



Elisabete José Vicente (11) 3091-7202 bevicent@usp.br

Instituto de Ciências Biomédicas/USP

Microrganismos na Agroindústria

- 1. A importância do Agronegócio no Brasil
- Os Microrganismos e o Agronegócio Principais demandas
- Associações Microrganismo-Planta
 - 3.1. Simbiose Como elas podem ser
 - 3.2. Microrganismos endofíticos o que são e como chegam aos tecidos vegetais
- 4. Os microrganismos e o Agronegócio Fertilizantes /Aumento de Resistência
 - 4.1. Mutualismo: Associações benéficas sendo aproveitadas
 - 4.2. Biodisponibilização de nitrogênio Fixação de N₂
 - Há bactérias de vida livre que fazem a fixação de nitrogênio
 - Associações simbióticas mutualísticas fazem a fixação de nitrogênio:
 - Rizóbios Leguminosa (produção de feijão, soja, amendoim, etc)
 - Azzola Samambaia aquática (plantação de arroz)
 - Frankia Amieiro
 - 4.3. Biodisponibilização de nutrientes do solo
 - Micorrizas
- Parasitismo: Problemas sendo enfrentados
- Algumas Inovações
 - 6.1. Biodisponibilização de nitrogênio Novos cultivares com bactérias fixadoras de N₂
 - 6.2. Novas possibilidades futuras oferecidas pela TDR
 - 6.3. Novas possibilidades futuras simples
- 7. Questões

- Fungos que aumentam a absorção de nutrientes para as plantas - Microrganismos que aumentam a resistência das plantas

1. Importância do Agronegócio no Brasil

Brasília/BRASIL (09/03/2020) – O Produto Interno Bruto (PIB) do **agronegócio** cresceu 3,81% em 2019 em comparação com 2018,

e

representou 21,4% do PIB total do país em 2019,

segundo publicação da Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA),

Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Cepea) e Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (Fealq).

Fonte:

https://www.cepea.esalq.usp.br/br



Agronegócio:

O agronegócio ("agribusiness") é um termo amplo. Envolve uma cadeia de atividades que inclui a própria produção agrícola (cultivo de culturas como o arroz, feijão, café, algodão, pecuária etc.), a demanda por adubos e fertilizantes, o desenvolvimento de maquinários agrícolas, a industrialização de produtos do campo (como óleos, cigarros, café solúvel, entre outros) e o desenvolvimento de tecnologias para dinamizar todas essas atividades.

Assim, o **Agronegócio** envolve atividades não só do campo, mas também da indústria de transformação, informática, e muito P&D.

O agronegócio brasileiro é um dos mais representativos do mundo





Veja mais em: https://www.cnabrasil.org.br/noticias/cenario-para-o-agro-e-otimista-mas-demanda-precaucao

1. Importância do Agronegócio no Brasil

O **Agronegócio do Brasil em 2021** alcançou participação de **27,4% no PIB brasileiro**, a maior desde 2004 (quando foi de 27,53%).

segundo publicação da Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA),

Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Cepea) e Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (Fealq).

Fonte:

https://www.cepea.esalg.usp.br/br



O agronegócio brasileiro é um dos mais representativos do mundo



Agronegócio:

O agronegócio ("agribusiness") é um termo amplo. Envolve uma cadeia de atividades que inclui a própria produção agrícola (cultivo de culturas como o arroz, feijão, café, algodão, pecuária etc.), a demanda por adubos e fertilizantes, o desenvolvimento de maquinários agrícolas, a industrialização de produtos do campo (como óleos, cigarros, café solúvel, entre outros) e o desenvolvimento de tecnologias para dinamizar todas essas atividades.

Assim, o **Agronegócio** envolve atividades não só do campo, mas também da indústria de transformação, informática, e muito P&D.



Veja mais em: https://www.cnabrasil.org.br/noticias/cenario-para-o-agro-e-otimista-mas-demanda-precaucao

1. Importância do Agronegócio no Brasil

O agronegócio brasileiro é um dos mais representativos do mundo





1. Importância do Agronegócio no Brasil

O agronegócio brasileiro é um dos mais representativos do mundo



Fonte:

https://www.cepea.esalq.usp.br/br

1. Importância do Agronegócio no Brasil (continuação)





Pesquisar...

SOBRE A SNA

AGRONEGÓCIO

EDUCAÇÃO PARA O AGRO

PUBLICAÇÕES ORGÂNICOS NA SNA

NOTÍCIAS

O agronegócio envolve toda uma cadeia \rightarrow

PIB, Mercado de trabalho, Exportações \rightarrow

Agronegócio: A força da economia brasileira

O agronegócio é a junção de inúmeras atividades que envolvem, de forma direta ou indireta, toda a cadela produtiva agrícola ou pecuária.

O agronegócio envolve todas as atividades da cadeia agroindustrial: antes da porteira (sementes, defensivos, máquinas e implementos), dentro da porteira (agropecuária básica ou primária), e depois da porteira (indústria e serviços), envolvendo o processamento, a distribuição e o consumo. Em 2019, segundo o Cálculo do PIB do Agronegócio Brasileiro, divulgado pelo Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Cepea), da Esalq/USP, e pela Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA), a participação de cada segmento do agronegócio foi de: Insumos (4,8%); produção agropecuária básica ou primária (24,1%), agroindústria (29,8%) e agrosserviços (41,2%).

















Depois da porteira

O agro em 2019



Fonte: Cepea/CNA (2019)

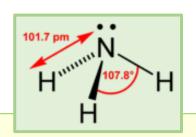




1. Importância do Agronegócio no Brasil

Porque a PETROBRAS investe em fertilizantes!





A amônia (NH3)

é usada na

indústria alimentícia e na produção de desinfetantes, tinturas de cabelo, materiais plásticos, couro e explosivos, entre outros produtos, mas

sua principal utilização é como matéria-prima para a produção de

fertilizantes nitrogenados (ureia, sulfato de amônio e nitrato de amônio).

A demanda do mercado brasileiro de fertilizantes é maior que a produção nacional.

Além disso, o segmento encontra-se em expansão tanto no Brasil quanto no mundo.

Com o crescimento populacional e o aumento de renda, espera-se aumento no consumo de alimentos, principalmente de proteína animal, que requer mais grãos para sua produção e, por consequência, maior uso de fertilizantes.

No Brasil, entre 2003 e 2012, o consumo de fertilizantes passou de 22,8 milhões de toneladas para 29,6 milhões, o que configurou crescimento de 30% no período.

De acordo com a previsão da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), entre 2010 e 2020, somente no Brasil, a produção de alimentos crescerá 40%.

Fonte: https://petrobras.com.br/fatos-e-dados/entenda-por-que-investimos-em-fertilizantes.htm

Mas, como a amônia (amoníaco) é hoje produzida nas industrias?

Atualmente, o <u>processo de Haber-Bosch</u> (cujo desenvolvimento valeu a <u>Fritz Haber</u> e a <u>Carl Bosch</u> o <u>Prémio Nobel</u> da Química de <u>1918</u> e <u>1931</u>, respectivamente) é o mais importante método de obtenção de amoníaco.

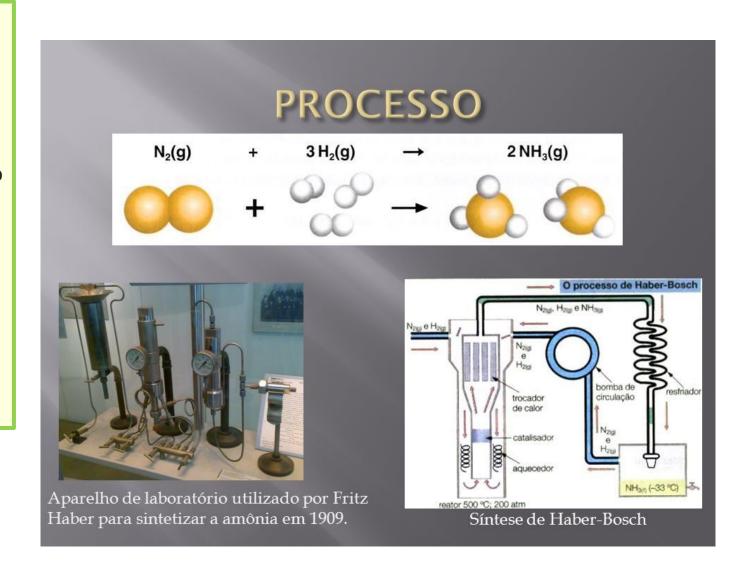
Neste processo, os gases <u>nitrogênio</u> e <u>hidrogênio</u> são combinados diretamente a:

- pressão de 20 MPa e a uma
- temperatura de 500 °C,
- utilizando o ferro como catalisador.

A reação de síntese do amoníaco pode ser representada quimicamente por:

$$\underline{N_2}(g) + 3 \underline{H_2}(g) \rightleftharpoons 2 NH_3(g)$$

$$N \equiv N_{(g)} + 3 H \longrightarrow H_{(g)} \longrightarrow 2 H \longrightarrow H_{(g)}$$



2. Os Microrganismos e o Agronegócio – Principais demandas

Dentre as principais demandas do Agronegócio estão os **Fertilizantes** e os **Defensivos agrícolas**.

Demandas atuais e participação de microrganismos:



Importância das comunidades microbianas

Na agricultura: Ciclagem dos Nutrientes;

Promoção de crescimento;

Indutores de resistência sistêmica em plantas;

Controle biológico de fitopatógenos;

Controle biológico de insetos;

Biorremediação;

Fixação de nitrogênio;

Produção de metabólitos em geral;

Fonte: Anderson Ferreira, 2017, Microbiologia e conservação de solos. EMBRAPA

O que já está sendo preparado para o futuro:

Microrganismos estão desenvolvendo um papel cada vez mais importante na agricultura produzindo:

- Fertilizantes (Biofertilizantes),
- Pesticidas (Biopesticidas),
- Herbicidas (Bioherbicidas),

para aumentar os rendimentos das lavouras.

Ainda, genes bacterianos têm sido transferidos para plantas, conferindo resistências às pestes transmitidas por insetos ou resistência às ervas daninhas.

São exemplos de alguns produtos derivados da Tecnologia do DNA Recombinante (TDR), que veremos mais adiante (Capitulo: Biologia Molecular):

- Bactéria "Ice Minus"- visando evitar perdas com geadas,
- Toxina Bt abrindo caminho para os Biopesticidas
- Plantas resistentes ao herbicida glifosato ("Roundup")

1. Importância do Agronegócio no Brasil

Apostar na microbiologia do solo e na adubação orgânica trazem equilíbrio e prosperidade para a lavoura segundo especialistas O solo é um patrimônio repleto de vida, abriga milhares de microrganismos que atuam no ciclo de nutrientes como **fósforo**, por exemplo. Na visão do Fundador e diretor da Libertas Agronegócios e do Instituto Brasileiro de Agroecologia, Antônio Teixeira, que acompanha com olhar crítico há 40 anos o agronegócio, o modelo de destruição do solo está ultrapassado. Esse tipo de modelo de **negócio está em transição**, prevalecendo hoje o uso de menos tecnologias de produtos e mais tecnologias de sistemas.

A parte de microbiologia do solo só começou a ser feita a partir da década de 90, segundo o professor da Esalq/USP, Fernando Dini Andreote. Esse sistema da utilização de dados científicos para estudar os microrganismos, trouxeram muitos avanços de conceitos, novas ideias e um ambiente mais saudável e equilibrado da agricultura.



3. Associações Microrganismo-Planta

3.1. Simbiose

Componentes de uma simbiose são chamados de **simbiontes**

O termo simbiose significa "vida conjunta".

Assim, as relações entre microrganismos com outros microrganismos e de microrganismos com macrorganismos, relações estas duradouras e íntimas, são denominadas simbiose.

Todas as simbioses microbianas beneficiam o microrganismo.

Associações Simbióticas - Como elas podem ser?

Relativamente às plantas, os microrganismos podem habitar raízes, superfície e, mais intimamente, o seu tecido interior vascular e células.

