

COMO FAZER UMA AGRICULTURA VERDE USANDO O MAIS ANTIGO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NITROGÊNIO EM PLANTAS

VERONICA MASSENA REIS¹

¹Embrapa Agrobiologia. Km 07 da BR 465, Seropédica, Rio de Janeiro, CEP 23890-000. E-mail: veronica@cnpab.embrapa.br

Abstract: Around 78% of the air is composed by nitrogen and this element is the third most important to the maintenance of life on the planet, after the carbon (C) and oxygen (O). The great paradox is life in earth it that this gas (N₂) is inert and can only be reduced to a form assimilated by plants by different genus of bacteria called diazotrophs. These bacteria interact with other organisms including agricultural crops as the most famous one, the rhizobia of soybean. Another example recently incorporated to the cereal production routine is the application of another bacterium called *Azospirillum brasilense* described by the research group of Johanna Döbereiner in the 80's. The association of diazotrophs and grasses has been studied for about 60 years and revealed that in addition to providing nitrogen to the crops (contributing with up to 58% of its necessity), can also produce phyto-hormones, act as a biocontrol agents, solubilize phosphates and some other features; helping plants in the response of environmental stresses and reflecting in crop productivity using reduced doses of N-fertilizer. With the objective of develop a crop management based on biological nitrogen fixation and a recommendation of inoculant application in order to improve the utilization of N-fertilizers, also preconized by the green revolution, made this research recognized worldwide for its innovation that advocates the use of a conservative practice, keeping the man in the field, producing more without harming the environment.

Key-words: nitrogen, fertilizer, bacteria, inoculant, bio-fertilizer.

INTRODUÇÃO

Dois processos físico-químicos de obtenção de energia e produção de proteínas são considerados fundamentais para a formação da cadeia de suporte de vida neste planeta. A evolução da vida fez com que a nossa atmosfera fosse rica em nitrogênio, sendo este elemento muito estável devido a sua tripla ligação. Ao redor de 78% do ar que respiramos é composto de N₂ e depois do carbono e do oxigênio obtidos da fotossíntese ($12\text{H}_2\text{O} + 6\text{CO}_2 \rightarrow 6\text{O}_2 + 6\text{H}_2\text{O} + \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}$) é o elemento utilizado em maior

quantidade pelas plantas. O grande paradoxo é que este gás inerte (N₂) pode ser reduzido a uma forma assimilável pelos vegetais (NH₃⁺) de três maneiras: 1. quebra natural abiótica que são as descargas elétricas; 2. quebra físico-química utilizando grandes quantidades de energia e sendo a patente deste processo descrita em 1930 como processo Harbor-Bosch, que utiliza temperaturas em torno de 400-600°C e pressões em torno de 100-200 atm para a redução; ou 3. quebra biológica realizada por microrganismos unicelulares, os procariotos, que sintetizam o complexo enzimático denominado nitrogenase (N₂ase) e

e são responsáveis por fixar valores em torno de 2×10^{13} g/ano de nitrogênio nos sistemas terrestres e aquáticos. Estes microrganismos são denominados diazotróficos e se associam a outros organismos, incluindo as plantas. Como só procariotos possuem os genes funcionais para esta síntese enzimática, preconiza-se que a necessidade de fixar N_2 ocorreu nos primórdios da evolução procariótica (Raymond et al., 2004).

O exemplo de utilização de bactérias diazotróficas na agricultura e responsável pelo sucesso do agronegócio da soja, é a utilização do rizóbio. Esta bactéria diazotrófica coloniza as raízes desta leguminosa e vem sendo aplicado na forma de inoculante (ou biofertilizante) contendo células vivas cultivadas em laboratório, a mais de 70 anos (primeira descrição foi feita em 1887, por Beijerinck). Os nódulos, estruturas biológicas formadas a partir da interação planta-bactéria diazotrófica, são hipertrofia radicular visíveis ao olho nu e permitem fixar o nitrogênio do ar necessário para o crescimento e produção de grãos, dispensando totalmente o uso de N-fertilizante.

