

ANÁLISE DO pH DO EXTRATO DE ISOLAMENTO E DOS ÍNDICES TECNOLÓGICOS NA COLONIZAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp*) POR *Gluconacetobacter diazotrophicus*

ARÃO ARAÚJO GOMES¹, SILVIA REGINA GOI², VERA LÚCIA DIVAN BALDANI³ & JORGE JACOB NETO⁴

1- Escola Agrotécnica Federal de Sergipe, Aracajú; 2- UFRRJ, Depto. de Ciências Ambientais/IF, 23890-000, Seropédica-RJ; 3- Embrapa-Agrobiologia, Seropédica-RJ; 4- UFRRJ, Depto de Fitotecnia/IA, Seropédica-RJ.

RESUMO

O presente trabalho foi conduzido em condições de campo com os híbridos SP 70-1143, SP 79-2312 e SP 1842 de *Saccharum officinarum* e as espécies *Saccharum spontaneum* e *Saccharum barberi*, com o objetivo de observar a influência da variação de pH do extrato de isolamento de bactérias endofíticas, e variações dos índices tecnológicos na população de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Foram estudados os índices tecnológicos (sólidos solúveis totais, sacarose aparente e açúcares redutores totais), o pH do extrato de isolamento e contagem do número de bactérias. Os resultados mostraram que os sólidos solúveis totais aumentaram com a idade da planta, sendo observado um ligeiro decréscimo a partir dos 360 dias após o plantio, nos colmos basais e intermediários. Os açúcares redutores totais apresentaram uma tendência a aumentar no final do ciclo nas canas comerciais. Os valores para açúcares redutores totais no colmo apical, no final do ciclo, correlacionaram-se positivamente com a população de *Glucanacetobacter diazotrophicus* na variedade SP 70-1143. Os valores mais baixos de pH dos extratos, foram observados nas raízes das plantas estudadas, locais onde também foram observadas as maiores populações de bactérias.

Palavras-chave: fixação biológica de nitrogênio, bactérias diazotróficas endofíticas, °BRIX, POL.

ABSTRACT

ANALYSIS OF pH OF THE ISOLATION EXTRACT AND TECHNOLOGICAL INDEXES ON THE COLONIZATION OF SUGARCANE PLANT BY *Gluconacetobacter diazotrophicus*

The field experiment was conducted with the two commercial varieties SP 70-1143 e SP 79-2312 of *Saccharum officinarum* and two breeding materials: Krakatau and Chunnee. The objective of this work was to investigate the effect of pH of the isolation extract and technological indexes on the colonization sugarcane plant by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. The studied parameters were: number of the bacterial population, pH of plant extract, % soluble solids, apparent sucrose and reduced sugar. The total soluble solids increased with the plant age, a little decrease were observed at 360 days after planting in the stems (basal and intermediary). The results showed that the higher values in the bacteria population were found in the roots of SP 70-1143, SP 79-2312 and Krakatau, where it were found lower pH value.

Key words: biological nitrogen fixation, endophytic diazotrophic bacteria, °BRIX, POL.

INTRODUÇÃO

O conhecimento das relações metabólicas entre as bactérias diazotróficas endofíticas com o seu hospedeiro, pode servir de ferramenta útil na elucidação do processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) nas gramíneas. A FBN que ocorre em plantas de cana-de-açúcar, pela colonização de tecidos por bactérias diazotróficas endofíticas, é sem dúvida uma estratégia alternativa para uma agricultura sustentável.

Estudos de quantificação da FBN, têm mostrado que cana-de-açúcar pode fixar quantidades

consideráveis de nitrogênio, evidenciando o potencial da associação com bactérias diazotróficas endofíticas. Lima *et al.* (1987) observaram o acúmulo de 200 kg/N/ha/ano na variedade CB 47-89 e Urquiaga *et al.*, (1992) citam o acúmulo de 170 a 210 kg/N/ha em CB 43-3 e SP 70-1143, respectivamente. Entre as bactérias associadas à cultura da cana-de-açúcar, responsáveis pela FBN, destaca-se a *Gluconacetobacter diazotrophicus* que pode ser responsável por grande parte do nitrogênio fixado na planta (Urquiaga *et al.*, 1992; Baldani *et al.*, 2002).