As associações podem ser agrupadas de acordo com a forma como afetam as plantas, em:

- Mutualismo: quando são benéficos a seus hospedeiros;
- Patogênicos: quando causam doença;
- **Parasitas:** se beneficiam em detrimento de seu hospedeiro;
- **Comensais**: não apresentam efeito detectável.

3.2 Microrganismos endofíticos – o que são e como chegam aos tecidos vegetais?

O <u>microbioma vegetal</u> é resultado da aquisição de microrganismos a partir da sua **rizosfera*** e subsequente migração para a sua **filosfera***.

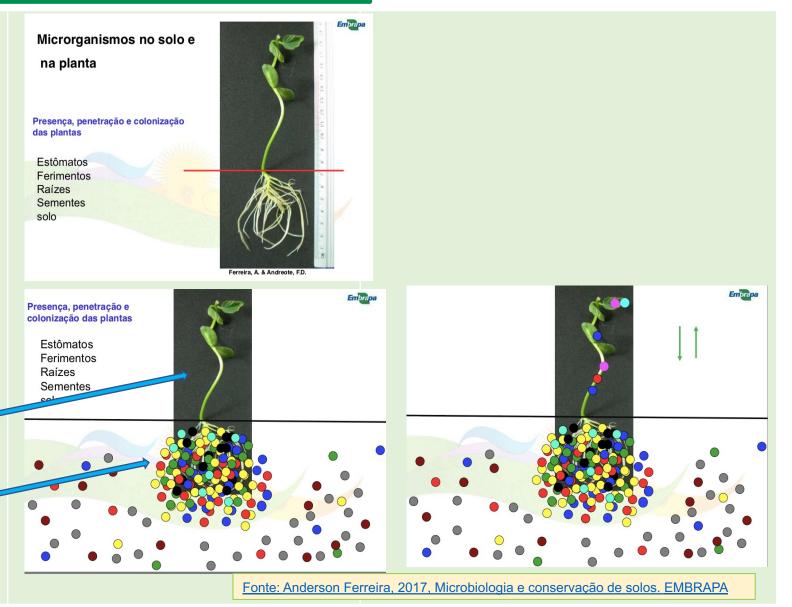
A diversidade presente nos tecidos vegetais é resultado do metabolismo específico da planta e da interação microrganismo-planta (Compant et al 2010; Mercado-Blanco e Prieto 2012).

As espécies de plantas que crescem no ambiente semelhante do solo recrutaram comunidades microbianas significativamente diferentes na **rizosfera** e em outros compartimentos.

Embora a **megadiversidade** de microrganismos endofíticos de plantas tropicais ainda seja pouco estudada, o seu enorme potencial para aplicações biotecnológicas já está bem estabelecido (Azevedo et al 2000).

Obs:

- * Filosfera: Total das partes das plantas que ficam acima do solo que são *habitats* para microrganismos. A filosfera pode ser subdividida em caulosfera (caules), filoplano (folhas), antosfera (flores) e carposfera (frutos).
- * Rizosfera: Região do solo onde as raízes das plantas crescem e conseguem agua e nutrientes. O número de microrganismos na raiz e à sua volta é muito maior do que no solo livre; os tipos de microrganismos na rizosfera também diferem do solo livre de raiz.



- 4. Os microrganismos e o Agronegócio Fertilizantes /Aumento de Resistência
 - 4.1. Mutualismo: Associações benéficas sendo aproveitadas
 - 4.2. Biodisponibilização de nitrogênio Fixação de N₂
 - Há bactérias de vida livre que fazem a fixação de nitrogênio
 - Associações simbióticas mutualísticas fazem a fixação de nitrogênio:
 - Rizóbios Leguminosa (produção de feijão, soja, amendoim, etc)
 - Azzola Samambaia aquática (plantação de arroz)
 - Frankia Amieiro
 - (produção de milho,
 - cana-de-açúcar (produção de açúcar e bioetanol)
 - 4.3. Biodisponibilização de nutrientes do solo

4. Os microrganismos e o Agronegócio – Fertilizantes /Aumento de Resistência

4.1. Simbiose Mutualística: Associações benéficas sendo aproveitadas

Mutualismo: Uma relação microrganismo-planta que pode ser muito bem aproveitada.

A maioria dos mutualismos entre plantas e microrganismos oferece os benefícios às plantas:

- Aumenta a disponibilidade de nutrientes para as plantas,
- Fornece proteção contra patógenos.

Muitas das **simbioses mutualísticas** entre microrganismos e plantas ou animais têm sua origem há milhões de anos. Um mutualismo que persiste ao longo da evolução modifica, de forma benéfica, a fisiologia das duas partes.

Coevolução:

O processo de alterações reciprocas entre microrganismo e hospedeiro é chamado de **coevolução** e, ao longo do tempo, as mudanças podem ser tão numerosas que esta simbiose se torna obrigatória e, assim, o microrganismo e/ou hospedeiro não podem sobreviver separadamente.

Exemplos:

1) A simbiose do nódulo radicular

Associações entre bactéria Bradyrhizobium japonicum em nódulos radiculares da soja

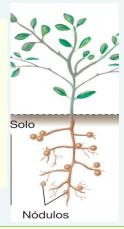


Figura 22.7 Nódulos radiculares da soja. Os nódulos desenvolvem-se pela infecção por *Bradyrhizobium japonicum*. A haste principal da soja tem diâmetro aproximado de 0,5 cm.

2) Micorriza

Associações entre fungos da classe Zigomicetes e raízes de plantas vasculares, ocorrendo nos mais diversos ecossistemas terrestres, podem ser dos tipos:

- Ecto,
- Ectoendo, e
- Endomicorrizas.





4. Os microrganismos e o Agronegócio – Fertilizantes /Aumento de Resistência

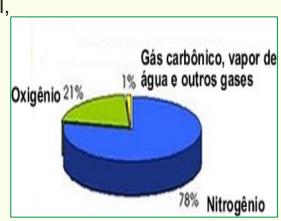
4.2. Biodisponibilização de nitrogênio - Fixação de N₂

- Há bactérias de vida livre que fazem a fixação de nitrogênio

Considerando os **Fertilizantes**, a disponibilização de nitrogênio para as plantas demanda grandes esforços econômicos, e os microrganismos podem ajudar muito nesta tarefa.

Embora o nitrogênio elementar (N₂) esteja presente em 78% da composição do ar que respiramos, ele não está biodisponível,

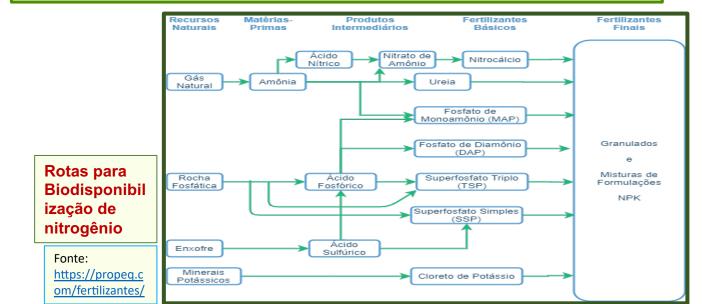
pois a molécula de nitrogênio é muito pouco reativa.



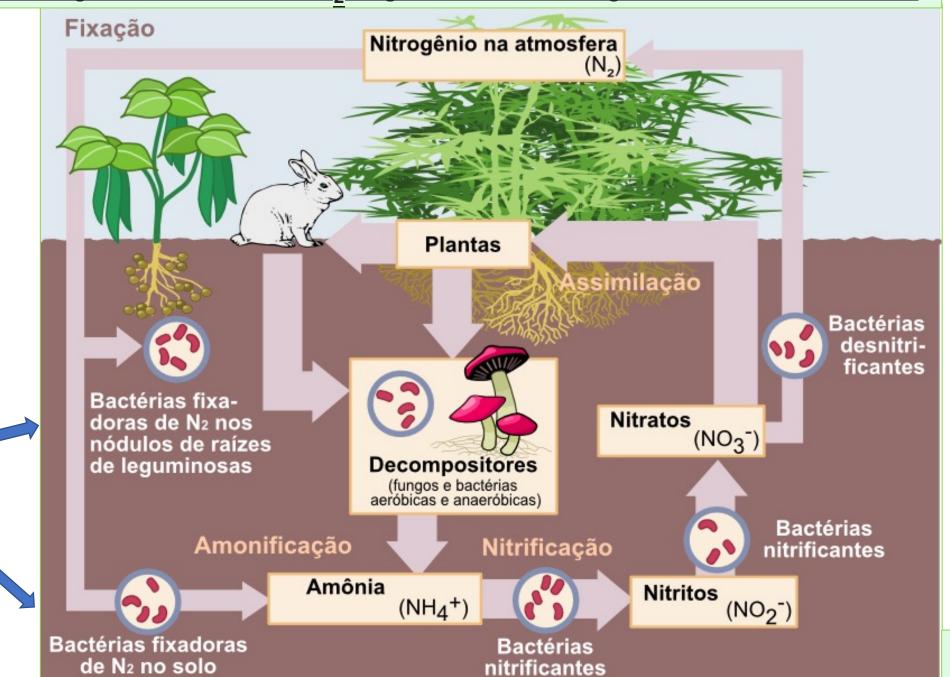
Para fazer com que o nitrogênio venha a se combinar com outros compostos, ou seja, torná-lo biodisponível, é inicialmente necessário romper a ligação tripla entre os dois átomos (N-N) e para isto é necessário o emprego de muita energia.



$$N_2 + 8 H^+ + 8 e^- + 16 ATP \rightarrow 2 NH_3 + H_2 + 16 ADP + 16 P$$



Há MUITO nitrogênio no ar na forma de N₂ e algumas bactérias conseguem torna-lo BIODISPONIVEL.



Bactérias

fixadoras de N₂

FONTE: Wikipedia

4.2. Biodisponibilização do nitrogênio - Fixação de N_{2.} (continuação)

Processos industriais

A fixação de N₂ decorrente de processos naturais, como à incidência de raios na atmosfera que promovem sua reatividade com água resultando na formação de óxidos, é muito baixa. Alternativamente, o processo de fixação de N₂ pode ser realizado por processos industriais. Todavia, estes são muito dispendiosos, pois envolvem grande quantidade energia (combustíveis fosseis) para produzir um ambiente de alta temperatura e pressão. Os produtos desse processo (amônia e nitrato) são utilizados como fertilizantes na agricultura. Essa atividade gera 450.000.000 T/ano de nitrogênio fixado, principalmente em: ureia, nitrato de amônia, e anidrido.

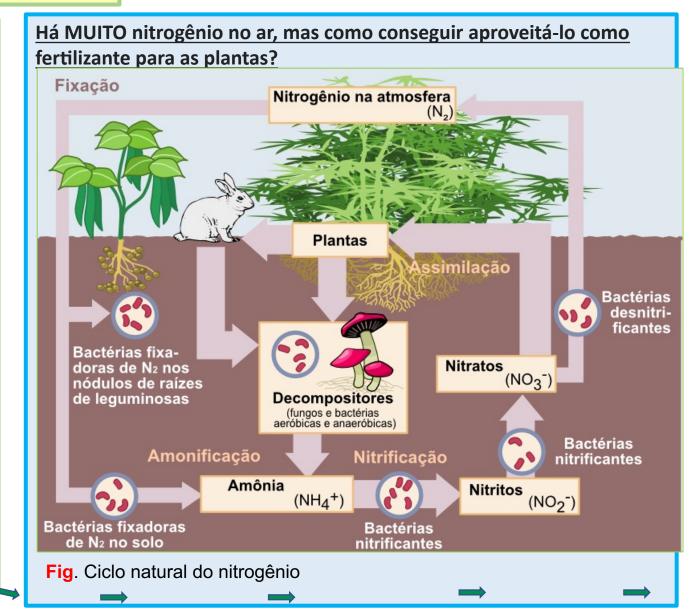
Problema: Alto custo

<u>Problema: Poluição -</u> Impacto dos fertilizantes no meio ambiente

O uso excessivo de fertilizantes tem gerado uma perturbação nas concentrações naturais de nitrogênio tanto no solo quanto em ambientes aquáticos, causando **eutrofização** (poluição causada pelo crescimento excessivo de plantas aquáticas) em águas continentais e marinhas costeiras. Esse fenômeno pode desencadear florações de algas que provocam diminuição da concentração de oxigênio na água.

