

Relação entre distribuição de nitrogênio e colonização por bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar

Arão Araújo Gomes⁽¹⁾, Veronica Massena Reis⁽²⁾, Vera Lucia Divan Baldani⁽²⁾ e Silvia Regina Goi⁽³⁾

⁽¹⁾Escola Agrotécnica Federal de São Cristóvão, Rod. BR 101, Km 96, Povoado Quisamã, CEP 49100-000 São Cristóvão, SE. E-mail: haaron@bol.com.br ⁽²⁾Embrapa Agrobiologia, BR 465, Km 47, CEP 23890-000 Seropédica, RJ. E-mail: vera@cnpab.embrapa.br, veronica@cnpab.embrapa.br ⁽³⁾Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Florestas, BR 465, Km 47, CEP 23890-000 Seropédica, RJ. E-mail: sgoi@ufrj.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação entre a distribuição de nitrogênio na planta e a colonização por *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. Foi implantado um experimento em parcelas subdivididas, tendo como tratamentos quatro genótipos: SP70-1143, SP79-2312 (híbridos), Krakatau (*Saccharum spontaneum* L.) e Chunnee (*Saccharum barberi* Jesw.); e quatro épocas de coleta: 90, 180, 360 e 540 dias após o plantio, com quatro repetições. Os parâmetros estudados foram: porcentual de nitrogênio, nitrato, N amino livre e o número mais provável de população das bactérias *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. Os valores mais elevados de nitrogênio foram observados aos 90 dias após o plantio, nas folhas e colmo apical; as maiores concentrações N amino ocorreram nas raízes, colmo basal e folhas da variedade SP79-2312 e no colmo apical do genótipo Chunnee. O maior acúmulo de nitrato foi observado nos colmos basais e intermediários, sobretudo na variedade SP79-2312. O N protéico mostrou ser o maior componente do nitrogênio porcentual, com a mesma tendência nas diferentes partes da planta. O maior valor na população de *G. diazotrophicus* ocorreu nas raízes de SP70-1143, SP79-2312 e Krakatau, e nos quatro genótipos de *Herbaspirillum* spp.

Termos para indexação: cana-de-açúcar, nutrição de plantas, bactérias endofíticas.

Relationship between nitrogen distribution and diazotrophic bacteria colonization in sugarcane

Abstract – The objective of this work was to evaluate the relation between nitrogen distribution in plants of sugarcane, and the colonization by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. The experimental design was a split plot, with four genotypes of sugarcane: SP70-1143 and SP79-2312 (hybrids), Krakatau (*Saccharum spontaneum* L.) and Chunnee (*Saccharum barberi* Jesw.), and four times of harvest: 90, 180, 360, 540 days after planting, and four replications. The parameters evaluated were: nitrogen percentage, nitrate, free amino-N, and the most probable number of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. population. The percentage of nitrogen showed higher values at 90 days after planting in leaves and apical stems, and the largest concentrations of amino-N occurred in the roots, basal stems, and leaves of SP79-2312 variety and in apical stems of the Chunnee genotype. The largest nitrate accumulation was observed in the basal and intermediary stems, mainly in SP79-2312 variety. Proteic-N was the main component of the total nitrogen content, with the same tendency in different parts of the plant. Highest value of *G. diazotrophicus* population occurred in the roots of SP70-1143, SP79-2312, Krakatau and in the four genotypes of *Herbaspirillum* spp.

Index terms: sugarcane, plant nutrition, endophytic bacteria.

Introdução

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas agrícolas, cultivada em regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre. A maioria das variedades brasileiras foi selecionada sob condições de baixa fertilidade, tendo-se minimizado a utilização dos adubos nitrogenados

(Azeredo et al., 1986), e constituiu-se em vantagem para se estudar o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN). Em estudos de quantificação da FBN, pela associação de bactérias diazotróficas endofíticas com a planta, foi verificado que na variedade CB 47-89 ocorreu um acúmulo equivalente a mais de 150 kg ha⁻¹ de N, e em CB 45-3 e SP70-1143 uma contribuição de 170 a

210 kg ha⁻¹ de N, com valores entre 60% e 70% de nitrogênio incorporado à planta, derivado do processo da FBN (Urquiaga et al., 1992). Entretanto, a contribuição da FBN é muito diferente entre as variedades (Yoneyama et al., 1997).

