



FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO NA CULTURA DO MILHO

Isabel Cristina Vinhal-Freitas, Mariana Bueno Rodrigues

Universidade Federal de Uberlândia

RESUMO

O nitrogênio é frequentemente o nutriente mais limitante à produção das culturas, uma vez que apenas uma fração do nitrogênio atmosférico é disponibilizada para as plantas através da fixação biológica de nitrogênio (FBN). Aumentar a capacidade de FBN às plantas que não são leguminosas seria uma tecnologia útil para aumentar o rendimento das culturas entre os agricultores com poucos recursos. As técnicas de manipulação genética podem ser utilizadas para a eficiência dessa tecnologia. Entretanto, quanto maior a compreensão sobre a bioquímica e fisiologia da FBN, parece menos provável que este objetivo seja alcançado “simplesmente” através da transferência de genes para a fixação de nitrogênio às culturas. Do N total aplicado a uma cultura, raramente mais do que 50% é assimilado, e muitas vezes a eficiência de utilização é muito menor. O processo natural de fixação biológica de nitrogênio (FBN) tem um papel fundamental no desenvolvimento de uma agricultura sustentável. Esse processo minimiza a necessidade de adubação nitrogenada, concomitante aos efeitos benéficos decorrentes sobre o ciclo global do nitrogênio, o aquecimento global, e contaminação no solo e da água. Esse processo natural é dependente de microorganismos em simbiose ou associação com as plantas.

Palavras-chave: *bactérias diazotróficas, bactérias endofíticas, FBN, Azospirillum sp.*

INTRODUÇÃO

Os fertilizantes nitrogenados representam 75% dos custos da adubação do milho, o que corresponde a cerca de 40% dos custos totais de produção da cultura (MACHADO et al., 2001). Coelho & França (1995) mostraram que na produtividade de 3,65 Mg ha⁻¹, são extraídos 77 kg de N e, na produtividade de 5,8 Mg ha⁻¹, a extração de N chega a 100 kg ha⁻¹. Uma alternativa para a economia de fertilizante nitrogenado é a fixação biológica de nitrogênio (FBN).

Recentemente, os sistemas agrícolas têm sofrido mudanças com o objetivo de promover a melhoria da qualidade ambiental e evitar a degradação do solo. O manejo do solo e a exploração da biodiversidade dos sistemas agrícolas têm sido utilizados para otimizar a produção e a sustentabilidade dos ecossistemas. Neste sentido, a associação de cereais e gramíneas com bactérias diazotróficas endofíticas pode representar uma das

alternativas mais promissoras para a promoção do crescimento das plantas, manejo do solo e qualidade ambiental.

Considerando o cultivo do milho, sabe-se que o rendimento é o resultado do potencial genético da semente, das condições edafoclimáticas, do local de semeadura e do manejo adotado na lavoura. Deste modo, na moderna agricultura, para se alcançar rendimentos máximos nos cultivos de cereais, como o milho, são necessárias abundantes quantidades de fertilizantes, especialmente também os nitrogenados.

Nos últimos 20 anos foram feitas descobertas sobre o potencial das bactérias diazotróficas microaeróbias, do gênero *Azospirillum*, fixadoras de nitrogênio atmosférico, quando em vida livre (BODDEY & DÖBEREINER, 1995) as quais, quando associadas à rizosfera das plantas podem, contribuir com a nutrição nitrogenada dessas plantas, tornando-se alvo de

estudo por parte de pesquisadores em biologia e fertilidade do solo. Assim sendo, o manejo correto dessa possível associação *Azospirillum* spp - Milho poderá resultar em incrementos de produtividade e em diminuição dos custos de produção, principalmente da aquisição de fertilizantes nitrogenados (OKON & VANDERLEYDEN, 1997) que são de uso intensivo na cultura do milho.

Organismos fixadores de nitrogênio

A fixação biológica do nitrogênio é realizada por determinados procariontes, denominados organismos fixadores de nitrogênio, que possuem a enzima nitrogenase. Os organismos fixadores podem ser de vida livre ou viver em associações.

A fixação de nitrogênio efetuada pelos organismos de vida livre está estimada em menos de 5 kg ha⁻¹ ano⁻¹. Nesse grupo encontram-se bactérias autotróficas e heterotróficas, as quais distinguem-se quanto à eficiência do processo de fixação.

Bactérias diazotróficas endofíticas podem estimular o crescimento das plantas, aumentar a resistência a doenças bem como promover a fixação biológica do nitrogênio (BASHAN et al., 2004). Além disso, diazotróficos endofíticos podem apresentar vantagens em relação aos diazotróficos associados às raízes uma vez que estes se encontram mais bem localizados para explorar as fontes de carbono disponibilizadas pelas plantas. Em adição, os diazotróficos endofíticos colonizam nichos específicos no interior das plantas que apresentam reduzida tensão de oxigênio, a qual é necessária para a expressão da nitrogenase (DOBBELAERE et al., 2003). As plantas são consideradas um complexo microecossistema, composto por diferentes habitats e podem ser colonizadas simultaneamente por uma grande diversidade de bactérias endofíticas (LODEWYCKX et al., 2002). Tal diversidade pode representar uma grande fonte de biodiversidade, largamente inexplorada.

A simbiose com as gramíneas

Algumas gramíneas de interesse econômico, como milho, arroz e trigo, podem estar associadas com bactérias do gênero *Azospirillum*. Outros exemplos importantes seriam a associação de bactérias do gênero *Beijerinckia* com cana-de-açúcar, *Azotobacter paspali* com a grama batatais (*Paspalum notatum*) e determinados cultivares de trigo com espécies do gênero *Bacillus*.

Nessa simbiose não ocorre, aparentemente, a invasão dos tecidos vegetais pela bactéria e nem a

formação de uma estrutura especializada para a fixação do nitrogênio (não há formação de nódulos, por exemplo).