Fixação de Nitrogênio por microrganismos - BOA ALTERNATIVA

A fixação biológica do nitrogênio pode ser realizada!...



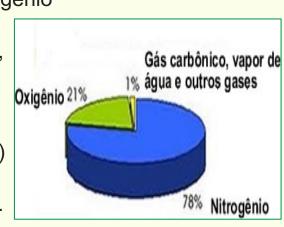
4. Os microrganismos e o Agronegócio – Fertilizantes /Aumento de Resistência

- 4.2. Biodisponibilização de nitrogênio Fixação de N₂
 - Há bactérias de vida livre que fazem a fixação de nitrogênio

Considerando os **Fertilizantes**, a disponibilização de nitrogênio para as plantas demanda grandes esforços econômicos, e os microrganismos podem ajudar muito nesta tarefa.

Para fazer com que o nitrogênio

venha a se combinar com outros compostos, ou seja, torná-lo **biodisponível**, é inicialmente necessário romper a ligação tripla entre os dois átomos (N-N) e para isto é necessário o emprego de muita energia.



O Agronegócio brasileiro é um dos mais representativos do mundo

Há na Terra "fábricas" de fertilizantes naturais com trabalhadores que trabalham 24h/dia e que nunca fazem greve!

Estas Biofábricas têm como trabalhadores as bactérias fixadoras de N₂

4. Os microrganismos e o Agronegócio – Fertilizantes /Aumento de Resistência

4.2. Biodisponibilização de nitrogênio - Fixação de N₂

- Há bactérias de vida livre que fazem a fixação de nitrogênio

A reação de fixação biológica do nitrogênio é catalisada por um <u>complexo</u> <u>enzimático</u> chamado <u>nitrogenase</u>. Esse complexo é composto por duas proteínas:

- uma que contém <u>ferro</u> férrico (Fe³⁺); e
- outra que contém ferro-molibdênio.

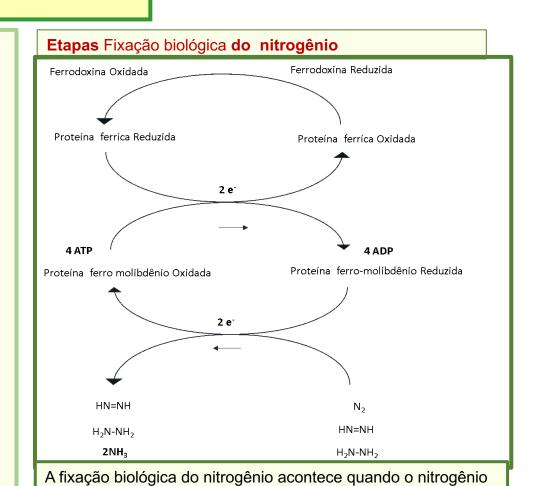
A reação se inicia quando o nitrogênio gasoso (N_2) se liga ao complexo enzimático nitrogenase. A proteína que contém ferro férrico é reduzida por <u>elétrons</u> doados pela proteína <u>ferrodoxina</u>.

Então, a proteína reduzida liga-se à uma molécula de $\underline{\text{ATP}}$ e reduz a segunda proteína que doa elétrons para o nitrogênio gasoso (N_2 , $N\equiv N$), quebrando uma das triplas ligações do N_2 produzindo HN=NH.

Esse ciclo repete-se mais duas vezes:

- reduzindo a espécie química HN=NH para H₂N-NH₂ e finalmente para
- duas moléculas de amônia (NH₃).

Esse complexo processo de fixação requer a utilização de 16 moléculas de ATP para formar duas moléculas de amônia. A geração de elétrons na reação pode diferir conforme o organismo.



atmosférico (N₂) é convertido em amônia (NH₃). São três

reações de **redução** da molécula inicial de N₂ elementar:

 $N_2 + 8 H^+ + 8 e^- + 16 ATP \rightarrow 2 NH_3 + H_2 + 16 ADP + 16 P$

4.2. Biodisponibilização do nitrogênio - Fixação de N_{2.} (continuação)

<u>Fixação de nitrogênio (N₂) por microrganismos</u>

Os únicos seres vivos capazes de fazer fixação de N₂ são bactérias. Estas bactérias podem viver:

- Em associações simbióticas com plantas;
- Em vida livre.

Simbiose mutualista:

Boa parte do **nitrogênio fixado** em ambientes terrestres provém da <u>interação</u> <u>simbiótica mutualística entre bactérias e plantas</u>.

As plantas fornecem açúcares às bactérias. que possuem a capacidade necessária realizar para a fixação do nitrogênio.

Por sua vez, as bactérias simbióticas fornecem às plantas hospedeiras o nitrogênio recém fixado.

- ✓ <u>As bactérias que vivem em associações simbióticas mutualísticas entre plantas e bactérias são as responsáveis pela maior porcentagem de N₂ fixado no Planeta Terra.</u> São Associações:
- Leguminosas e rizóbios,
- Samambaia aquática Azolla e cianobactéria Anabaena
- Amoeiro e bactéria Frankia
- Milho e bactéria
- Cana-de-açúcar e bactéria
- ✓ As bactérias de vida livre são responsáveis apenas por pequena parcela do N₂ fixado

Bactérias como

Azotobacter, Bacillus, Clostridium e Klebsiella são heterotróficos encontrados no solo, sendo responsáveis por apenas uma <u>pequena parcela</u> do nitrogênio fixado biologicamente.

Bactérias simbióticas mutualísticas		Bactérias de vida livre	
Associadas a plantas leguminosas (rizóbios) (principais gêneros)	Associadas a plantas não leguminosas	Aeróbias	Anaeróbias
Rhizobium Bradyrhizobium	Frankia Azospirillum	Azotobacter Beijerinckia Klebsiella	Clostridium Desulfovibrio

Tabela: Algumas das principais bactérias fixadoras de nitrogênio

4.2. Biodisponibilização do nitrogênio - Fixação de N_{2.} (continuação)

Fixação de Nitrogênio por microrganismos - BOA ALTERNATIVA

A fixação biológica do nitrogênio já é realizada e pode ser MUITO aproveitada!

Os primeiros indícios da fixação de nitrogênio remontam ao começo do século XIX, a partir da observação do sucesso no desenvolvimento de **plantas leguminosas** mesmo em solos com baixo teor de nitrogênio.

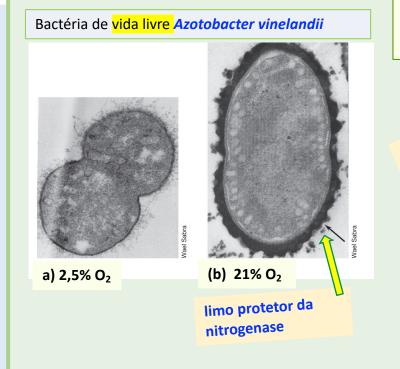
A fixação biológica do nitrogênio ocorre quando o nitrogênio atmosférico (N₂) é convertido em amônia (NH₃):

$$N_2 + 8 H^+ + 8 e^- + 16 ATP \rightarrow 2 NH_3 + H_2 + 16 ADP + 16 P$$

Essa reação é catalisada por um complexo enzimático chamado **nitrogenase** que é composto por duas proteínas: uma que contém ferro (Fe^{3+}) e outra que contém ferro (Fe^{2+}). A reação ocorre quando o nitrogênio gasoso (N_2) se liga ao complexo enzimático nitrogenase:

- A proteína que contém Fe³⁺ é primeiro reduzida por elétrons pela ferrodoxina;
- Então, a proteína reduzida liga-se à molécula de ATP e reduz a segunda proteína que doa elétrons para o nitrogênio gasoso (N₂), produzindo HN=NH;
- Esse ciclo se repete mais duas vezes, reduzindo HN=NH para H₂N-NH₂, e
- Finalmente para duas moléculas de amônia (NH₃).

As bactérias fixadoras de N₂ têm estruturas para proteção do complexo enzimático nitrogenase que é sensível ao O₂



Cianobactéria *Anabaena* que vive em associação com a samambaia aquática *Azolla*

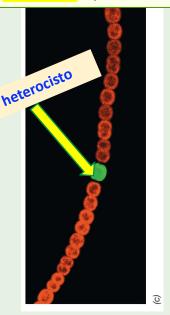


Figura 3.32: Proteção da nitrogenase em bactérias fixadoras de nitrogênio.

- **a** e **b**) Micrografia eletrônica de transmissão de células *Azotobacter vinelandii* crescidas em: **(a) 2,5% O**₂; muito pouco limo é formado;
- (b) em ar (21% O_2), onde se observa uma extensa camada de limo de coloração escura que retarda a difusão do O_2 no filamento, prevenindo a inativação da nitrogenase.
- (c) Fotomicrografia de fluorescência de uma célula da cianobactéria filamentosa *Anabaena* mostrando um único heterocisto (verde). O heterocisto é uma célula diferenciada que se especializa na fixação de nitrogênio e protege a nitrogenase da inativação por O₂.



4.2. Biodisponibilização do nitrogênio - Fixação de N_{2.} (continuação)

Lab.: Fixação biológica de N₂

Analisando a nitrogenase: redução de acetileno

As nitrogenases não são inteiramente específicas para N_2 e também reduzem outros compostos com ligações triplas, como o acetileno (HC=CH). A redução do acetileno pela nitrogenase é um processo que requer apenas dois elétrons, e o etileno (H2C=CH2) é o produto final. Assim, a redução do acetileno a etileno fornece um método simples e rápido para a mensuração da atividade da nitrogenase. Essa técnica, conhecida como "ensaio de redução do acetileno", é amplamente utilizada em microbiologia para detectar e quantificar a fixação de nitrogênio. A reação deve ser acompanhada por cromatografia gasosa.

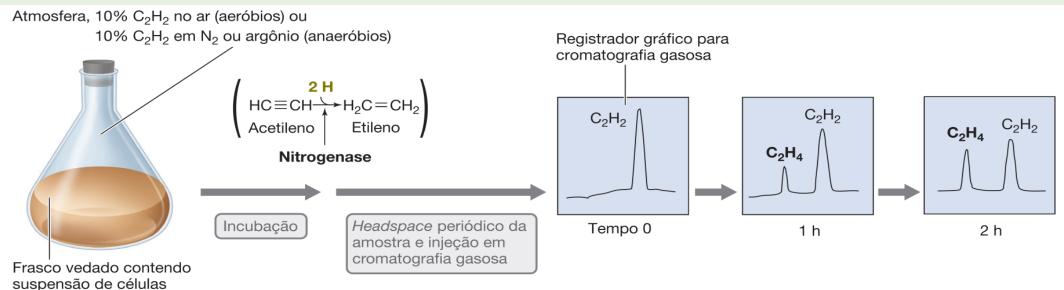


Figura 3.34 Ensaio de redução do acetileno, da atividade da enzima nitrogenase em bactérias fixadoras de nitrogênio. Os resultados mostram nenhum etileno (C_2H_4) no tempo 0, mas um aumento da produção à medida

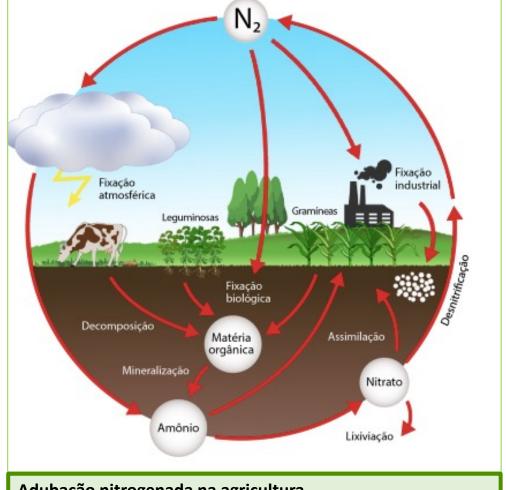
que o ensaio avança. À medida que C_2H_4 é produzido, uma quantidade correspondente de C_2H_2 é consumida.

