

## OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR<sup>1</sup>

FÁBIO BUENO DOS REIS JUNIOR<sup>2</sup>, LUCIA GRACINDA DA SILVA<sup>3</sup>,  
VERÔNICA MASSENA REIS<sup>4</sup> e JOHANNA DÖBEREINER<sup>4</sup>

**RESUMO** - O objetivo deste trabalho foi avaliar a localização e o número de bactérias endofíticas em quatro genótipos de cana-de-açúcar e investigar sobre a possível existência de correlação com os resultados apresentados em trabalhos de quantificação da fixação biológica de nitrogênio (FBN). Fez-se um levantamento das bactérias diazotróficas presentes, e quantificou-se a população de *Herbaspirillum* spp. e *Acetobacter diazotrophicus*, em genótipos de cana-de-açúcar contrastantes quanto à capacidade de obter N da FBN. De acordo com o levantamento realizado neste trabalho, as bactérias estudadas (*Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *Herbaspirillum* spp. e *Acetobacter diazotrophicus*) estavam presentes nos quatro genótipos avaliados e em todas as partes da planta, exceto *A. amazonense*, que não foi 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, elas 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. 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.

Termos para indexação: fixação de nitrogênio, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Herbaspirillum*.

### OCCURRENCE OF DIAZOTROPHIC BACTERIA IN DIFFERENT SUGAR CANE GENOTYPES

**ABSTRACT** - The objective of this work was to find out the localization and number of endophytic bacteria in four sugar cane genotypes and investigate upon the possible existence of correlation to the results obtained in some studies about quantification of biological nitrogen fixation (BNF). A survey of the diazotrophic bacteria present in sugar cane genotypes differing in their capacity to obtain nitrogen through BNF was performed, and population of *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* was quantified. 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 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 number in roots. While number 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. It is suggested 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.

Index terms: nitrogen fixation, diazotrophy, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Herbaspirillum*.

### INTRODUÇÃO

Quando se aborda o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) em plantas não-leguminosas, são comuns relatos em que o genótipo da planta exerce forte influência na FBN. App et al. (1986) em estudos de balanço de N no que se refere à quantificação da FBN em arroz utilizaram 83 variedades e encontraram grandes diferenças entre elas. Oliveira

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 7 de junho de 1999.

Extraído da dissertação de mestrado do primeiro autor apresentada à UFRRJ.

<sup>2</sup> Eng. Agrôn., M.Sc., Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (CNPAB), km 47 Antiga Rodovia Rio-São Paulo, Caixa Postal 74505, CEP 23851-970 Seropédica, RJ. E-mail: info@cnpab.embrapa.br

<sup>3</sup> Bióloga, Embrapa-CNPAB.

<sup>4</sup> Eng. Agrôn., Ph.D., Embrapa-CNPAB. E-mail: veronica@cnpab.embrapa.br

(1994), trabalhando com o método de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  em 40 variedades de arroz, também encontrou diferenças consideráveis entre as variedades no que se refere à contribuição da FBN. Miranda et al. (1990), quantificando a fixação de  $\text{N}_2$  pelo método da diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ , 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, Salomone & Döbereiner (1996) apresentaram resultados em que diferentes genótipos de milho responderam diferentemente à inoculação de *Azospirillum*, e certos genótipos mostraram aumento de produção de até 100%. Schloter & Hartman (1998) citam que os microrganismos fixadores de N interagiram de maneira diferente com plantas de trigo, de acordo com as variedades em que 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  $^{15}\text{N}$  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*) e os híbridos comerciais CB 45-3 e SP 70-1143 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  $^{15}\text{N}$ , observou uma contribuição da FBN de 60% em Krakatau (*S. spontaneum*), 54% em *S. sinens*, e 35% em Chuneé (*S. barberi*).

Experimentos em que foram utilizadas diferentes metodologias também indicaram 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, em toletes

e na planta inteira, aos dois meses de idade em sistema intacto e perturbado, e sobre pressão de oxigênio baixa e normal, e demonstraram diferentes medidas de ARA nas seis variedades comerciais estudadas. Ruschel et al. (1978) tiveram evidências de que diferenças varietais influem na atividade da nitrogenase. Trabalhando com três variedades, os autores demonstraram que a variedade CB 46-47 fixou mais N no período de 24 horas (1,79  $\mu\text{g}$  de N) do que as outras variedades, todas oriundas da mesma mãe, porém de pai diferente.