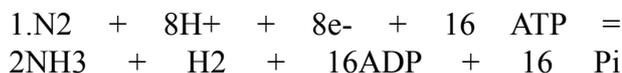
Outro exemplo nacional e recentemente incorporado a rotina de produção de cereais, é a aplicação de outra bactéria denominada *Azospirillum brasilense*, que foi descrita pela pesquisadora Johanna Döbereiner na década de 80 a partir de amostras de rizosfera de plantas utilizadas em gramados (*Paspalum notatum*). Esta última associação vem sendo estudada no Brasil desde a década de 50 e revelou que os diazotrófos, além de disponibilizarem N para as plantas (contribuindo com até 58% de sua necessidade), podem atuar no crescimento destas pela produção de hormônios, no biocontrole de fitopatógenos e na resposta da planta ao estresse ambiental, com reflexos na produção e na redução do uso de N-fertilizante.

A seleção de estirpes de bactérias diazotróficas eficientes e a sua utilização como um produto biológico na agricultura, culmina com a recomendação agrônômica desta prática. Para isto o Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) certifica que o produtor utilize somente as melhores estirpes testadas no Brasil

e recomendadas pela pesquisa (<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes/registro>) e também preconiza os testes necessários para que a indústria possa comercializar os insumos biológicos no país. Esta é a história que vamos apresentar neste documento.

A NITROGENASE – QUEM PODE REDUZIR O NITROGÊNIO ATMOSFÉRICO

O complexo denominado de nitrogenase é o responsável pela quebra do N_2 gás em NH_3^+ , a um custo energético elevado para a célula. Este complexo é composto de duas metaloproteínas também denominadas de sub-unidades ou componentes, e podendo variar de acordo com o substituinte de uma das subunidades. A mais estudada é a que contém Ferro (Fe-Co) no componente I e Ferro + Molibdênio no componente II (FeMo-Co). Vários genes controlam o seu funcionamento, sendo tradicionalmente denominados de nif (Howard & Rees, 2006). Em teoria, para cada molécula de nitrogênio reduzido, são necessários 16 moléculas de ATP. A estequiometria da reação de redução do N_2 até NH_3 é apresentada na equação



As vias metabólicas do carbono e do nitrogênio estão interligadas de várias maneiras. Ambas as vias utilizam a energia, os esqueletos de carbono e o poder redutor advindos do metabolismo celular primário da célula. Estudos recentes têm demonstrado que o metabolismo tanto do C como do N é acionado ao mesmo tempo e coordenados pelo hospedeiro, isto é, o organismo que fornece o carbono (Figura 1). De acordo com Vance (1992), os dois metabolismos estão integrados na fixação de N_2 nos nódulos, sendo a sacarose o primeiro esqueleto de carbono translocado para esta estrutura, embora não seja diretamente utilizada pelo rizóbio em sua fase celular denominada de bacteroide. Neste caso, a célula do rizóbio cessa o processo de divisão celular e uma vez funcional o com-

cessa o processo de divisão celular e uma vez funcional o complexo nitrogenase, utiliza a energia (ATP) para a redução do N₂. Neste ponto a sacarose entra na via metabólica para a produção de malato e succinato (via da síntese sucrose e glicose) em coordenação com o ciclo de Krebs (ciclo de Krebs = tricarboxílico ou do ácido cítrico - TCA), suprimindo a célula de energia. Em síntese, a inter-relação dos metabolismos de C e N tem como base o fato de que o nitrogênio é usado na produção dos órgãos fotossintéticos e o carbono produzido nesses órgãos é necessário para fornecer a energia utilizada na fixação do nitrogênio gasoso.

Estes elétrons também participam da via de redução de nitrato (enzima nitrato redutase) e da assimilação do nitrogênio nos compostos proteicos. Nos nódulos, a amônia sintetizada é rapidamente incorporada a íons hidrogênio (H⁺), abundantes nas células das bactérias, ocorrendo a transformação em íons amônio (NH₄⁺) que serão, então, distribuídos para a planta hospedeira e incorporados em diversas formas de N orgânico, como os ureídeos, aminoácidos e amidas (Hungria et al., 2007).

