que foram trituradas em picadeira elétrica, e após a homogeneização uma amostra de 200 g foi desidratada em estufa à  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ . Obteve-se de imediato o peso fresco das panículas e após a limpeza em maquinário próprio seguido do peneiramento, o peso fresco dos grãos. Uma amostra de 100 g foi retirada de cada unidade experimental e seca em estufa para a determinação da matéria seca de grãos. Após a moagem dos grãos e da palha, uma amostra foi recolhida para a determinação do conteúdo total de nitrogênio (N total), que foi determinado no laboratório de análise de nitrogênio da Embrapa Agrobiologia, usando o método descrito em ALVES et al. (1999).

As variáveis avaliadas foram: altura aos 40 dias (média de 6 plantas por subparcela); biomassa seca de grãos ( $\text{kg ha}^{-1}$ ); biomassa seca da palha (parte aérea sem a panícula) em  $\text{kg ha}^{-1}$  e teor e conteúdo de N nos grãos e palha.

Os procedimentos estatísticos constaram de análise de variância com o auxílio do programa SISVAR 4.6 (FERREIRA, 2003), no qual para o fator inoculação, foi usado na comparação das médias o teste F a 5 % de probabilidade, e para o fator nível de adubação foi utilizado o teste de regressão a 5 % de probabilidade.

### 3.2.2 Experimentos com sorgo forrageiro e sorgo sacarino

Os experimentos foram conduzidos nas mesmas condições descritas no item 3.2.1, as diferenças estão discriminadas na Tabela 2 e seus anexos.

**Tabela 2.** Diferenças entre os experimentos com sorgo granífero, forrageiro e sacarino

<b>Indicadores</b>	<b>Granífero</b>	<b>Forrageiro</b>	<b>Sacarino</b>
Análise química do solo	Anexo I	Anexo I	Anexo I
Cultivar	9920044	BRS 655	BR 501
Desenho experimental	Anexo II	Anexo II	Anexo II
Altura no momento do desbaste (cm)	25	30	20
Estande (plantas ha <sup>-1</sup> )	200000	150000	125000

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Seleção de Estirpes em Substrato Esterilizado

No experimento com sorgo granífero, comparando o tratamento T40 com os demais, observou-se diferença estatística pelo teste de Scott Knott a 5 % de probabilidade, nos parâmetros biomassa seca da parte aérea (Figura 3) e N total na parte aérea (Figura 4), evidenciando que a quantidade de N acumulada foi dependente da aplicação do fertilizante nitrogenado, com isso, as plantas se mostraram responsiva quanto ao acúmulo de biomassa, quando submetidas à aplicação de 40 kg de N ha<sup>-1</sup>, já na variável biomassa seca de raiz, não se observou diferença estatística.

Embora não significativo pelo teste empregado, observou-se nas variáveis analisadas, que o tratamento sem a aplicação de N apresentou menores incrementos de biomassa em relação aos demais tratamentos. E nos tratamentos adubados com 20 kg de N ha<sup>-1</sup>, observou-se quando comparado os tratamentos não inoculados com os inoculados, que 15 das 24 estirpes apresentaram incrementos positivos na biomassa, com incrementos de até 35 % em relação a T20.

Quando se comparou os tratamentos inoculados entre si, embora não significativo, observou-se que, a estirpe que mais incrementou a biomassa foi a ZAE 95, seguido pela ZMS 176 e 16 (Figura 3), sendo que o tratamento com a estirpe ZMS 176 apresentou o maior valor de N total acumulado na parte aérea (Figura 4), sugerindo a contribuição a partir da FBN.

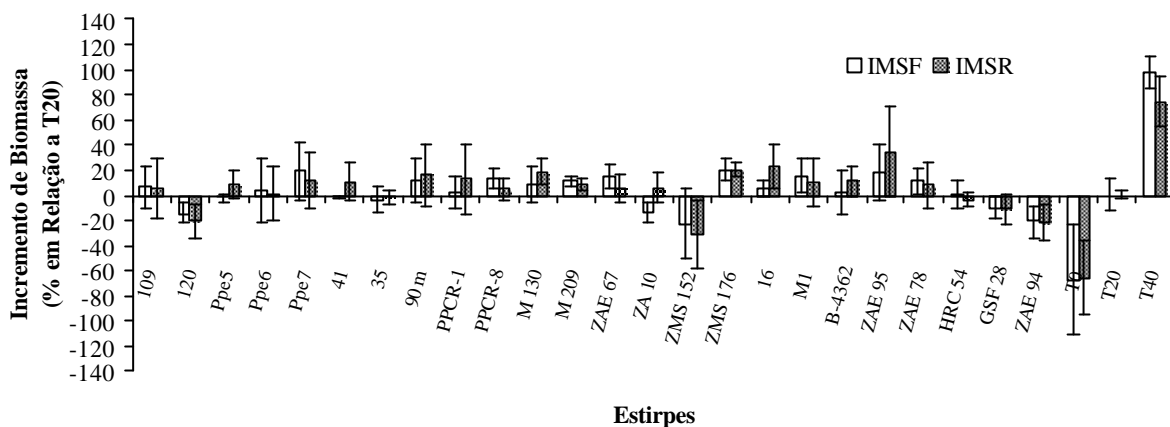
Ainda na Figura 4, com exceção das estirpes 109, Ppe7, 90 m e PPCR-1, do gênero *Burkholderia*, observou-se menor acúmulo de N total na parte aérea quando comparado com a T20, o que sugere que a contribuição no acúmulo de biomassa pode estar relacionada, com a produção de fito-hormônios ou mesmo outros mecanismos.

No experimento com sorgo forrageiro, não se observou diferença estatística entre os tratamentos nas variáveis analisadas. Porém, com exceção do tratamento com a estirpe M 209, todos apresentaram valores de incremento de biomassa na parte aérea e raiz, superiores não estatisticamente a T20 (Figura 5). A testemunha sem a presença de adubação, também apresentou valores maiores que a T20, o que pode estar ligado, a alguma falha experimental de causa não identificada na correção da fertilidade.

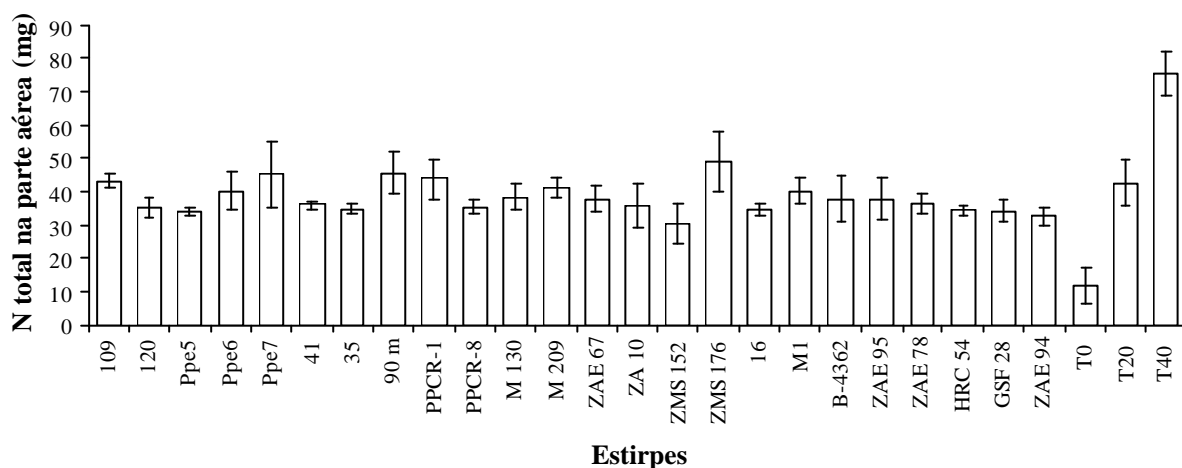
Contudo, observou-se que independente da estirpe utilizada e dose aplicada, o acúmulo de biomassa na parte aérea foi sempre superior ao acúmulo de biomassa na raiz, o que indica que a cultivar, nas condições do estudo incrementou a parte aérea em detrimento da raiz. As estirpes que mais se destacaram na contribuição com o acúmulo de biomassa no genótipo forrageiro foram a 109, Ppe5, 41, PPCR-8 e ZM 152, contudo, estas estirpes não foram efetivas no experimento com sorgo granífero.

No experimento com sorgo sacarino, as médias dos tratamentos não diferiram estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5 % nas variáveis analisadas. Porém, observou-se nos três controles adubados com 0, 20 e 40 kg N ha<sup>-1</sup>, aumento crescente no acúmulo de biomassa com a elevação da dose de N (Figura 6). O que sugere que a cultivar foi responsiva à aplicação de N.

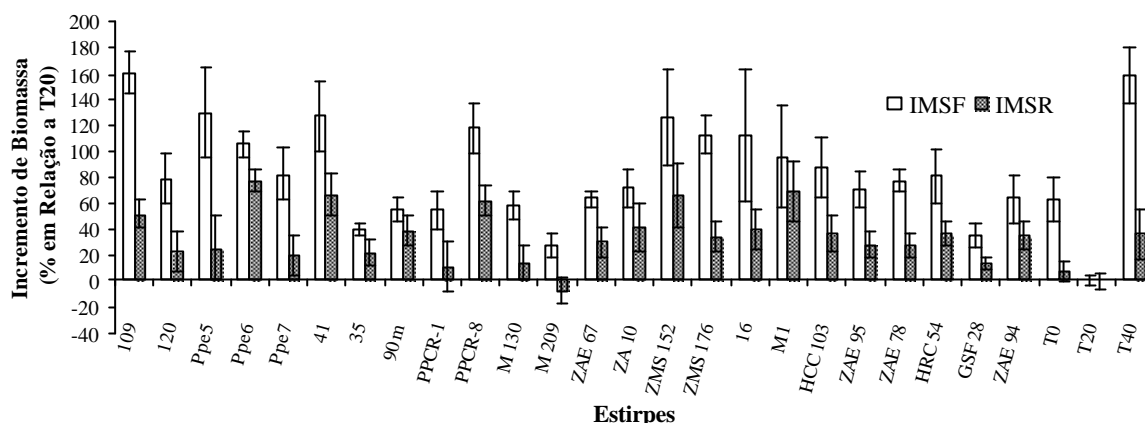
Dos tratamentos adubados com 20 kg de N ha<sup>-1</sup>, observou-se que 14 apresentaram valores de incremento de biomassa superiores ao controle não inoculado (Figura 6). As estirpes usadas nos tratamentos que se destacaram com maiores incrementos foram a ZAE 94, com incremento que se equiparou à testemunha adubada com o dobro de N (T40), seguido pelas estirpes 16, e ZAE 95, com maior incremento na parte aérea.



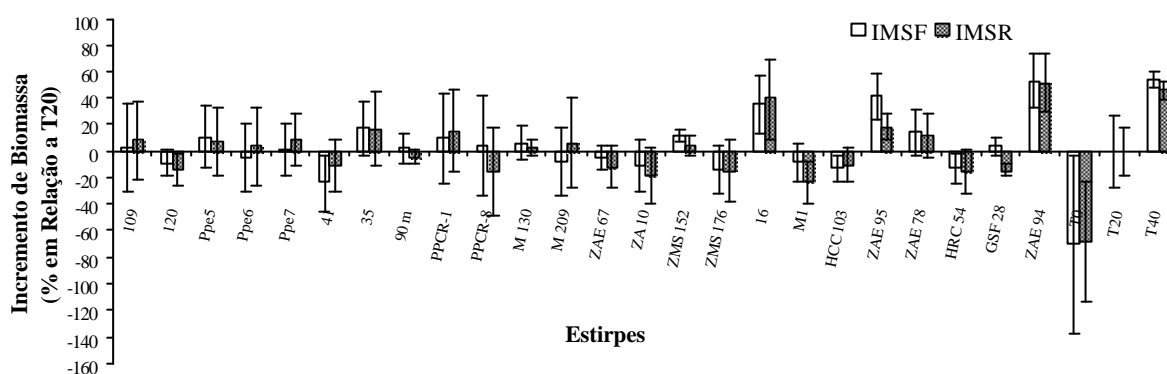
**Figura 3.** Valores relativos (%) de biomassa seca de parte aérea (IMSF) e sistema radicular (IMSR) dos tratamentos inoculados com *Herbaspirillum* spp e *Burkholderia* spp., em relação à testemunha adubada com a mesma dose de nitrogênio (T20), na seleção em substrato esterilizado em sorgo granífero. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento (+/-). Dados originais Anexo IV



**Figura 4.** Nitrogênio total contido na parte aérea dos tratamentos inoculados com *Herbaspirillum* spp e *Burkholderia* spp., em relação à testemunha adubada com a mesma dose de nitrogênio (T20), na seleção em substrato esterilizado em sorgo granífero. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento (+/-). Dados originais Anexo IV



**Figura 5.** Valores relativos (%) de biomassa seca de parte aérea (IMSF) e sistema radicular (IMSR) dos tratamentos inoculados com *Herbaspirillum* spp e *Burkholderia* spp., em relação à testemunha adubada com a mesma dose de nitrogênio (T20), na seleção em substrato esterilizado em sorgo forrageiro. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento (+/-). Dados originais Anexo IV



**Figura 6.** Valores relativos (%) de biomassa seca de parte aérea (IMSF) e sistema radicular (IMSR) dos tratamentos inoculados com *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp., em relação à testemunha adubada com a mesma dose de nitrogênio (T20), na seleção em substrato esterilizado em sorgo sacarino. Barras verticais representam o erro padrão da média de cada tratamento (+/-). Dados originais Anexo IV

De maneira geral, observou-se no tratamento com omissão de N, plantas cloróticas com porte reduzido, além de baixo acúmulo de biomassa e N total na parte aérea quando comparado com os tratamentos nitrogenados, fato também observado por SANTI et al. (2006) ao estudar a cultivar granífera Dow Agrosciences 822. Porém, no experimento com sorgo forrageiro, o tratamento sem a aplicação de nitrogênio apresentou-se superior nos parâmetros avaliados, em relação ao adubado com 20 kg de N ha<sup>-1</sup>.

Quanto aos tratamentos inoculados (Figura 3 a Figura 6), observou-se que alguns, em nenhum dos experimentos realizados contribuíram, para o acúmulo de biomassa quando comparado com a testemunha (T20). Os tratamentos com as estirpes HRC 54 (BR11335) e HCC 103 (BR11504), são exemplos. Estas estirpes, misturadas a outras três de diferentes gêneros foram inoculadas em cana-de-açúcar cultivada em condições de campo, e observaram-se contribuições de até quase 30 % no acúmulo de biomassa no primeiro corte (OLIVEIRA et al., 2006).

As estirpes M 130 (BR11340), ZAE 67 (BR11175) e M 209 (BR11345), também não demonstraram no presente trabalho, potencial para contribuir com os genótipos botânicos testados. Em outra ocasião BALDANI et al. (2000) constataram em arroz inoculado com estas estirpes, contribuições de até 25 % de FBN.

A estirpe ZAE 94 (BR11417) não contribuiu com o acúmulo de biomassa nos genótipos granífero e forrageiro, contudo, verificou-se contribuição de até 50 % em relação a T20 no sorgo sacarino (Figura 6). Em estudos anteriores de seleção com arroz e milho, observou-se destaque desta estirpe em relação ao acúmulo de biomassa (BALDANI et al. 2000; ALVES, 2007).

A estirpe ZAE 95 (BR11181) apresentou o maior incremento de raiz e o segundo maior de parte aérea nos experimentos com sorgo granífero e sacarino respectivamente (Figura 3 e Figura 6), sendo uma estirpe com potencial para estudos futuros. Porém não foi selecionada para testes em campo, tendo em vista que no experimento com sorgo forrageiro (Figura 5), teve efeito intermediário no acúmulo de biomassa.

Para os testes de campo, elaborou-se um inoculante misto contendo quatro estirpes de bactérias diazotróficas, sendo duas do gênero *Herbaspirillum* (16 e ZMS 176) e duas do gênero *Burkholderia* (109 e Ppe6), uma vez que poderia ser maior a possibilidade de obtenção de benefícios à cultura, testando uma maior diversidade de grupos, pois, as melhores estirpes selecionadas em condições de substrato esterilizado poderiam não ser as melhores em condições naturais de solo. Não se teve a imediata preocupação de conhecer dentre as quatro estirpes, qual a que mais contribui com a cultura, pois o sistema de produção do sorgo é composto por vários tipos agronômicos e diferentes cultivares, e no futuro seria inviável a fabricação de um inoculante para cada genótipo existente.

Dentre as bactérias testadas, a estirpe 16 (BR12233) foi a que demonstrou maior estabilidade na contribuição, com valores sempre altos nos três experimentos (Figura 3 a Figura 6), e foi acrescentada ao inoculante misto. Esta estirpe é da espécie *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, considerada um fraco fitopatógeno para sorgo e variedades suscetível de cana-de-açúcar (PIMENTEL et al., 1991; JAMES et al., 1997; OLIVARES, et al., 1997). Porém, sintomas visíveis da doença causada por esta espécie não foram detectados. Em experimento com milho (BRS - Sol da manhã) em condições de casa de vegetação utilizando solo nativo, a estirpe 16 (BR12233) foi a segunda em destaque, dentre um total de 21 estirpes para o parâmetro biomassa seca (ALVES, 2007).

Outra estirpe selecionada foi a estirpe ZMS 176 (BR 11179), que foi a que mais incrementou a raiz e a segunda a incrementar a parte aérea no experimento com sorgo granífero (Figura 3), além de ser a que mais acumulou N na parte aérea (Figura 4), apresentando também resultados satisfatórios para sorgo forrageiro (Figura 5). Porém, para sorgo sacarino não demonstrou capacidade de aumentar a biomassa (Figura 6), fato constatado também por ALVES (2007) em milho BRS - Sol da manhã, considerado genótipo promissor para a FBN. Assim, levou-se à campo em função do alto incremento em sorgo granífero.

A estirpe 109 (BR11818) foi escolhida em função do alto incremento na biomassa em sorgo forrageiro (Figura 5), que se equiparou ao controle adubado com o dobro da dose (40 kg ha<sup>-1</sup>).

Outra escolhida para a segunda etapa foi a estirpe Ppe6 (BR11364), que foi a que mais incrementou biomassa seca na raiz de sorgo forrageiro (Figura 5), porém, não demonstrou efeito no acúmulo de biomassa em sorgo granífero e sacarino (Figura 3 e Figura 6). ALVES (2007) observou que a estirpe Ppe6 se destacou dentre 21 estirpes do mesmo gênero, quanto ao incremento de biomassa no milho BRS - Sol da manhã cultivado em substrato esterilizado.



## 4.2 Experimentos Conduzidos em Condições de Campo

### 4.2.1 Avaliações no experimento com sorgo granífero

O experimento a princípio, foi montado com 4 blocos, no entanto devido às condições relatadas a seguir foi avaliado com somente 3 repetições. Devido ao severo ataque por *Spodoptera frugiperda* J. E. SMITH (lagarta do cartucho) e *Rhopalosiphum maidis* FITCH (pulgão do milho) aos 40 dias, pulverizou-se com extrato de nim comercial na concentração de 1 %, um dos blocos (o mais atacado), e por engano, parte do bloco adjacente (pois no momento do controle não se dispunha de produto para todo o experimento). No entanto, as condições de aplicação do produto ao bloco, que foi realizada no período da tarde (alta temperatura e insolação, além da falta de agitação da calda após um período de repouso devido a falhas mecânicas no pulverizador), pode ter causado algum efeito fito-tóxico ou contribuído de alguma forma na manifestação de algum microrganismo patogênico, uma vez que todo o bloco apresentou o sintoma detalhado na Figura 7, resultando no menor desenvolvimento das plantas, além do aumento no perfilhamento e diminuição no tamanho das panículas, provocando uma menor produtividade no bloco.

Curiosamente, observou-se que os outros experimentos tratados no período da manhã (temperaturas mais baixas, pouca insolação e calda recém preparada), não apresentaram o sintoma detalhado na Figura 7. Para se realizar as avaliações, optou-se por descartar o bloco em que parte foi pulverizada com extrato de nim, e preservar o que foi pulverizado por completo, pois as plantas se recuperaram e aparentemente o bloco permaneceu homogêneo.