Boddey (1995) sugere que a característica de obter uma significativa contribuição da FBN, presente em variedades brasileiras de cana-de-açúcar, pode ser causada por processos de melhoramento e seleção desenvolvidos em 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  $F_1$ , 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.

Neste trabalho, buscou-se observar a localização e o número de bactérias endofíticas em quatro diferentes genótipos de cana-de-açúcar, e investigar sobre a possível existência de correlação com os resultados apresentados em trabalhos de quantificação da FBN.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Levantamento da ocorrência de bactérias diazotróficas em genótipos de cana-de-açúcar

Foi feito um levantamento para avaliar 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-Centro Nacional de Pesquisa de

Agrobiologia (CNPAB). 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 Chuneé, citada como o menos eficiente dos genótipos estudados neste mesmo trabalho.

Após a rebrota da cana soca, a cada 30 dias, num total de três amostragens, 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 N, a saber: LGI-P, semi-seletivo para o isolamento de *Acetobacter diazotrophicus*; LGI, para *Azospirillum amazonense*; NFB, para *Azospirillum lipoferum* ou *Azospirillum brasilense*; e JNFb, para *Herbaspirillum* spp. (Döbereiner et al., 1995a). Amostras de 10 g (peso da matéria fresca) foram lavadas com água corrente, trituradas em 90 mL de solução salina e diluídas serialmente. Foram utilizadas as diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-6}$ . 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 maior diluição de cada um dos meios, foram utilizados na repicagem para um novo meio semi-sólido. Após a incubação foram retiradas alíquotas, 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. As colônias formadas nos meios sólidos foram repicadas para novo meio semi-sólido e, após o período de incubação, foram riscadas em placas de meios 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 semi-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.

#### **Quantificação de *Acetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. em genótipos de cana-de-açúcar**

Foi implantado um experimento em tanque de concreto, onde foram plantados os mesmos quatro genótipos avaliados anteriormente. O tanque possuía dimensões de 20 x 6 x 0,8 m, provido de drenos, e preenchido com solo PVA série Itaguá. De acordo com a análise do solo, este 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 ao crescimento das plantas fosse o N.

O desenho experimental foi de blocos ao acaso, com um arranjo em esquema fatorial de 4 (genótipos) x 4 (partes da planta) x 3 (amostragens) com quatro repetições. Cada um dos quatro blocos foi dividido em quatro parcelas de 2,5 x 3,0 m, separadas por telhas de amianto até o fundo do tanque, a fim de separar as raízes de cada genótipo. As partes amostradas das plantas – raízes, colmo basal, colmo apical e folha – foram consideradas subparcelas de genótipos, e a época das coletas, subparcelas de ambos. As coletas foram feitas aos 4, 7 e 15 meses após o plantio.

Para a obtenção do número das bactérias, presentes nas partes das plantas amostradas, utilizou-se a técnica do Número Mais Provável (NMP). Para tanto, realizaram-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).

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

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Ocorrência de bactérias diazotróficas em genótipos de cana-de-açúcar**

Os resultados do levantamento da ocorrência de bactérias diazotróficas associadas aos quatro diferentes genótipos da cultura da cana-de-açúcar (Tabela 1) 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 em todas as bactérias estudadas nos quatro genótipos, ocorreu nas raízes das plantas, seguida dos colmos e folhas, respectivamente, sendo mais acentuada nas bactérias do gênero *Azospirillum*. Já *Herbaspirillum* spp. e *A. diazotrophicus* apresentaram 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 das plantas também foi relatada por Baldani et al. (1997) e James & Olivares (1997). Apesar de esses microrganismos serem geralmente considerados como bactérias da rizosfera, colonizando principalmente as zonas de alongação e os pêlos radiculares (Döbereiner et al., 1995b; 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 frequentes; no entanto, Pereira (1995), estudando a incidência de bactérias do gênero *Azospirillum* em diferentes genótipos de milho, relatou a presença dessa bactéria no colmo de certas amostras.

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 desse tópico demonstram que genótipos contrastantes quanto ao ganho de N via fixação biológica de N<sub>2</sub> apresentam-se associados com todas as bactérias estudadas.