Em relação ao metabolismo bacteriano, sobretudo

no que se refere ao pH do meio de crescimento, a maioria das bactérias apresenta caráter neutrófilo, crescendo na faixa que vai de 6,0 a 8,0. *Gluconacetobacter diazotrophicus* por estar inserida no grupo das bactérias do ácido acético, cresce também em faixa de pH ácido; a tolerância à acidez apresentada por essa bactéria permite seu crescimento em pH em torno de 3,0 (Dobereiner *et al.*, 1995). A sobrevivência desses microrganismos em larga escala de pH, requer a secreção de diferentes enzimas, que possam tornar o pH do ambiente a ser colonizado, ideal para o seu crescimento. Manteau *et al.*, 2002, citam que a capacidade dos microrganismos de acidificar localmente o hospedeiro, como ocorre com o fungo *Botrytis cinerea*, via funcionamento de algumas enzimas que lhe conferem patogenicidade ou via secreção de vários ácidos orgânicos como ácido oxálico (Manteau *et al.*, 2002). Os autores citam também que embora pouco estudado, os tecidos da planta diferem em seu valor de pH, composição da parede celular e defesas bioquímicas, fatores que podem influenciar a colonização por microrganismos nestes diferentes ambientes.

As plantas apresentam diferentes estratégias para regulação do pH. Embora as interações metabólicas celulares tenham evoluído para desenvolver uma cadeia de transformações químicas e energéticas na qual a soma de prótons produzido, consumido, transferido ou transportado se aproxime de zero, existe uma variedade de situações em que pode ocorrer um distúrbio no equilíbrio dinâmico (Felle, 1996), tal como o abaixamento de até 0,6 unidades de pH em pêlos radiculares de *Medicago sativa* em condições de anoxia. Menegus *et al.*, (1991) cita que plântulas de arroz também em condições de anoxia são acidificadas em 0,4 unidades de pH.

A regulação do pH do citoplasma e do vacúolo, em função das diferentes fontes de nitrogênio a ser assimilado, se dá pela eliminação do excesso de H⁺ ou OH⁻, que pode ocorrer por: neutralização resultante da carboxilação ou descarboxilação, transporte para dentro do vacúolo ou transporte via floema para as raízes e depois para a solução do solo (Raven & Smith, 1976). A regulação ácido-base de simbioses diazotróficas, envolve geração de H⁺ ao meio (Raven *et al.*, 1990, Jacob-Neto, 1993).

Existem evidências de que a colonização por bactérias endofíticas e a conseqüente FBN, localizam-se em sítios preferenciais, os quais possivelmente oferecem condições para o desenvolvimento das bactérias. Bactérias endofíticas podem colonizar o apoplasto, vasos do xilema ou células mortas de gramíneas (Dong *et al.*, 1994; James, 2000; Ortega *et al.*, 2001). *G. diazotrophicus* foi anteriormente isolado de raízes, caule e folhas de plantas de cana-de-açúcar (Reis *et al.*, 1994; Reis Jr. *et al.*, 2000).

Durante o crescimento e desenvolvimento da cana-de-açúcar, ocorrem variações nas concentrações de carbono, que podem influenciar a colonização dos espaços intercelulares por bactérias diazotróficas. Na

fase inicial prevalecem os açúcares redutores, os quais vão decrescendo em função do incremento das concentrações de sacarose (Whitaker & Botha, 1997).

