

## AVALIAÇÃO DE FAMÍLIAS DE CANA-DE-AÇÚCAR QUANTO À EFICIÊNCIA NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

Lizz Kezzy de Moraes"; Paulo de Albuquerque e Silva'; Verônica Massena Reis'; Marcelo Sfcir de Aguiar', Adriane Leite do Amaral'; Kênia de Almeida Diniz Albuquerque"; Geraldo Veríssimo de Souza Barbosa"; João Messias dos Santos"; Antônio Maria Cardoso Rocha'Ananda Virgínia de Aguiar"

'Engenheiro Agrônomo Doutor em Genética e Melhoramento Embrapa Tabuleiros Costeiros-\*lizzulcpatc.embrapa.br 'Engenheiro Agrônomo Doutor em Fitotecnia Embrapa Tabuleiros Costeiros-pasrcscpatc.embrapa.br 'Bióloga Doutora em Microbiologia Embrapa Agrobiologia-verônica(alcnpab.embrapa.br "Engenheira Agrônoma Doutora em Fitotecnia Universidade Federal de Alagoas-keniadinizé@hotmail.com 'Engenheiro Agrônomo mestre em Estatística, Genética e Melhoramento Universidade Federal de Alagoas-gvbarbosa@gmail.com.br "Engenheira Agrônoma doutora em Genética e Melhoramento de Plantas Embrapa Floresta-ananda@cnpf.embrapa.br

### Resumo

Com o objetivo de selecionar as famílias de cana-de-açúcar mais responsivas à fixação biológica do nitrogênio foram avaliadas 10 famílias obtidas de cruzamentos biparentais inoculadas com bactérias diazotróficas endofíticas. Utilizou-se a metodologia REML/BLUP para obtenção dos valores genotípicos e para identificar as melhores famílias. As características diâmetro do colmo, número de perfilhos e altura de plantas foram determinadas como características promissoras para seleção de famílias responsivas à fixação biológica do nitrogênio. Os cruzamentos RB 813804 x RB 72910; RB 961003 x RB 931011; RB 98710 x RB 72454; CO 62175 x RB 72454; RB 92579 x RB 86 3129, apresentaram valores genotípicos superiores à média experimental. Conclui-se que para o conjunto de famílias estudadas existem clones promissores e responsivos à fixação biológica do nitrogênio.

### Abstract

#### *Evaluated families of sugarcane when to efficiency of biological nitrogen fixation*

The objective this study was selecting the families of sugarcane more responsive to biological nitrogen fixation. Were evaluated ten families obtained from biparental crosses inoculated with endophytic diazotrophs. The methodology REML / BLUP was used to obtain the genotypic values and to identify the best families. The stalk diameter, number of tillers and stalk height traits were evaluated for selection of families responsive to biological nitrogen fixation. The crosses RB 813804 x RB 72910; RB 961003 x RB 9310 11; RB 98710 x RB 72454; CO 62175 x RB 72454; RB 92579 x RB 86 3129, presented the higher genotypic values than the experimental average. Overall, the results suggest that there are promising and responsive clones to biological nitrogen fixation.

### INTRODUÇÃO

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) consiste na redução deste gás por bactérias que possuem a enzima chamada nitrogenase. A utilização de bactérias fixadoras de N<sub>1</sub>, que contribuem com a nutrição nitrogenada das plantas apresenta vantagens econômicas e ambientais. As vantagens da FBN está no seu baixo custo e contribuição para a melhoria da qualidade ambiental, já que a diminuição da utilização de fertilizantes industrializados, reduz a quantidade de nitrato escoada para águas superficiais e subterrâneas, além do fato que diversas fontes convencionais de nitrogênio são altamente demandantes de energia, proveniente do petróleo, na sua fabricação. A substituição dessas fontes aumentaria o balanço energético da produção de álcool com a cana,

assim, a maximização dos benefícios da FBN torna-se fundamental para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável (Urquiaga et al., 1992).