**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.**

Bactéria	Raízes			Colmos			Folhas		
	Época de coleta			Época de coleta			Época de coleta		
	2	3	4	2	3	4	2	3	4
Genótipo Krakatau									
<i>A. brasilense</i>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>
<i>A. lipoferum</i>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-4</sup>	ND	10 <sup>-2</sup>	ND
<i>A. amazonense</i>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	ND <sup>1</sup>	ND	10 <sup>-2</sup>	ND	ND	ND
<i>Herbaspirillum</i> spp.	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-4</sup>
<i>A. diazotrophicus</i>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-4</sup>	ND	10 <sup>-2</sup>	ND
Genótipo Chunece									
<i>A. brasilense</i>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	ND	10 <sup>-2</sup>
<i>A. lipoferum</i>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	ND	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	ND	ND
<i>A. amazonense</i>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	ND	10 <sup>-2</sup>	ND	ND	ND	ND
<i>Herbaspirillum</i> spp.	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>
<i>A. diazotrophicus</i>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>
Genótipo SP 70-1143									
<i>A. brasilense</i>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	ND	10 <sup>-2</sup>
<i>A. lipoferum</i>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-4</sup>	ND	ND	10 <sup>-2</sup>
<i>A. amazonense</i>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	ND	ND	10 <sup>-2</sup>	ND	ND	ND
<i>Herbaspirillum</i> spp.	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-4</sup>
<i>A. diazotrophicus</i>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	ND	10 <sup>-4</sup>
Genótipo CB 45-3									
<i>A. brasilense</i>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>					
<i>A. lipoferum</i>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	ND	ND	10 <sup>-2</sup>
<i>A. amazonense</i>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	ND	10 <sup>-2</sup>	ND	ND	ND
<i>Herbaspirillum</i> spp.	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-4</sup>
<i>A. diazotrophicus</i>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>					

<sup>1</sup> Não detectado.

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

Efeito do genótipo

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 desses microrganismos nas diferentes partes da planta ou época da coleta (Figs. 1 a 4). Tais 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 à contribuição da FBN para a nutrição nitrogenada dessas plantas. Holm et al. (1994), trabalhando com arroz, 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 às

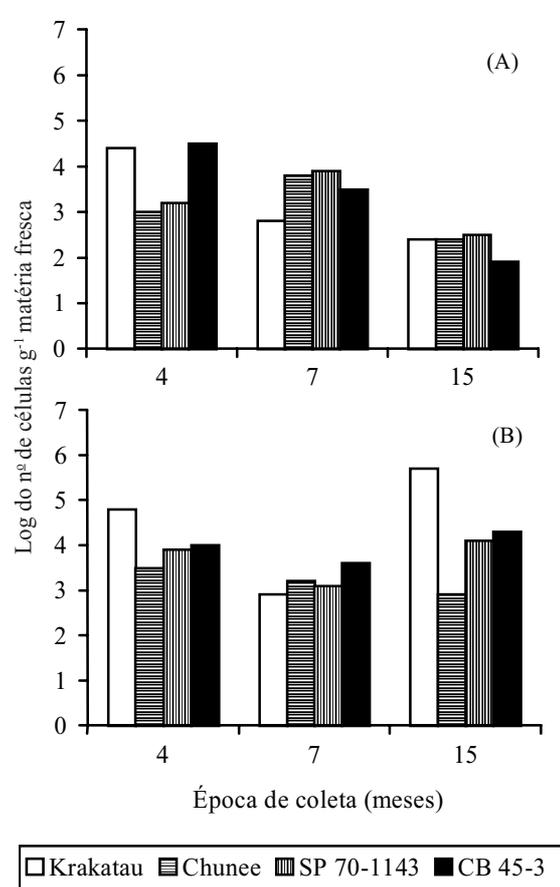
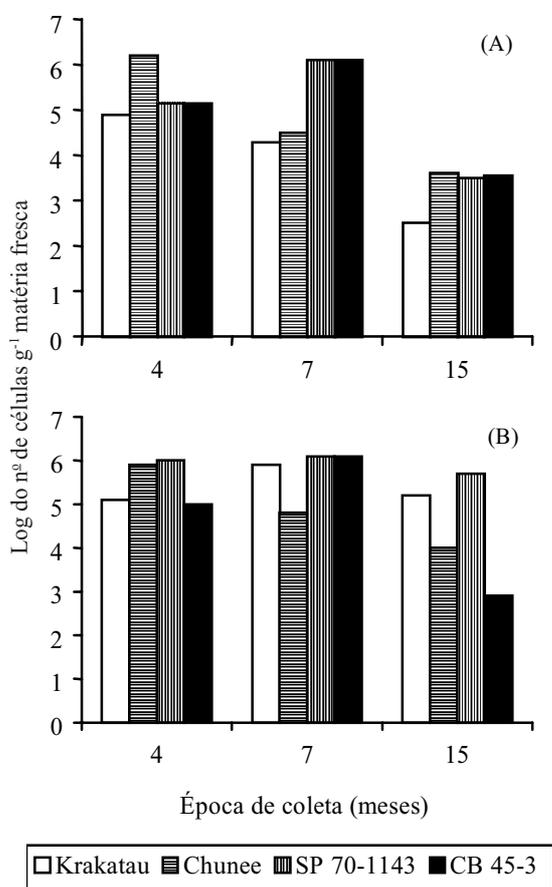


