

FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO ATMOSFÉRICO

Prof. Fatima M S Moreira

DCS/UFLA



- N 4º elemento mais abundante nos seres vivos
- Atmosfera 80% N₂
- Animais, vegetais e maioria dos microorganismos só utilizam nitrogênio na forma combinada (Vegetais: nitrato e amônia)
- Fixação biológica do N₂: Pequena parcela de procariotos de diversos ramos filogenéticos (Bactérias, arqueobactérias, cianobactérias, actinobactérias):



Fixação industrial (fertilizantes nitrogenados):

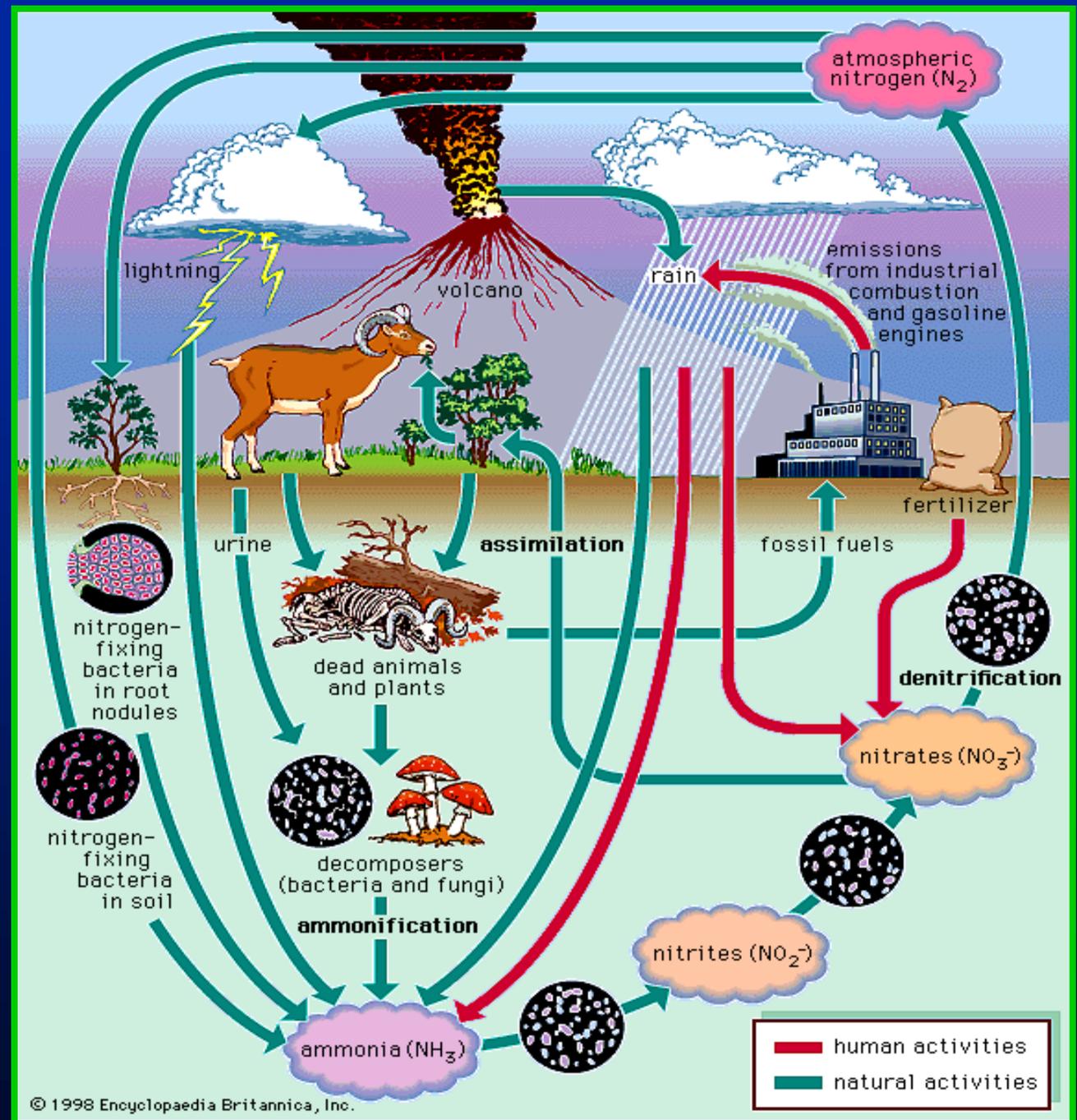


(400º C, 10⁷ Pa - derivados de petróleo)



Nitrogênio

- N é o nutriente mais requerido pelas plantas.



**Fixação anual de nitrogênio atmosférico
(modificado de Keeney, 1982)**

Fonte de fixação	Milhões de toneladas de N por ano
Industrial (fertilizantes)	49
Atmosférico (eletroquímica)	10
Outros processos químicos	35
Fixação biológica total	175
Oceanos	36
Total sistemas terrestres	139
Leguminosas (140 kg.ha⁻¹.ano⁻¹)	35
Cultura do arroz (30 kg.ha⁻¹.ano⁻¹)	4
Pastagens (15 kg.ha⁻¹.ano⁻¹)	45
Outras culturas (5 kg.ha⁻¹.ano⁻¹)	5
Ecossistemas florestais (10 kg.ha⁻¹.ano⁻¹)	40
Outros sistemas (2 kg.ha⁻¹.ano⁻¹)	10

FBN x Fixação industrial

Industrial (Fertilizantes)	FBN
Processo caro, tem alta demanda energética, consome fósseis e pode ser poluente.	É um recurso natural renovável e passivo de manipulação.
Fertilizantes nitrogenados (FN) exigem cuidados especiais para transporte e armazenamento, pois alguns são inflamáveis e explosivos.	É barato e sem impacto ambiental.
FN geralmente tem baixo aproveitamento, e pode ser poluentes de solo, água e atmosfera.	Consome em torno de 2,5% da energia da fotossíntese do planeta.
FN representam de 5 a 20% do custo de produção das culturas.	Mecanismo responsável por 65% do N ₂ incorporado nos seres vivos do planeta.
Expansão é limitada pelo capital e impacto ambiental.	Estima-se que a vida no planeta terminaria em 30 anos se a FBN parasasse.
FN representam apenas 2% da absorção total de N pelas plantas.	Representa 8,5% da absorção total de N.

Diazotróficos procariotos

Diversidade (The Prokaryotes, 1991):

40 gêneros bactérias heterotróficas (e.g. *Azotobacter*)

24 gêneros fototróficos anoxigênicas (e.g. *Rhodospirillum*)

37 gêneros cianobactérias (e.g. *Anabaena*, *Nostoc*)

6 gêneros Archaea (e.g. *Halobacterium*, *Methanococcus*)

Tipos metabólicos:

Aeróbios (e.g. *Bradyrhizobium*), anaeróbios (e.g. *Clostridium*),

anaeróbios facultativos (e.g. *Klebsiella*), microaerofílicos

(e.g. *Azospirillum*)

Halófilos (e.g. *Halobacterium*), metanogênicos (*Methanococcus*),

Metilotróficos (e.g. *Xanthobacter*), celulolíticos (e.g. *Bacillus*),

Denitrificadores (e.g. *Azospirillum*), Bactérias do ciclo do S

(e.g. *Desulfovibrio*, *Thiobacillus*)

Habitats

Vida livre (solo, rizosfera, filosfera, água doce ou salgada, etc.)
e.g. Azospirillum, Azotobacter, Derxia, Beijerinckia, Bacillus, etc.
Trato intestinal de certos animais (*e.g. cupins*)

Associações vegetais:

Endofíticos (dentro de raízes, caules, folhas, sementes)

e.g. Azospirillum spp (lipoferum, brasilense, amazonense) etc.

Endofíticos obrigatórios

Azoarcus spp, Herbaspirillum spp, Gluconobacter (Acetobacter)

Simbiose com fungos, diatomáceas e várias espécies vegetais

Nostoc & fungos, diatomáceas, Briófitas, Gimnospermas,

Angiospermas; Anabaena & Azolla spp.

Frankia & espécies de 8 famílias botânicas

Rizóbio & leguminosas

Associações de Diazotróficos com espécies vegetais

- Colonizam abundantemente a rizosfera, invadem o córtex, colonizam endofíticamente (raízes, caule, folhas)
 - Encontrados principalmente em monocotiledôneas: gramíneas e palmeiras, mas podem ser encontrados em dicotiledôneas.
- Efeitos: Contribuem com N fixado para a nutrição vegetal
- Hormônios de crescimento
 - Absorção de água e nutriente, outros
 - São consideradas BPCV (bactérias promotoras de crescimento vegetal).

Várias espécies ocorrem na mesma planta, não formam estruturas anatômicas diferenciadas nas plantas como os nódulos de rizóbio em leguminosas



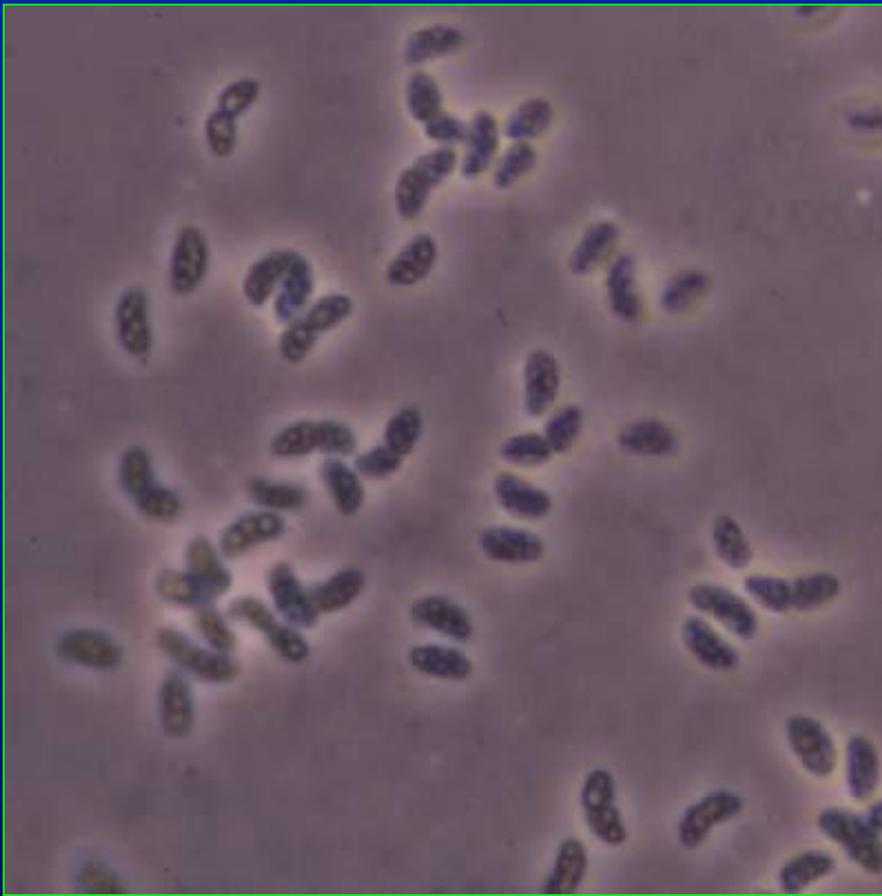
Detecção e isolamento de Bactérias diazotróficas associativas Amostras de solo e raízes de Gramíneas (ou outras spp vegetais)