O grande interesse na fixação biológica em gramíneas é devido à maior facilidade de aproveitamento de água das mesmas em relação às leguminosas, pela maior efetividade fotossintética. As gramíneas apresentam um sistema radicular fasciculado, tendo vantagens sobre o sistema pivotante das leguminosas para extrair água e nutrientes do solo; e por serem as gramíneas largamente utilizadas como alimento pelo homem. Por isso, mesmo que apenas uma parte do nitrogênio pudesse ser fornecida pela associação com bactérias fixadoras, a economia em adubos nitrogenados seria igual ou superior àquela verificada com as leguminosas que podem ser auto-suficientes em nitrogênio (DÖBEREINER, 1992).

Os produtos da fotossíntese são liberados pela planta, sendo absorvidos pelas bactérias que habitam a rizosfera. As bactérias fixam o nitrogênio e transferem o NH₄⁺ para a planta. Trabalhos realizados com trigo em associação com *Azospirillum* evidenciaram que as bactérias ligam-se à superfície externa da raiz para colonizar a rizosfera. Além disso, certos estudos realizados com aplicação de ¹⁵N₂ (nitrogênio atmosférico radioativo) demonstraram que ocorre a passagem de produtos nitrogenados da bactéria para a planta. Esses dados confirmam a existência de uma interação estreita entre planta e bactéria fixadora.

A nitrogenase e a reação de fixação de nitrogênio

A reação de fixação do nitrogênio caracteriza-se pela redução do N₂ à NH₃. Portanto, para que a reação ocorra, é necessário que haja um transporte de elétrons, mediado por moléculas aptas a realizá-lo. A enzima nitrogenase é formada por duas unidades protéicas, a Ferro-proteína (Fe-proteína) e a Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína), ambas capazes de transportar elétrons. Durante a reação de redução do N₂, a nitrogenase é auxiliada por uma terceira molécula transportadora de elétrons, a Ferredoxina.

Genes envolvidos na fixação biológica do nitrogênio

Usualmente, a identificação de bactérias diazotróficas é baseada no isolamento de genes responsáveis pela síntese da enzima nitrogenase, responsável pela catálise da reação que transforma

o nitrogênio atmosférico em amônia, ou pela medição da atividade da nitrogenase usando a técnica da redução do acetileno. Os primeiros genes envolvidos na fixação do nitrogênio foram identificados e estudados utilizando-se a bactéria *Klebsiella pneumoniae*. São conhecidos cerca de 20 genes, denominados genes nif. Genes homólogos ao gene nif foram detectados também em bactérias pertencentes ao filo Spirochaetes (LILBURN, 2001). Tais organismos foram isolados do intestino de térmitas e de sedimentos de água doce. Posteriormente, a fixação do nitrogênio por Spirochaetes foi comprovada pela quantificação da atividade da nitrogenase.

AS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

A biodiversidade dos organismos procarióticos tem sido fonte de estudos e debates entre microbiologistas nas últimas décadas. Comunidades microbianas são importantes para grande parte dos ciclos biogeoquímicos do planeta. Muitos microrganismos são utilizados em processos industriais, na saúde humana, uma vez que tais comunidades representam um reservatório de biodiversidade para a síntese de novas drogas, e na agricultura. Entre as comunidades microbianas de importância agrícola, destacam-se aquelas que apresentam a habilidade em converter o nitrogênio gasoso a formas de nitrogênio acessíveis aos demais organismos, coletivamente chamados de diazotróficos.

Grande parte do nitrogênio fixado presente nos ecossistemas terrestres e aquáticos é originado da fixação biológica do nitrogênio. Nos solos agrícolas, à exceção das adições antropogênicas, as comunidades diazotróficas são as principais fontes de nitrogênio. A exploração da fixação biológica do nitrogênio oferece uma fonte não poluente de nitrogênio podendo aumentar a produção e diminuir o uso global de fertilizantes sintéticos. Em adição, bactérias diazotróficas podem diminuir a emissão do gás de efeito estufa N₂O, assim como reduzir a lixiviação de NO₃⁻, devido à diminuição da utilização de fertilizantes nitrogenados, evitando possíveis contaminações de águas subsuperficiais (KENNEDY et al., 2004). Neste sentido, estimativas da diversidade e da riqueza dos microrganismos presentes no ambiente são de central importância, pois servem de conhecimento básico da função e do papel das comunidades bacterianas (HUGHES et al., 2001). Por meio de tais estimativas pode ser

possível obter importantes informações a respeito do manejo adequado do solo e sobre a adequada exploração da biodiversidade de sistemas agrícolas. Embora tenham sido feitos avanços significativos no entendimento da diversidade dos diazotróficos, um diagnóstico completo da comunidade fixadora de nitrogênio que habita o solo e/ou vive em associação com gramíneas ainda não foi realizado. Muitos estudos sobre a comunidade fixadora de nitrogênio são baseados no cultivo e subsequente caracterização dos isolados. Atualmente existe um consenso entre ecologistas microbianos de que a chave para prever a diversidade microbiana é evitar o isolamento, focalizando estudos no DNA microbiano (CURTIS & SLOAN, 2005).

De acordo com Hughes et al. (2001), investigações sobre a comunidade bacteriana requerem um grande número de amostras para que seja refletida a “real” diversidade da comunidade em estudo. Estimativas precisas requerem amostragens de aproximadamente 80%, as quais podem ser impraticáveis devido ao elevado número de microrganismos presentes no ambiente (GANS et al., 2005). Entretanto, a análise de um grupo específico de bactérias, tais como bactérias fixadoras de nitrogênio, pode ser consideravelmente facilitada em face da restrição do número de espécies capazes de fixar nitrogênio.

A biodiversidade desses microrganismos refere-se tanto ao número (riqueza) de diferentes categorias biológicas (ou unidades taxonômicas) quanto à abundância relativa (equitabilidade) dessas categorias. A biodiversidade inclui, assim, a totalidade dos recursos vivos, ou biológicos, e dos recursos genéticos, e seus componentes. O primeiro passo para o entendimento completo da biodiversidade das comunidades bacterianas é a identificação e classificação taxonômica das distintas populações microbianas. Entretanto, a taxonomia dos organismos procarióticos tem passado por muitas mudanças nos últimos anos devido aos rápidos avanços na tecnologia de seqüenciamento do DNA.