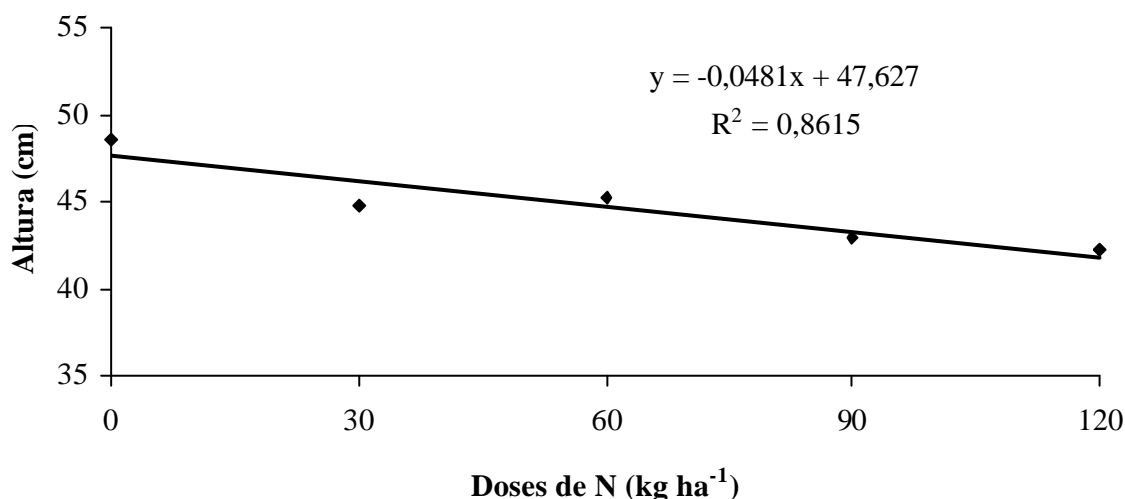


**Figura 7.** Planta de sorgo granífero desmembrada em raiz, colmo e folhas aos 40 dias, exibindo sintoma de podridão mole avermelhada na bainha foliar

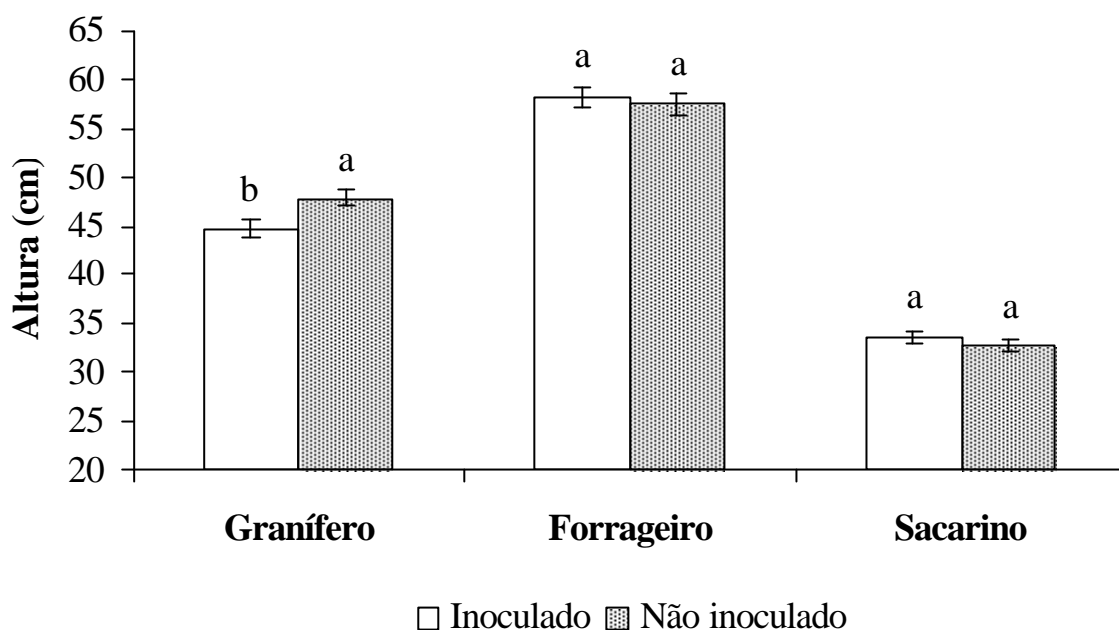
Apesar das condições desfavoráveis como o atraso no plantio e menor produtividade de um dos blocos, o rendimento médio de grãos a 13 % de umidade foi de 5,22 Mg ha<sup>-1</sup>, valor um pouco superior à média observada por SANTOS et al. (2007), em três experimentos na

safrinha usando o mesmo genótipo ( $4,71 \text{ Mg ha}^{-1}$ ), com isso, as respostas produtivas no presente estudo foram coerentes com os resultados já observados para o mesmo genótipo estudado, o que sugere, que o potencial produtivo nas condições das quais o experimento foi realizado, poderia ser maior ainda, sugerindo uma boa adaptação da cultivar a região na época de realização do estudo.

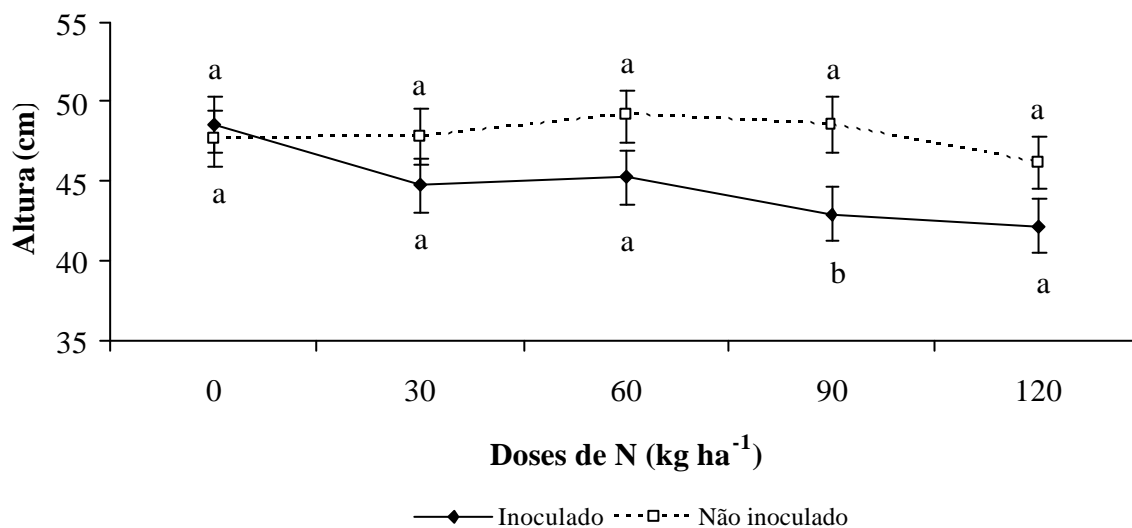
Quanto às avaliações utilizando-se regressão a 5 % para análise dos dados, verificou-se que não houve interação significativa da aplicação de diferentes doses de N e sua interação com o nível de inoculação (presença ou ausência), para os parâmetros avaliados (Anexo V), com exceção da variável altura, que diferiu no fator adubação nos tratamentos inoculados, onde o modelo linear foi o que melhor se ajustou aos dados, com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 86,15 %, o que mostra que altura aos 40 dias diminuiu de acordo com a elevação da dose de nitrogênio quando inoculado (Figura 8). No entanto ao se avaliar o fator nível de inoculação pelo teste F a 5 % de probabilidade, observou-se diferença estatística entre os tratamentos inoculados e não inoculados, porém essa diferença foi de apenas 3 cm (6,5 %), o que na prática é considerada muito pequena (Figura 9). No desdobramento do nível de inoculação dentro das doses, observou-se que a média dos tratamentos inoculados e adubados com  $90 \text{ kg de N ha}^{-1}$ , foi estatisticamente inferior ao não inoculado e adubado com a mesma dose em 11,6 % (Figura 10).



**Figura 8.** Altura após 40 dias da emergência de plantas inoculadas, sob cinco níveis de adubação nitrogenada aplicadas em sorgo granífero. Teste de regressão a 5 % de probabilidade. Médias de 3 repetições



**Figura 9.** Altura média das plantas após 40 dias da emergência em três genótipos de sorgo inoculado ou não com bactérias diazotróficas, médias seguidas de mesma letra em cada genótipo não diferem estatisticamente pelo teste F a 5 %. Médias de 20 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média (+/-). Dados originais Anexo IV



**Figura 10.** Altura após 40 dias da emergência de plantas inoculadas e não inoculadas, sob cinco níveis de adubação nitrogenada aplicada em sorgo granífero. Pontos seguidos de mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste F a 5 %. Médias de 3 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média (+/-). Dados originais Anexo IV.

Embora tenha se observada diferença estatística dentro de dois dos fatores analisados, o parâmetro altura aos 40 dias não pareceu ser relevante a ponto de informar se há ou não contribuição da inoculação, ou se as altas doses de nitrogênio tiveram influência nas respostas

produtivas incitadas pelas bactérias. E independente da dose aplicada, as plantas podem ter acumulado N até a sua capacidade máxima, portanto o nitrogênio presente no solo (0,08 %) foi suficiente para manter boas respostas de forma homogênea na parte aérea.

No presente estudo, não foi quantificado o volume de raízes, que é uma variável bastante influenciada em estudos de inoculação em sorgo com bactérias diazotróficas (PACOVISK, 1990; CHIARINI et al., 1998; IDRIS et al., 2009), além de que, as raízes podem ter tido respostas a inoculação em detrimento da parte aérea. Resultados observados por DIDONET et al. (1996), que estudando a inoculação em trigo, sugeriram que plantas inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum* promoveram um incremento significativo no volume radicular em detrimento da parte aérea.

Para a determinação dos valores médios referentes às estimativas da produção de biomassa de palha e grãos, os dados obtidos, a partir do número de plantas avaliadas nas parcelas experimentais foram extrapolados para a população final contida em um hectare (Anexo IV).

De maneira geral, observou-se que a adubação nitrogenada não teve efeito significativo pelo teste de regressão a 5 %, nos componentes de produção avaliados (Anexo V). O que pode estar ligado às possíveis perdas por volatilização, que podem chegar até a 50 % em condições de déficit hídrico (TRIVELIN et al., 2002), uma vez que, em três dias após a aplicação do adubo em superfície, choveu apenas 2,8 mm. No entanto, verificou-se nos tratamentos não inoculados, embora não significativo pelo teste de regressão a 5 % de probabilidade, uma tendência crescente na produção de biomassa em função do aumento das doses, fato não observado nos tratamentos inoculados, onde se verificou constância das respostas produtivas nas diferentes doses (Figura 11), sendo a produção reduzida na variável biomassa seca de palha na dose mais elevada (Figura 12), o que indica que a contribuição, por parte das bactérias pode ter sido influenciada pela aplicação de altas doses de N, sugerindo uma melhor resposta da inoculação em níveis baixos de N, o que condiz com OLIVEIRA et al. (2006).

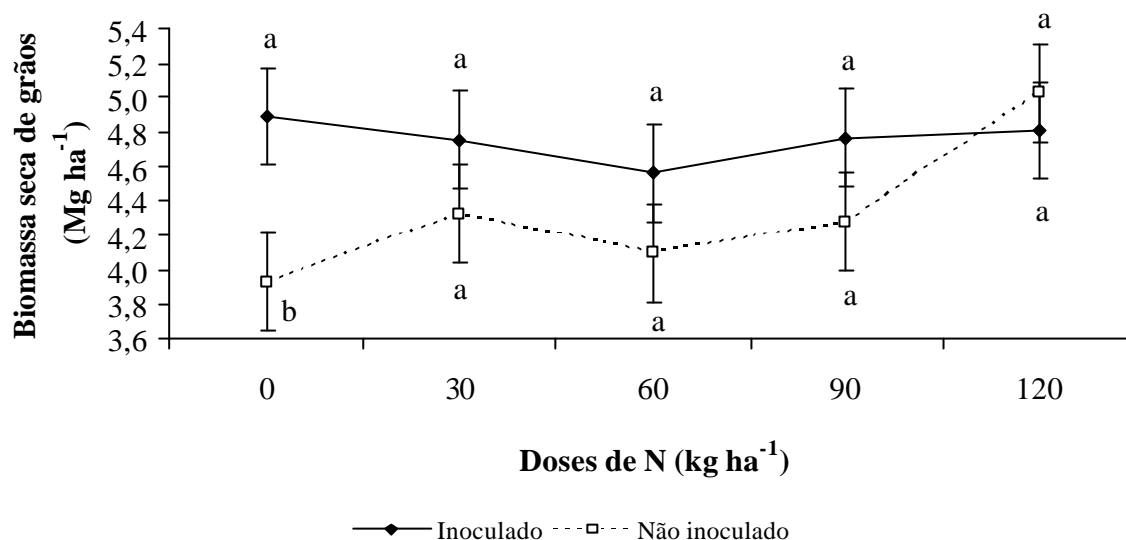
Na variável biomassa seca de palha, observou-se que a média dos tratamentos inoculados adubados com diferentes doses de N foi estatisticamente superior, pelo teste F a 5 %, à média dos tratamentos não inoculados, traduzindo num incremento de 6,2 % (Figura 13).

Ao desdobrar o nível de inoculação (presença e ausência) dentro das doses de N, observou-se diferença estatística pelo mesmo teste, entre as médias dos tratamentos de inoculação e sem, dentro da dose de 30 kg de N ha<sup>-1</sup> (metade da dose recomendada para sorgo), onde a média dos tratamentos inoculados foi de 12,7 % a mais que o não inoculado adubado com a mesma dose (Figura 12). O contrário aconteceu nos tratamentos adubados com a dose de 120 kg de N ha<sup>-1</sup>, onde se observou que a média dos tratamentos inoculados foi 13,3 % menor que a dos inoculados (Figura 12), o que sugere que, as melhores respostas da inoculação no genótipo testado foram verificadas ao se aplicar menores doses de N. Nas demais doses, embora não significativos, observou-se que os valores médios foram superiores nos tratamentos inoculados, variando de 9,4 a 12,8 % de incremento na biomassa seca de palha.

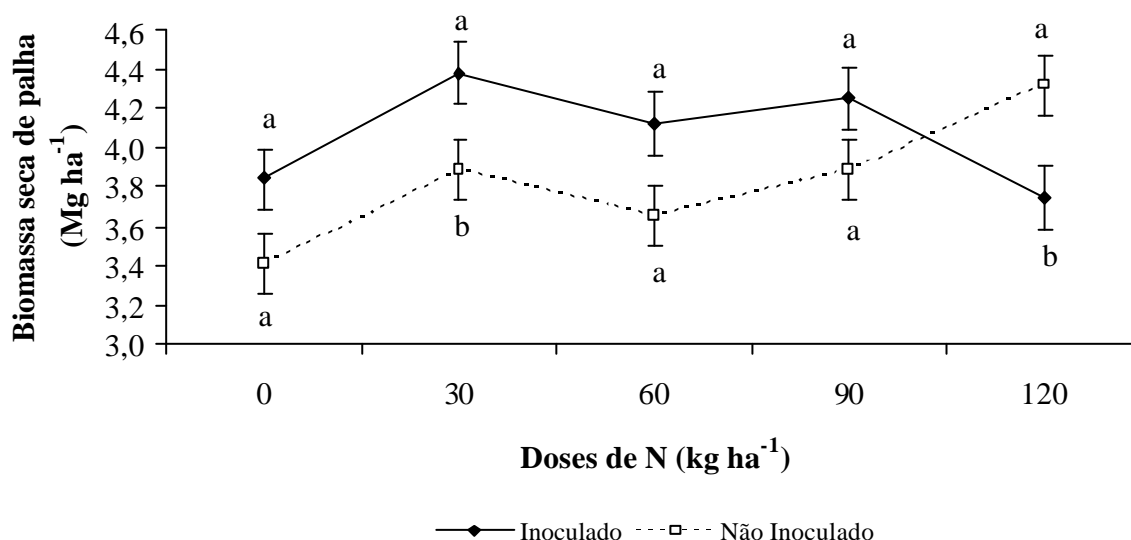
Na variável biomassa seca de grãos, observou-se que o tratamento sem adubação apresentou uma maior amplitude de diferença, mostrando significativamente pelo teste F a 5 %, que a produção de grãos foi maior no tratamento inoculado (Figura 11). Quanto aos incrementos observados, a média dos tratamentos inoculados com vários níveis de adubação nitrogenada, foi de 9,9 % a mais que a média dos tratamentos não inoculados (Figura 13).

No desdobramento do nível de inoculação dentro das doses de N, observou-se diferença estatística entre a média dos tratamentos inoculados não adubados com N, e a média dos tratamentos não inoculados no mesmo nível, resultando em um incremento de 24,6 % na produtividade de grão (Figura 11). Nos demais tratamentos, embora não se tenha observado

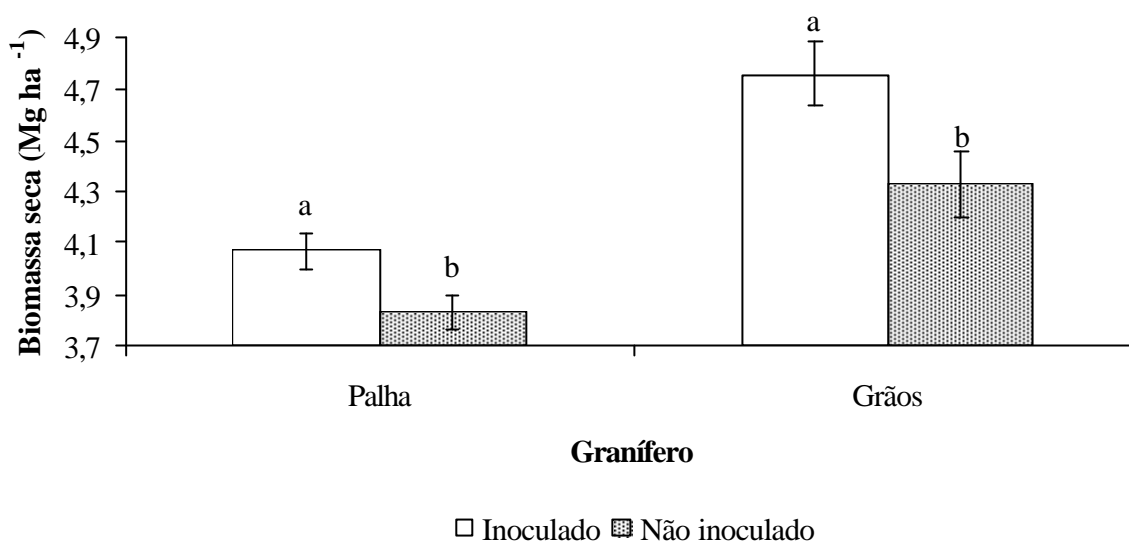
diferença estatística pelo teste F a 5 %, verificou-se que os tratamentos inoculados, nas doses de 30, 60 e 90 kg de N ha<sup>-1</sup> apresentaram médias superiores aos não inoculados, variando de 10,1 a 11,5 % o incremento na biomassa seca de grãos (Figura 11). O tratamento inoculado na dose de 120 kg, embora também não significativo, apresentou valor médio 4,6 % menor que o não inoculado.



**Figura 11.** Produtividade média de biomassa seca de grãos em plantas inoculadas e não inoculadas, sob cinco níveis de adubação nitrogenada aplicada em sorgo granífero. Pontos seguidos de mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste F a 5 %. Médias de 3 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média (+/-). Dados originais Anexo IV.



**Figura 12.** Produtividade média de biomassa seca de palha em plantas inoculadas e não inoculadas, sob cinco níveis de adubação nitrogenada aplicada em sorgo granífero. Pontos seguidos de mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste F a 5 %. Médias de 3 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média (+/-). Dados originais Anexo IV.



**Figura 13.** Produtividade média de biomassa seca de sorgo granífero inoculado e não inoculado. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste F a 5 %. Médias de 15 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média (+/-). Dados originais Anexo IV.

De modo geral, uma maior produção de biomassa seca de palha e grãos foi observada nos tratamentos inoculados (Figura 13), e isto pode ter sido devido a FBN, ou mesmo ao possível efeito promotor de crescimento realizado pelas bactérias, que pode ter incrementado as raízes, contribuindo com o aumento da absorção de água e nutrientes, especialmente do nitrogênio. Com o possível aumento do volume radicular, maior superfície específica de solo foi explorada, e quando a planta se encontrava na sua fase plena de absorção. As quantidades extraídas de acordo com a disponibilidade no solo foram maiores, resultando num maior incremento de produção. Sendo que as respostas das plantas às bactérias utilizadas podem ter sido influenciadas pelas altas doses de N.