O nitrogênio é constituinte obrigatório de aminoácidos, proteínas e ácidos nucléicos, participa direta e indiretamente de diversos processos bioquímicos das plantas, e pode ser encontrado também na forma inorgânica (NO₃⁻ e NH₄⁺). O nitrato é prontamente absorvido e convertido por enzimas e, em contato com carboidratos, forma as amidas e aminoácidos, passando então da forma inorgânica para a orgânica (Fernandes & Rossiello, 1995). É um dos nutrientes mais extraídos do solo pela planta da cana, considerada de elevada eficiência fisiológica na utilização de nitrogênio (Silveira, 1985), por isso pouco responsiva à fertilização nitrogenada.

Em estudos sobre o efeito da adubação nitrogenada, Azeredo et al. (1986) verificaram que somente em 20%, de 135 experimentos de campo conduzidos no Brasil, foram observados efeitos positivos que incrementaram a produção. A assimilação de nitrogênio é estreitamente relacionada com o metabolismo de carboidratos e provoca acentuada diminuição nos níveis de açúcares do colmo, com menor expressão na bainha (Silveira, 1985). Os valores de nitrogênio e de açúcar variam com a idade da cana, em razão inversa; na fase inicial da cultura prevalece o primeiro, enquanto o segundo é incrementado com o desenvolvimento (Clements, 1980).

A associação entre bactérias diazotróficas e a cana-de-açúcar envolve diversos gêneros bacterianos e mecanismos singulares ainda pouco compreendidos (James, 2000). Entre outras bactérias associadas à cana-de-açúcar, responsáveis pela FBN, destacam-se as espécies *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. *G. diazotrophicus* está inserida no grupo das bactérias do ácido acético e foi isolada de raízes e parte aérea de cana-de-açúcar por Cavalcante & Döbereiner (1988). Já as bactérias do gênero *Herbaspirillum* são naturalmente associadas às gramíneas e aí se incluem as espécies *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* (Baldani et al., 1986, 1996).

Diversas bactérias diazotróficas são capazes de produzir fitormônios, responsáveis pelo efeito estimulatório observado no crescimento de plantas. Bastián et al. (1998) detectaram a presença de ácido indol-acético (AIA) e giberelinas A₁ e A₃, em culturas de *Herbaspirillum seropedicae*, e Fuentes-Ramírez et al. (1993) avaliaram a produção de AIA por estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Embora se conheça a importância do nitrogênio para o crescimento vegetal, muito pouco foi feito sobre a dis-

tribuição de suas diferentes formas, na cana-de-açúcar, e sobre como esses compostos se comportam em relação à população de bactérias diazotróficas naturalmente presentes na cultura.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação entre a distribuição de nitrogênio em cana-de-açúcar e a colonização por *G. diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp.

Material e Métodos

O experimento foi instalado no campo Experimental da Embrapa Agrobiologia, situado no Município de Seropédica, RJ, em um Planossolo. O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições, em esquema de parcelas subdivididas no tempo: aos 90, 180, 365 e 540 dias após o plantio (DAP). Na parcela, foram avaliados quatro genótipos e, nas subparcelas, as épocas de coletas dos dados. Os genótipos avaliados na parcela foram escolhidos em razão do comportamento contrastante, em relação ao processo de fixação biológica de nitrogênio e de acúmulo de sacarose, sendo dois de canas cultivadas comercialmente: a SP70-1143, considerada de boa performance para fixação biológica de nitrogênio (FBN) e de ciclo tardio, e a SP79-2312, de performance inferior à primeira em relação à FBN e de ciclo precoce. Os outros genótipos foram Krakatau (*Saccharum spontaneum*) e Chunne (*Saccharum barberi*).

As variedades foram plantadas na mesma época, em parcelas onde cada cultivar representava uma subparcela, plantada em linhas espaçadas por 1 m, com distâncias entre plantas de 50 cm, com dois toletes e duas gemas por cova. Após a análise do solo, foi feita adubação conforme recomendado para a cultura, que consistiu na aplicação de 2 t ha⁻¹ de calcário dolomítico, 100% PRNT, 60 dias antes do plantio, e as covas receberam doses de 100 kg ha⁻¹ de K₂O, na forma de cloreto de potássio, e 150 kg ha⁻¹ de P₂O₅, na forma de superfosfato simples. Como adubação para suprir as necessidades em micronutrientes usou-se 50 kg ha⁻¹ de FTE BR-12.

