

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

**INFLUÊNCIA DO GENÓTIPO DA PLANTA, MICROPROPAGAÇÃO E
FERTILIZAÇÃO NITROGENADA SOBRE A POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS EM CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.).**

FÁBIO BUENO DOS REIS JUNIOR

SEROPÉDICA, RIO DE JANEIRO

1998

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

**INFLUÊNCIA DO GENÓTIPO DA PLANTA, MICROPROPAGAÇÃO E
FERTILIZAÇÃO NITROGENADA SOBRE A POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS EM CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.).**

FÁBIO BUENO DOS REIS JUNIOR

ORIENTAÇÃO:

Dra. JOHANNA DÖBEREINER

Dra. VERÔNICA MASSENA REIS

**Tese submetida como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Magister Scientie em Agronomia,
área de concentração em Ciência do Solo.**

SEROPÉDICA, RIO DE JANEIRO

JANEIRO DE 1998

INFLUÊNCIA DO GENÓTIPO DA PLANTA, MICROPROPAGAÇÃO E
FERTILIZAÇÃO NITROGENADA SOBRE A POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS EM CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.).

AUTOR

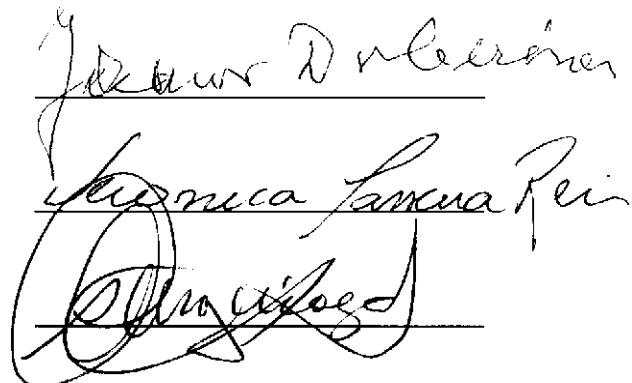
FÁBIO BUENO DOS REIS JUNIOR

Aprovado em: 27/01/1998

Dra. JOHANNA DÖBEREINER

Dra. VERÔNICA MASSENA REIS

Dr. SEGUNDO URQUIAGA



Dedico este trabalho

À Deus.

À minha família, em especial aos meus pais Fábio e Lindinalva, pelo amor, carinho, educação, amizade, (+ ∞).

À Diovana, pela força e por, neste período, ter preenchido minha vida com muita felicidade.

À Dra. Johanna Döbereiner, pela qual tenho um imenso orgulho de conhecê-la e mais ainda de ter tido a oportunidade de ser seu orientado.

Agradecimentos

À Verônica Massena Reis, pela orientação, estímulo e amizade.

A todos os amigos com quem tive a felicidade de conviver neste período, em especial para Elyson S. Amaral, Dr. Fabinho Olivares e Carlos Gava.

A todos os funcionários da *Embrapa Agrobiologia*, em especial para Geraldo Baeta, pela grande ajuda e amizade.

Aos pesquisadores Segundo Urquiaga, Robert Boddey, José Antônio R. Pereira, José Ivo e Vera Lúcia Baldani, pelo incentivo e amizade.

À *Embrapa Agrobiologia*, UFRRJ e CNPq pela oportunidade de realizar o meu trabalho.

À Copersucar, pela disposição em ajudar em alguns trabalhos desta tese.

Aos amigos do Instituto de Pesquisas GSF (Munique, Alemanha) e a Mr. Ewan K. James.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Nascido à 31 de Outubro de 1970 na cidade de Nova Iguaçu, estado do Rio de Janeiro, filho de Fábio Bueno dos Reis e Lindinalva Fonseca dos Reis, diplomou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em Fevereiro de 1994. No mesmo ano, iniciou as atividades de bolsista de aperfeiçoamento científico (bolsa concedida pelo CNPq) na *Embrapa Agrobiologia* sob orientação da Dra. Johanna Döbereiner. Em março de 1995 iniciou o curso de Mestrado em Ciência do Solo pela UFRRJ, desenvolvendo seu projeto de pesquisa na *Embrapa Agrobiologia*, trabalhando ainda sob orientação da Dra. Johanna Döbereiner e tendo como co-orientadora a Dra. Verônica Massena Reis.

SUMÁRIO

	página
RESUMO GERAL	XX
GENERAL ABSTRACT.....	XXIII
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11

CAPÍTULO 1. Levantamento e quantificação de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)

Resumo	21
Abstract	22
Introdução	23
Material e Métodos	26
Resultados e Discussão	29
Conclusões	42
Referências Bibliográficas	43

CAPÍTULO 2. Estudos de ocorrência e colonização de bactérias diazotróficas em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)

Resumo	49
Abstract	50
Introdução	51
Material e Métodos	56
Resultados e Discussão	67
Conclusões	96
Referências Bibliográficas	98

**CAPÍTULO 3. Influência da fertilização nitrogenada sobre a população de
Acetobacter diazotrophicus e *Herbaspirillum* spp. em plantas de cana-de-
açúcar (*Saccharum* spp.)**

Resumo	106
Abstract	107
Introdução	108
Material e Métodos	111
Resultados e Discussão	117
Conclusões	154
Referências Bibliográficas	156

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1	página
Tabela 1: Ocorrência de bactérias diazotróficas em raízes, colmos e folhas de quatro diferentes genótipos de cana de açúcar, em três épocas de coleta (meses após o corte)	
(A) Genótipo Krakatau	31
(B) Genótipo Chuneé	31
(C) Genótipo SP 70-1143	32
(D) Genótipo CB 45-3	32
Tabela 2: Log do nº de células de <i>A. diazotrophicus</i> e <i>Herbaspirillum</i> spp. nas diversas partes da planta de cana-de-açúcar ao longo do experimento	40
Tabela 3: Log do nº de células de <i>A. diazotrophicus</i> presente nos quatro genótipos de cana-de-açúcar avaliado nas coletas aos 4, 7 e 15 meses após o plantio.....	41

CAPÍTULO 2

página

Tabela 1: Avaliação da presença de bactérias diazotróficas em plantas de cana-de-açúcar oriundas de cultivo de meristemas, e diferentes tipos de substrato coletados no campo experimental do Centro Tecnológico da Copersucar (Piracicaba – SP)	69
Tabela 2: Avaliação da presença de bactérias diazotróficas em plantas de cana-de-açúcar oriundas de cultivo de meristemas, plantas propagadas por semente, e em diferentes tipos de substrato coletados no campo experimental do Centro Tecnológico da Copersucar (Piracicaba – SP) .	72
Tabela 3: Avaliação da presença de bactérias diazotróficas em plantas de cana-de-açúcar oriundas de cultivo de meristemas coletadas em três usinas localizadas em diferentes cidades do interior do estado de São Paulo .	74
Tabela 4: Máxima diluição de onde foi isolada a bactéria <i>A. diazotrophicus</i> em plantas adultas e pré-germinadas de diferentes variedades de cana-de-açúcar oriundas de cultivo tradicional ou cultura de tecidos	79
Tabela 5: Máxima diluição de onde foi isolada a bactéria <i>Herbaspirillum</i> spp. em plantas adultas e pré-germinadas de diferentes variedades de cana-de-açúcar oriundas de cultivo tradicional ou cultura de tecidos	79
Tabela 6: Isolamento de <i>Herbaspirillum</i> spp. e <i>A. diazotrophicus</i> de duas amostras de plantas de cana-de-açúcar da variedade SP 70-1143 utilizando-se a metodologia de imunocaptura	80

Tabela 7: Isolamento de <i>Herbaspirillum</i> spp. e <i>A. diazotrophicus</i> de quatro amostras de raízes de plantas de cana-de-açúcar da variedade SP 70-1143, com a utilização da metodologia de imunocaptura (I) e com a metodologia tradicional (T) de isolamento	82
--	----

CAPÍTULO 3	página
Tabela 1: Características químicas do solo PVA na profundidade de 0-20 cm, analisado antes do plantio	113
Tabela 2: Mistura utilizada como adubação de cobertura	113
Tabela 3: Acúmulo de matéria seca (kg/planta) nas raízes (A), colmos (B), palha (C) e folhas (D) de cana-de-açúcar das variedades SP 79-2312 e SP 70-1143, em diferentes épocas e nos tratamentos com e sem adubação nitrogenada	123
Tabela 4: Concentração de nitrogênio (mg/g de M.S.) nas raízes (A), colmos (B), palha (C) e folhas (D) de cana-de-açúcar das variedades SP 79-2312 e SP 70-1143, em diferentes épocas e nos tratamentos com e sem adubação nitrogenada	125
Tabela 5: Acúmulo de nitrogênio (g de N/planta) nas raízes (A), colmos (B), palha (C) e folhas (D) de cana-de-açúcar das variedades SP 79-2312 e SP 70-1143, em diferentes épocas nos tratamentos com e sem adubação nitrogenada	127
Tabela 6: Concentração de potássio (mg/g de M.S.) nas raízes (A), colmos (B), palha (C) e folhas (D) de cana-de-açúcar das variedades SP 79-2312 e SP 70-1143, em diferentes épocas e nos tratamentos com e sem adubação nitrogenada	132

Tabela 7: Concentração de fósforo (mg/g de M.S.) nas raízes (A), colmos (B), palha (C) e folhas (D) de cana-de-açúcar das variedades SP 79-2312 e SP 70-1143, em diferentes épocas e nos tratamentos com e sem adubação nitrogenada	134
Tabela 8: Concentração de cálcio (mg/g de M.S.) nas raízes (A), colmos (B), palha (C) e folhas (D) de cana-de-açúcar das variedades SP 79-2312 e SP 70-1143, em diferentes épocas e nos tratamentos com e sem adubação nitrogenada	136
Tabela 9: Concentração de magnésio (mg/g de M.S.) nas raízes (A), colmos (B), palha (C) e folhas (D) de cana-de-açúcar das variedades SP 79-2312 e SP 70-1143, em diferentes épocas e nos tratamentos com e sem adubação nitrogenada	138
Tabela 10: Log do número de <i>Herbaspirillum</i> spp. em raízes (A) e na base de colmos (B) de cana-de-açúcar das variedades SP 79-2312 e SP 70-1143, em diferentes épocas e nos tratamentos com e sem adubação nitrogenada	144
Tabela 11: Log do número de <i>Acetobacter diazotrophicus</i> em raízes (A) e na base de colmos (B) de cana-de-açúcar das variedades SP 79-2312 e SP 70-1143, em diferentes épocas e nos tratamentos com e sem adubação nitrogenada	145
Tabela 12: Peso de matéria fresca de parte aérea (PFpa) e comprimento da parte aérea (Cpa) em plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar var. Na 56-79 adubadas com o equivalente a 300 kg N/ha	147

Tabela 13: Comparações entre as médias das populações de bactérias <i>Herbaspirillum seropedicae</i> e <i>Acetobacter diazotrophicus</i> entre plantas adubadas e não adubadas	153
--	-----

LISTA DE FIGURAS

página

CAPÍTULO 1

Figura 1: Log do nº de células de <i>A. diazotrophicus</i> (A) e <i>Herbaspirillum</i> spp. (B) presente nas raízes de quatro genótipos de cana-de-açúcar	35
Figura 2: Log do nº de células de <i>A. diazotrophicus</i> (A) e <i>Herbaspirillum</i> spp. (B) presente na base do colmo de quatro genótipos de cana-de-açúcar	36
Figura 3: Log do nº de células de <i>A. diazotrophicus</i> (A) e <i>Herbaspirillum</i> spp. (B) presente no ápice do colmo de quatro genótipos de cana-de-açúcar	37
Figura 4: Log do nº de células de <i>A. diazotrophicus</i> (A) e <i>Herbaspirillum</i> spp. (B) presente nas folhas de quatro genótipos de cana-de-açúcar	38

CAPÍTULO 2

página

- Figura 1: Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura (FMEV) mostrando grande número de bactérias aderidas em uma região de ferimento na raiz, **barra = 10 mm** 87
- Figura 2: FMEV mostrando as bactérias acumuladas próximas a uma ferida da raiz e em seu interior, **barra = 15 mm** 87
- Figura 3: FMEV mostrando as bactérias no interior de uma ferida na raiz, **barra = 50 mm (zoom 8 x)** 87
- Figura 4: FMEV da colonização bacteriana em uma região de junção de raiz lateral, **barra = 65 mm (zoom 8 x)** 89
- Figura 5: FMEV do tecido danificado pela emergência de uma raiz secundária. É interessante notar a ausência de bactérias na parte não danificada da superfície radicular (setas), e a presença de muco e bactérias no tecido rompido da epiderme, **barra = 50 mm** 89
- Figura 6: Fotomicrografia de microscopia ótica (FMO) de seção transversal da região de emergência de uma raiz lateral. Observar as células bacterianas aderidas próximas ao local de emergência, **barra = 20 mm** 89
- Figura 7: Detalhe da figura anterior, **barra = 10 mm** 89

- Figura 8: FMO de seção transversal da região meristemática das raízes mostrando as bactérias (setas) em cavidades localizadas entre a coifa e o tecido meristemático, **barra = 10 mm** 91
- Figura 9: FMO de seção transversal da região meristemática das raízes, incubada com anticorpos policlonais anti – *A. diazotrophicus* PAL 5, **barra = 20 mm** 91
- Figura 10: Detalhe da figura 9 mostrando as bactérias acumuladas (seta) em cavidades na região entre a coifa e o tecido meristemático, **barra = 10 mm** 91
- Figura 11: Detalhe da figura 9 mostrando as bactérias no espaço intercelular próximo ao ápice da região meristemática, **barra = 10 mm** 91
- Figura 12: Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão (FMET) mostrando a colonização bacteriana no espaço intercelular das células do cortéx da raiz, **barra = 0,60 mm** 93
- Figura 13: Magnificação da FMET da figura 12 com as bactérias marcadas com ouro, após a incubação com anticorpos policlonais anti - *A. diazotrophicus* PAL 5, **barra = 0,25 mm** 93
- Figura 14: FMO mostrando algumas células de *A. diazotrophicus* (setas pequenas) dentro do vaso xilemático, enquanto outras células (setas maiores) iniciam o processo de infecção, **barra = 10 mm** 93

- Figura 15: FMEV de seção transversal da base do colmo mostrando as bactérias multiplicando-se nos espaços intercelulares do parênquima cortical, **barra = 20 mm (zoom 8 x)** 95
- Figura 16: FMO de seção longitudinal da folha mostrando as bactérias colonizando o interior do mesófilo foliar, **barra =10 mm**..... 95

CAPÍTULO 3

página

Figura 1: Valores médios mensais da umidade relativa do ar, precipitação e temperatura do ar (máxima, média e mínima), durante o período experimental (abril/1995 – agosto/1996)	112
Figura 2: Peso de matéria fresca das raízes aos 20 (A) e 40 (B) dias após a implantação (d.a.i) do experimento	150
Figura 3: Comprimento das raízes aos 20 (A) e 40 (B) d.a.i.	150
Figura 4: Peso de matéria fresca da parte aérea aos 20 (A) e 40 (B) dias após a implantação (d.a.i) do experimento	151
Figura 5: Comprimento da parte aérea aos 20 (A) e 40 (B) d.a.i.	151
Figura 6: Efeito da inoculação com <i>H. seropedicae</i> e adubação nitrogenada sobre o desenvolvimento das raízes de plântulas de cana-de-açúcar (var. Na 56-79)	152

RESUMO GERAL

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) em plantas de cana-de-açúcar tem sido considerada um dos principais suportes para o PROÁLCOOL, influenciando de maneira positiva para o aumento do balanço energético na produção de álcool combustível. Sendo a FBN resultado de complexas reações fisiológicas e bioquímicas, esta é dependente da expressão do potencial genético do microrganismo diazotrófico e do hospedeiro, podendo ser limitada por diversos fatores, tanto bióticos, quanto abióticos. Neste estudo buscou-se avaliar o efeito de diferentes fatores sobre a presença e/ou o número de bactérias diazotróficas presentes na cultura da cana-de-açúcar. A influência do genótipo da planta foi estudada fazendo-se um levantamento das bactérias diazotróficas presentes, e também com a quantificação da população de *Herbaspirillum* spp. e *A. diazotrophicus*, em quatro genótipos de cana-de-açúcar contrastantes quanto a capacidade de obter nitrogênio via FBN. Os genótipos avaliados neste trabalho foram Krakatau, CB 45-3, SP 70-1143, ditos eficientes em relação a FBN e Chunee citada como sendo um genótipo pouco eficiente. De acordo com o levantamento realizado as bactérias estudadas (*Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *Herbaspirillum* spp. e *Acetobacter diazotrophicus*) estavam presentes em todos os genótipos avaliados. Já a quantificação das bactérias *Herbaspirillum* spp. e *A. diazotrophicus* mostrou que não há diferenças significativas entre os genótipos quanto ao número destas bactérias. Também foi

observado que enquanto *Herbaspirillum* spp. mantem-se mais estável ao longo do ciclo da cultura, a população de *A. diazotrophicus* parece sofrer um decréscimo com a aproximação do final do ciclo comercial. Estes resultados podem sugerir que as diferenças entre as taxas de FBN encontradas nos diversos genótipos não são causadas por diferenças na presença ou número das espécies de bactérias aqui estudadas. Em outro estudo buscou-se evidências da presença destas bactérias em várias amostras de plantas micropropagadas, desde a fase inicial do processo de micropropagação até a utilização destas plantas no campo. Os estudo de ocorrência destas bactérias nestes materiais mostrou que o cultivo de meristemas realmente elimina as bactérias diazotróficas endofíticas, já que estas não foram encontradas no material recém micropropagado. No entanto, foi possível encontrar *Azospirillum* spp. em plantas ainda na fase de aclimação, e as bactérias *Herbaspirillum* spp. e *Acetobacter diazotrophicus* foram isoladas de plantas que já vinham sendo utilizadas no campo. Também foram testadas duas novas alternativas de isolamento para *Herbaspirillum* spp. e *A. diazotrophicus*, e tanto a pré-germinação de toletes colhidos no campo, quanto a técnica de imunocaptura mostraram-se alternativas viáveis para o isolamento destas bactérias. Os estudos de microscopia com plântulas micropropagadas inoculadas com a estirpe PAL 5 de *A. diazotrophicus*, mostraram aos 7 dias após a inoculação, que as bactérias estavam localizadas preferencialmente em feridas naturais ou naquelas provocadas pela emergência de raízes laterais, como também na ponta das raízes (região meristemática), provavelmente utilizando estas regiões para atingir o interior da planta. Já no interior das raízes pode-se observar as bactérias colonizando o espaço intercelular da região do córtex, como também a presença de células nos vasos do xilema, provavelmente fazendo desta região uma via de acesso a parte aérea das plantas. Por fim, foram implantados dois experimentos para averiguar os possíveis efeitos da adubação com altos níveis de N, em plantas de cana-de-açúcar, sobre as bactérias diazotróficas *Herbaspirillum* spp. e *Acetobacter*

diazotrophicus. Em um experimento de campo observou-se o comportamento da população natural destas bactérias, utilizando-se plantas de cana-de-açúcar adubadas com doses equivalentes a 300 kg de N/ha. No genótipo SP 79-2312, de maneira geral, em comparação com plantas onde não foi feita a aplicação de N, as plantas adubadas mostraram maior concentração deste elemento nos tecidos das raízes e colmos. Estas mesmas plantas também apresentaram um número menor da bactéria *A. diazotrophicus*, enquanto a população de *Herbaspirillum* spp. não foi afetada. A população de *A. diazotrophicus* também mostrou ser influenciada pela época de coleta, apresentando-se reduzida nas coletas coincidentes com os períodos secos do ano, e maior nos períodos de maior intensidade pluviométrica. Em um segundo experimento, montado em casa de vegetação, utilizou-se plântulas micropropagadas do genótipo Na 56-79, inoculadas com estirpes de *A. diazotrophicus* e *H. seropedicae*. Não foi demonstrado efeito da adubação nitrogenada sobre a população de ambas bactérias. A adubação nitrogenada foi prejudicial ao crescimento radicular, e a inoculação com estas bactérias, principalmente *H. seropedicae*, diminuiu o efeito deletério causado pela adição de N. Este efeito da inoculação apresentado nas raízes, provavelmente também foi o responsável por um maior desenvolvimento inicial da parte aérea nas plantas inoculadas e adubadas.

GENERAL ABSTRACT

The biological nitrogen fixation (BNF) in sugar-cane plants has been considered one of the main supports for the PROÁLCOOL programme, influencing in a positive way the increase of the energy balance for the production of alcohol combustible. BNF is result of complex physiological and biochemical reactions, and is dependent of the genetic potential expression of the diazotroph microorganism and the plant. It could be limited by several factors, biotic and abiotic. In this study was evaluated the effect of different factors on the presence and/or the number of the diazotrophic bacteria present in the sugar-cane plants. The influence of the plant genotype was studied performing a survey of the diazotrophic bacteria present in four sugar-cane genotypes differing in their capacity to obtain nitrogen through BNF, and also quantified the population of *Herbaspirillum* spp. and *A. diazotrophicus* within them. The genotypes evaluated were Krakatau, CB 45-3, SP 70-1143, all of which have been shown to be efficient in relation to BNF, and Chuneé, a non-efficient genotype. The bacteria tested in the survey were *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus*. All these bacteria were present in the four examined genotypes. The quantification of *Herbaspirillum* spp. and *A. diazotrophicus* showed that there were no significant differences among the sugar cane genotypes with respect to the number of these bacteria. While numbers of *Herbaspirillum* spp. remained stable

during the life-cycle of the culture, the population of *A. diazotrophicus* seemed to suffer a decrease with the approach of the end of the commercial cycle. Taken together, these results suggest that the differences in the rates of BNF found in sugar cane genotypes are not caused by differences in the presence or the number of the bacterial species studied here. In another study, evidence of the presence of some of these bacteria were looked for in several samples of micropropagated plants, from the initial phase of the micropropagation process until being planted in the field. The study demonstrated that the tissue culture technique does indeed eliminate the endophytic diazotrophic bacteria, as none were found in the newly micropropagated material. However, it was possible to find *Azospirillum* spp. in plants in the acclimatization phase, while isolates of *Herbaspirillum* spp. and *A. diazotrophicus* were obtained from plants that had already become used to the field. Also in this chapter, two new isolation alternatives for *Herbaspirillum* spp. and *A. diazotrophicus* were tested, and it was shown that pre-germination of stems picked in the field, together with the immunotrapping technique, were viable alternatives for the isolation of these bacteria. Microscopic studies were also made with micropropagated sugar-cane plantlets inoculated with the PAL 5 strain of *A. diazotrophicus*. These showed that 7 days after inoculation, the bacteria were located mainly within natural wounds, or within those “wounds” produced during the emergence of lateral roots, as well as in the root tip (meristematic area). These regions were probably used by the bacteria to enter the plants. Once inside the roots the bacteria were observed colonizing the intercellular spaces of the cortex, as well as the xylem vessels, probably using the latter as an access road to the aerial parts of the plants. Finally, two experiments were planted to study the possible effects of fertilization with high levels of N on the occurrence and numbers of the diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar-cane plants. In a field experiment the behaviour of the natural population of these bacteria was studied using plants fertilized with levels of up to 300 kg of N/ha.

In the variety SP 79-2312, generally, in comparison to plants where no application of N was made, the fertilized plants showed larger concentrations of this element in the roots and stems. These same plants also had a smaller number of *A. diazotrophicus*, while the population of *Herbaspirillum* spp. was not affected by N application. The numbers of *A. diazotrophicus* were also shown to be influenced by the harvest time, becoming reduced in the harvests which coincided with dry periods of the year, and larger in the periods of larger pluviometric intensity. The second experiment was of a shorter duration (40 days) and was set up in a greenhouse. In this case micropropagated plantlets were inoculated with strains of *A. diazotrophicus* and *H. seropedicae* and no effects of nitrogen fertilization on the population of either bacteria were shown. However, it was demonstrated that nitrogen fertilization was harmful to root growth, and that inoculation with these bacteria, particularly *H. seropedicae*, decreased the deleterious effect caused by the addition of nitrogen. The inoculation effect shown by the roots was probably also responsible for a larger initial development of the aerial parts of the inoculated and fertilized plants.

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é hoje o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, sendo esta cultura plantada em 22 dos 26 estados brasileiros ocupando uma área de 4.825.992 hectares com produção de 324.434.154 ton. (IBGE, 1997) e apresentando desta forma uma produtividade média de 67,22 ton/ha.

A importância da cultura da cana-de-açúcar cresceu muito com a implantação do Proálcool em meados da década de 70. Hoje o Brasil possui o maior programa de combustível biológico do mundo, fazendo com que a cultura da cana-de-açúcar assuma grande importância nos planos social, estratégico, econômico e ecológico. Em 20 anos, o Proálcool resultou na substituição de 200 mil barris/dia de petróleo e na geração de 1,4 milhões de empregos diretos e quatro milhões de empregos indiretos. Isto representou uma economia até hoje de mais de US\$ 33 bilhões para o país, valor este que é acrescido de outros R\$ 1,5 bilhões a cada ano (CANA-DE-AÇÚCAR..., 1997).

Sendo a cana-de-açúcar uma cultura com via fotossintética C4, ela apresenta como principal característica, uma alta eficiência na fixação do CO₂ do ar, o que permite que a produção do álcool retire mais CO₂ da atmosfera do que é retornado pela sua combustão, enquanto que combustíveis fósseis retornam à atmosfera o carbono imobilizado durante milhões de anos. Esta característica faz com que o uso do álcool como combustível não contribua para o aumento do efeito estufa (BODDEY, 1995). Estudos realizados pela CETESP, a agência de controle

ambiental do estado de São Paulo, citam que veículos movidos a álcool produzem 57% menos monóxido de carbono, 64% menos hidrocarbonetos, e 13% menos óxidos de nitrogênio do que veículos movidos a gasolina (BOHM, 1986). Além disso a adição de álcool anidro à gasolina utilizada nos veículos brasileiros (20%), elimina a necessidade do uso de tetraetil de chumbo para aumentar a taxa de octanagem do combustível, enquanto que em outros países estão gradualmente eliminando esta fonte de poluição por chumbo com adição de metil tert-butil éter (MTBE). Entretanto este produto é sintetizado a partir do metanol e do isobutileno, que são derivados principalmente do gás natural e petróleo, respectivamente (BODDEY, 1995).

O balanço energético para a produção de álcool em países como Cuba e EUA, atinge valores que geralmente são iguais ou inferiores a um (BODDEY, 1995), isto é, a energia gerada é igual ou menor aquela utilizada para sua produção. Isto acontece porque estes países utilizam grande quantidade de adubo nitrogenado (em torno de 300 kg/ha), colheita e plantio mecanizados e outros agroquímicos. Estas práticas demandam grande quantidade de combustível fóssil. Nas condições brasileiras, a cultura da cana-de-açúcar apresenta um balanço energético bastante positivo para a produção de álcool etílico, ou seja, a energia produzida é bem maior que a energia consumida. Estudos recentes realizados pela Copersucar, mostraram que este balanço energético é de aproximadamente 9.0, havendo possibilidades de ser incrementado apenas pela redução da utilização de insumos, principalmente de N-fertilizante e também com a diminuição das perdas industriais, alcançando assim níveis próximos a 12 (MACEDO & KOLLER, 1997).

Uma característica muito especial da cultura da cana-de-açúcar é mostrada em experimentos realizados no Brasil onde um cultivo que produz por volta de 120 ton. de colmos/ha no primeiro ciclo, acumula 180-200 kg de N/ha e 100-150 kg N/ha na soca. A palha é normalmente queimada antes do corte, quase nada de N fica nas cinzas e o N acumulado nos colmos é levado para as usinas. Já o N adicionado no plantio na forma de fertilizante raramente é superior a 40 kg/ha e na

soca, não mais de 80 kg de N/ha. Se nada deste nitrogênio aplicado se perdesse por lixiviação ou volatilização, o que jamais acontece, ainda assim a cultura retiraria do campo muito mais nitrogênio do que é adicionado. Na verdade, os solos plantados com cana-de-açúcar normalmente mantêm sua fertilidade em N por décadas. Era de se esperar um rápido esgotamento destes solos, porém isso não ocorre, indicando que a cultura possui um sistema natural de restituição do N exportado do solo. No nível de conhecimento atual, este mecanismo seria a fixação biológica de nitrogênio (FBN) associada a cultura e um forte reforço para esta hipótese é a falta de resposta a adubação nitrogenada em solos pobres em N. AZEREDO et al. (1986) coletaram resultados de 135 experimentos de campo conduzidos nas mais importantes regiões canavieiras do Brasil e mostraram no caso de cana-planta, apenas 19% dos experimentos apresentaram resposta significativa a aplicação de N fertilizante. No caso de cana-soca, as respostas a fertilização nitrogenada são mais frequentes, porém, raramente as quantidades de N aplicado são maiores que a metade do N acumulado pela cultura.

O primeiro estudo para a investigação da possível contribuição da FBN na cultura da cana-de-açúcar foi conduzido por RUSCHEL et al., (1975), utilizando plantas com 90 dias de idade crescidas em potes e expostas a atmosfera de N_2 enriquecida com ^{15}N . Os resultados deste experimento apresentaram evidências da contribuição da FBN, no entanto sem significância agronômica.

Em um experimento combinando solo marcado com ^{15}N (diluição isotópica de ^{15}N) e balanço de N, feito em potes com 64 kg de solo, LIMA et al. (1987) mostraram que a variedade de cana CB 47-89 foi capaz de obter uma contribuição da FBN estimada em 60% do N incorporado pela planta. URQUIAGA et al. (1992), trabalhando com 10 genótipos diferentes de cana em um tanque de concreto, utilizando as técnicas de diluição isotópica de ^{15}N e balanço de N, mostraram que alguns genótipos eram capazes de obter de 60 a 70% do seu N total através do processo de FBN.

Os resultados destes experimentos mostraram que mesmo em solos pobres a FBN pode ser suficiente para alcançar produções superiores ao dobro da média atual de produção de cana-de-açúcar no Brasil (67 ton/ha), se os outros nutrientes são supridos de acordo com a análise do solo e se a tecnologia é adequada usando entre outras, a aplicação de molibdênio e irrigação. A prática de irrigação tem mostrado efeitos consistentes, dobrando a produção em muitos casos, já que a deficiência hídrica parece aumentar a resposta a adubação nitrogenada, o que talvez possa ser explicado pela redução da fotossíntese e com isso falta de carboidratos para as bactérias fixadoras de nitrogênio. Já a disponibilidade de molibdênio (micronutriente essencial para a síntese das enzimas nitrato-redutase e nitrogenase) no solo parece exercer também grande influência na nutrição nitrogenada desta cultura (URQUIAGA et al., 1996).

Alguns pesquisadores iniciaram, à quase 40 anos atrás, as pesquisas sobre a FBN nesta cultura, procurando investigar as bactérias responsáveis pela fixação biológica de N_2 . DÖBEREINER, (1961) encontrou uma bactéria diazotrófica do gênero *Beijerinckia* em altos números nos campos de cana-de-açúcar, com enriquecimento populacional seletivo na rizosfera, especialmente na superfície das raízes. Ao mesmo tempo, uma nova espécie de *Beijerinckia* foi descoberta (*B. fluminense*) associada a cultura (DÖBEREINER & RUSCHEL, 1958). Subseqüentemente, outros autores (PURCHASE, 1980; GRACIOLLI et al., 1983) isolaram um leque de bactérias diazotróficas de raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar incluindo espécies de *Erwinia*, *Azotobacter*, *Derxia*, *Azospirillum* e *Enterobacter*.

A introdução do meio semi-sólido foi a chave para o isolamento e descoberta de novas bactérias diazotróficas (DÖBEREINER, 1992), não só em cana-de-açúcar, como em várias outras gramíneas. Na cultura da cana-de-açúcar podemos destacar as bactérias do gênero *Azospirillum*, *Herbaspirillum seropedicae*, que foi isolado inicialmente de arroz, milho e sorgo (BALDANI et

al.,1986), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BALDANI et al., 1996) e *Acetobacter diazotrophicus* (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988), sendo que estas três últimas espécies, apresentam características muito importantes que nos levam a crer serem as principais responsáveis pelas altas taxas de FBN apresentadas pela cultura da cana-de-açúcar.

As bactérias do gênero *Azospirillum* tem sido relatadas em associação com um grande número de espécies de cereais e gramíneas forrageiras cultivadas tanto em clima tropical como em clima temperado (BALDANI et al., 1997). No entanto, nem todas as espécies tem sido encontradas colonizando plantas em diferentes localidades. *A. amazonense* por exemplo só foi isolado até hoje no Brasil. Até o presente momento 3 espécies das 5 pertencentes ao gênero *Azospirillum* foram isoladas em associação com plantas de cana-de-açúcar (BALDANI et al., 1997), *A. lipoferum* (TARRAND et al., 1978), *A. brasilense* (TARRAND et al., 1978) e *A. amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983; FALK et al., 1985). Estas três espécies são também as que apresentam um maior espectro de hospedeiros (BALDANI et al., 1997), ao contrário de *A. irakense* (KHAMMAS et al., 1989) isolado apenas de plantas de arroz, e *A. halopraeferans* (REINHOLD et al., 1987) que apresenta uma associação rizosférica bastante específica com “kallar grass”.

Além da habilidade de fixar nitrogênio, estas espécies são capazes de produzir fitohormônios como o ácido-indol-acético (AIA) e a presença de genes responsáveis pela biossíntese destes hormônios foi demonstrada por VANDE BROEK & VANDERLEYDEN (1995). Apesar destes organismos serem geralmente classificados como bactérias de rizosfera, colonizando principalmente a zona de alongação e os pêlos radiculares (DÖBEREINER et al. 1995), algumas estirpes de *Azospirillum* também podem ser encontradas no interior do vegetal (DÖBEREINER et al., 1995; BODDEY & DÖBEREINER, 1995). A existência de estirpes da mesma bactéria que são diferentes quanto ao seu habitat preferencial, foi confirmada pelos estudos de SCHLOTER et al. (1994) e ASSMUS et al. (1995), que mostraram que

a estirpe Sp 245 de *A. brasilense* colonizou o interior dos pêlos radiculares, como também os vasos do xilema de raízes de trigo, enquanto a estirpe Sp 7 apenas colonizou a superfície das raízes.

Herbaspirillum seropedicae tem muitas características similares ao gênero *Azospirillum*, inclusive a habilidade de crescer em meio NFb semi-sólido (BALDANI et al., 1986). No entanto, a fixação de nitrogênio por esta bactéria é mais tolerante ao O₂ e pH do que aquelas do gênero *Azospirillum* (DÖBEREINER, 1992). A atividade da nitrogenase nestes organismos, assim como em *A. amazonense*, é apenas parcialmente inibida por 10 mM de NH₄⁺ durante algumas horas, enquanto que em *A. brasilense* e *A. lipoferum* ocorre uma inibição completa em apenas alguns minutos (FU et al., 1988).

Recentemente foi descoberto que uma bactéria patogênica que causa estria mosqueada em algumas variedades de cana-de-açúcar e conhecida inicialmente como *Pseudomonas rubrisubalbicans* (HALE AND WILKIE, 1972a), não era *Pseudomonas* (GOOR et al., 1986) e por ter alto grau de homologia DNA:rRNA com *Herbaspirillum* (GILLIS et al., 1991), foi então incluída neste gênero (BALDANI et al. 1996). Esta bactéria mostrou-se capaz de fixar N₂ em meio NFb semi-sólido e apresentou muitas características semelhantes a *H. seropedicae* (PIMENTEL et al., 1991).

As únicas características fisiológicas que distinguem essas duas espécies são a capacidade de crescer em meso-erithritol e N-acetilglucosamina como fonte de carbono (OLIVARES et al., 1993), e sua ótima temperatura de crescimento (BALDANI et al., 1992). Quanto ao aspecto ecológico, *Herbaspirillum seropedicae* tem sido isolado de vários cereais e gramíneas forrageiras (BALDANI et al., 1986; DÖBEREINER et al., 1993), havendo relatos mais recentes de sua ocorrência em fruteiras (WEBER et al., 1997) e palmeiras (FERREIRA et al., 1997). *H. rubrisubalbicans* parece associar-se com um número mais restrito de espécies, havendo até o momento relatos desta bactéria em cana-de-açúcar (OLIVARES et

al., 1996) e sorgo (HALE & WILKIE, 1972b) além de gramíneas do gênero *Miscanthus* (ECKERT et al. 1997). Uma das características mais importantes do gênero *Herbaspirillum* spp. é a baixa sobrevivência no solo, apresentando altos números no interior de raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar (BALDANI et al., 1992; OLIVARES et al., 1996).