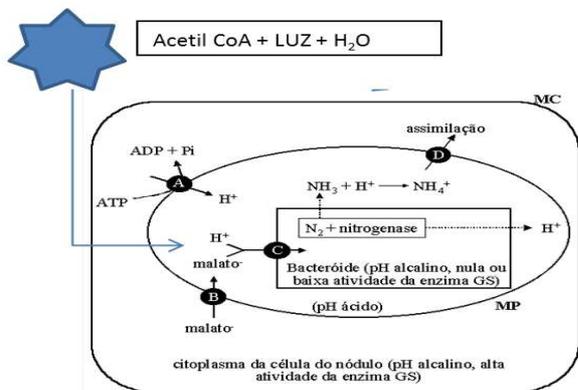


Figura 1: esquema mostrando como funciona a fixação biológica de nitrogênio nos nódulos. Os elétrons são transportados da ferredoxina reduzida (ou flavodoxina) via a azoferredoxina para a molibdênio ferredoxina. Cada mol de nitrogênio fixado requer 16 moles de ATP hidrolisado pela proteína NIFH. O NH₃ produzido é utilizado na síntese de glutamina ou glutamato, respectivamente, para o metabolismo do nitrogênio (Kneip et al., 2007; modificado)

A NITROGENASE FUNCIONAL: OXIGÊNIO E NITROGÊNIO REGULAM SUA SÍNTESE E ATIVIDADE

Por ser uma enzima redutora, o oxigênio reprime a expressão da nitrogenase ou a inativa quando já sintetizada e em funcionamento. No caso dos microrganismos diazotróficos aeróbicos, que precisam de oxigênio para crescer; alguns mecanismos de proteção podem atuar quando o processo de fixação biológica de nitrogênio está ativo. Este paradoxo, onde a redução ocorre em anaerobiose, mas na maioria dos casos a bactéria é aeróbica ou o ambiente ao redor é rico em oxigênio, mostrou adaptação evolutiva. A barreira física criada pela célula vegetal que circunda o nódulo reduz a passagem do O₂ e no centro ativo onde ocorre a redução. Neste local existe a formação de uma substância, a Leg-hemoglobina (chamada assim por ser vermelha como o nosso sangue), que protege o sítio de redução da nitrogenase e, portanto, somente nódulos ativos e de coloração rósea, estão realmente fixando nitrogênio.

Nos outros casos de associações com plantas não nodulíferas, a célula bacteriana lança mão de diversos artifícios para baixar a pressão interna de O₂, e permitir que a bactéria reduza o nitrogênio. Na maior parte dos casos este é um fenômeno populacional, isto é, um aglomerado celular respira o O₂ reduzindo a pressão e agindo como uma barreira viva que permite que a bactéria localizada no interior do aglomerado celular seja capaz de controlar o ótimo de difusão do oxigênio para que ocorra a síntese da nitrogenase ou mesmo a mantenha funcional.

O exemplo mais fácil de observar este fenômeno é a colônia de bactérias em placas de meio sólido, onde as células mais externas estão mortas ou produzindo exopolissacarídeos que protegem o interior, onde as células estão metabolicamente ativas e com reduzido acesso ao O₂. Outro modo de visualizar a proteção ao oxigênio e a síntese da nitrogenase é a utilização de meios de cultivo semi-gelificados ou semi-sólidos sem adição de fontes de N, onde ocorre a migração da população de bactérias diazotróficas de profundidades em torno de 2-3 mm (in-

terior do meio onde é feita a inoculação), onde a difusão do O₂ é quase zero (0,1 a 0,2 kPa), para a superfície onde a concentração está próxima de 20 kPa (Reis et al., 2005). A disponibilidade energética da célula, idade fisiológica, concentração de oxigênio, presença de alguns aminoácidos essenciais, disponibilidade de oxigênio e nitrogênio em excesso (principalmente o amônio) são alguns dos fatores que inibem a atividade da nitrogenase. Maiores detalhes ler Broughton et al., (2000) e Udvardi et al. (2007).