As amostras foram separadas em raízes vivas e finas, colmo basal (dois entrenós situados 5 cm acima do nível do solo), colmo intermédio (retirou-se amostra de dois colmos do centro do tolete), colmo apical (entrenós 1 e 2) e, finalmente, foi amostrada a folha +3, tendo-se retirado a nervura central e considerado apenas os 20 cm centrais. As amostras foram colhidas no campo e acomodadas em gelo, para o transporte até o laboratório, onde se procedeu à pesagem de 1 g de material fresco, que foi imerso em solução de etanol a 80% e estocado a 5°C, por 15 dias. Após esse período, foi feita a partição, utilizando-se como extrator o clorofór-

mio, determinando-se na fração polar obtida os teores de aminoácidos livres (Yemm & Cocking, 1955) e nitrogênio nítrico (Cataldo et al., 1975). O teor de nitrogênio total foi determinado em amostras de 200 mg de material seco e moído, por digestão sulfúrica, seguida de destilação e titulação segundo Tedesco (1983).

A contagem da população bacteriana foi realizada pelo método do número mais provável (NMP), em amostras frescas de 10 g das partes analisadas da planta, trituradas em 90 mL de solução salina à base de $\frac{3}{4}$ de sais do meio NFb. As células viáveis foram estimadas a partir do crescimento de película nas diluições seriadas e foram inoculadas em meio de cultura semi-sólido LGI-P caldo (semi-específico para a contagem de *Gluconacetobacter diazotrophicus*) e JNFb (semi-específico para a contagem de *Herbaspirillum* spp.), sem nitrogênio descritos por Döbereiner et al. (1995). A determinação do número de células baseou-se na

presença ou ausência de película, característica da espécie, em frasco com capacidade de 10 mL, utilizando-se a tabela de McCrady.

Os testes estatísticos (análise de variância, teste de médias e correlações) foram feitos com a utilização do programa MSTAT-C (Michigan State University, 1989). As médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

O percentual de nitrogênio nas raízes atingiu o valor máximo aos 360 DAP, tendo chegado à média de 0,7% (Tabela 1). Clements (1980) refere-se à fase de crescimento inicial em que as raízes são ativas e contêm consideráveis quantidades de nitrogênio e que, com a idade da cultura, há o declínio da atividade radicular, acompanhado por decréscimo do nitrogênio.

Tabela 1. Nitrogênio total (valor porcentual), em diferentes partes da planta de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), em função de dias após plantio (DAP)⁽¹⁾.

DAP	SP70-1143	SP79-2312	Krakatau	Chunnee	Média
Raízes					
90	0,474ab	0,527a	0,485ab	0,404b	0,472D
180	0,582ab	0,718a	0,646a	0,468b	0,604B
360	0,700a	0,660a	0,709a	0,735a	0,701A
540	0,617a	0,612a	0,548a	0,439b	0,554C
Média	0,593ab	0,629a	0,597ab	0,511c	
Colmo basal					
90	0,580ab	0,546ab	0,693a	0,464b	0,571A
180	0,201a	0,234a	0,209a	0,245a	0,222BC
360	0,253a	0,257a	0,276a	0,318a	0,276B
540	0,233a	0,218a	0,176a	0,213a	0,210C
Média	0,316a	0,313a	0,338a	0,310a	
CV	26,86				
Colmo intermediário					
90	0,852a	0,665b	-	-	-
180	0,231ab	0,211b	0,250a	0,256a	0,237C
360	0,256a	0,255a	0,250a	0,263a	0,256BC
540	0,256bc	0,164c	0,307ab	0,327a	0,263A
Média	0,398a	0,323b	0,263c	0,282c	
Colmo apical					
90	1,634b	1,908a	-	-	-
180	0,399c	0,440bc	0,756a	0,597ab	0,548C
360	0,725ab	0,562b	0,558b	0,831a	0,669A
540	0,847a	0,466c	0,670ab	0,545bc	0,632AB
Média	0,901a	0,844a	0,661b	0,657b	
Folhas					
90	2,005a	1,968a	2,028a	1,377b	1,845A
180	1,850a	1,797b	1,900a	1,317c	1,716AB
360	1,626a	1,315b	1,776a	1,454b	1,542B
540	1,749a	1,514ab	1,700a	1,377b	1,585B
Média	1,807ab	1,648b	1,851a	1,381c	

⁽¹⁾Médias seguidas de mesma letra, minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; médias de 4 repetições; os coeficientes de variação relativos aos dados das raízes, colmo basal, colmo intermediário, colmo apical e folhas foram 12,40%, 26,86%, 14,63%, 15,46% e 10,65%, respectivamente.