A bactéria *Acetobacter diazotrophicus* foi inicialmente encontrada, em números elevados, colonizando raízes, colmos, folhas e palhiço da cana-de-açúcar (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988; REIS et al., 1994). Posteriormente também foi isolada de *Pennisetum purpureum* cv cameroon e batata doce (DÖBEREINER et al., 1988; PAULA et al. 1989). Em contraste com os relatos de que *A. diazotrophicus* está presente somente em plantas de propagação vegetativa e ricas em sacarose, trabalhos mais recentes constataram sua presença também em amostras de caule, raízes e rizosfera de plantas de café (JIMENEZ-SALGADO et al., 1997). Inicialmente o seu isolamento foi possível através do uso de caldo de cana como base do meio de cultivo, que era inoculado com diluições de raízes e colmos, mostrando redução de acetileno (ARA) em diluições de 10^{-6} a 10^{-7} . Posteriormente foi descrito um meio de isolamento mais específico, o meio LGI-P desenvolvido por REIS et al. (1994). *A. diazotrophicus* tolera condições de estresse como baixo pH e altas concentrações de sacarose, não possui a enzima redutase do nitrato e a amônia, como em *Herbaspirillum*, causa apenas inibição parcial da atividade da nitrogenase, especialmente quando a bactéria está crescendo sob altas concentrações de sacarose (BODDEY et al., 1991; FU et al., 1988; TEIXEIRA et al., 1987). Esta bactéria, quando crescendo na presença de 10% de sacarose apresenta 0.2 kPa O_2 como concentração ideal de oxigênio para o processo de redução de acetileno, no entanto, a atividade da nitrogenase continua até 4.0 kPa, mostrando uma tolerância ao O_2 , elemento que é deletério a enzima nitrogenase, bem maior que *Azospirillum* spp. (REIS et al., 1990). ALVAREZ e MARTINEZ-DRETS (1995) mostraram que a habilidade desta bactéria

em crescer na presença de sacarose deve-se a atividade extracelular de uma enzima sacarolítica, que faz com que sejam liberados glucose e frutose para o crescimento da bactéria. Foi constatado também que, assim como as bactérias do gênero *Azospirillum*, *A. diazotrophicus* é capaz de produzir hormônios de crescimento como o AIA (FUENTES-RAMIREZ et al., 1993). *A. diazotrophicus*, assim como *Herbaspirillum* spp., também não é encontrado no solo, mesmo entre as linhas de plantio da cana-de-açúcar. Um experimento recente mostrou que a bactéria não pôde ser reisolada do solo apenas 48h após a sua inoculação, sendo bem mais sensível que *Herbaspirillum* (CARUSO & BALDANI, 1995).

Uma outra razão para se acreditar que as bactérias que vivem no interior da planta sejam as principais responsáveis pela FBN em cana-de-açúcar tem sido a possibilidade deste N fixado ser rapidamente assimilado pela planta hospedeira. Uma evidência que pode colaborar com esta hipótese foi descrita por COJHO et al., 1993, que desenvolveram um experimento de cultivo misto de *A. diazotrophicus* e uma levedura amilolítica, *Lipomyces kononenkoae*. Usados como um sistema modelo para interação planta/bactéria, estes experimentos, mostraram que quase 50% do N total fixado pela bactéria era transferido para a levedura, e que esta transferência se dava desde o início da cultura, o que sugere que esta rápida transferência possa ocorrer também para a planta hospedeira. Mais recentemente, CRUZ et al. (1995) determinaram que o produto excretado por *A. diazotrophicus* em condições de fixação de nitrogênio é o amônio.

Recentemente foi esclarecido por HARTMANN et al. (1995) que a bactéria conhecida como "isolado E", uma bactéria diazotrófica isolada do interior de plantas de cana-de-açúcar, batata-doce e arroz (BODDEY et al., 1995) é uma bactéria do gênero *Burkholderia*. Esta bactéria, ainda pouco conhecida, pode também ser uma das que contribuem significativamente para a FBN na cultura da cana-de-açúcar. Os primeiros estudos indicam que esta bactéria se localiza preferencialmente no interior do vegetal assim como *Herbaspirillum* sp. e *A. diazotrophicus*, e

mostraram em experimentos de inoculação em plantas de arroz que pode fixar quantidades substanciais de N₂ (BALDANI, 1996).

O termo endófito era utilizado a alguns anos atrás referindo-se a colonização interna das raízes por microrganismos (bactérias e fungos) que normalmente não causam danos a planta hospedeira e vivem a maior parte de suas vidas no interior dos tecidos dos vegetais sem promover sintomas de patogenicidade (PEREIRA, 1995). KLOPPER & BEAUCHAMP (1992) classificaram como endófitos os microrganismos que colonizavam o interior das raízes e promoviam benefícios as plantas. DÖBEREINER (1992) estendeu o termo endófito para as bactérias diazotróficas, tendo em vista da habilidade de algumas bactérias do gênero *Azospirillum*, *Herbaspirillum* spp. e *Acetobacter diazotrophicus* de colonizar o interior dos vegetais, e apresentarem uma baixa capacidade de sobrevivência no solo. A divisão do termo endófito em facultativo e obrigatório, foi proposto por BALDANI et al. (1997) para distinguir as bactérias capazes de colonizar tanto a superfície como o interior dos tecidos de plantas e que sobrevivem bem no solo, daquelas que não sobrevivem no solo, mas colonizam o interior das raízes e parte aérea das plantas. O grupo de bactérias endófitas facultativas é composto principalmente por espécies do gênero *Azospirillum* e o grupo de bactérias endófitas obrigatórias pelas conhecidas que colonizam o interior de plantas de cana-de-açúcar é composto por *A. diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* sp.

A ocorrência de bactérias no interior das plantas de cana-de-açúcar assume um caráter ecológico muito importante, já que estas bactéria recebem os nutrientes diretamente no interior do vegetal, sem sofrer estresses ou competição com outros organismos do solo, além de provavelmente poderem colonizar sítios onde o acesso de O₂ é restrito, não tendo assim problemas de inibição da atividade da nitrogenase. É sabido que plantas como a cana-de-açúcar que apresentam via fotossintética C₄, utilizam menos de 50% de sua capacidade fotossintética

(MACHADO,1987), podendo assim oferecer as bactérias diazotróficas os outros 30% necessários para manter a FBN (DÖBEREINER, 1992)

Os mecanismos envolvidos na colonização das plantas por estes microrganismos não são totalmente elucidados. Sabe-se que para a cana-de-açúcar estas bactérias benéficas são transferidas nos toletes que servem como propágulo, havendo também a possibilidade de que micorrizas VA tenham um papel importante na infecção das plantas, como foi mostrado para *A. diazotrophicus* por PAULA et al., (1991).

Desta forma fica claro que é de grande importância o estudo e a elucidação dos fenômenos que regem a associação da cana-de-açúcar com as bactérias diazotróficas. Este trabalho buscou estudar os aspectos ligados a ecologia desta associação envolvendo plantas de cana-de-açúcar e bactérias diazotróficas (*A. diazotrophicus* e *Herbaspirillum* sp., principalmente) , como a influência do genótipo e da ontogenia das plantas, da fertilização nitrogenada e da prática da cultura de tecidos, sobre a população destas bactérias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, B. & MARTINEZ-DRETS, G. Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, p. 918-924, 1995.
- ASSMUS, B.; HUTZLER, P.; KIRCHOF, G.; AMANN, R.; LAWRENCE, J.R. & HARTMANN, A. In situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, 61, p. 1019-1031, 1995.
- AZEREDO, D.F.; BOLSANELLO, J.; WEBBER, M. E VIEIRA, J.R. Nitrogênio em cana planta, doses e fracionamento. **STAB**, São Paulo, v. 4, p. 26-32, 1986.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SAMPAIO, M.J.A.M. AND DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 36, p. 86-93, 1986.

- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R. & DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 911-922, 1997.
- BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M. AND DÖBEREINER, J. Emended Description of *Herbaspirillum* ; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans* , a Mild Plant Pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and Classification of a Group of Clinical Isolates (EF Group1) as *Herbaspirillum* Species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 46, nº 3, p. 802-810, 1996
- BALDANI, V.L.D. & DOBEREINER, J. Host plant specificity in the infection of cereaes with *Azospirillum* spp. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 12, p. 433-439, 1980.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L. AND DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, p. 65-73, 1992.
- BALDANI, V.L.D. Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. **Universidade Federal Rural do Riode Janeiro**, Tese de Doutorado, 1996.
- BODDEY, R.M.; DE OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D. & DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 90, p. 195-209, 1995.
- BODDEY, R.M. & DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent progress and perspectives for the future. **Fertility Research**, v. 42, p. 241-250. 1995.

- BODDEY, R.M. Biological nitrogen fixation in sugar cane: A key to energetically viable biofuel production. **Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v. 14, p. 263-279, 1995.
- BODDEY, R.M., URQUIAGA, S., REIS, V. M. & DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 137, p. 111-117, 1991
- BOHM, G.M. Impactos da poluição dos veículos automotores na saúde humana e meio ambiente. **FIESP/CIESP**, São Paulo, 1986.
- CANA-DE-AÇÚCAR; Proálcool procura seu caminho para sobreviver. **A Granja**, Porto Alegre, v. 53, nº 581, p.12-17, maio 1997.
- CARUSO, L.V. AND BALDANI, J.I. Monitoring the Survival of Endophytic Diazotrophic Bacteria in soil using Lac-Z Fusion. In: **International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: The Role of Biological Nitrogen Fixation**, Programme and Abstracts, p. 108-109, Angra dos Reis - Rio de Janeiro - Brasil. November 26th - December 1st 1995.
- CAVALCANTE, V. AND DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugar-cane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 108, p. 23-31, 1988
- COJHO, E.H.; REIS, V.M.; SCHENBERG, A.C.G. AND DÖBEREINER, J. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amylolytic yeast in nitrogen-free batch culture. **FEM Microbiol. Lett.** v.106, p. 341-346, 1993.
- CRUZ, L.M.; TEIXEIRA, K.R.S. E BALDANI, J.I. Expressão fenotípica de estirpes de *Acetobacter diazotrophicus* contendo o gene nif A de *Azotobacter vinelandii*. In: **20ª Reunião Anual de Genética de Microrganismos**, Sociedade Brasileira de Genética, Piracicaba - São Paulo. Anais, v. 20, p. 116, 1995.
- DÖBEREINER, J. & RUSCHEL, A.P. Uma nova espécie de *Beijerinckia* Derx. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 21, p. 261-277, 1958.

- DÖBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, p. 1-13, 1992.
- DÖBEREINER, J. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 15, p. 211-216, 1961.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D. & REIS, V.M. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: **Azospirillum VI and related microorganisms**, Fendrik, I.; del Gallo, M.; Vanderleyden, J. & de Zamaroczy, M. Eds. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p 3-14, 1995.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L. AND REIS, V.M. Endophytic diazotrophs: The key to BNF in gramineaceous plants. **6th International Symposium with non-legumes**, Ismaila - Egypt, 6 -10 September, 1993.
- DÖBEREINER, J.; REIS, V. AND LAZARINE, A.C. A new fixing bacteria in association with cereals and sugar cane. In: **Nitrogen Fixation: Hundred years after**. Eds. H. Bothe, F.J. de Bruijin and W.E. Newton. Gustav Fischer, Stuttgart, p. 717-722, 1988.
- ECKERT, B.; KIRCHHOF, G. & HARTMANN. A. Analysis of endophytic diazotrophic bacteria in the C4-plant *Miscanthus* . In: **11th International Congress on Nitrogen Fixation**, Book of Abstracts, p. 137, Paris, 20-25 July 1997.
- FALK, E.C.; DÖBEREINER, J.; JOHNSON, J.L. AND KRIEG, N.R. Deoxyribonucleic acid homology of *Azospirillum amazonense* Magalhães *et al.* 1984 and emendation of the description of the genus *Azospirillum*. **International Journal Systematic Bacteriology**, Washington, v. 35, p. 117-118, 1985.
- FERREIRA, A.C.; COZZOLINO, K. & DÖBEREINER, J. Identificação de bactérias diazotróficas colonizando raízes e colmos de dendezeiro. In: **Academia Brasileira de Ciências**, v. 69, p. 115-116, 1997.

- FU, H.A.; FITZMAURICE, W.P.; LECHURAN, L.I., ROBERTS, G.P. AND BURRIS R.H. Regulation of nitrogenase activity in azospirilla, herbaspirilla and acetobacter and cloning of drag and drat homologous genes of *A. lipoferum* sp Br17. In **Nitrogen Fixation: Hundred years after**. Eds. H. Bothe, F.J. de Bruijin and W.E. Newton. Gustav Fischre. Stuttgart, p.336, 1988
- FUENTES-RAMIREZ, L.E.; JIMENEZ-SALGADO, I.R.; ABARCA-OCAMPO & CABALLERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indolacetic acid producing bacterium isolated from sugar cane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 154, p. 145-150, 1993
- GILLIS, M.; DÖBEREINER, J.; POT, B.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; REINHOLD, B. AND KERSTERS, K. Taxonomic relantionships between *{Pseudomonas} rubrisubalbicans*, some clinical isolates (EF group 1), *Herbaspirillum seropedicae* and *{Aquaspirillum} autotrophicum*. In: **Nitrogen Fixation**. p. 292-294. Polsinelli, M.; Materassi, R. and Vincenzini M. Eds., Kluwer Academic Publ., Dordrecht, Netherlands, 1991
- GOOR, M.; FALSEN, E.; POT, B.; GILLIS, M.; KEUSTERS, K. & DE LEY, J. Taxonomic position of the phytopatogen *Pseudomonas rubrisubalbicans* and related clinical isolates. **XIV International Congress of Microbiology** , Manchester, England (Abstracts), 1986
- GRACIOLLI, L.A.; FREITAS, J.R. DE & RUSCHEL, A.P. 1983. Bactérias fixadoras de nitrogênio nas raízes, caules e folhas de cana-de-açúcar (*saccharum* sp.). **Revista Microbiológica**, São Paulo, v. 14, p. 191-196, 1983.
- HALE, C.N. AND WILKIE, J.P. A comparative study of *Pseudomonas* species pathogenic to sorghum. **New Zeland Journal of Agriculture Research**, v. 15, p. 448-456, 1972a.
- HALE, C.N. AND WILKIE, J.P. Bacterial leaf stripe of sorghum in New Zeland. **New Zeland Journal of Agriculture Research**, v. 15, p. 457-460, 1972b.

- HARTMANN, A; BALDANI, J.I.; KIRCHHOF, G.; ASSMUS, B.; HUTZLER, P.; SPRINGER, N.; LUDWIG, W.; BALDANI, V.L.D. & DÖBEREINER, J. Taxonomic and ecologic studies of diazotrophic rhizosphere bacteria using phylogenetic probes. In: **Azospirillum VI and related microorganisms**, Fendrik, I.; del Gallo, M.; Vanderleyden, J. & de Zamaroczy, M. Eds. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p. 415 -427, 1995.
- IBGE - Levantamento Sistemático da produção Agrícola. Sistema IBGE de Recuperação Automática - **SIDRA 1997**.
- JIMENEZ-SALGADO, T.; FUENTES-RAMIREZ, L.E.; TAPIA-HERNANDEZ, A.; MASCARUA-ESPARZA, M.A.; MARTINEZ-ROMERO, E. & CABALLERO-MELLADO, J. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of other nitrogen-fixing-acetobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3676-3683, 1997.
- KHAMMAS, K.M.; AGERON, E.; GRIMONT, P.A.D. & KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen fixing bacteria associated with rice roots and rizosphere soil. **Research in Microbiology**, v. 140, p. 679-693. 1989.
- KLOPPER, J.W. & BEAUCHAMP, C.J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, p. 1219-1232, 1992.
- LIMA, E.; BODDEY, R.M. AND DÖBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a ^{15}N aided nitrogen balance. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 165-170, 1987.
- MACEDO, I.C. & KOLLER, H.W. Balanço de energia na produção de cana-de-açúcar e álcool nas usinas cooperadas em 1996. **International Report**, Centro Tecnológico da Copersucar, Piracicaba, 23p., 1997.
- MACHADO, E.C. Fisiologia de produção de cana-de-açúcar, cultivo e utilização. S.B. Paranhos, ed. **Cargill**, Campinas, p. 56-80, 1987.

- MAGALHÃES, F.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M., KUYENDALL, J.R. AND DÖBEREINER, J. A new acid tolerant *Azospirillum* specie. In **Academia Brasileira de Ciências**, v. 53, nº, p. 417 - 430, 1983.
- OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. AND DÖBEREINER, J. Occurrence of the diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of gramineae. **Biology and Fertility of soils**, Berlin, v. 21, p. 197-200, 1996.
- OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. E DÖBEREINER, J. Contribuição para diferenciação taxonômica entre *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* sin. *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, Aracaju, Sergipe, Programas e resumos. p. 313, 1993.
- PAULA, M.A. DE; DÖBEREINER, J E SIQUEIRA, J.O. Efeito da inoculação com fungo micorrízico VA e bactérias diazotróficas no crescimento e produção de batata doce. In: **22º Congresso Brasileiro de Ciência do solo**, Recife, SBCS, programa e resumos, p.109, 1989.
- PAULA, M.A. DE; REIS, V.M. AND DÖBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum* and *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomea batata*), sugar cane (*Saccharum* spp.) and sweet sorghum (*Sorghum bicolor*). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 11, p. 111-115, 1991.
- PEREIRA, J.O. Microrganismos endofíticos em espécies tropicais. In: **20ª Reunião Anual de Genética de Microrganismos**, Sociedade Brasileira de Genética , Piracicaba - São Paulo. Anais, v. 20, p. 3, 1995.
- PIMENTEL, J.P.; OLIVARES, F.; PITARD, R.M.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F. AND DÖBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 137, p. 61-65, 1991.

- PURCHASE, B.S. 1980. Nitrogen fixation associated with sugar cane. **Proc. S. Afr. Sugar Technol. Assoc.** June, pp. A3-A6.
- REINHOLD, B.; HYREK, T.; FENDRIK, I.; & POT, B. *Azospirillum Halopraeferans* sp. nov. , a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 37, p. 43-51, 1987.
- REIS, V.M.; ZONG, Y. & BURRIS, R.H. Regulation of nitrogenase activity by ammonium and oxygen in *Acetobacter diazotrophicus*. In: Anais Academia Brasileira de Ciências, v. 62, p. 377, 1990
- REIS, V.M.; OLIVARES, F.L. AND DÖBEREINER, J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 10, p. 401-404, 1994.
- RUSCHEL, A.P.; HENIS, Y. & SALATI, E. Nitrogen-15 tracing of N-fixation with soil-grown sugar cane seedlings. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v.7, p. 181-182, 1975.
- SCHLOTTER, M.; KIRCHOF, G.; HEINZMANN, U., DÖBEREINER, J. & HATMANN, A. Immunological studies of the wheat root colonization by the *Azospirillum brasilense* strains SP7 and SP245 using strain specific monoclonal antibodies. In: **Nitrogen fixation with non-legumes**, Hegazi, N.A.; Fayez, M.; Monib, M., Eds., American University of Cairo Press, Cairo, p. 291-297, 1994.
- TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R. & DÖBEREINER, J. A taxonomy study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 8, p. 967-980, 1978.
- TEIXEIRA, K.R.S.; STEPHAN, M.P. & DÖBEREINER, J. Physiological studies of *Saccharobacter nitrocaptans* a new acid tolerant N₂-fixing bacterium. In: **4th**

Internatiol symposium on Nitrogen Fixation with non-leguminous, Rio de Janeiro, Program and abstracts, p.149, 1987

URQUIAGA, S., K.H.S. CRUZ, R.M. BODDEY. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of American Journal**, Madison, v. 56, p. 105-114, 1992.

URQUIAGA, S.; RESENDE, A.; ALVES, B.; BODDEY, R.M. Importância do molibidênio na fixação biológica de nitrogênio e na nutrição nitrogenada da cultura de cana-de-açúcar. In: **XIII Congresso Latino Americano de Ciência do Solo - SOLO SUELO**, Águas de Lindóia - São Paulo - Brasil, 4 a 8 de agosto de 1996. 1 CD-ROM

VANDE BROEK, A. & VANDERLEYDEN, J. Rewiew: genetics of the *Azospirillum*-plant root association. **Critical Rewiew in Plant Science**, Boca Raton, v. 14, p. 445-466. 1995.

WEBER, O.B.; BAKDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Colonização de bactérias diazotróficas endofíticas em abacaxizeiro e bananeira no Estado do Rio de Janeiro. In: **Academia Brasileira de Ciências**, v. 69, p. 115, 1997.

CAPÍTULO I

LEVANTAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE CANA-DE-
AÇÚCAR (*Saccharum* spp.)

RESUMO

Trabalhos que visam a quantificação da fixação biológica de nitrogênio (FBN) na cultura da cana-de-açúcar têm mostrado que o genótipo da planta pode apresentar grande influência neste processo. No presente estudo buscou-se fazer um levantamento das bactérias diazotróficas presentes, bem como quantificar a população de *Herbaspirillum* spp. e *Acetobacter diazotrophicus*, em genótipos de cana-de-açúcar contrastantes quanto a capacidade de obter nitrogênio via FBN. De acordo com o levantamento realizado neste trabalho, as bactérias estudadas (*Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *Herbaspirillum* spp. e *A. diazotrophicus*) estavam presentes nos quatro genótipos avaliados e em todas as partes da planta, exceto *A. amazonense*, não isolado de amostras de folhas. A quantificação das bactérias *Herbaspirillum* spp. e *A. diazotrophicus* mostrou não haver diferenças significativas entre os genótipos e que, geralmente, estas bactérias estão presentes em maior número nas raízes. Enquanto *Herbaspirillum* spp. mantém-se mais estável ao longo do ciclo da cultura, a população de *A. diazotrophicus* decresce com a aproximação do final do ciclo comercial. Baseado nestes resultados pode-se sugerir que as diferenças entre as taxas de FBN encontradas nos diversos genótipos não é causada por diferenças na presença ou no número das bactérias aqui estudadas.

ABSTRACT

Previous studies of quantification of biological nitrogen fixation (BNF) in sugar-cane culture have shown that plant genotype can have a great influence on it. In this study, we performed a survey of the diazotrophic bacteria present in four sugar-cane genotypes differing in their capacity to obtain nitrogen through BNF, and also quantified the population of *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus*. The bacteria tested in the survey were *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *Herbaspirillum* spp. and *A. diazotrophicus*. All these bacteria were present in the four genotypes and were found in all parts of the plants, except *A. amazonense* which was not isolated from leaf samples. The quantification of *Herbaspirillum* spp. and *A. diazotrophicus* showed that there were no significant differences among the sugar cane genotypes and, generally, the bacteria were in greater numbers in roots. While numbers of *Herbaspirillum* spp. remained stable during the life-cycle of the culture, the population of *A. diazotrophicus* suffer a decrease with the approach of the end of the commercial cycle. These results suggest that the differences in the rates of BNF found in sugar cane genotypes are not caused by differences in the presence or the number of the bacterial species studied here.

INTRODUÇÃO

Quando se aborda o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) em plantas não leguminosas são comuns relatos onde o genótipo da planta exerce forte influência sobre as taxas de FBN observadas. App et al. (1986) em estudos de balanço de N para quantificação da FBN em arroz, utilizaram 83 variedades, encontrando grandes diferenças entre estas. Oliveira (1994), trabalhando com o método de diluição isotópica de ^{15}N em 40 variedades de arroz, também encontrou diferenças consideráveis entre as variedades no que se refere a contribuição da FBN. Miranda et al. (1990), quantificando a fixação de N_2 pelo método da diluição isotópica de ^{15}N , complementada por balanço de N, compararam vários ecótipos de *Panicum maximum* e também observaram que havia diferenças entre a porcentagem de N proveniente da FBN de acordo com o ecótipo da planta. Em condições de campo, Garcia de Salomone & Dobereiner (1996) apresentaram resultados onde diferentes genótipos de milho responderam diferentemente à inoculação com *Azospirillum*, com certos genótipos mostrando aumento de produção de até 100%. Zavalin et al. (1997) citam que os microrganismos fixadores de nitrogênio interagiram de maneira diferente com plantas de trigo de acordo com as variedades onde foram inoculados.

Diferenças de contribuição da FBN, de acordo com o genótipo das plantas, também estão presentes quando se trata da cultura da cana-de-açúcar. No

experimento conduzido por Urquiaga et al. (1992), foram utilizados os métodos de diluição isotópica de ^{15}N e balanço de N para a quantificação das taxas de FBN. Dez diferentes genótipos de *Saccharum* sp. foram utilizados e uma grande variação das taxas de FBN foi encontrada entre os genótipos. Krakatau (*S. spontaneum*), CB 45-3 e SP 70-1143 (ambos híbridos comerciais) apresentaram valores médios de contribuição da FBN superiores a 60% do total do N acumulado pela planta. Com relação à CB 47-89, Na 56-79, IAC 52-150, SP 71-799 e SP 79-2312, foram apresentadas taxas de FBN em torno de 50%. Os genótipos Chuneé (*S. barberi*) e Caiana (*S. officinarum*) não chegaram a obter 40% do total de N acumulado proveniente da FBN. Resultados semelhantes foram obtidos por Singh (1994), que trabalhando apenas com o método da diluição isotópica de ^{15}N , observou uma contribuição da FBN de 60% para Krakatau (*S. spontaneum*), 54% para *S. sinensi* e 35% para Chuneé (*S. barberi*).

Dados experimentais, não tão recentes, onde utilizou-se diferentes metodologias, também indicaram claramente um efeito varietal sobre a atividade da FBN em plantas de cana-de-açúcar. Ruschel & Ruschel (1977) avaliaram a atividade de redução de acetileno (ARA) em raízes, toletes e na planta inteira aos dois meses de idade em sistema intacto e perturbado, e sobre pressão de oxigênio baixa e normal, demonstrando diferentes medidas de ARA nas 6 variedades comerciais estudadas. Ruschel et al. (1978) voltaram a demonstrar evidências de que diferenças varietais afetam a atividade da nitrogenase. Trabalhando com três variedades, os autores demonstraram que a variedade CB 46-47 fixou mais N no período de 24 h ($1,79 \mu\text{g}$ de N) do que as outras variedades, todas oriundas da mesma mãe, porém de pais diferentes.

Boddey (1995) sugere que esta característica de obter uma significativa contribuição da FBN, presente em variedades brasileiras de cana-de-açúcar, pode ser devida aos processos de melhoramento e seleção feitos sob condições de baixos níveis de N. Vale lembrar que a cana-de-açúcar é altamente heterozigota,

de sorte que no cruzamento de duas variedades, a recombinação gênica gera grande variabilidade no F1, o que aumenta a possibilidade de seleção de características particulares.

As bactérias diazotróficas endofíticas *Acetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. parecem ser as principais responsáveis pelas altas taxas de FBN observadas na cultura da cana-de-açúcar (Boddey 1995). Uma possível explicação para as diferenças varietais, relacionadas com a FBN na cultura, seria o fato de que variedades diferentes apresentariam características distintas em relação à população de bactérias endofíticas. De acordo com esta hipótese, buscou-se observar a localização e o número de bactérias endofíticas em quatro diferentes genótipos de cana-de-açúcar, investigando uma possível correlação com os resultados apresentados em trabalhos de quantificação da FBN.

MATERIAL E MÉTODOS

1 - Levantamento da ocorrência de bactérias diazotróficas em quatro genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp).

Foi feito um levantamento onde avaliou-se a presença de diferentes bactérias diazotróficas em quatro genótipos de cana-de-açúcar. As plantas utilizadas foram oriundas de um experimento (4ª soca) plantado em solo Podzólico vermelho-amarelo (PVA) série Itaguaí e localizado na área experimental da **Embrapa Agrobiologia**. Os genótipos amostrados foram: Krakatau, CB 45-3, SP 70-1143, as mais eficientes em relação à FBN de acordo com o experimento de Urquiaga et al. (1992) e Chune, citada como o menos eficiente dos genótipos estudados neste mesmo trabalho.

A cada 30 dias, num total de três coletas, avaliou-se a presença das bactérias diazotróficas em amostras de raízes, colmos e folhas de cada um dos genótipos estudados. Foram utilizados meios de cultivo semi-sólidos sem adição de nitrogênio, a saber: LGI-P, semi-seletivo para o isolamento de *Acetobacter diazotrophicus*, LGI (*Azospirillum amazonense*), NFb (*Azospirillum lipoferum* ou *Azospirillum brasilense*) e JNFb (*Herbaspirillum* spp) (Döbereiner et al. 1995a). Amostras de 10g (peso da matéria fresca) foram lavadas com água corrente, trituradas em 90 ml de solução salina e diluídas serialmente. Foram utilizadas as diluições 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} . De cada diluição foram retiradas alíquotas de 0,1 ml e

inoculadas nos frascos com meio de cultura. Os frascos foram incubados a 30° C e aos 3, 5 e 7 dias o crescimento bacteriano foi avaliado verificando-se o aparecimento de película característica.

Os frascos com crescimento positivo, na mais alta diluição de cada um dos meios, foram utilizados para repicagem para um novo meio semi-sólido. Após a incubação retirou-se alíquotas que foram observadas ao microscópio de contraste de fase para a verificação da morfologia das células. Estes mesmos frascos foram utilizados para riscagem em placas com meio sólido, o mesmo do semi-sólido, acrescidos de extrato de levedura (Döbereiner et al. 1995a). As colônias formadas nos meios sólidos foram repicadas para novo meio semi-sólido e, após o período de incubação, foram riscadas em placas de meio sólidos batata ou batata-P (*A. diazotrophicus*) para purificação final (Döbereiner et al. 1995a).

A observação da morfologia das células, sob microscopia ótica de contraste de fase, e a morfologia das colônias nos meios específicos (LGI-P, LGI, NFb e JNFb) e no meio rico (batata e batata-P) foram utilizadas para agrupar as bactérias isoladas em cada um dos genótipos de cana-de-açúcar.

2 - Quantificação de *Acetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. em quatro diferentes genótipos de cana-de-açúcar.

Foi implantado um experimento em tanque de concreto, onde foram plantados os mesmos quatro genótipos avaliados anteriormente. O tanque de concreto possui 20 x 6 x 0,8 m, provido de drenos e preenchido com solo PVA série Itaguaí. De acordo com a análise do solo, o tanque foi adubado com P, K, Ca, Mg e micronutrientes (incluindo molibdênio), e a umidade foi mantida na capacidade de campo para que o único fator limitante fosse o nitrogênio.

O desenho experimental foi de blocos ao acaso com um arranjo em esquema fatorial de 4 (genótipos) X 4 (partes da planta) X 3 (coletas) com 4 repetições. Cada um dos 4 blocos foi dividido em 4 parcelas de 2,5 x 3,0 m, separadas por

telhas de amianto até o fundo do tanque, afim de separar as raízes de cada genótipo. As partes amostradas das plantas – raiz, colmo basal, colmo apical e folha foram consideradas sub-parcelas de genótipos e a época das coletas sub-parcelas de ambos. As coletas foram feitas aos 4, 7 e 15 meses após o plantio.

Os testes estatísticos (análise de variância e testes de médias) foram feitos com a utilização do programa MSTAT-C (Michigan State University).

A cada coleta eram retiradas amostras de raízes, colmo basal, colmo apical e folhas de cada parcela para avaliação das bactérias diazotróficas. Neste experimento foi avaliado apenas o número das bactérias endofíticas *Acetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp.

Para a obtenção do número das bactérias, presentes nas partes das plantas amostradas, utilizou-se a técnica do Número Mais Provável (NMP). Para tanto, realizou-se diluições seriadas (razão 10) de 10^{-2} até 10^{-7} , de cada parte da planta, inoculadas em meio semi-sólido sem N (LGI-P para *A. diazotrophicus* e JNFb para *Herbaspirillum* spp.). O número populacional foi obtido com o uso da tabela de MaCrady, tomando-se por base o número de frascos positivos em cada diluição (Döbereiner et al., 1995a).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 – Ocorrência de bactérias diazotróficas em quatro diferentes genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp).

Os resultados do levantamento da ocorrência de bactérias diazotróficas associadas aos quatro diferentes genótipos da cultura da cana-de-açúcar (Tabelas 1A, 1B, 1C e 1D) mostraram a presença das bactérias *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *Herbaspirillum* spp. e *Acetobacter diazotrophicus* nos quatro genótipos e em todas as partes amostradas (raízes, colmos e folhas), com exceção de *A. amazonense* que não foi isolado das folhas em nenhuma das três coletas.

A maior frequência de isolamento, observada para todas as bactérias estudadas nos quatro genótipos, se deu nas raízes das plantas, seguida dos colmos e folhas respectivamente, sendo mais acentuada para as bactérias do gênero *Azospirillum*. *Herbaspirillum* sp. e *A. diazotrophicus* apresentaram uma frequência de isolamento mais homogênea nas partes da planta, e foram as bactérias isoladas em maior número, principalmente as bactérias do gênero *Herbaspirillum*. Todas as bactérias estudadas já haviam sido observadas em associação com plantas de cana-de-açúcar (Baldani et al. 1997).

A presença de bactérias do gênero *Azospirillum* em todas as partes de plantas também foi relatada por diversos autores. Apesar destes microrganismos

serem geralmente considerados como bactérias da rizosfera, colonizando principalmente as zonas de elongação e os pêlos radiculares (Döbereiner 1995b; Vande Broek & Vanderleyden 1995), algumas estirpes podem também ser endofíticas e são encontradas no interior de raízes e parte aérea de diversas espécies (Baldani et al. 1997).

Relatos sobre a presença de *A. amazonense* colonizando a parte aérea de plantas são menos freqüentes. Pereira (1995), estudando a incidência de bactérias do gênero *Azospirillum* em diferentes genótipos de milho relatou a presença desta bactéria no colmo de certas amostras. Silva et al. (1995) indicaram a presença de bactérias, que provavelmente seriam *A. amazonense*, em raízes e colmos de diferentes ecótipos de *Pennisetum purpureum* e Ferreira et al. (1995) confirmaram a presença desta em sementes e frutos de duas espécies de palmeiras.

A ocorrência de espécies diazotróficas de *Herbaspirillum* e *Acetobacter* em plantas de cana-de-açúcar, colonizando tanto o interior das raízes como a parte aérea, já foi amplamente relatada (James & Olivares, 1997). Os resultados deste tópico demonstram que genótipos contrastantes quanto ao ganho de N via fixação biológica de N_2 apresentam-se associados com todas as bactérias estudadas. Estudos feitos com plantas de arroz (Campos et al. 1997) e *Pennisetum purpureum* (Silva et al. 1995), apresentaram resultados semelhantes, onde as bactérias estudadas estavam presentes em todos os genótipos avaliados.

Tabela 1: Ocorrência de bactérias diazotróficas em raízes, colmos e folhas de quatro diferentes genótipos de cana de açúcar, em três épocas de coleta (meses após o corte). Os valores são referentes à mais alta diluição com crescimento positivo.

(A) Genótipo Krakatau

Partes da planta									
Raízes				Colmos			Folhas		
Época das coletas (meses após o corte)									
Bactérias	2 meses	3 meses	4 meses	2meses	3 meses	4 meses	2 meses	3 meses	4 meses
<i>A. brasilense</i>	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²
<i>A. lipoferum</i>	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻⁴	N.D	10 ⁻²	N.D.
<i>A. amazonense</i>	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻²	N.D.	N.D.	10 ⁻²	N.D	N.D	N.D.
<i>Herbaspirillum</i> spp.	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻⁴
<i>A. diazotrophicus</i>	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻⁴	N.D	10 ⁻²	N.D.

N.D. - não detectado

(B) Genótipo Chuneé

Partes da planta									
Raízes				Colmos			Folhas		
Época das coletas (meses após o corte)									
Bactérias	2 meses	3 meses	4 meses	2meses	3 meses	4 meses	2 meses	3 meses	4 meses
<i>A. brasilense</i>	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻²	N.D.	10 ⁻²
<i>A. lipoferum</i>	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻²	N.D.	10 ⁻⁴	10 ⁻²	N.D.	N.D.
<i>A. amazonense</i>	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻²	N.D.	10 ⁻²	N.D.	N.D	N.D	N.D.
<i>Herbaspirillum</i> spp.	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻²
<i>A. diazotrophicus</i>	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²

N.D. - não detectado

(C) Genótipo SP 70-1143

Partes da planta									
Raízes				Colmos			Folhas		
Época das coletas (meses após o corte)									
Bactérias	2 meses	3 meses	4 meses	2meses	3 meses	4 meses	2 meses	3 meses	4 meses
<i>A. brasilense</i>	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻²	N.D.	10 ⁻²
<i>A. lipoferum</i>	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻⁴	N.D	N.D.	10 ⁻²
<i>A. amazonense</i>	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	N.D.	N.D.	10 ⁻²	N.D	N.D	N.D.
<i>Herbaspirillum</i> spp.	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻⁴
<i>A. diazotrophicus</i>	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻²	N.D.	10 ⁻⁴

N.D. - não detectado

(D) Genótipo CB 45-3

Partes da planta									
Raízes				Colmos			Folhas		
Época das coletas (meses após o corte)									
Bactérias	2 meses	3 meses	4 meses	2meses	3 meses	4 meses	2 meses	3 meses	4 meses
<i>A. brasilense</i>	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²
<i>A. lipoferum</i>	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²	N.D.	N.D.	10 ⁻²
<i>A. amazonense</i>	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻²	N.D.	10 ⁻²	N.D	N.D	N.D.
<i>Herbaspirillum spp.</i>	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻⁴
<i>A. diazotrophicus</i>	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²

N.D. - não detectado

2 - Quantificação de *Acetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. em quatro diferentes genótipos de cana-de-açúcar.