FIG. 1. Logaritmo do número de células de *Acetobacter diazotrophicus* (A) e *Herbaspirillum* spp. (B) presentes nas raízes de quatro genótipos de cana-de-açúcar avaliados nas coletas aos 4, 7 e 15 meses após o plantio.

FIG. 2. Logaritmo do número de células de *Acetobacter diazotrophicus* (A) e *Herbaspirillum* spp. (B) presentes na base do colmo de quatro genótipos de cana-de-açúcar avaliados nas coletas aos 4, 7 e 15 meses após o plantio.

taxas de FBN por estas 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 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 desse gênero, ser o agente causal da doença conhecida como estria

mosqueada em genótipos susceptíveis (Olivares et al., 1997). Deve-se ressaltar também que a eficiência fotossintética, as exigências nutricionais e a resistência às condições desfavoráveis, entre outras, são características ligadas ao genótipo das plantas que podem apresentar influência na eficiência de fixação de  $N_2$  pelas bactérias associadas a estas; 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 se analisarem as diferenças em relação à FBN na cul-

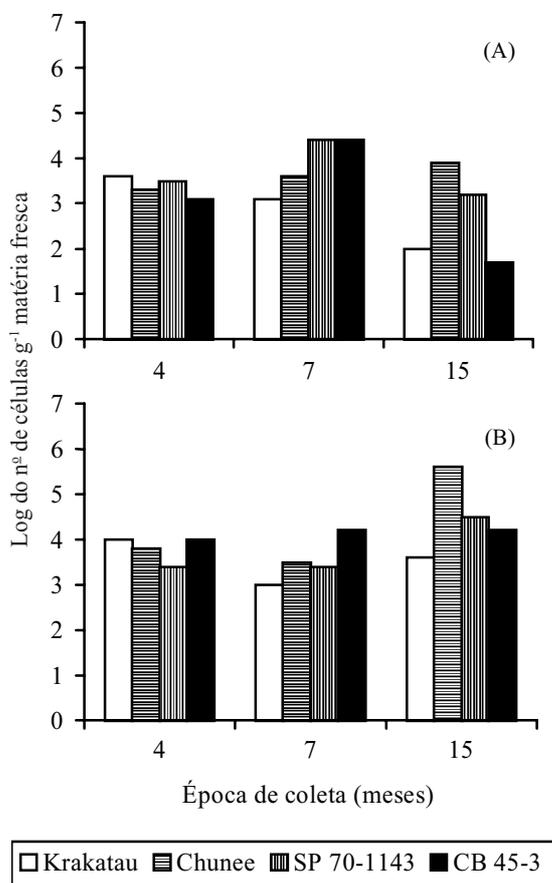


FIG. 3. Logaritmo do número de células de *Acetobacter diazotrophicus* (A) e *Herbaspirillum* spp. (B) presentes no ápice do colmo de quatro genótipos de cana-de-açúcar avaliados nas coletas aos 4, 7 e 15 meses após o plantio.