Bactérias diazotróficas endofíticas associadas ao milho e outras gramíneas

Algumas espécies fixadoras de N₂ podem, além de colonizar abundantemente a rizosfera, invadir o córtex e colonizar tecidos internos em diversas espécies vegetais. Essas bactérias associadas aos vegetais são chamadas de endofíticas quando habitam o interior da planta

hospedeira sem causar dano aparente (STURZ et al, 1998). A colonização do interior dos tecidos das plantas pode conferir uma vantagem ecológica sob as bactérias que colonizam a rizosfera (LODEWYCKX et al., 2002). O interior dos tecidos das plantas fornece, aos endofíticos, um ambiente protegido de condições ambientais extremas encontradas na superfície das raízes das plantas ou no solo. As plantas podem ser colonizadas simultaneamente por uma grande variedade de bactérias.

Muitos microrganismos são encontrados em grande número no interior das plantas, sendo caracterizados como espécies dominantes. Contudo, existe uma grande variedade de espécies bacterianas endofíticas que não são facilmente detectadas no interior das plantas devido ao baixo número de células presentes. Estes endofíticos são caracterizados como espécies raras.

Na verdade, pesquisas realizadas na última década têm demonstrado que bactérias estabelecidas endofiticamente podem também desempenhar um papel fisiológico importante no crescimento da planta hospedeira, como por exemplo, o biocontrole de fitopatógenos (KLOPPER et al., 1978), a supressão da doença por indução de resistência localizada e/ou sistêmica (DUIJFF et al., 1997), promoção do crescimento vegetal (MIRZA et al., 2001) ou melhoria da nutrição nitrogenada via fixação biológica de nitrogênio (BALDANI et al., 1983).

O estabelecimento endofítico, comparado ao ambiente rizosférico, tem sido considerado um evento importante para que as bactérias possam influenciar mais eficientemente no crescimento da planta, visto que no interior do vegetal a competição microbiana é menor, este nicho é menos sujeito a flutuações ambientais e a interface de troca de metabólitos é mais direta quando comparada com a rizosfera. É válido ressaltar também que entre as bactérias existe uma grande variabilidade inter e intraespecífica na capacidade de estabelecimento endofítico e que os genes envolvidos na capacidade de infecção bacteriana e colonização endofítica não são totalmente conhecidos. A maioria dos estudos de adesão, infecção e colonização são realizados entre gramíneas utilizando estirpes do gênero diazotrófico *Azospirillum*, sendo que estirpes da espécie *A. brasilense* apresentam ou não a capacidade de estabelecimento endofítico (BALDANI et al. 1997).

Bactérias diazotróficas endofíticas em gramíneas possuem penetração passiva na planta, acessando o seu interior através de ferimentos, de sítios de emergência de raízes, coifa e estômatos nas folhas, espalhando-se pelos tecidos radiculares via apoplasto, colonizando os espaços intercelulares das células da hipoderme, córtex radicular e parede do aerênquima (OLIVARES et al., 1997; JAMES & OLIVARES, 1998). Porém estudos envolvendo o processo de infecção e colonização são ainda escassos, necessitando de programas de seleção de microrganismos endofíticos para determinada espécie de planta com ensaios sob condições de casa de vegetação e campo utilizando marcadores para a estirpe a ser testada e técnicas microscópicas para monitorar e localizar a bactéria, permitindo sua caracterização como endofítica, esclarecendo o processo de interação planta-microrganismo, pois diferentes contribuições com a inoculação de estirpes do mesmo gênero de bactérias diazotróficas endofíticas foram observadas em culturas como arroz inundado (GUIMARÃES, 2001) e cana-de-açúcar (CANUTO, 2003).

O efeito da bactéria *Azospirillum* spp. no desenvolvimento do milho e em outras gramíneas, tem sido pesquisado, não somente quanto ao rendimento das culturas mas, também, com relação às causas fisiológicas que, possivelmente, aumentam esse rendimento. Didonet et al. (1996) mencionam que são muitas as evidências de que a inoculação das sementes de milho com *Azospirillum* brasileiro seja responsável pelo aumento da taxa de acúmulo de matéria seca, principalmente na presença de elevadas doses de nitrogênio, o que parece estar relacionado com o aumento da atividade das enzimas fotossintéticas e de assimilação de nitrogênio.

Okon e Vanderleyden (1997) baseando-se em dados acumulados durante 22 anos de pesquisa com experimentos de inoculação a campo, concluem que o gênero *Azospirillum* spp. promove ganhos em rendimento em importantes culturas nas mais variadas condições de clima e solo; contudo, salientam que o ganho com *Azospirillum* spp. vai mais além do que simplesmente auxiliar na fixação biológica do nitrogênio, interferindo também no aumento da superfície de absorção das raízes da planta e, conseqüentemente, no aumento do volume de substrato do solo explorado. Tal constatação é justificada pelo fato da inoculação modificar a morfologia do sistema radicular, aumentando não apenas o número de radículas,

mas, também, o diâmetro médio das raízes laterais e adventícias. Pelo menos parte, ou talvez muitos desses efeitos de *Azospirillum* spp. nas plantas, possam ser atribuídos à produção, pela bactéria, de substâncias promotoras de crescimento, entre elas auxinas, giberilinas e citocininas, e não somente a fixação biológica de nitrogênio

A produção de fitormônios por bactérias é um dos fatores responsáveis pelo efeito estimulatório observado no crescimento de plantas, como no caso da inoculação de estirpes de *Azospirillum*. O principal hormônio produzido por estirpes de *Azospirillum* é uma auxina, o ácido 3-indolacético (AIA) (CROZIER et al., 1988), além de outros compostos indólicos. Também produzem citoquininas (CACCIARI et al., 1989) e giberelinas. Quanto ao gênero *Herbaspirillum*, Bastián et al. (1998) detectaram a presença de AIA e giberelinas A1 e A3 em culturas de *Herbaspirillum seropedicae* e Radwan et al. (2002) constataram a produção de indóis por estirpes de *Herbaspirillum*, incluindo *H. rubrisubalbicans* e outros isolados não identificados.