2.1. Efeito do genótipos

Não houve diferenças significativas quanto ao número de *Herbaspirillum* spp. ou *A. diazotrophicus* em relação aos quatro genótipos estudados. Também não foram observadas diferenças na população destes microrganismos nas diferentes partes da planta ou época de coleta (Figuras 1 a 4). Estes resultados parecem sugerir que o número de bactérias (*A. diazotrophicus* ou *Herbaspirillum* spp.) presentes em cada um dos genótipos não explica as diferenças encontradas quanto a contribuição da FBN para a nutrição nitrogenada destas plantas. Kojemyakov (1997), em um estudo de inoculação com diferentes bactérias diazotróficas, em diferentes variedades de diversas espécies de plantas, apresentou resultados que sugerem que a densidade populacional das bactérias independe das variedades das plantas sendo determinada pelo genótipo da bactéria. Campos et al. (1997) apresentou resultados similares em 10 variedades de arroz que apresentaram diferentes taxas de contribuição da FBN. A população de diazotróficos, principalmente *Herbaspirillum* sp., foi alta em todos os genótipos não sendo observadas, portanto, diferenças que possam explicar a variação entre as taxas de FBN. Trabalhando também com diferentes variedades de arroz, Van Holm et al. (1993) demonstraram que entre as variedades estudadas não havia diferenças significativas quanto ao número das bactérias diazotróficas avaliadas.

Em função de não terem sido observadas diferenças entre o número de bactérias presentes, algumas hipóteses podem ser sugeridas para explicar a variação entre os genótipos das plantas em relação as taxas de FBN por estes apresentadas: 1) mesmo apresentando números similares de diazotróficos, há a possibilidade de que a interação planta x microrganismos seja diferente entre os genótipos da planta, como proposto por Zavalin et al. (1997) e García de Salomone & Döbereiner (1996). Sprent & James (1995) afirmam que mesmo em uma efetiva

simbiose *Rhizobium*-leguminosa o balanço entre os dois simbiontes é extremamente delicado. Na cultura da cana-de-açúcar, um bom exemplo é o fato de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, uma das duas bactérias diazotróficas deste gênero, ser o agente causal da doença conhecida como estria mosqueada em genótipos susceptíveis (Olivares et al. 1997). A eficiência fotossintética, a nutrição mineral, resistência a condições desfavoráveis, entre outras, são características ligadas ao genótipo das plantas e que podem apresentar influência sobre a eficiência e o volume de N_2 fixado pelas bactérias associadas a estas plantas (Von Bulow, 1977). 2). A diversidade genética de bactérias diazotróficas da mesma espécie relacionada com o genótipo da planta (Piñero et al. 1988; Combe et al. 1994) também deve ser considerada como um fator importante ao analisar-mos as diferenças em relação a FBN na cultura da cana-de-açúcar . 3) Devemos nos lembrar que o número de bactérias conhecidas como também o número de bactérias que são culturáveis é muito pequeno. Estima-se que menos de 10% do total de microrganismos existentes são conhecidos (Amann et al., 1994), e portanto, uma outra possibilidade que também não pode ser descartada, poderia estar relacionada com a presença de uma ou mais bactérias ainda não descritas.

É fato que a fixação biológica de nitrogênio em plantas de cana-de-açúcar é um processo complexo e que envolve uma gama de fatores relacionados com o genótipo das plantas e das bactérias associadas a estes. As hipóteses sugeridas acima devem ser analisadas em conjunto e somadas a outras, que possam vir a ser descritas, para que possamos, enfim, compreender os fenômenos que regem esta associação.

Figura 1: Log do nº de células de *A. diazotrophicus* (A) e *Herbaspirillum* spp. (B) presente nas raízes de quatro genótipos de cana-de-açúcar

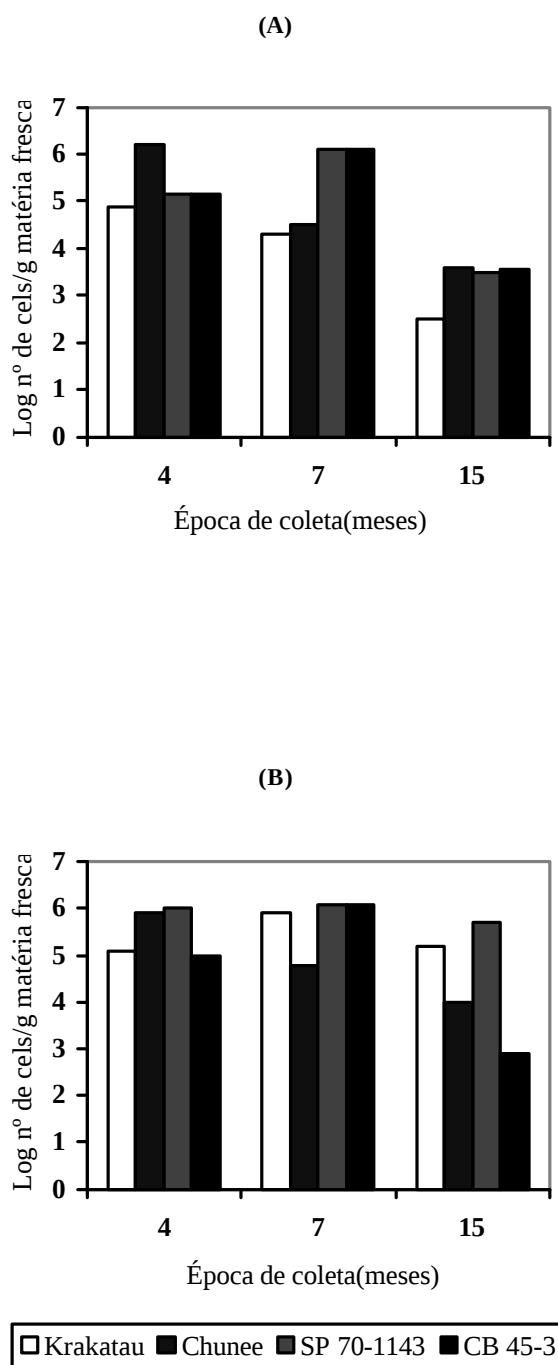


Figura 2: Log do nº de células de *A. diazotrophicus* (A) e *Herbaspirillum* spp. (B) presente na base do colmo de quatro genótipos de cana-de-açúcar

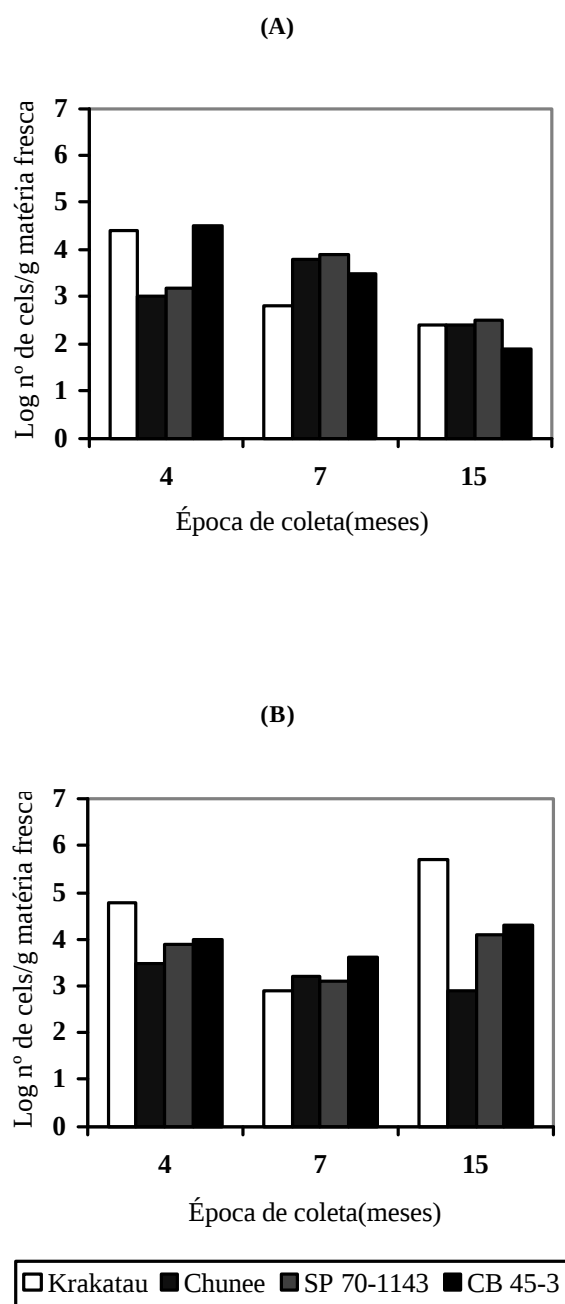


Figura 3: Log do nº de células de *A. diazotrophicus* (A) e *Herbaspirillum* spp. (B) presente no ápice do colmo de quatro genótipos de cana-de-açúcar

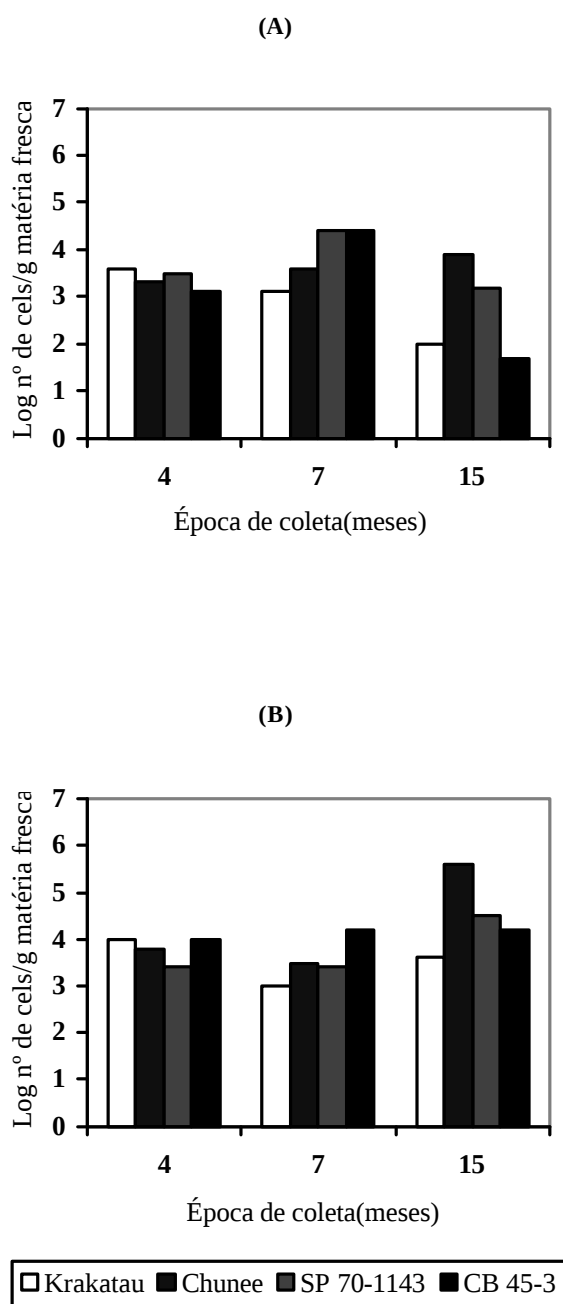
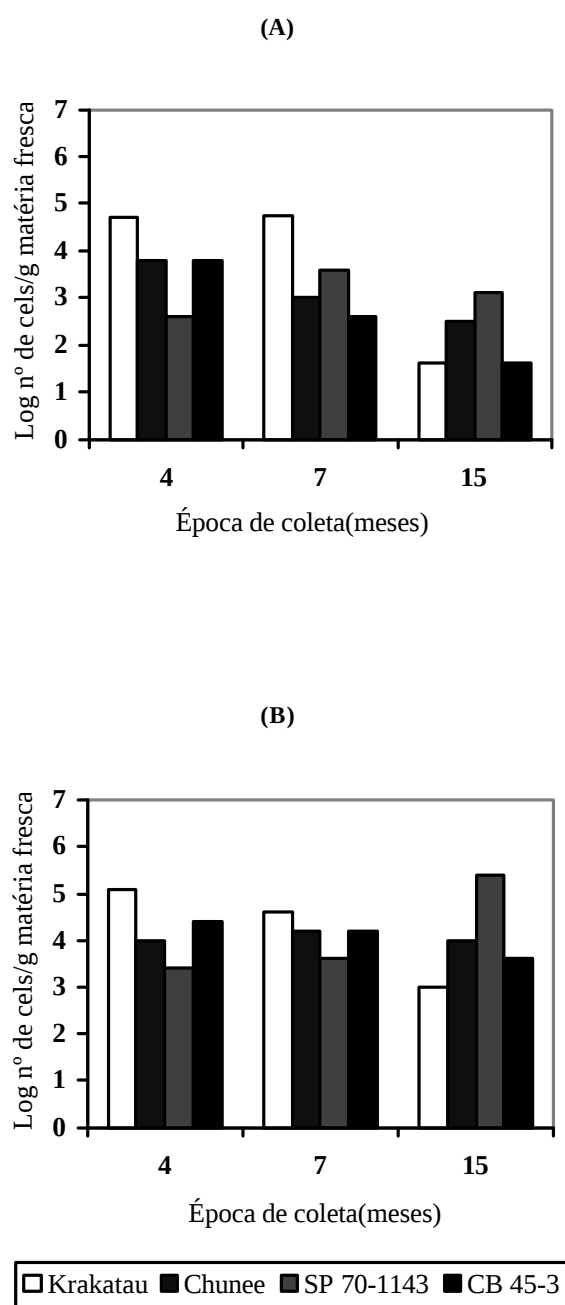


Figura 4: Log do nº de células de *A. diazotrophicus* (A) e *Herbaspirillum* spp. (B) presente nas folhas de quatro genótipos de cana-de-açúcar



2.2. Efeito das partes da planta e época de coleta

De maneira geral, as populações de *A. diazotrophicus* e *Herbaspirillum* sp. foram estatisticamente superiores nas raízes, não sofrendo maiores variações com relação às outras partes da planta (Tabela 2). Reis (1991) também apresentou resultados de quantificação para a espécie *A. diazotrophicus* em cana-de-açúcar, e na maioria das coletas as raízes apresentaram maior número destas bactérias em relação as outras partes da planta. Silva et al. (1995) demonstraram que, em plantas de *Pennisetum purpureum*, a população de bactérias diazotróficas, dentre estas *Herbaspirillum* spp., apresentava-se em números maiores nas raízes. Olivares (1997), em trabalho de levantamento da presença de *Herbaspirillum* spp. em diferentes variedades de cana-de-açúcar, obteve um maior número de isolados provenientes das raízes. Estes resultados indicam que provavelmente seja nas raízes o sítio preferencial de localização destas bactérias. Ainda não se sabe bem porque estas bactérias se localizam preferencialmente nas raízes, porém, sabemos que o sistema radicular é um grande dreno de fotoassimilados produzidos na parte aérea, e estes compostos são utilizados pelas bactérias para sua sobrevivência. Além disso, há relatos indicando que, em contraste aos trabalhos de James et al. (1994) e Sprent & James (1995), a translocação destas bactérias para a parte aérea via vasos do xilema seja dificultada (Dong et al. 1994). Trabalhando com as variedades de cana-de-açúcar Media Luna e Ja 60-5. Estes autores relataram que quando *A. diazotrophicus* foi introduzido no xilema, ocorreu uma forte reação nas células dos vasos com o aparecimento de uma goma vermelha que deveria impedir o fluxo livre das bactérias através destas células. Dong et al. (1997), ainda discutem a dificuldade de translocação de *A. diazotrophicus* através dos vasos xilemáticos baseados em estudos anatômicos e ensaios de translocação de corantes, partículas de látex e suspensão de células da bactéria nos vasos do xilema de plantas adultas da variedade Ja 60-5. Esta dificuldade de translocação

das bactérias para a parte aérea poderia também ser uma das razões para o acúmulo das bactérias nas raízes.

Com relação à época de coleta, para os quatro genótipos estudados, a população de *Herbaspirillum* spp. manteve-se relativamente estável, mas a população de *A. diazotrophicus* sofreu um decréscimo significativo com a aproximação do final do ciclo comercial da cultura (coleta aos 15 meses) (TABELA 3). As condições apresentadas pelas plantas no final do ciclo parecem afetar a população de *A. diazotrophicus*. Como proposto por Zavalin et al. (1997), as características da interação entre plantas e microrganismos não são apenas dependentes do caráter genético, como também das condições agroecológicas do período de vegetação. Costa & Ruschel (1981) mostraram que a população de microrganismos diazotróficos em cana-de-açúcar sofre influência da época do ano, e é bem provável também que o estado fisiológico da cultura apresente influência sobre estes microrganismos.

Tabela 2: Log do nº de células de *A. diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. nas diversas partes da planta de cana-de-açúcar ao longo do experimento.

PARTES DA PLANTA	<i>A. diazotrophicus</i>	<i>Herbaspirillum</i> sp.
Raízes	4.690 A	5.225 A
Base do colmo	3.150 B	3.771 B
Ápice do colmo	3.324 B	3.939 B
Folhas	3.116 B	4.134 B

Os valores seguidos de letras diferentes diferem-se pelo teste TUKEY 5%.

Estes dados são referentes as médias de quatro repetições para os quatro genótipos nas três épocas de coleta.

Tabela 3: Log do n° de células *A. diazotrophicus* presente nos quatro genótipos de cana-de-açúcar avaliado nas coletas aos 4, 7 e 15 meses após o plantio.

Coletas (meses após o plantio)	Genótipos				Total (média)
	Krakatau	Chunee	SP 70-1143	CB 45-3	
4	4,325 ab	4,175 a	3,544 a	4,150 a	4,048 A
7	3,755 a	3,729 a	4,474 ab	4,197 a	4,038 A
15	3,095 b	2,081 b	3,029 b	2,045 b	2,562 B
CV%	34,53				

Valores seguidos de mesma letra (minúsculas – colunas; maiúsculas – linhas) não são significativamente diferentes pelo teste TUKEY 5%.

CONCLUSÕES

1. *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum amazonense*, *Acetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. estão presentes tanto em genótipos de cana-de-açúcar ditos eficientes, quanto no genótipo não eficiente em relação à fixação biológica de N₂ (FBN).
2. Com exceção de *A. amazonense*, que não foi isolado de folhas, as bactérias estão presentes em todas as partes da planta avaliadas (raízes, colmos e folhas).
3. Os números populacionais de *A. diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. não são diferentes em genótipos de cana-de-açúcar contrastantes quanto ao potencial de FBN.
4. Os números populacionais de *A. diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. são maiores nas raízes em relação às outras partes da planta.
5. A população de *A. diazotrophicus* sofre um decréscimo com a aproximação do final do ciclo comercial da cultura de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANN, R.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H. Identification of uncultured bacteria: A challenging task for molecular taxonomists. **ASM News**, Washington, v.60, p.360-365, 1994
- APP, A.A.; WATANABE, I.; VENTURA, T.S.; BRAVO, M.; JUREY, C.D. The effect of cultivated and wild rice varieties on the nitrogen balance of flooded soil. **Soil Science Society of American Journal**, Madison, v.141, p.448-452, 1986.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p.911-922, 1997.
- BODDEY, R.M. Biological nitrogen fixation in sugar cane: A key to energetically viable biofuel production. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v.14, p.263-279, 1995.
- CAMPOS, D.V.B.; BERNADO, J.T.; REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. Occurrence of diazotrophic bacteria in wetland rice. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON NITROGEN FIXATION, 11., **Abstracts...** Paris: Institut Pasteur, 1997. p.50.
- COMBE, M.L.; PONS, J.L.; SESBOUE, R.; MARTIN, J.P. Electrophoretic transfer from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets, a new method to characterize multilocus enzyme genotypes of *Klebsiella* strains. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.26-30, 1994.

- COSTA, J.M.T.; RUSCHEL, A.P. Seasonal variation in the microbial populations of sugar-cane plants. In: VOSE, P.B.; RUSCHEL, A.P., eds. **Associative N₂ - Fixation** Boca Raton: CRC, 1981. v.2, p. 109-118.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília: EMBRAPA-SPI, Itaguaí, RJ: Embrapa-CNPAB, 1995a. 80 p.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J.; DE ZAMAROCZY, M., eds. **Azospirillum VI and related microorganisms**. Springer-Verlag, Berlin. Springer-Verlag, 1995b. p. 3-14.
- DONG, Z.; CANNY, M.J.; MCCULLY, M.E.; ROBOREDO, M.R.; CABADILLA, C.F.; ORTEGA, E. & RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. **Plant Physiology**, Rockville, v.105, p.1139-1147, 1994.
- DONG, Z.; MCCULLY, M.E.; CANNY, M.J. Does *Acetobacter diazotrophicus* live and move in the xylem of sugarcane stems? Some anatomical and physiological data. **Annals of Botany**, London, v.80, p.147-158, 1997 .
- FERREIRA, A.C.; COZZOLINO, K.; CARVALHO, A.R.V.; DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in oil palm trees. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS: THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis. **Abstracts...**, Angra dos Reis; RJ: Embrapa-CNPAB, 1995. p.210-211.
- GARCÍA DE SALOMONE, I.; DÖBEREINER, J. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.21, p.193-196, 1996.

- JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L. Infection and colonization of sugar cane and other gramieaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v.17, p.77-119,1997.
- JAMES, E.K.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.45, p.757-766, 1994.
- KOJEMYAKOV, A.P. Associative nitrogen-fixing bacteria: colonization of the roots and efficacy on non-legumes plants. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON NITROGEN FIXATION, 11., **Abstracts...** Paris: Institut Pasteur, 1997. p.
- MIRANDA, C.H.B.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Selection of ecotypes of *Panicum maximum* for associated biological nitrogen fixation using the ¹⁵N isotope dilution technique. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.22, p.657-663, 1990.
- OLIVARES, F.L. **Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. híbrido) por bactérias endofíticas do gênero *Herbaspirillum***. Itaguaí: UFRRJ, 1997. 344p. Tese de doutorado.
- OLIVARES, F.L.; JAMES, E.K.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, Cambridge, v.135, p.575-597, 1997.
- OLIVEIRA, O.C. **Quantificação da fixação biológica de nitrogênio em arroz (*Oryza sativa*, L.) inundado**. Itaguaí: UFRRJ, 1994. 235 p. Tese de mestrado.
- PIÑERO, D.; MARTÍNEZ, E.; SELANDER, R.K. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.54, p.2825-2832, 1988.

- PEREIRA, J.A.R. **Bactérias diaotróficas e fungos micorrízicos arbusculares em diferentes genótipos de milho** (*Zea mays* L.). Lavras UFLA, 1995. 112 p. Tese de mestrado.
- REIS, V.M. **Aspectos ecológicos e fisiológicos da bactéria fixadora de N₂ *Acetobacter diazotrophicus***. Itaguaí: UFRRJ, 1991. 119 p. Tese de mestrado.
- RUSCHEL, A.P.; RUSCHEL, R. Varietal differences affecting nitrogenase activity in rizosphere of sugar cane. **Proceedilings for International Society Sugar Cane Technology**, v.2, 1977.
- RUSCHEL, A.P.; VICTORIA, R.L.; SALATI, E. & HENIS, Y. Nitrogen fixation in sugarcane (*Saccharum officinarum*), In: GRANHALL, V. ed. **Environmental role of nitrogen-fixing blue-green algae and asymbiotic bacteria**. Uppsale: Swedish Natural Science Research Council, 1978. p.297-302.
- SILVA, M.M.P.; REIS, V.M.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M.; XAVIER, D.F.; DÖBEREINER, J. Screening *Pennisetum* ecotypes (*Pennisetum purpureum*, Schum.) for biological nitrogen fixation. . In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS: THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis. **Abstracts...**, Angra dos Reis; RJ: Embrapa-CNPAB, 1995. p.236-237.
- SINGH, M. Estimation of nitrogen fixation in *Saccharum* spp. by ¹⁵N dilution method. **Journal of Nuclear Agriculture and Biology**, New Delhi, v.23, p.1-5, 1994.
- SPRENT, J.I.; JAMES, E.K. N₂ - fixation by endophytic bacteria: questions of entry and operation. In: FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J. & DE ZAMAROCZY, M. eds **Azospirillum VI and related microorganisms**. Berlin: Springer-Verlart, 1995. p.15 -30.
- URQUIAGA, S., CRUZ, K.H.S.; BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.56, p.105-114, 1992.

- VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Review: genetics of the *Azospirillum*-plant root association. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v.14, p.445-466. 1995.
- VAN HOLM, L.H.J.; VAN NIEUWENHOVE, C.; STEENHOUDT, K.; VANAKEN, H.; VLASSAK, K. Changes in the dinitrogen fixing bacterial population of rice rhizosphere as influenced by rice cultivars, time and soil type. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON NITROGEN FIXATION, 6, Egypt, 1993. **Abstracts...** Ismailia, Egypt, 1993. p.373
- VON BÜLOW, J.F.W. Plant influence in symbiotic nitrogen fixation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE LIMITATIONS AND POTENTIALS OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN THE TROPICS, Brasília, UnB, 1997. **Abstracts...** Brasília: UnB, 1997. p.39.
- ZAVALIN, A.A.; KANDAUROVA, T.M.; VINOGRADOVA, L.V. Influence of associative nitrogen/fixing microorganisms on the provision with nitrogen of summer wheat. In: In: INTERNATIONAL CONGRESS ON NITROGEN FIXATION, 11., Paris, 1997. **Abstracts...** Paris: Institut Pasteur, 1997. p.72.

CAPÍTULO II

ESTUDOS DE OCORRÊNCIA E COLONIZAÇÃO DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS EM PLANTAS MICROPROPAGADAS DE CANA-DE-
AÇÚCAR (*Saccharum* spp.)

RESUMO

A provável eliminação das bactérias diazotróficas endofíticas com a utilização da metodologia de cultura de tecidos, fez com que fossem buscadas evidências de sua presença em plantas micropropagadas, desde a fase inicial do processo de micropropagação até a utilização destas plantas no campo. Os estudos confirmaram a eliminação destas bactérias, já que estas não foram encontradas no material recém micropropagado. No entanto, foi possível encontrar *Azospirillum* spp. em plantas ainda na fase de aclimação, enquanto que em plantas sendo utilizadas no campo também obtiveram-se isolados de *Herbaspirillum* spp. e *Acetobacter diazotrophicus*. Também foram testadas duas novas alternativas de isolamento para *Herbaspirillum* spp. e *A. diazotrophicus*. Tanto a pré-germinação de toletes colhidos no campo, quanto a técnica de imunocaptura mostraram-se viáveis para o isolamento destas bactérias. Estudos de microscopia com plântulas inoculadas com *A. diazotrophicus*, mostraram aos 7 dias após a inoculação, as bactérias localizadas preferencialmente em feridas naturais ou provocadas pela emergência de raízes laterais, como também na ponta das raízes, provavelmente utilizando estas regiões para atingir o interior da planta. Já no interior das raízes pode-se observar as bactérias colonizando o espaço intercelular da região do córtex, como também a sua presença nos vasos do xilema, provavelmente fazendo desta região uma via de acesso a parte aérea das plantas.

ABSTRACT

The technique of tissue culturing has recently become more widely used by the Brazilian producers of sugar-cane. There is a high possibility that the use of this methodology eliminates the endophytic diazotrophic bacteria within the plantlets. In the present study, evidence of the presence of these bacteria were looked for in several samples of micropropagated plants, from the initial phase of the micropropagation process until being planted in the field. The study demonstrated that the tissue culture technique does indeed eliminate the endophytic diazotrophic bacteria, as none were found in the newly micropropagated material. However, it was possible to find *Azospirillum* spp. in plants in the acclimatization phase, while isolates of *Herbaspirillum* spp. and *A. diazotrophicus* were obtained from plants that already became used in the field. Two new isolation alternatives for *Herbaspirillum* spp. and *A. diazotrophicus* were tested, and it was shown that pre-germination of stems picked on the field, together with the imunotrapping technique, were viable alternatives for the isolation of these bacteria. Microscopic studies were also made with micropropagated sugar-cane plantlets inoculated with *A. diazotrophicus*. These showed that by 7 days after inoculation, the bacteria were located mainly within natural wounds, or within those "wounds" produced during the emergence of lateral roots, as well as in the root tip. These regions were probably used by the bacteria to enter the plants. Once inside the roots the bacteria were observed colonizing the intercellular spaces of the cortex, as well as the xylem vessels, probably using the latter as an access road to the aerial parts of the plants.

INTRODUÇÃO

A técnica de micropropagação através da cultura de meristemas foi introduzida recentemente no Brasil, e plantas de cana-de-açúcar obtidas a partir desta técnica já vem sendo utilizadas por várias usinas, principalmente no estado de São Paulo, maior produtor nacional. Além da rápida propagação, as mudas obtidas por esta técnica conservam as características genéticas originais e excelente grau de sanidade (de MORAES & SANGUINO, 1994). A cultura de meristemas já provou ser eficiente na “limpeza” do mosaico, carvão, raquitismo das soqueiras e escaldadura das folhas, doenças mais importantes da cultura canavieira (LEE, 1986). O agente causal destas doenças, assim como as bactérias diazotróficas endofíticas residem no interior do vegetal. Sendo assim a hipótese de que esta técnica também elimina os microrganismos benéficos é bastante provável.

OLIVARES (1997), relata a ocorrência de bactérias do gênero *Herbaspirillum* em amostras de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar oriundas dos laboratórios da UFSCar (Universidade Federal de São Carlos), no entanto em amostras oriundas dos laboratórios da Copersucar (Cooperativa dos Produtores de Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo) nenhuma bactéria foi encontrada. O autor explica que, a presença de bactérias diazotróficas nas amostras da UFSCar, deve-se ao tamanho adotado para o meristema apical no procedimento de obtenção de plântulas, enquanto na UFSCar utilizou-se seções de meristemas apicais com aproximadamente 2 mm de comprimento, na Copersucar as seções não ultrapassam 0,6 mm. LEE (1986) discute que o tamanho adequado

do meristema é o responsável por livrar as plantas não só do vírus do mosaico, mas também de outros patógenos, cuja existência é desconhecida, mas que afetam o desenvolvimento do meristema apical. KARTHA & GAMBORG (1975) citam que, dependendo do tamanho do meristema, uma porção variável dos tecidos condutores é removida, podendo esta porção conduzir bactérias, e entre estas bactérias é bem provável que estejam as do gênero *Herbaspirillum*, que também tem sido observadas nos vasos do xilema de cana-de-açúcar (OLIVARES et al., 1993). Porém, como a maioria dos produtores que utilizam mudas micropropagadas recebem as plântulas da Copersucar, o mais provável é que não se encontrem bactérias diazotróficas endofíticas nestas plantas. Como acreditamos que estas bactérias não sobrevivem fora do tecido vegetal e que a sua transmissão ocorra normalmente via toletes utilizados para a propagação vegetativa (REIS et al., 1994), a utilização de plantas micropropagadas provavelmente elimina este modo de transferência.

Com a provável eliminação destes microrganismos é muito importante pensarmos na reintrodução deles ao sistema, e quem sabe aproveitar estas plantas para introdução de uma população de diazotróficos selecionados e/ou geneticamente melhorados, visando um aumento da contribuição da FBN. PAULA et al., (1991) mostraram que a inoculação de *A. diazotrophicus* em plantas crescendo no solo, não garantia a infecção destas plantas, a não ser em presença de fungos micorrízicos arbusculares. Trabalhos com a inoculação de *A. diazotrophicus* em toletes de cana-de-açúcar tratados termicamente, mostraram a mesma atividade da nitrogenase tanto para os controles como para as plantas cujo os toletes foram inoculados, indicando a pré-existência de bactérias fixadoras nestes toletes (REIS et al., 1994). A técnica de cultura de tecidos pode vir a facilitar a inoculação destas bactérias fixadoras de nitrogênio. Estudos recentes (REIS, 1994 e REIS et al., 1998) apresentaram modificações no meio de cultura básico para cultura de tecidos, com o objetivo de manter um equilíbrio entre a solução de nutrientes e a

associação planta/bactéria. O protocolo desenvolvido descreve a inoculação das bactérias ao final do período de enraizamento das plântulas, fase III do processo de micropropagação (de MORAES & SANGUINO, 1994), no meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) modificado sem hormônios ou vitaminas, e com 1/10 da concentração de açúcares e minerais. Esta nova metodologia parece favorecer a infecção e o estabelecimento da bactéria nos tecidos das plantas de cana-de-açúcar (REIS et al., 1998).

Utilizando o meio de cultura básico para micropropagação, com as modificações sugeridas por REIS (1994), em experimento de inoculação, OLIVARES (1997) mostrou que até os 106 dias após a inoculação e transferência das plântulas para substrato sólido (areia + vermiculita estéril) o número de *Herbaspirillum* spp. presente nas raízes das plantas manteve-se relativamente estável, não apresentando um declínio significativo em relação a população observada no interior das plantas no início do experimento (10^6 células. g⁻¹). Em relação a parte aérea foi observado que as populações sofriam grandes variações em função do tempo. OLIVEIRA et al. (1995) em experimento semelhante obtiveram evidências da presença de *Herbaspirillum* spp. e *A. diazotrophicus* aos 99 dias após a inoculação das plântulas. REIS et al. (1998) também apresentaram resultados semelhantes com *A. diazotrophicus* presente em números variando de 10^3 a 10^4 células. g⁻¹ de peso fresco da planta 30 dias após o início do período de aclimação.

A técnica da inoculação de bactérias diretamente no meio (modificado) para cultivo de meristemas tem sido de grande valia para os estudos de infecção e colonização das plantas de cana-de-açúcar por bactérias diazotróficas endofíticas. OLIVARES et al. (1995), em um experimento utilizando este sistema, mostraram que *Herbaspirillum* spp. era capaz de penetrar nas plântulas, preferencialmente via feridas provocadas pelo crescimento de raízes laterais, colonizando espaços intercelulares e células do córtex das raízes das plântulas. Subsequentemente,

estes autores observaram a presença de *Herbaspirillum* spp. no tecido vascular dos colmos das plântulas. Parece portanto, que *Herbaspirillum* spp. é translocado para a parte aérea via fluxo transpiratório, como mostrado para *Azoarcus* em plantas de arroz e “Kallar grass” (HUREK et al., 1994). Utilizando plantas micropropagadas inoculadas com *A. diazotrophicus*, JAMES et al. (1994), mostraram que esta bactéria também colonizava tanto os espaços intercelulares das raízes, como os vasos de xilema, tendo penetrado no interior das plântulas via sítios de emergência e crescimento de raízes laterais e meristema radicular. A presença destas bactérias no interior dos tecidos vasculares provavelmente deve-se, assim como para *Herbaspirillum* spp., a ruptura da endoderme durante a emergência das raízes secundárias ou a possibilidade das células do meristema radicular não serem diferenciadas nem espessas o bastante para impedir a entrada da bactéria, como proposto por SUMNER (1990). Como no caso de *Herbaspirillum* spp., *A. diazotrophicus* deve utilizar o fluxo transpiratório para se translocar para as outras partes da planta.

Os estudos feitos neste capítulo visaram determinar a presença de bactérias diazotróficas em plantas micropropagadas desde a cultura de meristemas até a utilização destas plantas no campo pelo produtor. É importante em estudos como este que a metodologia de isolamento seja a mais eficiente possível, pois pode existir a possibilidade de chegarmos a conclusões não verdadeiras, como por exemplo de que certa bactéria não está presente em determinado material, apenas por que a metodologia utilizada não foi capaz de detectá-la. Foi pensando neste problema que além do método tradicional de isolamento, duas novas metodologias foram testadas, a pré-germinação de toletes para posterior isolamento de bactérias e uma adaptação da metodologia de imunocaptura para isolamento de bactérias diazotróficas endofíticas.

A pré-germinação de toletes foi utilizada devido a observações feitas por RUSCHEL (1977), que observou alta atividade de redução de acetileno neste

tipo de material, e SILVA et al. (1994) que relatou a presença de *A. diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. em números em torno de 10^6 células por grama de material pré-germinado, para posterior estudos de quantificação com a utilização da metodologia de ELISA.