Nos colmos, a concentração aumentou da base para o ápice, já que o elemento está associado às áreas de maior crescimento. Comparando-se os híbridos nas condições de estresse de nitrogênio, a variedade SP70-1143 tendeu a acumular uma maior quantidade de N, tanto nos colmos como nas folhas, em relação à SP79-2312, que é uma variedade selecionada para solos mais ricos. Entre as espécies, Krakatau acumulou mais N nas folhas e colmo basal do que a Chunnee. Reis Júnior et al. (2000a) ao trabalhar com as variedades SP70-1143 e SP79-2312, verificaram dois picos nos valores de conteúdo de nitrogênio (N total), tendo o primeiro e mais elevado ocorrido aos 90 DAP, e o outro aos 360 DAP, independentemente do cultivo, com ou sem adubação nitrogenada. Esses autores também encontraram valores de N total mais elevados nas raízes, dos 90 aos 450 DAP, quando comparados aos colmos. Outros autores citam, também, que a concentração de nitrogênio decresce com a idade (Rossiello, 1987; Thangavelu

& Rao, 1996). Destaca-se que essas foram as variedades que obtiveram maiores contribuições via FBN, na quantificação efetuada por Urquiaga et al. (1992), só tendo perdido para a variedade CB 45-3 (74% do N derivado da FBN).

De forma geral, o nitrato tendeu a se acumular nas raízes, no final do ciclo da cultura, principalmente nas espécies Krakatau e Chunnee (Tabela 2). Nos colmos, essa fração estava concentrada naqueles mais velhos, tendo atingido aproximadamente 3,5 e 4 mmol g⁻¹ de matéria fresca nas variedades SP70-1143 e SP79-2312; a variedade Krakatau acumulou em torno de metade da concentração das outras, e o pico de acúmulo ocorreu aos 360 DAP (colmo apical). Silveira & Crocomo (1989), em amostras do colmo da variedade NA 56-79, cultivada em solução nutritiva com níveis combinados de N e K, aos 180 DAP, obtiveram valores de 0,19, 14,73 e 8,55 μmol g⁻¹ de matéria seca, para os diversos tratamentos aplicados. Essa fração não se acumulou nas

Tabela 2. Concentração de nitrato (μmol g⁻¹ de matéria fresca), em diferentes partes da planta de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), em função de dias após plantio (DAP)⁽¹⁾.

DAP	SP70-1143	SP79-2312	Krakatau	Chunnee	Média
Raízes					
90	1,400b	2,085b	2,152ab	2,177a	1,954B
180	1,703bc	1,779bc	2,516b	3,515a	2,378B
360	0,564b	1,461a	1,632a	0,376b	1,008C
540	2,831a	2,052b	3,550a	3,381a	2,954A
Média	1,625b	1,844b	2,462a	2,362a	
Colmo basal					
90	1,711a	1,690a	1,246a	1,164a	1,453C
180	3,382b	4,673a	1,453c	4,283a	3,448B
360	4,826b	6,914a	1,851c	4,481b	4,518A
540	4,542a	3,882ab	1,945c	3,580b	3,487B
Média	3,615b	4,290a	1,624c	3,377d	
Colmo intermediário					
90	1,080a	1,170a	-	-	-
180	3,092b	4,201a	1,438d	2,176c	2,727C
360	4,814b	6,268a	0,521d	3,208c	3,703A
540	3,934a	4,175a	1,731c	2,740b	3,145B
Média	3,530b	3,954a	1,230d	2,708c	
Colmo apical					
90	1,113a	1,253a	-	-	-
180	2,298a	1,575b	0,979c	1,336bc	1,547A
360	0,383c	0,845b	2,912a	0,925b	1,266A
540	1,289a	1,014ab	0,601bc	0,426c	0,832B
Média	1,271a	1,172a	1,123a	0,672b	
Folhas					
90	1,353a	1,697a	1,506a	1,532a	1,552B
180	3,926a	2,391b	1,642c	1,336c	2,324A
360	0,246b	0,306ab	0,804a	0,187b	0,386D
540	0,978a	0,853ab	0,377a	0,708ab	0,729C
Média	1,626a	1,312b	1,082b	0,941c	

⁽¹⁾Médias seguidas de mesma letra, minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; média de 4 repetições; os coeficientes de variação relativos aos dados das raízes, colmo basal, colmo intermediário, colmo apical e folhas foram 19,14%, 13,98%, 14,16%, 15,37% e 22,19%, respectivamente.

folhas, teve como pico de acumulação a fase vegetativa (90 DAP) e foi maior na variedade SP70-1143.