Novos resultados baseados na expressão de genes mostraram a regulação do gene *ipdC* por AIA em *A. brasilense* (VANDE BROEK et al., 1999) e observou-se que o promotor possui um elemento responsivo a auxina (*AuxRE*) similar ao promotor de genes que induzem auxinas em plantas (LAMBRECHT et al., 2000). Há evidências de que os microrganismos podem selecionar uma via metabólica diferenciada, dependendo do meio ambiente (PATTEN & GLICK, 1996). Fato similar foi observado em espécies de *Rhizobium* que só utilizavam a via do indole-3-acetamida quando associados ao hospedeiro (COSTACURTA & VANDERLEYDEN, 1995) e a via do ácido 3-indolepirúvico era utilizada em vida livre (ERNSTSEN et al., 1987).

Segundo Lodewyckx et al. (2002), bactérias endofíticas podem ser detectadas tanto em monocotiledôneas como em dicotiledôneas sendo que já foram encontrados mais de 80 gêneros bacterianos colonizando o interior dos tecidos das plantas tais como: *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Aeromonas*, *Afipia*, *Agrobacterium*, *Agromonas*, *Alcaligenes*, *Alcanivorax*, *Allorhizobium*, *Alteromonas*, *Aminobacter*, *Aquaspirillum*, *Arthrobacter*, *Aureobacterium*, *Azoarcus*, *Azomonas*, *Azorhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Blastobacter*, *Blastomonas*, *Brachymonas*, *Bradyrhizobium*,

Brenneria, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Chelatobacter*, *Chromobacterium*, *Chryseomonas*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Delftia*, *Derxia*, *Devosia*, *Enterobacter*, *Flavimonas*, *Flavobacterium*, *Flexibacter*, *Frankia*, *Halomonas*, *Herbaspirillum*, *Matsuebacter*, *Mesorhizobium*, *Moraxella*, *Nevskia*, *Nocardia*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Phenylbacterium*, *Phyllobacterium*, *Photobacterium*, *Porphyrobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Ralstonia*, *Renibacterium*, *Rhizobacter*, *Rhizobium*, *Rhizomonas*, *Rhodanobacter*, *Rhodococcus*, *Shewanella*, *Sinorhizobium*, *Sphingobacterium*, *Sphingomonas*, *Spirillum*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Thauera*, *Variovorax*, *Vibrio*, *Xanthomonas*, *Xylella*, *Zoogloea*, *Zymobacter*, *Zymomonas*. Embora exista uma grande diversidade de bactérias endofíticas capazes de se associar com uma variedade de espécies de plantas, apenas uma pequena fração destes organismos é capaz de fixar nitrogênio.

A possibilidade da ocorrência de aumentos significativos na disponibilidade de nitrogênio por meio da FBN para gramíneas, tais como o arroz (BODDEY et al., 1995), cana-de-açúcar (JAMES, 2000), milho, sorgo e trigo (RONCATO-MACCARI et al., 2003) foi demonstrada há alguns anos atrás. Sendo que a cana-de-açúcar foi um dos melhores exemplos de associação com bactérias fixadoras de nitrogênio (OLIVEIRA et al., 2002).

Além da FBN, alguns desses microrganismos também possuem a capacidade de promover o crescimento vegetal através da solubilização de fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo e produzem ou alteram a concentração de hormônios vegetais, como o ácido indol acético, ácido giberélico, citocininas e etileno (DOBBELAERE et al., 2003).

Döbereiner (1992) demonstrou que as bactérias diazotróficas podem infectar todos os tecidos da cana-de-açúcar e estudos subseqüentes mostraram que esses organismos não estão restritos a essa única cultura. Esses diazotróficos foram observados em vários membros da família das gramíneas, especialmente nas plantas com a rota fotossintética C4, a qual, em condições favoráveis, pode assimilar o dobro de energia solar que as plantas C3. A maioria das plantas C4 cresce nos trópicos, com exceção do milho e do sorgo, os quais também são encontrados em regiões temperadas (REIS et al., 2000).

O isolamento de bactérias diazotróficas endofíticas ativas na FBN do interior das raízes foi realizado há algum tempo atrás por Baldani et al. (1986) utilizando raízes de milho e sorgo, as quais foram externamente esterilizadas. Durante as últimas duas décadas, muitas bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio foram isoladas e identificadas, incluindo espécies dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Azoarcus*. Grande parte desses diazotróficos foi isolada de regiões tropicais, especialmente no Brasil, e essas regiões têm sido a principal fonte para os grupos que trabalham com diazotróficos associativos.

Entre os organismos diazotróficos endofíticos estão incluídos os organismos capazes de fixar nitrogênio em simbiose com plantas leguminosas (gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, por exemplo) e organismos que fixam nitrogênio associados às gramíneas. Entre os fixadores que habitam o interior das raízes (endofíticos), destacam-se as bactérias dos gêneros *Azospirillum* (endofíticas facultativas) e as bactérias dos gêneros *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* e *Azoarcus* (consideradas endofíticas obrigatórias, devido à obrigatoriedade de viverem no interior da planta) (BALDANI et al., 1997). Essa grande diversidade é também estendida para organismos do mesmo gênero e mesmo entre linhagens de uma mesma espécie, crescidos em condições ambientais diferentes. Para *Azospirillum*, por exemplo, foi demonstrado que diferentes linhagens, isoladas de solos de sete regiões geográficas diferentes na Austrália, apresentaram uma ampla variação na sua atividade de nitrogenase (redução do nitrogênio molecular à amônia), como conseqüência do ambiente em que estavam expostas (HAN & NEW, 1998). Os diazotróficos endofíticos são encontrados em várias plantas não leguminosas.