TAXONOMIA DOS DIAZOTRÓFOS

Todos os microrganismos fixadores de nitrogênio são procariotos (sem membrana nuclear, material genético disperso no citoplasma) e esta habilidade está distribuída entre os reinos Archaea (bactéria ancestral) e Eubacteria (bactéria verdadeira). Utilizando a atual nomenclatura taxonômica, que é baseada nos genes ribossômicos (Raymond et al., 2004).

A análise de sequências de genes nif (estruturais da enzima) mostrou que genes homólogos existem em uma grande variedade de procariotos e levou a especulação da existência de uma ancestral comum onde todos os organismos possuíam este sistema biológico de fixação.

Dentro do filo proteobacteria, as alfa-proteobacterias são as mais estudadas devido ao conhecimento da simbiose do rizóbio. A taxonomia atual também identificou vários organismos descritos como “Candidatus”, isto é, tem-se a sequência de genes, mas não se conhece o indivíduo, isto é, não se consegue cultivá-lo e sem o indivíduo, não se pode dar o nome de espécie.

Como a classificação atual muda quase que a todo instante, já que o estudo de sequenciamento de genes é dinâmico e os de ecologia precisam da classificação taxonômica para formular hipóteses, é mais fácil descrever nichos ecológicos e tentar organizar os estudos taxonômicos no enfoque evolutivo.

Dentro desta abordagem podemos subdividir as bactérias diazotróficas de acordo com o habitat e nesta revisão daremos ênfase as associações terrestres e de interesse agrícola:

1. Bactérias de vida livre ou saprófitas;
2. Associativas-endofíticas;
3. Simbióticos como o caso do rizóbio.

As bactérias de vida livre são descritas como aquelas que vivem no solo de forma tão eficiente como quando associadas a plantas, já que possuem um metabolismo bastante versátil e capaz de utilizar diversas fontes de carbono para a sua sobrevivência. As do grupo 2, denominadas ao longo das décadas de associativas e/ou endofíticas, colonizam partes do vegetal como a rizosfera (região limítrofe entre o solo e a planta), o rizoplano (ou endorizosfera) e podem invadir os espaços intercelulares entre células vegetais (apoplasto) ou vasos condutores como o floema e o xilema, formando pequenos aglomerados.

Na tentativa de dividir o comportamento da espécie de bactéria a características benéficas a planta em estudo, estas associações não são consideradas patogênicas e podem ser utilizadas pela ciência como bactérias capazes de promover o crescimento de plantas de forma direta ou indireta (Elmerich, 2007; Hardoim et al., 2008; ; Reis et al., 2011; van Loon 2007).

O termo endófito foi primeiramente utilizado para associações fúngicas e depois estendido para associações de bactérias. Neste caso alguns autores subdividem o termo em endófitos obrigatórios e facultativos, sendo este caráter relacionado com a competência da espécie em sobreviver no ambiente, neste caso o solo (Baldani et al., 1997).

O que deve ficar claro é que estamos tratando de bactérias não patogênicas e que uma mesma espécie pode habitar diferentes nichos e dependendo do hospedeiro, pode ser classificada como endofítica, simbiótica, ou saprófita, como o caso do rizóbio. A interação planta-bactéria comanda esta classificação (Figura 3).

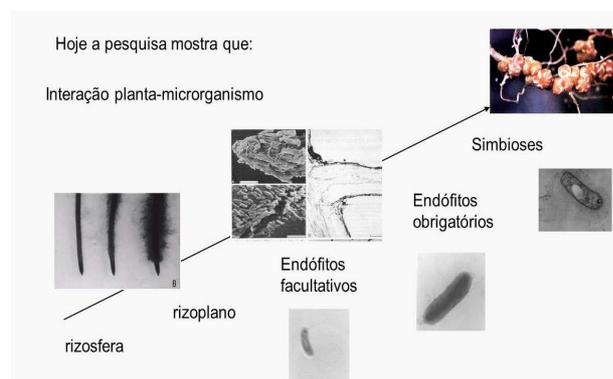


Figura 3: Estudos ecológicos de colonização de bactérias diazotróficas em consonância com os estudos de evolução de plantas e complexidades de genes. Classificação didática utilizada nesta revisão e baseada nos trabalhos de Reis et al., (2000; 2011) e Baldani et al., (1997).

FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO E O AMBIENTE

Independente do tipo de associação entre a planta e a bactéria, o genótipo da planta exerce grande influência. Na simbiose, a especificidade hospedeira é um exemplo deste controle entre os componentes da interação (planta = cultivar + bactéria = estirpe ou cepa). No caso das associativas, endofíticas e de vida livre, esta associação é menos exigente e uma mesma estirpe pode causar sintomas semelhantes da interação em diferentes espécies de plantas (ex: *Azospirillum* inoculado em milho, feijão, café (Dobbelaere et al., 2003). O estudo de seleção de variedades/híbridos ou mesmo a domesticação e geração de ecótipos mostra claramente que vale a pena selecionar plantas que se beneficiem da associação com bactérias diazotróficas.

O lançamento de qualquer cultivar na agricultura só é relevante se o agricultor obtiver maiores ganhos com menores custos operacionais, e neste sentido a revolução verde trouxe ganhos de produtividade a campo. Como o nitrogênio é um elemento limitante e seus sintomas de deficiência são facilmente identificados, as cultivares atuais de soja foram selecionadas para aumento de produtividade em associação com estirpes eficientes de rizóbio (*Bradyrhizobium*). Por ser uma planta exótica ao Brasil, o melhoramento genético foi beneficiado pela ausência do simbionte, e onde não havia a bactéria e não

se aplicava N-fertilizante, o sintoma de déficit de N foi facilmente adotado pelos geneticistas como indicativo de variedades responsivas a utilização do rizóbio, trazendo o binômio soja/inoculante = aumento de produtividade e rentabilidade para o país. As outras associações entre diazotrofos e plantas de interesse agrícola não foram diretamente beneficiadas pelo exemplo da soja. O feijão comum, o caupi, o amendoim, e outras plantas arbóreas como a leucena, ou forrageiras como o estilosantes, foram estudados por diferentes grupos de pesquisa brasileiros e mostraram que a inoculação pode gerar benefício ao agricultor. Hoje temos produtos e estirpes recomendadas para diversas culturas e podemos obter ganhos como os já descritos para a soja. Estas pesquisas não são recentes, mas a realidade ainda é outra. Mais de 95% do mercado de inoculantes no Brasil destina-se a atender a cadeia produtiva da soja e está organizado no Centro-Sul do País. Mais de 10 empresas comercializam ao redor de 22 milhões de doses, o que teoricamente representariam 22 milhões de hectares (1 dose por hectare). O plantio de soja cresceu do centro-sul para o meio norte, chegando a ser utilizada em todas as regiões agrícolas brasileiras. O mercado de produtos para a cultura é a grande vedete do agronegócio por ser a “commodity”, isto é, um bem fungível, ou seja; é equivalente e trocável por outro igual independentemente de quem a produz. Para ser mais rentável, tem que produzir mais com menor custo e competir no mercado internacional. As outras leguminosas que também poderiam se beneficiar do uso racional do N-fertilizante, não impactam nem 5% do negócio de inoculantes neste país. Utilizar um produto biológico e reduzir os gastos com N-fertilizante faz parte de uma estratégia de mercado onde o uso racional de doses de N versus ganhos reais de produtividade não era prioritário. O preço do insumo era a diferença entre a utilização ou não desta tecnologia.