↓ Amostras de solo/raízes inoculadas em
meio seletivo



→ De culturas com cresci-
mento positivo, i.e.,
formação de películas,
isolamento de
diazotróficos



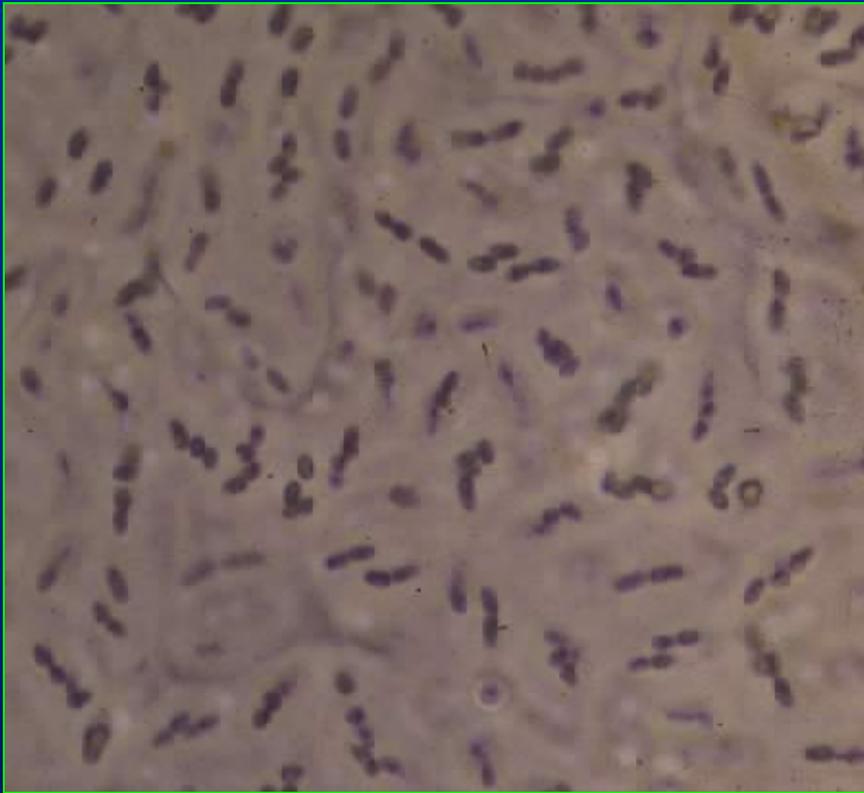


1



2

Azospirillum lipoferum - isolado de rizosfera de *Paspalum plicatum* em solo de terra-firme da região amazônica 1- Células em microscópio com contraste de fase. 2 - Aspecto de colônias em placas.

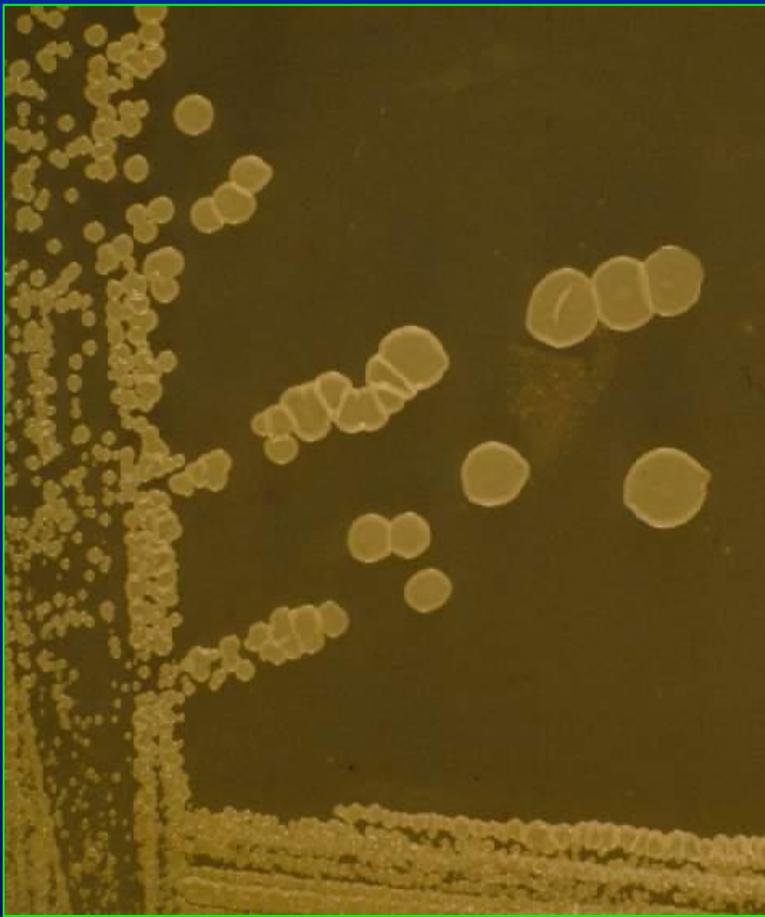


1



2

Derxia gumosa - isolada de raízes de *Oryza perenne* em solo de várzea da região Amazônica. 1- Células em microscópio com contraste de fase, notar goma em volta das células. 2 - Aspecto da colônia em placas.



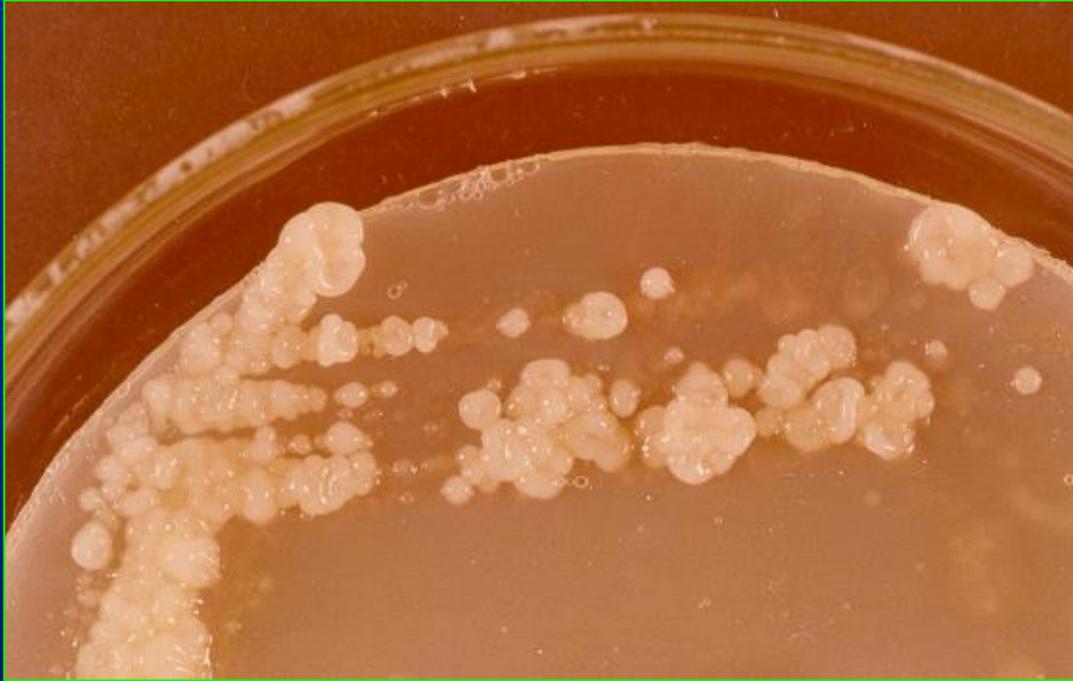
1



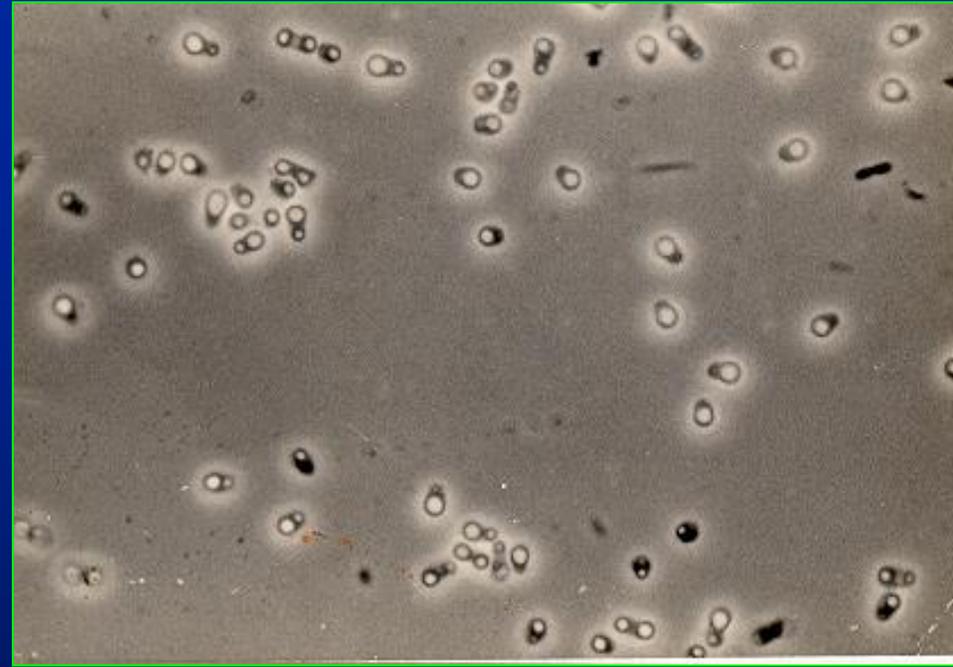
2

Azospirillum amazonense isolado de *Brachiaria brizantha*, *B. humidicola*, *Bactris gasipaes* (pupunha) e outras spp vegetais na Amazônia e de cereais no sudeste brasileiro.

1- Aspecto da colônia. 2- Célula em microscópio eletrônico de transmissão



1



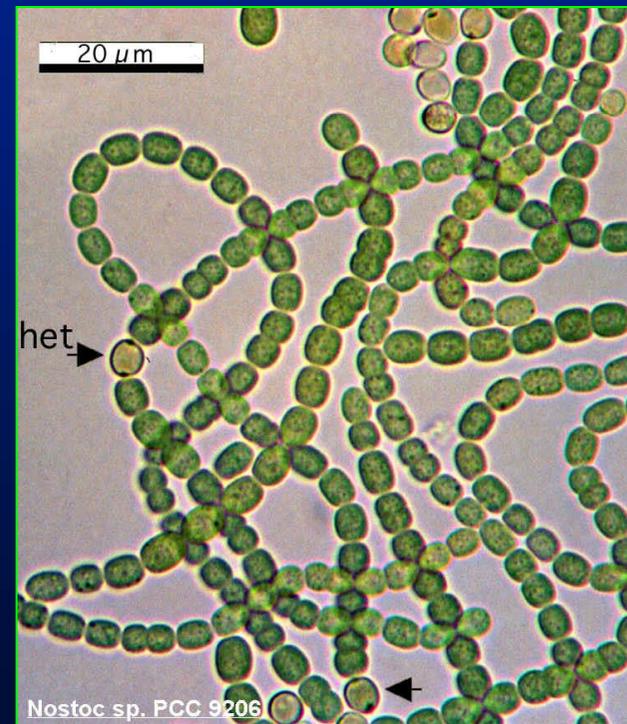
2

Beijerinckia indica - 1. Colônia em placas, 2. Células em microscópio ótico com contraste de fase.