Entre os organismos diazotróficos endofíticos citados, o gênero *Azospirillum* é o mais estudado e tem sido usado como modelo para investigações da associação entre bactérias diazotróficas e cereais (ZAKHAROVA et al., 1999). Organismos do gênero *Azospirillum* são bactérias Gram negativas fixadoras de nitrogênio classificadas inicialmente como bactérias de vida livre. Entretanto existem relatos da associação destes microrganismos com as raízes das plantas e da presença destes o interior dos tecidos vivendo endofiticamente nos espaços intercelulares. Sendo

assim, *Azospirillum* spp é atualmente classificado com endofítico facultativo.

O gênero apresenta um metabolismo bastante versátil o que confere características adaptativas permitindo assim o estabelecimento competitivo na rizosfera (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). Essas características conferem ao gênero a habilidade de promover o crescimento de mais de 100 espécies de cereais e leguminosas (BASHAN et al., 2004). Aparentemente, a inoculação de *Azospirillum* spp. pode reduzir o uso de fertilizantes químicos, especialmente nitrogênio, na ordem de 20% a 50% sendo que resultados superiores já foram obtidos quando a inoculação foi utilizada juntamente com a incorporação de fertilizantes orgânicos (BASHAN et al., 2004).

As plantas de milho podem ser colonizadas simultaneamente por uma grande diversidade de bactérias diazotróficas (LODEWYCKX et al., 2002). Recentemente, muitos microrganismos diazotróficos têm sido encontrados colonizando plantas de milho (OLIVARES et al., 1996; STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000). Contudo, a maioria dos estudos de diversidade, realizados até o presente, foram baseados em técnicas de cultivo e subseqüente caracterização de isolados.

O cultivo de microrganismos fornece informações limitadas sobre a diversidade já que a maioria dos organismos existentes não é facilmente isolada por meio de técnicas de cultivo convencionais. Embora muitos microrganismos diazotróficos tenham sido detectados em associação com plantas de milho, a diversidade (número e riqueza de espécies) de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a estas plantas ainda permanece desconhecida.

Relatos da associação de bactérias dos gêneros *Azospirillum* e *Klebsiella* são os mais freqüentes em estudos da interação de diazotróficos com o milho. Ambos os gêneros já foram detectados por estudos baseados em cultivo e isolamento (BALDANI et al., 1986; PALUS et al., 1996) bem como estudos baseados em técnicas independentes de cultivo (CHELIUS & TRIPLET, 2001). Tem sido reportado que bactérias do gênero *Azospirillum* podem colonizar o interior de diversas gramíneas e cereais (REIS et al., 2000) e que bactérias do gênero *Klebsiella* podem colonizar o interior de plantas de trevo vermelho (STURZ et al., 1998), videiras (BELL et al., 1995), arroz (ELBELTAGY et al., 2000) e batata doce (REITER et al., 2003).

O gênero *Burkholderia* também tem sido apontado como de ampla ocorrência em associação com o milho cultivado no Brasil e no México (PERIN et al., 2006) sendo que a espécie *B. tropica* tem sido detectada em maior frequência. A ocorrência destes organismos em associação com o milho em diferentes regiões geográficas pode indicar que certos gêneros de bactérias diazotróficas estão associados preferencialmente ao milho independente do tipo de solo e do clima da região de cultivo.

Além dos organismos diazotróficos citados anteriormente, o gênero *Rhizobium* também já foi detectado infectando o interior dos tecidos de plantas de milho principalmente em plantas coletadas em lavouras cultivadas no sistema de rotação de culturas com plantas leguminosas. Embora este gênero seja bem estudado na associação com plantas leguminosas, pouco se sabe sobre os efeitos provocados por estas bactérias quando associadas às gramíneas. Entretanto, o aumento no crescimento do milho devido à produção de fitormônios excretados por bactérias do gênero *Rhizobium* já foi constatado (SCHLOTTER et al., 1997). A espécie diazotrófica *Rhizobium tropici* isolado CIAT899, utilizada com sucesso na inoculação de *Phaseolus vulgaris*, também foi reconhecida por Rosenblueth e Martinez-Romero (2004) como uma espécie endofítica competitiva capaz de se associar às plantas de milho em experimentos de inoculação, o que demonstra que estes organismos estão naturalmente associados ao milho.

FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM MILHO: RESULTADOS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O estabelecimento em plantas de *Azospirillum* sp e várias outras espécies assimbióticas é restrita, pois esse tipo de bactéria requer grande necessidade de material energético e apesar da incidência ser relativamente grande em regiões tropicais e subtropicais, não há especificidade nas associações de gramíneas com essa bactéria (DÖBEREINER et al., 1990). No entanto, recentemente têm sido introduzidos no Brasil inoculantes contendo cepas de *Azospirillum* sp, de nome comercial "Graminante", havendo, contudo, informações escassas relativas ao seu potencial agrônomo e retorno econômico para o produtor. O principal efeito dessas bactérias está, principalmente, na promoção do crescimento

radicular das plantas, pela produção de substâncias promotoras de crescimento.

O inoculante "Graminante" é composto por bactérias do gênero *Azospirillum* e tem como veículo carbonato de cálcio e carbonato de magnésio. A recomendação do fabricante é que o produto seja aplicado a seco, imediatamente antes da semeadura (200 g de produto comercial para 50 kg de sementes). O fabricante não especifica o número de bactérias desse produto por grama de inoculante.

No trabalho de Cavallet et al. (2000), o produto comercial "Graminante" aumentou a produtividade em média de 300 kg ha⁻¹, no entanto esse aumento não foi significativo. Os autores verificaram também que com melhor disponibilidade de nitrogênio a inoculação das sementes aumentou a produção em 30%, dados confirmados também pelo trabalho de Didonet et al. (1996), no qual verificou que a associação *Azospirillum*-milho usa mais eficientemente o nitrogênio mineral aplicado ao solo. No mesmo artigo, os autores relatam que o comprimento de espigas de milho foi influenciado com a aplicação do produto (Cavallet et al., 2000), refletindo em maior produção de grãos por espiga.