Em preços atuais, o quilo de fertilizante nitrogenado vendido na forma de uréia, oscila entre US\$ 0,6 a 1,2. O inoculante da soja é vendido, a mais de 10 anos, pelo valor de apenas um dólar

devido ao seu baixo custo de formulação. Não se compara a aplicação mínima de qualquer insumo agrícola, mas ao mesmo tempo é pouco valorizado pelo agricultor. A utilização crescente de fertilizantes nitrogenados, principalmente os nitratos, são agentes de poluição direta desde que não assimilados pelo vegetal nas doses corretas. Cerca de 40 a 50% do N-fertilizante aplicado na agricultura é perdido, seja para o lençol freático seja para o ar na forma de gases. Neste caso, as perdas gasosas na forma de N₂O são bem menores (cerca de 1% do N aplicado retorna ao ar nesta forma), mas em termos de equivalência, 1 mol de N₂O é igual a 300 moles de CO₂. Neste cenário, a aplicação desenfreada de fertilizantes nitrogenados impacta diretamente o ambiente. Tirando a visão imediatista de custo/benefício do agricultor, mas pensando que o Brasil não é produtor de fertilizante nitrogenado, a cadeia produtiva brasileira é diretamente ligada a importação de fertilizantes nitrogenados e sua rentabilidade vinculada aos preços do petróleo, fonte energética usada para produzir uréia (processo Harbor-Bosch). Neste caso podemos dizer que a revolução realmente verde começa agora.

APLICAÇÕES NA AGRICULTURA

A produção de grãos pode ser barateada com o aumento da dependência das plantas pela FBN, inclusive para fins de produção de biocombustíveis onde há dependência de sistemas que possuam um balanço energético positivo, ou seja, menor energia gasta para produzir o combustível do que a gerada pelo mesmo. Na Europa e EUA, a elevada mecanização da agricultura e o uso de níveis elevados de fertilizantes, principalmente os nitrogenados, resultam em um gasto maior de energia do que a produzida pelos diversos biocombustíveis disponíveis. No Brasil, devido a falta de subsídios para fertilizantes, os adubos químicos nitrogenados comerciais são usados normalmente em doses menores que um quinto das aplicadas nos países industrializados. Isso acarretou, ao longo de décadas e para diversas culturas, a seleção natural ou

melhoramento de genótipos com capacidade de se associarem com bactérias fixadoras de N₂, obtendo-se assim grande parte do N necessário através da FBN. Por esta razão, o Brasil assumiu a liderança nas pesquisas sobre produção de grãos com níveis muito baixos de adubação nitrogenada, sem diminuição da produtividade.

A cultura de cana de açúcar é um exemplo deste melhoramento adaptado às condições de cultivo brasileiras, onde metade das necessidades de N advém do processo natural de fixar nitrogênio (Urquiaga et al., 2012, Schultz et al., 2012) e da presença de uma grande diversidade de espécies de bactérias diazotróficas que colonizam diversas partes da planta (Silva et al., 2003; Taule et al., 2012, Fisher et al., 2012).

Mas quais são as necessidades de nitrogênio de culturas onde não há a formação dos nódulos? Podemos notar, na tabela abaixo, que as necessidades de nitrogênio fertilizante para produzir apenas grãos ou colmos frescos de cana de açúcar, por exemplo, demandam a aplicação de quantidades de fertilizante em torno de 100 kg de uréia (se 100% fosse aproveitada pela planta). Como em média perde-se 40 a 50% do N aplicado na forma de uréia, temos então o dobro de gastos de fertilizante apenas falando do nitrogenado. Novas formulações que liberam lentamente este N no solo estão em desenvolvimento ou já a disposição do agricultor, mas também custam mais.

Tabela 1: Necessidade de N em diferentes culturas. Cultura agrícola N-retirado do sistema
Quantidade de N em fertilizante = Kg de uréia*
*Assumindo 100% de eficiência de utilização.

Cultura agrícola	N-retirado do sistema	Quantidade de N em fertilizante = Kg de uréia*
Arroz	16-17 kg N/Mg grão secos	1 Mg de grãos = 34 kg 3 Mg (média) = 102
Trigo	26-28 kg N/Mg grão secos	1 Mg de grãos = 56 2 Mg média = 112
Milho	9-11 N/Mg grão secos	1 Mg de grãos = 22 5 Mg média = 110
Cana-de-açúcar	1,45 kg de N/Mg colmos frescos 7 kg N / Mg MS ha = 116-274 kg N/ha	1 Mg colmos frescos = 2,9 100 Mg = 290 retirado da lavoura