Este trabalho teve como objetivo, identificar os locais de colonização por *G. diazotrophicus* em híbridos comerciais de *S. officinarum* com diferentes capacidades de FBN e acúmulo de sacarose e nas espécies *S. spontaneum* e *S. barberi*, quantificando e relacionando a sua população com o pH dos extratos dos tecidos, com a concentração de sólidos solúveis totais, sacarose aparente e açúcares redutores totais.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado no campo experimental da Embrapa-Agrobiologia e utilizou-se um delineamento experimental de parcelas sub-divididas, onde cada variedade representava uma subparcela, plantadas em linhas de 1 m com distâncias entre plantas de 50 cm. Os fatores constantes deste experimento foram: 1 - quatro representantes do gênero *Saccharum*, sendo duas variedades comerciais de cana (SP 70-1143 e SP 79-2312) e duas espécies usadas em cruzamentos para formação de híbridos comerciais: *Saccharum spontaneum* (Krakatau) e *Saccharum barberi* (Chunnee); 2 - quatro épocas de coleta, com 4 repetições (4 plantas). Foram plantados dois toletes com duas gemas cada, obtidos do viveiro da Coopersucar (variedades comerciais) e de um experimento da Embrapa-Agrobiologia (híbridos). Foi feita adubação das covas com 100Kg/ha de K₂O na forma de cloreto de potássio e 150 Kg/ha de P₂O₅, na forma de superfosfato simples. Foi aplicado também 50 Kg/ha de FTE Br12.

As coletas foram realizadas aos 90, 180, 360 e 540 dias após o plantio (DAP), e constavam de raízes, folhas (folha +3) e amostras do colmo apical (entrenó 2), entrenó intermediário (central) e basal (2 entrenós situados 5 cm acima do solo). A contagem do número de bactérias foi realizada pelo método do Número Mais Provável (Dobereiner *et al.*, 1995), utilizando-se amostras de 10 g de material fresco triturado com 90 ml de solução salina (sais do meio NFB a 3/4 da concentração). O inóculo foi diluído em série, em tubos contendo 9 ml desta mesma solução. Em seguida, realizou-se a inoculação de 0,1 ml de cada diluição no centro do meio semi-sólido LGI-P. A estimativa do número de células viáveis, foi feita através da avaliação de películas e utilizou-se a tabela de McCrady (Dobereiner *et al.*, 1995). O pH do extrato dos tecidos vegetais foi medido em potenciômetro, uma hora após a trituração do material vegetal, em meio NFB (1/4 de sais) com pH 6,5 (Dobereiner *et al.*, 1995). Os sólidos solúveis totais (°BRIX) foram determinados por refratômetro de campo, modelo Q-I 107-1. A sacarose aparente (POL) foi medida em polarímetro digital Perkin Elmer, modelo 341 e os açúcares redutores totais

foram obtidos através das reações de FEHLING, por titulação a quente. Os açúcares redutores totais e a sacarose aparente somente foram medidos nas variedades comerciais de cana. A população de bactérias e os sólidos solúveis totais nas espécies *S. spontaneum* e *S. barberi*, só foram determinadas no colmo intermediário e apical a partir da segunda coleta, pois na época da primeira coleta, não foi possível diferenciação do colmo, pois essas espécies apresentaram o crescimento mais lento.

Os dados foram processados e analisados estatisticamente, utilizando o programa SAEG e MSTAT-C. O contraste entre as médias foi feito pelo teste de Tukey a 5%. Os dados para a população bacteriana foram ajustados usando a função logaritmo em base 10.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, pode-se observar os valores de pH encontrados nos tecidos vegetais dos genótipos

estudados. Os menores valores de pH do extrato de tecidos foram encontrados nas amostras de raízes dos genótipos SP 70-1143, SP 79-2312, *Saccharum spontaneum* (Krakatau) e *Saccharum barberi* (Chunnee). Coincidentemente, nestas amostras de raízes foram encontrados também os maiores valores para a população desta bactéria, em termos médios, sendo maior em SP 70-1143 (Tabela 2). Estes resultados estão de acordo com os dados citados por Reis Júnior et al. (2000) que também encontraram um maior número de *G. diazotrophicus* nas raízes de quatro genótipos de cana crescidos a nível de campo, embora estes autores não tenham correlacionado seus resultados com o pH dos tecidos colonizados por essas bactérias. Foram observadas variações médias entre 0,64 e 0,32 unidades de pH, quando comparados os extratos de raiz e colmo basal, podendo ser esse, um dos fatores que leva a raiz a ser considerada um nicho ecológico ideal para a colonização. Na variedade SP 70-1143, foram observadas diferenças extremas de 2,22 unidades de pH, quando comparadas o pH do extrato da raiz e pH do extrato do colmo basal aos 180 dias após plantio.