Em estudos com cana-de-açúcar constatou-se que altas doses de N não influenciaram a contribuição da espécie *Herbaspirillum seropedicae* (REIS JUNIOR et al., 2000; SUMAN et al., 2008), em contraste, OLIVEIRA et al. (2006) observaram que a contribuição com a FBN foi maior em solos com baixa disponibilidade de N ao testarem uma mistura de espécies, com conhecidas diferenças na dinâmica de colonização e estabelecimento endofítico (BALDANI, 1996b; JAMES et al., 1997; CHIARINI et al., 1998), mas não se pôde prever qual espécie foi a responsável pelo possível benefício, e nem o mecanismo responsável pela contribuição.

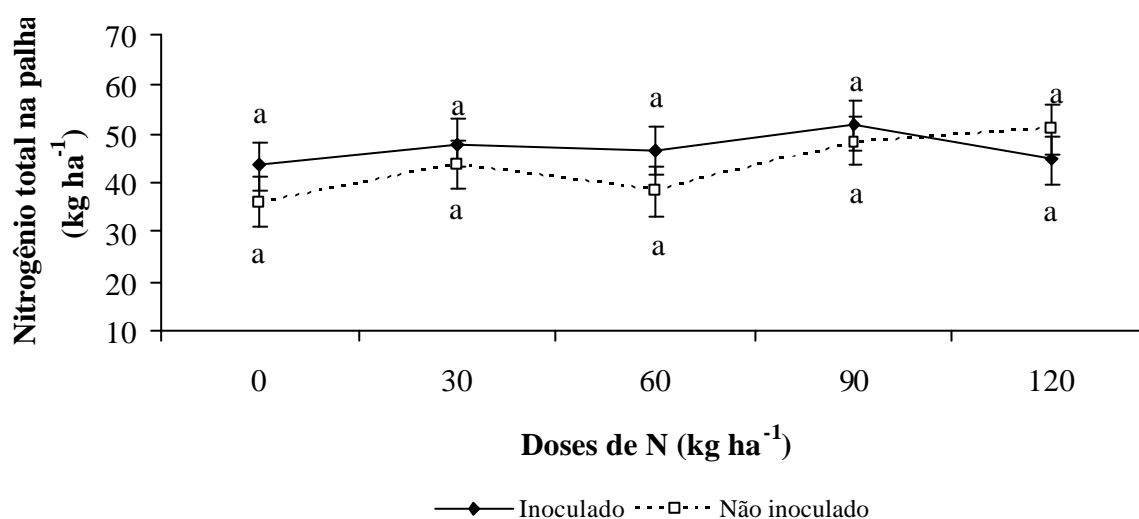
Em relação à porcentagem de N acumulada na palha e nos grãos, verificou-se que mesmo após a transformação dos dados, os mesmos não atenderam aos pressupostos da estatística paramétrica, por não apresentarem distribuição normal dos dados mediante o teste de aderência, Lilliefors, bem como a homogeneidade entre as variâncias dos erros amostrais por meio do teste de Cochran, inviabilizando assim a realização da análise de regressão dos dados apresentados no Anexo IV. Porém, observou-se uma tendência crescente no percentual de N acumulado de acordo com o aumento da dose (Anexo IV), sugerindo que o genótipo foi capaz de absorver N de acordo com a disponibilidade no solo.

Nas variáveis referentes ao acúmulo de N nos grãos e palha, verificou-se que não houve interação significativa da aplicação de diferentes doses de N (Anexo V), nem da sua interação com o nível de inoculação através do teste de regressão a 5 % de probabilidade, o que sugere que, o nitrogênio aplicado pode ter sido pouco aproveitado pela cultura, por condições inerentes ao déficit hídrico após a aplicação superficial, não sendo o N fator

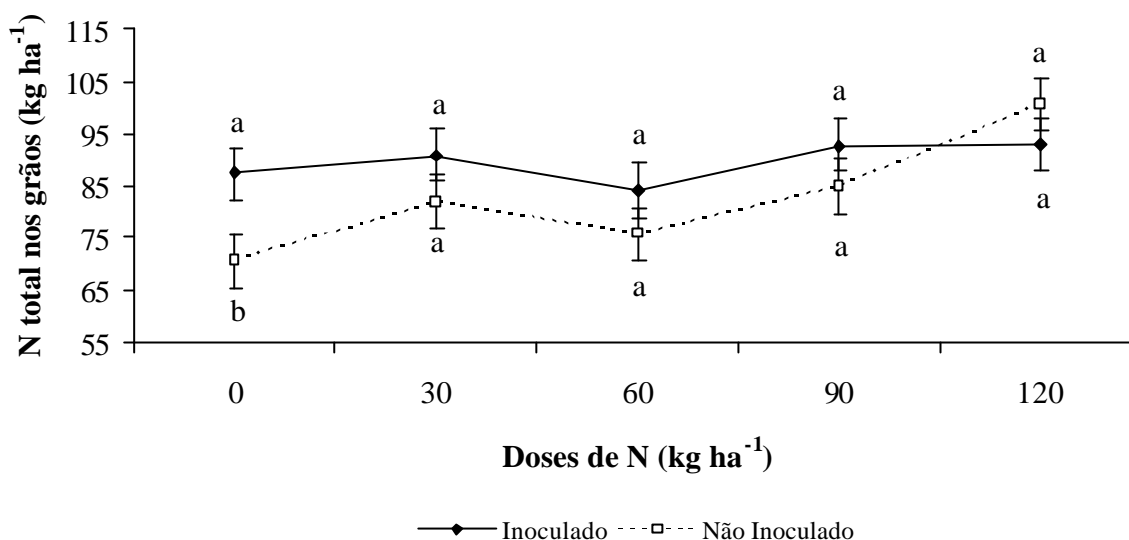
limitante na produção de biomassa. De acordo com GOVINDARAJAN et al. (2006), a FBN só se procede efetivamente em ambientes onde o nitrogênio é fator limitante, o que reforça a idéia de que a contribuição observada tenha sido devido a outros mecanismos.

Embora não significativo, verificou-se uma tendência dos tratamentos inoculados apresentarem níveis mais elevados de N que os sem inoculação nas menores doses. No tratamento inoculado sem a adubação, observou-se superioridade através do teste F a 5 % ao não inoculado (Figura 14 e Figura 15), indicando que o aumento verificado nos tratamentos inoculados pode ter sido devido às contribuições das bactérias com a FBN, ou aumento da eficiência de absorção de N, e/ou da eficiência de utilização do fertilizante pela planta, e que os maiores níveis de N interferiram negativamente nos possíveis benefícios da inoculação.

De maneira geral, foi observado que, o sorgo granífero inoculado apresentou no nível de 60 kg de N ha<sup>-1</sup> (dose usualmente utilizada por produtores de sorgo), um incremento de 12,8 %, incremento este ainda menor que o observado quando não se adubou e inoculou (24,6 %). No entanto, há a necessidade de se ressaltar que estes valores de incremento podem ter sido em função das condições do estudo, pois, é possível que alguns pontos da área apresentassem reservas naturais de N ou mesmo fertilizações residuais do cultivo anterior, que seriam possíveis, pois a área disponibilizada para o estudo, freqüentemente é utilizada em plantios experimentais. Nestas condições, o mais viável seria não adubar e inocular, contudo, não se pode generalizar.



**Figura 14.** Nitrogênio total na biomassa seca de palha em plantas inoculadas e não inoculadas, sob cinco níveis de adubação nitrogenada aplicada em sorgo granífero. Pontos seguidos de mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste F a 5 %. Médias de 3 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média (+/-). Dados originais Anexo IV.



**Figura 15.** Nitrogênio total na biomassa seca de grãos em plantas inoculadas e não inoculadas, sob cinco níveis de adubação nitrogenada aplicada em sorgo granífero. Pontos seguidos de mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste F a 5 %. Médias de 3 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média (+/-). Dados originais Anexo IV.

#### 4.2.2 Avaliações no experimento com sorgo forrageiro

De maneira geral, o rendimento médio de biomassa seca total observado foi de 8,56 Mg ha<sup>-1</sup>, valor este correspondente a praticamente a metade do potencial produtivo desta cultivar (RODRIGUES et al., 2008).

A baixa produtividade observada pode ser atribuída em parte, ao atraso no plantio, que foi realizado quase dois meses após a época recomendada para plantios safrinha (SANS et al., 2003), com isso, fatores como baixas temperaturas e baixa radiação solar, podem ter influenciado negativamente a produtividade do sorgo forrageiro. Além do que, a referida cultivar é recomendada para plantio no verão, para a finalidade de produção de silagem, podendo ser utilizada na forma de pastagem ou capineira no inverno. Foi observado ainda, que 53 % da biomassa total foram correspondentes ao peso de grãos, sendo que normalmente se observam de 30 a 40 % para essa cultivar. Outra observação foi que o porte das plantas na colheita foi em média 1,74 m, enquanto no verão chega a 2,5 m (RODRIGUES et al., 2008).

A partir destas observações, para a referida época (fora da estação), verificou-se que, não foi vantajoso o plantio da cultivar BRS 655 para a finalidade de uso como forrageira na região, mas sim como produtora de grãos.

Quanto às avaliações realizadas com o experimento, utilizando-se regressão a 5 % para análise dos dados, verificou-se que não houve interação significativa da aplicação de diferentes doses de N, e sua interação com o nível de inoculação (presença e ausência), para os parâmetros produtivos avaliados (Anexo V), que também não diferiram estatisticamente dentro dos fatores nível de inoculação e interação com a dose de N aplicada, exceto para o N total acumulado na biomassa, que foi influenciado pela dose de N aplicada. Na variável altura aos 40 dias, ao se avaliar o fator nível de inoculação pelo teste F a 5 % de probabilidade, não se observou diferença estatística entre os tratamentos inoculados e não inoculados, sendo que os valores médios observados foram bastante próximos (Figura 9).

Quando desdobrado o fator inoculação dentro da dose de 60 kg de N ha<sup>-1</sup>, observou-se um aumento significativo de 7,8 % na média da altura nos tratamentos inoculados (Figura 16).

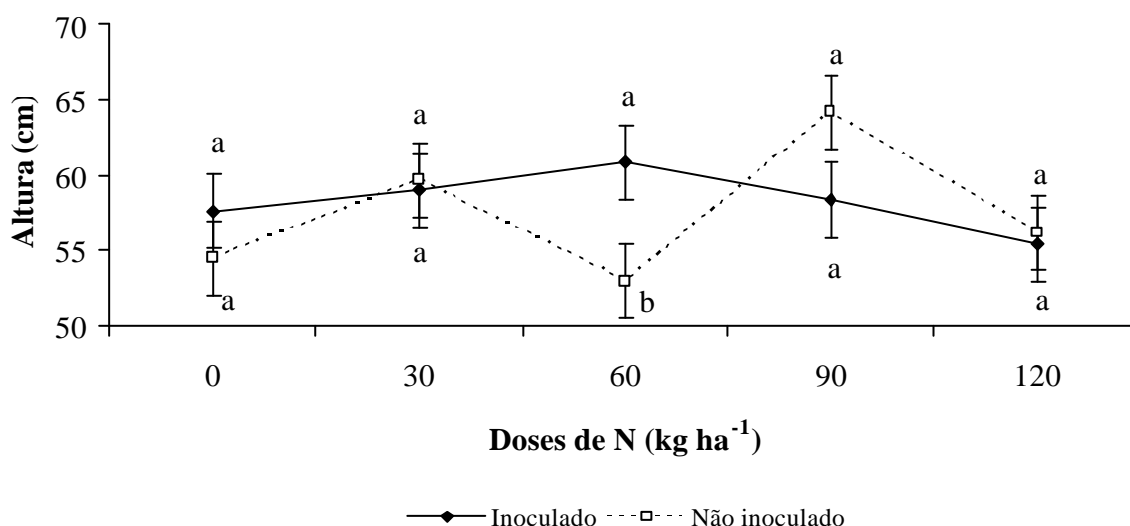


Embora não significativo estatisticamente, observou-se que sem a aplicação de N, a média da altura foi um pouco maior nos tratamentos inoculados (5,6 %), já nos demais níveis de adubação, os valores médios variaram de 1,2 a 9,1 % a menos que nos tratamentos não inoculados (Figura 16). Contudo, as diferenças observadas não pareceram ser relevante a ponto de ser atribuído à inoculação, em função das condições explicadas nos resultados do experimento com sorgo granífero no item 4.2.1.

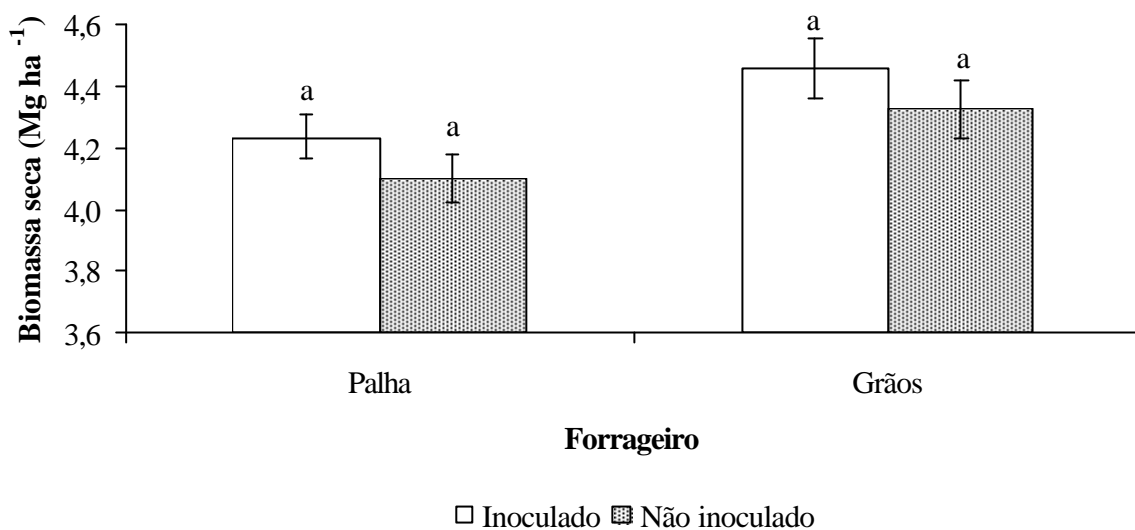
Na variável biomassa seca de palha, embora não significativo pelo teste F a 5 %, constatou-se um aumento de 3,2 % na média dos tratamentos inoculados nas diferentes doses (Figura 17). Desdobrando o fator inoculação dentro das diferentes doses, observou-se nos tratamentos inoculados não adubados com N, um aumento não significativo estatisticamente de 13,1 % na biomassa seca de palha; 4 % nos adubados com 60 kg de N ha<sup>-1</sup>; e 5,8 % nos adubados com a dose 90 kg de N ha<sup>-1</sup> (Figura 18), mas demais doses, os tratamentos não inoculados apresentaram valores médios maiores que os inoculados, 2,1 e 2,3 % nas doses de 30 e 120 kg de N ha<sup>-1</sup> respectivamente.

No entanto, a maior amplitude de resposta no tratamento inoculado e não adubado, na prática, não se mostrou vantajosa, uma vez que, independente do nível de inoculação, a produção foi menor em relação aos tratamentos adubados. Com isso, o genótipo forrageiro, mostrou-se mais responsivo quanto à aplicação de N, diferente do genótipo granífero, que em relação a este, aparentemente teve a capacidade de absorver N de forma mais eficiente.

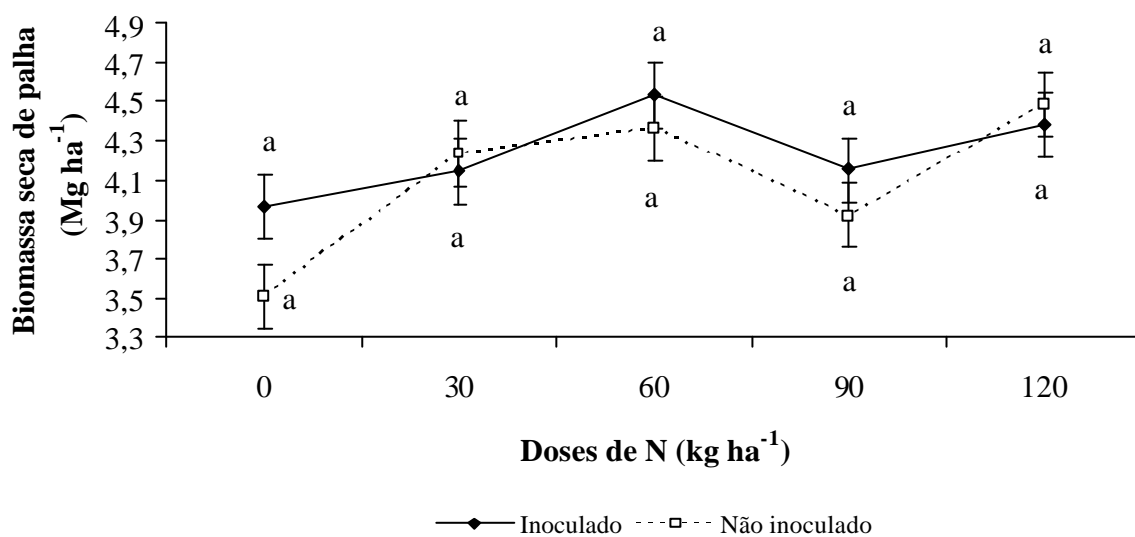
Analisando a variável biomassa seca de grãos, verificou-se que o valor médio dos tratamentos inoculados adubados com diferentes doses, embora não significativo, apresentou maior valor médio, 3 % a mais que o tratamento não inoculado (Figura 17). Desdobrando o fator inoculação dentro das diferentes doses, verificou-se que o incremento médio dos tratamentos inoculados não adubados com N, foi de 7,8 % a mais que o não inoculado. Nas doses de 60, 90 e 120 kg de N ha<sup>-1</sup>, os tratamentos inoculados apresentaram 1,4; 5,9; e 7 % a mais que o controle respectivamente. Na dose de 30 kg, o tratamento inoculado apresentou valor médio inferior ao não inoculado (Figura 19).



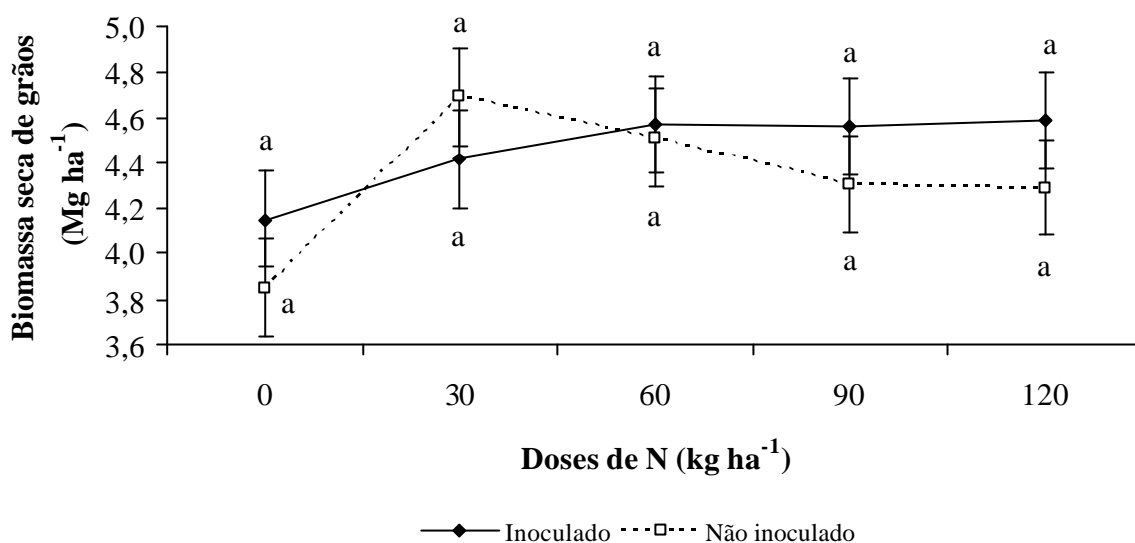
**Figura 16.** Altura após 40 dias da emergência de plantas inoculadas e não inoculadas, sob cinco níveis de adubação nitrogenada aplicada em sorgo forrageiro. Pontos seguidos de mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste F a 5 %. Médias de 3 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média (+/-). Dados originais Anexo IV.