A técnica de Imunocaptura foi desenvolvida por CHESS et al. (1974) para separação específica e isolamento de células ósseas humanas, e a partir daí sofreu várias adaptações para o isolamento de bactérias presentes na água, solo, e amostras de plantas (HRANITZKY et al., 1980; BRUNEL et al., 1988). MAVINGUI et al. (1990), utilizaram esta técnica para isolamento das bactérias anaeróbias fixadoras de N_2 *Bacillus polymixya* em raízes lavadas e rizosfera de plantas de trigo. SCHLOTTER (com. pessoal) promoveu ainda algumas modificações na metodologia visando melhorar o isolamento de bactérias diazotróficas endófitas. Esta técnica de captura imunológica baseia-se no fato de que os anticorpos ligam-se a proteína A, que é previamente adsorvida nos poços de placas de ELISA. Com a adição das amostras, as bactérias que tem afinidade com os anticorpos ligam-se a eles. Lavagens sucessivas eliminam o material restante (inclusive outras bactérias não ligadas aos anticorpos), portanto, teoricamente só restarão nas placas a ligação proteína A + anticorpos + bactérias. Com a adição de uma enzima (papaína) que denatura o anticorpo, estas bactérias são liberadas para a solução.

Neste capítulo, além dos trabalhos de isolamento, também foram estudados os processos de infecção da bactéria *A. diazotrophicus* em plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar, com a intenção de confirmar e adicionar informações as já existentes.

MATERIAL E MÉTODOS

1 - Ocorrência de bactérias diazotróficas em plantas de cana-de-açúcar oriundas da técnica de cultivo de meristemas.

Os estudos de ocorrência de bactérias diazotróficas foram feitos com a colaboração da Copersucar-SP, em amostras provenientes de diversos materiais, desde a cultura de meristemas até a utilização destas plantas no campo pelos produtores associados à cooperativa.

1.1 - Coleta das amostras

Foram avaliados diversos materiais num total de quatro coletas. Na primeira coleta foi avaliada a presença de bactérias em amostras coletadas no campo experimental da Copersucar em Piracicaba - SP. Foram coletadas amostras do solo das entrelinhas de cana-de-açúcar variedades SP 83-5073 e SP 80-185 (micropropagadas); composto utilizado como componente do substrato de aclimação das plantas micropropagadas; composto fumigado; variedades de cana-de-açúcar micropropagadas SP 80-180 (1 mês de transplante para viveiro), SP 80-4445 (2 meses de transplante para viveiro), SP 80-1520 (4 meses de transplante para viveiro), SP 83-5073 (há 3 meses no campo), SP 80-180 (há 3 meses no campo); e diversas amostras de plântulas micropropagadas ainda presentes no meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962).

Na segunda coleta, foram analisadas plantas vindas do viveiro de aclimação provenientes de plantio por sementes; plantas oriundas da micropropagação com 4 e 10 meses no campo; plântulas micropropagadas ainda presentes no meio MS; substrato utilizado para enviveiramento das mudas micropropagadas (esterilizados e não esterilizados).

Para a terceira coleta, foram feitas visitas a três usinas que fazem parte da Cooperativa. Foram coletadas diversas variedades de cana-de-açúcar que foram plantadas a partir de mudas micropropagadas, a saber:

1. Usina São João no município de Araras - SP 80-1842 (18 meses no campo) e RB 85-5563 (12 meses no campo);
2. Usina São Luiz no município de Pirassununga - SP 79-1011 (42 meses no campo), SP 80-1816 (7 meses no campo) e SP 80-1842 (5 meses no campo);
3. Usina da Pedra no município de Ribeirão Preto - SP 80-1836 (8 meses no campo), SP 80-1816 (12 meses no campo) e SP 77-5181 (22 meses no campo).

1.2 - Isolamento de bactérias diazotróficas

Para amostras de planta foram seguidos os passos descritos no material e métodos do primeiro capítulo. No entanto, os extratos desta vez foram inoculados nos meios JNFb, LGI-P e LGI, meios semi-específicos para *Herbaspirillum* spp (*Azospirillum* spp. também é isolado neste meio), *A. diazotrophicus* e *Azospirillum amazonense*, respectivamente (DÖBEREINER et al., 1995a).

Das amostras de substrato, foi tomado 1 g e agitado por 1 min a 100 rpm em 9 ml de solução salina e a partir daí fez-se as diluições seriadas e seguiram-se os mesmos passos feitos para o material de planta.

Os frascos com crescimento positivo nas últimas diluições foram repicados para o mesmo meio original. Após crescimento inicial, estes foram riscados em placas contendo o mesmo meio mais 20 mg de extrato de levedura, com exceção das bactérias crescidas em JNFb, que foram todas riscadas em placas de NFb

com 3 vezes a quantidade do indicador, azul de bromotimol (DÖBEREINER et al., 1995a). Após o crescimento das colônias por 7 dias, estas foram repicadas novamente para novo meio semi-sólido e seu crescimento inicial finalmente riscado em placas de petri contendo meio batata para a purificação final.

1.3 - Utilização de métodos alternativos para o isolamento de *A. diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp.

1.3.1 - Utilização de toletes pré-germinados

Buscou-se isolar *A. diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. de variedades de cana-de-açúcar cultivadas nas usinas São João e São Luiz, as mesmas já citadas no tópico 1.1. Na Usina São João, foram coletadas amostras das variedades RB 85-5563 (30 meses no campo), SP 80-1816 (30 meses no campo) e SP 80-1842 (30 meses no campo). Da Usina São Luiz foram amostradas as variedades SP 80-4445 (10 meses no campo), SP 80-1842 (10 meses no campo) e SP 80 - 3280 (10 meses no campo). Para todas as variedades foram obtidas amostras oriundas tanto do cultivo tradicional como da técnica de micropropagação.

De cada variedade foram coletadas parte da base do colmo e raízes para a avaliação da presença destas bactérias em amostras vindas diretamente do campo. Para estas amostras seguiram-se os mesmos passos de isolamento destas bactérias já citados anteriormente.

A nova estratégia de isolamento consistiu apenas em dividir os toletes de amostras destas mesmas variedades de forma a conterem apenas uma gema viável, e plantá-los em bandejas com substrato (areia + vermiculita, 2:1) esterilizado. Aos trinta dias após o plantio as plantas germinadas foram divididas em raiz e parte aérea e o isolamento de *A. diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. foi efetuado de acordo com DÖBEREINER et al. (1995a).

1.3.2 - Imunocaptura

Para utilização desta técnica amostras de 1g foram maceradas em 9 ml de PBS. A seguir adicionou-se 0,2 g de poli-etileno-glicol 6000 (PEG) e 0,2 g de resina Chelex 100, para eliminação de ligações orgânicas e iônicas presentes entre as bactérias e o material vegetal. Estas amostras foram incubadas por 1 hora sob agitação a 4° C. O material foi filtrado em papel de filtro (Whatman) e em seguida em filtro de 5 µm para eliminação de materiais grosseiros das amostras de plantas. As amostras foram centrifugadas (10.000 RPM por 10 min.) e ressuspensas em 1 ml de PBS.

A metodologia de imunocaptura consistiu em cobrir os poços das placas de ELISA (marca GRAINER) com 200µl de proteína A diluída 1:50 em tampão carbonato e deixar incubando a 4°C durante a noite. Após este período de incubação lavou-se as placas uma vez com PBS. Após a lavagem, adicionou-se 200µl do anticorpo primário (específico para a bactéria alvo) na diluição ideal (diluídos em PBS) e incubou-se sob agitação por 1 hora a 37°C. Desta vez lavaram-se as placas com PBS duas vezes após o período de incubação. Após a lavagem, aplicou-se 200µl da amostra do material vegetal por poço e incubou-se sob agitação por 2 horas a 37°C. Nos momentos seguintes a esta incubação, tomou-se o cuidado de que o trabalho fosse em condições estéreis. Cada placa foi lavada por seis vezes com solução de lavagem, depois aplicou-se 200µl de solução de papaína diluída 1:50 em tampão papaína estéril e incubou-se sob agitação por 1 hora a 37°C. A solução foi recolhida dos poços e diluída em PBS estéril (1:10). Esta solução diluída foi então inoculada em vidros com meio semi-sólido contendo LGI-P para *A. diazotrophicus* ou JNFb para *Herbaspirillum* spp.

Soluções utilizadas:

1. PBS:

NaCl - 8,0g.

KCl - 0,2g.

Na₂HPO₄ x 2H₂O - 1,4g.

KH₂PO₄ - 0,2g. (Completar para 1l com água destilada)

2. Solução de lavagem (em PBS):

0,05% Tween.

0,5% BSA.

3. Tampão carbonato:

50mM Na₂CO₃

50mM NaHCO₃

pH 9.6

4. Tampão Papaína:

10 mM EDTA (a).

50mM Cisteína (b).

Adicionar 2,6 ml da solução (a) + 2,6 ml da solução (b) e completar para 50ml com água destilada.

pH 6.2

Para os testes de imunocaptura foram feitas duas coletas no campo experimental da *Embrapa Agrobiologia* de onde obteve-se amostras da variedade SP 70-1143. Na primeira coleta avaliou-se a capacidade de isolamento de *A.diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. das raízes das plantas com a utilização desta técnica. Na segunda coleta foi feita uma comparação entre o método de isolamento tradicional (DÖBEREINER et al., 1995a) e a técnica de imunocaptura para as mesmas bactérias. Para este teste, foram então coletadas raízes de quatro plantas da variedade SP 70-1143.

2 - Microscopia ótica e eletrônica de *A. diazotrophicus* inoculado em plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar

2.1 - Obtenção das plântulas micropropagadas e inoculação.

Variedades de cana-de-açúcar foram micropropagadas de acordo com HENDRE et al. (1993) (as plantas micropropagadas foram fornecidas pela Copersucar-SP). Após o crescimento no meio de enraizamento (Fase 3), as plântulas foram transferidas para meio MS diluído 1/10 (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e inoculadas com 0,1ml de suspensão bacteriana contendo 10^6 a 10^7 células por ml de *A. diazotrophicus* (estirpe PAL 5). As bactérias foram crescidas por 24h em um meio contendo (l^{-1}): 2.0 g glucose, 1.5 g ácido glutâmico, 1.5 g peptona, 0.5 g K_2HPO_4 , 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g extrato de levedura, pH 6.0. As plantas foram mantidas a uma temperatura controlada de 30° C com uma irradiância de 60 μmol fótons $m^{-2} s^{-1}$ por 12 h por dia. As coletas foram feitas 7 dias após a inoculação.

2.2 - Microscopia ótica e eletrônica de transmissão

Após a coleta das plântulas, estas foram lavadas em água destilada e pequenos pedaços de 3 a 5 mm das raízes, colmos e folhas foram cortados e fixados em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 50 mM, com pH 7,0 por 24 horas a temperatura ambiente. As amostras foram preparadas para microscopia ótica e microscopia eletrônica de transmissão (MET) de acordo com JAMES et al. (1994). Após a fixação, as amostras foram lavadas por três vezes em tampão fosfato para remoção do glutaraldeído residual e desidratadas em série etanólica crescente (15, 30, 50, 60, 70, 80, 90, 100 % etanol em água v/v), permanecendo por 15 minutos em cada mistura. Após a desidratação as amostras foram embebidas em resina acrílica “LR White medium grade” (London Resin Company, UK) durante um período de 7 dias, sendo mantidas em geladeira para infiltração da resina. Amostras individuais foram cuidadosamente transferidas com

pinça fina para cápsulas transparentes de gelatina contendo resina, orientadas para obtenção de cortes transversais, longitudinais ou paradérmicos e postas a polimerizar em estufa a 60° C por um período de 18 horas. As cápsulas polimerizadas foram selecionadas, levadas a lupa do ultramicrotomo e lapidadas a mão para obtenção de blocos de forma trapezoidal contendo a amostra. A partir destes blocos foram obtidas seções semi-finas (0,7 - 1 µm) e seções ultra-finas (60 - 80 nm) utilizando um ultramicrotomo "Reichert-Jung Ultracut E" e facas de vidro preparadas em um "Knife maker II Reichert-Jung". Seções semi-finas para observação ao microscópio ótico foram coletadas em lâminas de vidro contendo uma gota de água, fixadas em placa metálica aquecida e imediatamente coradas com azul de toluidina solução 0,1% preparada a partir de uma solução contendo 1% de azul de toluidina e 1% de tetraborato de sódio (bórax) em água, sendo então examinadas em um microscópio ótico Olympus modelo BH2 (Micronal). Cortes seriadas foram preparados como descritos acima e o número e espessura total dos cortes registrada no aparelho de contagem serial (Counter Reichert-Jung). Seções ultra-finas para observação ao MET foram recolhidas em grades de cobre hexagonais de 200 ou 300 mesh, cobertas com uma fina camada de filme plástico de nitrocelulose, piroxilina (solução 2% em amil-acetato) ou de forma opcional em filme de polivinil formol, Formvar 15/95 (Shawinigan Resins Corporation, Springfield, Massachusetts, USA) solução 0,3% em clorofórmio, postas para secar sobre papel de filtro e posteriormente contrastadas em acetato de uranila solução 5% em água por 10 minutos e citrato de chumbo solução 0,2% em NaOH 0,01N por 7 a 10 minutos (REYNOLDS, 1963). A seguir foram postos a secar em placas de petri com papel de filtro por 1 hora e então examinados em um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss modelo EM 900 (Carls Zeiss).

2.3 - Microscopia eletrônica de varredura

As plântulas foram coletadas e cortadas com gilete em pequenos pedaços (1-3 mm) sobre uma placa de parafina em presença de tampão fosfato 50 mM, pH 7,0. As amostras foram colocadas em frascos contendo solução de glutaraldeído a 2,5% para a fixação do material. Após a fixação, com uma pipeta Pasteur, o glutaraldeído foi substituído pelo tampão fosfato lavando as amostras por três vezes. As amostras foram então desidratadas em série etanólica crescente (15, 30, 50, 60, 70, 80, 90, 100 % etanol em água), permanecendo por 15 minutos em cada mistura e posteriormente em série acetônica crescente (15, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 % acetona em etanol). Em seguida, amostras selecionadas foram transferidas para o equipamento "Critical Point Drying Apparatus" (Mod E 300, Bio Rad), onde se efetuou a secagem completa das amostras pela substituição da acetona por gás carbônico líquido mantido a alta pressão. Em seguida transformou-se o CO₂ líquido em CO₂ gasoso pela aplicação de uma temperatura de 36 °C e pressão de 70 atm (ponto crítico de secagem para o CO₂), no qual ocorre mudança de fase sem adição de calor no sistema e redução dos danos de tensão superficial associadas a evaporação, resultando em um espécime completamente seco. Após este procedimento, as amostras foram cobertas com uma película de ouro visando aumentar a condutividade eletrônica, utilizando o "Automatic Sputter Coater E5200" (Bio Rad), aplicando-se uma corrente de 18 mA e tempo de deposição de ouro de 240 segundos, o que fornece em teoria uma cobertura em torno de 300 nm de espessura. Finalizado este processo, as amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura Stereocan 200 (Cambridge Instrument) utilizando uma voltagem de trabalho de 15 a 25KV.

2.4 - Técnicas imunológicas

2.4.1 - Produção, purificação e caracterização dos anticorpos policlonais utilizados nos ensaios de imunomarcacão.

Os anticorpos primários utilizados nos ensaios de imunomarcacão e nos trabalhos de imunocaptura, contra *A. diazotrophicus* (estirpes PAL 3 e PAL 5), *H. rubrisubalbicans* (estirpe M4) e *H. seropedicae* (estirpe Z67), foram produzidos nos laboratórios da *Embrapa Agrobiologia*, e assim como o processo de produçã, as etapas de purificação e caracterização deste material foram previamente concluídas de acordo com REIS et al. (1997).

2.4.2 - Imunomarcacão com partículas de ouro para microscopia ótica :

Seções semi-finas(0,7-1 µm) obtidas no ultramicrotomo foram colocadas em uma gota de água sobre lâminas para microscopia cobertas com solução de gelatina 1% em água e fixadas a temperatura em torno de 40 °C . As lâminas contendo os cortes foram então colocadas em câmara úmida, sendo cobertas por solução de bloqueio IGL (soro albumina bovina BSA - 10g.l⁻¹; tween 20 - 1g.l⁻¹ ; diluídos em PBS) por 1 hora a temperatura ambiente (de 20 - 25 °C). Em seguida, após rápida lavagem em água destilada, foi aplicado o antisoro primário, produzido contra *A. diazotrophicus* (estirpe PAL 5), diluído 1:400 e o material foi incubado em câmara úmida por 2 horas a temperatura ambiente. As seções foram então cuidadosamente lavadas em solução IGL por três vezes deixando-se cada seção coberta com a solução por 5 min. Após esta etapa fez-se uma lavagem com água destilada e secaram-se as lâminas com papel absorvente. Em seguida, foram aplicados 40-50 µl de anticorpo secundário conjugado com partículas de ouro de 5 nm, diluído 1:100 em solução IGL por um período de 2 horas a temperatura ambiente sob câmara úmida. Decorrido este período as lâminas foram novamente lavadas, como já citado anteriormente, e postas para secar encerrando assim o processo de imunomarcacão. Para visualização ao microscópio ótico, marcou-se as

partículas de ouro com prata utilizando o “kit Intense SE BL Silver Enhancement” (Laboratory Janssen Life Sciences Products). Resumidamente, o método consistiu na mistura 1:1 do inibidor e estimulador, colocando-se então 45 µl da mistura sobre as seções em lâminas. A reação de deposição de prata coloidal sobre as partículas de ouro foi monitorada ao microscópio ótico utilizando a lente objetiva de 40 aumentos, e o tempo ideal de deposição específica ficou em torno de 9 a 10 minutos a temperatura ambiente. Decorrido este período, as lâminas foram imediatamente lavadas como descrito anteriormente, secas e coradas com uma solução 0,01% de azul de toluidina, sendo então observadas ao microscópio ótico. A reação foi visualizada pela deposição de um precipitado preto opaco ao redor das partículas de ouro conjugadas ao anticorpo secundário. Foram utilizados dois tipos de controle para o ensaio de imunomarcação com ouro e revelação a base de prata. O primeiro controle com lâminas contendo seções similares aos tratamentos testes nas quais foi aplicada solução de bloqueio (controle IGL) em substituição ao anticorpo primário, e o segundo controle consistiu na aplicação do soro do coelho antes da imunização com estirpes de *A. diazotrophicus* (controle pré-imune).

2.4.3 - Imunomarcação com partículas de ouro para microscopia eletrônica de transmissão (MET):

Seções semi-finas foram selecionadas e preparadas para MET, sendo processadas de acordo com método descrito anteriormente. Desse modo, seções ultrafinas (70-80 nm) foram recolhidas em grades hexagonais de níquel de 200 mesh cobertos com filme piroxilina para imunomarcação com ouro e postas para secar em placa de petri sobre papel de filtro. Todas as etapas seguintes foram conduzidas utilizando como suporte uma tira de “Parafilm M” (American company) e uma pinça anti-magnética fina para manipulação das grades. A etapa inicial, isto é, o bloqueio das reações inespecíficas, consistiu em flutuar a grade com a face contendo o corte sobre a superfície de uma gota (50 µl) de solução de bloqueio IGL (composição citada acima) por um período de 1 hora. Em seguida as grades

foram incubadas a temperatura ambiente (de 20 - 25 °C) em uma gota (50 µl) de anticorpo primário, produzido contra *A. diazotrophicus* (estirpe PAL 5), diluído 1:400 em solução IGL por um período de 2 horas e lavadas cuidadosamente por 30 segundos em água destilada estéril utilizando uma pisseta. Após a lavagem, as grades foram imersas em uma gota (40-50 µl) de anticorpo secundário diluído 1:100 em solução IGL por um período de 2 horas a temperatura ambiente. Ao fim desse processo, as grades foram lavadas em água destilada estéril com pisseta e totalmente imersas em uma gota de IGL. Repetido este procedimento por três vezes dentro de um período de 5 minutos, as grades foram postas à secar sobre papel de filtro e contrastadas com acetato de uranila sol. 5% e citrato de chumbo sol. 0,2% por 2 minutos, estando prontas para observação ao microscópio eletrônico de transmissão. A reação é visualizada ao MET pela deposição de pontos negros (partículas de ouro) em regiões da seção que expõem os determinantes antigênicos para o qual o soro foi produzido. Foram utilizados dois tipos de controle para o ensaio de imunomarcacão com ouro, o primeiro controle com grades contendo seções similares aos tratamentos testes nas quais foi aplicada solução de bloqueio (controle IGL) em substituição ao anticorpo primário e o segundo controle consistiu na aplicação do soro do coelho antes da imunização com estirpes de *A. diazotrophicus* (controle pré-imune).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 - Ocorrência de bactérias diazotróficas em plantas de cana-de-açúcar oriundas da técnica de micropropagação.

1.1. 1º Coleta

As plântulas de cana-de-açúcar produzidas pela Copersucar através do sistema de cultivo de meristemas, quando ainda presentes no sistema “*in vitro*” , não apresentaram em seu interior nenhuma das bactérias avaliadas (Tabela 1).

Nas fases posteriores, que consistem no plantio de mudas em substrato (aclimatação) e enviveiramento de mudas no campo, foi possível observar a presença de bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* (Tabela 1). Enquanto *Azospirillum* spp. (*A. lipoferum* e *A. brasilense*) foram isolados tanto de amostras de raízes como de amostras da base do colmo, a espécie *A. amazonense* apresentou-se mais restrito as raízes, sendo isolado em apenas uma das amostras de base do colmo.

A facilidade de encontrarmos bactérias do gênero *Azospirillum* associadas a estas plantas pode ser explicada quando observamos algumas características destes microrganismos. Além de serem comumente encontradas em associação com plantas de cana-de-açúcar (BALDANI et al., 1997), em uma recente revisão sobre estas bactérias, BASHAM & HOLGUIM (1997) relatam que estirpes de *Azospirillum* geralmente não apresentam preferência por plantas com as quais irão se associar, e podem facilmente associar-se a plantas que não possuam

relatos da presença de *Azospirillum* em suas raízes, mostrando que *Azospirillum* coloniza raízes de plantas de uma maneira geral e não é uma bactéria que associa-se especificamente a uma planta. Desta maneira estas bactérias podem permanecer no campo, em associação com outras plantas, podendo formar associação com a cultura da cana-de-açúcar quando esta for introduzida nestas áreas. Alguns trabalhos também demonstram que estas bactérias podem apresentar uma alta capacidade de sobrevivência no solo (BASHAN & LEVANOY, 1990), outra característica ecológica importante. Pode-se então concluir que diferentemente das bactérias *Herbaspirillum* spp. e *A. diazotrophicus* (OLIVARES et al., 1996; REIS et al., 1994) que apresentam características de especificidade planta/bactéria e baixa sobrevivência no solo, a presença de bactérias do gênero *Azospirillum* associadas a plantas de maneira geral, a sua capacidade de sobrevivência no solo, aliadas ainda a possibilidade de transmissão via correntes de ar (BASHAN, 1991), torna comum a presença destas bactérias em plantas que originalmente estavam livres de microrganismos.

Ainda na tabela 1 pode-se observar a presença de bactérias do gênero *Azospirillum* em amostras de solo coletadas entre as linhas de plantas de cana-de-açúcar micropropagadas. Como já foi mencionado acima estas bactérias possuem uma boa persistência no solo (BASHAN & LEVANOY, 1990) e seu isolamento neste tipo de amostra é bastante comum. Já em amostras de composto não obteve-se isolados de nenhuma das bactérias estudadas.

O não isolamento de bactérias *A. diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. nas amostras da primeira coleta mostram que a ocorrência destas bactérias nestes materiais pode ser mais restrita. Fatores como o limite de detecção do método de isolamento utilizado, e o período entre a coleta das amostras e os trabalhos de isolamento em laboratório ($\pm$ 5 dias), podem ter influenciado na detecção destas bactérias.

Tabela 1: Avaliação da presença de bactérias diazotróficas em plantas de cana-de-açúcar oriundas de cultivo de meristemas, e diferentes tipos de substrato coletados no campo experimental do Centro Tecnológico da Copersucar (Piracicaba – SP)

Amostra	Parte da planta	<i>Azospirillum</i> spp.	<i>Azospirillum amazonense</i>	<i>Herbaspirillum</i> spp.	<i>A. diazotrophicus</i>
Cultivo “in vitro” - 10 amostras (meio MS)	plântula inteira	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SP 80-180 em fase de aclimação	Raízes	+	+	n.d.	n.d.
	Colmo	+	+	n.d.	n.d.
SP 80-4445 em fase de aclimação	Raízes	+	+	n.d.	n.d.
	Colmo	+	n.d.	n.d.	n.d.
SP 80-1520 em fase de aclimação	Raízes	+	+	n.d.	n.d.
	Colmo	+	n.d.	n.d.	n.d.
SP 83-5073 com três meses no campo	Raízes	+	+	n.d.	n.d.
	Colmo	+	n.d.	n.d.	n.d.
SP 80-180 com três meses no campo	Raízes	+	+	n.d.	n.d.
	Colmo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Solo do canavial	_____	+	n.d.	n.d.	n.d.
Solo do canavial	_____	+	+	n.d.	n.d.
(varied. SP 85-5073)					
Solo do canavial	_____	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
(varied. SP 80-185)					
Composto	_____	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Composto fumigado	_____	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

* n.d. - não detectado: A bactéria não está presente ou se encontra abaixo do limite de detecção do método.

Colmo = base do colmo

1.2. 2º Coleta

Como na primeira coleta, não foi possível obter qualquer isolado de plântulas ainda presentes no sistema “in vitro”, comprovando a eficiência do método na eliminação destes microrganismos (Tabela 2)

Na tabela 2 destaca-se a presença de bactérias do gênero *Herbaspirillum* em uma das amostras de planta micropropagada em condições de campo e na amostra de uma planta produzida via semente reprodutiva. Apesar de não apresentar um espectro de hospedeiros tão amplo quanto as bactérias do gênero *Azospirillum*, *Herbaspirillum* spp. (principalmente *H. seropedicae*) é encontrado em diversas plantas, principalmente da família das gramíneas (OLIVARES et al., 1996), tornando possível sua permanência no campo em associação com estas plantas e posterior infecção das plantas de cana-de-açúcar micropropagadas em condições de campo. KIMURA (1981), cita que a capacidade de persistência de bactérias em outras plantas hospedeiras e principalmente não hospedeiras pode ser um componente importante para a disseminação e estabelecimento endofítico das bactérias. Outra característica das bactérias do gênero *Herbaspirillum* que poderia explicar a sua presença em plantas micropropagadas no campo é que apesar de apresentar baixa capacidade de persistência no solo, estas bactérias podem, nesta situação, apresentar um mecanismo de sobrevivência descrito como “estágio viável porém não culturável” (OLIVARES et al., 1996). De acordo com ROSZAK & COLEWELL (1987), o mecanismo de viabilidade e não culturabilidade, caracteriza-se como um desvio no metabolismo natural da bactéria e surge em função dos estresses que ocorrem no solo. A célula bacteriana permanece intacta e viável, mas não sofre divisão celular em meios de cultura comumente empregados. Desse modo com a introdução da planta hospedeira haveria um estímulo específico para a multiplicação das bactérias.

Já a presença de *Herbaspirillum* em plantas propagadas via semente é melhor explicada pela possibilidade destas bactérias estarem presentes nas

sementes. DÖBEREINER & BALDANI (1995) citam a possibilidade destas bactérias serem transmitidas através das sementes. BALDANI (1996) apresenta relatos da presença de *Herbaspirillum seropedicae* em sementes de arroz, o que deixa claro a possibilidade da presença destas bactérias em sementes de plantas hospedeiras.

Pode-se observar ainda a presença de bactérias *Azospirillum* spp. em amostras do substrato utilizado para aclimação das plantas (não esterilizado), e como também observado na primeira coleta, nas raízes e colmos de plantas micropropagadas em fase de aclimação. Mais uma vez, a comprovada capacidade de persistência no solo mostrada por bactérias *Azospirillum* spp., pode explicar a presença destas bactérias nestas amostras, já que o solo é um dos componentes do substrato utilizado na Copersucar para a aclimação das plantas. A característica das bactérias *Azospirillum* spp. de apresentarem a possibilidade de serem transmitidas via correntes de ar (BASHAN, 1991), também é um fator que pode contribuir para a presença destas bactérias nestas amostras.

Como na primeira coleta, *A. diazotrophicus* não foi detectado em nenhuma das amostras.

Tabela 2: Avaliação da presença de bactérias diazotróficas em plantas de cana-de-açúcar oriundas de cultivo de meristemas, plantas propagadas por semente, e em diferentes tipos de substrato coletados no campo experimental do Centro Tecnológico da Copersucar (Piracicaba – SP)

Amostra	Parte da planta	<i>Azospirillum</i> spp.	<i>Azospirillum amazonense</i>	<i>Herbaspirillum</i> spp.	<i>A. diazotrophicus</i>
Cultivo “in vitro” – 10 amostras (meio MS)	plântula inteira	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Micropropagada em fase de aclimação	Raízes	+	n.d.	n.d.	n.d.
	Colmo	+	n.d.	n.d.	n.d.
Planta com 4 meses no campo	Raízes	+	n.d.	+	n.d.
	Colmo	+	n.d.	n.d.	n.d.
Planta com 10 meses no campo	Colmo	+	n.d.	n.d.	n.d.
Planta propagada por semente	Raízes	+	+	n.d.	n.d.
	Colmo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Planta propagada por semente	Raízes	n.d.	n.d.	+	n.d.
	Colmo	n.d.	n.d.		n.d.
Substrato utilizado na aclimação	_____	+	n.d.	n.d.	n.d.
Substrato esterilizado	_____	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

* n.d. - não detectado: A bactéria não está presente ou se encontra abaixo do limite de detecção do método.

Colmo = base do colmo

1.3. 3º Coleta

Os resultados apresentados na tabela 3 mostram novamente a já discutida presença de bactérias *Azospirillum* spp. e *Herbaspirillum* spp. em algumas amostras de plantas oriundas da técnica de cultivo de meristemas, desta vez coletadas em Usinas produtoras de açúcar e álcool do estado de São Paulo. Como demonstrado nas coletas anteriores, *A. brasilense* e *A. lipoferum* estão presentes em raízes e colmo, enquanto *A. amazonense* fica mais restrito as raízes. A presença de *Herbaspirillum* spp. também parece ser mais restrita nestas plantas quando comparada com *Azospirillum* spp. Também não foram detectadas bactérias da espécie *A. diazotrophicus* nas amostras da terceira coleta.

Tabela 3: Avaliação da presença de bactérias diazotróficas em plantas de cana-de-açúcar oriundas de cultivo de meristemas coletadas em três usinas localizadas em diferentes cidades do interior do estado de São Paulo

Amostra	Parte da planta	<i>Azospirillum</i> spp.	<i>Azospirillum amazonense</i>	<i>Herbaspirillum</i> spp.	<i>A. diazotrophicus</i>
SP 80-1816 com 12 meses no campo (Ribeirão Preto)	Raízes	+	n.d.	+	n.d.
	Colmo	+	n.d.	n.d.	n.d.
SP 80-1836 com 8 meses no campo (Ribeirão Preto)	Raízes	+	+	+	n.d.
	Colmo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SP 77-5181 com 22 meses no campo (Ribeirão Preto)	Raízes	+	+	n.d.	n.d.
	Colmo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SP 80-1842 com 5 meses no campo (Pirassununga)	Raízes	+	+	n.d.	n.d.
	Colmo	+	n.d.	n.d.	n.d.
SP 80-1816 com 7 meses no campo (Pirassununga)	Raízes	+	+	n.d.	n.d.
	Colmo	+	n.d.	n.d.	n.d.
SP 79-1011 com 42 meses no campo (Pirassununga)	Raízes	+	+	n.d.	n.d.
	Colmo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RB 85-5563 com 12 meses no campo (Araras)	Raízes	+	+	+	n.d.
	Colmo	n.d.	n.d.	+	n.d.
SP 80-1842 com 18 meses no campo (Araras)	Colmo	+	n.d.	n.d.	n.d.

* n.d. - não detectado: A bactéria não está presente ou se encontra abaixo do limite de detecção do método.

Colmo = base do colmo

1.4. 4º Coleta (Utilização de toletes pré-germinados como alternativa para isolamento de *A. diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp.)

A não detecção de *A. diazotrophicus* nas coletas anteriores fez com que se buscasse novas alternativas para um isolamento mais eficiente desta bactéria.

Nesta coleta as amostras foram divididas de modo que uma das partes fosse diretamente processada para o isolamento de *Herbaspirillum* spp. e *A. diazotrophicus*, enquanto outra parte das amostras foi pré-germinada para posterior avaliação da presença destas bactérias em tais amostras. Deste modo, foi possível uma comparação da frequência de isolamento destas bactérias em amostras vindas diretamente do campo, e em amostras que foram pré-germinadas para só então sofrerem as etapas de isolamento.

Os resultados da tabela 4 mostram que foi possível obter isolados de *A. diazotrophicus* em plantas oriundas da técnica de micropropagação, sendo estes isolados obtidos tanto com plantas vindas diretamente do campo, quanto com a pré-germinação destas. A presença natural desta bactéria em plantas produzidas via cultura de tecidos, fez com que fossem formuladas hipóteses da possibilidade de infecção destes organismos em plantas com as quais estes não estavam associados originalmente. Até o momento, a disseminação desta bactéria via toletes, que servem como fonte propagativa da cultura da cana-de-açúcar, era a forma de disseminação aparentemente mais óbvia. No entanto, com a utilização de mudas obtidas pela micropropagação, e portanto, sem esta bactéria no seu interior, esta forma de disseminação não pode explicar a presença de *A. diazotrophicus* nestas plantas.

A presença confirmada da bactéria *A. diazotrophicus* em restos culturais, como o palhiço por exemplo (REIS, 1991), deixa indícios de que a bactéria pode permanecer no campo sem a planta, em materiais como estes. Também não deve ser descartada a possibilidade, de assim como *Herbaspirillum* spp. (OLIVARES et

al., 1996), *Acetobacter diazotrophicus* possa vir a permanecer no solo em estado “viável não cultivável”, portanto, estes fatores também devem ser pensados quando discutimos sobre a infecção das plantas micropropagadas por essas bactérias.

Outra possibilidade da infecção de *A. diazotrophicus* em plantas micropropagadas surgiu com o isolamento desta bactéria em amostras da espécie de cochonilha, *Saccharococcus sacchari* (ASHBOLT & INKERMANN, 1990; CABALLERO-MELLADO & MARTINEZ-ROMERO, 1994). Estes insetos alimentam-se no tecido entre o colmo e a bainha das folhas, assim como as cigarrinhas (*Perkinsiella saccharicida* Kirk), de onde bactérias *Acetobacter* spp. também foram isoladas. O fato de se encontrar *Acetobacter* no interior destes insetos é uma evidência circunstancial de que estes possam estar envolvidos na transferência destas bactérias de uma planta para outra (DÖBEREINER et al., 1995b; ASHBOLT & INKERMANN, 1990; CABALLERO-MELLADO & MARTINEZ-ROMERO, 1994). Na verdade, as altas concentrações de açúcar, assim como o baixo pH encontrados no interior destes insetos, parece fornecer um ambiente propício para a sobrevivência destas bactérias por um período prolongado fora da planta hospedeira, aumentando assim o potencial destes insetos como vetores destas bactérias (PURCELL, 1989; BARBEHENN & PURCELL, 1993).

Finalmente podemos também sugerir que a infecção destas plantas com *A. diazotrophicus*, poderia se dar através de fungos micorrízicos. Estudos citoquímicos da ultraestrutura do fungo *Glomus clarum* mostraram acumulação de lipídios e açúcares nas estruturas intramatriciais (GIANINAZZI et al., 1983; JABAGI-HARE et al. 1990), formando um ambiente que poderia favorecer o crescimento microbiano. A ocorrência de bactérias na superfície ou mesmo no citoplasma de esporos de fungos micorrízicos já foi relatada (VARMA et al., 1981). BIANCIOTTO et al. (1996) mostraram que o citoplasma do fungo micorrízico arbuscular *Gigaspora margarita* contém bactérias como endossimbiontes, e observações morfológicas, com a utilização de marcadores fluorescentes,

revelaram um número de aproximadamente 250.000 bactérias vivas no interior de cada esporo. A presença de bactérias diazotróficas dentre estas bactérias que colonizam o interior dos esporos também já foi citada. TILAK et al. (1989) foi capaz de isolar bactérias do gênero *Azospirillum* a partir de esporos esterilizados superficialmente, de cinco espécies de fungos micorrízicos. PAULA et al. (1991) demonstraram que *A. diazotrophicus* pode também estar presente no interior dos esporos de fungos micorrízicos e que a bactéria inoculada nas plantas em conjunto com fungos micorrízicos, permaneceu viável por mais de dois meses nos esporos de *Glomus clarum* estocados a 4 °C. PAULA et al. (1993) relatam ainda a presença de *A. diazotrophicus* em esporos, lavados e desinfestados superficialmente, de *G. clarum*, *Acaulospora* sp. e *Gigaspora gigantea* coletados no campo em cultura de batata doce não inoculada com esta bactéria. No trabalho de PAULA et al. (1991), é relatada a eficiência dos fungos micorrízicos na introdução de *A. diazotrophicus* inoculado em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar.