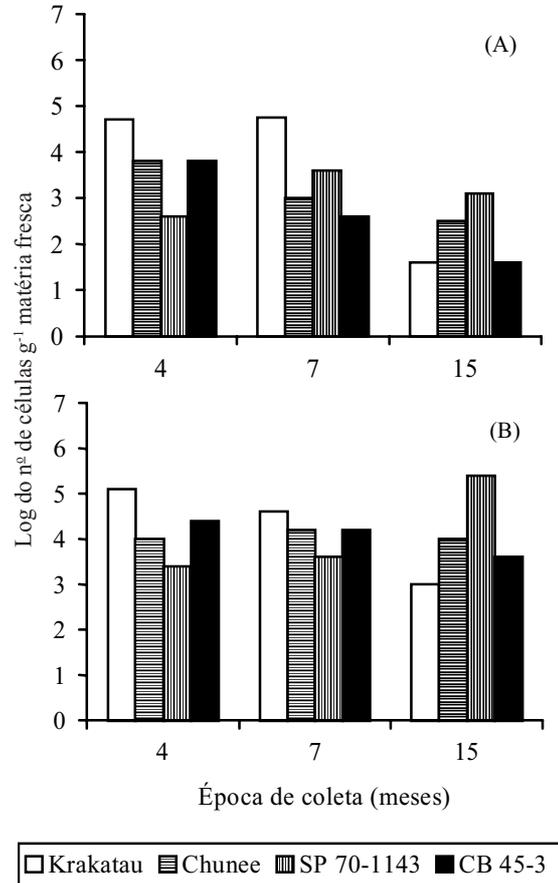


FIG. 4. Logaritmo do número de células de *Acetobacter diazotrophicus* (A) e *Herbaspirillum* spp. (B) presentes nas folhas de quatro genótipos de cana-de-açúcar avaliados nas coletas aos 4, 7 e 15 meses após o plantio.

tura da cana-de-açúcar; 3) Deve ser lembrado 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, 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 N 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 estas. As hipóteses sugeridas acima devem ser analisadas em conjunto, e somadas a outras que possam vir a ser apresentadas, para que se possa compreender os fenômenos que regem essa associação.

#### 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, e não sofreram maiores variações com relação às outras partes da planta (Tabela 2). Reis (1991) também apresentou resultados de quantificação em relação à espécie *A. diazotrophicus* em cana-de-açúcar, e na maioria das coletas as raízes apresentaram maior número de bactérias em relação às outras partes da planta. Olivares (1997), em trabalho de levantamento da presença de *Herbaspirillum* spp. em diferentes variedades de cana-de-açúcar, obteve maior número de isolados provenientes das raízes. Tais resultados indicam que provavelmente é nas raízes o sítio preferencial de localização dessas bactérias.

Ainda não se sabe bem por que elas se localizam preferencialmente nas raízes, porém, é sabido que o sistema radicular é um grande dreno de fotoassimilados produzidos na parte aérea, e esses 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 dessas bactérias para a parte aérea através dos vasos do xilema seja dificultada (Dong et al., 1994). Trabalhando com as variedades de cana-de-açúcar Media Luna e Ja 60-5, esses 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 dessas células. Dong et al. (1997) ainda discutiram a dificuldade de translocação de *A. diazotrophicus* através dos vasos xilemáticos, com base 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. A 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 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

**TABELA 2. Logaritmo do número de células de *Acetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* sp. presentes nas diversas partes da planta de cana-de-açúcar ao longo do experimento<sup>1</sup>.**

Partes da planta	<i>A. diazotrophicus</i> (Log do nº de células g <sup>-1</sup> de matéria fresca)	<i>Herbaspirillum</i> sp. (Log do nº de células g <sup>-1</sup> de matéria fresca)
Raízes	4,61A	5,22A
Base do colmo	3,15B	3,77B
Ápice do colmo	3,32B	3,94B
Folhas	3,12B	4,13B
CV (%)	34,53	33,95

<sup>1</sup> Valores seguidos de letras diferentes diferem-se pelo teste Tukey a 5% de probabilidade; dados referentes às médias de quatro repetições referentes aos quatro genótipos nas três épocas de coleta.

**TABELA 3. Logaritmo do número de células de *Acetobacter diazotrophicus* presentes nos quatro genótipos de cana-de-açúcar avaliados nas coletas aos 4, 7 e 15 meses após o plantio<sup>1</sup>.**

Coletas (meses após o plantio)	Genótipos				Média
	Krakatau	Chunee	SP 70-1143	CB 45-3	
	(Log do nº células g <sup>-1</sup> de matéria fresca)				
4	4,32ab	4,17a	3,54a	4,150a	4,048A
7	3,75a	3,73a	4,47ab	4,197a	4,038A
15	3,09b	2,08b	3,03b	2,045b	2,562B
CV (%)					34,53

<sup>1</sup> Valores seguidos de mesma letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*A. diazotrophicus*. 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 presente influência sobre esses microrganismos.