**Figura 17.** Produtividade média de biomassa seca de sorgo forrageiro inoculado e não inoculado. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste F a 5 %. Médias de 20 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média (+/-). Dados originais Anexo IV.



**Figura 18.** Produtividade média de biomassa seca de palha em plantas inoculadas e não inoculadas, sob cinco níveis de adubação nitrogenada aplicada em sorgo forrageiro. Pontos seguidos de mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste F a 5 %. Médias de 3 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média (+/-). Dados originais Anexo IV.



**Figura 19.** Produtividade média de biomassa seca de grãos em plantas inoculadas e não inoculadas, sob cinco níveis de adubação nitrogenada aplicada em sorgo forrageiro. Pontos seguidos de mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste F a 5 %. Médias de 3 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média (+/-). Dados originais Anexo IV.

Em relação à porcentagem de N acumulada na palha e nos grãos, mais uma vez observou-se que mesmo após a transformação dos dados, os mesmos não atenderam aos pressupostos da estatística paramétrica, inviabilizando assim a realização da análise de regressão dos dados descritos no Anexo IV. No entanto, uma tendência crescente no percentual de N acumulado foi observada com o aumento do nível de adubação nitrogenada, sugerindo que o genótipo foi capaz de absorver N de acordo com a disponibilidade no solo.

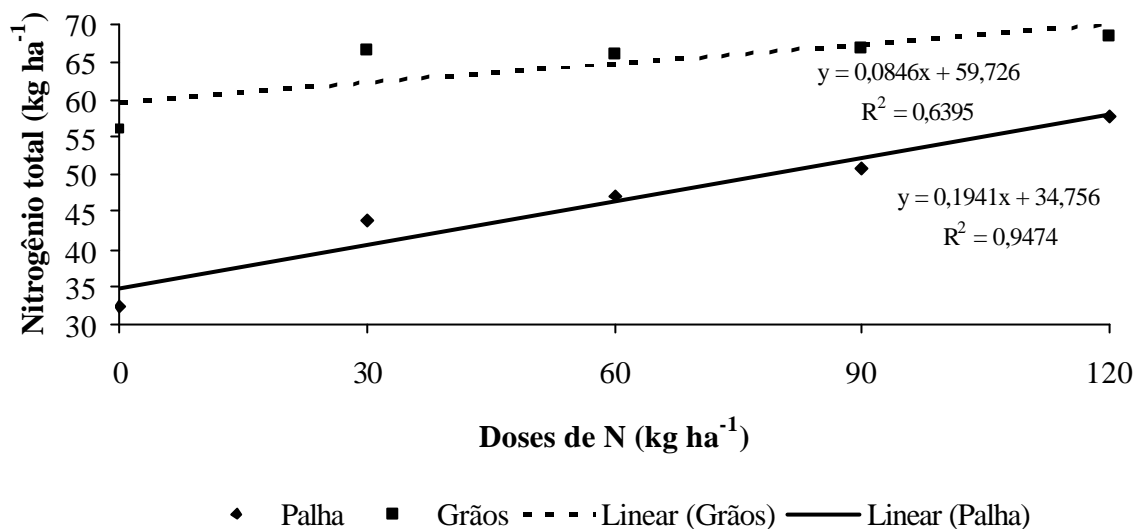
Na variável N total na palha e grãos, utilizando-se regressão a 5 % para análise dos dados, verificou-se interação significativa da aplicação de diferentes doses de N, e sua interação com o nível de inoculação, sendo o modelo linear o que melhor se ajustou aos dados, com coeficientes de determinação ( $R^2$ ) de 94,74 % para N total na parte aérea, e de 63,95 % para N total nos grãos (Figura 20), o que evidenciou que o incremento de nitrogênio foi maior com o aumento da dose, independente do nível de inoculação nas variáveis analisadas (Figura 21 e Figura 22).

Já, quando comparadas as médias dentro dos níveis de inoculação e interação com a dose de N aplicada, não se constatou diferença estatística entre as médias pelo teste F a 5 %, além de não se verificar tendência no acúmulo de N nos tratamentos inoculados nos fatores estudados (Figura 23 e Figura 24), evidenciando que, a inoculação não contribuiu para o aumento da produção, sendo as diferentes respostas observadas devido à aplicação das doses de N.

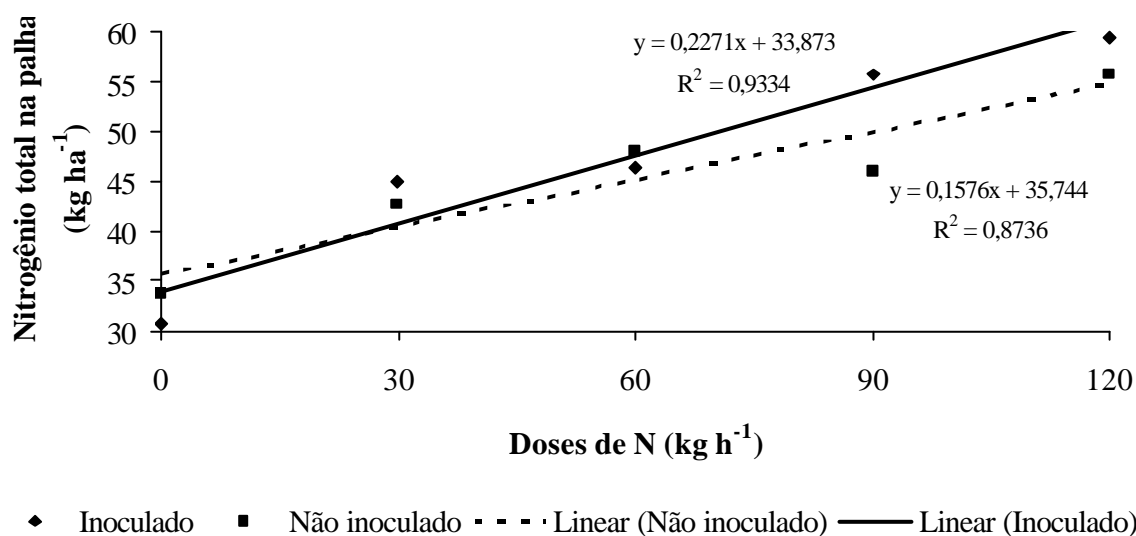
Diferente do experimento conduzido com sorgo granífero, este com forrageiro não demonstrou estatisticamente que o genótipo é beneficiado pela inoculação com as bactérias diazotróficas testadas, não parecendo ser um genótipo promissor para estudos com as mesmas.

Respostas diferenciadas em função do genótipo botânico são comuns em estudos deste tipo com gramíneas (OLIVEIRA et al., 2006; MONTAÑEZ et al., 2009). ALVES (2007), estudando a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes doses de N, em alguns genótipos de milho percebeu respostas produtivas contrastantes entre alguns genótipos, dentre eles as cultivares BRS 106 e BR 1030, que nos menores níveis de N (0 e 40 kg ha<sup>-1</sup>),

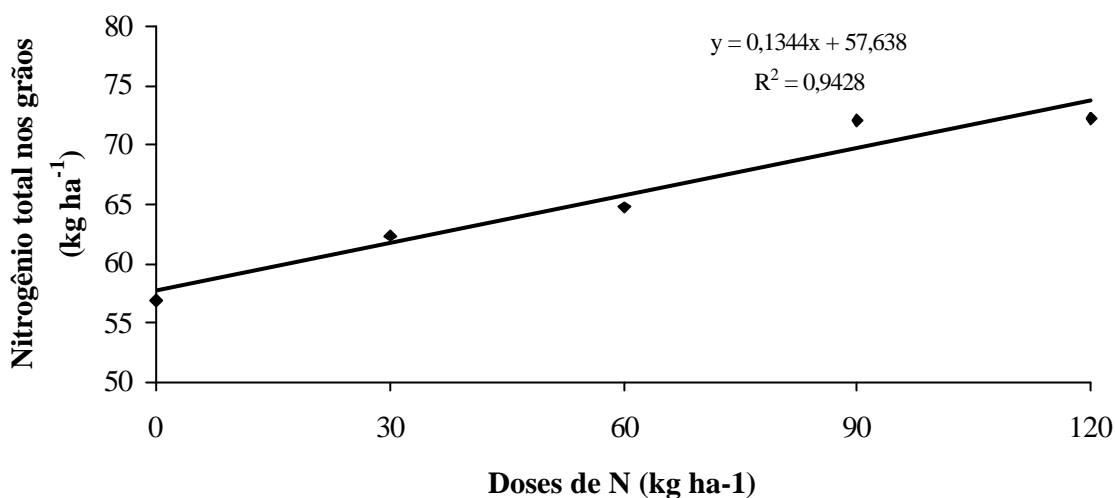
mostraram respostas negativas para a cultivar BRS 106 enquanto para a BR 1030 os incrementos foram de 500 e 850 kg de grãos por hectare nas respectivas doses sob inoculação.



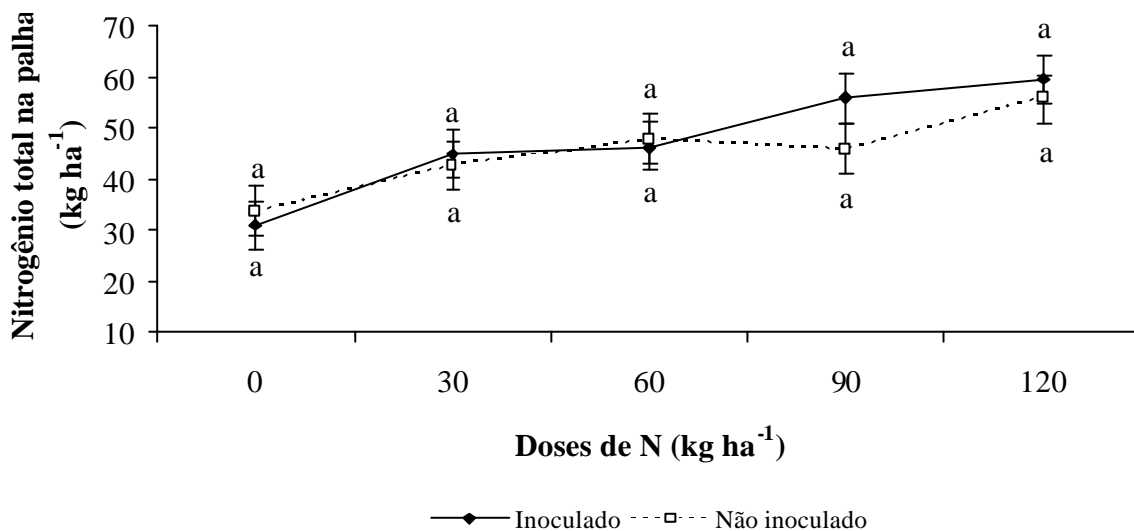
**Figura 20.** Nitrogênio total na palha e grãos de plantas de sorgo forrageiro, submetidos a cinco níveis de adubação nitrogenada. Médias de 8 repetições. Teste de regressão a 5 % de probabilidade.



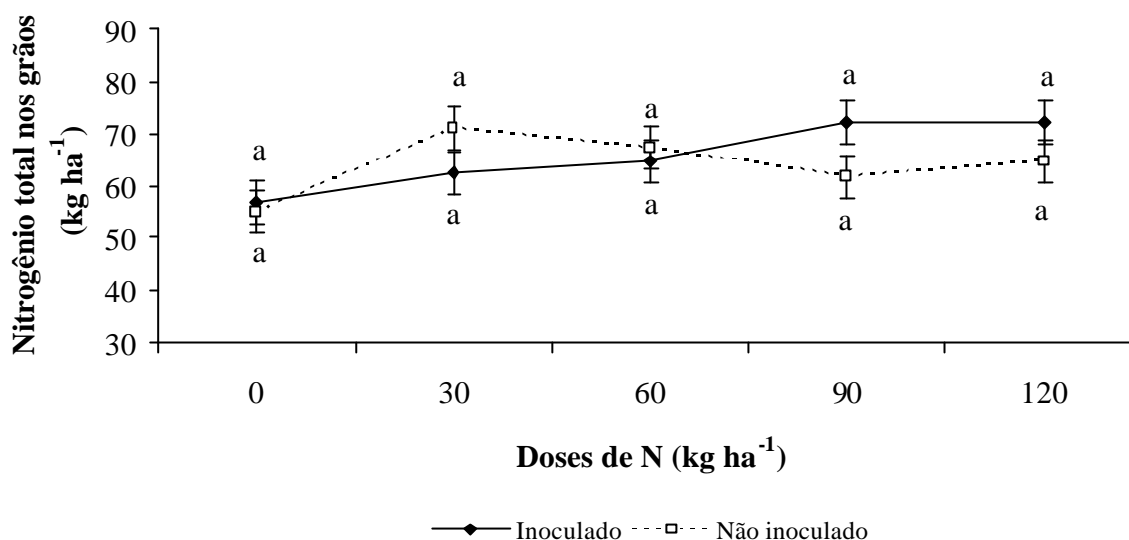
**Figura 21.** Nitrogênio total na palha de plantas inoculadas ou não, sob cinco níveis de adubação nitrogenada aplicadas em sorgo forrageiro. Médias de 4 repetições. Teste de regressão a 5 % de probabilidade.



**Figura 22.** Nitrogênio total nos grãos de plantas inoculadas, sob cinco níveis de adubação nitrogenada aplicadas em sorgo forrageiro. Médias de 4 repetições. Teste de regressão a 5 % de probabilidade.



**Figura 23.** Nitrogênio total na biomassa seca de palha em plantas inoculadas e não inoculadas, sob cinco níveis de adubação nitrogenada aplicada em sorgo forrageiro. Pontos seguidos de mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste F a 5 %. Médias de 3 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média (+/-). Dados originais Anexo IV.



**Figura 24.** Nitrogênio total na biomassa seca de grãos em plantas inoculadas e não inoculadas, sob cinco níveis de adubação nitrogenada aplicada em sorgo forrageiro. Pontos seguidos de mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste F a 5 %. Médias de 3 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média (+/-). Dados originais Anexo IV.

#### 4.2.3 Avaliações no experimento com sorgo sacarino

Na tentativa de transformar os dados de biomassa seca obtidos na colheita, em biomassa fresca no estágio de grão pastoso, com mera finalidade comparativa, foram realizados cálculos, a partir da informação de que os grãos de sorgo neste estágio apresenta em média 26,72 % de matéria seca, compilado de OLIVEIRA et al. (2005). O valor observado foi bastante baixo no presente estudo (6,33 Mg), enquanto XIMENES et al. (1988) estudando também a cultivar BR 501, observaram rendimento médio de biomassa fresca de 34,38 Mg ha<sup>-1</sup>.

A baixa produtividade pode ter sido devido às condições climáticas desfavoráveis citadas anteriormente; ao alto índice da doença denominada Helminthosporiose (*Exserohilum turcicum*), observada em todas as unidades experimentais; ao valor de pH (4,8), observado na amostra de terra coletada na área (Anexo I), que não é adequado para áreas cultivadas com sorgo, que apresenta melhor desenvolvimento em solos com pH variando de 5,5 a 6,5 (LANDAU & SANS, 2008); além de que, a cultivar BR 501 apresenta como característica a sensibilidade ao fotoperíodo, portanto o cultivo deve ser realizado na época correta (verão). Estes fatores somados podem ter sido os responsáveis pela baixa produtividade do sorgo sacarino nas condições de implantação do experimento.

Quanto às avaliações feitas a partir dos dados obtidos com o experimento, utilizando-se regressão a 5 % para análise dos dados, verificou-se que não houve interação significativa da aplicação de diferentes doses de N e sua interação com o nível de inoculação (presença e ausência), para todos os componentes de produção avaliados (Anexo V), que também não diferiram estatisticamente dentro dos fatores nível de inoculação e interação com a dose de N aplicada pelo teste F a 5 %. Onde se verificou que nos tratamentos com a ausência de N, a produção de palha foi aproximadamente 8 % a mais que na dose de 60 kg ha<sup>-1</sup> (dose recomendada para a cultura) (Figura 25), o que indica que o nitrogênio não foi fator limitante na área de estudo.

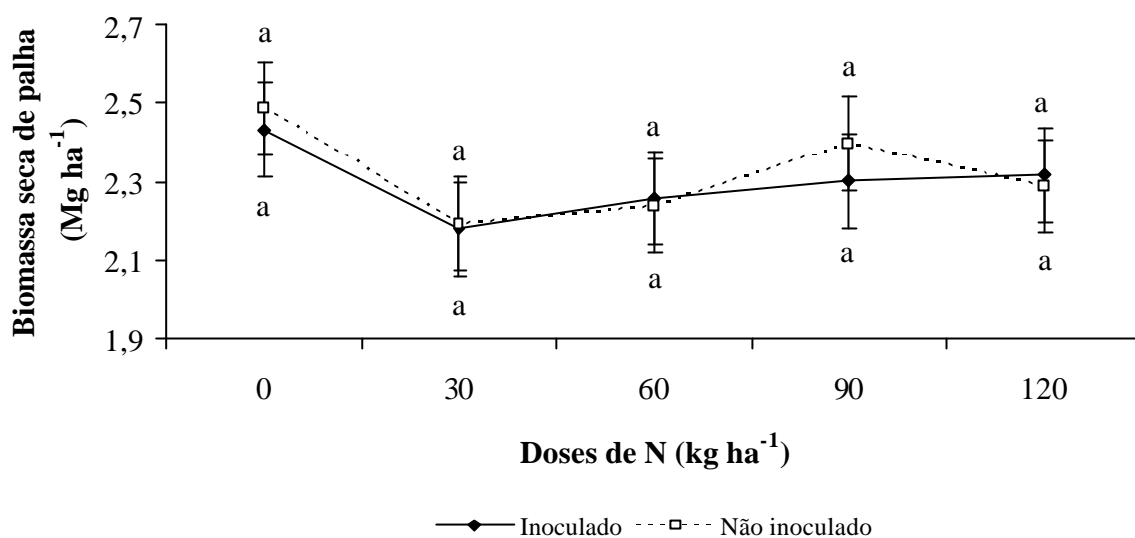
Avaliando o fator inoculação pelo teste F a 5 % de probabilidade, verificou-se que a inoculação não interferiu na altura aos 40 dias, os valores médios observados nos tratamentos inoculados e não inoculados foram bastante semelhantes, fato também observado no desdobramento do nível de inoculação dentro das doses de N (Figura 9 e Figura 26). Quanto à variável biomassa seca de palha, também não se observou diferença significativa dentro e entre os fatores estudados, porém, verificou-se valor médio de peso seco de palha 1 % menor nos tratamentos inoculados (Figura 27). No desdobramento do nível de inoculação dentro das doses, observou-se decréscimo não significativo de 2,2; 0,8 e 3,9 % nas doses de 0, 30 e 90 kg de N ha<sup>-1</sup> respectivamente e, acréscimo de 1 % na dose de 60 kg de N ha<sup>-1</sup> e 1,2 % na dose de 120 kg de N ha<sup>-1</sup> (Figura 25).

No parâmetro biomassa seca de grãos, as análises estatísticas foram realizadas com os dados transformados em logaritmo, uma vez que as variâncias dos tratamentos, comparadas pelo teste de Cochran mostraram-se heterogêneas.