Respostas (em % de aumento de produção) de diferentes espécies vegetais à inoculação com *Azospirillum* spp. no campo (Extraído de várias referências citadas pelas revisões de Boddey & Döbereiner, 1982, Summer, 1990, Okon & Labandera-Gonzales, 1994) em relação ao tratamento não inoculado.

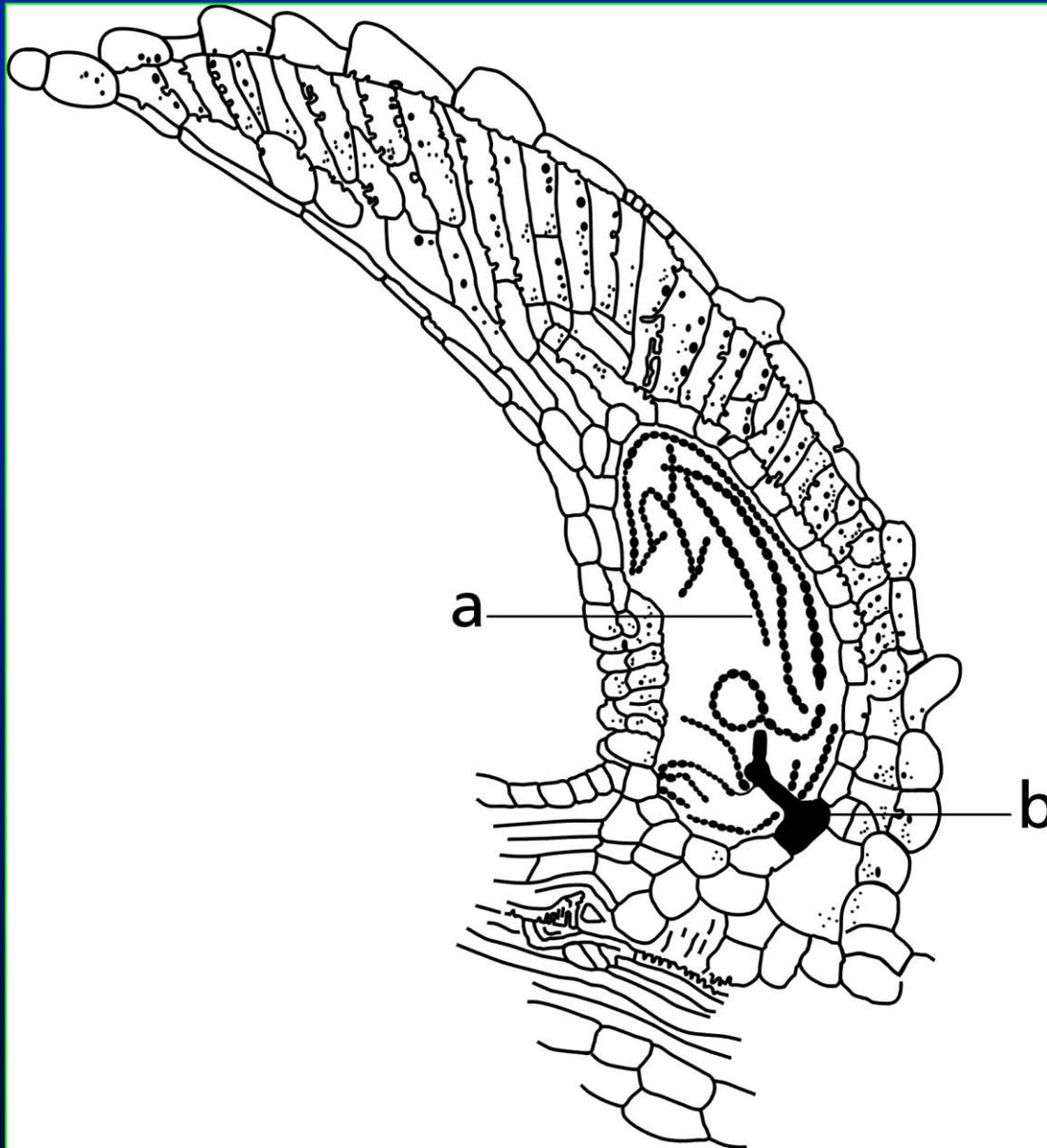
Espécie vegetal	Bactéria	% aumento ¹
<i>Pennisetum americanum</i>	<i>A. lipoferum</i>	0 – 29
	<i>A. brasiliense</i>	<u>-3</u> – 32
<i>Panicum maximum</i>	<i>A. lipoferum</i>	0 – 16
<i>Sorghum bicolor</i>	<i>A. brasiliense</i>	
	<i>A. lipoferum</i>	0 – 370
<i>Zea mays</i>	<i>A. brasiliense</i>	0 – 37
	<i>A. lipoferum</i>	0 – 154
<i>Setaria itálica</i>	<i>A. brasiliense</i>	
	<i>A. lipoferum</i>	21 – 58
<i>Panicum miliaceum</i>	<i>A. brasiliense</i>	13
<i>Triticum aestivum</i>	<i>A. brasiliense</i>	0 – 79
	<i>A. lipoferum</i>	0 – 64
	<i>A. amazonense</i>	37
<i>Oryza sativa</i>	<i>Azospirillum</i> sp.	5 – 15
	<i>A. lipoferum</i>	<u>-32</u> – 99
<i>Vicia sativa</i>	<i>A. brasiliense</i>	23
<i>Arachis hypogea</i>	<i>A. lipoferum</i>	24 – 25
<i>Pisum sativum</i>	<i>A. brasiliense</i>	0

Simbiose de cianobactérias com plantas, fungos e diatomáceas.



Simbiose das cianobactérias com plantas, fungos e diatomáceas

Simbionte	Gênero das cianobactérias	Localização	N ₂ fixado kg.ha ⁻¹ .ano ⁻¹
Diatomacea			
(marinhas)			
<i>Rhizosolenia</i>			
<i>Hemiaulus</i>	<i>Rhichelia</i>		3
Fungos	<i>Calothrix</i>		
	<i>Nostoc</i>	Talo	
	<i>Scytonema</i>	(intercelular)	1 - 10
Briófitas			
<i>Phaeoceros</i>			
<i>Anthoceros</i>			
<i>Blasia</i>		Talo	
<i>Cavicularia</i>	<i>Nostoc</i>	(intercelular)	1 - 10
Pteridófitas			
<i>Azolla</i>	<i>Anabaena</i> (<i>Nostoc?</i>)	Cavidade nas folhas (intercelular)	10 - 100
Gimnospermas			
<i>Macrozamia</i>		Raízes diferenciadas	
Cicadaceae	<i>Nostoc</i>	(inter e intracelular)	20
Angiospermas			
<i>Gunnera</i>	<i>Nostoc</i>	Glândulas axilares (intracelular)	10 - 70



Corte transversal
do lóbulo superior
da folha de *Azolla*
a) Filamentos de *Anabaena*
b) Pêlos de transferência

Cultivo de *Azolla* spp na Amazônia



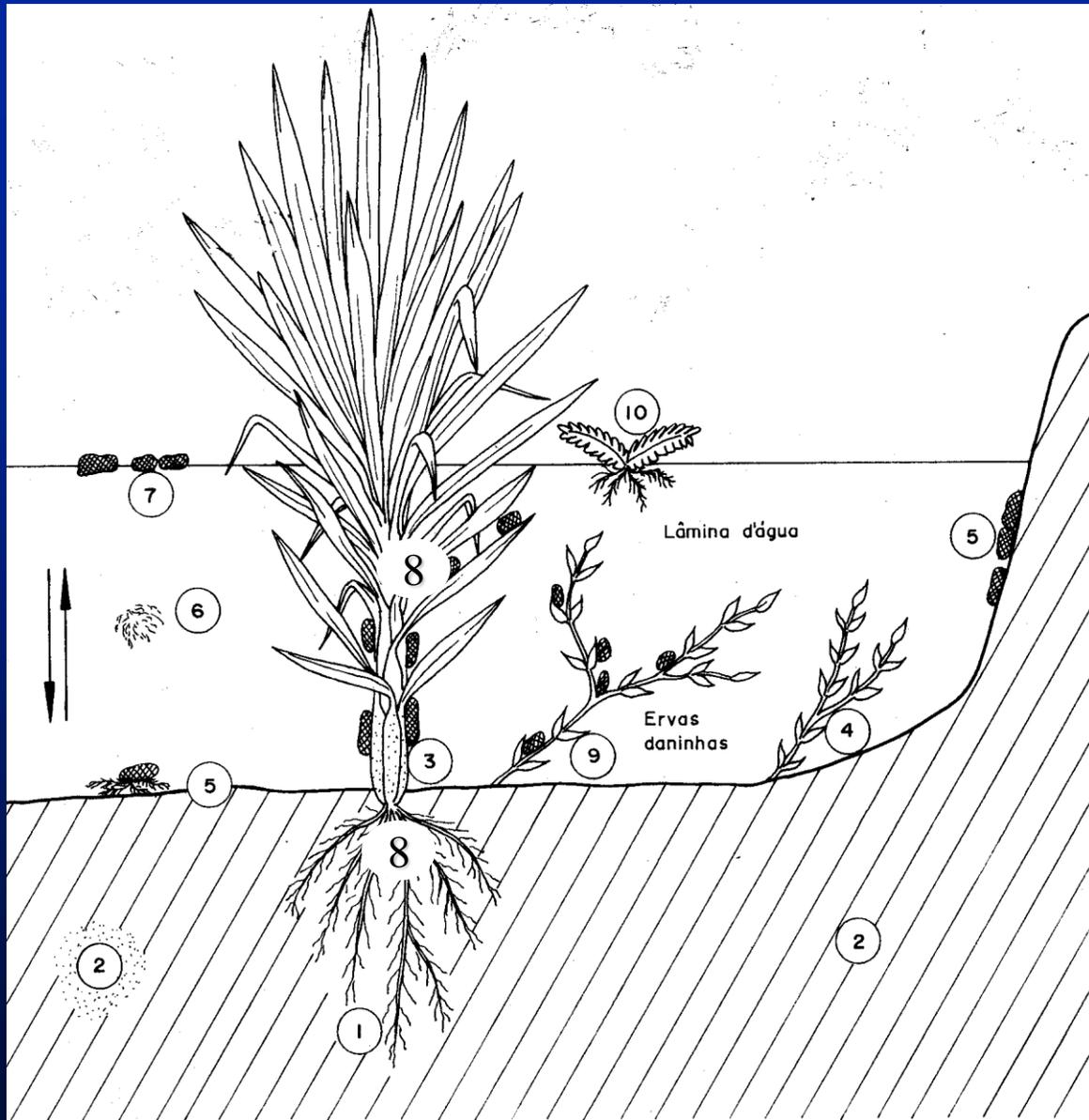


Secagem de *Azolla*
Para utilização como
Adubo ou ração para
animais

Efeito de *Azolla* na produção de arroz⁽¹⁾

Tratamento	Produção de grãos	
	1979	1980
 ton/ha (%)	
	