Tabela 1 – pH dos extratos de diferentes partes de genótipos de cana-de-açúcar

Genótipos				
Época (dap)	SP 70-1143	SP 79-2312	Krakatau	Chunnee
raízes				
90	5,610 a	5,615 a	4,475 a	5,570 a
180	4,890 a	5,390 a	5,340 a	5,570 a
360	5,653 a	5,795 a	5,523 a	5,553 a
540	5,480 a	5,563 a	5,395 a	5,278 a
Média	5,408 a	5,591 a	5,433 a	5,468 a
CV%	4,18			
colmo basal				
90	5,590 a	5,753 a	5,057 b	5,538 a
180	6,112 a	6,112 a	5,933 a	5,933 a
360	6,460 a	6,327 ab	6,005 c	6,155 bc
540	6,035 a	6,030 a	6,050 a	5,777 a
Média	6,049 a	6,056 a	5,761 b	5,865 b
CV%	2,69			
colmo intermediário				
90	5,173 b	5,330 a	-	-
180	6,042 a	6,042 a	5,805 b	6,210 a
360	6,290 a	6,255 a	5,840 b	6,010 b
540	5,788 ab	5,962 a	5,862 a	5,598 b
Média	5,823 b	5,897 ab	5,836 a	5,939 a
CV%	2,07			
colmo apical				
90	5,120 a	5,125 a	-	-
180	5,270 b	5,270 b	5,013 c	5,513 a
360	5,858 a	5,755 ab	5,585 b	5,665 ab
540	5,692 b	5,973 a	5,620 b	5,362 c
Média	5,485 a	5,531 a	5,405 a	5,514 a
CV%	2,52			
Folhas				
90	5,593 a	5,637 a	5,475 a	5,550 a
180	5,510 ab	5,508 ab	5,737 a	5,457 b
360	5,662 a	5,755 a	5,815 a	5,665 a
540	5,667 b	5,660 b	5,942 a	5,362 c
Média	5,608 bc	5,640 ab	5,743 a	5,509 c
CV%	2,29			

Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas linhas ou maiúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Média de 4 repetições.

Contudo, os extratos do colmo apical apresentaram também valores mais baixos de pH, sem ocorrer aumento no número de bactérias. O pH do extrato de tecido encontrado neste trabalho, é resultante da liberação de substâncias orgânicas presentes nos espaços intercelulares, bem como do material

intracelular liberado pela quebra da parede celular. Este trabalho não teve o objetivo de determinar as substâncias orgânicas que só poderiam ser identificadas utilizando outros métodos, como a marcação com material radioativo, como realizado por Jacob-Neto (1993).

Tabela 2- População de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Log do número de células. g⁻¹ massa fresca) em diferentes partes de genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp),.

Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas linhas ou maiúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Média de 4 repetições.

Foram observadas correlações negativas entre a população de *G. diazotrophicus* com o pH do extrato no colmo basal ($r = -0,88$), intermediário ($r = -0,85$) e apical ($r = -0,56$) e positiva com o pH do extrato nas raízes ($r = 0,60$) ao nível de probabilidade de 1%, confirmando que o pH ligeiramente mais ácido encontrado nesta parte da planta, pode influenciar o isolamento. Em *S. spontaneum* ocorreu correlação de r

$= 0,98$ entre a população desta bactéria e o pH do extrato nas raízes. Desta forma, mesmo sendo uma análise de pH realizada no conjunto de tecidos de parte da planta, os dados sugerem que estes valores podem ser correlacionados com a população local de microrganismos. Os resultados do levantamento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* associados aos quatro genótipos estudados de cana-de-açúcar (Tabela

2) mostraram a presença da bactéria em todas as partes amostradas. Foram obtidos 34 isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, sendo 21 destes oriundos das variedades SP 70-1143 e SP 79-2312, que colonizaram os espaços intercelulares ricos em açúcar no caule ou espaços intercelulares da raiz, como já anteriormente identificado por Dong et al. (1994) e Ortega et al., 2001.