- 4. Os microrganismos e o Agronegócio Fertilizantes /Aumento de Resistência
 - 4.2. Biodisponibilização de nitrogênio Fixação de N₂
 - Há bactérias de vida livre que fazem a fixação de nitrogênio



Bactérias como *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium* e *Klebsiella* são heterotróficos encontrados no solo,

Como já comentamos, estas bactérias são responsáveis apenas por uma <u>pequena parcela</u> da fixação do nitrogênio biologicamente.



Adubação nitrogenada na agricultura

- 4. Os microrganismos e o Agronegócio Fertilizantes /Aumento de Resistência
 4.2. Biodisponibilização de nitrogênio Fixação de N₂
 - Associações simbióticas mutualísticas fazem a fixação de nitrogênio:
 - Rizóbios Leguminosa (produção de feijão, soja, amendoim, etc)
 - Azolla Samambaia aquática (plantação de arroz)
 - Frankia Amieiro



4.2. Biodisponibilização de nitrogênio - Fixação de N₂

- Associações simbióticas mutualísticas fazem a fixação de nitrogênio:
 - Rizóbios Leguminosas (produção de feijão, soja, amendoim, etc)

As associações simbióticas mutualísticas entre plantas e bactérias fixam a maior porcentagem do N_2 em nosso Planeta.

A relação simbiótica mais importante ocorre entre as plantas leguminosas e as bactérias coletivamente chamadas de rizóbios.

Os rizóbios são bactérias que pertencem aos gêneros:

- Rhizobium,
- Bradyrhizobium,
- Ochrobactrum,
- Azorhizobium,
- Devosia,
- Methylobacterium,
- Mesorhizobium,
- Phyllobacterium,
- Sinorhizobium

Esta simbiose causa a formação de <u>nódulos</u> nas raízes da planta, e este processo de nodulação das leguminosas é essencial o crescimento e desenvolvimento da planta.

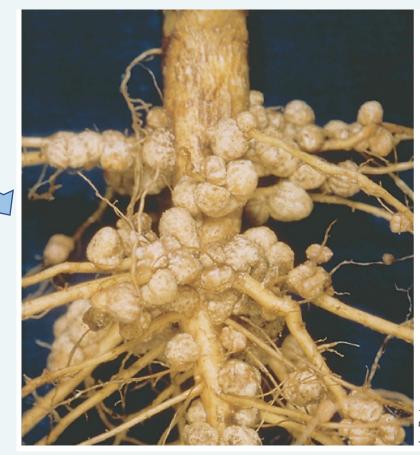


Fig.2.7: Nódulos radiculares da soja. Os nódulos desenvolvem-se pela infeção por *Bradyrhizobium japonicum.* A haste principal da soja tem diâmetro de 0,5 cm.

- Associações simbióticas mutualísticas fazem a fixação de nitrogênio:
 - Rizóbios Leguminosas (produção de feijão, soja, amendoim, etc) (continuação)

A simbiose no nódulo radicular e a fixação de N₂.

Um dos mutualismos planta-bactéria mais importantes para o homem é aquele entre plantas leguminosa e bactérias fixadoras de nitrogênio (N_2).

A maioria dos **simbiontes bacterianos de plantas capazes de fixar nitrogênio são** <u>coletivamente chamados</u> <u>rizóbios</u>, nome derivado do principal gênero dessas bactérias, *Rhizobium*.

Os **rizóbios** são capazes <u>de crescer livremente no solo</u> ou <u>infectar as plantas leguminosas</u>, estabelecendo uma relação de mutualismo. Um mesmo gênero de planta (ou até mesmo uma mesma espécie) pode conter linhagens rizobiais e não rizobiais.

Leguminosas são produtos essenciais para as **indústrias agrícola** e **de alimentos**, e a possibilidade des serem cultivadas sem o uso de fertilizantes nitrogenado traz enormes possibilidades vantajosas:

- 1) economiza milhões aos fazendeiros em fertilizantes anualmente,
- 2) Redução de efeitos da poluição causada pelo escoamento de fertilizantes.

Plantas da familia Leguminosae (também denominadas Fabaceae, vem de fava) encontram-se distribuidas por todo o globo terrestre. São plantas com flores, vulgarmente conhecidas como leguminosas, e estão entre as plantas cultivadas pelo homem de maior importância econômica a nível global., como soja, trevo, alfafa, feijões e ervilhas.

São a terceira família de plantas terrrestres em número de espécies, agrupando cerca de **751 gêneros** com mais de **19.000 espécies.**

Inclui árvores, arbustos, herbáceas perenes ou anuais reconhecíveis pelo fruto (em forma de vagem) e pelas folhas compotas e estipuladas (em forma de escamas).

Muitas das espécies desta família albergam nódulos radiculares que conferem ao grupo uma enorme importância ecológica global na fixação de nitrogênio (azoto).

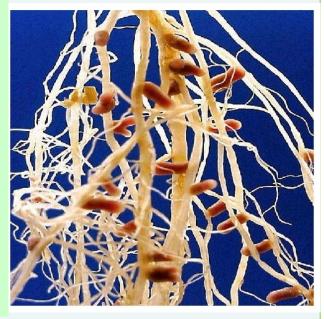


Fig: Nódulos radiculares de leguminosas (fixação de nitrogênio com **bactérias do gênero Rhizobium**. A infecção das raízes de uma planta leguminosa por essas bactérias leva à formação de nódulos radiculares, nos quais a bactéria fixa o nitrogênio gasoso (**N**₂).

- Associações simbióticas mutualísticas fazem a fixação de nitrogênio:
 - Rizóbios Leguminosas (produção de feijão, soja, amendoim, etc) (continuação)

A simbiose no nódulo radicular de leguminosas e a fixação de N₂

A fixação de nitrogênio nos **nódulos** radiculares representa **1/4 de todo N₂ fixado na Terra**, e possui imensa importância para a agricultura, uma vez que aumenta a quantidade de nitrogênio fixada no solo.

Leguminosas com nódulos crescem bem em solos não fertilizados e deficientes em nitrogênio, enquanto plantas sem nódulos apresentam dificuldades para crescer nestes solos.

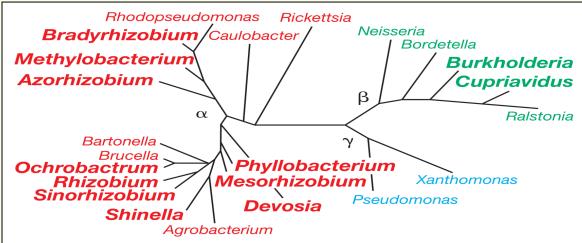


Figura 22.6 Filogenia dos rizóbios (nomes em negrito) e dos gêneros relacionados, inferida pela análise das sequências do gene 16S RNAr. Existem rizóbios em 12 gêneros e em mais de 70 espécies de Alpha e Betaproteobacteria.



nódulos radiculares

Fig 2.8: Efeito da nodulação no crescimento de plantas. Uma plantação de soja apresentando plantas desprovidas de nódulos (à esquerda) e plantas nodulosas (à direita) desenvolvendo-se em solo podre em nitrogênio. A cor amarelada é típica da clorose, resultado da falta nitrogênio.

4.2. Biodisponibilização do nitrogênio (continuação)



Lab.: Isolamento e de bactérias endofíticas com capacidade de realizar a fixação de Nitrogênio.

Etapa: Isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio:

bactérias podem ser isoladas a partir de raízes e de folhas de plantas. Estas estruturas devem ser inicialmente higienizadas, esmagadas assepticamente, e os extratos semeados em meios de cultura adequados.

A incubação deverá ser realizada em atmosfera contendo teores reduzidos de oxigênio, de acordo com as características da bactéria que se

deseja isolar.



Etapa: Análise da fixação de nitrogênio:

Macerados obtidos na etapa anterior deverão ser realizados pela técnica "ensaio de redução do acetileno".

- Associações simbióticas mutualísticas fazem a fixação de nitrogênio:
 - Rizóbios Leguminosas (produção de feijão, soja, amendoim, etc) (continuação)

Etapas da formação de **nódulos radiculares em leguminosas pe**los **rizóbios**:

- 1. Reconhecimento do parceiro correto por parte da planta <u>e</u> da bactéria, seguida pela ligação da bactéria aos pelos radiculares;
- 2. Secreção de moléculas de oligossacarídeos sinalizadores (fatores de nodulação) pela bactéria;
- 3. Invasão do radicular pela bactéria;
- 4. Migração da bactéria para a raiz principal por meio do conduto de infecção;
- 5. Formação de células bacterianas modificadas (**bacteroides**) no interior das células vegetais e no desenvolvimento do estado fixador de nitrogênio;
- 6. Divisão continuada o interior da planta, resultando na formação de **nódulos**.

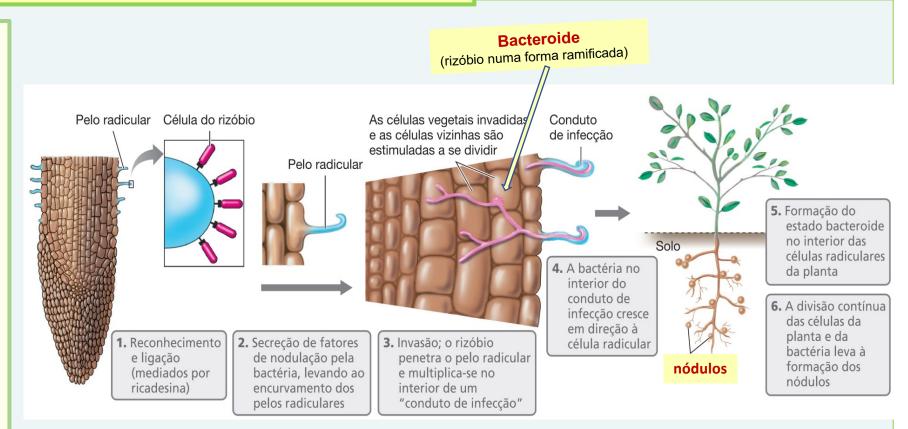
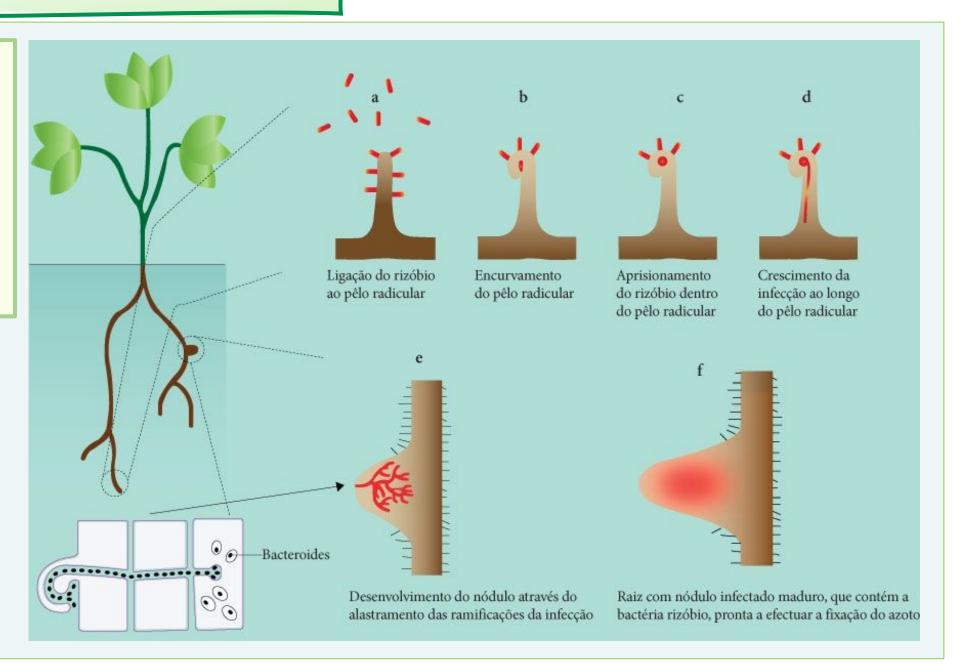


Fig 2.10: Etapas na formação de um nódulo radicular em uma leguminosa infectada por *Rhizobium*. A formação do estado de bacteroide é um pré-requisito para a fixação de nitrogênio.

Fig: Etapas da formação de nódulos radiculares em leguminosas infectada por *Rhizobium*.