Entre os aspectos que devem merecer atenção dos pesquisadores, ressalta-se a seleção de estirpes adaptadas às condições locais e às culturas e cultivares usadas em cada região, sendo necessário testar-se as estirpes de *Azospirillum*, selecionando-se aquelas mais adaptadas às situações de clima e do manejo de culturas, para possível recomendação em um produto comercial.

Experimentos desenvolvidos pelo método de incorporação do ¹⁵N₂ confirmaram que várias gramíneas tropicais se beneficiam de nitrogênio fixado biologicamente (De-Polli, 1975). No entanto, o manejo desse processo em gramíneas depende, entre outros, da identificação das espécies que contribuem, significativamente, para o processo. Como elas não formam estruturas anatômicas diferenciadas (como os nódulos em leguminosas), sua localização e ocorrência na rizosfera e no interior de tecidos vegetais são pesquisadas, colocando-se amostras de solo, rizosfera, raiz ou outro material vegetal em meios de cultura seletivos para cada espécie. As de espécies endofíticas (que ocorrem dentro dos tecidos) são pesquisadas, desinfestando-se, superficialmente, a amostra com produtos como Cloramina-T ou água sanitária, entre outros. Frequentemente, mais de

uma espécie e até mais de um gênero são encontrados na mesma espécie vegetal.

Outras espécies, não detectadas pelos meios de cultivo atualmente utilizado, ou espécies não cultiváveis podem, também, estar ocorrendo. No entanto, alguns resultados mostraram correlação com a incidência de determinadas espécies e as demandas nutricionais da planta. Por exemplo, o número de células de *Azospirillum* spp. é constante no solo e na rizosfera (ecto + endorizosfera) de milho durante todo o ciclo da planta, porém quando as bactérias da ectorizosfera são eliminadas, através da esterilização superficial das amostras de raízes com Cloramina-T, verifica-se que o número dessas bactérias na endorizosfera aumenta bastante na floração e, posteriormente, no enchimento de grãos, justamente quando a demanda de nitrogênio e de outros nutrientes pela planta é maior.

Apesar de a pesquisa sobre fixadores de N₂ (diazotróficos) associativos no Brasil, ter-se iniciado na década de 50 por Döbereiner e colaboradores, com os gêneros *Azotobacter* e *Beijerinckia*, ela só foi intensificada a partir da descoberta de novas espécies de *Azospirillum* (DÖBEREINER, 1978), que coincidiu com a chamada “crise do petróleo”, despertando o interesse por alternativas biológicas aos fertilizantes nitrogenados utilizados na agricultura. A partir de então, várias espécies novas têm sido descobertas e ensaios de inoculação de diazotróficos associativos em plantas têm sido realizados no Brasil e em outros países. Os resultados nem sempre são positivos, e se questiona se o número de resultados negativos ou sem efeito não estaria subestimado, uma vez que a tendência é não publicá-los.

Já, na maioria dos ensaios, usaram-se estirpes introduzidas e não homólogas (i.e. isoladas da mesma espécie vegetal onde foram inoculadas) que não passaram por um processo de seleção quanto a sua eficiência e adaptação às condições edáficas e climáticas dos ensaios, a exemplo do que se faz nas simbioses de bactérias nodulíferas (e.g. rizóbio) em leguminosas, o que contribuiria para subestimar também, não só o número de resultados positivos como a magnitude do efeito encontrado. Estima-se que 60 a 70% dos trabalhos realizados, obtiveram respostas positivas com maior frequência na faixa de 5 a 30% de aumento de produção (OKON; LABANDERA-GONZALEZ, 1994), e geralmente em solos com baixa aplicação de insumos, principalmente níveis baixos de

fertilizante nitrogenado. Resultados obtidos em experimentos realizados posteriormente apresentaram a mesma tendência (BASHAN et al., 2004).

De qualquer modo, deve-se admitir que eficiência similar à das simbioses de bactérias nodulíferas com leguminosas no solo não pode ser alcançada, uma vez que esta é resultante de um processo muito mais evoluído que minimiza perdas, no nitrogênio fixado, por interferência de fatores químicos, físicos e biológicos que interagem na complexidade, heterogeneidade e dinâmica do sistema edáfico. A eficiência da FBN pode ser calculada em termos de quantidade de N₂ fixado por grama de substrato consumido. Bacterióides de rizóbio dentro de nódulos de ervilha têm eficiência elevada de 100 mg N₂ g⁻¹ glicose, uma vez que estabelecido o nódulo, cessa seu crescimento e passa a fixar N₂ em fase estacionária, enquanto as outras espécies, por serem organismos em crescimento, têm que utilizar parte da energia metabólica na síntese de material celular. Por outro lado, no interior dos nódulos no solo, os bacterióides estão em íntima relação com a planta, relação essa que é modulada fisiológica, bioquímica e geneticamente, o que garante maior eficiência da simbiose. Já para as bactérias associativas, mesmo localizadas no interior das plantas, não há evidências de relação tão complexa, o que teoricamente contribui para diminuir a contribuição da FBN.

Alguns trabalhos têm mostrado que os efeitos da inoculação de diazotróficos no crescimento vegetal podem ser também nutricionais, fisiológicos, morfológicos e de controle biológico de organismos maléficos. Os possíveis mecanismos causadores desses efeitos encontram-se na Tabela 10. Além da FBN destaca-se a produção de substâncias promotoras de crescimento vegetal, como fitormônios (auxinas, citocininas e giberelinas) e vitaminas.