No Brasil vem-se observando, há muitos anos, que a resposta à aplicação de N-fertilizante vem diminuindo (Malavolta et al., 1963; Urquiaga et al., 1992). Por esta razão os próprios agricultores reduziram a aplicação de N até 25 kg N/ha na cana plantada em muitas áreas do Estado de São Paulo, sem afetar os rendimentos. Contudo, no contexto nacional, a aplicação de N-fertilizante continua alta, em cana-planta chega ao redor de 60 kg N/ha/ano. Além disto, a cana-de-açúcar é uma gramínea tropical de ciclo fotossintético C4 que é capaz de incorporar muito mais carbono da atmosfera que o CO<sub>2</sub> liberado na queima do álcool derivado de seu cultivo, atuando potencialmente na diminuição do "efeito estufa" provocado pelo aumento do teor de CO<sub>2</sub> atmosférico (Döbereiner e Baldani, 1998). Mas esta cultura também é capaz de se associar com uma diversidade de bactérias diazotróficas e obter contribuições efetivas do processo de redução do nitrogênio atmosférico.

A descoberta de microrganismos fixadores de nitrogênio em cana-de-açúcar foi um mérito dos pesquisadores brasileiros liderados por Johanna Döbereiner, há mais de 40 anos. Porém, o mecanismo que envolve a fixação de nitrogênio, a sua eficiência e os fatores que interferem, não foram ainda totalmente desvendados. Contudo, sabe-se que há várias espécies de microrganismo fixadores de nitrogênio que vivem em associação com a cana-de-açúcar e que existem diferenças entre variedades de cana à resposta a essas associações (Vitti et al., 2008). Pesquisadores isolaram e classificaram bactérias fixadoras encontradas na cana-de-açúcar, como *Gluconacetobacter diazotrophicus* que se encontra em qualquer órgão da planta, restos de colheita e no solo (Boddey et al., 1995; Baldani et al., 1997; Reis et al., 2004). Recentemente, ênfase tem sido dada a diazotróficos que infectam o interior das plantas (chamadas endofíticas), as quais incluem bactérias do gênero *Herbaspirillum* e *Gluconacetobacter* (Boddey et al., 2003). A *G.diazotrophicus* produz hormônio de crescimento, como o ácido indolacético (AIA) e possui atividade antagonista a alguns patógenos do solo, segundo vários autores citados por Perin et al. (2004).

Ainda são incipientes os trabalhos que relatem aumento da produtividade na associação com bactérias fixadoras de nitrogênio em cana-de-açúcar, ou mesmo, que inoculações com as bactérias possam aumentar a eficiência da planta em fixar nitrogênio (Boddey et al., 2003). A perspectiva de uso da formulação com bactérias diazotróficas para fixação de nitrogênio em cana-de-açúcar representa economia no custo de produção além de atender a sociedade mundial para garantir a diminuição de insumos químicos, altamente tóxicos ao meio ambiente, sem causar diminuições drásticas nos índices de produtividade econômica. Como são microrganismos benéficos para as plantas, não se espera nenhum tipo de interação negativa pela adoção do produto que pode inclusive contribuir com estímulo de outras características vegetais atuando como microrganismos promotores de crescimento tais como: aumento da área de superfície radicular, foliar, acúmulo de massa seca e até mesmo na resistência e controle de pragas. Neste sentido, existe necessidade de maiores estudos com genótipos responsivos ao uso de formulação com bactérias diazotróficas. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a resposta de diferentes famílias de cana-de-açúcar à inoculação com bactérias diazotróficas endofíticas.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação da Unidade de Execução em Pesquisa da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Rio Largo-AL no ano agrícola 2009/20 IO lotada no Centro Experimental de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, no município de Rio Largo-AL,

Foram utilizadas dez diferentes famílias de cana-de-açúcar provenientes de cruzamentos biparentais do Banco de Germoplasma da RIDESA fornecidos pelo Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar (Quadro I). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições em esquema fatorial 10 x 2, constituído de 20 tratamentos, em que a cada repetição foi composta por oito indivíduos. Os tratamentos foram compostos de combinações dez famílias com e sem a presença de inoculante. As sementes, oriundas dos cruzamentos, foram semeadas em bandejas de células de polietileno e após um mês foram transplantadas para sacos de polietileno 10cm x 25cm, em substrato livre de nitrogênio. O mix de bactérias diazotróficas (inoculante) foi fornecido pela Embrapa Agrobiologia, sendo recomendado a dosagem de 400g/ha. Após quatro meses de transplantio dos seedlings foram realizadas as avaliações para diâmetro médio de colmos (em); número médio de perfilhos (contagem); altura média de colmos (em) e teor de clorofila.determinado por método indireto com uso do aparelho Clorofilômetro; número de folhas vivas (contagem) e número de folhas mortas (contagem).