A formação do estado de **bacteroide** é um prérequisito para a fixação de nitrogênio.



- Associações simbióticas mutualísticas fazem a fixação de nitrogênio:
 - Rizóbios Leguminosas (produção de feijão, soja, amendoim, etc) (continuação)

A Leg-hemoglobina

É uma proteína dentro da planta leguminosa que controla os níveis de O₂ e permite que as nitrogenases bacterianas realizem a fixação de N₂.

Em <u>cultura pura</u>, os <u>rizóbios</u> são capazes de fixar N_2 somente quando cultivados em condições de <u>microaerofilia</u> (as nitrogenases são inativadas por altos níveis de O_2).

<u>No nódulo</u>, as concentrações de O_2 são precisamente controladas por uma proteína chamada <u>leg-hemoglobina</u> <u>é</u> sintetizada pela planta e se liga ao O_2 <u>e</u> controla sua concentração dentro das células da planta.

Especificidade de infecção de plantas dos rizóbios

Uma única espécie de rizóbio é capaz de infectar determinadas espécies de leguminosas e não outras. Há uma acentuada especificidade entre as espécies de leguminosas e as espécies de rizóbios no estabelecimento do estado simbiótico. Na ausência da bactéria simbiôntica correta, uma leguminosa não é capaz de fixar nitrogênio.

Há grupos de plantas de inoculação cruzada

Um grupo de leguminosas relacionadas, as quais podem ser infectadas por uma espécie em particular de rizóbio, é denominado grupo de inoculação cruzada. Ex. Há um grupo de trevos, grupo de feijões, grupo de alfafa, etc. Quando a linhagem correta é utilizada, resulta em nódulos radiculares fixadores de nitrogênio e ricos em leg-hemoglobina.

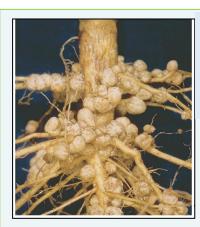


Figura 22.7 Nódulos radiculares da soja. Os nódulos desenvolvem-se pela infecção por *Bradyrhizobium japonicum*. A haste principal da soja tem diâmetro aproximado de 0,5 cm



Fig 22.9: Estrutura do nódulo radicular. Secções de nódulos radiculares da leguminosa *Coronilla varia*, apresentando o pigmento avermelhado da leg-hemoglobina. A produção desta proteína, que contém ferro, em nódulos fixadores de N_2 saudáveis é induzida pela interação entre planta e bactéria. A leg-hemoglobina atua como um "tampão de oxigênio", alternando-se entre as formas oxidada (Fe³⁺) e reduzida (Fe²⁺) do ferro, mantendo O_2 livre no interior do nódulo em concentrações baixas. A proporção entre a leg-hemoglobina ligada ao O_2 e o O_2 livre no nódulo radicular é mantida na ordem de 10.000:1.

- Associações simbióticas mutualísticas fazem a fixação de nitrogênio:
 - Rizóbios Leguminosas (produção de feijão, soja, amendoim, etc) (continuação)

Nódulos radiculares – como se estabelecem

As raízes das plantas leguminosas secretam compostos orgânicos que estimulam o crescimento de uma diversificada comunidade microbiana de rizosfera. Havendo a presença de **rizóbios** do **grupo de inoculação cruzada** correto no solo, eles formarão grandes populações e, por fim, serão ligados aos pelos radiculares que se estendem das raízes da planta.

Etapas da formação do nódulo radicular

LIGAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA:

Uma **proteína de adesão**, **ricadesina**, é encontrada na superfície das células de rizóbios. Outras substâncias, como proteínas contendo carboidratos, denominadas **lectinas**, e receptores específicos na membrana citoplasmática das plantas, também desempenham papel na ligação planta-bactéria.

PENETRAÇÃO:

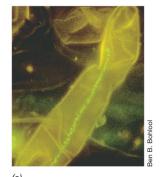
Após a ligação, uma célula de rizóbio penetra nos pelos radiculares, que se curvam em resposta às substâncias secretadas pela bactéria.

A bactéria, induz a planta a formar um tubo celulósico, denominado **conduto de infecção**, que se expande ao longo do pelo radicular.

ESPALHAMENTO:

As células da raiz, adjacentes aos pelos radiculares, são subsequentemente infectadas pelos rizóbios, ocorrendo a divisão da célula vegetal.

A divisão continuada da célula vegetal leva à formação de um **nódulo** semelhante a um tumor.



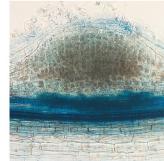


Figura 22.11: O conduto de infecção e formação de nódulos radiculares. (a) Um conduto de infecção formado por células de *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii em um pelo radicular de um trevo branco (*Trifolium repens*). O conduto de infecção consiste em um tubo celulósico, por meio do qual as bactérias se movem até as células radiculares.



Bacteroides

Fig 22.11:. (b-d) Nódulos de raízes de alfafa infectadas por células de **Sinorhizobium meliloti.**

O curso de tempo dos eventos da nodulação, a partir da infecção até a formação efetiva do nódulo, é de um mês, tanto na soja quanto na alfafa.

Os **bacteroides** têm comprimento aproximado de 2 μ m.

- Associações simbióticas mutualísticas fazem a fixação de nitrogênio:
 - Rizóbios Leguminosas (produção de feijão, soja, amendoim, etc) (continuação)

Bioquímica dos nódulos radiculares - simbiossomo

O **simbiossomo** é um conjunto de **bacteroides** circundados por uma única membrana oriunda da **planta** .

A fixação de nitrogênio envolve a atividade da **enzima nitrogenase**. A nitrogenase dos **bacteroides** apresenta as mesmas características bioquímicas das enzimas de bactérias fixadoras de N_2 de vida livre, incluindo a <u>sensibilidade ao O_2 </u> e a capacidade de reduzir acetileno e N_2 .

- <u>Benefícios para as bactérias</u>: Os bacteroides dependem da planta para supri-los do doador de elétrons para a fixação de N₂.

Os principais compostos orgânicos transportados através da membrana do $\underline{simbiossomo}$ para o $\underline{bacteroide}$ são os intermediários do ciclo do ácido cítrico (ácidos orgânicos C4, succinato, malato e fumarato). Eles são utilizados como doadores de elétrons para a síntese de ATP e, após sua conversão a piruvato, como fonte final de elétrons para a redução de N_2 .

 Benefícios para a planta: O produto da fixação de N₂ corresponde à amônia (NH₃), e a planta assimila grande parte desta amônia, formando compostos orgânicos nitrogenados.

A enzima assimiladora de amônia, **glutamina sintase**, é encontrada em altas concentrações no citoplasma das células vegetais, podendo converter o glutamato e a amônia em glutamina. Ela e outros compostos orgânicos nitrogenados transportam o nitrogênio fixado por toda a planta.

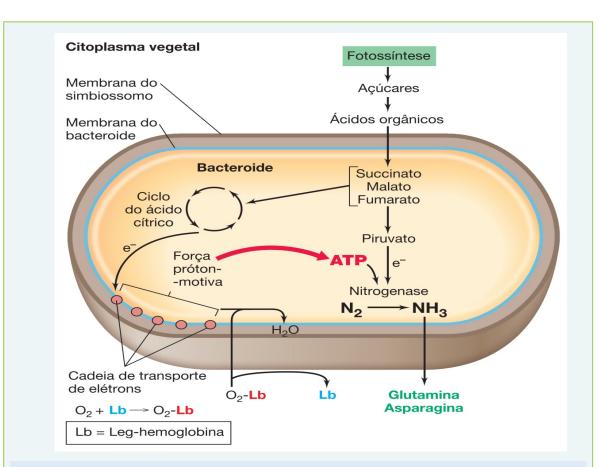


Fig 22.15: O bacteroide do nódulo radicular. Esquema das principais reações metabólicas e trocas de nutrientes que ocorrem no bacteroide. O simbiossomo é um conjunto de bacteroides circundados por uma única membrana oriunda da planta.

4.2. Biodisponibilização de nitrogênio - Fixação de N₂

- Associações simbióticas mutualísticas fazem a fixação de nitrogênio:
 - Rizóbios formadores de nódulos em caules de leguminosas

Algumas <u>poucas espécies de **leguminosas**</u> apresentam **nódulos** em <u>seus</u> <u>caules</u>. Estas são amplamente distribuídas em regiões tropicais, onde os solos frequentemente são deficientes em nitrogênio, em decorrência da lixiviação e intensa atividade biológica.

O sistema mais bem estudado é a <u>leguminosa aquática</u> tropical <u>Sesbania</u> rastrata, que é nodulada pela bactéria <u>Azorhizobium caulinodans</u>.

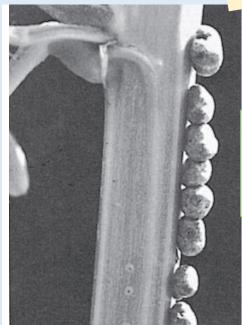
Os nódulos caulinares normalmente são formados nas porções submersas dos caules ou em porções situadas imediatamente acima do nível da água.

A sequência geral dos eventos na formação dos nódulos de caule em **Sesbania** é extremamente semelhante àquela observada nos nódulos radiculares: ligação, formação de um conduto de infecção e formação do bacteroide.

Alguns **rizóbios** de nodulação caulinar produzem **bacterioclorofila** e, desse modo, exibem o potencial de realizar a fotossíntese anoxigênica.

Rizóbios contendo **bacterioclorofila**, denominados *Bradyrhizobium* **fotossintetizantes**, são amplamente distribuídos na natureza, particularmente em associação com **leguminosas tropicais**.

Sesbania uma leguminosa tropical



nódulos
da bactéria
fixadora de N₂
Azorhizobium
caulinodans

Fig 22.16: Nódulos caulinares produzidos por *Azorhizobium caulinodans*. A porção à direita do caule da leguminosa tropical *Sesbania rostrata* foi inoculada com *Azorhizobium* enquanto a porção à esquerda não.

Sesbania são plantas cujas inflorescências são usadas para fins ornamentais e para proteção e recuperação de solos, sementes de algumas espécies são também utilizadas como alimento para humanos.



- 4. Os microrganismos e o Agronegócio Fertilizantes /Aumento de Resistência
 4.2. Biodisponibilização de nitrogênio Fixação de N₂
 - Associações simbióticas mutualísticas fazem a fixação de nitrogênio:
 - Rizóbios Leguminosa (produção de feijão, soja, amendoim, etc)
 - Azolla Samambaia aquática (plantação de arroz gramínea)
 - Frankia Amieiro

Algumas figuras destas associações!

4.2. Biodisponibilização de nitrogênio - Fixação de N₂

- Associações simbióticas mutualísticas fazem a fixação de nitrogênio:
- Samambaia aquática Azolla cianobactéria Anabaena (plantação de arroz)

Azolla - Anabaena

A *Azolla* é encontrada em rios, riachos e lagos de águas calmas, ela possui um pequeno orifício em suas folhas no qual se aloja uma cianobactéria chamada *Anabaena* que é a grande responsável pela fixação de N. A *Anabaena* sp. possui a enzima **nitrogenase** que transforma o nitrogênio atmosférico em amônia, forma que a planta é capaz de assimilar.

A *Azolla* tem resposta positiva ao incremento de fósforo nutriente. A temperatura ideal varia muito conforme a espécie utilizada, por esse motivo a faixa de adaptação é bem ampla (de -5°C – 35°C). O melhor desenvolvimento ocorre com o fotoperíodo prox. a 20 horas.

Em relação ao seu cultivo, a *Azolla* possui três sistemas: monocultura em pré-plantio de arroz, cultivo simultâneo ou consórcio e sistema combinado.

A *Azolla* é vista como um adubo verde, principalmente pelo fato de fornecer grandes volumes de biomassa, e ciclar nutrientes. Estudos feitos na China, EUA e Brasil relatam incorporação de 30 a 60 kg.ha⁻¹ ao sistema. Esta planta também pode ser utilizada como alimento fresco, seco ou fermentado para animais como porcos, marrecos, patos, coelhos, peixes e galinhas - fonte de proteína para animais.