Sem N	2,6 (100)	3,2 (100)
30 kg N/ha – uréia	3,2 (122)	3,8 (123)
60 kg N/ha – uréia	3,7 (141)	4,2 (139)
<i>Azolla</i> antes plantio (transplântio)	3,2 (122)	4,0 (123)
<i>Azolla</i> depois plantio incorporada	3,1 (118)	3,9 (123)
<i>Azolla</i> depois plantio não incorporada	3,1 (118)	4,0 (123)
30 kg N + <i>Azolla</i> antes plantio	3,7 (143)	4,4 (140)
30 kg N + <i>Azolla</i> depois transplântio	3,5 (134)	4,4 (140)
<i>Azolla</i> antes e depois transplântio	3,6 (139)	4,2 (137)

⁽¹⁾ Conduzido pelo Int. Network of soil fert. and Fert. evaluation for rice (IRRI) (5 países), em 13 e 19



Diversidade de diazotróficos em ecossistemas. Exemplo: localização de diazotróficos em diversos nichos de arroz inundado:

1. Rizosfera
2. Solo
3. Epifíticas em arroz
4. Epifíticas em ervas daninhas
5. Interface solo/água
6. Flutuante
7. Interface água-ar
8. Endofíticas no arroz
9. Epifíticas em ervas daninhas
10. Em simbiose com *Azolla*

Simbiose entre *Frankia* (actinobactérias) e plantas

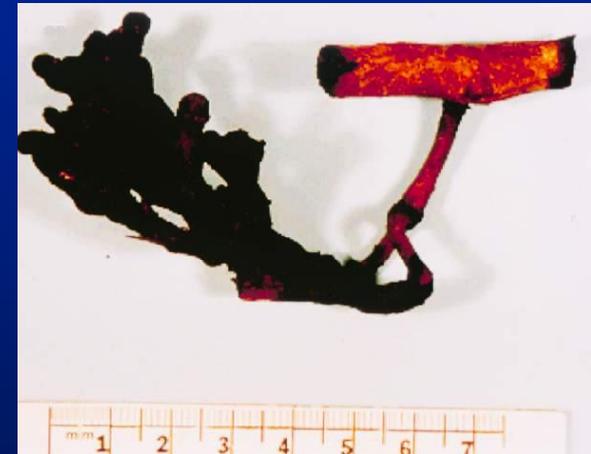


Distribuição geográfica dos gêneros de plantas actinorrízicas, i.e., que formam simbiose com *Frankia* (Baker & Mullin, 1992)

Gênero	Família	Nº de espécies noduladas	Distribuição geográfica principal ^a
<i>Allocasuarina</i>	Casuarinaceae	58	Aus
<i>Alnus</i>	Betulaceae	42	AmN, AmS, Eur, NAs, SAs
<i>Casuarina</i>	Casuarinaceae	18	Aus, SAs, NAf, AmN, AmS
<i>Ceanothus</i>	Rhamnaceae	31	AmN
<i>Cercocarpus</i>	Rosaceae	4	AmN
<i>Ceuthostoma</i>	Casuarinaceae	2	Aus
<i>Chamaebatia</i>	Rosaceae	1	AmN
<i>Colletia</i>	Rhamnaceae	3	Eur, NAf, AmS
<i>Comptonia</i>	Myricaceae	1	AmN
<i>Coriaria</i>	Coriariaceae	16	Aus, AmN, AmS, Eur
<i>Cowania</i>	Rosaceae	1	AmN
<i>Datisca</i>	Datiscaceae	2	AmN, SAs
<i>Discaria</i>	Rhamnaceae	5	AmS, Eur
<i>Dryas</i>	Rosaceae	3	AmN, Eur
<i>Elaeagnus</i>	Elaeagnaceae	35	NAs, AmN, Eur, SAs
<i>Gymnostoma</i>	Casuarinaceae	18	Aus
<i>Hippophae</i>	Elaeagnaceae	2	Eur, NAs
<i>Kentrothamnus</i>	Rhamnaceae	1	AmS
<i>Myrica</i>	Myricaceae	28	SAf, AmN, AmS, Aus, SAs, NAs
<i>Purshia</i>	Rosaceae	2	AmN
<i>Retanilla</i>	Rhamnaceae	1	AmS
<i>Shepherdia</i>	Elaeagnaceae	2	AmN
<i>Talguenea</i>	Rhamnaceae	1	AmS
<i>Trevoa</i>	Rhamnaceae	2	AmS
Total		279	

^a AmN = América do Norte, AmS = América do Sul, Eur = Europa, Aus = Austrália e Oceania, NAf = N

Simbioses rizóbio & Leguminosas



Nódulo de *S. schomburkii*,
floresta de terra firme,
Amazônia.

Swartzia laevicarpa-
Rio Negro , Amazônia

LEGUMINOSAE

Terceira maior Família das fanerógamas:
650 gêneros, **19 700** espécies

Sub-família	Número de espécies
Caesalpinioideae	1900 (maioria arbóreas tropicais)
Mimosoideae	2713 (maioria arbóreas tropicais, sub-tropicais e temperadas)
Papilionoideae	13000 (maioria herbáceas, 4-5000 arbóreas tropicais)

Leguminosas

Importância econômica - exemplos

- ◆ Grãos - *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Vigna unguiculata*
- ◆ Madeira - *Dalbergia nigra*, *Cedrelinga catenaeformis*
- ◆ forrageira - *Prosopis juliflora*, *Acacia mangium*
- ◆ adubação verde - *Leucaena leucocephala*
- ◆ lenha - *Inga spp*, *Acacia spp*
- ◆ flora apícola - *Mimosa spp*, *Acacia spp*
- ◆ gomas - *Acacia senegal*, *Parkia spp*
- ◆ celulose e papel - *Apuleia molaris*
- ◆ carvão - *Swartzia ulei*
- ◆ alimentação humana - *Inga spp*, *Pentaclethra macroloba*
- ◆ cercas vivas - *Mimosa caesalpinifolia*, *Gliricidia sepium*
- ◆ produtos medicinais - *Copaifera multijuga*
- ◆ produtos aromáticos - *Elizabetha princeps*
- ◆ produtos fitoquímicos - *Derris negrensis*

Leguminosas na Amazônia

Maior família em diversidade de espécies e entre as 5 maiores em número de indivíduos.

**Ex. Klinge e Rodrigues, 1971-Leguminosae :
12,3% das espécies, 8,6% dos indivíduos**

	Gêneros	Espécies
Caesalpinioideae	45	469
Mimosoideae	23	288
Papilionoideae	73	464
Total	141	1221
% da Família	22	7

(Silva et al, 1989)

Leguminosas no Cerrado Brasileiro

(Kirkbride Junior, 1984)

	Gêneros	Espécies
Caesalpinioideae	13	212
Mimosoideae	11	91
Papilionoideae	47	252
Total	71	555

Leguminosas em florestas semidecíduas do sul de Minas Gerais

(Lavras-LV, Poço Bonito-PB, Bom Sucesso-BS, Itutinga-IT, Madre de Deus-MD, Tiradentes-TD)
(Oliveira-Filho et al., 1991)

	LV	PB	BS	IT	MD	TD
Total de spp	184	219	241	256	192	277
Leguminosae	22	28	31	25	22	29
Caesalpinioideae	6	4	7	5	2	5
Papilionoideae	10	14	16	12	15	14
Mimosoideae	6	10	8	8	5	10
%Leg/total spp	12	13	13	10	12	11



Bactérias fixadoras de N_2 que nodulam espécies de Leguminosae

“Nodulos”- “casa” das bactérias fixadoras de nitrogênio

**N_2 (impossível de ser usado por plantas e animais) ---
Nitrogenase- \rightarrow NH_3 (usados por plantas)**



Nódulo caulinar
em *Sesbania rostrata*
por *Azorhizobium*
caulinodans



Nódulos radiculares em
Enterolobium schomburkii
por *Bradyrhizobium japonicum*

Simbiose com rizóbio

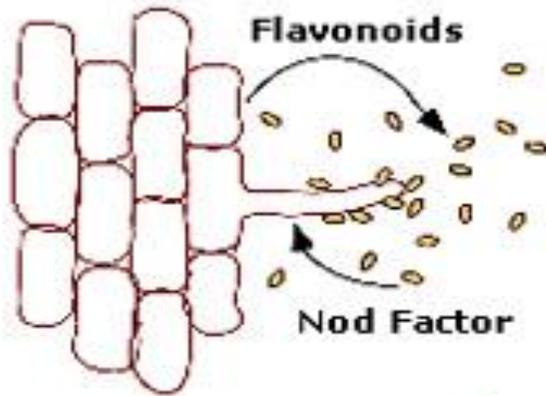
- Bactérias fixadoras de N₂ formam nódulos na raiz ou excepcionalmente no caule de leguminosas
- Capacidade de nodular não é inerente a todas as espécies
ex. *Dalbergia nigra* (jacaranda) formam simbiose
Caesalpinia echinata (pau brasil) não forma simbiose
- Graham (1976) - 8 a 12 % das espécies examinadas
- Allen & Allen (1981) - 15% das espécies examinadas

Maioria das espécies tropicais sem informação sobre sua capacidade de nodular, i.e., de formar simbiose com rizóbio

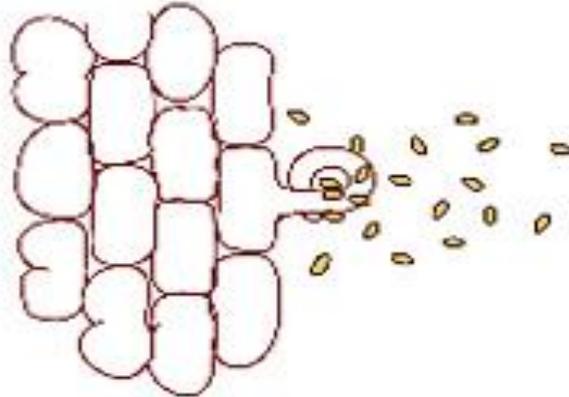
Etapas para o estabelecimento da simbiose:

1. Pré-infecção (reconhecimento dos simbiontes e interações entre superfícies das bactérias e da planta);
2. Infecção da planta pela bactéria e formação do nódulo;
3. Funcionamento dos nódulos (fixação do nitrogênio).