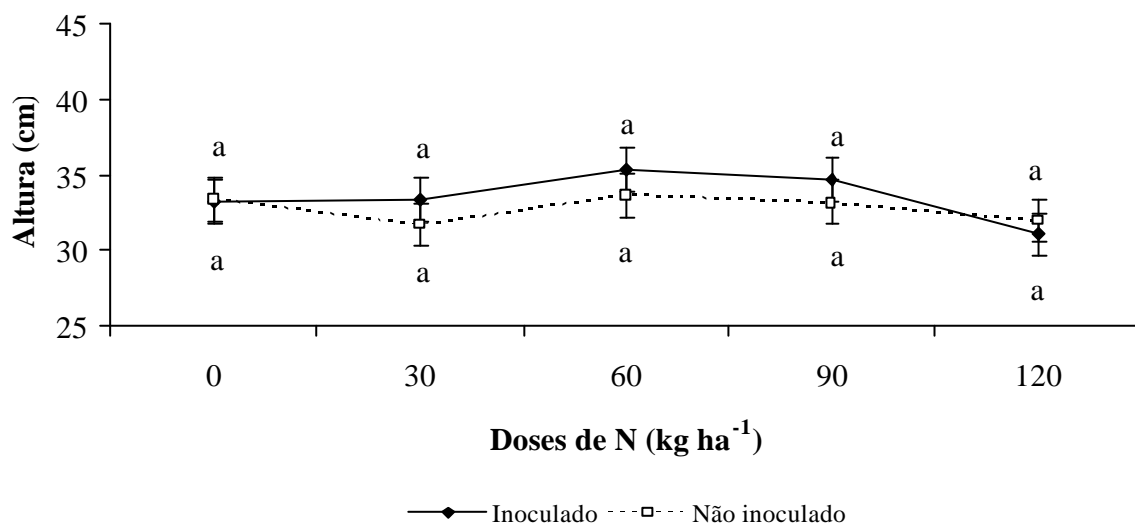
As médias dos tratamentos inoculados e não inoculados nas diferentes doses de N, apresentaram praticamente os mesmos valores de médias (Figura 27). No desdobramento do nível de inoculação dentro das doses de N, não se observou diferença estatística pelo teste F a 5 %, no entanto, o tratamento inoculado adubado com 120 kg de N ha<sup>-1</sup> apresentou incremento de 0,7 % na produtividade de grãos, em contrapartida, o tratamento inoculado adubado com 30 kg de N ha<sup>-1</sup> apresentou decréscimo de 5,2 % de grãos (Figura 28).

Em relação à porcentagem de N acumulada na palha e nos grãos, mais uma vez, observou-se que mesmo após a transformação dos dados, os mesmos não atenderam aos pressupostos da estatística paramétrica, inviabilizando assim a realização da análise de regressão dos dados descritos no Anexo IV. No entanto, não se observou tendência crescente no acúmulo percentual de N, com o aumento do nível de adubação nitrogenada, sugerindo que, o genótipo foi eficiente em absorver N, independente da disponibilidade no solo (0,106 % de N), alcançando a sua máxima capacidade de absorção, com este teor disponível naturalmente no solo. E, quando estimada a quantidade total de N na biomassa seca de palha e grãos, verificou-se que o comportamento foi o mesmo para todos os níveis de N aplicados (Anexo V).

Observou-se ainda, que foi indiferente proceder a inoculação ou não (Figura 29 e Figura 30), com isso, o genótipo avaliado pode não ter estabelecido relação positiva com as bactérias diazotróficas testadas. E, a provável causa disto, pode estar ligada a ineficiência na escolha das estirpes para este genótipo, uma vez que, as bactérias utilizadas no inoculante, com exceção da estirpe 16 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, não contribuíram no incremento de biomassa em condições de substrato esterilizado no genótipo em questão, e só foram testadas no campo em função do fato relatado no item 4.1. Este genótipo poderia ter tido melhores respostas se fosse inoculado também com a estirpe ZAE 94 (BR11417), que demonstrou ser a que mais contribuiu com o sorgo sacarino na fase anterior, tendo também destaque em outros experimentos com, arroz e milho (ALVES, 2007; GUIMARÃES et al. 2007).

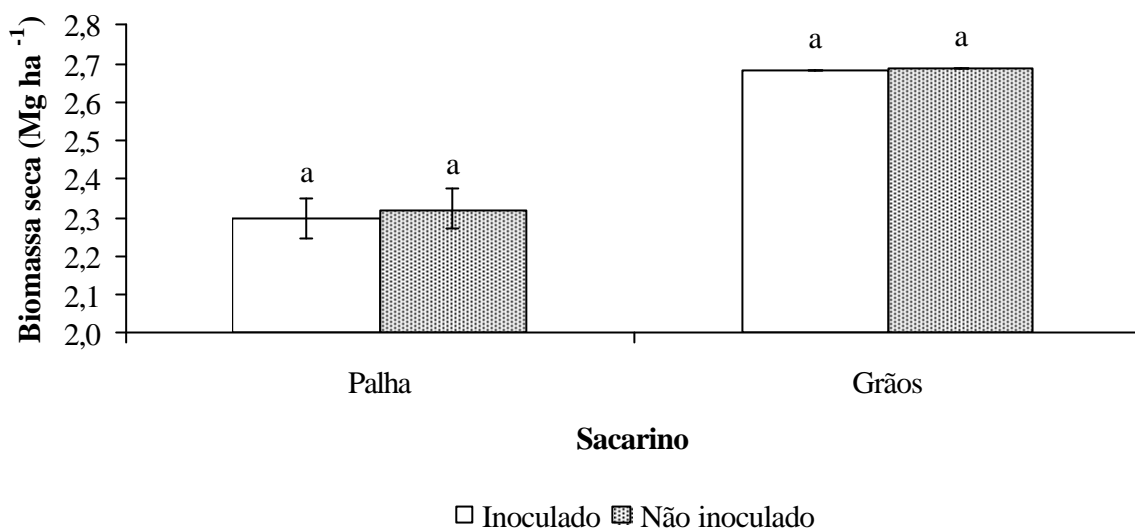


**Figura 25.** Produtividade média de biomassa seca de palha em plantas inoculadas e não inoculadas, sob cinco níveis de adubação nitrogenada aplicada em sorgo sacarino. Pontos seguidos de mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste F a 5 %. Médias de 4 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média (+/-). Dados originais Anexo IV.

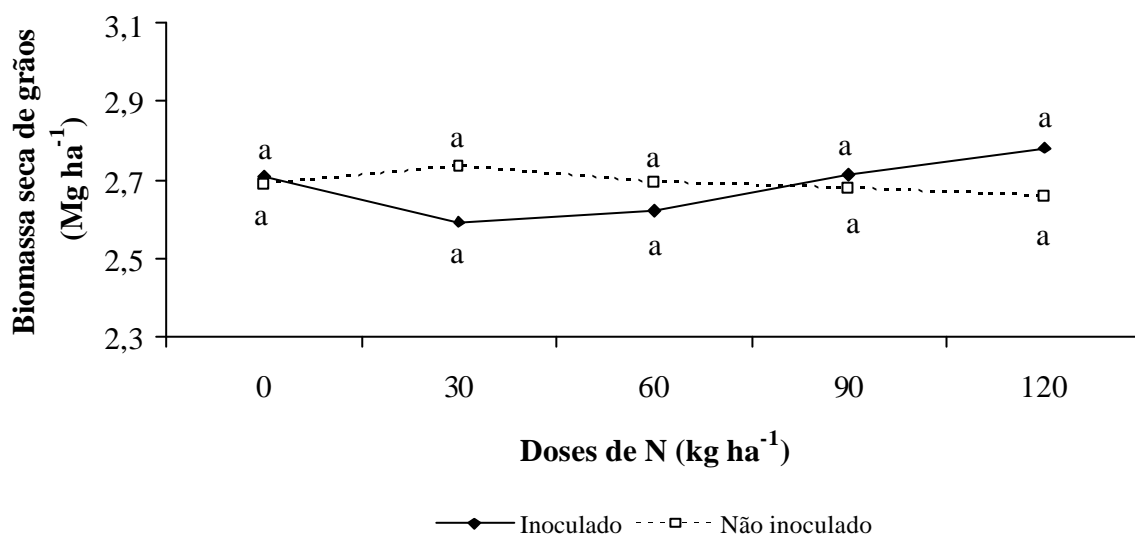


**Figura 26.** Altura após 40 dias da emergência de plantas inoculadas e não inoculadas, sob cinco níveis de adubação nitrogenada aplicada em sorgo sacarino. Pontos seguidos de mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste F a 5 %. Médias de 4 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média (+/-). Dados originais Anexo IV.

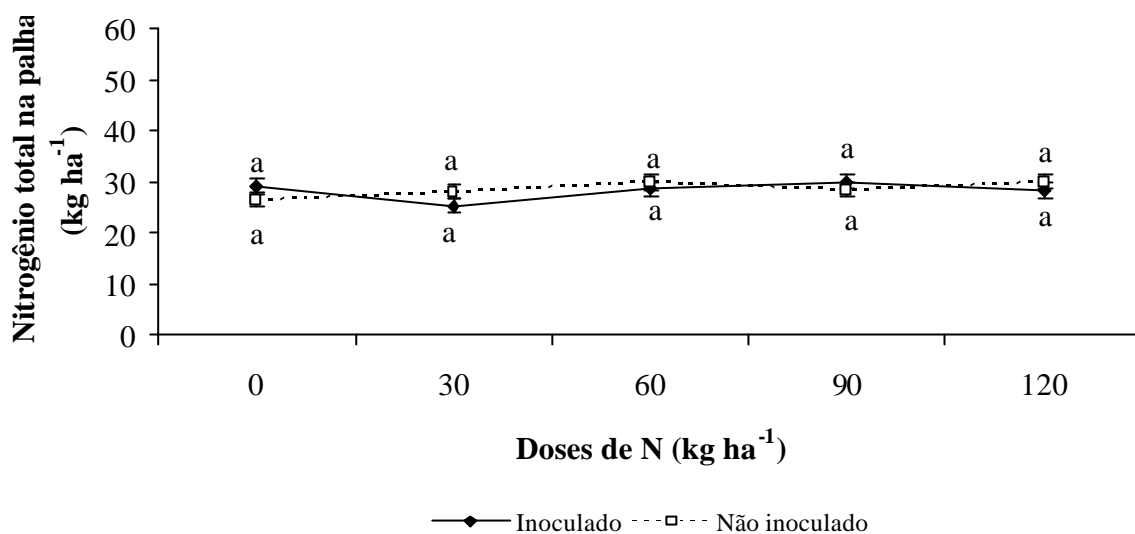




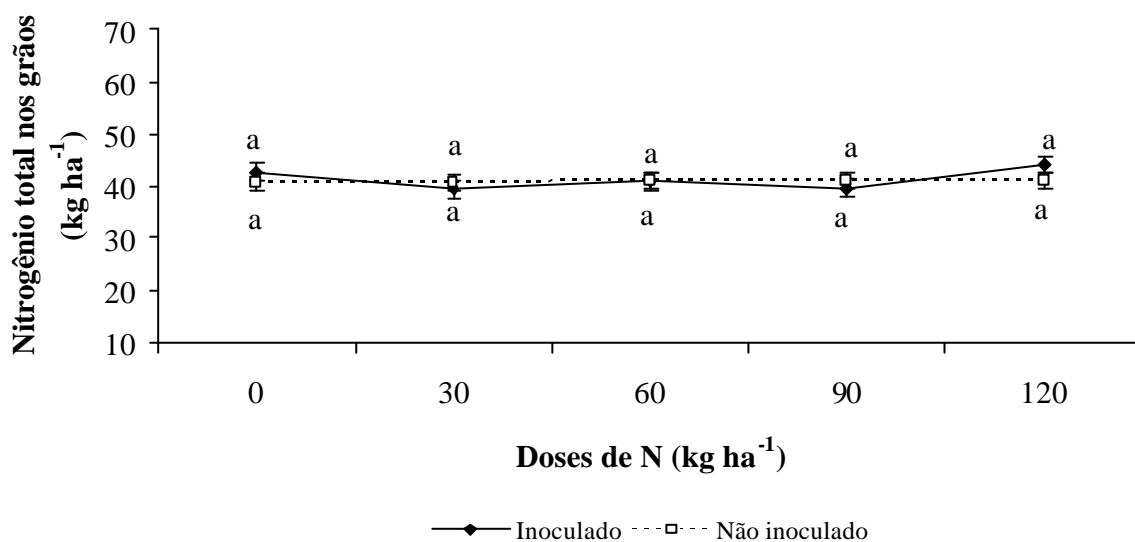
**Figura 27.** Produtividade média de biomassa seca de sorgo sacarino inoculado e não inoculado. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste F a 5 %. Médias de 20 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média (+/-). Dados originais Anexo IV.



**Figura 28.** Produtividade média de biomassa seca de grãos em plantas inoculadas e não inoculadas, sob cinco níveis de adubação nitrogenada aplicada em sorgo sacarino. Pontos seguidos de mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste F a 5 %. Médias de 4 repetições. Dados originais Anexo IV.



**Figura 29.** Nitrogênio total na biomassa seca de palha em plantas inoculadas e não inoculadas, sob cinco níveis de adubação nitrogenada aplicada em sorgo sacarino. Pontos seguidos de mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste F a 5 %. Médias de 4 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média (+/-). Dados originais Anexo IV.



**Figura 30.** Nitrogênio total na biomassa seca de grãos em plantas inoculadas e não inoculadas, sob cinco níveis de adubação nitrogenada aplicada em sorgo sacarino. Pontos seguidos de mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste F a 5 %. Médias de 4 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média (+/-). Dados originais Anexo IV.

## 5 CONCLUSÕES

As estirpes que mais incrementaram biomassa seca, em condições de substrato esterilizado em sorgo granífero, forrageiro e sacarino foram as ZAE 95 (BR11181), 109 (BR11818) e ZAE 94 (BR11417) respectivamente.

O sorgo granífero foi beneficiado pela mistura de estirpes dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, sendo que as melhores respostas foram observadas nas menores doses de N.

O sorgo forrageiro adubado com a dose usual de N, (60 kg N ha<sup>-1</sup>), não respondeu à inoculação com a mistura de estirpes, mas houve uma tendência não significativa dos componentes de produção nos tratamentos inoculados, serem mais elevados sem a adubação nitrogenada, e nas doses de 90 e 120 kg N ha<sup>-1</sup>.

O genótipo sacarino não respondeu à inoculação com a mistura de estirpes.

As respostas produtivas derivadas da inoculação foram variáveis de acordo com o genótipo botânico testado.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em outras gramíneas de importância econômica no Brasil, os estudos relacionados ao uso de bactérias diazotróficas endofíticas, como insumo capaz de reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados, estão um pouco mais avançados em relação aos estudos com a cultura do sorgo, que por sua vez, apresenta grande potencial para o uso alternativo às grandes culturas energéticas cultivadas atualmente no país.

Espera-se com este trabalho, que o interesse por estudos de inoculação em sorgo possa aumentar, e a partir destas observações preliminares, os próximos experimentos possam ser planejados com algumas sugestões, como: realizar a inoculação simples com a estirpe mais promissora para cada tipo agrônomico de sorgo testado, pois desta forma será possível determinar qual, ou quais estirpes foram responsáveis pelas contribuições observadas; ou mesmo, iniciar um estudo de dinâmica de colonização, e estabelecimento inicial das diferentes espécies testadas, o que seria interessante para o entendimento da interação das bactérias entre si, e com as plantas.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, D. L.; SANTOS, G. A.; DE-POLLI, H.; CUNHA, L. H.; FREIRE, L. R.; AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; PEREIRA, N. M. C.; EIRA, P. A.; BLOISE, R. M.; SALEK, R. C. **Manual de adubação para o estado do Rio de Janeiro**. Itaguaí: Editora Universidade Rural, 1988. 179 p. (Coleção Universidade Rural. Ciências Agrárias, n. 2).

ALVES, B. J. R.; BAËTA, A. M.; ALVES, J. V. **Protocolo da Embrapa Agrobiologia para análise de nitrogênio em adubos orgânicos, solo e tecidos**. Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1999. 17 p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 100).

ALVES, G. C. **Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em genótipos de milho**. 2007. 54 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

AMIRA, C. D., Small grains in monogastric and ruminant feed formulations: prospects and problems. In: GOMEZ, M. I; HOUSE, L. R.; ROONEY, L. W.; DENDY, D. A. V. **Utilization of sorghum and millets**. Patancheru: INCRISAT, 1992. p.182-190.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, n.5-6, p. 911-922, 1997.

APPS - Associação Paulista dos Produtores de Sementes e Mudanças. **Evolução da Área e Produção de Sorgo no Brasil** 2009. Disponível em: [http://www.apps.agr.br/dados\\_estatisticos/](http://www.apps.agr.br/dados_estatisticos/). Acesso em 12/03/2010.

BALDANI, J. I.; AZEVEDO, M. S.; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S.; OLIVARES, F. L.; GOI, S. R.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS, Lavras, UFLA/DCS, p.621-666, 1999.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.77, n.3, p. 549-579, 2005.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.36, n.1, p. 86-93, 1986.

BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*, inclusion of "*Pseudomonas*" *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov. and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.46, n.3, p. 802-810, 1996a.

BALDANI, V. L. D., BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J., Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.30, n.5-6, p. 485-491, 2000.

BALDANI, V. L. D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** 1996b. 238f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

BERGAMASCHI, C.; ROESCH, L. F. W.; DE QUADROS, P. D.; CAMARGO, F. A. O. Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de sorgo forrageiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.3, p.727-733, 2007.

BHATTACHARJEE, R. B.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S. N.; Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v.80, p. 199-209, 2008.

BUCHER, C. A.; REIS, V. M. **Biofertilizante contendo bactérias diazotróficas.** Seropédica: Embrapa-CNPAB, 2008. 17 p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 247).

CABALLERO-MELLADO, J., MARTINEZ-AGUILAR, L., PAREDES-VALDEZ, G. ESTRADA-DE LOS SANTOS, P. *Burkholderia unamae* sp nov., an N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophytic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.54, part.4, p. 1165-1172, 2004.

CHEN, W. M., JAMES, E. K., COENYE, T., CHOU, J. H., BARRIOS, E., DE FARIA, S. M., ELLIOTT, G. N., SHEU, S. Y., SPRENT, J. I.; VANDAMME, P. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.56, p. 1847-1851, 2006.

CHEN, W. M., MOULIN, L., BONTEMPS, C., VANDAMME, P., BÉNA, G.; MASSON, C. B. Legume symbiotic nitrogen fixation by  $\beta$ -Proteobacteria is widespread in nature. **Journal Bacteriology**, Washington, v.185, p. 7266-7272, 2003.

CHEN, W. M.; FARIA, S. M.; CHOU, J. H.; JAMES, E. K.; ELLIOTT, G. N.; SPRENT, J. I.; BONTEMPS, C.; YOUNG, J. P. W.; VANDAMME, P. *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpinifolia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.58, p. 2174-2179, 2008.

CHEN, W. M.; FARIA, S. M.; JAMES, E. K.; ELLIOTT, G. N., LIN, K. Y.; CHOU, J. H.; SHEU, S. Y.; CNOCKAERT, M.; SPRENT, J. I.; VANDAMME, P. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella* **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.57, p. 1055-1059, 2007.

CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; SILVIA TABACCHIONI, S.; DALMASTRI, C. Inoculation of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter* sp. on *Sorghum bicolor*:

root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.30, n.1, p. 81-87, 1998.

COELHO, A. M.; FRANÇA, G. E.; PITTA, G. V. E.; ALVES, V. M. C. **Amostragens de solos: a base para a aplicação de corretivos e fertilizantes**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 2003. 5 p. (Embrapa-CNPMS. Comunicado técnico, 42).

COELHO, A. M.; WAQUIL, J. M.; KARAN, D.; CASELA, C. R.; RIBAS, P. M. **Seja o doutor do seu sorgo**. Piracicaba: POTAFOS, 2002. 24 p. (Arquivo do Agrônomo, n.14).

COENYE, T., VANDAMME, P.: Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, New York, v.5, p. 719-729, 2003.

DAJUE, L. Studies on sustainable eco-agriculture system of sweet sorghum. In: **Second International Conference on Sustainable Agriculture for Food, Energy and Industry. 2002**, Beijing: v.1, p. 8-13, 2002. Disponível em: [http://d.wanfangdata.com.cn/NSTLHY\\_NSTL\\_HY285334.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/NSTLHY_NSTL_HY285334.aspx) . Acesso em: 10/09/09.

DIDONET, A. D.; LIMA, O. S.; CANATEN, A. A.; RODRIGUES, O. Realocação de nitrogênio da biomassa para os grãos em trigo submetido à inoculação de *Azospirillum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.2, p. 401-411, 2000.

DING, L.; YOKOTA, A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.54, p.2223-2230, 2004.

DÖBEREINER, J. A importância da Fixação Biológica do Nitrogênio para a Agricultura Sustentável. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.1, n.1, p. 2-3, 1997, (Encarte especial).

DÖBEREINER J. *Azotobacter* em solos ácidos. **Boletim do Instituto de Ecologia e Experimentação Agrícolas**, Rio de Janeiro, v.11, n.1, p. 36, 1953.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: DF: Embrapa-SPI, 1995. 60 p.