De modo geral, a concentração de N amino nas raízes apresentou uma variação sazonal e varietal maior do que as frações anteriores (Tabela 3). A variedade SP79-2312 acumulou o maior teor dessa fração nas raízes, aos 90 e 540 DAP. A acumulação nos colmos acompanhou a variação sazonal das raízes, entretanto a variação varietal não seguiu nenhum padrão. A fração de colmos que mais acumulou N amino foi o colmo apical, especialmente na espécie *Saccharum barberi* (Chunnee), chegando a acumular três vezes mais do que a variedade SP70-1143 no mesmo período. As folhas acumularam mais N amino aos 90 DAP, e as quatro variedades decresceram cerca de 1/3 do valor inicial, ao final do ciclo.

A maior população de *G. diazotrophicus* estava presente nas raízes, principalmente no início do ciclo. Esse fato está relacionado com o efeito de diluição. Entretanto como as raízes de gramíneas são profundas, embora

o número diminua por unidade de massa (g de matéria fresca), a população pode ser maior pela matéria fresca total, que aumenta com a idade. As variedades comerciais (SP70-1143 e SP79-2312) apresentaram uma população dez vezes maior de *G. diazotrophicus* aos 90 DAP, diferindo de Krakatau e Chunnee, e apenas a variedade SP70-1143 manteve a população mais alta até os 180 DAP (Tabela 4). O fato de ter existido uma maior população de *G. diazotrophicus*, na variedade SP70-1143, sugere que há maior potencial dessa variedade, com relação à fixação biológica de nitrogênio, como já citado por Urquiaga et al. (1992), que obtiveram 67% do nitrogênio utilizado em seu ciclo, da FBN. As maiores populações de bactérias diazotróficas, encontradas nas raízes, estão de acordo com os estudos realizados em cana-de-açúcar por Reis Júnior et al. (2000a, 2000b).

De modo geral, a população nos colmos e folhas foi inferior a 10^4 células por g de matéria fresca, não tendo

Tabela 3. Concentração de N amino livre ($\mu\text{mol g}^{-1}$ de matéria fresca), em diferentes partes da planta de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), em função de dias após plantio (DAP)⁽¹⁾.

DAP	SP70-1143	SP79-2312	Krakatau	Chunnee	Média
Raízes					
90	3,587bc	6,234a	3,186c	3,900b	4,227A
180	3,805a	3,901a	2,821b	3,775a	3,576B
360	3,725b	2,983c	6,636a	3,694b	4,259A
540	4,551b	5,487a	1,865c	1,110d	3,253B
Média	3,917b	4,651a	3,627b	3,119c	
Colmo basal					
90	3,056a	3,020a	2,612a	2,710a	2,850A
180	0,918c	2,422a	1,114bc	1,515b	1,492C
360	1,250d	2,847c	4,746a	3,958a	3,200A
540	0,197c	1,171a	0,798ab	0,346bc	0,626D
Média	1,355b	2,365a	2,315a	2,132a	
Colmo intermediário					
90	3,633a	1,430b	-	-	-
180	0,906a	1,325a	0,973a	1,175a	1,095B
360	1,175b	2,795a	1,707b	2,397a	2,018A
540	0,404b	0,273b	1,074a	0,584ab	0,584C
Média	1,529a	1,456a	1,251b	1,385b	
Colmo apical					
90	4,459a	4,897a	-	-	-
180	1,120b	1,243ab	2,325a	1,078b	1,441C
360	6,317b	4,648c	4,900c	19,205a	8,767A
540	1,112b	0,890b	6,293a	1,350b	2,411B
Média	3,377b	2,919b	4,506b	7,211a	
Folhas					
90	6,627b	7,654a	7,603a	6,961ab	7,211A
180	4,590b	5,768a	4,227b	3,030c	4,404C
360	3,576c	5,582b	6,198ab	6,412a	5,442B
540	1,634b	3,038a	1,700b	2,065b	2,110D
Média	4,107c	5,510a	4,932b	4,617b	

⁽¹⁾Médias seguidas de mesma letra, minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; médias de 4 repetições; os coeficientes de variação relativos aos dados das raízes, colmo basal, colmo intermediário, colmo apical e folhas foram 8,86%, 12,94%, 26,57%, 15,37% e 8,74%, respectivamente.

diferido entre variedades ou épocas de coleta. Baixos números populacionais também foram observados por Gonzales & Barraquio (2000), nas Filipinas, pelo método aqui utilizado, o NMP. Tal fato pode ser atribuído ao estado fenológico da planta, como sugerido por Reis Júnior et al. (2000a). A população de *G. diazotrophicus* decresceu com a aproximação do final do ciclo da cultura da cana (Reis Júnior et al., 2000b). Asis et al. (2000) obtiveram números em torno de $4,5 \times 10^5$ células por g de matéria fresca de colmos de cana-de-açúcar plantada no Japão. Estes autores isolaram 21 estirpes fixadoras de nitrogênio, tendo utilizado o mesmo meio de cultivo deste trabalho, para o isolamento de *G. diazotrophicus*. Muñoz-Rojas & Caballero-Mellado (2003) observaram que a população das estirpes de *G. diazotrophicus*, inoculada em plantas micropropagadas de diferentes variedades de cana-de-açúcar, diminuiu drasticamente, em relação à ida-

de da planta, e que tal decréscimo ocorreu independentemente do nível de fertilização, genótipo da bactéria ou variedade da planta.