Mas a pesquisa mostra que a manutenção de palha no campo, o plantio direto e a FBN; podem contribuir na eficiência de uso do N-fertilizante e a rotação de culturas, incluindo leguminosas de grãos, por exemplo, deixam no campo maiores quantidades de matéria orgânica com baixa relação C/N, que bem manejadas podem contribuir com a redução de doses de N-fertilizante, sem reduzir os ganhos de produtividade (Boddey et al. 2010). Veja que a retirada de N do sistema é diretamente ligada a produtividade, e na tabela não está o gasto vinculado ao potencial máximo produtivo de cada genótipo, mas a média de produções do Brasil. E o processo biológico de fixar nitrogênio em gramíneas (cereais/ forrageiras/ energéticas) pode reduzir os gastos de N a zero? Os estudos têm mostrado que no melhor dos casos para plantas como o arroz e a trigo, menos de 20 % do N advém do processo biológico (Fages, 1994; Okon & Labandera-Gonzalez, 1994). Outras culturas podem se beneficiar de contribuições maiores como o caso da cana de açúcar e do capim elefante (Boddey et al., 2012, da Moraes et al., 2012) mas a redução total, como o caso da soja, ainda não será recomendada com o atual conhecimento da pesquisa. Independente da efetividade ou eficiência do processo de fixar nitrogênio e do hospedeiro de interesse da pesquisa, muito se fez para levar ao campo o melhor da pesquisa científica. Entretanto o ensino de agronomia no país ainda está baseado nos conceitos preconizados pela revolução verde, isto é, aumentos de produção obtidos pela utilização crescente de insumos incluindo doses elevadas de calcário e/ou fertilizantes. Genótipos cada vez mais responsivos a aplicação de pacotes tecnológicos buscando produzir mais por área. Independente de qual seja o pesquisador, este princípio era válido na década de 70. Hoje podemos produzir 12 Mg de milho por hectare a cada safra, 6 Mg de soja mas esquecemos que a quantidade de insumos aplicados no solo e não utilizados pela cultura subsequente impacta diretamente no lençol freático dos rios e aumenta na mesma proporção as emissões de gases de efeito estufa. Se a

revolução foi verde, ela agora tem que ser azul.

AGRADECIMENTOS

A EMBRAPA projeto 02.09.01.011; ao CNPq pela bolsa de pesquisa e a FAPERJ pela bolsa "Cientista do Nosso Estado". Ao INCT-FBN e ao MCT-CT Agro. Proj. no. 558329/2009-8.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDANI J I, CARUSO L, BALDANI V L D, GOI S R AND DOBEREINER J 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol Biochem* 29: 911-922.

BODDEY R M , URQUIAGA S AND REIS V M 2012. Agronomic evaluation of varieties of sugar cane inoculated with diazotrophic bacteria and fertilized with nitrogen *Pesq Agrop Bras* 47: 261-268.

BODDEY R M, JANTALIA C P, CONCEIÇÃO P C, ZANATTA J A, BAYER C, MIELNICZUK J, DIECKOW J, DOS SANTOS H P, DENARDIN J E, AITA C, GIACOMINI S J, ALVES B J RAND URQUIAGAS 2010. Carbon accumulation at depth in Ferralsols under zero-till subtropical agriculture *Global Change Biol* 16: 784-795.

PERRET X; STAEHELIN C; BROUGHTON WJ 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 180-201.

COUTINHO R P, URQUIAGA S, BODDEY R M, ALVES B J R, TORRES A Q A AND JANTALIA C P, 2010. Carbon and nitrogen stocks and N₂O emission under different land use in Atlantic Forest biome. *Pesp Agrop Bras* 45: 195-203.

DE MORAIS R F, QUESADA D M, REIS, V M, URQUIAGA S, ALVES B J R AND BODDEY R M 2012. Contribution of biological nitrogen fixation to Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) *Plant Soil* 356: 23-34.