EADY, R. R. Structure-function relationships of alternative nitrogenases. **Chemical Reviews**, Washington, v.96, n.7, p. 3013-3030, 1996.

EL-KOMY, H. M. A.; SAAD, O. A. O.; HETTA, A. M. A. Significance of *Herbaspirillum seropedicae* inoculation and/or straw amendment on growth and dinitrogen fixation of wheat using <sup>15</sup>N-dilution method **Folia Microbiologica**, Prague, v.48, n.6, p 787-793, 2003.

ELLIOTT, G. N., CHEN, W.-M., CHOU, J.-H., WANG, H.-C., SHEU, S.-Y., PERIN, L., REIS, V. M., MOULIN, L., SIMON, M. F.; BONTEMPS, C.; SUTHERLAND, J. M.; BESSI, R.; FARIA, S. M.; TRINIC, M. J.; PRESCOTT, A. R.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen ex planta. **New Phytologist**, Cambridge, v.173, p. 168-180, 2007.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). **Manual de métodos de análise de solos**. 2.ed. EMBRAPA – CNPS, Rio de Janeiro, 1997. 212p.

ESTRADA-DE LOS SANTOS, P., BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.6, p. 2790-2798, 2001.

EUZÉBIO, J. P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (1998 - 2008). Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/b/burkholderia.html>. Acesso em: 05/12/2009.

FALLIK, J.; OKON, Y. The response of maize (*Zea mays*) to *Azospirillum* inoculation in various types of soils in the field. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.12, p. 511-515, 1996.

FAO-Organizacion de las naciones unidas para La agricultura y La alimentacion. **El sorgo y mijo en la nutrición**. Roma: FAO. 1995. n.27. 197 p.

FARIAS, G. A. A. M.; FARIAS, J. G.; NORONHA, J. F. Rentabilidade da produção de vassouras de sorgo-vassoura (*Sorghum bicolor* (L.) MOENCH) **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.30, n.1, p. 97-102, 2000.

FERREIRA, D. F. **SISVAR Versão 4.6 (Build 6.1)**. DEX/UFLA. 2003. Disponível em: [http://www.dex.ufla.br/index.php?option=com\\_content&task=view&id=64&Itemid=1](http://www.dex.ufla.br/index.php?option=com_content&task=view&id=64&Itemid=1). Acesso em: 15/09/2009.

GARCIA DE SALAMONE, I. E.; DÖBEREINER, J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the <sup>15</sup>N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.23, n.3, p. 249-256, 1996.

GILLIS, M.; TRÂN VAN, V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HERBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HEULIN, T.; FERNANDES, M.P. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Jena, v.45, n.2, p. 274-289. 1995.

GORIS, J.; DE VOS, P.; CABALLERO-MELLADO; J., PARK, J. H.; FALSEN, E.; QUENSEN, J. F.; TIEDJE, J. M.; VANDAMME, P. Classification of the PCB- and biphenyl-degrading strain LB400 and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.54, part.5, p. 1677-1681, 2004.



GOVINDARAJAN, M.; BALANDREAU, J.; KWON, S. W.; WEON, H. Y.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamiensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice **Microbial Ecology**, New York, v.55, p. 21-37, 2008.

GOVINDARAJAN, M.; BALANDREAU, J.; MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*, **Plant and Soil**, Dordrecht, v.280, n.1-2, p. 239-252, 2006.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; JACOB-NETO, J. Adição de molibdênio ao inoculante turfoso com bactérias diazotróficas usado em duas cultivares de arroz irrigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.42, n.3, p. 393-398, 2007.

**IBGE. Levantamento Sistemático da produção Agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil.** Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2008. v.20. n.12. 80 p. (IBGE).

IDRIS, A.; LABUSCHAGNE, N.; KORSTEN, L. Efficacy of rhizobacteria for growth promotion in sorghum under greenhouse conditions and selected modes of action studies. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.147, p. 17-30, 2009.

**INMET. Instituto Nacional de Meteorologia:** Dados climáticos 2009. Disponível em: <http://www.ufrj.br/institutos/it/deng/daniel/dadosclimaticos.htm/>. Acesso em: 17/11/2009

JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.65, p. 197-209, 2000.

JAMES, E. K., OLIVARES, F.L.; BALDANI, J. I., DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.48, n.308, p. 785-797, 1997.

KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.51, part.1, p.157-168, 2001.

LANDAU, E. C.; SANS, L. M. A. **Cultivo do sorgo - Clima.** Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/sorgo/index.htm>. Acesso em: 08/03/2010.

MARTIN, J. H. Historia y clasificación de los sorgos (*Sorghum bicolor* (Linn.) Moench). In: WALL, L. S.; ROSS, W. M. **Producción y usos Del sorgo.** Buenos Aires: Ed. Hemisfério Sur. 1975. p. 4-6.

MEURER, E. J.; RHENHEIMER, D.; BISSANI, C. A. Fenômenos de sorção em solos. In: MEURER, E. J. (Ed.). **Fundamentos de Química do Solo** 3 Ed. Porto Alegre: Evangraf, 2006. p. 117-180.

MILES, A. A; MISRA, S. S.; IRWIN, O. A. The estimation of the bacterial power of blood. **Journal of Hygiene**, Jena, v.38, n.6, p. 732-749, 1938.

MONTAÑEZ, A.; ABREU, C.; GILL, P. R.; HARDARSON, G.; SICARDI, M. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by <sup>15</sup>N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.45, p. 253-263, 2009.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the b-subclass of proteobacteria. **Nature**, London, v.411, p 948-950, 2001.

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

OKON, Y.; FALLIK, E.; SARIG, S.; YAHALON, E.; TAL, S. Plant growth promoting effects of *Azospirillum*. In: BOTLE, H.; DE BRUIJN, F.J; NEWTON, W.E. eds. **Nitrogen fixation: hundred years after**. Stuttgart, Gustav Fischer, 1988. p. 741-748.

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, Oxford, v.135, p. 723-737, 1997.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. ; BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 284, n.1-2, p. 23-32, 2006.

PACOVSKY, R. S. Development and growth effects in the Sorghum *Azospirillum* association. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.68, n.6, p. 555-563, 1990.

PARKE, J. L. & GURIAN-SHERMAN, D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.39, p. 225-258, 2001.

PARRELLA, R. A. R. **Sorgo sacarino desponta como alternativa na produção de etanol**. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2009/maio/2a-semana/sorgo-sacarino-desponta-como-alternativa-promissora-na-producao-de-etanol>: Acesso em 14/03/2010.

PEIX, A.; MATEOS, P. F.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C.; MARTINEZ-MOLINA, E.; VELAZQUEZ, E. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.33, p. 1927-1935, 2001.

PEREIRA, J. A. R.; CAVALCANTE, V. A.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp. and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, The Hague, v.110, n.2, p. 269-274, 1988.

PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; BALDANI, J. I.; ESTRADA-DE-LOS-SANTOS, P; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J. Diazotrophic *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.56, part.8, p. 1931-1937, 2006.

PIMENTEL, J. P.; OLIVARES, F. L.; PITARD, R. M., URQUIAGA, S., AKIBA, F.; DÖBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.137, n.1, p. 61-65, 1991.

PITARD, R. M. **Organização e manutenção da coleção de bactérias diazotróficas do CNPAB – I. dados referentes ao período de janeiro de 1994 a dezembro de 1999**. Seropédica: Embrapa-CNPAB, 2000. 13 p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 121).

REHDER, D. Vanadium nitrogenase. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v.80, n.1-2, p. 133-136, 2000.

RAMOS, D. P.; CASTRO, A. F.; CAARGO, M. N. Levantamento detalhado de solo da área da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Agronomia**, Rio de Janeiro, v.8, p. 1-27, 1973.

RAO, N. S. Cereal nitrogen fixation research under the BNF coordinated project of the ICAR. In: WANI, S. P. ed. **Cereal nitrogen fixation**. Proceeding of the Working Group Meeting held at INCRISAT, 1984. Andhra Pradesh, INCRISAT, 1986. p. 23-35.

REIS JUNIOR, F. B.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J. Influence of nitrogen fertilization on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). **Plant and Soil**, Dordrecht v.219, p. 153-159, 2000.

REIS, V. M., ESTRADA-DE LOS SANTOS, P., TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, I. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.54, part.6, p. 2155-2162, 2004.

REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p.153-174.

RIBAS, P. M. Cultivo do sorgo - Importância econômica. 2008. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/sorgo/index.htm>. Acesso em: 08/03/2010.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA Jr., V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.12, n.1-2, p.16, 1986.

RODRIGUES, J. A. S.; SANTOS, F. G.; SHAFFERT, R. E.; FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R.; TARDIN, F. D. **BRS 655 - Híbrido de sorgo forrageiro para produção de silagem de alta qualidade**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 2008. 65 p. (Embrapa-CNPMS. Circular Técnica, 107).

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, Oxford, v.17, n.4-5, p. 319-339, 1999.

ROSOLEM, C. A.; MALAVOLTA, E. Estudos sobre a nutrição mineral do sorgo granífero: VI. Exigências Nutricionais. *Revista de Agricultura*, Piracicaba, v. 55, p. 49-55, 1980.

ROUT, E.; CHRZANOWSKI, T. H. The invasive *Sorghum halepense* harbors endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria and alters soil biogeochemistry **Plant and Soil**, Dordrecht, v.315, n.1-2, p.163-172, 2009.

RUAS, D. G.; GARCIA, J. C.; TEIXEIRA, N. M. Origem e importância do sorgo para o Brasil. In: **Recomendações técnicas para o cultivo do sorgo**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1988. 79 p. (Embrapa-CNPMS. Circular Técnica, 1).

SAIKIA, S. P.; JAIN, V. Biological nitrogen fixation with non-legumes: An achievable target or a dogma?. **Current Science**, Bangalore, v.92, n.3, p. 317-322, 2007.

SALA, V. M. R.; FREITAS, S. S.; DONZELI, V. P.; FREITAS, J. G.; GALLO, P. B.; SILVEIRA, A. P. D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.29, p. 345-352, 2005.

SALLES, J. F.; GITAHY, P. M.; SKOT, L.; BALDANI, J. I. Use of endophytic diazotrophic bacteria as a vector to express the cry3a gene from *Bacillus thuringiensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.31, n.3, p.155-161, 2000.

SANGOI, L. ERNANI, P. R., LECH, V. A., RAMPAZZO, C. Lixiviação de nitrogênio afetada pela forma de aplicação da uréia e manejo dos restos culturais de aveia em dois solos com texturas contrastantes, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.1, p. 65-70, 2003.

SANS, L. M. A.; MORAIS, A. V. C.; GUIMARÃES, D. P. **Época de plantio de sorgo**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS. 2003. 4 p. (Embrapa-CNPMS. Comunicado Técnico, 80).

SANTI, A.; CAMARGOS, S. L.; SCARAMUZZA, W. L. M. P.; SCARAMUZZA, J. F. Deficiências de macronutrientes em sorgo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.2, p. 228-233, 2006.

SANTOS, F. G., RODRIGUES, J. A. S.; SCHAFFERT, R. E.; CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S. F. **Híbrido de Sorgo Granífero BRS 308**. Sete Lagoas: Embrapa CNPMS. 2007. 4 p. (Embrapa-CNPMS. Comunicado Técnico, 146).

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Oxford, v. 30, n.3, p. 507-512, 1974.

SHEARER, G.; KOHL, D. H. N<sub>2</sub>-fixation in field settings: estimations based on natural <sup>15</sup>N abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v.13, n.6, p. 699-756, 1986.

SIMON, J. E.; LOURENÇO JÚNIOR, J. B.; FERREIRA, G. D. G. SANTOS, N. F. A.; NAHUM, B. S.; MOREIRA, E. M. Consumo e digestibilidade aparente das frações fibrosas de silagem de sorgo (*Sorghum bicolor* [L.] Moench) por ovinos. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v.30, n.3, p. 333-338, 2008.

STEIN, T.; HAYEN-SCHNEG, N.; FENDRIK, I. Contribution of BNF by *Azoarcus sp.* BH72 in *Sorghum vulgare*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, n.5-6, p. 969-971, 1997.

STRALIOTTO, R. **Protocolo operacional para o preparo da turfa para inoculante rizobiano**. Seropédica: Embrapa-CNPAB. 2000. 4 p.

SUMAN, A.; SHRIVASTAVA, A. K.; GAUR, A.; SINGH, P.; SINGH, J.; YADAV, R. L. Nitrogen use efficiency of sugarcane in relation to its BNF potential and population of endophytic diazotrophs at different N levels, **Plant Growth Regulation**, v.54, p. 1-11, 2008.

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

TISDALE, S. L.; NELSON, W. L.; BEATON, J. D. **Soil fertility and fertilizers 4th**. New York: ed. McMillan Publishers Company. 1984. 754 p.

TRIVELIN, P. C. O.; OLIVEIRA, M. W.; VITTI, A. C.; GAVA, G. J. C.; BENDASSOLLI, J. A. Perdas do nitrogênio da uréia no sistema solo-planta em dois ciclos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, p. 193-201, 2002.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen: <sup>15</sup>N and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.56, n.1, p. 105-114, 1992.

VALVERDE, A.; VELAZQUEZ, E.; GUTIERREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J. M. *Herbaspirillum lusitanum sp. nov.*, a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.53, part.6, p. 1979-1983, 2003.

VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W. M.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum sp. nov.* and *Burkholderia phymatum sp. nov.* nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, New York, v.25, p 507-512, 2002.

VANLAERE, E.; BALDWIN, A.; GEVERS, D.; HENRY, D.; DE BRANDT, E.; LIPUMA, J. J.; MAHENTHIRALINGAM, E.; SPEERT, D. P.; DOWSON, C.; VANDAMME, P. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans sp. nov.* and *Burkholderia lata sp. nov.* **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, 2009, v.59, p. 102-111, 2009.

VAN OEVELEN, S.; DE WACHTER, R.; VANDAMME, P.; ROBBRECHT, E.; PRINSEN, E. 'Candidatus *Burkholderia calva*' and 'Candidatus *Burkholderia nigropunctata*' as leaf gall endosymbionts of African *Psychotria*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.54, p. 2237-2240. 2004.

VAN OEVELEN, S.; DE WACHTER, R.; VANDAMME, P.; ROBBRECHT, E.; PRINSEN, E. Identification of the bacterial endosymbionts in leaf galls of *Psychotria* (*Rubiaceae*,

angiosperms) and proposal of '*Candidatus Burkholderia kirkii*' sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.52, p. 2023-2027, 2002.

WANG, F.; LIU, C. Z. Development of an Economic Refining Strategy of Sweet Sorghum in the Inner Mongolia Region of China **Energy & Fuels**, Washington, v.23, p. 4137-4142, 2009.

WEBER, O. B.; TEIXEIRA, K. R. S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.210, p. 103-113, 1999.

XIMENES, P. A.; FREIRE, A. C.; MOREIRA-JUNIOR, W. N. Avaliação do potencial agrônômico de algumas cultivares de sorgo sacarino (*Sorghum bicolor*). **Anais da Escola de Agronomia e Veterinária-UFG**, Goiânia, v.18, p. 109-115, 1988.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. Nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology Immunology**, Tokio, v.36, p. 1251-1275, 1992.

YANG, H. C.; IM, W. T.; KIM, K. K.; AN, D. S.; LEE, S. T. *Burkholderia terrae* sp. nov., isolated from a forest soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.56, p. 453-457, 2006.

ZHANG, H., HANADA, S., SHIGEMATSU, T., SHIBUYA, K., KAMAGATA, Y., KANAGAWA, T.; KURANE, R. *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.50, n.2, p. 743-749, 2000.

ZHAO, D.; REDDY, K. R.; KAKANI, V. G.; REDDY, V. R. Nitrogen deficiency effects on plant growth, leaf photosynthesis, and hyper spectral reflectance properties of sorghum **European Journal of Agronomy**, Amsterdam, v.22, n.4, p. 391-403, 2005.

## 8 ANEXOS

**Anexo I** - Resultados das análises químicas dos substratos utilizados para o cultivo em casa de vegetação e terra oriunda da área experimental.....53

**Anexo II** - Desenhos Experimentais (Experimentos de campo).....54

**Anexo III** - Meios utilizados para o crescimento das bactérias diazotróficas.....55

**Anexo IV** - Médias dos experimentos de casa de vegetação e campo.....57

**Anexo V** - Médias referentes ao fator adubação, que não diferiram pelo teste de regressão a 5 % de probabilidade.....63

### **Anexo I Resultados das análises químicas dos substratos utilizados para o cultivo em casa de vegetação e terra oriunda da área experimental**

Substrato areia com vermiculita utilizado em casa de vegetação para cultivo do sorgo granífero

	cmolc dm <sup>3</sup>				mg dm <sup>3</sup>	
pH	Al	Ca+Mg	Ca	Mg	P	K
7,3	0,0	6,7	5,4	1,3	-	345,0

Substrato areia com vermiculita utilizado em casa de vegetação para cultivo do sorgo forrageiro

	cmolc dm <sup>3</sup>				mg dm <sup>3</sup>	
pH	Al	Ca+Mg	Ca	Mg	P	K
6,6	0,0	1,8	1,4	0,4	10,1	95

Substrato areia com vermiculita utilizado em casa de vegetação para cultivo do sorgo sacarino

	cmolc dm <sup>3</sup>			mg dm <sup>3</sup>		g kg <sup>-1</sup>		%	
pH	Al	Ca+Mg	Ca	Mg	P	K	C	MO	N
7,0	0,0	3,4	0,3	3,0	0,7	18,0	1,0	0,03	0,002

Terra oriunda da área experimental onde foi cultivado o sorgo granífero

	cmolc dm <sup>3</sup>			mg dm <sup>3</sup>		g kg <sup>-1</sup>		%	
pH	Al	Ca+Mg	Ca	Mg	P	K	C	MO	N
5,6	0,0	3,0	1,8	1,2	4,6	44,0	6,1	1,05	0,080

Terra oriunda da área experimental onde foi cultivado o sorgo forrageiro

	cmolc dm <sup>3</sup>			mg dm <sup>3</sup>		g kg <sup>-1</sup>		%	
pH	Al	Ca+Mg	Ca	Mg	P	K	C	MO	N
5,6	0,1	2,7	1,8	1,0	3,1	49,0	5,5	0,94	0,083

Terra oriunda da área experimental onde foi cultivado o sorgo sacarino

	cmolc dm <sup>3</sup>			mg dm <sup>3</sup>		g kg <sup>-1</sup>		%	
pH	Al	Ca+Mg	Ca	Mg	P	K	C	MO	N
4,8	0,3	2,4	1,5	0,9	4,5	78,0	7,3	1,25	0,106

## Anexo II      Desenhos Experimentais (Condições de campo)

11 I 0	12 I 60	13 I 30	14 NI 120	15 NI 90
11 NI 0	12 NI 60	13 NI 30	14 I 120	15 I 90
10 NI 60	9 NI 90	8 NI 0	7 I 120	6 I 30
10 I 60	9 I 90	8 I 0	7 NI 120	6 NI 30
1 NI 0	2 NI 30	3 I 120	4 NI 90	5 NI 60
1 I 0	2 I 30	3 NI 120	4 I 90	5 I 60

Desenho experimental representando a localização de cada tratamento aplicado ao acaso no experimento de sorgo granífero. A numeração de 1 a 15 representa as parcelas, e as iniciais I e NI, representam as subparcelas inoculadas e não inoculadas, respectivamente; os valores 0, 30, 60, 90 e 120 representam as doses de adubação nitrogenada em kg ha<sup>-1</sup>, repetidos 3 vezes.

20 I 90	19 NI 30	18 I 120	17 I 60	16 I 0
20 NI 90	19 I 30	18 NI 120	17 NI 60	16 NI 0
11 NI 60	12 NI 0	13 NI 30	14 NI 90	15 NI 120
11 I 60	12 I 0	13 I 30	14 I 90	15 I 120
10 I 30	9 NI 0	8 NI 60	7 NI 30	6 I 120
10 NI 30	9 I 0	8 I 60	7 I 30	6 NI 120
1 NI 0	2 NI 120	3 NI 90	4 NI 60	5 I 30
1 I 0	2 I 120	3 I 90	4 I 60	5 NI 30

Desenho experimental representando a localização de cada tratamento aplicado ao acaso no experimento de sorgo forrageiro. A numeração de 1 a 20 representa as parcelas, e as iniciais I e NI, representam as subparcelas inoculadas e não inoculadas, respectivamente; os valores 0, 30, 60, 90 e 120 representam as doses de adubação nitrogenada em kg ha<sup>-1</sup>, repetidos 4 vezes.