Com relação à população de *Herbaspirillum* spp. nas raízes, observou-se pouca variação no número populacional ao longo do tempo (10^2 a 10^4 células por g de matéria fresca), e os números foram superiores aos observados para *G. diazotrophicus* (Tabela 5). Embora não tenha sido observada diferença varietal, a população se manteve em números maiores por mais tempo, independentemente da época de amostragem. Essa tendência também foi verificada por Reis Júnior et al. (2000a, 2000b). *Herbaspirillum* spp. figura entre a população microbiana do solo, e pode tanto obter metabólitos de carbono na rizosfera, quanto no interior das raízes, hipótese reforçada por observações de Muthukumarasamy et al. (1999), que não verificaram diferenças na população desse gênero, na rizosfera e no interior das raízes.

Tabela 4. População de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (log do número de células g⁻¹ de matéria fresca), em diferentes partes da planta de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), em função e dias após plantio (DAP)⁽¹⁾.

DAP	SP70-1143	SP79-2312	Krakatau	Chunnee	Média
Raízes					
90	4,220a	4,775a	2,957b	2,477b	3,607A
180	3,811a	2,569b	2,652ab	2,477b	2,877AB
360	2,957a	2,477a	2,508a	2,477a	2,605B
540	2,957a	2,707a	2,477a	2,477a	2,655C
Média	3,486a	3,132ab	2,649bc	2,477c	
Colmo basal					
90	2,477a	2,477a	2,477a	2,477a	2,477A
180	2,727b	2,477b	2,802b	4,105a	2,903A
360	3,187a	3,251a	2,852a	2,477a	2,942A
540	2,477a	2,477a	2,477a	2,477a	2,477A
Média	2,717a	2,671a	2,527a	2,884a	
Colmo intermediário					
90	2,477a	2,477a	-	-	-
180	2,771a	2,508a	2,652a	2,477a	2,602A
360	3,021a	2,477a	2,890a	2,477a	2,716A
540	2,477a	2,477a	3,152a	2,477a	2,646A
Média	2,686a	2,485a	2,898a	2,477a	
Colmo apical					
90	2,508a	2,477a	-	-	-
180	2,596a	2,477a	2,477a	2,477a	2,507A
360	3,021a	2,508ab	2,508ab	2,477a	2,659A
540	2,477a	2,477a	2,477a	2,477a	2,477A
Média	2,651a	2,507a	2,484a	2,477a	
Folhas					
90	2,802a	2,477a	2,477a	2,477a	2,558A
180	2,477a	2,477a	2,477a	2,477a	2,477A
360	2,477b	3,187a	2,477b	2,477b	2,655A
540	2,477a	2,477a	2,477a	2,477a	2,477A
Média	2,558a	2,654a	2,477a	2,477a	

⁽¹⁾Médias seguidas de mesma letra, minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; médias de 4 repetições; os coeficientes de variação relativos aos dados das raízes, colmo basal, colmo intermediário, colmo apical e folhas, foram 21,60%, 21,00%, 28,83%, 12,48% e 10,62, respectivamente.

Vale ressaltar que os toletes usados para a propagação da cana-de-açúcar carregam uma população nativa de bactérias diazotróficas, pertencentes aos gêneros avaliados neste trabalho, e outros como *Azospirillum*, *Burkholderia* etc. Mesmo que tais populações estabelecidas se multipliquem e colonizem as raízes da cana-de-açúcar, os números populacionais estão de acordo com os dados descritos para essa e outras gramíneas, onde as raízes apresentam os maiores valores (Olivares, 1997).