DOBBELAERE S, VANDERLEYDEN J AND OKON Y 2003. Plant growth pro-

- moting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit Rev Plant Sci* 22:107-149.
- SIMÕES-ARAÚJO J L, REIS V M, PEREIRA W, ORMENO-ORRILLO E, HAI B, HOFMANN A, SCHLOTTER M, MARTINEZ-ROMERO E, BALDANI J I AND HARTMANN A 2012. Molecular characterisation of the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum* sp.) *Plant Soil* 356: 83-99.
- KNEIP C, LOCKHART P, VOSS C, MAIER U G 2007. Nitrogen fixation in eukaryotes – new models for symbiosis. *BMC Evol Biol* 7, 55. DOI: 10.1186/1471-2148-7-55.
- HARDOIM P R, VAN OVERBEEK L S AND VAN ELSAS J D 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol* 16: 463-471.
- HOWARD J B AND REES D C 2006. How many metals does it takes to fix N₂? A mechanistic overview of biological nitrogen fixation. *PNAS* 103: 17088-17093.
- HUNGRIA M, CAMPO R J AND MENDES I C 2007. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa CNPSo. 80 p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).
- OKON Y AND LABANDERA-GONZALEZ C A 1994 Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol Biochem* 26: 1591-1601.
- RAYMOND J, SIEFERT J L, STAPLES R AND BLANKENSHIP R E 2004. The natural history of nitrogen fixation. *Mol Biol Evol* 21: 541-554.
- REIS V M, BALDANI V L D AND BALDANI J I 2005. Ecologia, isolamento e identificação de bactérias diazotróficas. I. Adriana Maria de Aquino; Renato Linhares. (Org.). *Processos Biológicos no Sistema Solo-Planta: Ferramentas para uma agricultura sustentável*. 1 ed. Brasília: Embrapa informação tecnológica, v. 1, p. 257-279.
- REIS V M, BALDANI J I, BALDANI V L D AND DÖBEREINER J 2000. Biological nitrogen fixation in gramineae and palm trees. *CRC Crit Rev Plant Sciences* 19: 227-247.
- REIS V M, SPAEPEN S AND VANDERLEYDEN J 2011 Bacterial endophytes. N₂-fixing endophytes in grasses/cereals and molecular signals involved. In: *Ecological aspects of plant nitrogen metabolism*. Ed. Wiley-Blackwell, JC Polacco, CD Todd, eds. B. Epi and Endo-phytic microbes.
- SILVA L G, MIGUENS F C AND OLIVARES F L 2003. *Herbaspirillum seropedicae* and sugarcane endophytic interaction investigated by using high pressure freezing electron microscopy. *Braz J Microbiol* 24 69-71.
- SCHULTZ N, MORAIS R F, DA SILVA J A, BAPTISTA, R B, OLIVEIRA R P, LEITE J M, PEREIRA W, CARNEIRO JUNIOR, J DA B, ALVES B J, BALDANI J I, TAULE C, MAREQUE C, BARLOCCO C, HACKEMBRUCH F, REIS V M, SICARDI M AND BATTISTONI F 2012. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. *Plant Soil* 356: 35-49.
- UDVARDI M K, KAKAR K, WANDREY M, MONTANARI O, MURRAY J, ANDRIANKAJA A, ZHANG J Y, BENEDITO V, HOFER J M, CHUENG F, TOWN C D 2007. Legume transcription factors: global regulators of plant development and response to the environment. *Plant Physiol* 144: 538–549.
- URQUIAGA S, CRUZ K H S AND BODDEY R M 1992. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane N-15 and nitrogen balance estimates. *Soil Sci Soc Am J* 56: 105-114.

URQUIAGA S, XAVIER R P, DE MORAIS R F, BATISTA R B, SCHULTZ N, LEITE J M, SA J M E, BARBOSA K P, DE RESENDE A S, ALVES B J R, BODDEY R M 2012. Evidence from field nitrogen balance and N-15 natural abundance data for the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. *Plant Soil* 356: 5-21.

VANCE C P, GANTT J S 1992. Control of nitrogen and carbon metabolism in root-nodules. *Physiol Plantarum* 85: 266-274.

VAN LOON L C 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol* 119: 243-254.