20 I 0	19 I 90	18 NI 60	17 NI 30	16 NI 120
20 NI 0	19 NI 90	18 I 60	17 I 30	16 I 120
11 NI 120	12 NI 30	13 NI 60	14 I 90	15 NI 0
11 I 120	12 I 30	13 I 60	14 NI 90	15 I 0
10 NI 120	9 NI 0	8 I 90	7 I 60	6 I 30
10 120 I	9 I 0	8 NI 90	7 NI 60	6 NI 30
1 NI 30	2 I 120	3 NI 0	4 I 90	5 I 60
1 I 30	2 NI 120	3 I 0	4 NI 90	5 NI 60

Desenho experimental representando a localização de cada tratamento aplicado ao acaso no experimento de sorgo sacarino. A numeração de 1 a 20 representa as parcelas, e as iniciais I e NI, representam as subparcelas inoculadas e não inoculadas, respectivamente; os valores 0, 30, 60, 90 e 120 representam as doses de adubação nitrogenada em kg ha<sup>-1</sup>, repetidos 4 vezes.



### Anexo III Meios utilizados para o crescimento das bactérias diazotróficas

#### NFb (3X) (DÖBEREINER, 1995)

Ácido málico		5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	sol. 10 %	5 mL
Mg SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	sol. 10 %	2 mL
NaCl	sol. 10 %	1 mL
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	sol. 1 %	2 mL
FeEDTA	sol. 1,4 %	4 mL
Azul de bromotimol, solução 0,5 % em 0,2 N de KOH		6 mL
Solução de micronutrientes para meio de cultura		2 mL
Vitamina para meio de cultura		1 mL
KOH		4,5 g
Água destilada		1000 mL

#### Observações:

Ajustar o pH para 6,5.

Para meio sólido adicionar 50mg de extrato de levedura e 15 g de agar

Para semi-sólido adicionar 1,6 g de agar.

#### JMV (BALDANI, 1996b)

Manitol		5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	sol. 10 %	6 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	sol. 10 %	18 mL
Mg SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	sol. 10 %	2 mL
NaCl	sol. 10 %	1 mL
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	sol. 1 %	2 mL
FeEDTA	sol. 1,4 %	4 mL
Azul de bromotimol, solução 0,5 % em 0,2 N de KOH		2 mL
Solução de micronutrientes para meio de cultura		2 mL
Vitamina para meio de cultura		1 mL
KOH		4,5 g
Extrato de levedura		100 mg
Água destilada		1000 mL

#### Observações:

Ajustar o pH para 4,2-5,4.

Para meio sólido adicionar 25 g de agar.

Para meio semi-sólido adicionar 1,6 g de agar.

Para meio semi-sólido não adicionar extrato de levedura.

### DYG'S (Modificado de RODRIGUES NETO, 1986)

Glicose		2,0 g
Ácido málico		2,0 g
Peptona bacteriológica		1,5 g
Extrato de levedura		2,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O		0,5 g
Ácido glutâmico		1,5 g
Água destilada		1000 mL

#### Observações:

pH 6,0 para *Herbaspirillum*.

pH 5,5 para *Burkholderia*

### JNFb (DÖBEREINER, 1995)

Ácido málico		5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	sol. 10 %	6 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	sol. 10 %	18 mL
Mg SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	sol. 10 %	2 mL
NaCl	sol. 10 %	1 mL
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	sol. 1 %	2 mL
FeEDTA	sol. 1,4 %	4 mL
Azul de bromotimol, solução 0,5 % em 0,2 N de KOH		2 mL
Solução de micronutrientes para meio de cultura		2 mL
Vitamina para meio de cultura		1 mL
KOH		4,5 g
Extrato de levedura		20 mg
Água destilada		1000 mL

#### Observações:

Ajustar o pH para 5,8.

Para meio sólido adicionar 17 g de agar.

Para meio semi-sólido adicionar 1,8 g de agar.

Para meio semi-sólido não adicionar extrato de levedura.

### Solução de micronutrientes para meio de cultura (DÖBEREINER, 1995)

CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O		0,04 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O		1,20 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		1,40 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O		1,00 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O		1,175 g
Água destilada		1000 mL

### Solução de vitaminas (DÖBEREINER, 1995)

Biotina	10 mg
Piridoxol – HCl	20 mg
Água destilada	100 mL

Observações:

Dissolver em banho-maria

Manter a solução em geladeira.

### Anexo IV Médias dos experimentos de casa de vegetação e campo

Produção de biomassa seca e teor de nitrogênio em sorgo granífero, inoculadas com bactérias diazotróficas, comparando com os controles T0, T20 e T40

Tratamentos	Código	MSPA	MSR	N %	N Total PA
109	BR11818	3,88 b	2,99 a	1,23 a	43 b
120	BR11821	3,11 b	2,25 a	1,14 a	35 b
Ppe5	BR11363	3,56 b	3,07 a	0,96 a	34 b
Ppe6	BR11364	3,76 b	2,87 a	1,14 a	40 b
Ppe7	BR11365	4,32 b	3,19 a	1,07 a	45 b
41	BR12149	3,57 b	3,16 a	1,01 a	36 b
35	BR12234	3,50 b	2,79 a	1,01 a	35 b
90 m	BR11915	4,07 b	3,30 a	1,17 a	46 b
PPCR-1	BR12164	3,72 b	3,20 a	1,18 a	44 b
PPCR-8	BR12166	4,10 b	2,96 a	0,87 a	35 b
M 130	BR11340	3,93 b	3,37 a	1,00 a	38 b
M 209	BR11345	4,05 b	3,07 a	1,01 a	41 b
ZAE 67	BR11175	4,18 b	3,02 a	0,91 a	38 b
ZA 10	BR11765	3,15 b	3,02 a	1,12 a	36 b
ZMS 152	BR11178	2,77 b	1,96 a	1,34 a	30 b
ZMS 176	BR11179	4,38 b	3,42 a	1,12 a	49 b
16	BR12233	3,84 b	3,49 a	0,91 a	35 b
M1	BR11191	4,21 b	3,12 a	0,98 a	40 b
B-4362	BR12229	3,70 b	3,17 a	1,02 a	38 b
ZAE 95	BR11181	4,27 b	3,85 a	0,91 a	38 b
ZAE 78	BR11177	4,05 b	3,07 a	0,92 a	37 b
HRC 54	BR11335	3,66 b	2,74 a	0,96 a	34 b
GSF 28	GSF 28	3,29 b	2,53 a	1,05 a	34 b
ZAE 94	BR11417	2,85 b	2,23 a	1,19 a	33 b
T0	T0	1,17 b	0,96 a	1,01 a	12 b
T20	T20	3,64 b	2,85 a	1,16 a	43 b
T40	T40	7,20 a	4,95 a	1,07 a	75 a
	CV %	29,24	32,24	20,21	26,44

MSPA= Massa seca de parte aérea (g), MSR= Massa seca de raiz (g), N %= Porcentagem de nitrogênio na parte aérea, N Total PA= Nitrogênio total na parte aérea (mg), CV %- Coeficiente de variação. Delineamento experimental em blocos ao acaso com quatro repetições. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

Produção de biomassa seca e altura das plantas em sorgo forrageiro, inoculadas com bactérias diazotróficas, comparando com os controles T0, T20 e T40

<b>Tratamentos</b>	<b>Código</b>	<b>MSPA</b>	<b>MSR</b>	<b>Altura</b>
109	BR11818	1,20 a	0,79 a	38,0 a
120	BR11821	0,82 a	0,64 a	32,3 a
Ppe5	BR11363	1,05 a	0,65 a	34,3 a
Ppe6	BR11364	0,94 a	0,92 a	35,0 a
Ppe7	BR11365	0,84 a	0,62 a	31,8 a
41	BR12149	1,04 a	0,86 a	33,5 a
35	BR12234	0,64 a	0,63 a	30,0 a
90 m	BR11915	0,71 a	0,72 a	31,5 a
PPCR-1	BR12164	0,71 a	0,58 a	29,3 a
PPCR-8	BR12166	1,00 a	0,84 a	33,8 a
M 130	BR11340	0,73 a	0,59 a	30,0 a
M 209	BR11345	0,58 a	0,48 a	27,3 a
ZAE 67	BR11175	0,75 a	0,68 a	32,0 a
ZA 10	BR11765	0,79 a	0,73 a	33,3 a
ZMS 152	BR11178	1,03 a	0,86 a	34,8 a
ZMS 176	BR11179	0,97 a	0,69 a	32,3 a
16	BR12233	0,97 a	0,72 a	34,3 a
M1	BR11191	0,90 a	0,88 a	32,3 a
HCC 103	BR11504	0,86 a	0,70 a	30,8 a
ZAE 95	BR11181	0,78 a	0,67 a	30,5 a
ZAE 78	BR11177	0,81 a	0,66 a	32,5 a
HRC 54	BR11335	0,83 a	0,71 a	32,0 a
GSF 28	GSF 28	0,62 a	0,59 a	28,5 a
ZAE 94	BR11417	0,75 a	0,70 a	32,5 a
T0	T0	0,75 a	0,56 a	31,5 a
T20	T20	0,46 a	0,52 a	25,3 a
T40	T40	1,18 a	0,70 a	36,8 a
	CV %	44,64	28,81	16,72

MSPA= Massa seca de parte aérea (g), MSR= Massa seca de raiz (g), Altura = Média da altura de quatro plantas aos 45 dias (cm), CV %- Coeficiente de variação. Delineamento experimental em blocos ao acaso com quatro repetições. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

Produção de biomassa seca e altura das plantas em sorgo sacarino, inoculadas com bactérias diazotróficas, comparando com os controles T0, T20 e T40

<b>Tratamentos</b>	<b>Código</b>	<b>MSPA</b>	<b>MSR</b>	<b>Altura</b>
109	BR11818	1,30 a	0,79 a	41,9 a
120	BR11821	1,14 a	0,63 a	39,9 a
Ppe5	BR11363	1,40 a	0,78 a	40,6 a
Ppe6	BR11364	1,20 a	0,76 a	41,1 a
Ppe7	BR11365	1,28 a	0,80 a	41,7 a
41	BR12149	0,97 a	0,65 a	36,1 a
35	BR12234	1,49 a	0,85 a	42,4 a
90 m	BR11915	1,29 a	0,70 a	41,3 a
PPCR-1	BR12164	1,39 a	0,84 a	41,3 a
PPCR-8	BR12166	1,32 a	0,62 a	41,5 a
M 130	BR11340	1,35 a	0,75 a	42,0 a
M 209	BR11345	1,17 a	0,78 a	40,5 a
ZAE 67	BR11175	1,21 a	0,64 a	40,0 a
ZA 10	BR11765	1,12 a	0,59 a	38,1 a
ZMS 152	BR11178	1,42 a	0,76 a	43,6 a
ZMS 176	BR11179	1,09 a	0,62 a	40,1 a
16	BR12233	1,71 a	1,02 a	43,9 a
M1	BR11191	1,16 a	0,56 a	40,7 a
HCC 103	BR11504	1,10 a	0,65 a	38,7 a
ZAE 95	BR11181	1,79 a	0,86 a	47,0 a
ZAE 78	BR11177	1,45 a	0,82 a	42,9 a
HRC 54	BR11335	1,10 a	0,62 a	38,8 a
GSF 28	GSF 28	1,31 a	0,62 a	41,8 a
ZAE 94	BR11417	1,94 a	1,11 a	47,9 a
T0	T0	0,38 a	0,24 a	18,2 b
T20	T20	1,26 a	0,73 a	41,7 a
T40	T40	1,95 a	1,07 a	49,8 a
	CV %	39,20	39,03	16,48

MSPA= Massa seca de parte aérea (g), MSR= Massa seca de raiz (g), Altura = Média da altura de quatro plantas aos 45 dias (cm), CV %- Coeficiente de variação. Delineamento experimental em blocos ao acaso com quatro repetições. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

Altura das plantas aos 40 dias após emergência, biomassa seca de palha (parte aérea sem panículas) e de grãos de sorgo granífero inoculado ou não inoculado com bactérias diazotróficas, sob diferentes doses de N em kg ha<sup>-1</sup> (médias de 3 repetições)

Trat.	Altura (cm)		Palha (kg ha <sup>-1</sup> )			Grãos (kg ha <sup>-1</sup> )			
	Doses de N	NI	I	NI	I	INCR	NI	I	INCR
0		47,7 a	48,5 a	3412 a	3843 a	12,6	3927 b	4892 a	24,6
30		47,8 a	44,8 a	3887 b	4381 a	12,7	4319 a	4754 a	10,1
60		49,1 a	45,2 a	3653 a	4123 a	12,9	4094 a	4564 a	11,5
90		48,6 a	42,9 b	3886 a	4252 a	9,4	4278 a	4771 a	11,5
120		46,2 a	42,2 a	4319 a	3745 b	-13,3	5031 a	4807 a	-4,5
<b>Médias</b>		47,9 a	44,7 b	3831 b	4069 a	6,2	4330 b	4757 a	9,9
<b>CV % 1</b>		7,98		17,85			20,06		
<b>CV % 2</b>		6,32		6,82			10,80		

Médias seguidas de mesma letra em cada variável na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste F a 5 %. NI = tratamento não inoculado; I = tratamento inoculado; INCR = porcentagem de incremento em relação à testemunha sob mesmo nível de N-mineral; Médias = valor médio dos tratamentos não inoculados e inoculados nas referentes variáveis; CV % 1 = coeficiente de variação referente à parcela e CV % 2 = coeficiente de variação referente a subparcela. Delineamento experimental em blocos ao acaso com parcelas subdivididas.

Nitrogênio total e percentual de nitrogênio na biomassa seca de sorgo granífero inoculado ou não com bactérias diazotróficas sob diferentes níveis de adubação nitrogenada (médias de 3 repetições)

Trat.	% N Palha		% N Grão		N total Palha		N total Grão		
	Doses de N	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I
0		1,07	1,12	1,81	1,80	36,1 a	43,5 a	70,6 b	87,4 a
30		1,12	1,09	1,90	1,93	43,7 a	48,0 a	81,9 a	90,9 a
60		1,03	1,16	1,91	1,92	38,4 a	46,6 a	75,8 a	84,1 a
90		1,23	1,21	2,01	1,97	48,4 a	51,0 a	84,8 a	92,8 a
120		1,19	1,19	2,00	1,95	51,0 a	44,6 a	100,6 a	92,9 a
<b>Médias</b>		1,13	1,15	1,93	1,91	43,5 a	46,7 a	82,8 a	89,6 a
<b>CV % 1</b>						29,31		25,68	
<b>CV % 2</b>						18,84		10,18	

Médias seguidas de mesma letra em cada variável na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste F a 5 %. Médias = valor médio dos tratamentos não inoculados e inoculados nas referentes variáveis, % N Palha e % N Grão = porcentagem de nitrogênio contido na palha e nos grãos respectivamente, N total Palha e N total Grão = quantidade de nitrogênio em kg ha<sup>-1</sup> presente na palha e grãos respectivamente, CV % 1 = coeficiente de variação referente à parcela e CV % 2 = coeficiente de variação referente a subparcela. Delineamento experimental em blocos ao acaso com parcelas subdivididas.

Altura das plantas aos 40 dias após emergência, biomassa seca de palha (parte aérea sem panículas) e de grãos de sorgo forrageiro inoculado ou não inoculado com bactérias diazotróficas, sob diferentes doses de N em kg ha<sup>-1</sup> (médias de 4 repetições)

Trat.	Altura (cm)		Palha (kg ha <sup>-1</sup> )			Grãos (kg ha <sup>-1</sup> )		
	Doses de N		NI	I	INCR	NI	I	INCR
0	54,5 a	57,6 a	3505 a	3963 a	13,1	3852 a	4154 a	7,8
30	59,7 a	59,0 a	4235 a	4144 a	-2,1	4694 a	4414 a	-6,0
60	53,0 b	60,8 a	4361 a	4534 a	4,0	4509 a	4571 a	1,4
90	64,2 a	58,3 a	3921 a	4150 a	5,8	4306 a	4561 a	5,9
120	55,4 a	55,4 a	4485 a	4381 a	-2,3	4291 a	4591 a	7,0
<b>Médias</b>	57,5 a	58,2 a	4101 a	4234 a	3,2	4330 a	4458 a	3,0
<b>CV % 1</b>	10,97		14,45			12,25		
<b>CV % 2</b>	8,54		7,93			9,73		

Médias seguidas de mesma letra em cada variável na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste F a 5 %. NI = tratamento não inoculado; I = tratamento inoculado; INCR = porcentagem de incremento em relação à testemunha sob mesmo nível de N-mineral; Médias = valor médio dos tratamentos não inoculados e inoculados nas referentes variáveis, CV % 1 = coeficiente de variação referente à parcela e CV % 2 = coeficiente de variação referente a subparcela. Delineamento experimental em blocos ao acaso com parcelas subdivididas.

Nitrogênio total e percentual de nitrogênio na biomassa seca de sorgo forrageiro inoculado ou não com bactérias diazotróficas sob diferentes níveis de adubação nitrogenada (médias de 4 repetições)

Trat.	% N Palha		% N Grãos		N total Palha		N total Grãos	
	Doses de N		NI	I	NI	I	NI	I
0	0,96	0,84	1,42	1,31	33,7 a	30,8 a	55,0 a	57,0 a
30	0,99	1,08	1,50	1,42	42,7 a	44,9 a	70,8 a	62,4 a
60	1,08	1,02	1,49	1,42	47,9 a	46,4 a	67,2 a	64,8 a
90	1,18	1,35	1,43	1,59	46,0 a	55,8 a	61,7 a	72,1 a
120	1,24	1,36	1,51	1,57	55,7 a	59,5 a	64,8 a	72,2 a
<b>Médias</b>	1,09	1,13	1,47	1,46	45,2 a	47,5 a	63,9 a	65,7 a
<b>CV % 1</b>					32,39		15,10	
<b>CV % 2</b>					21,22		12,68	

Médias seguidas de mesma letra em cada variável na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste F a 5 %. Médias = valor médio dos tratamentos não inoculados e inoculados nas referentes variáveis, % N Palha e % N Grão = porcentagem de nitrogênio contido na palha e nos grãos respectivamente, N total Palha e N total Grão = quantidade de nitrogênio em kg ha<sup>-1</sup> presente na palha e grãos respectivamente, CV % 1 = coeficiente de variação referente à parcela e CV % 2 = coeficiente de variação referente à subparcela. Delineamento experimental em blocos ao acaso com parcelas subdivididas.

Altura das plantas aos 40 dias após emergência, biomassa seca de palha (parte aérea sem panículas) e de grãos de sorgo sacarino inoculado ou não inoculado com bactérias diazotróficas, sob diferentes doses de N em kg ha<sup>-1</sup> (médias de 4 repetições)

Trat.	Altura (cm)		Palha (kg ha <sup>-1</sup> )			Grãos (kg ha <sup>-1</sup> )			
	Doses de N	NI	I	NI	I	INCR	NI	I	INCR
0		33,4 a	33,2 a	2487 a	2431 a	-2,2	2689 a	2708 a	0,7
30		31,7 a	33,4 a	2195 a	2177 a	-0,8	2734 a	2592 a	-5,2
60		33,7 a	35,4 a	2237 a	2260 a	1,0	2690 a	2622 a	-2,5
90		33,2 a	34,7 a	2395 a	2302 a	-3,9	2711 a	2676 a	-1,3
120		32,0 a	31,1 a	2290 a	2317 a	1,2	2782 a	2656 a	-4,5
<b>Médias</b>		32,8 a	33,5 a	2321 a	2297 a	-1,0	2721 a	2651 a	-2,6
<b>CV % 1</b>		7,55		10,62			8,42		
<b>CV % 2</b>		8,71		10,31			6,00		

Médias seguidas de mesma letra em cada variável na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste F a 5 %. NI = tratamento não inoculado; I = tratamento inoculado; INCR = porcentagem de incremento em relação à testemunha sob mesmo nível de N-mineral; Médias = valor médio dos tratamentos não inoculados e inoculados nas referentes variáveis, CV % 1 = coeficiente de variação referente à parcela e CV % 2 = coeficiente de variação referente à subparcela. Delineamento experimental em blocos ao acaso com parcelas subdivididas.