Nos colmos e folhas, a população manteve-se em números relativamente baixos ao longo do ciclo, independentemente da variedade e época de coleta. Em algumas coletas, esse número elevou-se em torno de dez vezes (Tabela 5). Muthukumarasamy et al. (1999) verificaram que a população de *Herbaspirillum* spp. foi mais abundante em colmos e folhas, que nas raízes e rizosfera. Entretanto, Reis Júnior et al. (2000b) observaram tendência inversa, e também

verificaram que a população dessa bactéria não sofreu decréscimo com a aproximação do final do ciclo, nas duas variedades avaliadas (SP70-1143 e SP79-2312), nem tampouco ao longo do ciclo das canas não comerciais (Chunnee e Krakatau). Olivares (1997) verificou decréscimo nos números de *Herbaspirillum* spp., em plântulas de cana-de-açúcar que passaram por inoculação, com o aumento da idade, sob condições de casa de vegetação.

A composição do N, nas variedades estudadas, apresentou-se dentro dos níveis esperados para gramíneas e, principalmente, para a cana de açúcar, que produz sacarose e não acumula nitrogênio em quantidades elevadas em nenhum de seus órgãos. As diferenças observadas estão relacionadas com as características genótípicas, pois trata-se de duas espécies diferentes e dois *Saccharum* híbridos. Não foi verificada correlação entre as formas de nitrogênio estudadas e a população de bactérias. A população

Tabela 5. População de *Herbaspirillum* spp. (log do número de células g⁻¹ de matéria fresca), em diferentes partes da planta de cana de açúcar (*Saccharum* spp.), em função de dias após plantio (DAP)⁽¹⁾.

DAP	SP70-1143	SP79-2312	Krakatau	Chunnee	Média
Raízes					
90	4,872a	5,023a	4,212a	3,624a	4,433A
180	3,989a	4,261a	4,936a	3,688a	4,219A
360	4,265a	3,251a	3,865a	3,187a	3,642A
540	3,758a	2,957a	2,724a	2,477a	2,979A
Média	4,221a	3,873ab	3,934ab	3,244b	
Colmo basal					
90	2,508a	2,477a	2,477a	2,802a	2,566A
180	2,508a	2,477a	2,477a	2,477a	2,485A
360	2,477a	2,477a	2,625a	2,477a	2,521A
540	2,596a	2,477a	2,477a	2,477a	2,507A
Média	2,522a	2,477a	2,521a	2,558a	
Colmo intermediário					
90	2,477a	2,477a	-	-	-
180	2,477a	2,477a	2,477a	2,477a	2,477A
360	2,477b	2,477b	3,219a	2,477b	2,662A
540	3,227a	2,508b	2,569b	2,477b	2,695A
Média	2,665a	2,485a	2,755a	2,477a	
Colmo apical					
90	2,477a	2,477a	-	-	-
180	2,500a	2,477a	2,477a	2,477a	2,485A
360	2,477a	2,477a	2,477a	2,477a	2,477A
540	2,707a	2,477a	2,477a	2,477a	2,535A
Média	2,542a	2,477a	2,477a	2,477a	
Folhas					
90	2,652a	2,477a	2,477a	2,508a	2,529A
180	2,539a	2,627a	2,477a	2,477a	2,530A
360	2,477a	2,477a	2,477a	2,477b	2,477A
540	2,477b	2,477b	3,057a	2,477b	2,622A
Média	2,536a	2,530a	2,622a	2,485a	

⁽¹⁾Médias seguidas de mesma letra, minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; média de 4 repetições; os coeficientes de variação relativos aos dados das raízes, colmo basal, colmo intermediário, colmo apical e folhas foram 22,14%, 7,16%, 14,01%, 5,32% e 7,16%, respectivamente.

das duas espécies apresentou números baixos, em todos os materiais vegetais estudados, e maiores esforços devem ser direcionados na busca de metodologias que quantifiquem a população total de bactérias fixadoras.

Conclusões

1. Os valores do porcentual de nitrogênio tendem a ser mais elevados aos 90 dias após o plantio nos colmos e nas folhas.

2. As maiores concentrações de N amino ocorrem nas raízes, colmo basal e folhas da variedade SP79-2312 e no colmo apical do genótipo Chunnee.

3. Os maiores valores na concentração de nitrato são observados no colmo basal e intermediário das variedades SP79-2312, SP70-1143, e no colmo basal da Chunnee.

4. As maiores populações de *Gluconacetobacter diazotrophicus* são observadas nas raízes das variedades SP70-1143 e SP79-2312.

5. As populações de *Herbaspirillum* spp. são maiores nas raízes de todos os genótipos.

6. As análises das formas de nitrogênio não se correlacionam à população de bactérias diazotróficas avaliadas.

Agradecimentos

Ao CNPq, pelas bolsas de produtividade concedidas aos pesquisadores; ao Pronex II/CNPq, pelo apoio financeiro.