Posterior a coleta dos dados foi realizada a análise de variância, e em seguida, obtido os componentes de variância e valores genotípicos pelo método REML (máxima verossimilhança restrita) 1 BLUP (melhor preditor não-viciado) utilizando o software SELEGEN.

Quadro I - Relação dos cruzamentos biparentais realizados para obtenção das famílias.

Cruzamento	♂		♀
1	RB 813804	x	RB 72910
2	RB 961003	x	RB 931011
3	RB 93509	x	RB 9629
4	RB 98710	x	RB 72 454
5	CO 62175	x	RB 72 454
6	RB 92 579	x	RB 863129
7	RB 99395	x	SP 77-5181
8	RB 867515	x	RB 91514
9	IAC 87-3396	x	SP 81-3250
10	RB 92606	x	RB 977619

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que houve diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre as famílias para as características avaliadas Diâmetro do Colmo (DIAM), Altura de Plantas (ALT), Número de Perfilhos (NPERF), Teor de Clorofila (CLORF), Número de Folhas Mortas (NFM) e Número de Folhas Vivas (NFV). A análise mostra diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os fatores inoculado e não-inoculado para as características DIAM, ALT e NPERF (Tabela I). Essas famílias se mostram promissoras para a seleção de clones responsivos à fixação biológica do nitrogênio para essas características. DIAM, NPERF e ALT são características ligadas ao crescimento e desenvolvimento das plantas que está diretamente relacionado à estímulos proporcionado por hormônios vegetais. Diversas bactérias diazotróficas são capazes de produzir fitormônios, responsáveis pelo efeito estimulatório observado no crescimento das plantas. Bastián et al. (1998) detectaram a presença de ácido

indol-acético (AIA) e giberelinas A I e A3, em culturas de *Herbaspirillum seropedicae*. Resultados semelhantes foram encontrados por Fuentes-Ramírez et al. (1993) avaliando a produção de AIA por estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Na Tabela 2 são observadas as médias gerais das dez famílias para as características avaliadas submetidas à com e sem inoculação. Verificou-se que as famílias obtidas dos cruzamentos biparentais C062175 x RB72454, RB813804 x RB72910, RB961003 x RB931011, RB93509 x RB9629 RB93509 x RB9629 e RB92579 x RB863 129 apresentaram maiores valores em magnitude para o fator inoculação. Sabe-se que as associações planta x bactéria ocorrem em diferentes graus de interação, promovendo variação no comportamento de genótipos em diferentes condições ambientais em estudo e em muitos casos estão relacionadas à especificidade de interação entre as características genéticas microbianas e características genéticas da planta hospedeira (Olivares et al., 1997).

Os valores genotípicos das famílias avaliadas no presente trabalho encontram-se na Tabela 4. Verificou-se que das 10 famílias avaliadas, cinco apresentaram valores genotípicos superiores à média experimental para algumas características (1- RB 813804 x RB 72910; 2-RB 961003 x RB 9310 11; 4-RB 98710 x RB 72454; 5- CO 62175 x RB 72454; 6- RB 92579 x RB 86 3129). Conseqüentemente existam genótipos promissores responsivos à fixação biológica do nitrogênio dentro destas melhores famílias. Segundo Oliveira et al. (2009) uma forma de explorar o potencial dessas famílias seria realizar o plantio de plântulas em maior número para estas famílias, sendo posteriormente realizada a seleção individual com base em características promissoras. As melhores famílias para NPERF apresentaram valor genotípico (Vgf) de 0,5623 e 0,8559, sendo proveniente do cruzamento entre os genitores C062175 x RB72454. Para DIAM os maiores valores genotípicos são apresentados para os cruzamentos RB813804 x RB729 10 (10,5557); RB961003 x RB931 0 II (10,4342) e RB93509 x RB9629 (10,1636). Para altura de planta os cruzamentos RB93509 x RB9629 (53, 1320) e RB92579 x RB863129 (40,8544), respectivamente apresentaram os maiores valores genotípicos. Segundo Oliveira et al (2009) a exploração de cruzamentos com valores genotípicos superiores seriam importante, pois visaria à identificação de clones potenciais e com maior probabilidade de serem promissores, no caso deste trabalho, responsivos à fixação biológica do nitrogênio. A exploração das famílias superiores pode possibilitar que maior número de clones potenciais avance para etapas seguintes do melhoramento genético da cana-de-açúcar (Barbosa et al, 2005; Resende e Barbosa, 2006). Neste sentido Resende e Barbosa (2006), relataram que a seleção de indivíduos dentro das famílias deve-se levar em conta o valor genotípico das famílias, sendo que as melhores famílias seriam selecionadas um maior número de clones potenciais. Diferenças entre variedades de cana-de-açúcar e o potencial de fixação de nitrogênio foram estudadas por Coelho et al. (2003), que verificaram que a FBN ocorreu em todos os genótipos comerciais de cana-de-açúcar avaliados: RB739735, SP79-23 13, RB72454, RB758540, RB835089, RB825336 e SP79-2312, e também nos acessos silvestres: Krakatau (5. *spontaneum*) e Chunnee (5. *barberi*). As maiores contribuições da FBN foram observadas nas variedades RB739735, RB758540, RB835089 e SP79-23 12, podendo ser resultado do sucesso dos programas de melhoramento genético realizados em solos de baixa fertilidade natural. Observa-se que algumas dessas variedades são genitoras dos seedlings avaliados no presente estudo. Boddey et al. (2003) afirmam que a capacidade de fixação de N2 parece ter grande dependência da variedade de cana. No estudo de Polidoro et al. (2001), as variedades comerciais de cana-de-açúcar RB72454 e SP80-1842 apresentaram alto potencial para FBN. Assim, a contabilização do N