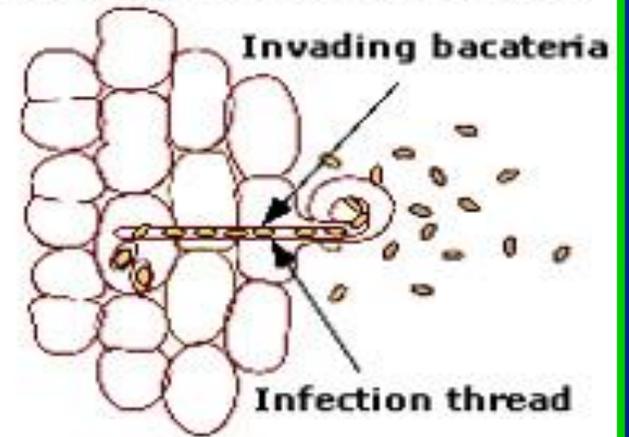
Chemical recognition.



Deformation of root hair and root cell division.

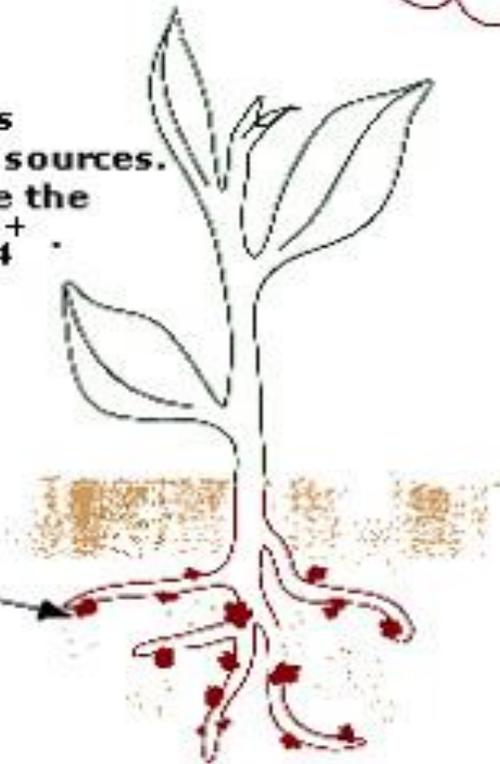


Formation of infection thread.

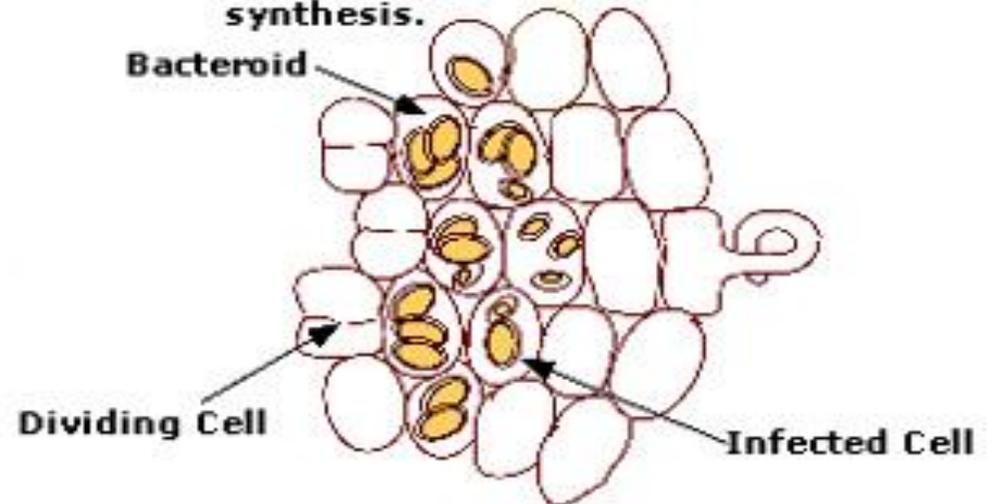


Legume provides Rhizobia with C sources.
Rhizobia provide the legume with NH_4^+ .

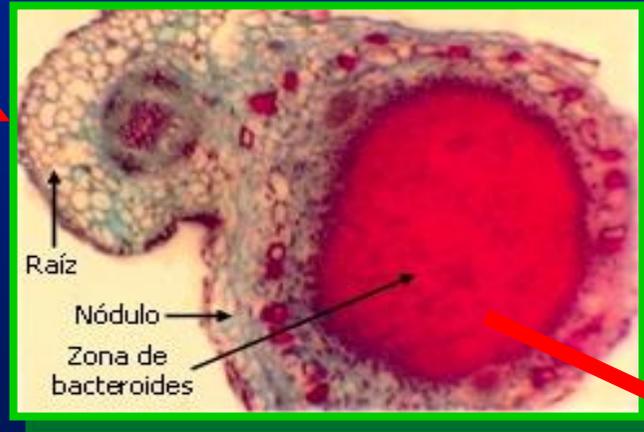
Root nodule



**Nodule tissue formation and bacteroid differentiation.
Nitrogenase and leghemoglobin synthesis.**



Estabelecimento da nodulação



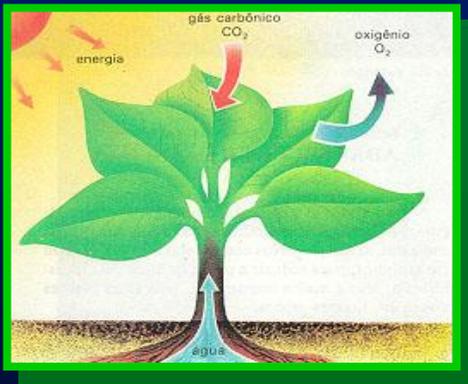
Bacteróides



Nódulos:

Hipertrofias especializadas originadas do córtex ou do periciclo da raiz ou excepcionalmente do caule.

Fixação Biológica de Nitrogênio



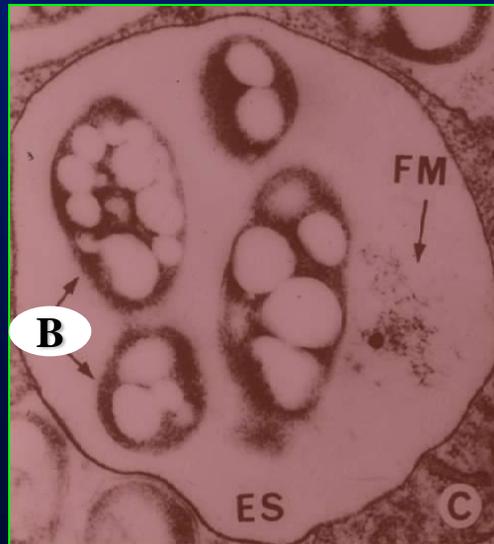
Fotossíntese

- Gera força redutora e ATP.
- Gera substratos para crescimento e manutenção das células microbianas.
- Suprem esqueletos de C, ATP e força redutora para assimilação de NH_3 .

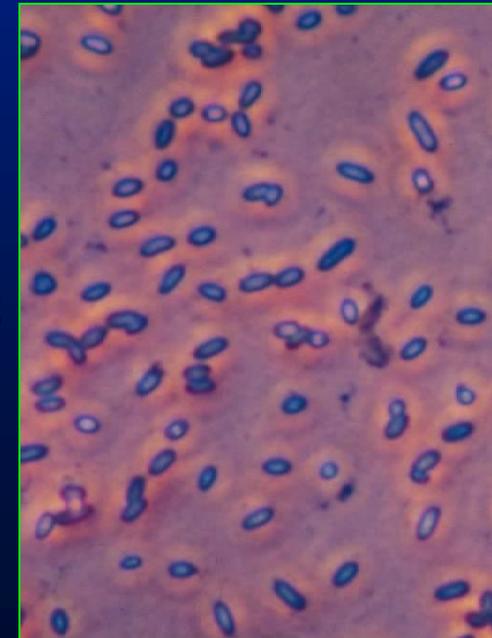


Nódulos radiculares ↓

Bacteróides dentro dos nódulos



Rizóbio fora dos nódulos



Rizóbio

- Alfa-Proteobacteria
- Gram negativa
- Bastonetes
- Células sem endosporos, com inclusões de grânulos de poli-beta-hidroxibutirato
- aeróbicos
- bastonetes móveis
- induz formação de nódulos em raízes ou excepcionalmente no caule de espécies de Leguminosae e em raízes de *Parasponia* spp.

Classificação de espécies de rizóbio de acordo com grupos de Inoculação cruzada (Jordan & Allen, 1974)

Grupo	Espécies de rizóbio	Hospedeiros
I	<i>R. leguminosarum</i>	<i>Pisum, Vicia, Lens</i>
I	<i>R. trifolii</i>	<i>Trifolium</i>
I	<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris,</i> <i>P. angustifolius</i> <i>P. multiflorus</i>
I	<i>R. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus,</i> <i>Trigonella</i>
II	<i>R. lupini</i>	<i>Lupinus, Ornithopus</i>
II	<i>R. japonicum</i>	<i>Glycine</i>
II	Unclassified	cowpea group

ULTRAPASSADA!!!!

Hospedeiros das espécies de rizóbio descritas até o momento.

Espécies de rizóbio	Hospedeiros
<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovars <i>phaseoli</i> , <i>trifolii</i> , <i>viciae</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>P. multiflorus</i> , <i>P. angustifolius</i> , <i>Trifolium</i> spp., <i>Pisum</i> spp., <i>Vicia</i> spp., <i>Lens</i> spp., <i>Macroptilium atropurpureum</i> , <i>Lathyrus</i>
<i>R. tropici</i> ,	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena</i> spp., <i>L. Leucocephala</i>
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. galegae</i>	<i>Galega</i> spp.
<i>R. giardinii</i> biovars <i>phaseoli</i> , <i>giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>P.spp</i> , <i>Macroptilium atropurpureum</i> , <i>L. leucocephala</i> .
<i>R. gallicum</i> biovars <i>phaseoli</i> , <i>gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>P.spp</i> <i>Macroptilium atropurpureum</i> , <i>L. leucocephala</i> , <i>Onobrychis viciifolia</i>
<i>R. hainanense</i>	<i>Macroptilium lathyroides</i> , <i>Zornia diphila</i> , <i>Uraria crinita</i> , <i>Desmodium sinuatum</i> , <i>Stylosanthes guianensis</i> , <i>Desmodium gyroides</i> , <i>Acacia sinuata</i> , <i>Tephrosia candida</i> , <i>Arachis hypogea</i> , <i>Centrosema pubescens</i> , <i>Desmodium triquetrum</i> , <i>Desmodium heterophyllum</i>
<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i> , <i>M. Sativa</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>Vicia sativa</i> , <i>V. angulares</i>
<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbaceae</i> , <i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Sesbania rostrata</i> , <i>Trifolium repens</i>
<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Wisteria frutescens</i> , <i>Caragana</i> spp., <i>Lótus</i> spp., <i>P. vulgaris</i> , <i>M. atropurpureum</i>
<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza</i> spp., <i>Halineodendron</i> spp., <i>Sophora</i> spp., <i>Caragana</i> spp., <i>Glycine</i> spp., <i>Swainsonia</i> spp.