Outro detalhe relevante observado na tabela 4 é a eficiência de isolamento de *A. diazotrophicus* em amostras de plantas que foram pré-germinadas. Como pode ser observado, a pré-germinação dos toletes mostrou-se uma alternativa bastante eficiente para facilitar o isolamento destas bactérias. De forma geral, os isolados provenientes de amostras vindas direto do campo possibilitaram a detecção da bactéria em apenas 3 das 24 amostras coletadas (13%), enquanto que este número de isolados subiu para 13 (54%) quando utilizaram-se amostras das mesmas plantas pré-germinadas.

Devido a distância entre os locais de amostragem e o laboratório onde foram feitos os trabalhos de isolamento, as amostras permaneciam em câmara fria por volta de 5 dias. Este intervalo entre o dia da coleta do material e sua utilização no laboratório, pode ter representado um efeito negativo no isolamento destas bactérias. Portanto, a pré-germinação das amostras para posterior isolamento das

bactérias possivelmente elimina este problema, estimulando a multiplicação das bactérias.

Estes resultados mostram que existe uma condição propícia para o estímulo populacional de *A. diazotrophicus* na fase de germinação dos toletes de cana-de-açúcar. O fato de que toletes em processo de germinação exibem elevada atividade de redução de acetileno (ARA) (RUSCHEL et al., 1977), ou seja, elevada atividade da nitrogenase, reforça a hipótese de que o número de bactérias neste estágio de desenvolvimento da cultura possa ser maior. Toletes oriundos de plantas no campo, testados imediatamente após o corte, não exibiam ARA, porém, se colocados para germinar em substrato estéril, desenvolviam parte aérea e raízes adventícias a partir da região nodal, passando a exibir elevada atividade da nitrogenase.

A tabela 5 mostra que o processo de pré-germinação também foi eficiente para o isolamento de *Herbaspirillum* spp., enquanto que em amostras vindas direto do campo conseguiu-se apenas 4 isolados (17%), em amostras pré-germinadas o número de isolados subiu para 11 (46%). Os resultados apresentados nas tabelas 4 e 5 assim como o trabalho de RUSCHEL et al. (1977) demonstram a importância das alterações anatofisiológicas sofridas pela planta sobre a dinâmica populacional e as taxas de FBN encontradas na cultura.

Tabela 4: Máxima diluição de onde foi isolada a bactéria *A. diazotrophicus* em plantas adultas e pré-germinadas de diferentes variedades de cana-de-açúcar oriundas de cultivo tradicional ou cultura de tecidos

Variedades	Usinas	Partes da planta	Origem das plantas			
			cultivo tradicional		cultura de tecidos	
			pré-germinadas	direto do campo	pré-germinadas	direto do campo
			máxima diluição de isolamento			
SP 80-3280	1	Raiz	10 ⁻⁵	N.D	N.D	N.D
		Parte aérea	N.D	N.D	N.D	N.D
SP 80-1842	1	Raiz	N.D	N.D	N.D	N.D
		Parte aérea	N.D	N.D	N.D	N.D
SP 80-4445	1	Raiz	10 ⁻³	N.D	10 ⁻³	N.D
		Parte aérea	N.D	N.D	10 ⁻³	N.D
SP 80-1816	2	Raiz	10 ⁻⁷	N.D	10 ⁻³	10 ⁻³
		Parte aérea	10 ⁻³	N.D	N.D	N.D
SP 80-1842	2	Raiz	10 ⁻³	N.D	N.D	10 ⁻³
		Parte aérea	10 ⁻³	N.D	N.D	N.D
RB 85-5563	2	Raiz	10 ⁻⁵	N.D	10 ⁻⁵	N.D
		Parte aérea	10 ⁻³	N.D	10 ⁻³	10 ⁻³

Tabela 5: Máxima diluição de onde foi isolada a bactéria *Herbaspirillum* spp. em plantas adultas e pré-germinadas de diferentes variedades de cana-de-açúcar oriundas de cultivo tradicional ou cultura de tecidos

Variedades	Usinas	Partes da planta	Origem das plantas			
			cultivo tradicional		cultura de tecidos	
			pré-germinadas	direto do campo	pré-germinadas	direto do campo
			máxima diluição de isolamento			
SP 80-3280	1	Raiz	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻⁴	N.D.
		Parte aérea	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻⁴	N.D.
SP 80-1842	1	Raiz	10 ⁻³	N.D.	10 ⁻⁴	N.D.
		Parte aérea	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
SP 80-4445	1	Raiz	N.D.	N.D.	N.D.	10 ⁻³
		Parte aérea	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
SP 80-1816	2	Raiz	10 ⁻³	10 ⁻³	N.D.	N.D.
		Parte aérea	10 ⁻³	N.D.	N.D.	N.D.
SP 80-1842	2	Raiz	N.D.	N.D.	10 ⁻⁴	N.D.
		Parte aérea	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
RB 85-5563	2	Raiz	10 ⁻³	N.D.	10 ⁻⁴	N.D.
		Parte aérea	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

1. Usina São José - Pirassununga (SP). 2. Usina São João - Araras (SP). N.D. Não detectado . Os dados são médias de duas repetições.

2 - Utilização da técnica de Imunocaptura para isolamento de *A. diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp.

2.1. 1º Coleta

Nesta primeira coleta foi mostrado que a metodologia empregada permitiu o isolamento, tanto de *Herbaspirillum* spp. quanto de *A. diazotrophicus*. A tabela 6 mostra que com a utilização de soros policlonais produzidos contra *Herbaspirillum* spp. e *A. diazotrophicus*, foi possível o isolamento destas bactérias nas amostras de raízes das duas plantas, enquanto que, em amostras de colmo, conseguiu-se apenas 1 isolado de *Herbaspirillum* proveniente da amostra 2 com a utilização do soro produzido contra *H. seropedicae*.

Tabela 6: Isolamento de *Herbaspirillum* spp. e *A. diazotrophicus* de duas amostras de plantas de cana-de-açúcar da variedade SP 70-1143 utilizando-se a metodologia de imunocaptura

Anticorpos específicos utilizados	Amostra 1		Amostra 2	
	Raízes	Colmo	Raízes	Colmo
M4 (<i>H. rubrisubalbicans</i>)	+	-	+	-
Z67 (<i>H. seropedicae</i>)	+	+	-	-
PAL 3 (<i>A. diazotrophicus</i>)	+	-	+	-

2.2. 2º Coleta

Nesta coleta, as mesmas amostras foram trituradas em solução salina e então divididas para dar seguimento as etapas de isolamento tradicional e

imunocaptura. A tabela 7 mostra que a metodologia de imunocaptura foi bem mais eficiente que a metodologia tradicional para o isolamento de *A. diazotrophicus*. Enquanto que, com a utilização da técnica imunológica, obteve-se isolados de três das quatro amostras avaliadas, com o uso do método tradicional não foi possível a obtenção de nenhum isolado. Também para *Herbaspirillum*, com a imunocaptura, o isolamento foi possível em três das quatro amostras avaliadas. Utilizando-se a metodologia tradicional para isolamento de *Herbaspirillum* spp., também foram obtidos isolados de bactérias diazotróficas de três das quatro amostras avaliadas, porém somente em uma das amostras estas bactérias eram *Herbaspirillum*, sendo as bactérias isoladas nas outras duas amostras pertencentes ao gênero *Azospirillum* (*A. lipoferum* ou *A. brasilense*).

É provável que as etapas posteriores à trituração, sofridas pelas amostras para imunocaptura (adição de PEG e resina, filtração e centrifugação), tenham também influenciado na efetividade da metodologia, porém ao comparar-mos o isolamento de *Herbaspirillum* com a utilização dos dois métodos, podemos concluir que não apenas o processo de extração como também um enriquecimento altamente seletivo proporcionado pela utilização de anticorpos policlonais específicos são os responsáveis pelo sucesso da imunocaptura. MAVINGUI et al. (1990) já haviam verificado a eficiência desta metodologia para o isolamento da bactéria diazotrófica anaeróbia *Bacillus polymyxa*. Estes autores observaram que em amostras de solo, a utilização da metodologia de imunocaptura para isolamento deste microrganismo era 100 vezes mais eficiente que a metodologia tradicional. Já para amostras da região da rizosfera de plantas de trigo, a imunocaptura foi apenas 10 vezes mais eficiente que a metodologia tradicional. Os autores sugerem que a eficiência de isolamento em amostras da rizosfera pode ter sido prejudicada pela alta diluição de *B. polymyxa* em relação a várias bactérias de crescimento rápido presentes na região da rizosfera destas plantas de trigo. Para as bactérias diazotróficas presentes na cultura da cana-de-açúcar, foram utilizados os meios

semi-sólidos, semi-específicos, sem N, que podem diminuir este tipo de problema encontrado por estes autores, e melhorar ainda mais a eficiência do método.

Tabela 7: Isolamento de *Herbaspirillum* spp. e *A. diazotrophicus* de quatro amostras de raízes de plantas de cana-de-açúcar da variedade SP 70-1143, com a utilização da metodologia de imunocaptura (I) e com metodologia tradicional (T) de isolamento

Anticorpos específicos utilizados	Raízes planta 1		Raízes planta 2		Raízes planta 3		Raízes planta 4	
	I	T	I	T	I	T	I	T
Z67 (<i>H. seropedicae</i>)	-	*	+	+	+	*	+	-
PAL 3 (<i>A. diazotrophicus</i>)	+	-	-	-	+	-	+	-

⊕ - Isolamento da bactéria alvo.

* - Isolamento de outra bactéria, que não a bactéria alvo.

- - Sem obtenção de isolados.

3 - Estudo dos processos de infecção e colonização de *A. diazotrophicus* inoculado em plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar com a utilização de técnicas de microscopia ótica e eletrônica

Danos ou feridas presentes nas superfícies das raízes, provavelmente provocados no processo de divisão das plântulas após a “fase 3” da micropropagação, mostraram que podem constituir-se em áreas de infecção para a bactéria *A. diazotrophicus* (figuras 1, 2 e 3). A verificação de que feridas poderiam servir como porta de entrada para *A. diazotrophicus* em plântulas de cana-de-açúcar já havia sido feita por JAMES et al. (1994), notando que grande número de

bactérias acumulava-se nas regiões de ruptura de células da epiderme. KLOEPPER et al. (1997), citam que feridas nas camadas da epiderme, ocasionadas naturalmente como resultado do crescimento da planta, são consideradas junto com as áreas de emergência de raízes laterais, como sendo as principais vias de entrada de bactérias endofíticas nos tecidos das plantas.

Como citado anteriormente, o local de emergência das raízes secundárias pode ser considerado como sendo um sítio de infecção destas bactérias. As raízes laterais normalmente tem origem no periciclo e crescem na direção do córtex da raiz parental, rompendo a camada de células da epiderme e proporcionando sua emergência. As cavidades formadas neste processo constituem sítios de infecção para muitas bactérias, incluindo bactérias diazotróficas como *Azospirillum* spp. (PATRIQUIN et al., 1983), *Azoarcus* sp. (REINHOLD & HUREK, 1988), *Herbaspirillum* spp. (OLIVARES, 1997) e o próprio *A. diazotrophicus* (JAMES et al., 1994). No presente estudo também foi mostrado células de *A. diazotrophicus* acumuladas nas regiões de emergência de raízes laterais (figuras 4, 5, 6 e 7). Os ferimentos provocados pelo crescimento de raízes laterais podem fazer com que ocorra uma ruptura momentânea da endoderme promovendo uma via apoplástica temporária entre o córtex e os vasos condutores (KLOEPPER et al., 1992), o que pode garantir a entrada das bactérias nestes tecidos.

Por fim a região meristemática da ponta das raízes também mostrou-se como possível via de acesso destas bactérias ao interior das plântulas (figuras 8, 9, 10 e 11). A bactéria localizou-se preferencialmente nas cavidades presentes entre a coifa e o tecido meristemático. Como proposto por SUMNER (1990), a penetração das bactérias via ponta das raízes provavelmente deve-se a possibilidade das células do meristema radicular não serem diferenciadas nem espessas o bastante para impedir a entrada da bactéria. Sendo um local de intenso crescimento, as células da epiderme e da estria de Caspari não foram suberizadas e os vasos ainda não foram diferenciados. Não foi observada nenhuma evidência da

colonização de pêlos radiculares por *A. diazotrophicus*, como também relatado por JAMES et al. (1994).

As observações ao microscópio eletrônico de varredura possibilitaram afirmar que as bactérias aderem-se a superfície das raízes por meio de ataque apolar em monocamada, e como também observado por JAMES et al. (1994) para *A. diazotrophicus*, esta adesão se dá aparentemente via uma substância mucoide, similar a relatada por LEVANOY et al. (1989) para *Azospirillum brasilense* e OLIVARES (1997) para *Herbaspirillum* spp.

Já no interior das raízes, *A. diazotrophicus* foi encontrado principalmente nos espaços intercelulares das células do córtex (figura 12). A presença da bactéria em células do tecido condutor (figura 14), confirma o que já havia sido demonstrado por JAMES et al. (1994), mostrando que estas células podem ser colonizadas pela bactéria, e que possivelmente atuem como um meio de transporte para as outras partes da planta, principalmente a parte aérea. Também de acordo com JAMES et al. (1994), as bactérias estavam envoltas por uma substância mucoide, que foi marcada com partículas de ouro através da técnica de imuno-ouro (figura 13). Os autores deste trabalho sugeriram que este muco contenha a maioria dos sítios antigênicos específicos para o antisoro utilizado. Provavelmente o muco contém exopolissacarídeos que já foram demonstrados para outras bactérias diazotróficas gram-negativas como sendo altamente imunogênicos (BREWIN et al., 1986; LEVANOY et al., 1989; SCHLOTER et al.; 1992).

Diferentemente do observado por JAMES et al., (1994), foi possível a localização da bactéria nos espaços intercelulares da base do colmo (figura 15). OLIVARES (1997) também demonstrou que aos sete dias após a inoculação, bactérias do gênero *Herbaspirillum* poderiam ser encontradas na base do colmo, colonizando células de parênquima associadas aos feixes vasculares. Este mesmo autor observou estas bactérias em seções do limbo foliar, da mesma forma como demonstrado na figura 16 para *A. diazotrophicus*. OLIVARES (1997) pressupõe

que a colonização do tecido foliar possa ter se dado via abertura estomática, o que é perfeitamente possível no sistema de inoculação utilizado, já que respingos contendo bactérias em suspensão podem depositar-se na superfície foliar.

Como descrito por OLIVARES (1997), este modelo de inoculação para estudos dos processos de infecção e colonização destas plântulas é sabidamente artificial. Porém, é verdade que do ponto de vista anatômico, o sistema radicular destas plântulas possui organização histológica similar a de tecidos meristemáticos de plantas em condições de campo, embora saiba-se que em meio líquido as células são mais frouxamente associadas (YU et al., 1969; VASSE et al., 1995). No entanto, VASSE (1995), fez um estudo comparativo do processo de infecção de raízes de tomate por diferentes estirpes de *P. solanacearum*, e adotou um modelo experimental de inoculação em meio MS líquido semelhante ao utilizado nesta tese. O autor descreveu que todos os eventos observados foram similares aos observados em outros sistemas, incluindo sistemas próximos das condições de cultivo do tomate. Este estudo também indica que esta possa ser uma alternativa de inoculação de *A. diazotrophicus* em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, tendo a vantagem de se poder selecionar as estirpes que serão inoculadas e que se estabelecerão nestas plantas monoxenicas.

FIGURA 1: Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura (FMEV) mostrando grande número de bactérias aderidas em uma região de ferimento na raiz, **barra = 10 mm**.

FIGURA 2: FMEV mostrando as bactérias acumuladas próximas a uma ferida da raiz e em seu interior, **barra = 15 mm**.

FIGURA 3: FMEV mostrando as bactérias no interior de uma ferida na raiz, **barra = 50 mm (zoom 8 x)**.

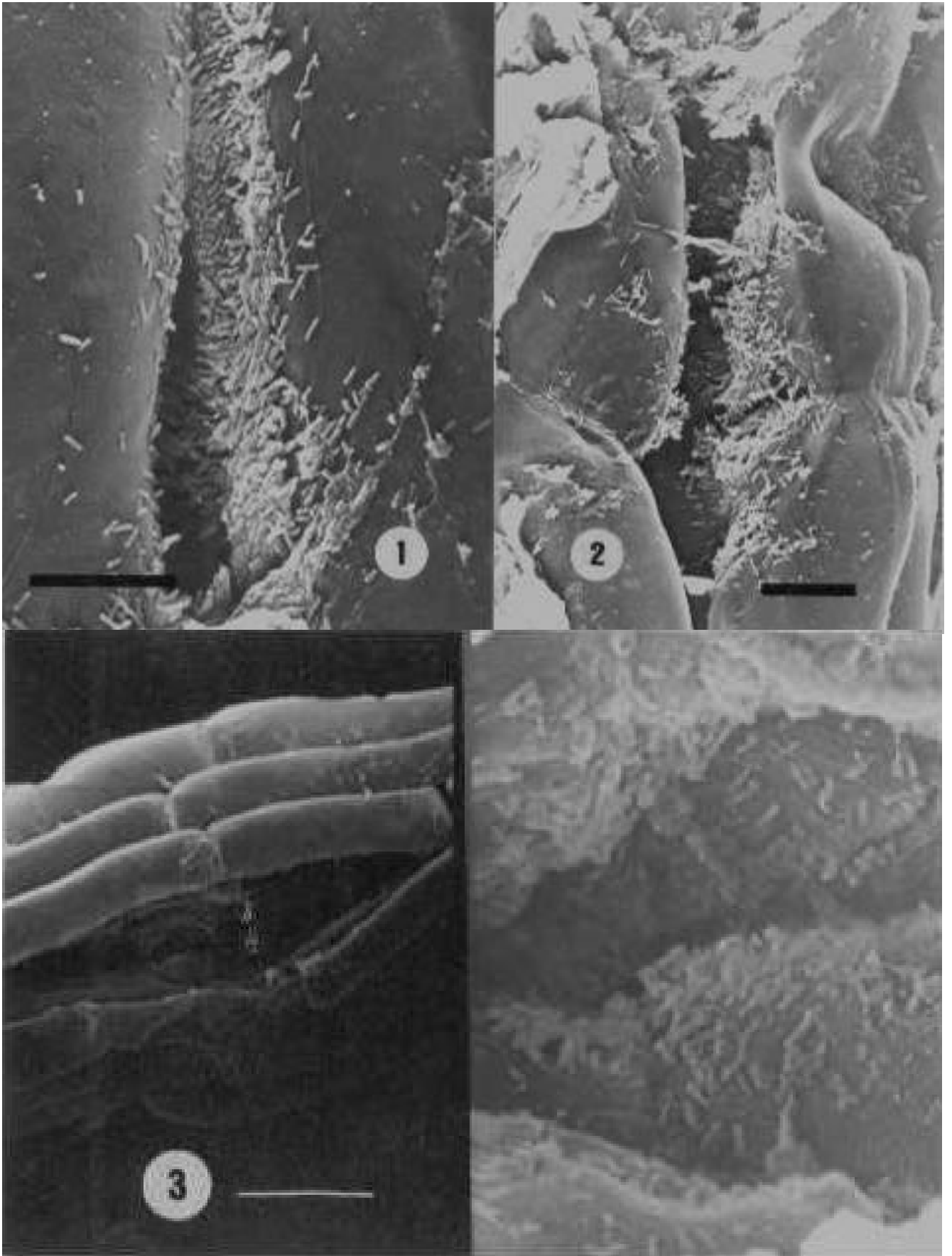


FIGURA 4: FMEV da colonização bacteriana em uma região de junção de raiz lateral, **barra = 65 mm (zoom 8 x)**.

FIGURA 5: FMEV do tecido danificado pela emergência de uma raiz secundária. É interessante notar a ausência de bactérias na parte não danificada da superfície radicular (setas), e a presença de muco e bactérias no tecido rompido da epiderme, **barra = 50 mm**.

FIGURA 6: Fotomicrografia de microscopia ótica (FMO) de seção transversal da região de emergência de uma raiz lateral. Observar as células bacterianas aderidas próximas ao local de emergência, **barra = 20 mm**.

FIGURA 7: Detalhe da figura anterior, **barra = 10 mm**.

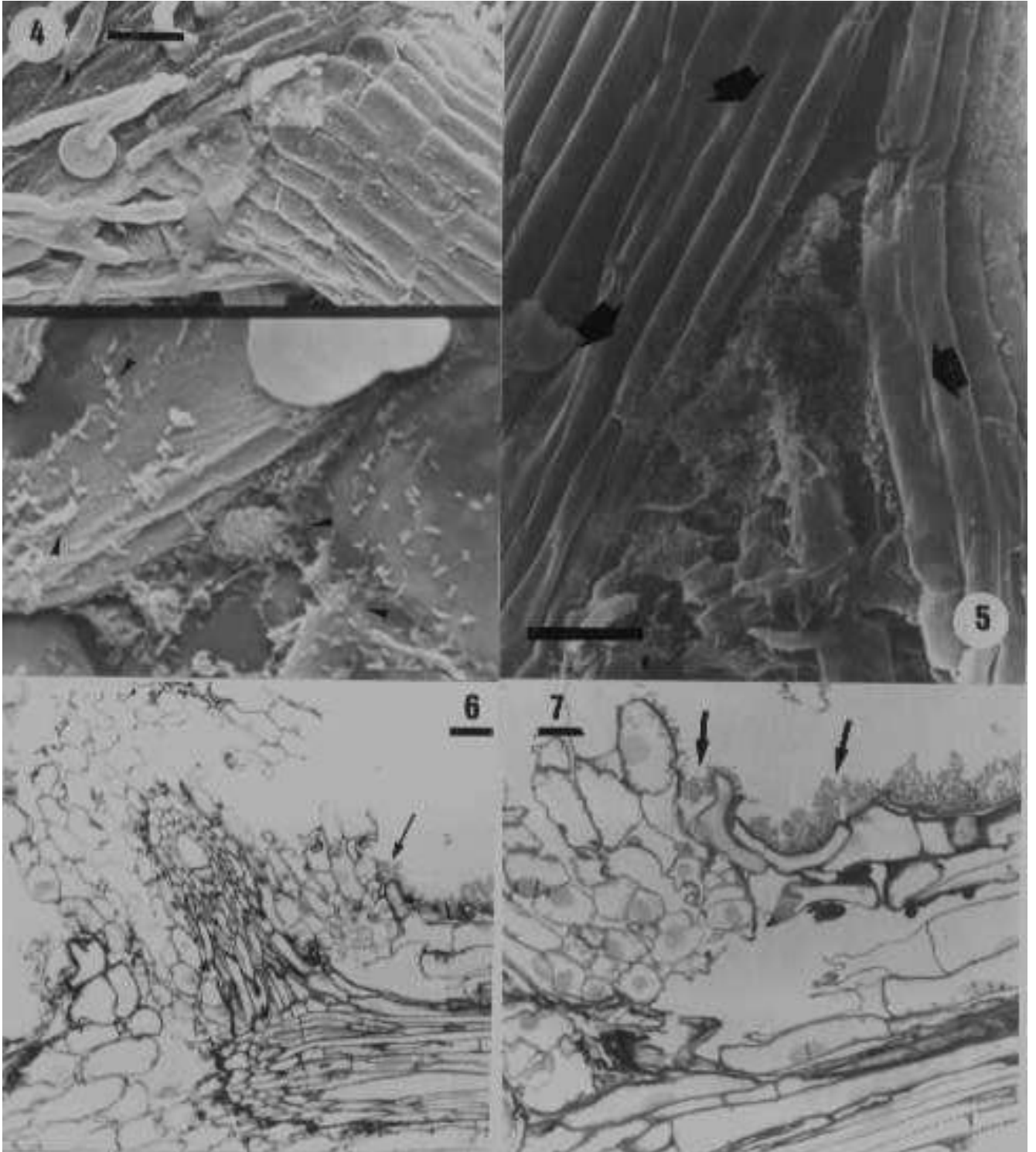


FIGURA 8: FMO de seção transversal da região meristemática das raízes mostrando as bactérias (setas) em cavidades na região entre a coifa e o tecido meristemático, **barra = 10 mm**.

FIGURA 9: FMO de seção transversal da região meristemática das raízes, incubada com anticorpos policlonais anti - *A. diazotrophicus* PAL 5, seguido de imunomarcação com ouro e precipitação com prata. Notar depósitos escuros indicando a acumulação de *A. diazotrophicus* em duas regiões distintas (setas grande e pequenas), **barra = 20 mm**.

FIGURA 10: Detalhe da figura 9 mostrando as bactérias acumuladas (seta) em cavidades na região entre a coifa e o tecido meristemático, **barra = 10 mm**.

FIGURA 11: Detalhe da figura 9 mostrando as bactérias no espaço intercelular próximo ao ápice da região meristemática, **barra = 10 mm**.

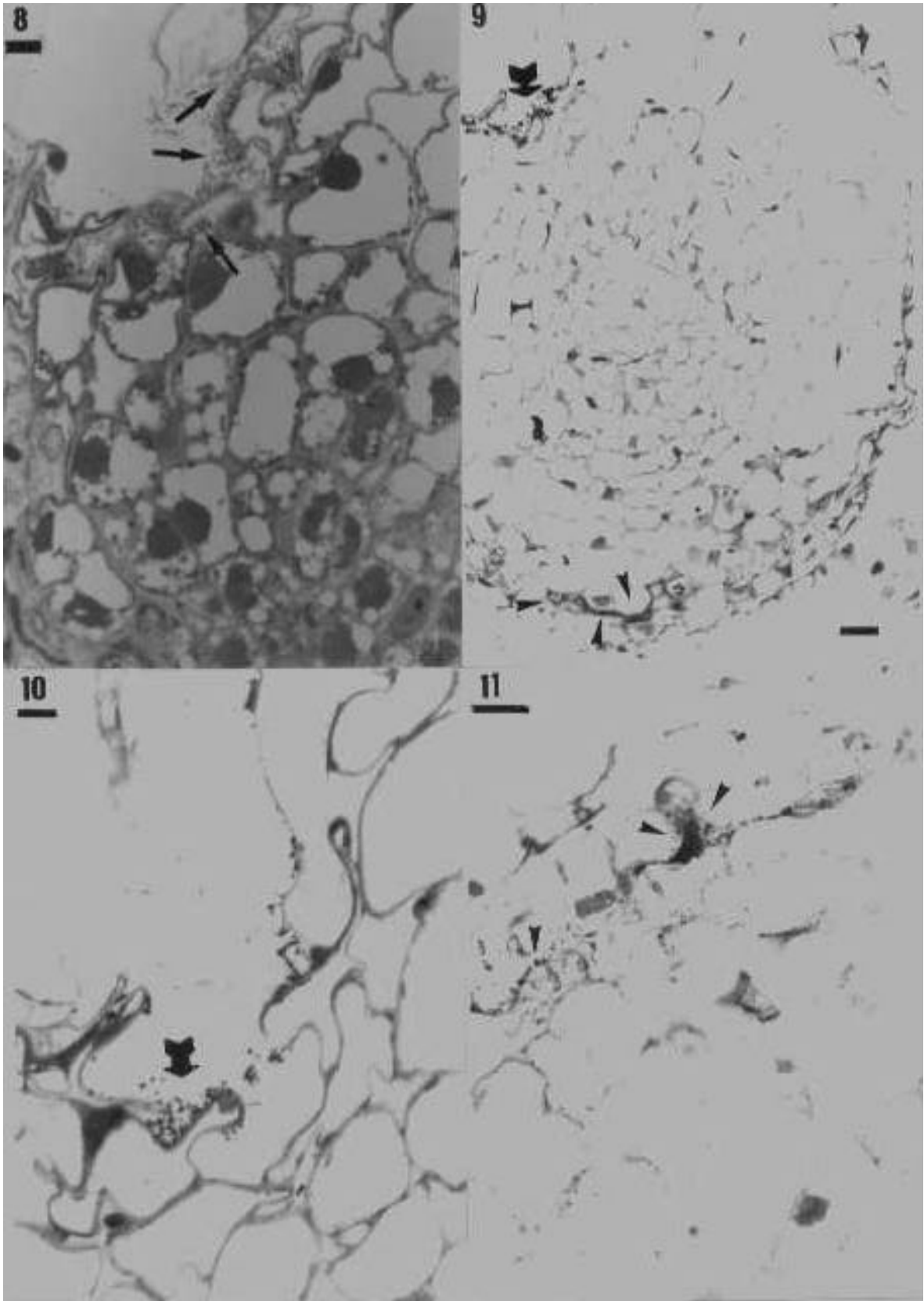


FIGURA 12: Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão (FMET) mostrando a colonização bacteriana no espaço intercelular das células do cortéx da raiz, **barra = 0,60 mm**.

FIGURA 13: Magnificação da FMET da figura 12 com as bactérias marcadas com ouro, após a incubação com anticorpos policlonais anti - *A. diazotrophicus* PAL 5. Note o material mucoide envolvendo a bactéria, reagindo com o anticorpo, **barra = 0,25 mm**.

FIGURA 14: FMO mostrando algumas células de *A. diazotrophicus* (setas pequenas) dentro do vaso xilemático, enquanto outras células (setas maiores) iniciam o processo de infecção, **barra = 10 mm**.

Aberviações: Parede celular (p); Bactéria (b); Espaço intercelular (ei); Xilema (x).

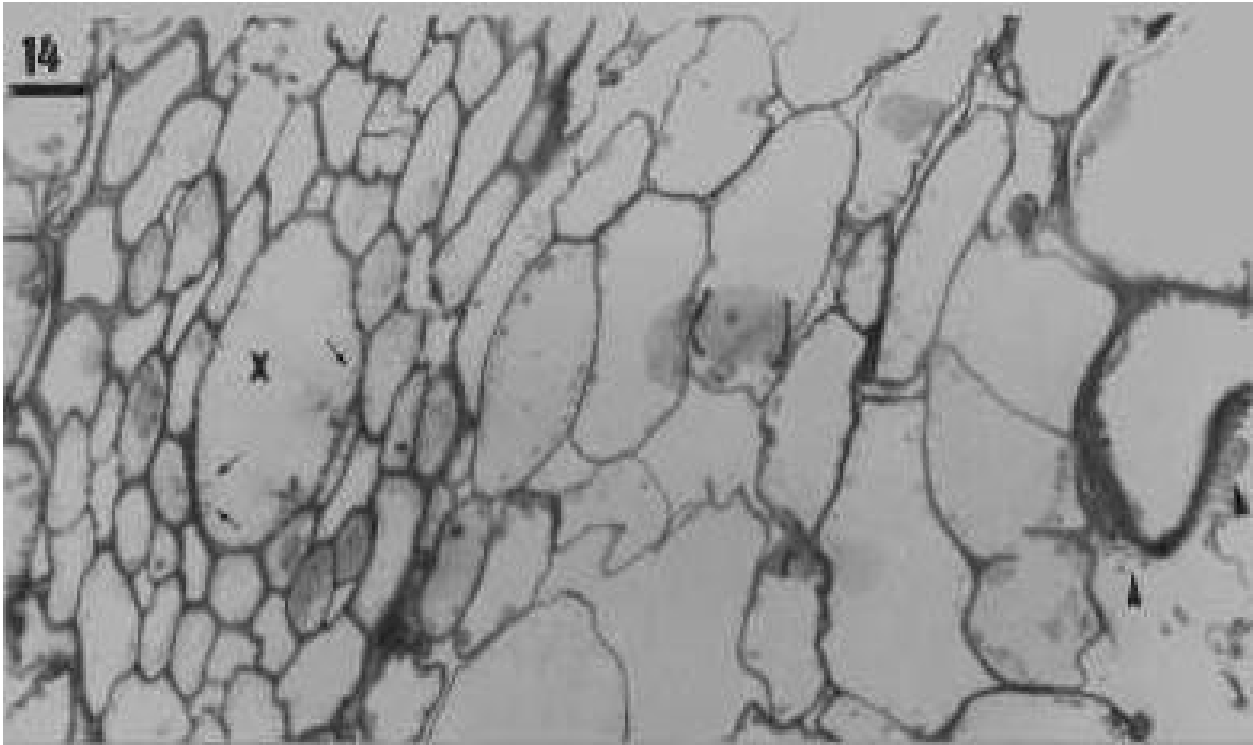
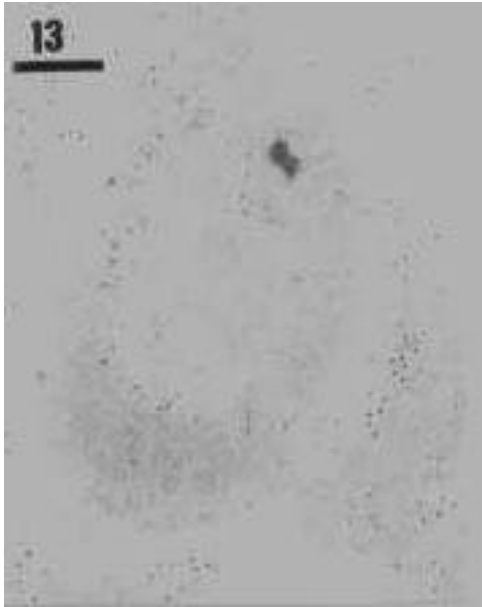
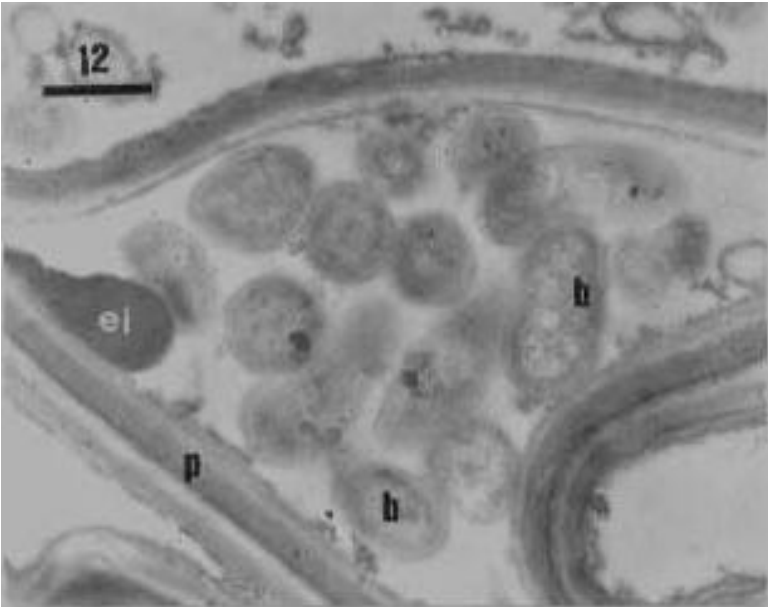
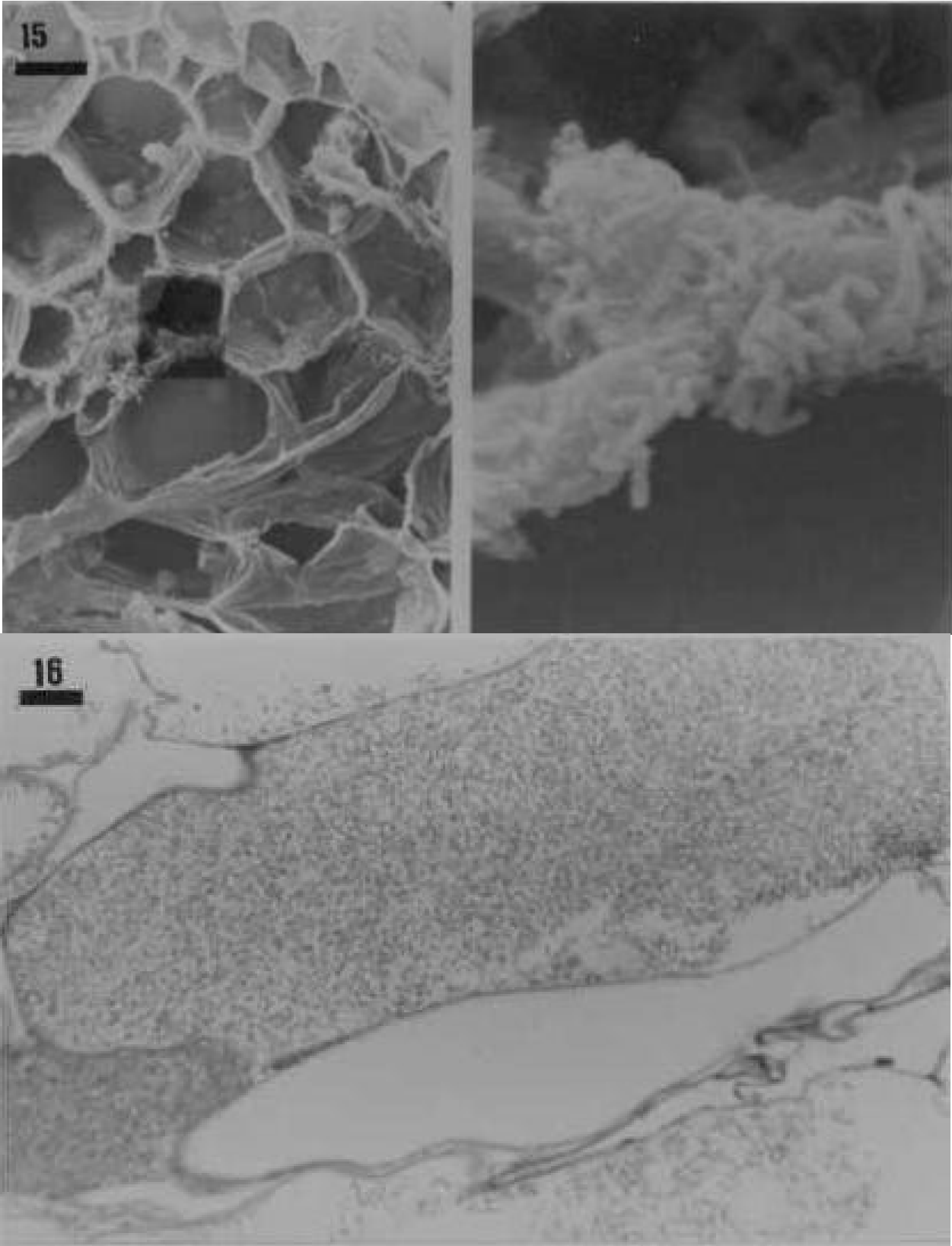


FIGURA 15: FMEV de seção transversal da base do colmo mostrando as bactérias multiplicando-se nos espaços intercelulares do parênquima cortical, **barra = 20 mm (zoom 8 x)**.