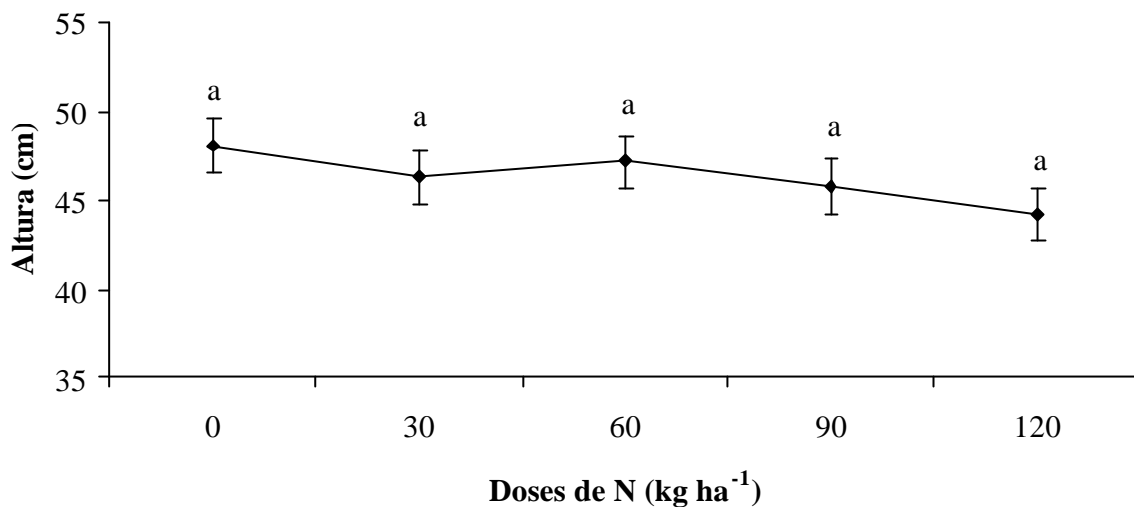
Nitrogênio total e percentual de nitrogênio na biomassa seca de sorgo sacarino inoculado ou não com bactérias diazotróficas sob diferentes níveis de adubação nitrogenada (médias de 4 repetições)

Trat.	% N Palha		% N Grão		N total Palha		N total Grão		
	Doses de N	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I
0		1,07	1,20	1,52	1,57	26,5 a	29,1 a	40,7 a	42,5 a
30		1,19	1,30	1,48	1,52	28,1 a	25,3 a	40,5 a	39,4 a
60		1,33	1,26	1,52	1,56	29,8 a	28,5 a	40,9 a	40,8 a
90		1,19	1,30	1,53	1,46	28,3 a	29,9 a	41,0 a	39,5 a
120		1,31	1,22	1,54	1,59	30,0 a	28,3 a	40,9 a	44,0 a
<b>Médias</b>		1,22	1,26	1,52	1,54	28,5 a	28,2 a	40,8 a	41,2 a
<b>CV % 1</b>						15,14		10,04	
<b>CV % 2</b>						9,65		7,9	

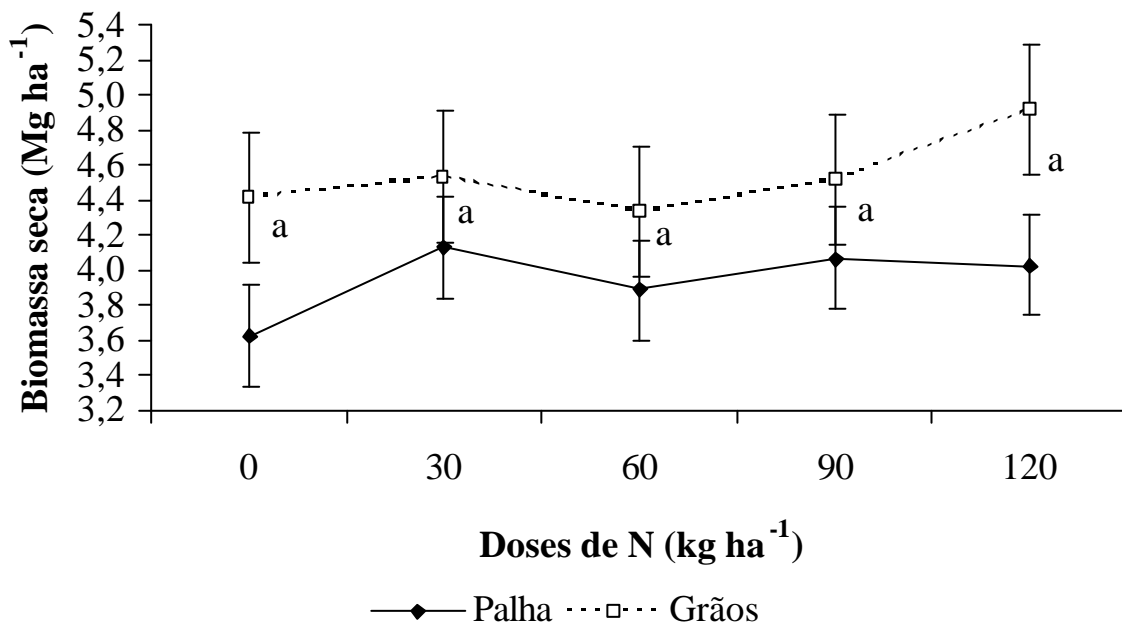
Médias seguidas de mesma letra em cada variável na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste F a 5 %. Médias = valor médio dos tratamentos não inoculados e inoculados nas referentes variáveis, % N Palha e % N Grão = porcentagem de nitrogênio contido na palha e nos grãos respectivamente, N total Palha e N total Grão = quantidade de nitrogênio em kg ha<sup>-1</sup> presente na palha e grãos respectivamente, CV % 1 = coeficiente de variação referente à parcela e CV % 2 = coeficiente de variação referente a subparcela. Delineamento experimental em blocos ao acaso com parcelas subdivididas.



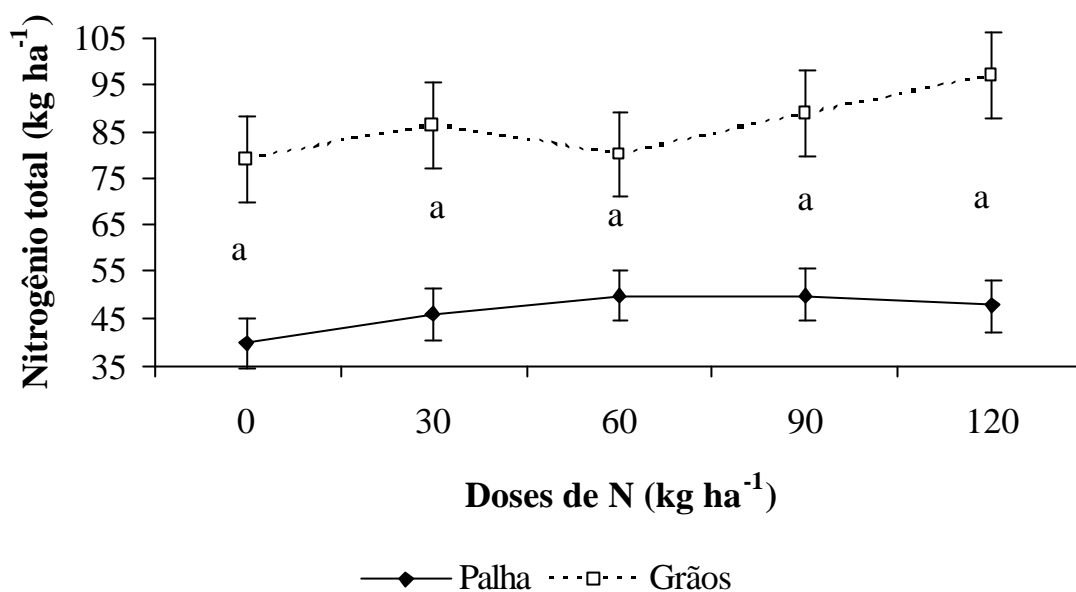
**Anexo V Médias referentes ao fator adubação, que não diferiram pelo teste de regressão a 5 % de probabilidade**



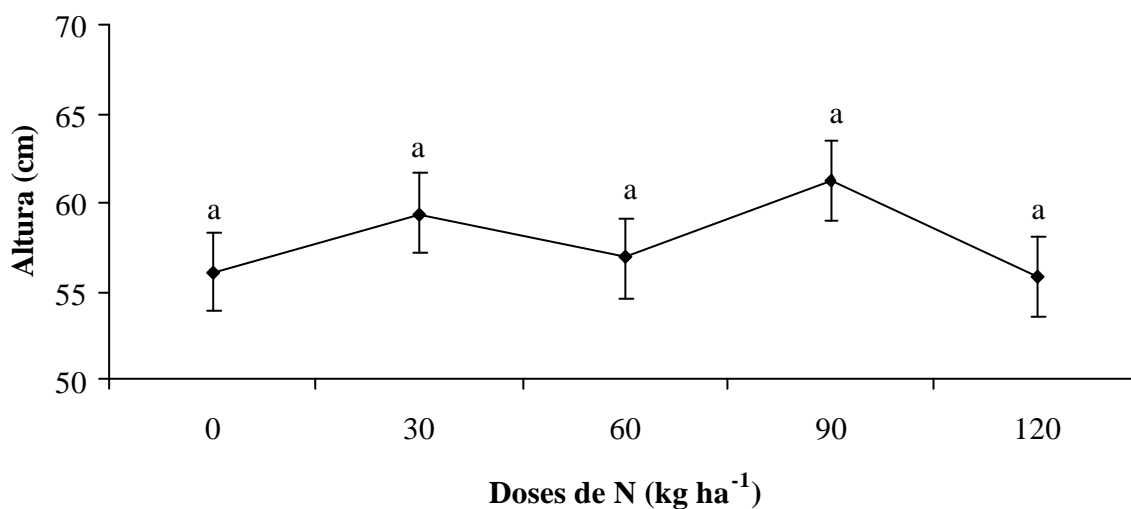
Altura média após 40 dias da emergência de sorgo granífero sob cinco níveis de adubação nitrogenada. Pontos seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de regressão a 5 % de probabilidade. Médias de 6 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média (+/-)



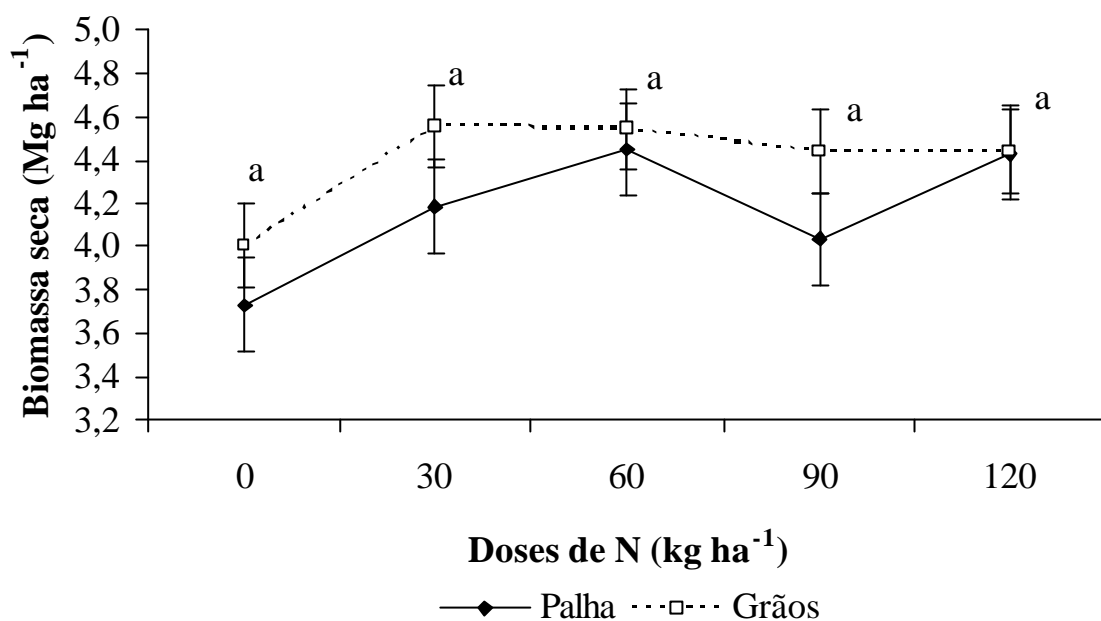
Produtividade média de biomassa de sorgo granífero sob cinco níveis de adubação nitrogenada. Pontos seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de regressão a 5 % de probabilidade. Médias de 6 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média (+/-)



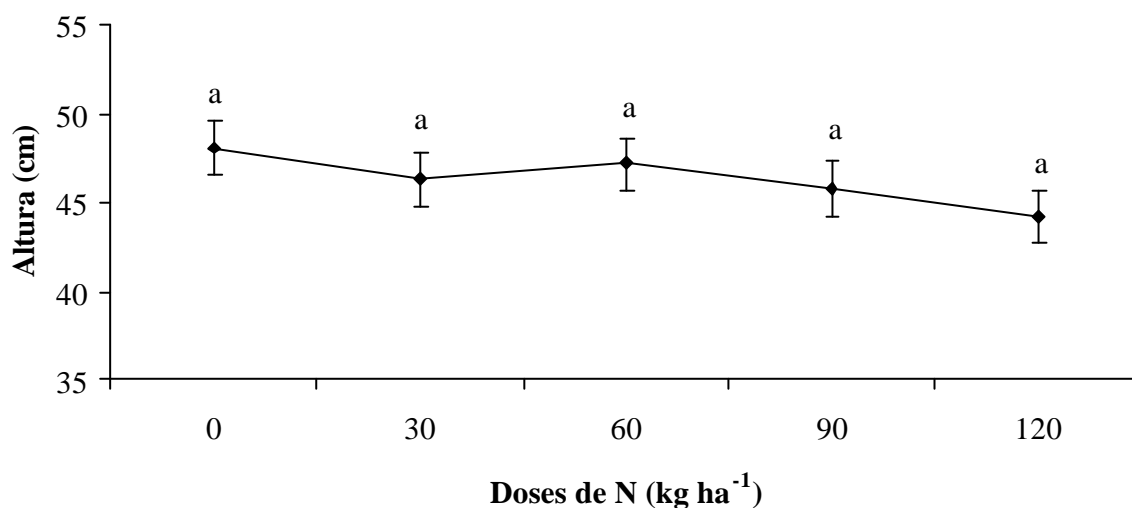
Nitrogênio total na biomassa seca de palha e grãos de sorgo granífero sob cinco níveis de adubação nitrogenada. Pontos seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de regressão a 5 % de probabilidade. Médias de 6 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média (+/-)



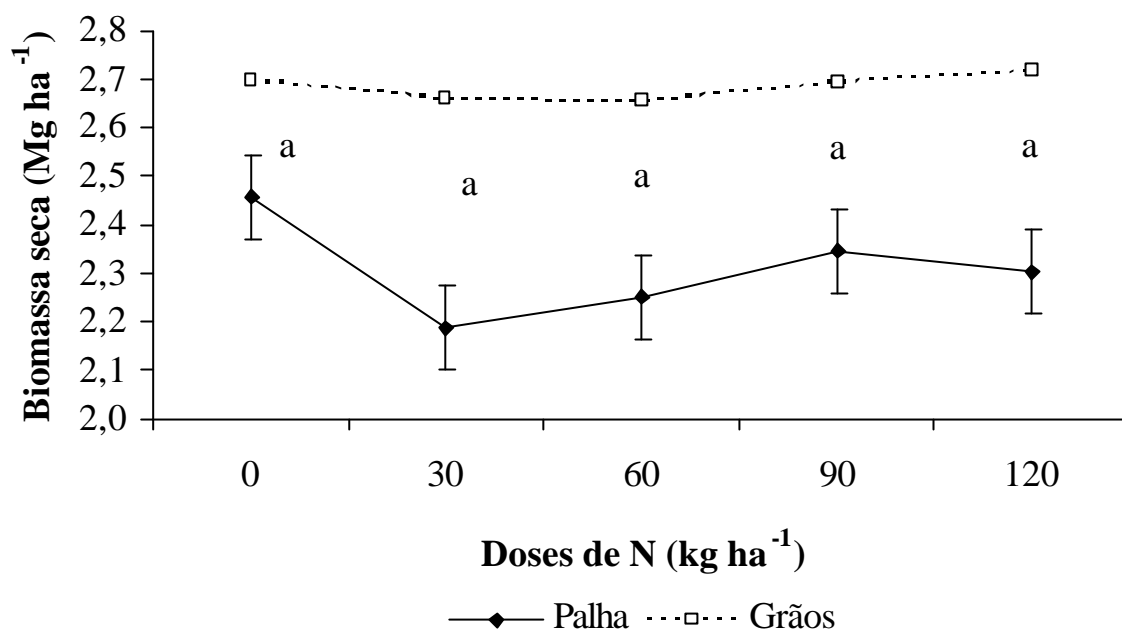
Altura média após 40 dias da emergência de sorgo forrageiro sob cinco níveis de adubação nitrogenada. Pontos seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de regressão a 5 % de probabilidade. Médias de 8 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média (+/-)



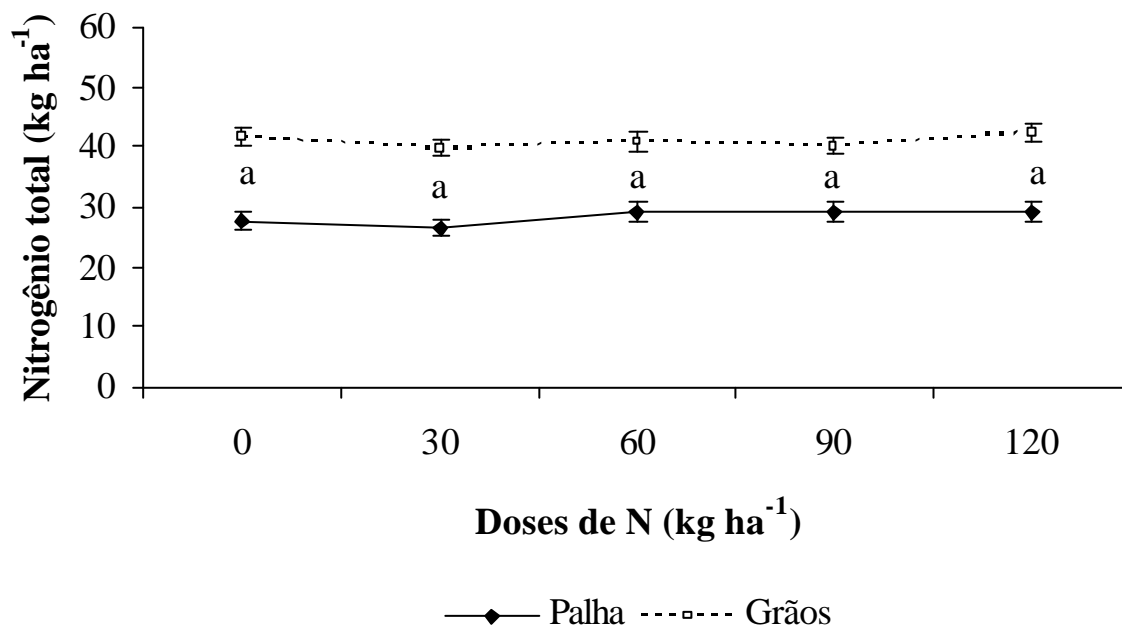
Produtividade média de biomassa de sorgo forrageiro sob cinco níveis de adubação nitrogenada. Pontos seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de regressão a 5 % de probabilidade. Médias de 8 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média (+/-)



Altura média após 40 dias da emergência de sorgo sacarino sob cinco níveis de adubação nitrogenada. Pontos seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de regressão a 5 % de probabilidade. Médias de 8 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média (+/-)



Produtividade média de biomassa de sorgo sacarino sob cinco níveis de adubação nitrogenada. Pontos seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de regressão a 5 % de probabilidade. Médias de 8 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média (+/-)



Nitrogênio total na biomassa seca de palha e grãos de sorgo sacarino sob cinco níveis de adubação nitrogenada. Pontos seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de regressão a 5 % de probabilidade. Médias de 8 repetições. Barras verticais representam o erro padrão da média (+/-)