Referências

- ASIS, C.A.; KUBOTA, M.; OHTA, H.; ARIMA, Y.; CHEBOTAR, V.K.; TSUCHIY, A.K.; AKAO, S. Isolation and partial characterization of endophytic diazotrophs associated with japanese sugarcane cultivar. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.46, p.759-765, 2000.
- AZEREDO, D.F.; BOLSANELLO, J.; WEBER, H.; VIEIRA, J.R. Nitrogênio na cana planta: doses e fracionamento. **Revista STAB**, v.4, p.32-36, 1986.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root associated nitrogen-fixing. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.36, p.86-93, 1986.
- BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HORSTE, B.; KERSTERE, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Inclusion of "*Pseudomonas*" *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen within the genus *Herbaspirillum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.46, p.802-810, 1996.
- BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A₁ and A₃ by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v.24, p.7-11, 1998.
- CATALDO, D.A.; SCHARADER, L.E.; YONGS, L.R. Analyses by colorimetric assay of total nitrogen in plant tissues high in nitrate. **Crop Science**, v.14, p.854-856, 1975.
- CAVALCANTE, V.A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v.108, p.23-31, 1988.
- CLEMENTS, H.F. **Sugarcane crop logging and control: principles and practices**. [London]: Pitman Publishing; [Honolulu]: The University Press of Hawaii, 1980. 520p.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas em plantas não leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI; Itaguaí-RJ: Embrapa-CNPAB, 1995. 60p.
- FERNANDES, M.S.; ROSSIELLO, R.O.P. Mineral nitrogen in plant physiology and plant nutrition. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.14, p.111-148, 1995.
- FUENTES-RAMÍREZ, L.E.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I.R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indole-acetic acid producing bacterium isolated from sugar cane cultivars in México. **Plant and Soil**, v.154, p.145-150, 1993.
- GONZALEZ, M.S.; BARRAQUIO, W.L. Isolation and characterization of *Acetobacter diazotrophicus* (Gillis) in *Saccharum officinarum* L., *S. spontaneum* L., and *Erianthus* sp. **Philippine Agricultural Scientist**, v.83, p.173-181, 2000.
- JAMES, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, v.65, p.197-209, 2000.
- MICHIGAN STATE UNIVERSITY. **MSTAT-C: a software program for the design, management, and analysis of agronomic research experiments**. East Lansing: 1989. 1 CD-ROM.
- MUÑOZ-ROJAS, J.; CABALLERO-MELLADO, J. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. **Microbial Ecology**, v.46, p.454-464, 2003.
- MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of N fertilisation on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility of Soils**, v.29, p.157-164, 1999.
- OLIVARES, F.L. **Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. híbrido) por bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum***. 1997. 328p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- REIS JUNIOR, F.B. dos; REIS, V.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J. Influence of nitrogen fertilisation on the population

- of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). **Plant and Soil**, v.219, p.153-159, 2000a.
- REIS JUNIOR, F.B. dos; REIS, V.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.985-994, 2000b.
- ROSSIELLO, R.O.P. **Bases fisiológicas da acumulação de nitrogênio e potássio em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp., cv. NA 56-79) em resposta à adubação nitrogenada em Cambissolo**. 172p. 1987. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- SILVEIRA, J.A.G. **Interações entre assimilação de nitrogênio e o crescimento de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) cultivada em condições de campo**. 1985. 152p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- SILVEIRA, J.A.G.; CROCOMO, O.J. Sintomas de deficiência de potássio induzidos pelo acúmulo de aminoácidos e amônia em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.13, p.329-334, 1989.
- TEDESCO, M.J. **Extração simultânea de N, P, K, Ca e Mg em tecidos de plantas por digestão com H₂SO₄**. Porto Alegre: UFRGS, 1983. 23p.
- THANGAVELU, S.; RAO, K.C. Total nitrogen content present in immature, mature and over-mature cane juice of some sugarcane genetic stocks. **Indian Sugar**, v.46, p.507-511, 1996.
- URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.; BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen-fixation to sugarcane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimate. **Soil Science Society of America Journal**, v.56, p.105-114, 1992.
- YEEM, E.W.; COCKING, E.C. The determination of aminoacid with ninhydrin. **Analyst**, v.80, p.209-213, 1955.
- YONEYAMA, T.; MURAOKA, T.; KIM, T.H.; DACANAY, E.V.; NAKANISHI, Y. The natural ¹⁵N abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). **Plant and Soil**, v.189, p.239-244, 1997.

Recebido em 3 de fevereiro de 2005 e aprovado em 5 de abril de 2005