<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietnum</i>
<i>M. plurifarium</i>	<i>Prosopis juliflora</i> , <i>Neptunia oleraceae</i> , <i>Acacia</i> spp., <i>L. leucocephala</i> , <i>Chamaecrista ensiformis</i>
<i>M. huakuui</i>	<i>Astragalus sinicus</i> , <i>Vicia villosa</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>Sesbania</i> spp., <i>A.alignoses</i> , <i>A. Adsurgens</i>
<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietnum</i>
<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>Melilotus</i> spp., <i>Medicago</i> spp., <i>Trigonella</i> spp.
<i>S. fredii</i>	<i>Glicine max</i> , <i>G. soja</i> , <i>P. vulgaris</i>
<i>S. saheli</i>	<i>Sesbania</i> spp., <i>Acacia seyal</i> , <i>L. leucocephala</i> , <i>N. oleraceae</i>
<i>S. teranga</i>	<i>Sesbania</i> spp., <i>Acacia</i> spp., <i>N. oleraceae</i> , <i>L. leucocephala</i>
<i>S. medicae</i>	<i>Medicago</i> spp.
<i>S. arboris</i>	<i>Acacia senegal</i> , <i>Prosopis chilensis</i>
<i>S. kostiense</i>	<i>Acacia senegal</i> , <i>Prosopis chilensis</i>
<i>Allorhizobium undicola</i>	<i>Neptunia natans</i> , <i>Lotus arabicus</i> , <i>Acacia seyal</i> , <i>Faidherbia albida</i> , <i>Acacia tortilis</i> , <i>Medicago sativa</i> , <i>Acacia Senegal</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Macroptilium atropurpureum</i> , <i>Ornithopus sativus</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Lupinus</i> spp.
<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine soja</i> , <i>G. max</i>
<i>B. liaoningense</i>	<i>G. soja</i> , <i>G. max</i> , <i>Phaseolus aureus</i>
<i>B. spp.</i>	<i>Lotus</i> , <i>Vigna</i> spp., <i>Vigna</i> , <i>Lupinus</i> , <i>Ornithopus</i> , <i>Cicer</i> , <i>Sesbania</i> , <i>Leucaena</i> , <i>Mimosa</i> , <i>Lab-lab</i> , <i>Acacia</i> , <i>Macroptilium</i> , <i>Glycine</i> .
<i>Azorhizobium A.caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>A. doebereinae</i>	<i>S. virgata</i>

2001

Revolução na taxonomia de bactérias que nodulam leguminosas:

- outras α -Proteobacteria: *Methylobacterium*
- β -Proteobacteria também nodulam leguminosas:
Burkholderia, *Cupriavidus* com espécies de patógenos vegetais e humanos

Classificação de espécies de leguminosas em função de seu potencial de fixar nitrogênio)

Espécies de potencial elevado (> 60 kg N/ano/ha)

Glycine max

Leucaena leucocephala

Calliandra spp.

Acacia mearnsii, *A. mangium*

A. auriculiformis, *A. crassicarpa*

Gliricidia sepium, *Sesbania* spp

Espécies de potencial médio

Prosopis juliflora

Acacia saligna

Espécies de potencial baixo

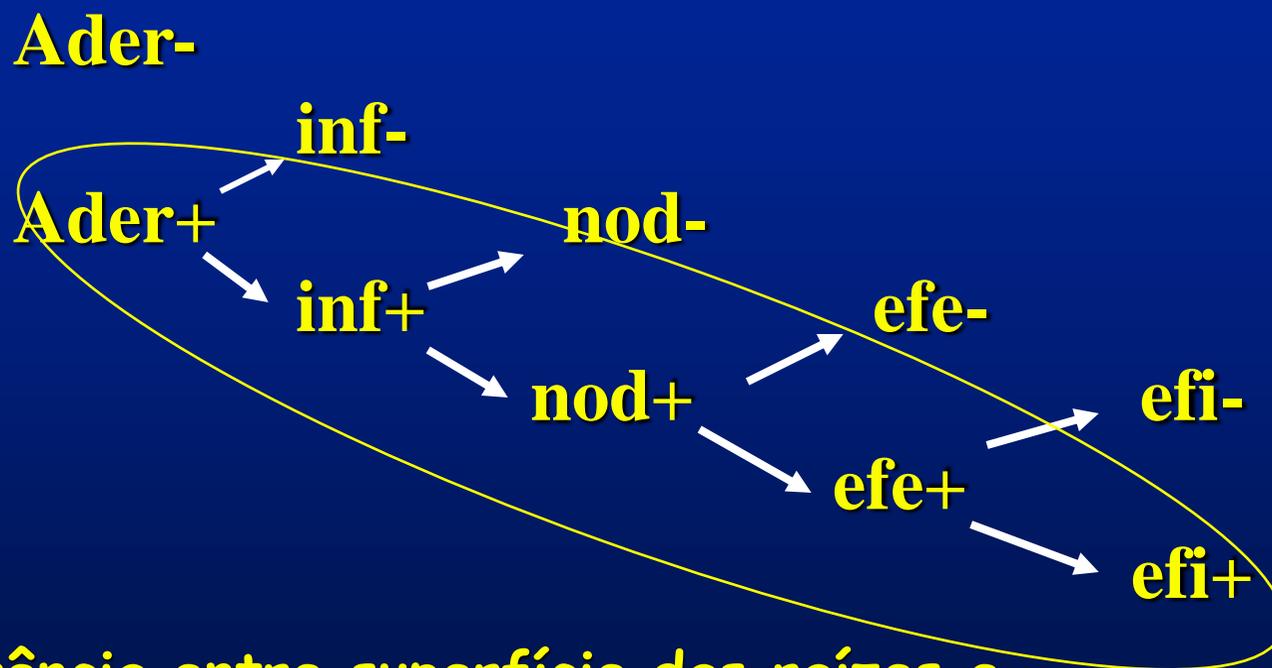
Acacia raddiana, *a.senegal*

A. cyclops, *Faidherbia albida*

Espécies de potencial nulo

As não nodulíferas

Possíveis interação de rizóbio com espécies de leguminosas



Ader = aderência entre superfície das raízes e de bactérias

inf = infecção de raiz pela bactéria

nod = formação de nódulos

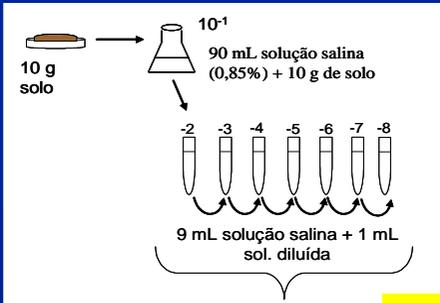
efe = fixação biológica de N_2 efetiva

efi = eficiência superior da FBN

Seleção de estirpes eficientes para uso agrícola (produção de inoculantes para leguminosas):

- 1- Condições axênicas (solução nutritiva com ou sem suporte de meio agarizado)
- 2- Vasos de Leonard com areia + vermiculita + solução nutritiva esterilizadas.
- 3- Vasos com solo em casa de vegetação
- 4- Campo

Seleção de estirpes - caupi



Solo



Planta-isca

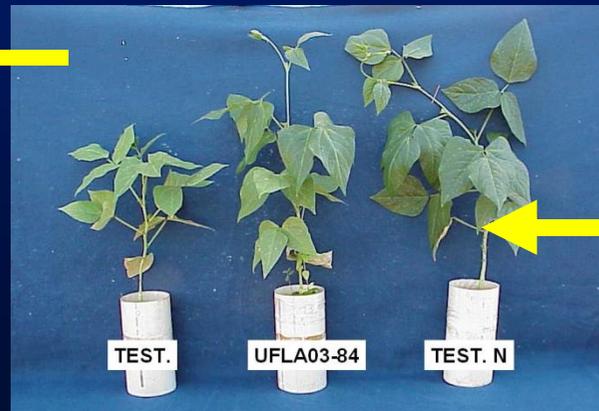
Coleta dos nódulos



Isolamento do rizóbio



Experimento de campo

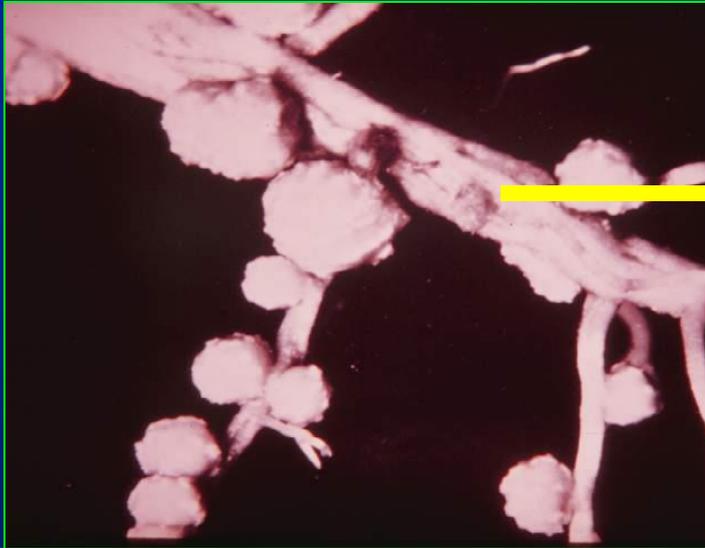


Vasos com solo



Vasos de Leonard

Bactérias fixadoras de N₂ podem ser isoladas de nódulos do campo



Diferentes isolados testados para sua eficiência em contribuir para o crescimento da planta através da nutrição em N.