Em relação aos índices tecnológicos, que são utilizados para qualificar o caldo de cana, verificou-se que na fase inicial da cultura da cana, os sólidos solúveis totais mostraram seus valores mais baixos, e foram aumentando com o decorrer do desenvolvimento da cultura (Tabela 3), sendo observado um ligeiro decréscimo a partir dos 360 dias após o plantio, nos colmos basais e intermediário.

Tabela 3 - Valores dos sólidos solúveis totais (°BRIX) em diferentes partes de genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp).

Genótipos				
Época (dap)	SP 70-1143	SP 79-2312	Krakatau	Chunnee
colmo basal				
90	7,250 ab	8,625 a	6,625 b	6,000 b
180	13,500 b	16,957 a	8,000 c	13,375 b
360	20,900 ab	21,300 a	11,325 c	19,750 b
540	20,425 a	19,025 ab	11,25 c	18,550 b
Média	15,519 b	16,957 a	11,692 c	14,419 b
CV%	5,47			
colmo intermediário				
90	5,500 a	4,875 a	-	-
180	10,250 b	10,050 a	5,750 b	5,000 b
360	20,000 ab	21,000 a	8,500 c	17,500 b
540	18,475 ab	18,050 a	9,250 c	14,300 b
Média	14,556 a	14,269 a	7,838 b	11,413 b
CV%	8,66			

Médias seguidas de mesma letra na linha ou maiúscula nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey (5%). Média e CV em %.

Os valores de °BRIX encontrados neste trabalho são da mesma ordem de grandeza dos encontrados por Komdornfer et al (1993). Este índice correlacionou-se negativamente com a população de *G. diazotrophicus* no colmo basal ($r = -0,83$) e intermediário ($r = -0,83$) ao nível de probabilidade de 1%. Em *S. spontaneum* esse índice correlacionou-se negativamente com a população de *G. diazotrophicus* no colmo basal ($r = -96$) e apical ($r = -89$). As variedades SP 70-1143 e SP 79-2312 apresentaram os maiores valores de sólidos solúveis totais, sendo seguidas por *S. barberi*.

Embora não tenham sido observadas diferenças

significativas, os açúcares redutores totais e a sacarose aparente foram maiores aos 540 dias após plantio (Tabela 4). Assim como o BRIX, a POL foi também maior nos colmos basal e intermediário Na fase de amadurecimento, a sacarose representava quase toda a composição dos carboidratos. Os maiores valores para açúcares redutores totais foram encontrados no colmo apical (Tabela 4). Os açúcares redutores totais no colmo apical correlacionaram-se positivamente com a população de *G. diazotrophicus* nas raízes da variedade SP 70-1143. Na variedade SP 70-1143, o aumento de açúcares redutores totais, no final do ciclo, principalmente no colmo apical correlacionaram-se positivamente com a população desta bactéria nas raízes, ($r = 0,95$). Nesta mesma variedade, a sacarose aparente no colmo apical correlacionou-se negativamente com *G. diazotrophicus* no colmo basal.

Os resultados obtidos neste trabalho, sugerem a habilidade da bactéria *G. diazotrophicus* de colonizar diferentes partes da planta de cana-de-açúcar e que

valores de pH menores, como os encontrados nas raízes, podem favorecer a colonização.

Tabela 4 – Teor de sacarose aparente (POL) e percentagem de açúcares redutores totais do caldo em diferentes partes do colmo de genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp).