Em pesquisa realizada por Reis Junior et al. (2008), pela Embrapa Cerrados, avaliando 8 variedades de milho (Sol da Manhã, Eldorado, BR 106, BR 451, BRS 4150, MC 5, MC 4 e MC 10), relataram a presença de mais de 104 bactérias diazotróficas em associação com as diferentes variedades de milho. Os resultados demonstraram que as bactérias do gênero *Herbaspirillum* que foram obtidos no isolamento, foram superiores à do gênero *Azospirillum* spp. (*A. brasilense* e *A. lipoferum*) (Figura 10). Provavelmente, as colônias

características de *Herbaspirillum* spp. e *A. amazonense* foram mais facilmente isoladas se comparado às outras bactérias (*A. brasiliense* e *A. lipoferum*). Entretanto os autores não esperavam que o número de isolados de *Herbaspirillum* fosse superior aos de *Azospirillum*, mesmo que a presença de bactérias do gênero *Herbaspirillum* já tenha sido relatada em associação com plantas de milho (BALDANI et al., 1986; OLIVARES et al., 1996).

No mesmo trabalho, Reis Junior et al. (2008), verificaram que a adubação nitrogenada provocou efeitos negativos em relação ao número de bactérias diazotróficas encontradas. Pode-se observar também que não houve diferenças significativas em relação à população de bactérias encontradas entre as diferentes variedades de milho avaliadas. Isso indica que as diferentes eficiências nutricionais das variedades de milho não se correlacionam à população destes microrganismos, e que, provavelmente, devem ser resultado de uma gama de fatores genéticos, bioquímicos e fisiológicos envolvendo tanto os macro quanto os microsmbiontes. Em virtude da importância da produção de AIA por bactérias dos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum*, alguns isolados oriundos da associação com raízes de milho tiveram sua capacidade de produção deste hormônio avaliada (REIS JUNIOR et al., 2008). Todos os isolados produziram AIA, e a quantidade de AIA variou entre os isolados. A estirpe *A. lipoferum* foi a que produziu a maior quantidade.

Reis Junior et al. (2008) testaram também a capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico pelos isolados de raízes de milho, estirpes *Azospirillum amazonense* e *Herbaspirillum* tiveram sua atividade nitrogenase averiguada pela metodologia de redução do acetileno. Todos os isolados apresentaram capacidade de reduzir acetileno.

No experimento de inoculação de bactérias em milho, de Reis Junior et al. (2008), *A. amazonense* se destacou diante dos demais tratamentos, produzindo 39% a mais de matéria seca e 42% de raízes em relação ao tratamento não inoculado. Provavelmente, a maior produção de matéria seca e acúmulo de nutrientes por plantas inoculadas sejam devido à produção de substâncias promotoras de crescimento pelas bactérias (AIA).

Os autores demonstraram também em outro experimento que plantas inoculadas com espécies diferentes (*A. amazonense* + *H. seropedicae*) tiveram melhor desempenho,

apresentando resultados superiores aos demais, com incremento de 33% em relação ao controle para a área foliar. Apenas esse tratamento apresentou quantidade de N acumulado estatisticamente superior ao controle (24%). O aumento nos teores de N em plantas inoculadas com bactérias diazotróficas é comumente relatado, podendo ser resultado tanto da fixação biológica de nitrogênio, quanto dos mecanismos de promoção do crescimento, que podem incrementar a capacidade de absorção desse nutriente (DOBBELAERE et al., 2001).

Esses trabalhos demonstram a importância de se reiniciar os estudos envolvendo bactérias fixadoras de nitrogênio e/ou promotoras de crescimento de plantas, em associação com gramíneas como o milho que é uma espécie de muita importância econômica. Porém esses experimentos devem ser repetidos em condições de campo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para outras plantas não-leguminosas, a exemplo do milho, estudos também mostraram associações com bactérias fixadoras de nitrogênio, embora, não havendo a formação de nódulos como acontece nas leguminosas, entretanto, o interessante é direcionar estudos relativos à melhor assimilação do nitrogênio. Nestas plantas, ocorre a colonização da superfície e/ou interior das raízes e interior da parte aérea por bactérias do solo que fixam nitrogênio do ar e disponibilizam as plantas. Neste campo, os resultados de seleção de estirpes inoculantes ainda não atingiram níveis tão elevados quanto à simbiose em leguminosas. Ainda assim, existem pacotes tecnológicos, utilizando variedades de plantas e estirpes bacterianas eficientes, que podem suprir mais de 50% do nitrogênio necessário à planta, devido à maior facilidade de assimilação do nitrogênio.

Entre os aspectos que devem merecer atenção dos pesquisadores, ressalte-se a seleção de estirpes adaptadas às condições locais e às culturas e cultivares usadas em cada região, sendo necessário testar-se as estirpes de *Azospirillum*, selecionando-se aquelas mais adaptadas às situações de clima e do manejo de culturas, para possível recomendação em um produto comercial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BALDANI, J.I.; CARUSO, L.V.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, v.29, p.911-922, 1997.
2. BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. & DOBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 29, p. 284-299, 1983.
3. BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. & DOBEREINER, J. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v. 4, p. 37-40, 1986.
4. BASHAN, Y. et al. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 50, n. 8, p. 521-577, 2004.
5. BELL, C.R. et al. Endophytic bacteria in grapevine. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 41, n.1, p. 46-53, 1995.
6. BODDEY, R.M. et al. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 174, n.1, p. 195-209, 1995.
7. BODDEY, R.M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. *Fertilizer Research*, Oxford, v.42, p.241-250, 1995.
8. CANUTO, E. L. Seleção de bactérias diazotróficas endofíticas para uso como insumo biológico em plantas de cana-de-açúcar oriundas de sementes. 2003. 57p. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Ciência do Solo) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2003.
9. CAVALLET, L.E.; PESSOA, A.C.S.; HELMICH, J.J.; HELMICH, P.R.; OST, C.F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp.
10. CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microbial Ecology*, New York, v. 41, n. 3, p. 252-263, 2001.
11. COELHO, A.M.; FRANÇA, G.E. Seja o doutor do seu milho: nutrição e adubação. 2.ed. Piracicaba: Potafos, 1995. 9p.
12. CURTIS, T.; SLOAN, T. Exploring microbial diversity – A vast below. *Science*, Washington, v. 309, n. 5739, p. 1331 - 1333, 2005.
13. DE-POLLI, H. Ocorrência de fixação de $15N_2$ nas gramíneas tropicais *Digitaria decumbens* e *Paspalum notatum*. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1975.
14. DIDONET, A.D.; RODRIGUES, O; KENNER, M.H. Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasiliense*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.16, n.9, p.645-651, 1996.
15. DOBBELAERE, S. et al. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Review in Plant Science*, Boca Raton, v. 22, n. 2, p.107-149, 2003.
16. DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, P.; LABANDERA-GONZALEZ, C.; CABALLERO-MELADO, J.; AGUIRRE, J.F.; KAPULNIK, Y.; BRENER, S.; BURDMAN, S.; KADOURI, D.; SARIG, S.; OKON, Y. Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Australian Journal of Plant Physiology*, Victoria, v. 28, p. 871-879, 2001.