Há várias espécies de *Azospirillum*, associadas a **gramíneas**.

A (Fixação Biológica de Nitrogênio) FBN é relacionada na maioria das vezes às leguminosas, porém algumas gramíneas como o arroz. e o milho também podem realizar esse processo utilizando plantas, algas e cianobactérias.

4.2. Biodisponibilização de nitrogênio - Fixação de N₂

- Associações simbióticas mutualísticas fazem a fixação de nitrogênio:
- Samambaia aquática *Azolla* cianobactéria *Anabaena* (plantação de arroz)

Azolla - Anabaena

Várias plantas **não leguminosas** formam simbioses fixadoras de N_2 com bactérias diferentes dos **rizóbios**.

Por exemplo, a <u>samambaia aquática Azolla</u> abriga dentro de pequenos poros de suas folhagens uma espécie de cianobactéria fixadora de N₂ e formadora de heterocistos denominada *Anabaena azollae*.

Emprego:

Esta associação foi utilizada por séculos para enriquecer os campos de arroz com nitrogênio fixado.

Antes do plantio do arroz, a superfície dos campos de arroz é densamente recoberta por *Azolla*. À medida que o arroz cresce, acaba sobrepujando a *Azolla*, causando a morte da samambaia e a liberação do nitrogênio, que é assimilado pelo arroz.

A repetição desse processo a cada período de plantio permite uma elevada produção de arroz, sem a necessidade da utilização de fertilizantes nitrogenados.

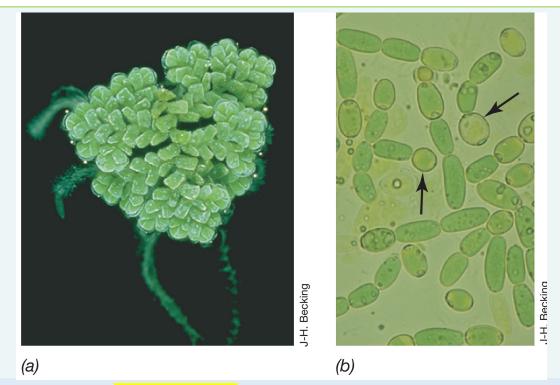


Figura 22.17: Simbiose Azolla-Anabaena.

- (a) Associação intacta ilustrando uma única planta de *Azolla pinnata*. O diâmetro da planta é de aproximadamente 1 cm.
- (b) A cianobactéria simbionte, *Anabaena azollae*, observada em folhas trituradas *de Azolla pinnata*. Cada célula de *A. azollae* tem largura aproximada de 5 μm. As células vegetativas apresentam formato oblongo; os heterocistos esféricos (coloração mais clara, setas) são diferenciadas para fixação de nitrogênio.

- 4.2. Biodisponibilização de nitrogênio Fixação de N₂
 - Associações simbióticas mutualísticas fazem a fixação de nitrogênio:
 - árvore **Amieiro** actinomiceto **Frankia**

O amieiro possui nódulos radiculares fixadores de nitrogênio que abriga actinomicetos fixadores de N₂.

Estas bactérias filamentosas pertencem ao gênero *Frankia*.





Amieiro (Alnus glutinosa) é uma planta de origem europeia conhecida na medicina popular para alívio de vários males desde a antiguidade; além de usada na construção de moinhos.

A planta é rica em **propriedades terapêuticas** tais como adstringente, analgésica, cicatrizante, antidiarreica, expectorante, febrífuga, antipirética e mucilaginosa.

É rica em vitaminas A, B1 e C; alicina, alina, óleos essenciais; além de sais minerais tais como cálcio, ferro, fósforo, magnésio e potássio.

As **cascas e raízes** são usadas, na **medicina popular**, para alívio de contrações musculares, diarreia, disfunção hepatobiliar, estomatite, feridas, febre, faringite, hemorroidas, leucorreia, mialgias, úlceras cutâneas e vulvovaginite.

As **folhas** esmagadas, são usadas em forma de emplastro, para acelerar a cicatrização de feridas.

A **madeira é resistente à água**, geadas, por isso ela é muito utilizada na construção de corpos de guitarras sólidas, brinquedos, pequenas peças, enfeites, lápis e até na construção naval, recuperação de áreas degradadas.

Possui crescimento rápido, se as condições climáticas forem favoráveis.

4.2. Biodisponibilização de nitrogênio - Fixação de N₂

- Associações simbióticas mutualísticas fazem a fixação de nitrogênio:
 - árvore **Amieiro** actinomiceto **Frankia**

O amieiro possui nódulos radiculares fixadores de nitrogênio que abriga actinomicetos filamentosos (do gênero *Frankia*) fixadores de N₂.

(gênero almieiro Alnus glutinosa) é uma árvore caracteristicamente pioneira, capaz de colonizar solos pobres em nutrientes, provavelmente devido a sua capacidade de estabelecer uma relação simbiótica fixadora de N₂ com as células de *Frankia*. Outras plantas lenhosas pequenas ou também arbustos são nodulados por *Frankia*.

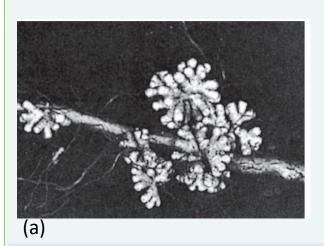


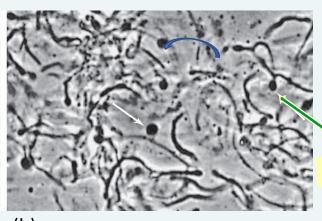


As células de *Frankia* fixam N_2 na presença de altas tensões de oxigênio porque nesta planta a **nitrogenase** fica protegida contra O_2 em **intumescimentos terminais, denominados vesículas.**

As **vesículas** possuem paredes espessas que retardam a difusão de O_2 , mantendo a tensão de O_2 no interior compatível com a atividade da **nitrogenase**. Estas vesículas assemelham-se aos **heterocistos** de algumas cianobactérias filamentosas.

Uma única linhagem de *Frankia* pode formar nódulos em diferentes espécies de plantas.





vesículas

(b)

Figura 22.18: Nódulos e células de Frankia. (a) Nódulos radiculares do amieiro comum, *Alnus glutinosa*. (b) Cultura de Frankia purificada a partir dos nódulos de Comptonia peregrina. Observe as vesículas (setas) situadas nas extremidades das hifas (pontos escuros).

Algumas OUTRAS contribuições positivas oferecidas pelas bactérias

4.3. Biodisponibilização de nutrientes do solo

- Micorrizas

Micorrizas são associações simbióticas mutualísticas entre fungos e raízes de determinadas plantas.

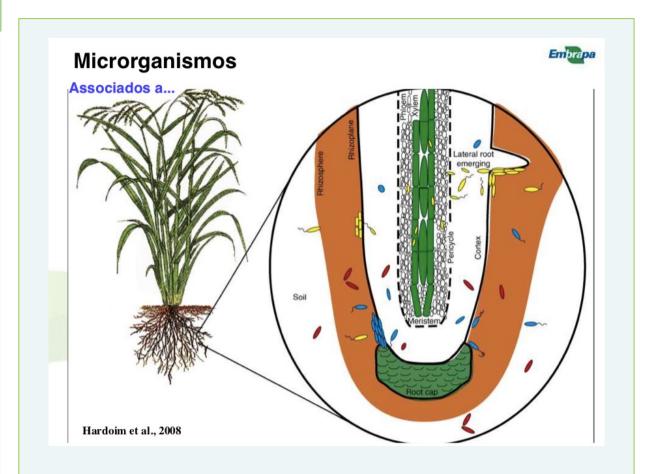
(O nome vem de: *mico*: fungo + *rhizo*: raiz) .

As **hifas do fungo se** associam às raízes das plantas e aumentam muito sua superficie de absorção e, assim, vão auxiliar na:

- Absorção de água,
- Absorção de sais minerais do solo, principalmente **fósforo** e **nitrogênio.**

Há dois tipos:

- Ectomicorrizas: neste tipo de associação as células fúngicas formam uma extensa bainha ao redor da face externa da raiz, havendo pequena penetração no tecido radicular;
- Endomicorrizas: neste tipo de associação o micelio se encontra embebido profundamente no tecido da raiz.



4.3. Biodisponibilização de nutrientes do solo

- Micorrizas (continuação)

Endomicorrizas: Correspondem ao tipo de micorriza mais frequentemente encontrado. **Estão presentes em mais de 80% das plantas terrestres**.

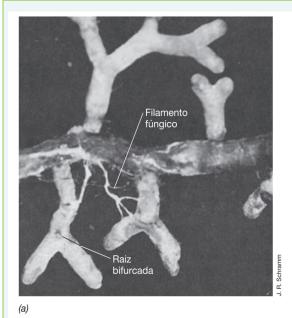
Ectomicorrizas: São encontradas principalmente nas raizes de árvores em áreas florestais, como carvalhos e pinheiros. Correspondem a quase totalidade destas raizes. Árvores como pinheiro têm raizes curtas de ramificação dicotômica e raizes longas.

Detalhes sa associação:

A maioria dos fungos de micorrizas **não cataboliza celulose e outros polímeros de folhas em decomposição**. Eles catabolizam carboidratos simples e geralmente requerem uma ou mais vitaminas, estes são obtidos a partir das secreções radiculares. Em troca, fornecem à planta minerais inorgânicos presentes no solo que captam.

Apesar da associação simbiótica estreita entre o fungo e a raiz, uma única espécie de árvore é capaz de formar múltiplas associações do tipo micorriza. Uma única espécie de pinheiro é capaz de se associar a mais de 40 espécies de fungos. A relativa falta de especificidade em relação aos hospedeiros permite que os micélios das ectomicorrizas interconectem árvores, criando ligações para transferência de carbono e outros nutrientes entre plantas da mesma espécie ou de espécies diferentes. Imagina-se que a transferência de nutrientes de plantas localizadas em planos superiores e mais bem iluminados para plantas localizadas em ambientes sombreados ajude a equalizar a disponibilidade de recursos, subsidiando árvores jovens, aumentando a biodiversidade e promovendo a coexistência de diferentes espécies.

Ectomicorrizas: associações <u>simbióticas mutualísticas</u> típicas entre fungos filamentosos e raízes de pinheiro



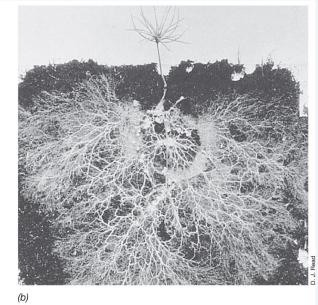


Fig 22.22: **Micorrizas**. a) Raiz de pinhero (*Pinus rigida*) apresentando uma associação típica **ectomicorriza** com filamentos do fungo *Thelephora terrestris*;

b) Muda de *Pinus contorta* revelando o extenso desenvolvimento do micelio de absorção de seu fungo associado *Suillus bovinus*. Ele cresce a partir das raizes ectomicorriza originando uma formação em leque responsável pela captação de mutrientes presentes no solo. A muda tem altura aproximada de 12 cm.

Interconectividade entre árvores - que coisa linda!

4.3. Biodisponibilização de nutrientes do solo

- Micorrizas arbusculares

Embora os **fungos endomicorrizicos** e **ectomicorrízicos** desempenhem um papel importante na ecologia das florestas, existe uma **diversidade maior dos fungos endomicorrízicos**. A maioria das micorrizas são **Micorrizas Arbusculares (MA)**.

Este grupo compreende uma divisão de fungos filogeneticamente distinta, a *Glomeromycota*, na qual todas ou quase todas as espécies são **mutualistas** obrigatórios de plantas (o termo "arbuscular" significa "árvores pequenas").

As MA colonizam 70 a 90% de todas as plantas terrestres, incluindo a maioria das espécies de campinas e muitas espécies agrícolas.

Acredita-se que a **associação entre plantas** e **Glomeromycota** seja a forma ancestral de micorriza, estabelecida 400 a 460 milhões de anos atrás e um importante estágio evolutivo na invasão da terra seca pelas plantas terrestres.

Sabe-se que fungos MA produzem fatores de sinalização oligossacarídeos de lipoquitina (fatores Myc), bastante similares aos fatores Nod, e estes fatores iniciam a formação do estado de micorriza.