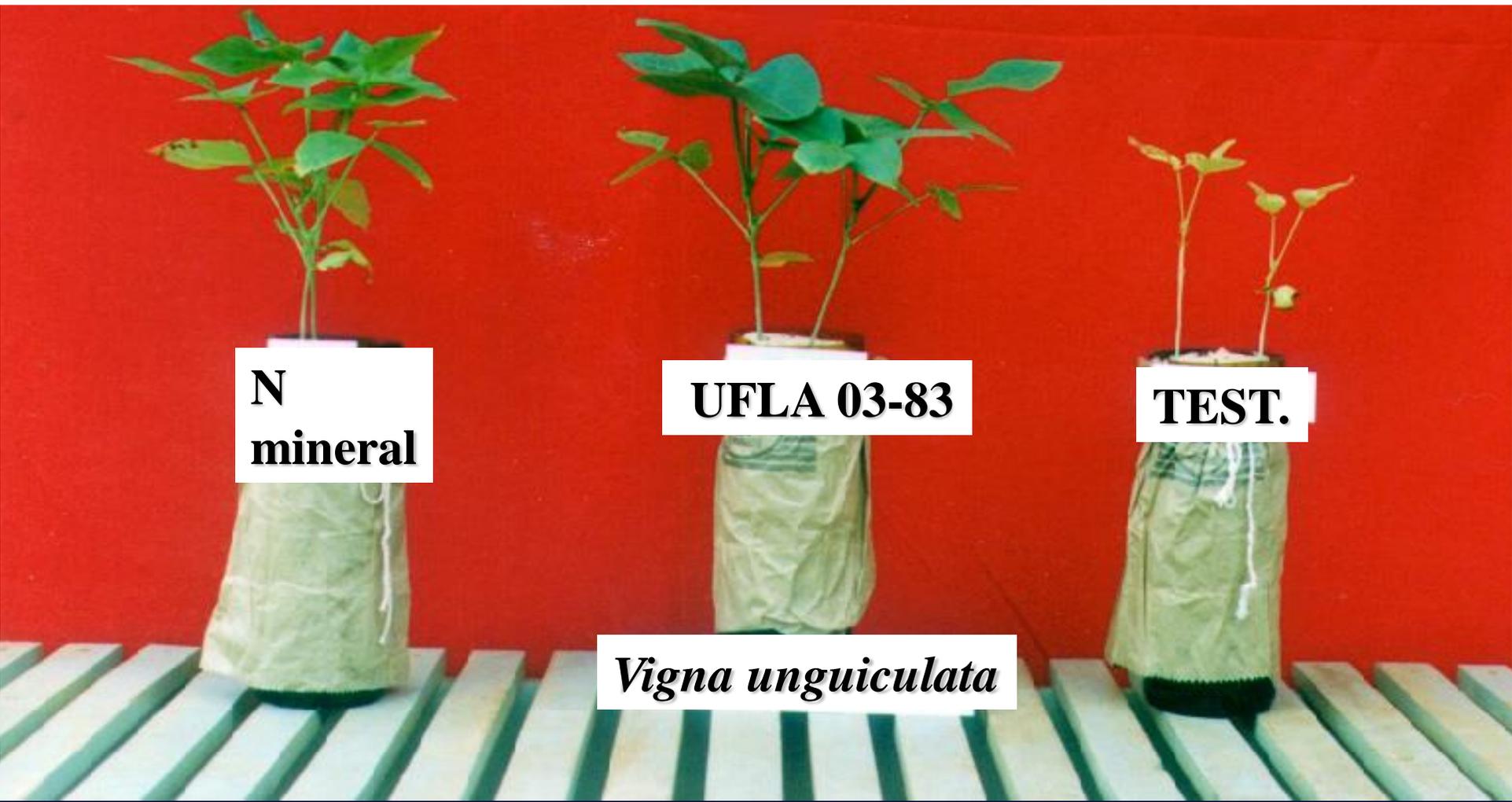
N-fertilizer

Phaseolus vulgaris beans

Control



Nodulação em *Macroptilium atropurpureum* (siratro), leguminosa
Considerada promíscua,
em condições axênicas (sem organismos estranhos) inoculado
com suspensão de solo

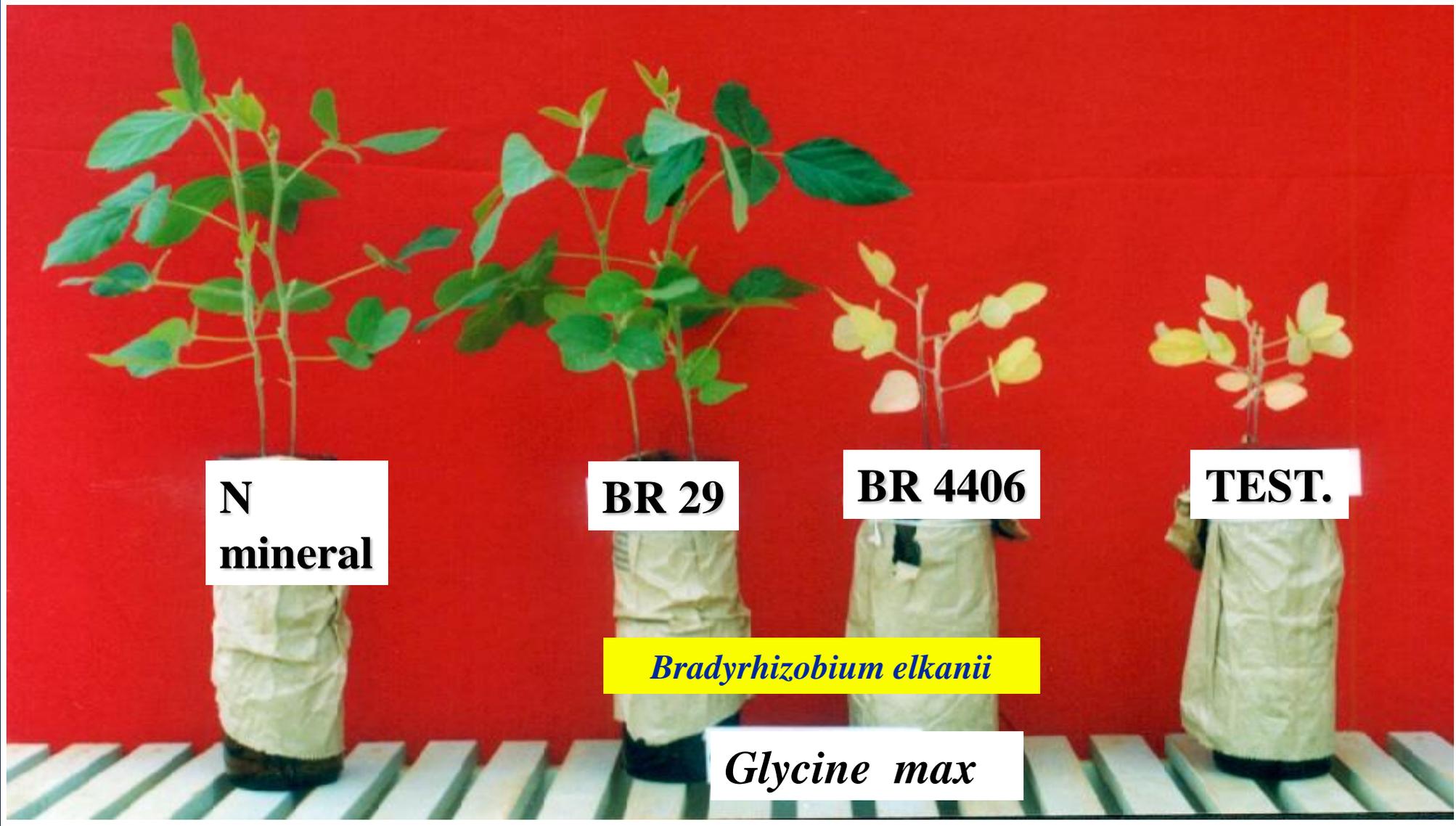


**N
mineral**

UFLA 03-83

TEST.

Vigna unguiculata



**N
mineral**

BR 29

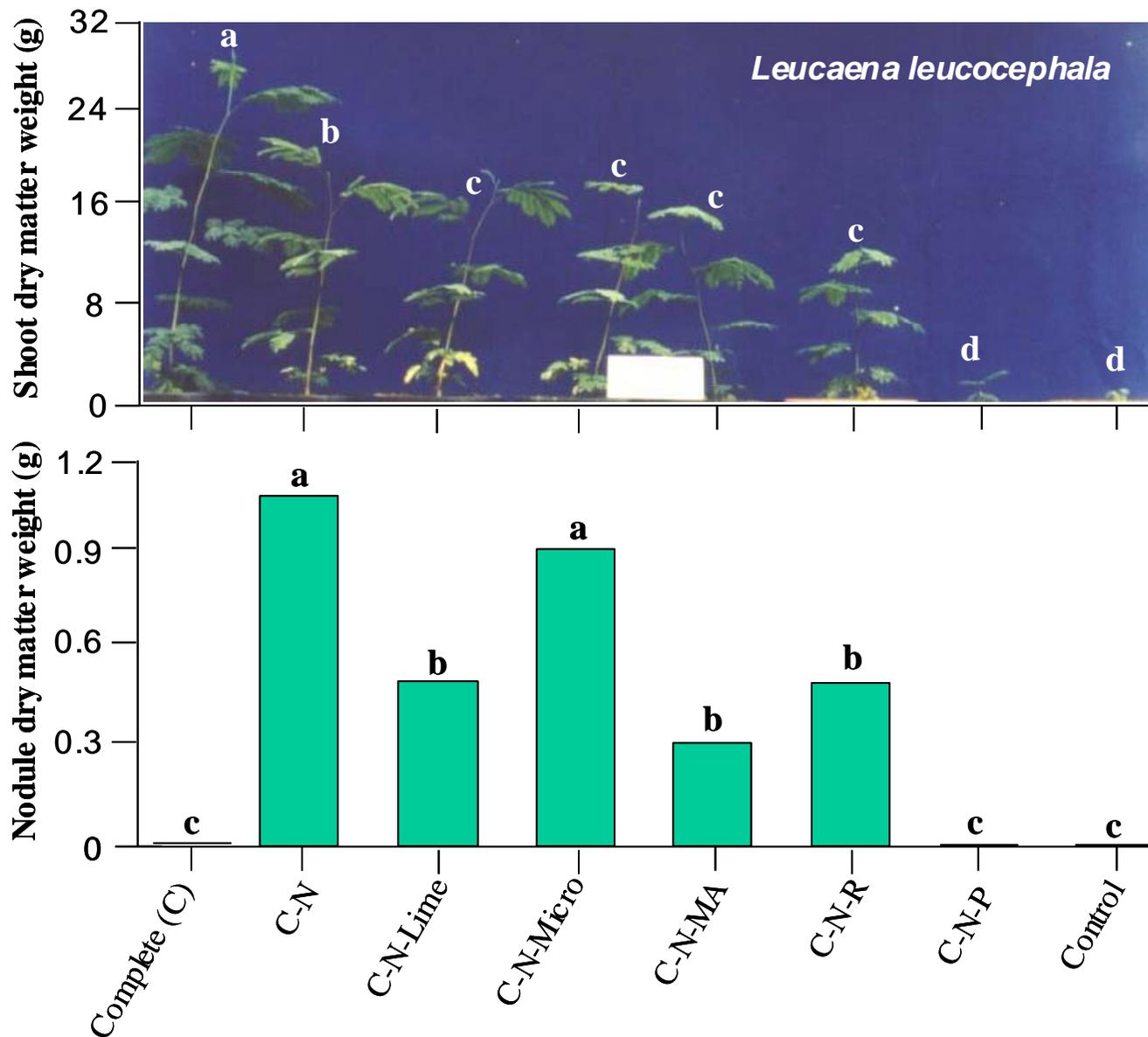
BR 4406

TEST.

Bradyrhizobium elkanii

Glycine max

**Latossolo
argiloso
vasos de 4 kg**



Completo:

por kg solo :N= 200 mg/kg N-NH₄NO₃, calagem V=70%, micro= FTE-BR12=20g,

P= 100mg/kg solo superfosfato, K-KCl= 120mg/kg solo

R=rizóbio estirpe BR827, MA=200 esporos/planta *Glomus etunicatum*

Compatibilidade de agrotóxicos com rizóbio e a simbiose das leguminosas (De-Polli et al., 1986)

Tóxicos:

54% dos fungicidas

42% dos herbicidas

inseticidas 40%

Sem efeito:

Nematicidas

Fatores limitantes: nutrientes

e.g. P, N mineral (excesso limita nodulação inibe nodulação), pH, temperatura, etc.