17. DÖBEREINER, J. History and new perspective of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis*, Rehovot, v. 13, n. 1, p. 1-13, 1992.
18. DOBEREINER, J. Influence of environmental factors on the occurrence of *Spirillum lipoferum* in soils and roots. In: Environmental role of nitrogen-fixing blue green algae and assymbiotic bacteria. *Ecological Bulletin*, Copenhagen, v.26, p.343-352, 1978.
19. DÖBEREINER, J.; PAULA, M.A. de, MONTEIRO, E.M.S. A pesquisa em microbiologia do solo no Brasil. *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, v. 50, p. 841-854, 1990.
20. DUIJFF, B.; GIANINIZZI-PEARSON, V. & LEMANCEAU, P. Involvement of the outer membrane lipopoly saccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *New Phytology*, Oxford, v. 135, p. 325-334, 1997.
21. ELBELTAGY, A. et al. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil Science and Plant Nutrition*, Tokyo, v. 46, n. 3, p. 617-629, 2000.
22. GANS, J.; WOLINSKY, M.; DUNBAR, J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, Washington, v. 309, n. 5739, p.1387-1390, 2005.
23. GUIMARÃES, S. L. Seleção de estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas para inoculação em 3 cultivares de arroz inundado. 2001. 52p. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Ciência do Solo) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2001.
24. HAN, S.O.; NEW, P.B. Variation in nitrogen fixing ability among natural isolates of *Azospirillum*. *Microbial Ecology*, New York, v. 36, n.2, p. 193-201, 1998.
25. HUGHES, J.B. et al. Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 67, n. 1, p. 4399-4406, 2001.
26. JAMES, E. K. & OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Review in Plant Science*, Boca Raton, v. 17, p. 77-119, 1998.
27. JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic associative symbiosis. *Field Crops Research*, North Carolina, v. 65, n. 2, p.197-209, 2000.
28. KENNEDY, I. R., et al. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 36, n. 8, p.1229-1244, 2004.
29. KLOPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. Proceedings of the 4th International conference on plant pathogenic bacteria. Angers-France: Station the Pathologie Vegetal et Phytobacteriologie, v. 2, p. 8879-882, 1978.
30. LILBURN, T.G. et al. Nitrogen fixation by symbiotic and free-living Spirochetes. *Science*, Washington, v. 292, n. 29 p. 2495, 2001.
31. LODEWYCKX, C. et al. Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Review in Plant Sciences*, Boca Raton, v. 21, n. 6, p. 583-606, 2002.
32. MACHADO, A.T.; SODEK, L.; FERNANDES, M.S. N partitioning, nitrate reductase and glutamine synthetase activities in two contrasting varieties of maize. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.36, p.249-256, 2001.

33. MIRZA, M. S.; AHMAD, N.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND P.; MALIK, K. A Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micropropagated sugarcane in vitro. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 237, p. 47-54., 2001.
34. OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated Azospirillum species can stimulate plants. *Applied and Environmental Microbiology*, New York, v.63, n.7, p.366-370, 1997.
35. OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I. & DOBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease susceptible and resistant varieties of sugar cane by endophytic diazotroph *Herbaspirillum* spp., *New Phytology*, Oxford, v. 135, p. 723-737, 1997.
36. OLIVARES, F. L.; REIS Jr., F. B. dos; REIS, V. M. BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. & DOBEREINER, J. Infection of sugarcane roots by the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *H. rubrisubalbicans*. *International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: the Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts*. Angra do Reis, p. 65-66, 1996.
37. OLIVEIRA, A.L.M. et al. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 242, n. 2, p. 205-215, 2002.
38. PALUS, J.A. et al. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* Iltis and Doebley. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 186, n. 1, p. 135-142, 1996.
39. PERIN, L. et al. Diazotrophic Burkholderia species associated with field-grown maize and sugarcane. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 72, n. 5, p. 3103 - 3110, 2006.
40. REIS JUNIOR, F.B.; MACHADO, C.T.T.; MACHADO, A.T.; MENDES, I.C.; MEHTA, A. Isolamento, caracterização e seleção de estirpes de *Azospirillum amazonense* e *Herbaspirillum seropedicae* associadas a diferentes variedades de milho cultivadas no cerrado. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. 36 p.
41. REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in gramineae and palm trees. *Critical Review in Plant Sciences*, v.19, p.227-247, 2000.
42. REITER, B. et al. Endophytic nifH gene diversity in African sweet potato. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 49, n. 9, p. 549-555, 2003.
43. RONCATO-MACCARI, L. et al. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. *FEMS Microbiology Ecology*, Oxford, v. 45, n.1, p. 39-47, 2003.
44. ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. *Archives of Microbiology*, New York, v. 181, n.5, p. 337-344, 2004.
45. STURZ, A. V. et al. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 44, n. 2, p. 162-167. 1998.
46. ZAKHAROVA, E, A. et al. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense* - Insights from quantum chemistry. *European Journal of Biochemistry*, Oxford, v. 259, n. 3, 572-576, 1999.