A colonização da raiz por um fungo MA começa com a germinação de um esporo proveniente do solo, produzindo um micélio de germinação curto que reconhece a planta hospedeira por meio de sinalização química recíproca; o fungo, então, forma uma estrutura de contato com as células epidérmicas da raiz. A hifa de penetração estende-se para dentro da planta, geralmente tomando um caminho intracelular, por meio das camadas de células da epiderme e do córtex da raiz, posteriormente formando estruturas de hifas ramificadas ou enoveladas chamadas arbúsculos, no interior das células vegetais do córtex interno, próximo aos tecidos vasculares.

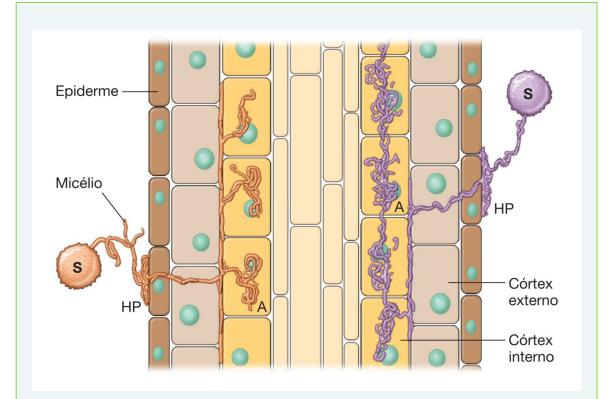


Fig 22.23: Colonização da raiz por micorrizas arbusculares. Um esporo (S) próximo a uma raiz de planta origina um micélio curto que é atraído à planta por meio de sinalização química, formando uma estrutura de adesão, denominada hifopódium (HP). O micélio, então, adentra a região do córtex interno da raiz penetrando células epidermais e células do córtex externo. Arbúsculos (invaginações dicotomicamente ramificadas, A) são formados pelo espalhamento dos micélios no meio intercelular (à esquerda) ou intracelular (à direita).

4.3. Biodisponibilização de nutrientes do solo

- Micorrizas (continuação)

Benefícios para a planta

Na muda de pinheiro, o micélio fúngico da **ectomicorriza** é a porção dominante da capacidade absortiva do sistema radicular da planta.

O efeito benéfico que o fungo da micorriza confere à planta é mais bem observado em solos pobres, onde árvores providas de micorrizas sobrevivem, enquanto aquelas desprovidas não conseguem. A planta com micorriza é capaz de:

- manter seu funcionamento fisiológico e
- competir com sucesso em uma comunidade rica em espécies vegetais;

o fungo beneficia-se com um fluxo constante de nutrientes orgânicos.

<u>Ex.</u>: Quando árvores plantadas em pradarias, que geralmente não possuem um inóculo fúngico adequado, são inoculadas artificialmente no ato do plantio, crescem mais rapidamente do que as árvores não inoculadas.

O maior poder de absorção nutricional é decorrente da maior área superficial fornecida pelo micélio fúngico.

Assim, as **micorrizas** além de <u>auxiliar as plantas na absorção de água e nutrientes</u>, as **micorrizas** também desempenham um importante papel no <u>controle da</u> diversidade vegetal.

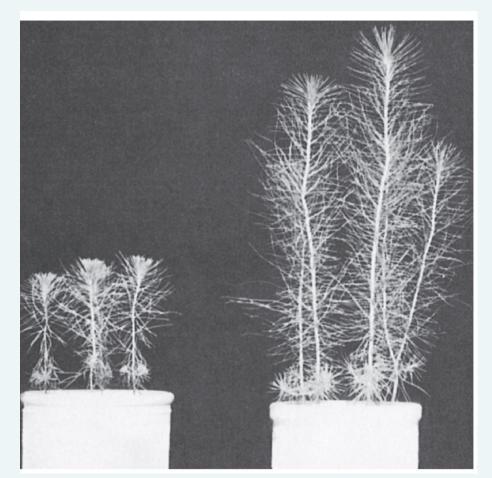


Fig 22.23: Efeito dos fungos de micorrizas sobre o crescimento das plantas. Mudas de seis meses de pinheiro de Monterey (*Pinus radiata*) crescendo em vasos contendo solo de pradarias:

- à esquerda, desprovida de micorriza;
- à direita, com inoculo fúngico que leva a produção de micorriza.

Agora,

alguns **Problemas** causados

pelos microrganismos às

plantações ...!

5. Parasitismo: Problemas sendo enfrentados

- Simbioses Parasitárias

Fitopatógeno

É a designação a um organismo que causa doença em plantas. Podem ser: **bactérias**, **fungos**, **vírus**, nematódeos, moluscos.

Eles perturbam o metabolismo vegetal de diversas maneiras:

- Absorvendo nutrientes da planta;
- Excretando: Enzimas, Toxinas, Fito-reguladores, etc;
- <u>Crescendo e se multiplicando no xilema ou floema</u> bloqueando:
 - Xilema: transporte de <u>água</u> e de <u>nutrientes</u> das raízes até as folhas,
 - Floema: fluxo da seiva das folhas para o resto da planta.



a) Tabaco com tumor Galha-da-cora



c) Laranja com cancro cítrico



b) cacau com vassourade-bruxa



d) Tomate com cancro-bacteriano

Fig. Exemplos de algumas das doenças de Plantas

5. Parasitismo: Problemas sendo enfrentados

- Simbioses Parasitárias
 - Doença do tabaco, da videira: Galha-da-coroa

Ex.: Planta tabaco

Agrobacterium tumefaciens, também chamada *Rhizobium radiobacter,* é <u>intimamente relacionada</u> com espécies formadoras de nódulos radiculares do gênero *Rhizobium,* mas é um patógeno de plantas.

A. tumefaciens <u>não</u> forma nódulos radiculares, e o gene que codifica a formação da **galha** não está relacionado com os genes que medeiam a formação do nódulo.

A doença normalmente provoca:

- morte da planta,
- pode torná-la mais fraca e susceptível ao ressecamento e outras doenças.

Ex.: Planta videira

Agrobacterium vitis

Provoca presença de galhas na parte basal do tronco das plantas, abaixo ou acima da linha do solo.

Plantas de videira infectadas podem produzir:

- brotações pouco desenvolvidas
- a parte da planta situada logo acima da região do solo pode morrer.

Prevenção e controle

Uma vez verificado sintomas da doença no vinhedo (e outras culturas doentes), a planta deve ser eliminada, inclusive as raízes.

- Evitar instalar novos cultivares em áreas com histórico da doença;
- Dar preferência, nessas áreas, à rotação de culturas;
- Utilizar material propagativo de copa e porta-enxerto sadios;
- Evitar ferimentos, principalmente nas raízes e no colo da planta.



Fig 22.19.. Planta de tabaco com deformações denominadas "tumor de galha-da-cora". Estes tumores são provocados pela bactéria Agrobacterium tumefaciens.

5. Parasitismo: Problemas sendo enfrentado

- Simbioses Parasitárias
 - Doença do cacaueiro: Vassoura-de-bruxa

Ex.: Planta cacaueiro

Esta doença dos cacaueiros é causada por um **fungo** basidiomiceto *Moniliophtora perniciosa*.

É uma das doenças de maior impacto econômico nos países produtores de cacau da América do Sul e das ilhas do Caribe.

M. perniciosa ataca as **regiões meristemáticas** (tecidos que conservaram a capacidade de divisão, responsáveis pelo crescimento do vegetal, uma vez que adicionam células indefinidamente à planta) **do cacaueiro**, principalmente

frutos, brotos e almofadas florais, ocasionando queda acentuada na produção, provocando o desenvolvimento anormal, seguido de morte, das partes infectadas.

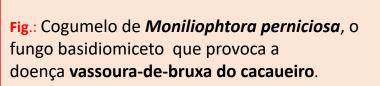
Atualmente, a doença a constitui o maior problema fitopatológico do estado da Bahia/Brasil

Problema econômico:

A doença é originária da bacia amazônica e só foi detectada em 1989. De 1991 para 2000 o Brasil teve sua produção anual reduzida de 320,5 mil toneladas para 191,1 mil toneladas/ano, caindo a sua participação no mercado internacional de 14,8% para 4%.



Fig.: Cacau com a doença vassoura-de-bruxa do cacaueiro.





6. Algumas Inovações

- 6.1. Cultivos já sendo realizados
- 6.2. Novas possibilidades futuras oferecidas pela TDR

Como fazer de um limão uma gostosa limonada!...

As plantas podem vir a ter muitas doenças. As doenças das plantas sempre trazem como consequências perdas de **qualidade** ou de quantidade de produção. Em alguns casos estas perdas podem ser muito significativas <u>economicamente</u> e em termos de <u>saúde</u> para a comunidade. Este tema é objeto de estudo da <u>Fitopatologia</u>.

Em todos os casos, o conhecimento das causas das doenças de plantas se apresentam como **grandes desafios** (mas que também podem ser vistos como oportunidades!) a serem superadas.

Há exemplos de como este conhecimento vem abrindo vários tipos de <u>novas</u> <u>oportunidades de trabalho</u> e <u>novas perspectivas de enfrentamento, algumas mais tradicionais</u> e <u>outras extremamente modernas</u>. As novas abordagens vem permitindo até mesmo a obtenção de novas variedades de plantas mais resistentes aos agentes patogênicos e que apresentam maiores produtividades, como veremos a seguir.



Fig.: Doença "verrugose dos citros", frequente aparece em sementeiras, porta enxertos (afetando tecidos jovens), viveiros, pomares e frutos. Pode ser causada pelos fungos:

- Sphaceloma fawceti (Elsinoe fawceti) (limões, laranja azeda, tangerina, etc);
- S. australis (tangerinas, laranjas doces).



6. Algumas inovações: Novos produtos já em campo

- 6.1. Biodisponibilização de nitrogênio Fixação de N₂
- Novos cultivares com bactérias fixadoras de N₂ gramíneas, cereais e tuberosas

Johanna Döbereiner

<u>Nos anos 1960</u>, o cultivo da **soja** foi introduzido no Brasil. **Johanna Döbereiner** propôs fortemente o aproveitamento das associações entre plantas e bactérias para conseguir a **fixação de nitrogênio**, opondo-se a utilização de adubação nitrogenada obrigatória.

Isto <u>resultou no desenvolvendo de uma nova tecnologia</u> capaz de diminuir ou até mesmo eliminar a dependência deste tipo de adubação, poupando entre um e dois bilhões de dólares/ano. Esta tecnologia faz com que o <u>Brasil tenha o menor custo</u> de <u>produção de <u>soja</u> do mundo, se estabelecendo como um dos maiores produtores.</u>

Em 1974, **Johanna** também é a primeira a descrever a ocorrência de uma associação entre bactérias **fixadoras de nitrogênio** do gênero <u>Azospirillum</u> e a **gramínea** *Paspalum* notatum. Posteriormente, estas bactérias foram descritas associadas ao <u>milho</u> e forrageiras.

<u>Em 1988</u>, **Johanna** escreveu sobre a associação entre a bactéria endofítica fixadora de nitrogênio *Gluconacetobacter diazotrophicus* e <u>cana-de-açúcar</u>. Algumas variedades foram capazes de produções acima de **160 T/ano**, com até 200 kg de nitrogênio fixado derivado desta associação.

Johanna e seus estudos levaram à descoberta de 9 espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a gramíneas, cereais e tuberosas.

A caminho da limonada! Vamos aos Estudos





Foto: Johanna Liesbeth Kubelka Döbereiner

Fonte: Embrapa

- 6.2. Novas possibilidades futuras oferecidas pela TDR
 - Oportunidade oferecida por *Agrobacterium tumefaciens*

E nossa limonada!

A caminho Vamos aos Estudos

Problema:

Simbiose parasitaria causada por Agrobacterium

Agrobacterium promove a formação de **crescimentos tumorais em diversas plantas**. As duas espécies bacterianas mais estudadas são:

- Agrobacterium tumefaciens (ou Rhizobium radiobacter),
 que causa a doença da galha-da-coroa; e,
- Agrobacterium rhizogenes, que causa a "raiz em cabeleira".