FIGURA 16: FMO de seção longitudinal da folha mostrando as bactérias colonizando o interior do mesófilo foliar, **barra =10 mm**.



CONCLUSÕES

- 1) A prática de micropropagação adotada pela Copersucar-SP elimina as bactérias diazotróficas estudadas (*Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp. e *A.diazotrophicus*), não sendo possível o isolamento destas bactérias em amostras de plântulas na ultima fase da micropropagação (fase 3 - enraizamento)
- 2) As bactérias do gênero *Azospirillum* foram encontradas em associação com as plantas micropropagadas já na fase de aclimação das mudas.
- 3) Bactérias *Herbaspirillum* spp. e *A. diazotrophicus* foram isoladas apenas de plantas micropopagadas em condições de campo, mostrando porém, que estas bactérias podem infectar plantas que originalmente não continham esses organismos.
- 4) A pré-germinação dos toletes mostrou um aumento na eficiência de isolamento de *Herbaspirillum* spp. e *A.diazotrophicus*, quando comparada ao isolamento de plantas de cana-de-açúcar vindas direto do campo.

5) A técnica de imunocaptura mostrou-se viável para trabalhos de isolamento das bactérias *Herbaspirillum* spp. e *A.diazotrophicus* em plantas de cana-de-açúcar.

6) Os estudos de microscopia demonstraram que *A. diazotrophicus*, 7 dias após ser inoculado em plântulas micropropagadas (fase 3), colonizou o tecido vegetal, utilizando preferencialmente como vias de acesso aos tecidos internos, as feridas naturais, a região de emergência de raízes laterais e a ponta das raízes.

7) No interior das plântulas pode-se observar *A. diazotrophicus* no espaço intercelular da região do córtex das raízes, nos vasos do xilema, na base do colmo em espaço intercelular do parênquima cortical e no mesófilo foliar.

8) A técnica de imuno-ouro foi aplicada com êxito na localização específica de *A. diazotrophicus* nos tecidos da planta. O uso de prata coloidal permitiu a visualização da marcação do sinal de ouro para observação em microscopia ótica

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASHBOLT, N.J. & INKERMAN, P.A. Acetic acid bacterial biota of the pink sugar cane mealbug *Saccharococcus sacchari* and its environs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p. 707-712, 1990.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R. & DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 911-922, 1997.
- BALDANI, V.L.D. Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Tese de Doutorado, 1996.
- BARBEHENN, R.V. & PURCELL, A.H. Factors limiting the transmission of a xylem-inhabiting bacterium *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* to grasses by insects. **Phytopatology**, St. Paul, v. 83, p. 859-863, 1993.
- BASHAN, Y. & HOLGUIN, G. *Azospirillum* - plant relationships: environmental and physiological advances (1990 - 1996). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 103-121, 1997.
- BASHAN, Y. & LEVANOY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 591 - 608, 1990.

- BASHAN, Y. Airborne transmission of the Rhizosphere Bacterium *Azospirillum*. **Microbiol Ecology**, New York, v. 22, p. 227-269, 1991.
- BIANCOTTO, V.; BANDI, C.; MINERDI, D.; SIRONI, M.; TICHY, H.V. & BONFANTE, P. An obligate Endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 3005-3010, 1996.
- BREWIN, N.J.; WOOD, E.A.; LARKINS, A.P.; GALTREY, G. & BUTCHER, G.W. Analysis of lipopolysaccharide from root nodule bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* using monoclonal antibodies. **Journal of General Microbiology**, v. 132, p. 1959 - 1968, 1986.
- BRUNEL, B.; CLEYET-MAREL, J.I.; NORMAND, P. & BARDIN, R. Stability of *Bradyrhizobium japonicum* inoculants after introduction into soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v. 54, p. 2636-2642, 1988.
- CABALLERO-MELLADO, J. & MARTINEZ-ROMERO, E. Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 1532-1537, 1994.
- CHESS, L.; MACDERMOTT, R.P. & SCHLOSSMAN, S.T. Immunologic functions of isolated human lymphocyte subpopulations. I. Quantitative isolation of human T and B cells and response of mitogens. **Journal of Immunology**, v. 113, p. 1113-1121, 1974.
- de MORAES, V.A. & SANGUINO, A. Uso da cultura de meristemas na multiplicação rápida de cana-de-açúcar. In: **VI Seminário Copersucar de Tecnologia Agrônômica**. Piracicaba, p. 229-235, 1994.
- DÖBEREINER, J. & BALDANI, V.L.D. Endophytic diazotrophs other than Rhizobia. In: **7th. International Symposium on Microbial Ecology**. Abstracts, Santos, p. 14, 1995.

- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D. & BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. **Brasília, EMBRAPA-SPI**, Itaguaí, RJ, EMBRAPA-CNPAB, 1995a.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D. & REIS, V.M. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: **Azospirillum VI and related microorganisms**, Fendrik, I.; del Gallo, M.; Vanderleyden, J. & de Zamaroczy, M. Eds. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p 3-14, 1995b.
- GIANINAZZI, S.; DEXHEIMER, J.; GIANINAZZI-PEARSON, V. & MARX, C. Role the host-arbuscule interface in the VA mycorrhizal symbiosis. Ultracytological studies of process involved in phosphate and carbohydrate exchange. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 71, p. 211-215, 1983.
- HENDRE, R.R.; IYOR, R.S.; KOTWALM, M.; KLUSPE, S.S & MASCARENHAS, A.F. Rapid multiplication of sugar cane by tissue culture. **Sugar cane**, Port Tabolt, v.1, p. 5-8, 1983.
- HRANITZKY, K.W.; LARSON, A.D.; RAGSDALE, D.W. & SIEBELING, R.J. Isolation of serovars of *Vibrio cholerae* from water by serological specific method. **Science**, New York, v. 210, p. 1025-1026, 1980.
- HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; VAN MONTAGU, M. & KELLENBERG, E. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 176, p. 1913-1923, 1994.
- JABAGI-HARE, S.H.; THÉRIN, J. & CLAREST, P.M. High resolution cytochemical study of the vesicular-arbuscular mycorrhizal association, *Glomus clarum* X *Allium porrum*. **The New Phytologist**, London, v. 114, p. 481-496, 1990.
- JAMES, E.K.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I. AND DÖBEREINER, J. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.45, p.757-766, 1994.

- KARTHA, K.K. & GAMBORG, O.L. Elimination of cassava mosaic disease by meristem culture. **Phytopatology**, St. Paul, v. 65, p. 826-828, 1975.
- KIMURA, O. Importância das populações “residentes” de fitobactérias na epidemiologia de enfermidades bacterianas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 310-311, 1981.
- KLOEPPER, J.W.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F. & HALLMANN, J. Recent studies on the microbial ecology of bacterial endophytes in plants. In: **XVI Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**, Rio de Janeiro - RJ - Brasil, 20 a 26 de Julho de 1997. 1 CD-ROM
- KLOEPPER, J.W.; SCHIPPERS, B. & BAKKER, P.A.H.M. Proposed elimination of the term Endorhizosphere. **Phytopatology**, St. Paul, v. 82, p. 726-727, 1992
- LEE, T.S.G. Produção de mudas sadias de cana-de-açúcar através da técnica de cultura de tecidos. **Álcool e Açúcar**, São Paulo, v. 45, p. 757-766, 1986.
- LEVANOY, H.; BASHAN, Y.; ROMANO, B. & KLRIN, E. Ultrastructural localization and identification of *Azospirillum brasilense* Cd on and within roots by immunogold labelling. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 117, p. 207 - 218, 1989.
- MAVINGUI, P.; BERGUE, O. & HEULIN, T. Immunotrapping of *Bacillus polymyxa* in soil and rhizosphere of wheat. **Symbiosis**, Rehovot, v. 9, p. 215-221, 1990.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- OLIVARES, F.L. Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. híbrido) por bactérias endofíticas do gênero *Herbaspirillum*. **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Tese de Doutorado, 1997.
- OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. AND DÖBEREINER, J. Occurrence of the diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of gramineae. **Biology and Fertility of soils**, Berlin, v. 21, p. 197-200, 1996.

- OLIVARES, F.L.; REIS, F.B.; REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Infection of sugarcane roots by the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *H. rubrisubalbicans*. In: **International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: The Role of Biological Nitrogen Fixation**, Programme and Abstracts, p. 65-66, Angra dos Reis - Rio de Janeiro - Brasil. November 26th - December 1st, 1995.
- OLIVARES, F.L.; REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D.; REIS, F.B.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Ecologia das bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum*. **Fitopatologia Brasileira**, Aracajú, Suplemento 18, p. 313, 1993.
- OLIVEIRA, A.L.M.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Colonisation of micropropagated sugar cane by nitrogen-fixing bacteria co-inoculated with arbuscular-mycorrhizal *Glomus clarum*. In: **International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: The Role of Biological Nitrogen Fixation**, Programme and Abstracts, p. 218-219, Angra dos Reis - Rio de Janeiro - Brasil. November 26th - December 1st, 1995.
- PATRIQUIN, D.G.; DÖBEREINER, J. & JAIN, D.K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, p. 900 - 915, 1983.
- PAULA, M.A. DE; REIS, V.M. AND DÖBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum* and *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomea batata*), sugar cane (*Saccharum* spp.) and sweet sorghum (*Sorghum bicolor*). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 11, p. 111-115, 1991.
- PAULA, M.A.; SIQUEIRA, J.O. & DÖBEREINER, J. Ocorrência de fungos micorrízicos vesículoarbusculares e de bactérias diazotróficas na cultura da batata-doce. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 17, p. 349 - 356, 1993.

- PURCELL, A.H. Homopteran transmission of xylem-inhabiting bacteria. **Adv. Dis. Vector Res.**, v. 6, p. 243-266, 1989.
- REINHOLD-HUREK, B. & HUREK, T. Capacities of *Azoarcus* sp., a new genus of grass-associated diazotrophs. In: **New Horizons in Nitrogen Fixation**, Palacios, R.; Mora, J.; Newton, W. E. eds., Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p. 691 - 694, 1993.
- REIS, V.M. Aspectos ecológicos e fisiológicos da bactéria fixadora de N₂ *Acetobacter diazotrophicus*. **Universidade Rural do Rio de Janeiro**, Tese de Mestrado, 1991.
- REIS, V.M. Estudos de infecção e métodos de detecção da bactéria endófito *Acetobacter diazotrophicus* em associação com a cana-de-açúcar. **Universidade Rural do Rio de Janeiro**, Tese de Doutorado, 1994.
- REIS, V.M., OLIVARES, F. & DÖBEREINER, J. Improved methodology for isolation of *A. diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. **World Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 10, p. 101-104, 1994.
- REIS, V.M.; CRUZ, G.B.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M.; FERREIRA, A.C.; REIS Jr., F.B.; ASSIS, J.R.; SALLES, J.F. & WEBER, O.B. Produção e caracterização de soros policlonais para a detecção de bactérias diazotróficas. **EMBRAPA-CNPAB**, Seropédica, Documentos nº 30, 11p., 1997.
- REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; OLIVEIRA, A.L.M.; REIS Jr., F.B.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants with *Acetobacter diazotrophicus*. **World Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 206, p. 205-211, 1998.
- ROZSAK, D.B. & COLWELL, R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 51, p. 365-379, 1987.

- RUSCHEL, A.P.; ORLANDO, F. & ZAMBELLO J., E. The effect of nitrogen, phosphorus and potassium fertilization and irrigation on nitrogenase activity and yield of sugarcane. **Proceedilings for International Society of Sugar Cane Technology**, v. 2, p. 1903-1909, 1977.
- SCHLOTTER, M.; BODE, W. & HARTMANN, A. Characterization of monoclonal antibodies against cell surface structures of *Azospirillum brasilense* Sp 7 using ELISA techniques. **Symbiosis**, v. 13. p. 37 - 45, 1992.
- SILVA, L.G.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; REIS, F.B. & BODDEY, R.M. Uso do método de ELISA indireto para detecção e enumeração de bactérias fixadoras de N₂. In: **III Simpósio Brasileiro sobre Microbiologia do Solo**, Londrina, Resumo nº155, 1994.
- SUMNER, M.E. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. **Advances in Soil Science**, v. 12, p. 53-123. 1990.
- TILAK, K.V.B.R.; LI, C.Y. & HO, I. Ocurrance of nitrogen-fixing *Azospirillum* in a vesicular-arbuscular mycorrizal fungi. **Plant and Soil**, Dordretch, v. 116, p. 286-288, 1989.
- VARMA, A.K.; SINGH, K. & LALL, K. Lumen bacteria from endomycorrizal spores. **Current Microbiology**, v. 6, p. 207-211, 1981.
- VASSE, J. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 8, p. 241-251, 1995.
- VASSE, J.; FREY, P. & TRIGAKET, A. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v. 8, p. 241 - 251, 1995.
- YU, P.T.; STOLZY, H. & LETEY, J. Survival of plants under prolonged flooded conditions. **Agronomy Journal**, v. 61, p. 844 – 847, 1969.

CAPÍTULO III

INFLUÊNCIA DA FERTILIZAÇÃO NITROGENADA SOBRE A
POPULAÇÃO DAS BACTÉRIAS *Herbaspirillum* spp. E *Acetobacter*
diazotrophicus em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)

RESUMO

Em um experimento de campo observou-se o comportamento da população natural das bactérias diazotróficas *Herbaspirillum* spp. e *Acetobacter diazotrophicus*, utilizando-se as variedades SP 79-2312 e SP 70-1143, com doses equivalentes a 300 kg de N/ha. Na variedade SP 79-2312 de maneira geral as plantas adubadas mostraram maior concentração deste elemento. Estas plantas também apresentaram um número menor da bactéria *A. diazotrophicus*. Para SP 70-1143 não foram observadas diferenças entre os teores de N, o mesmo ocorrendo em relação a população das bactérias. A população de *A. diazotrophicus* também mostrou ser influenciada pela época de coleta, apresentando-se reduzida nas coletas coincidentes com os períodos secos do ano. Outro experimento, montado em casa de vegetação, utilizou-se plântulas micropropagadas da variedade Na 56-79 inoculadas com estirpes de *A. diazotrophicus* e *H. seropedicae*. Não foi demonstrado efeito da adubação nitrogenada sobre a população de ambas. A adubação nitrogenada foi prejudicial ao crescimento radicular, e a inoculação com estas bactérias, principalmente *H. seropedicae*, diminuiu o efeito deletério causado pela adição de N. Este efeito da inoculação apresentado nas raízes, provavelmente também foi o responsável por um maior desenvolvimento inicial da parte aérea nas plantas inoculadas e adubadas.

ABSTRACT

Two experiments were planted to study the possible effects of fertilization with high levels of N on the occurrence and numbers of the diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane plants. In a field experiment the behaviour of the natural population of these bacteria was studied using plants fertilized with levels of up to 300 kg of N/ha. In the genotype SP 79-2312 generally the fertilized plants showed larger concentrations of this element. These same plants also had a smaller number of *A. diazotrophicus*. These differences on the concentration of N and the numbers of *A. diazotrophicus* due to N application were not shown in the genotype SP 70-1143. The numbers of *A. diazotrophicus* were also shown to be influenced by the harvest time, becoming reduced in the harvests which coincided with dry periods of the year. The second experiment was set up in a greenhouse. In this case micropropagated plantlets were inoculated with strains of *A. diazotrophicus* and *H. seropedicae* and no effects of nitrogen fertilization on the population of either bacteria were shown. However, it was demonstrated that nitrogen fertilization was harmful to root growth, and that inoculation with these bacteria, particularly *H. seropedicae*, decreased the deleterious effect caused by the addition of nitrogen. The inoculation effect shown by the roots was probably also responsible for a larger initial development of the aerial parts of the inoculated and fertilized plants.

INTRODUÇÃO

O nitrogênio representa cerca de 1% da matéria seca total em plantas maduras de cana-de-açúcar, e mesmo assim, assume importância tão grande quanto a do carbono, hidrogênio e oxigênio, que juntos perfazem 90% do total desta matéria seca (VAN DILLEWIJN, 1952). Dentre os macronutrientes essenciais o nitrogênio, junto com o potássio, são os mais extraídos pela cultura, seguidos de cálcio, magnésio, enxofre e fósforo (CATANI et al., 1959; ORLANDO FILHO et al., 1980). No entanto, mesmo sendo a cultura da cana-de-açúcar altamente extrativa em nitrogênio (100 - 200 kg/ha/ano), quando as condições hídricas são adequadas, são raras as vezes que as variedades brasileiras respondem a adubação nitrogenada (FRANCO & DÖBEREINER, 1994). A ocorrência do processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN) em plantas de certos genótipos de cana-de-açúcar (URQUIAGA et al., 1992; BODDEY et al., 1995a; DÖBEREINER et al., 1995a), é hoje tido como o fator que melhor pode explicar a falta de resposta da cultura a fertilização com nitrogênio.

Aparentemente, a maioria das variedades brasileiras de cana-de-açúcar sofreram um processo de seleção sob condições de baixas aplicações de fertilizantes nitrogenados. BODDEY et al. (1995a) sugerem que, provavelmente por esta razão as respostas a aplicação de N sejam raras. O cultivo destas variedades em solos pobres em nitrogênio pode ter proporcionado, mesmo que de maneira inconsciente, a seleção de plantas mais eficientes quanto a FBN. Enquanto as

respostas a adubação são raras no Brasil, em outros países que utilizam altos níveis de adubo nitrogenado (200-400 kg N/ ha), como Estados Unidos, Cuba, Peru e Venezuela, são frequentes os relatos de resposta da cultura as aplicações deste elemento (BODDEY, 1995).

A fertilização com altas doses de nitrogênio mineral, além de ser desvantajosa economicamente, pode trazer outras consequências danosas para a cultura da cana-de-açúcar, tanto no que diz respeito ao desenvolvimento vegetal quanto nas qualidades agro-industriais da cultura (teores de açúcar, pol%, etc). A queda no rendimento em açúcar deve-se a diminuição das concentrações de sacarose (ALEXANDER, 1964), concentração de açúcares redutores e açúcares totais (CROCOMO et al., 1981). HUMBERT (1968) relatou que altas doses de N podem diminuir a qualidade do caldo e causar alta incidência de mortalidade dos colmos. ORLANDO FILHO & ZAMBELLO Jr. (1980) demonstraram que o pol% da cana-de-açúcar foi afetado negativamente devido as altas doses de N aplicadas e nesta situação a maturação das plantas também é retardada (SALATA, 1982).

O excesso de nitrogênio pode também afetar o processo de FBN. De acordo com SIQUEIRA & FRANCO (1988), dos nutrientes minerais, o N é o que apresenta maior efeito sobre a FBN. No caso das leguminosas, concentrações superiores a 20mM geralmente causam decréscimo na fixação de nitrogênio. A presença de altas doses de nitrogênio no solo podem inibir a formação dos nódulos e causar senescência nos nódulos já formados, mas os mecanismos moleculares envolvidos nestes efeitos inibitórios são ainda pouco explicados. Em cana-de-açúcar, VOSE et al. (1981) demonstraram que níveis elevados de N mineral causaram um decréscimo significativo na atividade de redução de acetileno e provavelmente este efeito deve-se a já conhecida ação deletéria sobre a nitrogenase. FUENTES-RAMÍREZ et al. (1993), obtiveram resultados sugerindo que a associação entre *Acetobacter diazotrophicus* e a cana-de-açúcar pode ser severamente limitada quando fertilizantes nitrogenados são aplicados em grande quantidade na cultura, podendo também este fator ser um dos responsáveis pela queda da atividade de

redução de acetileno. Em plantios que foram adubados com 120 kg N/ha obteve-se uma percentagem de isolados muito superior aqueles adubados com 300 kg N/ha. MUTHUKUMARASAMY (1995) obteve resultados semelhantes, em estudos realizados na Índia. Tudo indica que este efeito não é uma relação negativa direta entre a presença da bactéria e os altos níveis de nitrogênio, já que *A. diazotrophicus* tem bom crescimento em meio de cultura com altas concentrações de N. Então, é mais provável que o estado fisiológico da planta seja alterado pelo nitrogênio, e subsequentemente tenha efeito na associação com estes organismos.

Estes relatos são de grande importância levando-se em conta que *A. diazotrophicus* é considerado um dos principais responsáveis pela FBN na cultura da cana-de-açúcar (BODDEY et al., 1995b), e poderiam explicar o por que da maioria das variedades brasileiras, selecionadas em condições de baixos níveis de nitrogênio, serem eficientes quanto a FBN. Para confirmar esta hipótese, e também para verificar o efeito do N sobre a população de bactérias *Herbaspirillum* spp., foram executados os dois experimentos abordados neste capítulo.

MATERIAL E MÉTODOS

EXPERIMENTO 1 - Efeitos da adubação nitrogenada sobre a população natural de *A. diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. nas variedades de cana-de-açúcar SP 79-2312 e SP 70-1143.

O experimento foi conduzido em condições de campo, na estação experimental da **Embrapa Agrobiologia**, município de Seropédica, Rio de Janeiro, durante o período de abril de 1995 até agosto de 1996. O clima local segundo o sistema de Koppen, é do tipo Aw caracterizado por verão chuvoso e inverno relativamente seco, e durante o período experimental, os fatores temperatura (média, mínima e máxima), umidade do ar e precipitação foram mensurados em estação meteorológica localizada próxima ao local do experimento. A intensidade de variação destes fatores é mostrada através da figura 1.

O solo foi classificado como sendo um Podzólico Vermelho Amarelo (PVA) série Itaguaí. Na tabela 1 são mostrados os resultados das análises química e granulométrica deste solo.

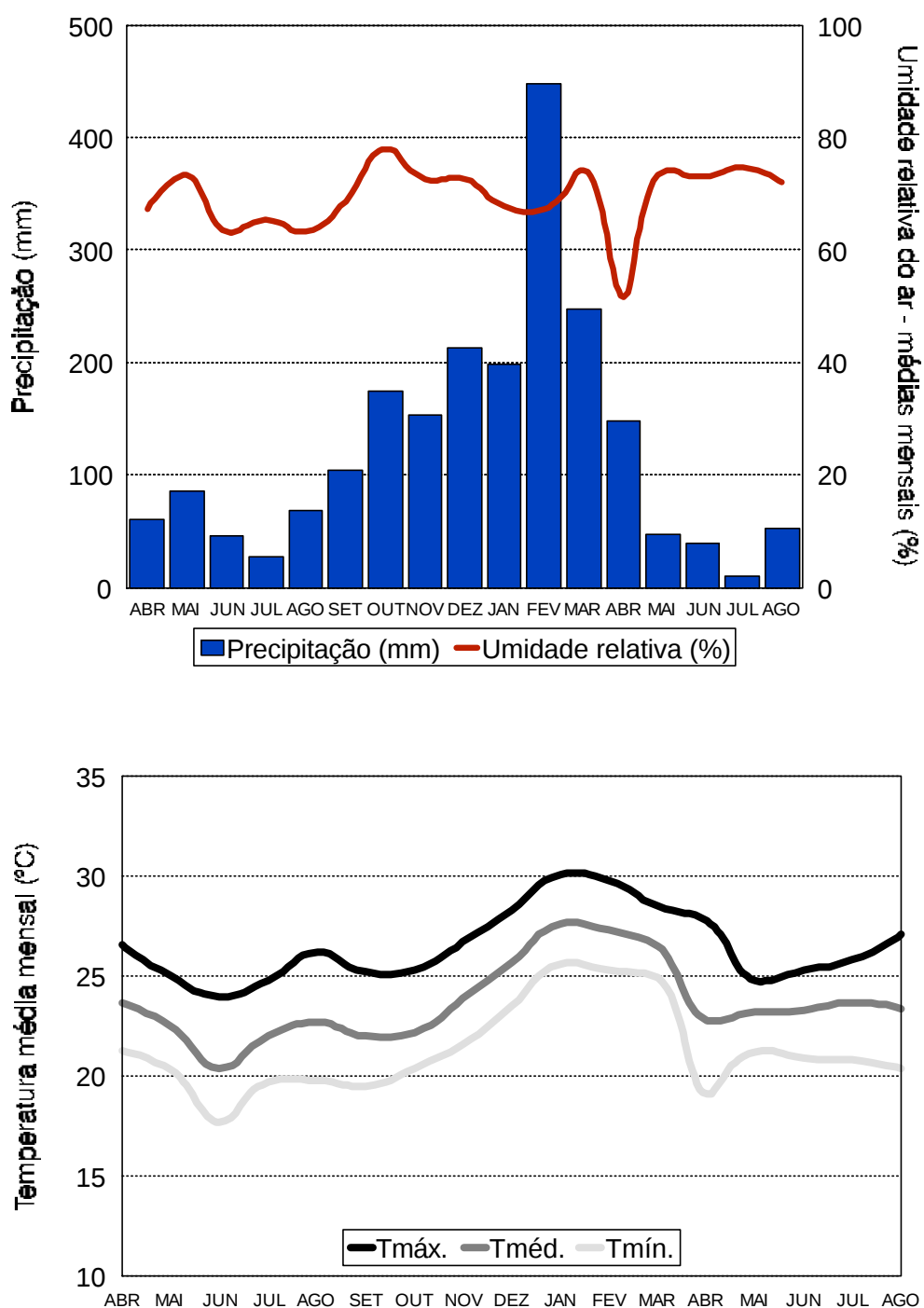


Figura 1 - Valores médios mensais da umidade relativa do ar, precipitação e temperatura do ar (máxima, média e mínima), durante o período experimental (abril/1995 - agosto/1996).

Tabela 1 - Características químicas e granulométricas do solo PVA na profundidade de 0-20 cm, analisado antes do plantio

Características químicas	pH (H ₂ O)	Al (cmol.kg ⁻¹)	Ca+Mg (cmol.kg ⁻¹)	P (mg.kg ⁻¹)	K (mg.kg ⁻¹)	
	5,0	0,1	1,6	5	19	
Granulometria (%)	Argila	Silte	Areia fina	Areia grossa	Areia total	Textura
	6	4	2	88	90	ARENOSA

O solo foi preparado na forma tradicional com uma aração e duas gradagens, e a adubação foi feita de acordo com a análise do solo, sendo aplicados P, K, Ca, Mg e micronutrientes (Tabela 2).

Os dois níveis de fertilização nitrogenada utilizados foram os seguintes:

(a) Tratamento N (alto nível de nitrogênio)

A aplicação dos 300 kg de nitrogênio por hectare (1500 kg de sulfato de amônio) foi realizada da seguinte forma: 1/5 após a germinação, 2/5 após dois meses e os últimos 2/5 após mais dois meses. Estas aplicações foram feitas em cobertura, com incorporação parcial.

Obs.: A adubação nitrogenada parcelada foi feita em 25/05/95, 31/07/95 e 03/10/95.

(b) Tratamento sem adubação nitrogenada

Tabela 2 - Mistura utilizada como adubação de cobertura

Gesso Agríc.	P ₂ O ₅	K ₂ O	FTE	CuSO ₄	Molibdato
2 ton/ha	150 kg/ha	200 kg/ha	50kg/ha	10kg/ha	1kg/ha

Foram utilizadas as variedades SP 70-1143 e SP 79-2312. Estas variedades são híbridos comerciais que apresentam genótipos relativamente contrastantes quanto a capacidade de fixação de N_2 . De acordo com URQUIAGA et al. (1992), a variedade SP 70-1143 obtém mais de 60% do seu N através da fixação biológica de nitrogênio, enquanto na variedade SP 79-2312 estes valores não chegam a 40%. O espaçamento adotado foi de 1,0 m de distância entre as linhas de plantio e 1,0 m entre as plantas, utilizado para facilitar as colheitas de plantas individuais, principalmente devido a coleta das raízes das plantas.

Para cada variedade, foram instalados dois tratamentos principais, sem adubação nitrogenada e com aplicação de 300 kg N/ha. Os tratamentos foram distribuídos ao acaso em quatro blocos (repetições), com cinco colheitas programadas (25/07/95, 04/11/95, 25/01/96, 05/05/96 e 05/08/96). Para análise da variância, utilizou-se o delineamento do tipo fatorial em blocos ao acaso, onde cada coleta constituiu-se em sub-tratamento, resultando um fatorial do tipo 2 x 5.

As plantas foram divididas em raízes, colmos, palha e folhas bandeira. De cada uma destas partes da planta foram observados o valor do peso fresco total e peso seco de amostras, que foram utilizadas para avaliação do teor de N, P, K, Ca e Mg. Para a quantificação e localização das bactérias diazotróficas *A. diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp., foram coletadas amostras das raízes e base dos colmos.

Na primeira coleta os teores de nutrientes foram determinados apenas para amostras de raiz e folhas, já que as plantas ainda não apresentavam palha e nem colmos diferenciados.

A matéria seca foi determinada após secagem do material em estufa com ventilação forçada a 65°C por 72 h. Após isso as amostras foram pesadas e moídas em moinho de até 40 mesh (partículas <0,167 mm), para a determinação de nitrogênio pelo método semi-micro Kjeldahl (BREMMER E MULVANEY, 1982, citado por OLIVEIRA, 1994). Para os outros nutrientes, após digestão

nitroperclórica (BATAGLIA et al., 1985), o teor de P foi determinado em espectrofotômetro, a partir da formação da cor azul do complexo fosfato-molibdato em meio sulfúrico na presença de ácido ascórbico como redutor (EMBRAPA/SNLCS, 1979), enquanto, o K, Ca e Mg foram determinados em espectrofotômetro de absorção atômica.

Amostras contendo 10g de raízes e base dos colmos das plantas coletadas foram lavadas com água corrente e trituradas em 90 ml de solução salina (DÖBEREINER et al., 1995b). Em seguida foram feitas diluições seriadas de onde se tomou alíquotas de 0,1 ml de cada diluição para inoculação em frascos de 15 ml contendo 5 ml dos meios semi-sólidos JNFb e LGI-P (DÖBEREINER et al., 1995b), semi-específicos para *Herbaspirillum* spp e *A. diazotrophicus* respectivamente, utilizando-se três repetições por diluição. A quantificação do número mais provável (NMP) das bactérias foi feita utilizando-se a Tabela de McCrady (DÖBEREINER et al., 1995b) para três diluições.

EXPERIMENTO 2 - Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação de *A. diazotrophicus* e *Herbaspirillum seropedicae* sobre o crescimento inicial de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar.

As plantas de cana-de-açúcar variedade Na 56-79 foram micropropagadas pela Copersucar-SP de acordo com HENDRE et al. (1983). Após o crescimento no meio de enraizamento (Fase 3 da micropropagação), as plântulas foram transferidas para meio MS diluído 1/10 (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e inoculadas com 0,1ml de suspensão bacteriana contendo 10^6 a 10^7 células por ml de *A. diazotrophicus* (estirpe PAL 5) e *H. seropedicae* (estirpe HRC 54). As bactérias foram crescidas por 24h em um meio contendo (L^{-1}): 2.0 g glucose, 1.5 g ácido glutâmico, 1.5 g peptona, 0.5 g K_2HPO_4 , 0.5g $MgSO_4.7H_2O$, 2g extrato de levedura, pH 6.0. As plantas foram mantidas a uma temperatura controlada de 30°

C com uma irradiância de $60 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 12h por dia. Dez dias ap\333s a inocula\327\303o as pl\302ntulas foram transferidas para potes de 1kg contendo areia + vermiculita (2:1) est\303ereis em casa de vegeta\327\303o.

Durante todo o per\333odo do experimento a umidade do substrato foi mantida em torno da capacidade de campo, e semanalmente eram aplicados nos vasos 40 ml de solu\327\303o de Hoagland (HOAGLAND & ARNON, 1950) sem nitrog\303\323nio. Nos tratamentos com fertilizante nitrogenado aplicou-se como fonte de N o NH_4NO_3 . A aplica\327\303o do nitrog\303\323nio foi dividida em duas semanas, sendo a primeira dose (1/3 do total) aplicada somente 7 dias ap\3333s a implanta\327\303o do experimento.

O delineamento foi do tipo fatorial (2X3) em blocos ao acaso, com 4 repeti\327\303\303es. Consta de duas doses de N (0 e 300 kg/ha) e inocula\327\303o com *H. seropedicae*, *A. diazotrophicus* e controle n\303o inoculado. Foram feitas duas coletas aos 20 e 40 dias ap\3333s a implanta\327\303o (d.a.i) do experimento. Em cada coleta verificou-se tanto o comprimento e peso de mat\303\303ria fresca das ra\333zes e parte a\303\303rea, como o NMP de *H. seropedicae* e *A. diazotrophicus* do tratamento respectivo.

Para verifica\327\303o do NMP amostras de 1g do tecido vegetal tiveram sua superf\333cie previamente esterilizada de acordo com D\303\303BEREINER et al. (1995b) e logo ap\3333s foram maceradas em 9ml de solu\327\303o salina. Com as plantas da primeira coleta (20 d.a.i.), n\303o foi feita separa\327\303o das partes do vegetal devido ao pequeno volume de material, sendo assim a popula\327\303o das bact\303\303rias foi avaliada em toda a planta. Na segunda coleta (40 d.a.i.) o material vegetal foi dividido em ra\333zes e parte a\303\303rea para a contagem das bact\303\303rias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

EXPERIMENTO 1 - Efeitos da adubação nitrogenada sobre a população natural de *A. diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp nas variedades de cana-de-açúcar SP 79-2312 e SP 70-1143.

1.1. Acúmulo de matéria seca, nitrogênio e concentrações de N, K, P, Ca e Mg em diferentes estádios do crescimento da cultura.

Os valores de acúmulo de matéria seca nos dois tratamentos em função do tempo, mostram que nas raízes das variedades SP 79-2312 e SP 70-1143 (tabela 3 A), há uma tendência de crescimento até a última coleta aos 15 meses após o plantio. No entanto, para a variedade SP 79-2312, a partir do nono mês não há diferenças significativas entre estes valores, sugerindo a estabilização do crescimento das raízes a partir desta coleta, para ambos os tratamentos. Para a variedade SP 70-1143, um pouco mais tardia, esta estabilização do crescimento das raízes foi mostrada na coleta aos 12 meses.

Os valores obtidos para colmos de ambas as variedades (tabela 3 B) demonstram o mesmo comportamento apresentado pelas raízes, com crescimento até a última coleta. Estes resultados estão próximos aos apresentados por ORLANDO FILHO et al. (1980), que também mostrou que no caso de cana planta, a matéria seca foi produzida de forma crescente pelos colmos.

Na variedade SP 79-2312, em amostras de palha houve uma estabilização do acúmulo de matéria seca a partir da coleta aos 6 meses. O mesmo não ocorreu para a variedade SP 70-1143, onde houve um acréscimo até a coleta aos 12 meses, seguido de um decréscimo na última coleta, aos 15 meses (tabela 3 C).

Para as folhas verdes da variedade SP 79-2312 observou-se um crescimento até o sexto mês e uma estabilização até o nono mês, começando aí um declínio chegando ao 15º mês com valores significativamente inferiores aos encontrados entre o sexto e nono mês. Em amostras da variedade SP 70-1143 que além de ser mais tardia, apresentando um período maior de crescimento vegetativo, parece também apresentar uma produção maior de folhas, houve um crescimento progressivo até a coleta aos 12 meses, com um declínio destes valores na coleta aos 15 meses (tabela 3 D). SAMPAIO et al. (1984), em seu experimento, explicaram a estabilização de massa de folhas após os seis meses, pelo simultâneo desenvolvimento de folhas novas e queda das folhas mais velhas. ORLANDO FILHO et al. (1980), também notaram uma diminuição no teor da matéria seca de folhas ao final do ciclo da planta (14 para 16 meses de idade), devido ao secamento e queda das folhas com a aproximação do final do período de maturação.