Época (dap) / Genótipos	Teor de sacarose aparente		Açúcares redutores to	
	SP 70-1143	SP 79-2312	SP 70-1143	SP 79-
Colmo basal				
360	18,807a	19,245a	0,242a	0,
540	20,175a	19,714a	0,543a	0,
Média	19,491a	19,583a	0,393a	0,
CV%	4,92		14,60	
Colmo intermediário				
360	18,695a	18,352a	0,267a	0,
540	18,302a	18,805a	0,608a	0,
Média	18,499a	18,579a	0,438a	0,
CV%	3,24		18,28	
Colmo apical				
360	7,443a	10,010a	1,225a	1,
540	7,930a	13,123a	2,290a	1,
Média	7,686a	11,566a	1,757a	1,
CV%	21,59		30,51	

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Média de 4 repetições.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao PRONEX II/CNPq pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, B.; MARTINEZ-DRETZ, G. Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 41, p. 918-924.1995.
- BALDANI, J. I.; REIS, V.M.; BALDANI, V. L.; DÖBEREINER, J. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane – reasons for success in Brazil. *Functional Plant Biology*, v. 29, p. 417-423, 2002.
- DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas em plantas não leguminosas. Itaguaí-RJ. Embrapa/CNPAB.1995. 60 p.
- DONG, Z., CANNY, M. J., McCULLY, M. E., REBOREDO, M. R., FERNANDEZ, C., ORTEGA, E., RODES, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. A new role for the apoplast. *Plant Physiology*, v.105, p.1139-1147, 1994.
- FELLE, H. H. Control of cytoplasmic pH under anoxic conditions and its implication for plasma membrane proton transport in *Medicago sativa* root hairs. *Journal of Experimental Botany*, v. 47, p.967-973, 1996.
- JACOB-NETO, J. The interactions of H⁺/OH⁻ exchanges between roots and rhizosphere with plant nutrition and aluminium effects. PhD Thesis. University of Dundee, Dundee, Scotland, 1993.
- JAMES, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research*, v. 65, p. 197-209, 2000.
- KORNDORFFER, G. H. ; BENEDINI, M. S.; ROCHA, A. C.; FERREIRA NETO, D. A. Avaliação de três variedades de cana (*Saccharum officinarum*) submetidas a adubação com nutrientes. STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos, Piracicaba, v. 14, p. 23-26,1995.
- LIMA, E.; BODDEY, R. M.; DOBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen-fixation associated with sugarcane using a ¹⁵N aided nitrogen balance. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford,

- v. 19, p. 165-170. 1987.
- MANTEAU, S.; ABOUNA, S.; LAMBERT, B.; LEGENDRE, L. Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by phytophogenic fungus *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 43, n.3, p. 359-366, 2002.
- MENEGUS, F.; CATTARUZZA, L.; MATTANA, M.; BEFFSGNA, N.; RAGG, E. Response to anoxia in rice and wheat seedlings. Changes in the pH of intracellular compartments, glucose-6-phosphate level and metabolic rate. *Plant Physiology*, v. 95, p. 760-767, 1991.
- ORTEGA, E., RODÉS, R., FUENTE, E. DELA, FERNÁNDEZ, L. Does the routine heat treatment of sugarcane stem pieces for xylem pathogen control affect the nitrogenase activity of an N₂-fixing endophyte in the cane? *Australian Journal of Plant Physiology*, v. 28, p. 907-912, 2001.
- RAVEN, J. A.; FRANCO, A. A. ; JESUS, E. L.de; JACOB NETO, J. H⁺ extrusion and organic-acid synthesis in N₂-fixing symbioses involving vascular plants. *New Phytology*, v.114, p.369-389,1990.
- RAVEN, J. A.; SMITH, F. A. Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytology*, v. 76, p. 415-431, 1976.
- REIS JR F. B. DOS; SILVA, L. G.; REIS, V.M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 35, p. 985-994, 2000.
- REIS, V.M.; OLIVARES, F. L.; DÖBEREINER, J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 10, p. 101-104, 1994.
- SUBIROS, J. F. Juice quality and fibra content in tree sugarcane varieties through one growth cycle in Guatemala. *Agricultura Costarricense*, San José, v. 22, p.173-184,1998.
- WHITTAKER, A.; BOTHA, F. C. Carbon partitioning during sucrose accumulation in sugarcane internodal tissue. *Plant Physiology*, Rockville, v. 115, p. 1661-1659. 1997.