MAS, CONSIDERANDO QUE:

O gênero *Agrobacterium* é formado por bactérias MUITO relacionadas com *Rhizobium* que promovem o surgimento de nódulos radiculares benignos fixadores de N₂.

Oportunidade:

ENTÃO, isto pode ser aproveitado....







Galha da Coroa



Fig.: Simbioses parasitarias causada por Agrobacterium.

a) A. tumefaciens causando "galha-da-coroa" (Fonte:

https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4459183/mod_resource/content/1/LGN0232%2 0Metodos%20de%20Transformação%20de%20Plantas%208a%20aula%202018.pdf

e b) A. rhizogenes causando "raiz em cabeleira".

6.2. Novas possibilidades futuras oferecidas pela TDR

- Oportunidade oferecida por *Agrobacterium tumefaciens* (continuação)

Oportunidade trazida pelo conhecimento

O plasmídeo Ti

O crescimento na galha-da-coroa é diferente dos demais calos, por ser descontrolado, assemelhando-se a um tumor observado em animais.

As células de *A. tumefaciens* induzem a formação destes tumores somente quando possuem o **plasmídeo Ti** ("Tumor induction").

Após a infecção, uma parte do **plasmídeo Ti**, denominada DNA de transferência (**T-DNA**), se integra ao genoma da planta.

O **T-DNA** contém tanto os genes responsáveis pela formação do tumor quanto aqueles envolvidos na produção de alguns aminoácidos modificados denominados **opinas**. As **opinas** são produzidas por células vegetais transformadas com o T-DNA, correspondendo a uma fonte de carbono e nitrogênio e, algumas vezes, de fosfato, para as células de *Agrobacterium* parasitas.

O plasmídeo Ri

A. rhizogenes, para causar a doença da "raiz em cabeleira, um plasmídeo similar (plasmídeo Ri) é necessário.

Os estudos levam ao conhecimento

Então, como isto está sendo usado?

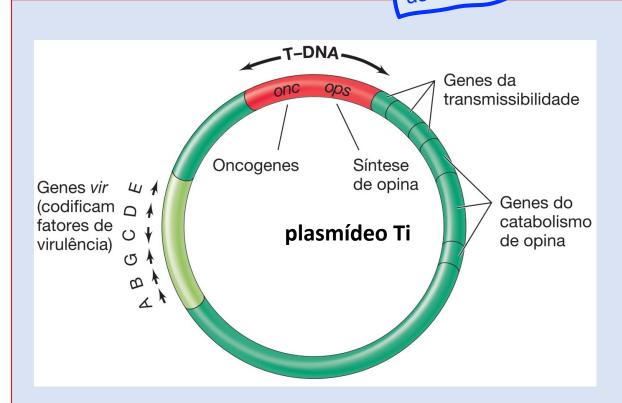


Fig. 22.20: Estrutura do plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. O T-DNA é a região transferida para à planta. As setas indicam a direção que é transcrito cada gene de virulência. O plasmídeo Ti completo tem 200 Kpb e o T-DNA tem aproximadamente 20 Kpb.

6.2. Novas possibilidades futuras oferecidas pela TDR

- Oportunidade oferecida por *Agrobacterium tumefaciens* (continuação)

Então, como isto está sendo usado?

Engenharia genética utilizando o plasmídeo Ti

Do ponto de vista da microbiologia e da patologia vegetal, tanto a doença da **galha-da-coroa** quanto a **raiz em cabeleira** envolvem interações estreitas entre a planta e a bactéria, as quais levam à transferência de genes da bactéria para a planta. Isto é, **Ti** oferece um sistema natural de transformação de plantas.

Assim, em anos recentes, o interesse no sistema **Ti-galha-da-coroa foi desviado** da **própria doença**, para as aplicações desse processo natural de permuta genética, na **biotecnologia de plantas**.

Vários plasmídeos Ti modificados, desprovidos dos genes envolvidos na doença, mas ainda capazes de transferir DNA para plantas, foram desenvolvidos por engenharia genética. Eles foram utilizados na obtenção de plantas modificadas geneticamente (transgênicas). Diversas plantas transgênicas foram desenvolvidas, incluindo plantas de interesse agrícola carreando genes de:

- Resistência a herbicidas,
- Resistência a ataques de insetos,
- Ressecamento.

(Veremos mais sobre o plasmídeo Ti no Item Biotecnologia)

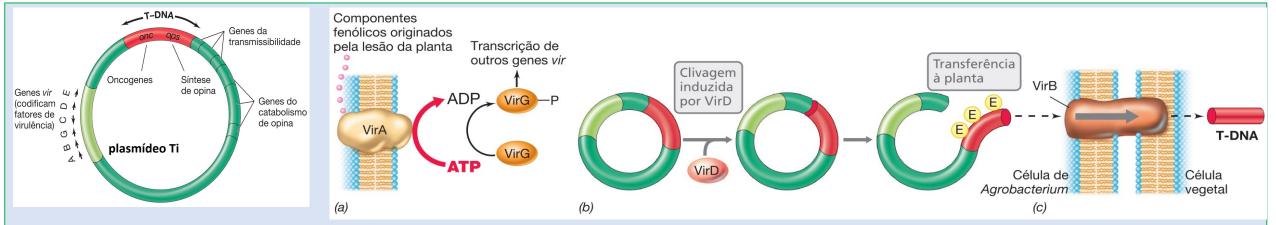


Fig. 22.21: Plasmídeo Ti e o mecanismo de transferência do T-DNA para a célula da planta por *Agrobacterium tumefaciens*. (a) VirA ativa VirG fosforilando-o, e VirG ativa a transcrição de outros genes vir. (b) VirD é uma endonuclease que cliva Ti, liberando o T-DNA. (c) VirB atua como uma ponte de conjugação entre a célula de *Agrobacterium* e a célula vegetal, enquanto VirE é uma proteína de ligação ao DNA de fita simples, que auxilia a transferência do T-DNA. A DNA-polimerase da planta produz a fita complementar à fita simples de T-DNA transferida.

6.2. Novas possibilidades futuras oferecidas pela TDR

- Oportunidade oferecida por Xylella fastidiosa

Xylella fastidiosa (bactéria bacilo Gram-negativo)

Provoca a Clorose Variegada de Citros (CVC) ou "amarelinho: praga que afeta laranjais, grande problema na citricultura Paulista.

É capaz de causar severas doenças em **laranjeiras**, muitas vezes letais. Também é conhecida pela sua **extrema capacidade de infecção** de um grande número de plantas hospedeiras (cana-de-açúcar, lavanda, oliveira, pessegueiro), induzindo **ressecamento** ou às vezes sem induzir manifestações patológicas.

Por estas características, o microrganismo é conhecido pelo dano grave que é capaz de causar uma variedade de culturas agrícolas.

Marco Brasileiro: PRIMEIRO PROJETO GENOMA DE um FITOPATÓGENO

O genoma de *X. fastidiosa* foi o primeiro de uma bactéria **fitopatogênica** a ser completado em todo o mundo. Este marco pioneiro do Brasil, completado em 11/1999, foi realizado por um consórcio de vários laboratórios de pesquisa (**Rede ONSA** - "Organization for **N**ucleotide **S**equencing and **A**nalysis") financiado pela <u>FAPESP</u> e o <u>Fundo Paulista</u> de <u>Citricultura</u> (<u>Fundecitrus</u>).

Problema - Simbiose Parasitária causada por Xylella fastidiosa - Clorose Variegada de Citrus (CVC) que afeta laranjeiras



O **Projeto Genoma** da bactéria **Xylella** reuniu 35 laboratórios e quase 200 pesquisadores, integrados por meio da <u>Rede ONSA</u> ("**O**rganization for **N**ucleotide **S**equencing and **A**nalysis").

O Genoma *Xylella* foi concluído em <u>novembro de 1999</u>, com a determinação de 2,7 x10⁶ pb, abrindo muitos novos caminhos para pesquisa das causas desta doença e possibilidades futuras de condutas.

6.2. Novas possibilidades futuras oferecidas pela TDR

- Oportunidade oferecida por Xantomonas citri

Xantomonas citri (bactéria bacilo Gram-negativo)

O mapeamento do genoma da bactéria *Xanthomonas citri* consolidou a liderança do **Brasil** na área de genética de pragas agrícolas. Esta bactéria, é a causadora do **cancro cítrico** que ataca os pomares, causando prejuízos anuais de R\$ 110 milhões à economia paulista.

O Projeto genoma de *Xanthomonas* reuniu 11 laboratórios de sequenciamento espalhados na Universidade de São Paulo (USP), Universidade Estadual Paulista (Unesp) e Unicamp, sob a coordenação de dois centrais, um na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) na Unesp de Jaboticabal e outro no Instituto de Química da USP.

Primeiramente, foi feito um *scaffold* – um mapa virtual ou esqueleto do genoma. O arcabouço foi montado com cerca de **2 mil cosmídeos**, cada um com **35 mil a 50 mil pares de bases de nucleotídeos**.

Novo Marco Brasileiro: PROJETO GENOMA DE FITOPATÓGENO

O genoma de *X. citri*, uma bactéria **fitopatogênica** foi um novo marco do Brasil e foi realizado por um consorcio de vários laboratórios de pesquisa financiado pela <u>FAPESP</u>.

Problema - Simbiose Parasitária causada por *Xantomonas citri*

- Cancro cítrico que afeta laranjeiras



Fig 22.19. Laranjeira com cancro cítrico. Lesões em frutos e folhas causada pela infecção por *Xantomonas citri*.

- 6.3. Novas possibilidades futuras simples
 - Oferecidas pelo conhecimento bioma natural

Ainda há muito espaço para tecnologias tradicionais

Considere ainda que, muitos melhoramentos podem ser alcançados para a melhoria de vários cultivos vegetais empregando-se:

- Bioestimulação de simbioses mutualísticas.
- Bioadição de simbioses mutualísticas.
- Controle biológico de pragas (empregando-se microrganismos competidores aos microrganismos patogênicos)







Figs.: Exemplos de alguns produtos já no mercado com abordagens baseadas na preservação da qualidade do solo e manutenção do meio ambiente

7. Questões

- 1. O que são microrganismos endofíticos?
- Quais são os principais tipos de associações simbióticas que os microrganismos podem estabelecer com as plantas? Como são elas?
- 3. Nódulos radiculares podem beneficiar uma planta? Como?
- 4. Como as nitrogenases, enzimas responsáveis pela fixação de N₂ em plantas, exercem sua função já que necessitam de ambiente com anaerobiose para manter sua atividade ?
- 5. O que é um bacteroide e o que ocorre em seu interior? Qual a função da leg-hemoglobina?
- 6. Quais são as principais semelhanças e diferenças entre Frankia e os rizóbios?
- Cite 3 bactérias que podem fazer associação simbiótica com plantas que resultam na fixação de N_{2.}
- 8. As associações simbióticas mutualísticas das plantas com microrganismos somente podem resultar no benefício para plantas para a fixação de N₂? Há casos que podem resultar em outros benefícios? Quais?

- 9. Há bactérias de vida livre que fazem a fixação de N₂ ou somente bactérias em associação simbiótica mutualista com plantas têm esta capacidade?
- 10. Há associações simbióticas parasitárias de microrganismos com plantas que podemos nos beneficiar de algum modo?
- 11. Como os Projetos genoma podem resultar em contribuições para o controle de pragas da agricultura? Já temos algum exemplo neste campo ou apenas estamos em fases iniciais de estudo.
- 12. Discuta a afirmação: Certamente, as contribuições resultantes da TDR podem trazer contribuições extremamente valiosas para o controle de pragas agrícolas. Esta abordagem envolve trabalho coletivo e muitos esforços. Todavia, algumas contribuições também podem ser realizadas empregando metodologias que envolvem o conhecimento da microbiota associada às plantas sadias incluindo Bioestimulação, Bioadição e controle biológico de pragas com a microbiota simbiótica mutualística das plantas.



Eita! sabe todas as

Se você sabe todas as

Parabéns!
respostas.......parabéns!
(Veremos mais sobre este Tema e
(Veremos mais sobre Biotecnologia)
plasmídeo Ti no Item Biotecnologia)