Não houve diferenças estatísticas entre os valores de peso seco quanto as doses de nitrogênio aplicadas para ambas as variedades, em nenhuma das coletas ou partes da planta.

A tabela 4 mostra os valores da concentração de N nas diversas partes e nas diferentes épocas de coleta, como também nos tratamentos com e sem adubação nitrogenada. Para raízes (tabela 4 A), os valores foram inferiores a partir da segunda coleta (6 meses após o plantio), mantendo-se estáveis desde então. CLEMENTS (1980) discute que, nos estágios de crescimento inicial, as raízes estão ativas e necessitam de maior quantidade de N. Com o avanço da idade da planta, a atividade das raízes diminui e o nitrogênio é translocado para a parte aérea, ou então, vai para o solo com a morte dos tecidos corticais de raízes

velhas. Os valores acumulados da variedade SP 79-2312, mostraram que no tratamento adubado com nitrogênio, as raízes apresentaram maior concentração deste elemento em relação as raízes das plantas do tratamento não adubado. Na variedade SP 70-1143 não houve diferenças entre a concentração do nitrogênio em plantas adubadas e não adubadas.

A concentração de N nos colmos da variedade SP 79-2312 apresentou-se superior apenas na coleta aos 6 meses após o plantio, havendo um decréscimo destes valores nas coletas posteriores. Em amostras da variedade SP 70-1143, este decréscimo ocorreu apenas após a coleta aos nove meses (tabela 4 B). Resultados semelhantes foram obtidos por ORLANDO FILHO et al. (1980) e SRIVASTAVA (1970), que também demonstraram uma queda nos teores de nitrogênio do colmo da cana-de-açúcar com o aumento da idade. HUMBERT (1968) cita que o decréscimo na concentração de nitrogênio em função da idade, é causado pelo efeito da diluição proporcionado pelo crescimento acelerado das plantas. Assim sendo, as partes mais novas das plantas retiram o N dos internódios maduros e estes, juntamente com as folhas adultas, à medida que envelhecem, liberam parte do seu N para os tecidos mais jovens (VAN DILLEWIJN, 1952).

Assim como as raízes, os colmos da variedade SP 79-2312 também apresentaram um valor total de concentração de N superior nas plantas adubadas com nitrogênio. SILVEIRA (1985) também obteve resultados que mostraram que os colmos de plantas adubadas com nitrogênio obtiveram maior concentração deste elemento que a testemunha, a partir de 120 dias após o plantio. Já para amostras da variedade SP 70-1143, como ocorrido nas raízes, nos colmos também não ocorreu diferença significativa entre as plantas adubadas e não adubadas com nitrogênio.

Os valores da concentração de N na palha (tabela 4 C) e folhas (tabela 4 D) para variedade SP 79-2312, também sugerem um decréscimo de acordo com a idade da planta. No caso das amostras de palha, ocorreu um aumento do sexto para o nono mês, com os valores voltando a decrescer, e mantendo-se estáveis a

partir do nono mês após o plantio. Na variedade SP 70-1143 a concentração de N em amostras de palha, mostrou-se relativamente estável, apresentando um decréscimo dos valores aos 12 meses. No caso das folhas o comportamento foi semelhante ao observado em SP 79-2312. Em relação a palha e folhas, no caso das duas variedades, não houve diferenças significativas quanto a concentração de N entre as amostras de plantas adubadas e não adubadas com este elemento. Pode-se também observar, que o teor de nitrogênio das folhas velhas e secas (palha) é menor do que aquele encontrado em folhas verdes e novas, MALAVOLTA & HAAG (1964), interpretam esta diferença como uma evidência da substancial translocação deste elemento, que volta das folhas adultas para as folhas mais novas e o colmo.

Observando-se os valores apresentados pela variedade SP 79-2312 (tabelas 4 A, B, C, D), pode-se notar que houve uma tendência dos valores do tratamento adubado serem maiores que o tratamento sem adubação, principalmente do sexto até o nono mês após o plantio. As possíveis perdas do fertilizante nitrogenado após este período podem ter sido responsáveis pela diminuição destas diferenças. Estas perdas devem ter sido facilitadas pelas características do solo. Já para a variedade SP 70-1143, estas diferenças quanto a concentração de nitrogênio em plantas adubadas e não adubadas, praticamente não existem, indicando provavelmente que a eficiência da adubação foi muito baixa, com as plantas absorvendo muito pouco do fertilizante aplicado.

As tabelas 5 A, B, C, D mostram os valores de acúmulo de nitrogênio das variedades SP 79-2312 e SP 70-1143 para as diversas partes da planta nos tratamentos com e sem adubação nitrogenada. Pode-se notar que estes valores seguem um padrão semelhante aos gráficos de acúmulo de matéria seca (tabelas 3 A, B, C, D). Do mesmo modo, os valores de acúmulo de nitrogênio observados por SILVEIRA (1985), ajustaram-se a função utilizada para descrever o acúmulo de matéria seca, passando também a descrever a variação do N acumulado.

As raízes da variedade SP 79-2312 mostraram uma tendência de acúmulo de N até a última coleta. Nas raízes da variedade SP 70-1143, o acúmulo de N nas primeiras coletas foi mais lento, demonstrando diferenças significativas apenas a partir da coleta aos 12 meses após o plantio (tabela 5 A). Os colmos de ambas as variedades (tabela 5 B) seguiram com um aumento da quantidade de N acumulado até a coleta aos 15 meses. A acumulação de N por parte da palha (tabela 5 C) se manteve estável na variedade SP 79-2312 a partir dos 6 meses, o mesmo ocorrendo a partir dos nove meses para a variedade SP 70-1143. Em amostras de folha da variedade SP 79-2312 ocorreu um acúmulo crescente até o sexto mês e a partir do nono mês começou a ocorrer um decréscimo nestes valores. Para SP 70-1143 este acúmulo foi crescente até os 12 meses, com um decréscimo observado na coleta aos 15 meses (tabela 5D). SILVEIRA (1985) e ORLANDO FILHO et al. (1980), também encontraram resultados semelhantes no que diz respeito ao N acumulado por colmos e folhas. As quantidades de N absorvidas pelos colmos foram sempre crescentes, enquanto que as das folhas decresceram a partir do oitavo (SILVEIRA, 1985) ou décimo-quarto (ORLANDO FILHO et al. 1980) mês após o plantio.

Não houve diferenças significativas quanto ao acúmulo de N entre o tratamento adubado e o não adubado com nitrogênio. Observando os valores do N extraído pelos colmos aos 15 meses após o plantio podemos afirmar que no tratamento adubado foram acumulados por volta de 120 kg N/ha e 93 kg N/ha, nas variedades SP 79-2312 e SP 70-1143, respectivamente. Para o tratamento não adubado foram acumulados por volta de 100 kg N/ha (SP 79-2312) e 87kg N/ha (SP 70-1143). Estes valores estão relativamente de acordo com os experimentos de ORLANDO FILHO et al. (1980) que apresentaram um acúmulo de N, dependendo do tipo de solo, entre 104 e 115 kg N/ha para a variedade CB 41-76, aos 18 meses após o plantio. No entanto, SILVEIRA (1985) trabalhando com dose de 450 kg N/ha observou uma diferença bastante significativa no acúmulo de nitrogênio pelas plantas que foram adubadas em relação aquelas não adubadas.

A ausência de diferenças significativas nas taxas de acúmulo de N neste experimento e a grande diferença apresentada por SILVEIRA (1985), podem ser em parte explicadas pelas características físicas dos solos apresentadas pelos dois experimentos. Poderíamos esperar uma eficiência maior da adubação nitrogenada no experimento de SILVEIRA (1985), pois o solo em questão apresentava textura argilosa, enquanto o solo do nosso experimento apresenta textura arenosa. Além das características do solo serem diferentes, podemos ainda citar a importância da diferença entre os genótipos e os fatores ambientais presentes nos dois experimentos, fatores que também estão envolvidos em questões como a absorção de nutrientes e resposta da cana-de-açúcar a adubação nitrogenada.

Neste experimento, o acúmulo de nitrogênio por volta de 100 kg/ha (apenas nos colmos), como também a pequena diferença observada na concentração e acúmulo de N entre plantas adubadas e não adubadas, somadas as características de um solo pobre, nos faz deparar com aspectos bastante especiais da cultura de cana-de-açúcar. BITTENCOURT et al. (1986) baseado em seus trabalhos com ^{15}N , que apresentaram eficiências baixíssimas de utilização do fertilizante nitrogenado, afirmam que a cana-de-açúcar pode ter condições de receber N de “outras fontes”, que não do fertilizante, e que este pode ser submetido a processos que o tornam indisponível à cana-de-açúcar. Estas “outras fontes”, também citadas por LIMA JÚNIOR (1982), seriam o N residual do solo e a fixação biológica do nitrogênio atmosférico (URQUIAGA et al., 1992), que em conjunto com outros mecanismos, formariam um “reservatório” suficiente para suprir todas as necessidades da cultura. Outro estudo que confirma esta tese é apresentado por SALCEDO et al. (1984), onde pode-se observar um acúmulo de até 250 kg de N/ha, pela planta cultivada em solo pobre, com textura arenosa e valor de N-total de apenas 0,06%.

Tabela 3: Acúmulo de matéria seca (kg/planta) nas raízes (A), colmos (B), palha (C) e folhas (D) de cana-de-açúcar das variedades SP 79-2312 e SP 70-1143, em diferentes épocas e nos tratamentos com e sem adubação nitrogenada. Média de quatro repetições

(A)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
3	0,008	0,008	0,008 b	0,010	0,008	0,009 c
6	0,532	0,411	0,472 b	0,231	0,196	0,214 bc
9	0,780	1,481	1,087 a	0,352	0,420	0,386 b
12	1,005	1,169	1,131 a	0,921	1,036	0,978 a
15	1,470	1,422	1,446 a	1,277	1,316	1,296 a
Total (média)	0,758	0,898		0,558	0,595	
Análise de variância						
coletas	0,0000*			0,0000*		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	43,06			43,57		

(B)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
6	1,409	1,337	1,373 c	0,623	0,488	0,555 c
9	2,168	2,459	2,313 bc	0,792	1,412	1,102 c
12	3,457	3,097	3,277 b	2,799	2,908	2,853 b
15	5,047	4,380	4,713 a	4,368	4,333	4,350 a
Total (média)	3,020	2,818		1,716	1,828	
Análise de variância						
coletas	0,0000*			0,0000*		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	27,32			42,24		

(C)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
6	0,602	0,417	0,509	0,354	0,138	0,246 c
9	0,303	0,437	0,369	0,442	0,541	0,492 b
12	0,398	0,465	0,431	0,749	0,751	0,750 a
15	0,344	0,399	0,371	0,647	0,683	0,665 ab
Total (média)	0,412	0,430		0,438	0,423	
Análise de variância						
coletas	N.S.			0,0001*		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	40,32			30,01		

(D)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
3	0,089	0,093	0,091 b	0,061	0,058	0,059 d
6	0,445	0,427	0,436 a	0,294	0,243	0,268 c
9	0,521	0,465	0,493 a	0,419	0,478	0,448 b
12	0,340	0,317	0,329 ab	0,744	0,810	0,777 a
15	0,239	0,262	0,251 b	0,636	0,427	0,531 b
TOTAL (média)	0,326	0,312		0,431	0,403	
Análise de variância						
coletas	0,0000*			0,0000*		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	40,41			25,48		

N.S. - diferenças não significativas entre médias a $P = 0,05$.* - Diferenças significativas entre médias a $P < 0,05$.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste TUKEY 5%: As letras diferenciam as médias entre as coletas.

Tabela 4: Concentração de nitrogênio (mg/g de M.S.) nas raízes (A), colmos (B), palha (C) e folhas (D) de cana-de-açúcar das variedades SP 79-2312 e SP 70-1143, em diferentes épocas e nos tratamentos com e sem adubação nitrogenada. Média de quatro repetições

(A)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
3	7,373	7,100	7,237 a	6,923	5,350	6,131 a
6	5,362	3,425	4,394 b	3,980	3,772	3,876 b
9	5,387	4,255	4,821 b	3,933	3,688	3,810 b
12	5,580	5,217	5,399 b	3,345	3,407	3,376 b
15	4,893	4,633	4,763 b	3,992	4,050	4,021 b
Total (média)	5,719 A	4,926 B		4,433	4,053	
Análise de variância						
coletas	0,0000*			0,0000*		
nitrogênio	0,0107*			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	17,19			20,09		

(B)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
6	4,657	3,165	3,911 a	3,345	3,185	3,265 a
9	3,230	2,480	2,855 b	3,100	3,055	3,078 a
12	3,072	2,915	2,994 ab	1,990	2,245	2,117 b
15	2,240	2,305	2,273 b	2,135	2,000	2,067 b
Total (média)	3,300 A	2,716 B		2,642	2,621	
Análise de variância						
coletas	0,0041*			0,0000*		
nitrogênio	0,0253*			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	24,54			15,56		

(C)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
6	3,400	3,275	3,338 b	3,943	3,658	3,800 a
9	4,895	3,920	4,408 a	3,440	3,252	3,346 a
12	3,505	3,262	3,384 b	2,855	2,717	2,786 b
15	3,528	2,910	3,219 b	3,501	3,203	3,358 a
Total (média)	3,832	3,342		3,438	3,208	
Análise de variância						
coletas	0,0092*			0,0000*		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	19,49			11,30		

(D)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
3	11,993	12,050	12,022 a	13,645	12,467	13,056 a
6	9,713	8,217	8,965 b	10,130	10,865	10,498 b
9	7,862	7,658	7,760 bc	8,462	10,110	9,286 bc
12	8,943	8,857	8,900 b	8,087	8,527	8,304 c
15	7,218	6,960	7,089 c	8,062	8,882	8,472 bc
TOTAL (média)	9,146	8,748		9,676	10,170	
Análise de variância						
coletas	0,0000*			0,0000*		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	13,02			14,36		

N.S. - diferenças não significativas entre médias a P = 0,05.

* - Diferenças significativas entre médias a P < 0,05.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste TUKEY 5%: As letras maiúsculas foram utilizadas para diferenciar as médias entre os tratamentos com e sem N. As letras minúsculas para diferenciar as médias entre as coletas.

Tabela 5: Acúmulo de nitrogênio (g de N/planta) nas raízes (A), colmos (B), palha (C) e folhas (D) de cana-de-açúcar das variedades SP 79-2312 e SP 70-1143, em diferentes épocas nos tratamentos com e sem adubação nitrogenada. Média de quatro repetições

(A)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
3	0,059	0,056	0,058 b	0,069	0,043	0,056 c
6	2,853	1,408	2,131 b	0,919	0,739	0,829 c
9	4,201	6,302	5,252 a	1,384	1,549	1,467 c
12	5,608	6,099	5,854 a	3,081	3,530	3,305 b
15	7,193	6,588	6,891 a	5,098	5,330	5,214 a
Total (média)	3,983	4,037		2,110	2,238	
Análise de variância						
coletas	0,0000*			0,0000*		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	50,18			46,73		

(B)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
6	6,562	4,232	5,397 c	2,080	1,554	1,817 c
9	7,003	6,086	6,545 bc	2,455	4,314	3,384 bc
12	10,620	9,028	9,824 ab	5,570	6,529	6,049 ab
15	12,345	10,096	11,221 a	9,326	8,666	8,993 a
Total (média)	9,133	7,370		4,858	5,265	
Análise de variância						
coletas	0,0000*			0,0001*		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	36,98			50,62		

(C)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
6	2,047	1,366	1,707	1,396	0,504	0,950 b
9	1,483	1,713	1,598	1,520	1,759	1,640 ab
12	1,395	1,517	1,456	2,138	2,040	2,089 a
15	1,214	1,161	1,188	2,265	2,188	2,226 a
Total (média)	1,535	1,439		1,830	1,623	
Análise de variância						
coletas	N.S.			0,0002*		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	47,89			32,43		

(D)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
3	1,067	1,120	1,094 c	0,832	0,723	0,777 c
6	4,322	3,509	3,916 a	2,978	2,640	2,809 b
9	4,096	3,561	3,829 a	3,546	4,833	4,189 b
12	3,041	2,808	2,925 ab	6,017	6,907	6,462 a
15	1,725	1,475	1,600 bc	5,127	3,793	4,460 b
TOTAL (média)	2,850	2,495		3,700	3,780	
Análise de variância						
coletas	0,0001*			0,0000*		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	39,66			32,19		

N.S. - diferenças não significativas entre médias a $P = 0,05$.* - Diferenças significativas entre médias a $P < 0,05$.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste TUKEY 5%: As letras diferenciam as médias entre as coletas.

A concentração de K apresentada pelas diversas partes da planta nas diferentes épocas de coleta, para os dois tratamentos, está demonstrada nas tabelas 6 A, B, C, D. Para ambas as variedades as raízes (tabela 6 A) apresentaram um rápido decréscimo na concentração deste elemento logo na segunda coleta aos 6 meses após o plantio, mantendo uma estabilidade a partir desta coleta. Os colmos (tabela 6 B) apresentaram comportamento semelhante as raízes, mostrando um decréscimo significativo do sexto para o nono mês. Em amostras de palha da variedade SP 79-2312, a concentração de K foi variável de acordo com a coleta e não foi observado um padrão definido, enquanto que para a variedade SP 70-1143 os teores de K na palha mantiveram-se relativamente estáveis (tabela 6 C). Nas folhas de SP 79-2312 ocorreu um decréscimo na concentração deste elemento após a segunda coleta, o mesmo ocorrendo logo após a primeira coleta na variedade SP 70-1143 (tabela 6 D). SILVEIRA (1985) também observou uma tendência geral para a concentração de K decrescer em função da idade. Pode-se observar que o K se acumula mais nas folhas novas e que, de acordo com MALAVOLTA & HAAG (1964), podem retirar K das folhas velhas e colmo, redistribuindo o elemento quando começam a tornar-se fisiologicamente inativas.

As tabelas 7 A, B, C, D mostram, para as duas variedades, a concentração de P nas diversas partes da planta nas diferentes épocas de coleta, para os dois tratamentos. Para a variedade SP 79-2312, enquanto raízes (tabela 7 A), palha (tabela 7 C) e folhas (tabela 7 D) mostraram uma tendência para o declínio da concentração deste elemento com o tempo e posterior estabilização, a concentração de P nos colmos (tabela 6 B) manteve-se relativamente estável desde o início, com pequenas oscilações. Para SP 70-1143, foi mostrado um declínio da concentração de P nas raízes após a primeira coleta, e posterior estabilização, enquanto para as outras partes a concentração deste elemento manteve-se relativamente estável. No trabalho de ORLANDO FILHO et al. (1980) as concentrações de fósforo no colmo apresentaram declínio do quarto ao oitavo

mês de idade, estabilizando-se a partir de então. Para as folhas ocorreu um declínio até o oitavo mês, e em seguida uma estabilização até os meses finais do ciclo considerado (ORLANDO FILHO et al. 1980). Já para MALAVOLTA & HAAG (1964), a absorção de fósforo não apresenta períodos preferenciais, indo continuamente do início ao fim do ciclo. Podemos notar também que, assim como o potássio e o nitrogênio, o teor de fósforo na palha é menor do que o encontrado nas folhas novas, indicando a capacidade de translocação deste elemento.

As variações nas concentrações de Ca e Mg, para as duas variedades, estão apresentadas nas tabelas 8 e 9. Com exceção das amostras de palha da variedade SP 70-1143 (tabela 8 C e 9 C) que apresentaram variações de acordo com a coleta, tanto para Ca quanto para Mg, as raízes (tabelas 8 A e 9 A), colmos (tabelas 8 B e 9 B), palha de SP 79-2312 e folhas (tabelas 8 D e 9 D), apresentaram concentrações de Ca e Mg com uma tendência a decrescer de acordo com a idade da planta. O mesmo padrão de variação destes elementos em função da idade da planta foi demonstrado por SILVEIRA (1985). Já nos trabalhos de ORLANDO FILHO et al. (1980) estes elementos não variaram muito de acordo com a idade da planta, apresentando apenas pequenas oscilações. Diferentemente do que ocorreu com N, K e P, os teores de Ca e Mg presentes, tanto nas folhas novas, quanto na palha, foram relativamente similares. MALAVOLTA & HAAG (1964), relatam que em trabalhos utilizando ^{45}Ca foi observado que este elemento é móvel, caminhando para todas as partes do colmo, como também para outros colmos da mesma touceira. Desse modo, não se pode explicar que o teor de Ca encontrado na palha seja equivalente ao encontrado nas folhas novas como, consequência da dificuldade de translocação deste elemento.

A concentração dos nutrientes K, P, Ca e Mg não foi estatisticamente diferente entre os tratamentos com e sem adubação nitrogenada, mesmo nas amostras de raízes e colmos da variedade SP 79-2312, que apresentaram uma maior concentração de N nas plantas adubadas. Estes resultados diferem dos resultados obtidos por SILVEIRA (1985), que trabalhando com plantas adubadas

com 450 kg N/ha, evidenciou um efeito positivo no acúmulo destes elementos na cultura da cana-de-açúcar. Esta diferença entre os resultados dos dois experimentos deve estar relacionada exatamente com a diferença entre plantas adubadas e não adubadas no que diz respeito a concentração de N, muito superior no experimento de SILVEIRA (1985).

São normais as diferenças que possam vir a ser notadas na composição mineral de acordo com a variedade analisada. MALAVOLTA & HAAG (1964) relatam que as quantidades dos elementos removidos, do mesmo solo, por variedades diversas podem diferir até em 100%.

Tabela 6: Concentração de potássio (mg/g de M.S.) nas raízes (A), colmos (B), palha (C) e folhas (D) de cana-de-açúcar das variedades SP 79-2312 e SP 70-1143, em diferentes épocas e nos tratamentos com e sem adubação nitrogenada.

Média de quatro repetições

(A)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
3	5,063	4,475	4,769 a	5,625	5,850	5,738 a
6	1,938	1,000	1,469 b	1,875	2,188	2,031 b
9	1,490	2,002	1,746 b	2,365	2,420	2,392 b
12	1,940	1,540	1,740 b	2,122	2,265	2,194 b
15	1,985	2,183	2,084 b	1,728	1,240	1,484 b
Total (média)	2,483	2,240		2,743	2,793	
Análise de variância						
coletas	0,0000*			0,0000*		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	46,68			44,60		

(B)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
6	3,125	2,125	2,625 a	2,313	2,438	2,375 a
9	1,075	1,508	1,291 b	1,112	1,027	1,070 b
12	2,077	1,410	1,744 b	1,628	1,483	1,555 ab
15	1,542	1,490	1,516 b	1,698	1,522	1,610 ab
Total (média)	1,955	1,633		1,688	1,617	
Análise de variância						
coletas	0,0012*			0,0094*		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	33,13			41,49		

(C)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
6	1,813	2,213	2,013 b	1,563	1,750	1,656
9	3,895	1,848	2,872 a	1,287	1,120	1,204
12	1,053	1,292	1,173 c	1,090	1,120	1,105
15	2,473	2,703	2,588 b	1,700	1,483	1,591
Total (média)	2,308	2,039		1,410	1,368	
Análise de variância						
coletas	0,0001*			N.S.		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	32,58			39,83		

(D)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
3	14,375	16,000	15,188 a	17,188	18,875	18,031 a
6	15,000	15,375	15,188 a	11,250	10,125	10,688 b
9	10,220	10,598	10,409 b	11,035	9,628	10,331 b
12	13,470	10,065	11,768 b	9,690	11,408	10,549 b
15	6,813	6,425	6,619 c	12,158	11,220	11,689 b
TOTAL (média)	11,976	11,693		12,264	12,251	
Análise de variância						
coletas	0,0000*			0,0000*		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	14,47			23,89		

N.S. - diferenças não significativas entre médias a $P = 0,05$.* - Diferenças significativas entre médias a $P < 0,05$.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste TUKEY 5%: As letras diferenciam as médias entre as coletas.

Tabela 7: Concentração de fósforo (mg/g de M.S.) nas raízes (A), colmos (B), palha (C) e folhas (D) de cana-de-açúcar das variedades SP 79-2312 e SP 70-1143, em diferentes épocas e nos tratamentos com e sem adubação nitrogenada.

Média de quatro repetições

(A)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
3	1,508	0,885	1,196 a	0,850	0,750	0,800 a
6	0,537	0,630	0,584 b	0,545	0,605	0,575 b
9	0,535	0,510	0,523 b	0,423	0,463	0,443 b
12	0,795	0,505	0,650 ab	0,563	0,587	0,575 b
15	0,500	0,485	0,492 b	0,537	0,422	0,480 b
Total (média)	0,775	0,603		0,583	0,565	
Análise de variância						
coletas	0,0118*			0,0000*		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	59,82			21,48		

(B)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
6	0,467	0,538	0,502	0,550	0,732	0,641
9	0,403	0,435	0,419	0,525	0,695	0,610
12	0,507	0,342	0,425	0,410	0,550	0,480
15	0,410	0,523	0,466	0,565	0,573	0,569
Total (média)	0,447	0,459		0,512	0,638	
Análise de variância						
coletas	N.S.			N.S.		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	29,89			33,06		

(C)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
6	0,532	0,477	0,505	0,328	0,442	0,385
9	0,445	0,425	0,435	0,590	0,445	0,517
12	0,265	0,232	0,249	0,322	0,318	0,320
15	0,248	0,235	0,242	0,350	0,298	0,324
Total (média)	0,373	0,342		0,397	0,376	
Análise de variância						
coletas	N.S.			N.S.		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	49,46			59,22		

(D)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
3	2,135	2,192	2,164 a	2,130	1,865	1,988 a
6	1,795	1,843	1,819 a	1,793	1,958	1,865 a
9	1,162	1,290	1,226 b	1,525	1,713	1,619 ab
12	1,330	1,263	1,296 b	1,783	1,688	1,735 ab
15	1,030	1,182	1,106 b	1,200	1,333	1,266 b
TOTAL (média)	1,490	1,554		1,682	1,711	
Análise de variância						
coletas	0,0000*			0,0024*		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	18,72			19,93		

N.S. - diferenças não significativas entre médias a $P = 0,05$.* - Diferenças significativas entre médias a $P < 0,05$.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste TUKEY 5%: As letras diferenciam as médias entre as coletas.

Tabela 8: Concentração de cálcio (mg/g de M.S.) nas raízes (A), colmos (B), palha (C) e folhas (D) de cana-de-açúcar das variedades SP 79-2312 e SP 70-1143, em diferentes épocas e nos tratamentos com e sem adubação nitrogenada. Média de quatro repetições

(A)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
3	2,875	2,750	2,813 a	2,750	3,000	2,875 a
6	2,125	2,00	2,063 b	1,875	2,250	2,063 b
9	1,518	1,442	1,480 c	1,372	1,050	1,211 cd
12	1,487	1,238	1,363 c	1,325	1,450	1,388 c
15	0,743	0,645	0,694 d	0,605	0,685	0,645 d
Total (média)	1,750	1,615		1,585	1,687	
Análise de variância						
coletas	0,0000*			0,0000*		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	20,17			23,66		

(B)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
6	1,875	1,625	1,750 a	2,125	2,250	2,188 a
9	1,550	1,387	1,469 a	1,450	1,250	1,350 b
12	0,445	0,375	0,410 b	0,782	0,627	0,705 c
15	0,428	0,437	0,433 b	0,338	0,295	0,316 d
Total (média)	1,074	0,956		1,174	1,106	
Análise de variância						
coletas	0,0000*			0,0000*		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	38,54			18,63		

(C)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
6	5,625	5,625	5,625 a	4,375	4,375	4,375 a
9	4,868	4,203	4,536 b	2,095	2,530	2,313 b
12	4,800	4,238	4,519 b	3,950	3,675	3,813 a
15	3,798	3,757	3,778 b	2,553	2,470	2,511 b
Total (média)	4,772	4,456		3,243	3,263	
Análise de variância						
coletas	0,0026*			0,0000*		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	16,91			17,28		

(D)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
3	5,250	4,875	5,063 a	4,125	4,875	4,500 a
6	3,250	3,375	3,313 b	3,375	3,875	3,625 ab
9	2,777	2,760	2,769 bc	2,412	2,960	2,686 b
12	3,800	2,925	3,363 b	3,000	2,850	3,225 b
15	2,085	1,792	1,939 c	3,325	3,205	3,265 b
TOTAL (média)	3,433	3,146		3,368	3,553	
Análise de variância						
coletas	0,0000*			0,0001*		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	19,09			18,72		

N.S. - diferenças não significativas entre médias a $P = 0,05$.* - Diferenças significativas entre médias a $P < 0,05$.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste TUKEY 5%: As letras diferenciam as médias entre as coletas.

Tabela 9: Concentração de magnésio (mg/g de M.S.) nas raízes (A), colmos (B), palha (C) e folhas (D) de cana-de-açúcar das variedades SP 79-2312 e SP 70-1143, em diferentes épocas e nos tratamentos com e sem adubação nitrogenada.

Média de quatro repetições

(A)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
3	1,000	1,000	1,000 a	0,750	0,750	0,750 a
6	0,625	0,615	0,620 b	0,500	0,500	0,500 b
9	0,525	0,520	0,523 b	0,460	0,585	0,522 b
12	0,655	0,527	0,591 b	0,538	0,570	0,554 ab
15	0,492	0,500	0,496 b	0,605	0,407	0,506 b
Total (média)	0,660	0,632		0,570	0,562	
Análise de variância						
coletas	0,0000*			0,0159*		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	17,24			27,19		

(B)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
6	1,225	1,000	1,113 a	1,125	1,200	1,163 a
9	0,748	0,890	0,819 b	0,637	0,850	0,748 b
12	0,715	0,647	0,681 b	0,600	0,605	0,602 b
15	0,755	0,747	0,751 b	0,693	0,775	0,734 b
Total (média)	0,836	0,821		0,764	0,859	
Análise de variância						
coletas	0,0001*			0,0000*		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	16,62			23,25		

(C)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
6	1,625	1,500	1,563 a	1,500	1,500	1,500 a
9	1,120	1,190	1,155 b	0,947	0,980	0,964 bc
12	0,735	0,680	0,708 c	0,710	0,840	0,775 c
15	0,855	0,825	0,840 c	1,323	1,095	1,209 ab
Total (média)	1,306	1,055		1,120	1,104	
Análise de variância						
coletas	0,0000*			0,0006*		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	17,47			26,85		

(D)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
3	2,375	2,125	2,250 a	2,375	2,250	2,313 a
6	0,875	1,250	1,063 b	1,750	1,875	1,813 b
9	1,057	1,157	1,107 b	1,222	1,582	1,402 bc
12	0,957	0,770	0,864 b	1,190	1,125	1,158 c
15	0,813	0,963	0,888 b	1,445	1,460	1,453 bc
TOTAL (média)	1,215	1,253		1,597	1,659	
Análise de variância						
coletas	0,0000*			0,0000*		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	30,83			17,30		

N.S. - diferenças não significativas entre médias a $P = 0,05$.* - Diferenças significativas entre médias a $P < 0,05$.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste TUKEY 5%: As letras diferenciam as médias entre as coletas.

1.2. Avaliação do número de células das bactérias *Acetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. presentes nas raízes e base do colmo das plantas de cana-de-açúcar, nas diversas coletas e nos tratamentos com e sem adubação nitrogenada.

Como pode ser observado nas tabela 10, a população de bactérias *Herbaspirillum* spp. presentes nas raízes ou na base do colmo das plantas coletadas, não sofreu uma variação significativa de acordo com a época de coleta ou prática da adubação nitrogenada. No entanto, os números de *A. diazotrophicus* (tabela 11) presentes nas raízes e na base do colmo das plantas amostradas, apresentaram variações devido a época de coleta (em ambas as variedades de cana-de-açúcar) e adubação nitrogenada (variedade SP 79-2312).

A bactéria *A. diazotrophicus*, nas duas variedades, apresentou-se com números mais reduzidos, tanto nas raízes, quanto na base do colmo, nas coletas aos 3 e 6 meses após o plantio. Nas coletas posteriores, aos 9 e 12 meses, esta bactéria mostrou um incremento populacional e os números voltaram a decrescer na coleta aos 15 meses. Mesmo sem apresentar diferenças estatísticas significativas, as bactérias do gênero *Herbaspirillum* spp. apresentaram um padrão similar ao revelado por *A. diazotrophicus*.

Podemos sugerir que as variações do número de bactérias, principalmente *A. diazotrophicus*, observadas na tabela 11, sejam explicadas por fatores ambientais, neste caso, principalmente pelas taxas de precipitação pluviométrica. Ao se observar a figura 1 nota-se que a primeira coleta (25/07/1995) se dá no meio de um período de baixa taxa de precipitação pluviométrica, assim como a segunda coleta (04/11/1995). Apesar do aumento das taxas de precipitação no mês de outubro, foi feita após a planta ter passado por um longo período onde as chuvas eram relativamente escassas. Exatamente nestas duas coletas, a população de *A. diazotrophicus* apresentou os mais baixos números.

Nas duas coletas posteriores, 25/01/1996 (praticamente no meio do período das chuvas), e 05/05/1996 (ao final do período das chuvas), foi possível a contagem de um número maior de bactérias, número este que voltou a decrescer na última coleta (05/08/1996), novamente em um período de baixa precipitação.

A influência dos fatores ambientais, principalmente estresse hídrico e variação sazonal, sobre o processo de fixação biológica de nitrogênio e populações de microrganismos fixadores de nitrogênio, foi demonstrada em trabalhos como o de COSTA & RUSCHEL (1981) e BELLONE et al. (1996). O primeiro trabalho sugere que a distribuição de microrganismos fixadores de N_2 sofre influência em razão da época do ano, mostrando que a atividade de microrganismos no interior do colmo foi bastante irregular na primavera, sendo relativamente uniforme no verão, e caindo bruscamente no outono. Já o trabalho de BELLONE et al. (1996) mostra que em solos com progressiva deficiência hídrica (mais de 20 dias), as plantas de cana-de-açúcar apresentaram baixos níveis de atividade de redução de acetileno (ARA) associados a um baixo número de microrganismos por grama de raiz.

Ao analisarmos os dados deste experimento, podemos sugerir que a população da bactéria *A. diazotrophicus* no interior da cana-de-açúcar, seja sensível a fatores como estresse hídrico e variações sazonais. *Herbaspirillum* spp. parece não sofrer influência tão drástica. As próprias características de bactérias do gênero *Herbaspirillum* (principalmente *H. seropedicae*), quando comparadas com *A. diazotrophicus*, como maior sobrevivência no solo, capacidade de se manter no solo em estado viável não cultivável e um espectro mais amplo de hospedeiros (BALDANI et al., 1997), permite-nos sugerir que esta bactéria seja mais adaptável as diferenças ambientais.

As alterações sofridas no metabolismo da planta de cana-de-açúcar na temporada de chuvas escassas já é conhecida. A paralização do crescimento vegetal, o acúmulo de carboidratos e a diminuição das taxas de fotossíntese,

ocasionada pelo fechamento dos estômatos, para que a planta não perca água, são mudanças que ocorrem nestas plantas quando em estresse hídrico, e que podem afetar a população de bactérias que residem no interior do vegetal, principalmente aquelas que estão mais intimamente associadas a planta, como acredita-se ser o caso de *A. diazotrophicus*.

As tabelas 10 e 11, mostram que a população de *A. diazotrophicus* também é mais sensível a aplicação de fertilizantes nitrogenados, em comparação a *Herbaspirillum*. Os números de *A. diazotrophicus* presentes nas raízes e base do colmo de cana-de-açúcar variedade SP 79-2312, ao longo do experimento, foram significativamente menores em plantas que foram adubadas com nitrogênio, em comparação com aquelas que não sofreram adubação nitrogenada. Já em plantas da variedade SP 70-1143 não foram observadas diferenças relativas ao número de células de *A. diazotrophicus* em amostras de plantas adubadas e não adubadas com N. É importante lembrar que apenas a variedade SP 79-2312 mostrou maior concentração de nitrogênio nos tecidos das raízes e colmos das plantas adubadas, sendo provavelmente esta, a principal razão para que estas plantas tenham apresentado as diferenças demonstradas.

A influência de altas doses de adubo nitrogenado sobre bactérias da espécie *A. diazotrophicus* em cana-de-açúcar já foi relatada por FUENTES-RAMIREZ et al. (1993) e MUTHUKUMARASAMY (1995). Estes autores observaram que a percentagem de isolados de *A. diazotrophicus*, em plantas não adubadas ou adubadas com pouco nitrogênio, era muito superior a encontrada em plantas adubadas com altas doses deste nutriente (300 kg N/ha). RIVERA et al. (1991), também trabalhando com cana-de-açúcar, obtiveram resultados em experimento de campo, que mostravam a inibição de microrganismos diazotróficos pela presença de altas concentrações de N mineral. Estes mesmos autores também observaram que esta inibição desapareceu quando ocorreu um decréscimo dos teores de N

mineral no solo, o que explicou o aumento da atividade destes organismos no tratamento fertilizado após os seis meses de idade.