proveniente da fixação biológica do nitrogênio e a resposta diferenciada em cada genótipo específico em programas de melhoramento genético vegetal, ainda é uma questão que deve ser muito estudada, especificamente no que diz respeito a cultura da cana-de-açúcar.

Considerando os impactos ambientais decorrentes das práticas da cultura canavieira, a FBN faz diferença: baixa utilização da adubação química nitrogenada tende a proporcionar uma melhoria na qualidade do solo, dos mananciais e de outros componentes ambientais. Do ponto de vista energético, a FBN associada à cana-de-açúcar contribui, significativamente, para o ganho energético na produção de etanol, pois emprega-se na produção de fertilizantes altos níveis de energia fóssil além da emissão de altos níveis de CO<sub>2</sub>.

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) pode substituir entre 10 a 30% do fertilizante nitrogenado aplicado na cultura da cana-de-açúcar (Urquiaga et al., 1992). Este valor pode ser aumentado se considerarmos a seleção de genótipos de cana-de-açúcar com maior potencial de fixação biológica de nitrogênio. Mas para que isso aconteça faz-se necessário estratégias que permitam maximizar a escolha desses materiais como a seleção de famílias responsivas à fixação biológica do nitrogênio.

## CONCLUSÕES

- 1) Diâmetro médio do colmo, Número de Perfilhos e Altura de plantas são características promissoras na seleção de famílias responsivas à fixação biológica do nitrogênio com bactérias diazotróficas endofíticas.
- 2) Os cruzamentos RB 813804 x RB 72910; RB 961003 x RB 9310 I; RB 98710 x RB 72454; CO 62175 x RB 72454; RB 92579 x RB 86 3129, apresentaram valores genotípicos superiores à média experimental.
- 3) Para o grupo de famílias estudadas existem clones de cana-de-açúcar promissores responsivos à fixação biológica do nitrogênio

**Tabela I.** Análise de variância, para avaliação de dez famílias de cana-de-açúcar submetidas à inoculação ou não com bactérias diazotróficas endofíticas, Rio Largo-Al., 2009.

FV	GI	DIAM"	ALT	NPERF	CLF	NFM	NFV
Família (F)	9	4,58**	559,18**	0,65**	46,82**	0,63**	0,75**
Inoculação (I)	I	L17*	la 1,81 *	0,52*	0,16	0,07	0,11
FxI	9	0,27	11,57	0,11	2,83	1,90	0,06
Erro Médio	40	0,28	24,47	0,08	3,20	0,11	0,08
CV(%)		5,63	14,20	13,11	7,26	13,30	8,79

//DIAM: diâmetro do colmo (mm); ALT: altura das plantas (em); NPERF: número de perfilhas; CLORF: teor de clorofila; NFM: número de folhas mortas; NFV: número de folhas vivas.

**Tabela 2.** Média geral das dez famílias de cana-de-açúcar para as características" diâmetro do colmo, número de perfilhas, número de folhas mortas, número de folhas vivas, altura da planta e teor de clorofila. Rio Largo-AL,2009.