Tudo que afeta planta afeta simbiose

Inoculantes

Inoculante: corresponde ao substrato de sobrevivência onde se concentram populações das estirpes das espécies bacterianas fixadoras do N_2 . Equivale ao veículo da bactéria.

Inoculação: refere-se à operação agrícola, manual ou mecanizada, por meio da qual possibilita-se o contato físico entre a bactéria fixadora do N_2 e a planta hospedeira, com o objetivo de se estabelecer o processo simbiote da fixação biológica do nitrogênio atmosférico no sistema radicular da espécie leguminosa.

Tipos de inoculantes



Turfoso



Líquido

Estirpes recomendadas como inoculantes para algunas leguminosas

SEMIA

<i>Glicine max</i>	5019, 587, 5079, 5080
<i>Phaseolus vulgaris</i>	4077, PRF81
<i>Vigna unguiculata</i>	(UFLA3-84, INPA 3-11B, BR 3267)
<i>Desmodium intortum</i>	656
<i>Stylosanthes spp.</i>	6154, 6155
<i>Trifolium pratense</i>	222, 265
<i>Vicia sativa</i>	384
<i>Crotalaria juncea</i>	6145, 6156
<i>Dalbergia nigra</i>	6413, 6101
<i>Gliricidia sepium</i>	6168
<i>Leucaena leucocephala</i>	6069, 6153

Estirpes selecionadas para cerca de 109 espécies

Coleções de depósito SEMIA (FEPAGRO) e BR (Embrapa-Agrobiologia, RJ)/ RELARE (Rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbiológicos de interesse agrícola)

Lei no 6894/1980

Decreto No 4.954/2004

IN no 10/2004

Prazo de validade mínimo de 6 meses, 10^9 UFC/g no vencimento sem contaminantes na diluição 10^{-5}

Pacote de inoculante: \cong R\$4,00

dá para inocular 50 Kg de semente (soja) (1 ha)

Soja

2006/2007- área plantada 20.960.000 ha,

Produção: 57.550.700 ton grãos

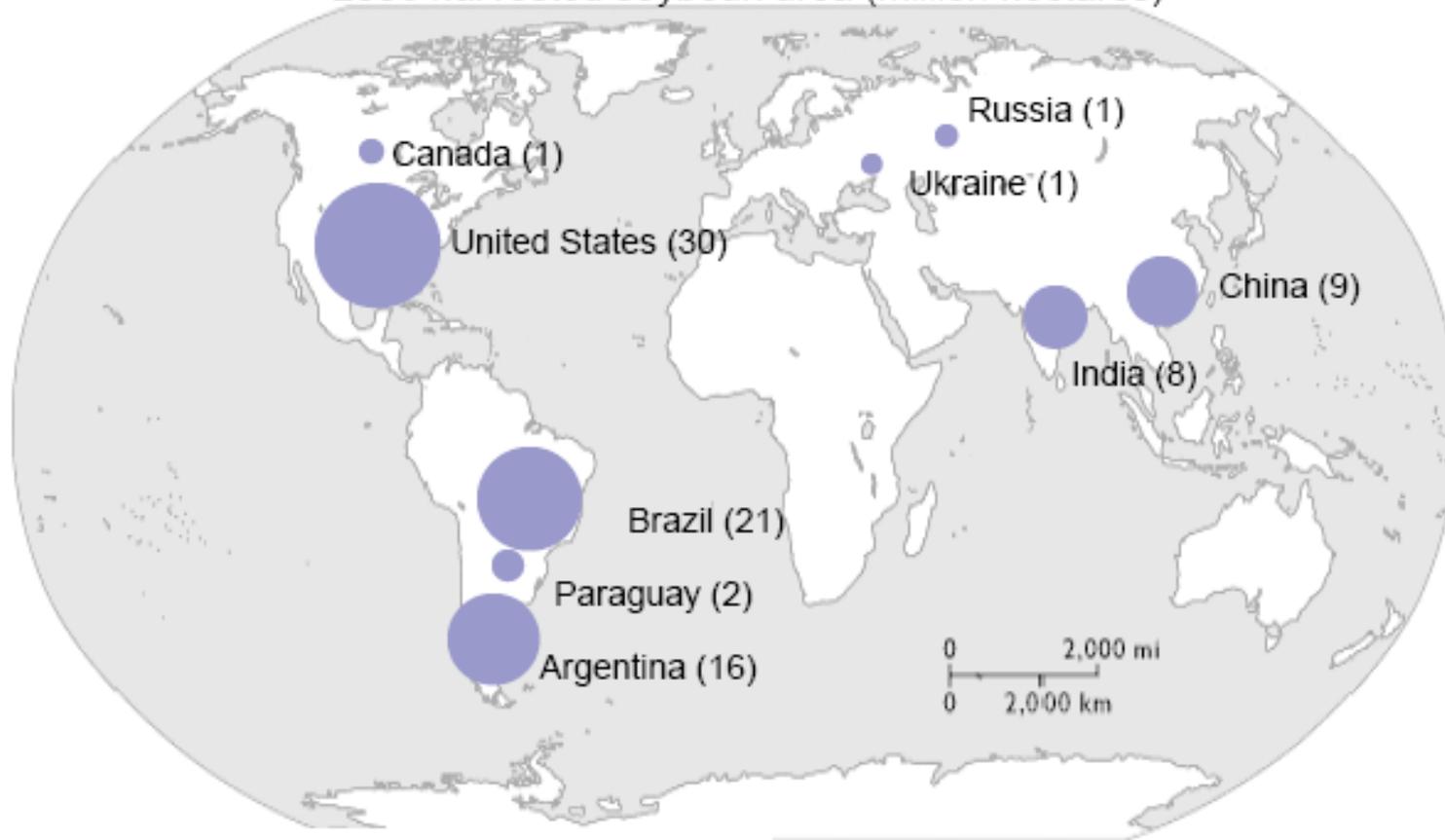
Custo se fosse usar fertilizante nitrogenado: US\$ 3,3 bilhões

Custo com inoculantes: \cong R\$ 84 milhões

Soja no mundo

Major Soybean Producers

2006 harvested soybean area (million hectares)



1 hectare = 2.47 acres

USDA data; world map from National Geographic Society.

Soja e Inoculantes

- Garante economia de 3,3 bilhões de dólares na agricultura brasileira.
- FBN- 2,60 milhões t de N (soja)



- 2,34 milhões de t fertilizantes N - 64% importado. (todas as demais culturas)

Outras leguminosas



Amendoim



Stylosanthes



Puerária



Crotalária

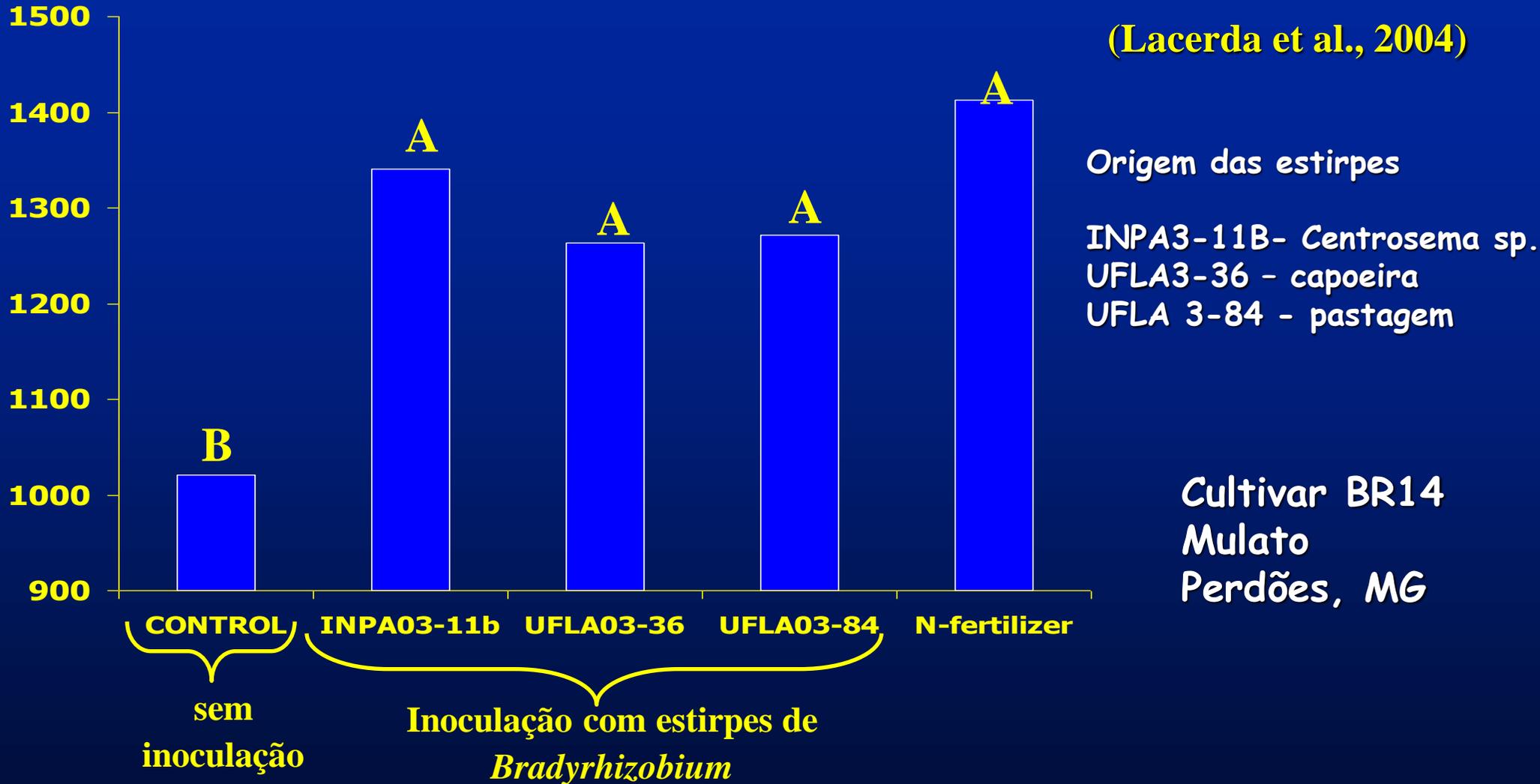


Caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]



- Feijão-caupi, feijão de corda, feijão estrada, feijão fradinho, feijão de praia, etc...
- O caupi destaca-se dentre as leguminosas cultivadas no Norte e Nordeste do Brasil.
- Excelente fonte de proteína de baixo custo e alimento básico para população.
- Bastante cultivado nas regiões tropicais dos continentes africano, asiático e americano e representa 26,8% de todos os feijões produzidos no Brasil.

Caupi inoculado com estirpes selecionadas de *Bradyrhizobium* isoladas da Amazônia : Produção de grãos Kg/ha



Caupi é muito consumido nas regiões norte e nordeste, onde é cultivado por pequenos agricultores que não conhecem esta biotecnologia.