É provável que as alterações provocadas pelo nitrogênio na fisiologia da planta de cana-de-açúcar, sejam as responsáveis pela inibição da presença de *A. diazotrophicus*, em plantas submetidas a altas doses de N mineral. A diminuição das concentrações de sacarose (ALEXANDER, 1964), concentração de açúcares redutores e açúcares totais (CROCOMO et al., 1981), são algumas das alterações que ocorrem em plantas adubadas com altas doses de nitrogênio e que podem ter influência sobre as bactérias da espécie *A. diazotrophicus*.

De maneira geral os números de bactérias encontrados neste experimento foram relativamente baixos, provavelmente devido as limitações intrínsecas ao método utilizado. LI & MACRAE (1992), relataram que a metodologia do NMP pode subestimar os valores de contagem de microrganismos, e observaram que as populações de *A. diazotrophicus* estimadas por este método eram geralmente 2-10 vezes menores do que os valores correspondentes avaliados pelo método de ELISA.

Tabela 10: Log do número de *Herbaspirillum* spp. em raízes (A) e na base de colmos (B) de cana-de-açúcar das variedades SP 79-2312 e SP 70-1143, em diferentes épocas e nos tratamentos com e sem adubação nitrogenada. Média de quatro repetições.

(A)						
Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
3	3,200	3,150	3,175	4,225	3,675	3,950
6	2,565	2,815	2,690	3,115	3,695	3,405
9	4,345	4,800	4,573	4,275	4,450	4,362
12	3,595	4,300	3,948	3,525	3,950	3,737
15	3,875	3,500	3,688	3,115	4,500	3,808
Total (média)	3,516	3,713		3,651	4,054	
Análise de variância						
coletas	N.S.			N.S.		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	35,72			34,94		
(B)						
Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
3	2,110	1,480	1,795	1,760	2,110	1,935
6	1,480	1,480	1,480	2,110	2,040	2,075
9	2,200	1,760	1,980	2,140	2,040	2,090
12	2,070	2,040	2,055	2,420	2,700	2,560
15	1,860	1,890	1,875	2,040	2,040	2,040
Total (média)	1,944	1,730		2,094	2,186	
Análise de variância						
coletas	N.S.			N.S.		
nitrogênio	N.S.			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	32,65			34,43		

N.S. - diferenças não significativas entre médias a P = 0,05.

Tabela 11: Log do número de *Acetobacter diazotrophicus* em raízes (A) e na base de colmos (B) de cana-de-açúcar das variedades SP 79-2312 e SP 70-1143, em diferentes épocas e nos tratamentos com e sem adubação nitrogenada. Média de quatro repetições.

(A)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
3	1,480	1,480	1,480 b	1,480	1,480	1,480 c
6	1,480	1,480	1,480 b	1,480	1,480	1,480 c
9	2,240	3,625	2,933 a	3,345	3,775	3,560 a
12	2,240	3,125	2,683 a	2,845	3,100	2,973 ab
15	2,170	2,095	2,133 ab	2,245	2,600	2,422 b
Total (média)	1,922 B	2,361 A		2,279	2,487	
Análise de variância						
coletas	0.0001 *			0.0000 *		
nitrogênio	0,0403 *			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	30,10			25,31		

(B)

Coletas (meses após o plantio)	Tratamento					
	SP 79-2312			SP 70-1143		
	Com N	Sem N	Total (média)	Com N	Sem N	Total (média)
3	1,480	1,760	1,620 bc	1,480	1,480	1,480 b
6	1,480	1,480	1,480 c	1,480	1,480	1,480 b
9	1,860	2,720	2,29 ab	2,295	2,015	2,155 a
12	1,860	3,100	2,48 a	2,295	2,775	2,535 a
15	1,685	1,890	1,787 abc	1,480	1,480	1,480 b
Total (média)	1,673 B	2,190 A		1,806	1,846	
Análise de variância						
coletas	0,0008 *			0,0000 *		
nitrogênio	0,0020 *			N.S.		
interação	N.S.			N.S.		
CV %	24,68			19,73		

N.S. - diferenças não significativas entre médias a $P = 0,05$.

* - Diferenças significativas entre médias a $P < 0,05$.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste TUKEY 5%: As letras maiúsculas foram utilizadas para diferenciar as médias entre os tratamentos com e sem N. As letras minúsculas para diferenciar as médias entre as coletas.

EXPERIMENTO 2 - Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação de *A. diazotrophicus* e *Herbaspirillum seropedicae* sobre o crescimento inicial de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar.

Nas figuras 2 (A) e 3 (A) pode-se observar o efeito da inoculação das bactérias e da fertilização nitrogenada sobre as raízes das plântulas aos 20 dias após a implantação do experimento. Em relação ao peso fresco das raízes (figura 2) não houve diferenças significativas ($\alpha = 5\%$) entre os tratamentos. Quanto ao parâmetro comprimento (figura 3), de maneira geral a fertilização nitrogenada causou um significativo efeito negativo. Plantas que não foram adubadas com nitrogênio apresentaram raízes mais finas e alongadas, enquanto as plantas adubadas com nitrogênio apresentaram raízes curtas e grossas.

Sendo nitrato de amônio o fertilizante utilizado neste experimento, é provável que os efeitos deletérios provocados nas raízes das plantas sejam devidos principalmente aos íons NH_4^+ , já que esta forma de nitrogênio inorgânico é citada como a mais tóxica para a maioria das plantas (GOYAL & HUFFAKER, 1984), e mesmo altos níveis de NO_3^- são tolerados sem provocar nenhum distúrbio fisiológico. Em geral os íons NH_4^+ são mais deletérios ao crescimento das raízes do que da parte aérea (BENNETT et al., 1964; HAYNES & GOH, 1977). ANDERSON et al. (1991) relataram que as raízes de plantas adubadas com NH_4 tiveram sua alongação retardada, limitando momentaneamente o volume de solo explorado pelo sistema radicular. OLIVARES (1997), demonstra um efeito deletério marcante da fertilização nitrogenada no desenvolvimento inicial de plântulas de cana-de-açúcar, comprometendo o crescimento de raízes e parte aérea aos 12 e 24 dias após a inoculação.

Observando as figuras 2 (A e B), 3 (A e B) e figura 6 (fotografia das raízes) podemos notar que as raízes de plantas inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* (estirpe HRC 54) apresentam uma tendência de possuir maior peso de matéria fresca e comprimento que os demais tratamentos. Esta característica pode

ser devido a produção de hormônios vegetais como o ácido indolacético (AIA) ou outros compostos capazes de promover o crescimento das plantas. A produção de AIA por bactérias do gênero *Azospirillum* (PATTEN & GLICK, 1996) e também por *Acetobacter diazotrophicus* (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1993) tem sido relatada, mas em relação a *Herbaspirillum* pouco se sabe.

Os resultados relacionados com a parte aérea das plantas aos 20 dias após a implantação do experimento (figuras 4 A e 5 A) mostram que ao contrário do que aconteceu com as raízes, houve um incremento nos parâmetros peso e comprimento em plantas adubadas com nitrogênio. A tabela 12 mostra um resultado interessante, onde plantas adubadas com nitrogênio e inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* diferem-se estatisticamente do controle não inoculado e adubado com nitrogênio. Estes dados podem ser explicados pelo fato de que as raízes de plantas inoculadas com *H. seropedicae* não foram tão drasticamente afetadas quanto as raízes do controle, não tendo portanto, a captação e absorção de nutrientes muito diminuída devido ao fato de apresentar um sistema radicular pouco desenvolvido, o que provavelmente deve ter acontecido com o controle + N.

Tabela 12 - Peso de matéria fresca de parte aérea (PFpa) e comprimento da parte aérea (Cpa) em plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar var. Na 56-79 adubadas com o equivalente a 300 kg N/ha 20 dias após a implantação do experimento.

TRATAMENTO	PFpa (g)	Cpa (cm)
H. seropedicae (HRC 54)	1,427 A	48,37 A
A. diazotrophicus (PAL 5)	1,265 AB	46,57 AB
Controle	0,808 B	29,87 B
CV (%)	31,44	27,14

Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Os resultados da segunda coleta aos 40 d.a.i. mostram que o comprimento das raízes (figura 2 B) ainda é significativamente maior em plantas que não foram adubadas com nitrogênio. Em relação a parte aérea, as plantas adubadas com nitrogênio apresentaram maior peso e comprimento (figuras 4 B e 5 B) do que aquelas não adubadas, não apresentando, no entanto, as diferenças entre tratamentos demonstrada na primeira coleta. Provavelmente o desenvolvimento apresentado na segunda coleta pelas raízes do controle + N foi suficiente para a absorção dos nutrientes que iriam suprir o desenvolvimento da parte aérea. Em um experimento similar, OLIVARES (1997) mostrou que, aos 64 dias após a inoculação, as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos já não mais existiam para as raízes, enquanto que em relação a parte aérea, o tratamento nitrogenado foi superior aos demais. O autor sugere que a partir dos 64 dias após a inoculação, os efeitos deletérios do N desapareceram, presumivelmente em função das perdas de N do sistema ou nitrificação do amônio (GOYAL & HUFFAKER, 1984), favorecendo assim o crescimento concomitante das raízes e parte aérea em concentrações não tóxicas de nitrogênio.

OLIVARES (1997) cita que em seu experimento, a elevada variabilidade no vigor e tamanho das plântulas micropropagadas contribuíram para o aumento da variância do erro experimental, mascarando a variação devido ao tratamento e gerando médias do tratamento não inoculado não diferentes estatisticamente do controle inoculado. Além disto, o fato de que bactérias do gênero *Azospirillum* e *Herbaspirillum*, terem sido também encontradas nas plantas controle em número ao redor de 10^3 células.g⁻¹, pode ter tido influência na reduzida resposta das plantas a inoculação. A contaminação das plantas nestas condições não é um fato incomum. BASHAN (1991) verificou que plantas inoculadas com *Azospirillum brasilense*, causaram a contaminação de plantas controle via transmissão pelo ar, e OLIVARES (1997) relata que a contaminação do controle não inoculado por *Azospirillum* spp. tem sido bem frequente em condições de casa-de-vegetação. No

caso das bactérias *Herbaspirillum*, vidros com o meio JNFb semi-sólido foram abertos e dispersos aleatoriamente na área experimental e após 18 h estes frascos foram recolhidos e levados a incubação por 5 a 7 dias. Depois deste período, alguns frascos apresentaram crescimento positivo e possibilitaram o isolamento de bactérias do gênero *Herbaspirillum*. Estes isolados provavelmente são *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 provenientes das plantas inoculadas e que teriam sido transmitidas via ar ou arrastadas junto a água de irrigação das folhas, que era feita com a utilização de um atomizador.

Figura 2 - Peso de matéria fresca das raízes aos 20 (A) e 40 (B) dias após a implantação (d.a.i) do experimento.

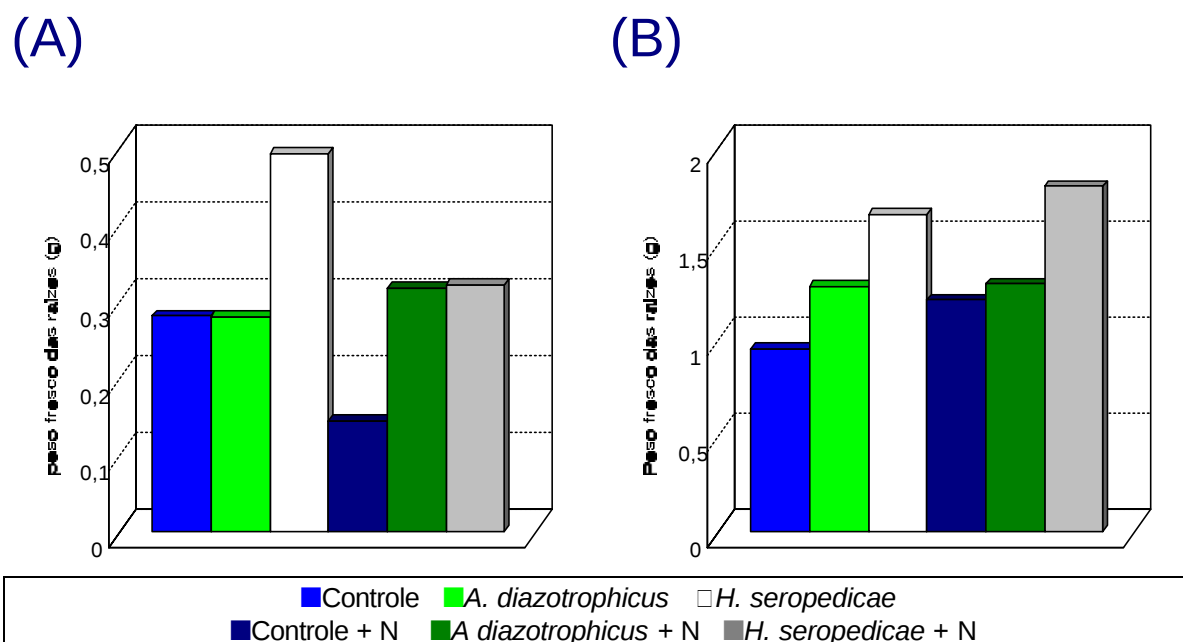


Figura 3 - Comprimento das raízes aos 20 (A) e 40 (B) d.a.i.

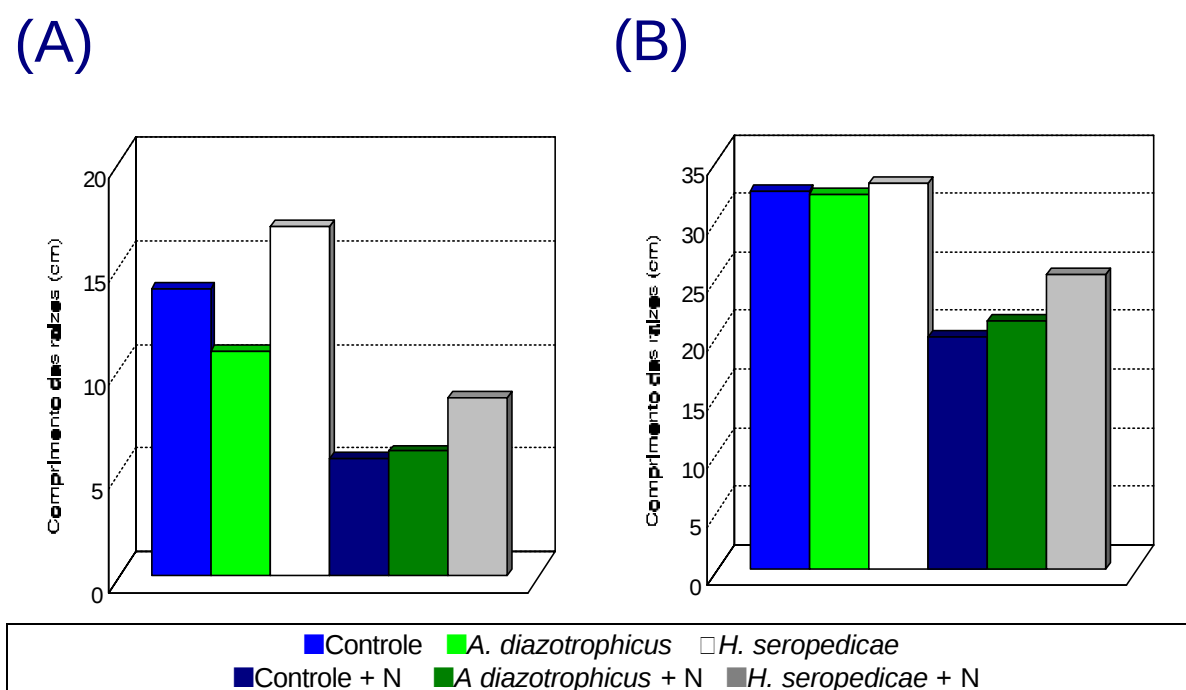


Figura 4 - Peso de matéria fresca da parte aérea aos 20 (A) e 40 (B) dias após a implantação (d.a.i) do experimento.

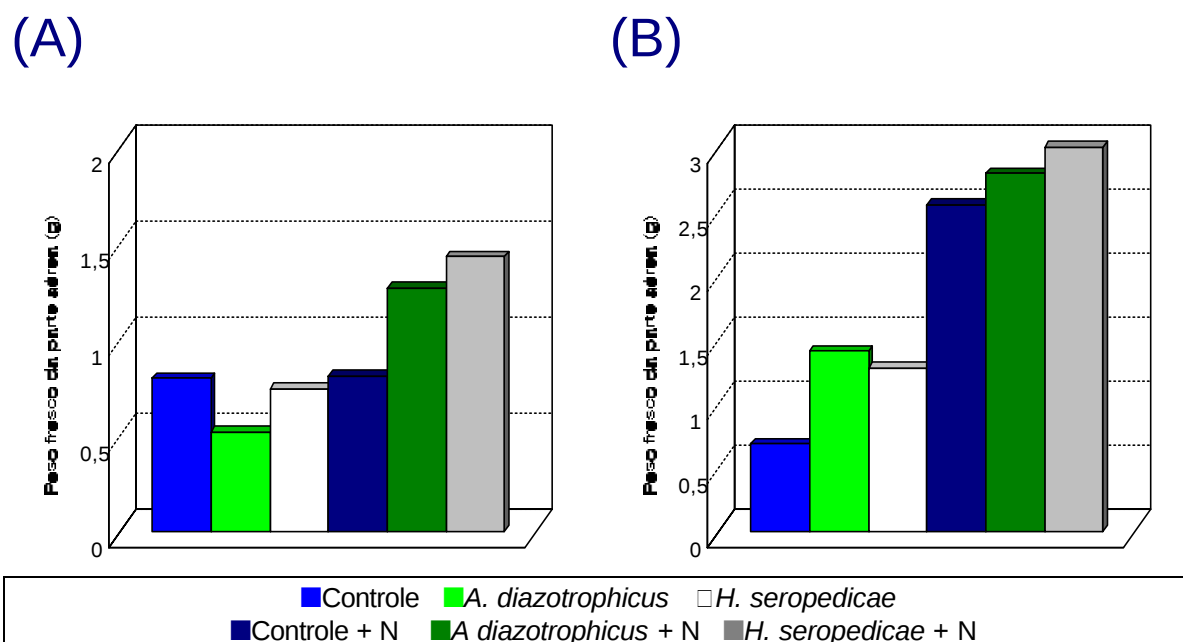


Figura 5 - Comprimento da parte aérea aos 20 (A) e 40 (B) d.a.i.

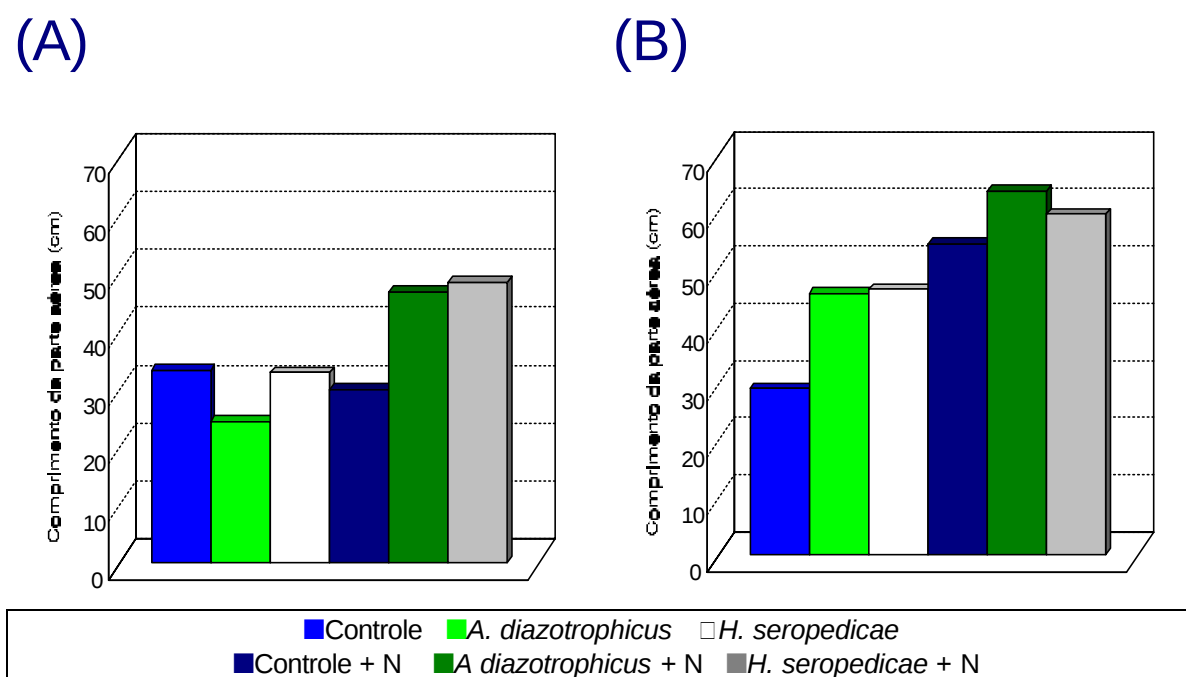


Figura 6: Efeito da inoculação com *H. seropedicae* e adubação nitrogenada sobre o desenvolvimento das raízes de plântulas de cana-de-açúcar (var. Na 56-79)

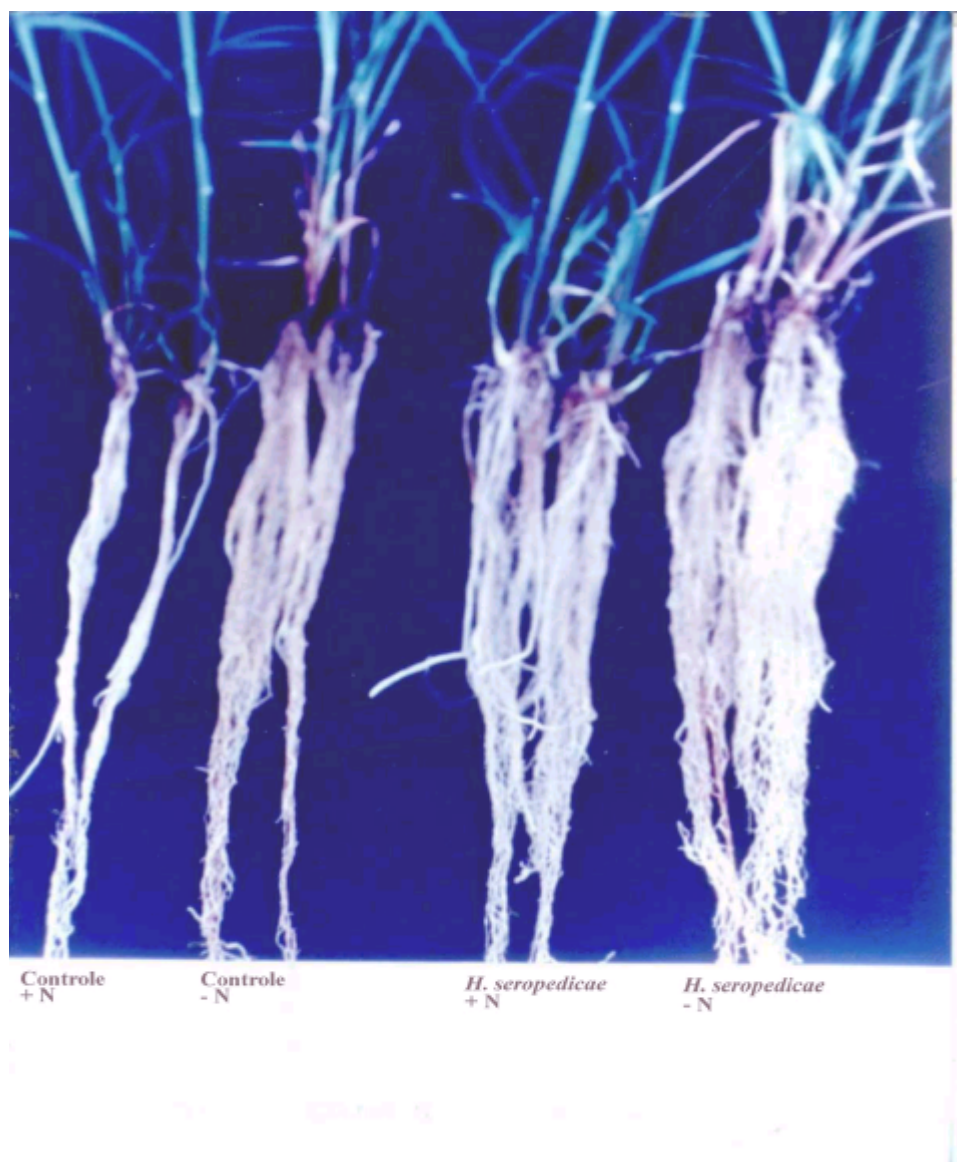


Tabela 13 - Comparações entre as médias das populações de bactérias *Herbaspirillum seropedicae* e *Acetobacter diazotrophicus* entre plantas adubadas e não adubadas (teste t de student para $\alpha = 5\%$).

TRATAMENTO	1ª COLETA	2ª COLETA	
	log nº de bactérias/g planta	log nº de bactérias/g RAIZ	PARTE AÉREA
<i>A. diazotrophicus</i> - N	3,12 n.s.	2,96 n.s.	2,15
<i>A. diazotrophicus</i> + N	2,74	2,24	2,32 n.s.
<i>H. seropedicae</i> - N	6,21 n.s.	5,19 n.s.	4,44 n.s.
<i>H. seropedicae</i> + N	5,42	4,45	4,11

n.s. médias não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste t de student

Apesar da tendência das plantas não adubadas com N, apresentarem um número maior de células de *A. diazotrophicus*, estas diferenças não foram estatisticamente significativas (tabela 13). A queda brusca da população destes microrganismos nas plantas, tanto adubadas quanto não adubadas, pode ter mascarado algum efeito deletério que a adubação com N poderia provocar sobre a população destes microrganismos. REIS (1994) sugere que a diminuição da população de *A. diazotrophicus* nestas plantas, seja devida a mudanças metabólicas drásticas que ocorrem quando estas são retiradas do meio MS e transplantadas para vasos com areia e vermiculita. Com o transplante das plantúlas surgem as necessidades do suprimento de carbono via fotossíntese, do desenvolvimento do sistema radicular em um substrato sólido e de viver sob uma atmosfera com teores reduzidos de umidade, o que faz com que a planta sofra alguns estresses nesta aclimação inicial.

Na tabela 13 pode-se observar que a população de *H. seropedicae* não sofreu uma queda tão brusca quanto *A. diazotrophicus*, e também não mostrou diferenças entre seu número nas plantas adubadas, quando comparadas com as plantas não adubadas, o que está de acordo com o observado no experimento com plantas no campo (EXPERIMENTO 1)

CONCLUSÕES

EXPERIMENTO 1 - Efeito da adubação nitrogenada sobre a população natural de *A. diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. nas variedades de cana-de-açúcar SP 79-2312 e SP 70-1143.

- 1) As plantas da variedade SP 79-2312 adubadas com N apresentaram, de maneira geral, uma maior concentração deste elemento nas raízes e colmos.
- 2) A população de bactérias da espécie *A. diazotrophicus* em plantas da variedade SP 79-2312 adubadas com nitrogênio, foi inferior a encontrada em plantas controle não adubadas com N.
- 3) A população de bactérias da espécie *A. diazotrophicus* diminuiu nas coletas coincidentes com os períodos de baixa precipitação pluviométrica.
- 4) Os números de *Herbaspirillum* spp. não sofreram influência devido aos níveis de adubação nitrogenada ou da época de coleta.

EXPERIMENTO 2 - Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação de *A. diazotrophicus* e *Herbaspirillum seropedicae* sobre o crescimento inicial de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar.

1) A adubação nitrogenada causou um efeito inibitório ao crescimento inicial das raízes das plântulas.

2) Plântulas inoculadas com *H. seropedicae* apresentaram maior desenvolvimento das raízes.

3) A parte aérea de plântulas adubadas e inoculadas com *H. seropedicae* foram estatisticamente superiores ao controle não inoculado.

4) Não houve diferenças entre o número das bactérias em plântulas adubadas e não adubadas com N. Porém os números de *A. diazotrophicus* sofreram uma queda brusca com a transferência das plântulas para um substrato sólido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, A.G. Sucrose-enzyme relationship in immature sugarcane affected by varying levels of nitrate and potassium supplied in sand culture. **Journal Agriculture of the University of Porto Rico**, Rio Piedras, v. 47, p. 165-229, 1964.
- ANDERSON, D.S. Nitrogen form effects on early corn root morphological and anatomical development. **Journal of plant nutrition**, v. 14, p. 1255-1266, 1991.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R. & DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 911-922, 1997.
- BATAGLIA, O.C; QUAGGIO, J.A.; BRUNINI, O. & CIARELLI, D.M. Adubação nitrogenada e ajustamento osmótico em milho e sorgo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 659-665, 1985.
- BELLONE, C.H.; BELLONE, S.C. & PEDRAZA, R.O. Hydric deficiency and acetylene reduction in sugar cane roots. In: **7th International Symposium Nitrogen Fixation With Non-Legumes**, Faisalabad, Pakistan, Abstracts p. 125-126, 1996.

- BENNETT, W.F.; PESAK, J. & HANWAY, J.J. Effect of NO_3^- and NH_4^+ on growth of corn in nutrient solution sand culture. **Agronomy Journal**, v. 56, p. 342-345, 1964.
- BITTENCOURT, V.C.; FAGANELLO, B.F. & SALATA, J.C. Eficiência da adubação nitrogenada em cana-de-açúcar (planta). **STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 5, p. 25-29, 1986.
- BODDEY, R.M. Biological nitrogen fixation in sugar cane: A key to energetically viable biofuel production. **Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v. 14, p. 263-279, 1995.
- BODDEY, R.M.; DE OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D. & DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 90, p. 195-209, 1995a.
- BODDEY, R.M.; REIS, V.M.; URQUIAGA, S.; SILVA, L.G.; REIS, F.B.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. N_2 fixation in sugar cane: the role of *Acetobacter diazotrophicus*. In: **Nitrogen fixation: Fundamentals and Applications**. Tikhonovich, I.A.; Rovorov, N.A. & Newton, W.E., Eds. Kluwer Academic, Dordrecht, p. 641-646, 1995b.
- CATANI, R.A.; ARRUDA, H.C.; PELEGRINO, D. & BERGAMIN FILHO, H. A absorção de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre pela cana-de-açúcar Co 419 e seu crescimento em função da idade. **Anais da ESALQ**, Piracicaba, v. 16, p. 167-190, 1959.
- CLEMENTS, H.F. **Sugarcane Crop Logging and Crop Control: Principles and Practices**. University Press of Hawai, 520 p., 1980.
- COSTA, J.M.T.F. & RUSCHEL, A.P. Seasonal variation in the microbial populations of sugar-cane plants. In: **Associative N_2 - fixation vol II**, VOSE, P.B. & RUSCHEL, A.P., eds. CRC Press, Boca Raton, p. 109-118, 1981.

- CROCOMO, O.J.; SILVEIRA, J.A.G. & ALEJO, N.O. Formas nitrogenadas e metabolismo de açúcares e crescimento em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) cv. NA 56-79. In: **Congresso Nacional da Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil**. Rio de Janeiro, Anais, p. 282-304, 1981.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D. & REIS, V.M. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: **Azospirillum VI and related microorganisms**, Fendrik, I.; del Gallo, M.; Vanderleyden, J. & de Zamaroczy, M. Eds. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p 3-14, 1995a.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D. E BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. - **Brasília: EMBRAPA-SPI : Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB**, 60p, 1995b.
- EMBRAPA - Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos (Rio de Janeiro). **Manual de métodos de análise do solo**. Rio de Janeiro: SNLCS, 1979.
- FRANCO, A.A. & DÖBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathologica**, v. 20, p. 68-74, 1994.
- FUENTES-RAMIREZ, L.E.; JIMENEZ-SALGADO, I.R.; ABARCA-OCAMPO AND CABALLERO-MELLADO. *Acetobacter diazotrophicus*, an indolacetic acid producing bacterium isolated from sugar cane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 154, p.145-150, 1993.
- GOYAL, S.S. & HUFFAKER, R.C. Nitrogen toxicity in plants. In: **Nitrogen in crop production**. Ed. Hauck, R.D., American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, p. 97 - 118, 1984.
- HAYNES, R.J. & GOH, K.M. Evaluation of potting media for commercial plants. II. Effects of media, fertilizer nitrogen and nitrification inhibitor on yield and

- nitrogen uptake of *Callistephus chinensis* (L.) Nees "Pink Princess". **New Zeland Journal of Agriculture Research**, v. 20, p. 371 - 381, 1977.
- HENDRE, R.R.; IYOR, R.S.; KOTWALM, M.; KLUSPE, S.S & MASCARENHAS, A.F. Rapid multiplication of sugar cane by tissue culture. **Sugar cane**, Port Tabolt, v.1, p. 5-8, 1983.
- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.T. California Agriculture Experiment Station Circular 347, **University of California**, Berkley, 1950
- HUMBERT, R.P. The nutrition of sugar cane. **The growing of sugar cane**, Amsterdam, Elsevier, p. 133-163, 1968.
- LI, R. & MACRAE, I.C. Specific identification and enumeration of *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 24, p. 413-419, 1992.
- LIMA JÚNIOR, M.A. Nitrogen nutrition of sugar cane in N.E. Brazil. **University of Saskatchewan**, Ph.D. Thesis, 1982.
- MALAVOLTA, E. & HAAG, H.P. Nutrição e adubação. In: **Cultura e adubação da cana-de-açúcar**, Ed. Instituto Brasileiro de Potassa, São Paulo, p. 237-278, 1964.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- MUTHUKUMARASAMY, R. Endophytic Nitrogen-Fixing Bacteria from Sugarcane in India. In: **International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: The Role of Biological Nitrogen Fixation**, Angra dos Reis-RJ. Programme and Abstracts, p. 216-217, 1995.
- OLIVARES, F.L. Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. híbrido) por bactérias endofíticas do gênero *Herbaspirillum*. **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Tese de Doutorado, 1997.

- OLIVEIRA, O.C. Quantificação da fixação biológica de nitrogênio em arroz (*Oriza sativa*, L.) inundado. **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Itaguaí, Rio de Janeiro, Tese de mestrado, 1994.
- ORLANDO FILHO, J. & ZAMBELLO Jr., E. Influência da adubação N-P-K nas qualidades tecnológicas da cana-planta, variedade CB41-76. **Brasil Açucareiro**, v. 96, p. 37-44, 1980.
- ORLANDO FILHO, J.; HAAG, H.P. & ZAMBELLO Jr., E. Crescimento e absorção de macronutrientes pela cana-de-açúcar, variedade CB 41-76 em função da idade em solos do estado de São Paulo. **Boletim Técnico Planalsucar**, v. 2, p. 1-128, 1980.
- PATTEN, C.L. & GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of microbiology**, Ottawa, v. 42, p. 207 - 220, 1996.
- RIVERA, R.; VELAZCO, A. & TRETO, E. La fertilizacion (^{15}N), nutricion nitrogenada y actividad de los microorganismos nitrofixadores en la caña de azucar, cepa de caña planta, cultivada sobre suelo ferralitico rojo. **Cultivos Tropicales**, v. 12, p. 21-28, 1991.
- SALATA, J.C. Resposta de diferentes variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) à adubação nitrogenada em solo TE; cana-planta. **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, Tese de mestrado, 1982.
- SAMPAIO, E.V.S.B.; SALCEDO, I.H. & BETTANY, J. Dinâmica de nutrientes em cana-de-açúcar. I. Eficiência na utilização de uréia (^{15}N) em aplicação única ou parcelada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 943-949, 1984.
- SILVEIRA, J.A.G. Interações entre assimilação de nitrogênio e o crescimento de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) cultivada em amostras de campo. **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, Tese de doutorado, 1985.

- SIQUEIRA, J.O. & FRANCO, A.A. Biotecnologia do solo: Fundamentos e Perspectivas. **MEC Ministério da Educação**, ABEAS, Brasília; Lavras:ESAL, FAEPE, 236 p., 1988.
- SRIVASTAVA, S.C. A new concept to guide timing of nitrogen fertilization for sugarcane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 32, p. 373-381, 1970.
- URQUIAGA, S., K.H.S. CRUZ, R.M. BODDEY. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of American Journal**, Madison, v. 56, p. 105-114, 1992.
- VAN DILLEWIJN, C. Botany of sugarcane. **The Chronica Botanica**, Waltham, Massachussets, 371 p., 1952.
- VOSE, P.B.; RUSCHEL, A.P.; VICTORIA, R.L. & MATSUI, E. Potential N_2 - fixation by sugar cane, *Saccharum* sp. in solution culture - I. Effect of NH^{+4} VS. NO_3^- , variety and nitrogen level. In: **Associative N_2 - fixation vol II**, VOSE, P.B. & RUSCHEL, A.P., eds. CRC Press, Boca Raton, p. 119-123, 1981.