Famílias	DIAM"		NPERF		NFM		NFV		ALT		CLORF	
	N-Inoc	Inoc	N-Inoc	Inoc	N-Inoc	Inoc	N-Inoc	Inoc	N-Inoc	Inoc	N-Inoc	Inoc
I	10,11	10,62	0,04	0,11	2,08	2,42	351	333	3833	38,03	26,92	25,66
2	11,17	9,86	0,13	0,08	2,71	2,87	3,62	3,41	38,43	35,54	22,74	22,49
J	10,17	10,27	0,16	0,01	258	275	391	362	53,41	5471	22,47	2343
4	9,58	9,377	0,33	0,83	2,12	1,95	3,37	3,16	41,71	3445	21,85	20,28
5	9,26	9,48	0,70	1,16	3,08	295	271	2,41	41,79	35,66	2540	26,99
6	9,81	9,64	0,12	0,46	2,83	3,08	333	3,12	42,58	39,73	26,85	26,05
7	7,88	7,80	0,45	0,29	279	3,01	3,37	333	23 50	2195	2928	3125
8	9,5'	8,96	0,17	0,5	3,29	245	345	.175	24,66	2429	23,21	22,17
9	8,10	8,25	0,62	0,79	2,58	2,28	2,87	307	2521	2426	22,50	22,02
10	9,45	9,20	0,87	1,00	3,01	258	2,95	3,01	31,73	26,66	2469	26,62

I/DIAM: diâmetro do colmo (mm); ALT: altura das plantas (em); NPERF: número de perfilhas; CLORF: teor de clorofila; NFM: número de folhas mortas; NFV: número de folhas vivas.

**Tabela 3.** Média geral das característicasv diâmetro do colmo, número de perfilhas, número de folhas mortas, número de folhas vivas, altura da planta e teor de clorofila. Rio Largo-AL, 2009.

Família	DIAM	NPERF	NFM	NFV	ALT	CLORF
I	106667	0.0831	2.2556	3.4157	38.1793	26.2935
2	10.5190	0.1092	2.7917	3.5208	36.9896	22.6224
3	10.2242	0.0883	2.6667	37708	54.0625	22.9564
4	9.4804	0.5833	2.0417	3.2708	380833	210690
5	9.3758	0.9375	30208	25625	38.7292	26.1977
6	97263	0.2950	2.9583	3.2292	41.1604	26.4578
7	7.8410	03750	2.8958	3.3542	227292	30.2678
8	9.2540	0.4600	2.8750	3..6042	24.4792	22.6971
9	8.4 772	0.7120	2.4316	2.9751	247378	22.2686
10	9.3271	09375	27917	2.9752	29.1979	25.6609

I/OIAM: diâmetro do colmo (mm); ALT: altura das plantas (em); NPERF: número de perfilhas; CLORF: teor de clorofila; NFM: número de folhas mortas; NFV: número de folhas vivas.

**Tabela 4.** Valores genotípicos obtidos na análise REML/BLUP para as características u diâmetro do colmo, número de perfilhas, número de folhas mortas, número de folhas vivas, altura da planta e teor de clorofila,

Cruzamentos	OIAM	NPERF	NFM	NFV	ALT	CLORF
RB 813804 x RB 72910	10.5557	0.1478	2.3932	3.4015	38.1800	26.294
RB 961003 x RB 93 f0l I	10.4342	0.1651	2.7496	3.4957	36.8854	22.622
RB93509 x RB 9629	101636	0.1478	2.6674	3.7218	53.1320	22.956
RB 98710 x RB 72454	9.4807	0.5623	2.2561	3.2696	37.9262	21069
CO 62175 x RB 72454	9.3846	08559	2.9004	2.6291	38.5408	26.198
RB 92579 x RB 86 3129	9.7064	0.3205	2.8593	3.2320	40.8544	26.458
RB 99395 x SP 77-5181	7.9754	0.3896	2.8182	3.3450	23.3151	30.268
RB867515xRB9514	9.2727	04587	2.8045	3.5711	249804	22697
IAC 87-3396 x SP 81-3250	8.5200	0.7005	2.4892	2.9117	250796	22.269
RB 92606 x RB 97 7619	9.3399	08559	2.7496	3.0059	29.4708	25.661