### 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 nitrogênio.

2. Com exceção de *A. amazonense*, que não foi isolado de folhas, as bactérias estão presentes nas raízes, colmos e folhas das plantas.

3. Os números populacionais de *A. diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. não são diferentes em genótipos de cana-de-açúcar contrastantes quanto ao potencial de fixação biológica de nitrogênio.

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.

### AGRADECIMENTOS

Ao programa PRONEX II/FINEP e PADCT III, que financiou parcialmente este trabalho; a Dorimar dos Santos Félix, pela correção da bibliografia.

### REFERÊNCIAS

- 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 America. 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 & Biochemistry*, Elmsford, 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 Sciences*, Boca Raton, v.14, p.263-279, 1995.
- BROEK, A. vande; VANDERLEYDEN, J. Review genetics of the *Azospirillum*-plant root association. *Critical Reviews in Plant Sciences*, Boca Raton, v.14, p.445-466, 1995.
- 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 and 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*

- N<sub>2</sub> - 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 : Embrapa-CNPAB, 1995a. 80p.
- 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.; ZAMAROCZY, M. de. (Eds.). **Azospirillum VI and related microorganisms.** Berlin : Springer, 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 .
- HOLM, L.H.J. van; NIEUWENHOVE, C. van; 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: HEGAZI, N.A.; FAYEZ, M.; MONIB, M. (Eds.). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION WITH NON-LEGUMES, 6., 1993, Ismailia. **Nitrogen fixation with non-legumes.** Cairo : The American University in Cairo Press, 1994. p.373-374.
- JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L. Infection and colonization of sugar cane and other gramineaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 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.
- MIRANDA, C.H.B.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Selection of ecotypes of *Panicum maximum* for associated biological nitrogen fixation using the <sup>15</sup>N isotope dilution technique. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, 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, Grã-Bretanha, v.135, p.575-597, 1997.
- OLIVEIRA, O.C. **Quantificação da fixação biológica de nitrogênio em arroz (*Oryza sativa*, L.) inundado.** Itaguaí : UFRRJ, 1994. 235p. Dissertação de Mestrado.
- PEREIRA, J.A.R. **Bactérias diatróficas e fungos micorrízicos arbusculares em diferentes genótipos de milho (*Zea mays* L.).** Lavras : UFLA, 1995. 112p. Dissertação de Mestrado.
- PIÑERO, D.; MARTÍNEZ, E.; SELANDER, R.K. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, p.2825-2832, 1988.
- REIS, V.M. **Aspectos ecológicos e fisiológicos da bactéria fixadora de N<sub>2</sub>, *Acetobacter diazotrophicus*.** Itaguaí : UFRRJ, 1991. 119p. Dissertação de Mestrado.
- RUSCHEL, A.P.; RUSCHEL, R. Varietal differences affecting nitrogenase activity in rizosphere of sugar cane. **Proceedings for International Society Sugar Cane Tecnology**, v.2, p.1941-1947, 1977.
- RUSCHEL, A.P.; VICTORIA, R.L.; SALATI, E.; HENIS, Y. Nitrogen fixation in sugar cane (*Saccharum officinarum*). In: GRANHALL, V. (Ed.). **Environmental role of nitrogen-fixing blue-green algae and asymbiotic bacteria.** Uppsala : Swedish Natural Science Research Council, 1978. p.297-302.
- SALOMONE, I.G. de; DÖBEREINER, J. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.21, p.193-196, 1996.
- SCHLOTTER, M.; HARTMAN, A. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains

- studied with strain-specific monoclonal antibodies. **Symbiosis**, Rehovot, v.25, p.150-179, 1998.
- SINGH, M. Estimation of nitrogen fixation in *Saccharum* spp. by  $^{15}\text{N}$  dilution method. **Journal of Nuclear Agriculture and Biology**, New Delhi, v.23, p.1-5, 1994.
- SPRENT, J.I.; JAMES, E.K.  $\text{N}_2$  - fixation by endophytic bacteria: questions of entry and operation. In: FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J.; ZAMAROCZY, M. de (Eds.). ***Azospirillum VI and related microorganisms***. Berlin : Springer, 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.