I/DIAM: diâmetro do colmo (mm); ALT: altura das plantas (em); NPERF: número de perfilhas; CLORF: teor de clorofila; NFM: número de folhas mortas; NFV: número de folhas vivas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDANI, V. L. D.~ OLIVEIRA, E.~ BALOTA, E.~ BALDANI, J. I., KIRCHHOF, G., DOBEREINER, J. *Burkholderia brasiliensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. *An.Acad.Bras. Cie.*, 69: 116,1997.
- BARBOSA, M. H. P.~ RESENDE, M. D. V.~ BRESSIANI, J. A.; SILVEIRA, I. C. L.~ PETERNELLI, I. A Selection of sugarcane families and parents by REMLIBLUP. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v5, p443-450. 2005
- BASTIÁN, F. COHEN, A., PICCIOLI, C., LUNA, V., BARALDI, R., BOTTINI, R. Producción de indol-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically defined culture media. *Plant Growth Regul.* 24: 7-11. 1998.
- BODDEY, R. M.~ URQUIAGA, S.; DOBEREINER, J. I. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. *Sugar Journal*. v.58, n. I. p.34-37,1995
- BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.~ ALVES, B. I. R.~ REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant and Soil*. v252, p.139-149, 2003
- COELHO, C. H. M., MEDEIROS, A. F. A.; POLIDORO, J. C.; XAVIER, R. P., RESENDE, A., QUESADA, D., M., ALVES, B. J. A.; BODDEY, R. M.~ URQUIAGA, S. Identificação de genótipos de cana-de-açúcar quanto ao potencial de contribuição da fixação biológica de nitrogênio. *Agronomia*, v.37, n.2, p.37-40, 2003.
- DOBEREINER, J.; BALDANI, J. I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas em plantas não leguminosas. *Seropédica: Embrapa Agrobiologia*, 1998,60 p.
- FUENTES-RAMÍREZ, L. L. JIMÉNEZ-SALGADO, I.; ABARCA-OCAMPO, I. R.~ CABALERO-MELLADO, J. I. *Acetobacter diazotrophicus*, an indole-acetic producing bacterium isolated from sugarcane cultivars 01 México. *Plant and Soil*, v.154, p.145-150, 1993.
- MALAVOL TA, E., GOMES, F.P., COUR Y, T. A diagnose foliar na cana-de-açúcar. IV. Resultados de 40 ensaios fatoriais NPK 3x3x3, primeiro corte, Piracicaba, ESALQ/USP. 47p, 1963.
- OLIVARES, F.L., JAMES, E. K., BALDANI, J. I., DOBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease susceptible and resistant cultivars of sugar-cane by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. *New Phytologist*. 135:723-737, 1997.
- PERIN, L. BALDANI, J. I.; REIS, V. M. Diversidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolada de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.39, n.S, p.763-770. 2004.
- OLIVEIRA, A.L.M., STOFFELS, M., SCHMID, M., REIS, V.M., BALDANI, J. I., HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. *European Journal of Soil Biology*, 45: 106-113,2009.
- POLIDORO, J. C., RESENDE, S., QUESADA, D. M.~ XAVIER, R. P.~ COELHO, C. H. M.~ ALVES, B. I. R. BODDEY, R. M.~ URQUIAGA, S.; Levantamento da contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura da cana-de-açúcar no Brasil. *Seropédica: Embrapa Agrobiologia*, dez. 200 1.8 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 144).
- REIS, V. M.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.~ VOLGEL, I.; STOFFELS, M.~ GUYON, S.; MA VINGUI, P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 2155-2162~ 2004.
- RESENDE, M. D. V.~ BARBOSA, M. H. P. Selection via simulated Blup base on family genotypic effects in sugarcane. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vAI, n.J, pA21-429, 2006
- URQUIAGA, S.~ CRUZ, K. H. S.~ BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugarcane: nitrogen - 15 and nitrogen balance estimates. *Soil Science Society of America Journal*. v.56, p. 105-115, 1992.
- VITTI, A. C.; CANTARELLA, H., TRIVELIN, P. C. N., ROSSETTO, R. Nitrogênio Fixação Biológica de Nitrogênio em cana-de-açúcar. In: *Cana-de-açúcar*. Dinardo-Miranda, L. L.; Vasconcelos, A. C. M. de; Landell, M. G. de A. (ed.) Campinas: Instituto Agronômico, 2008. 882 p.