



## Fixação biológica de nitrogênio: uma revisão



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Algodão  
Ministério da Agricultura e Pecuária***

## **DOCUMENTOS 293**

# Fixação biológica de nitrogênio: uma revisão

Magna Maria Macedo Nunes Costa

***Embrapa Algodão  
Campina Grande, PB  
2023***

**Embrapa Algodão**  
Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário  
58428-095, Campina Grande, PB  
Fone: (83) 3182 4300  
www.embrapa.br/algodao  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente  
*Daniel da Silva Ferreira*

Secretária-Executiva  
*Magna Maria Macedo Nunes Costa*

Membros  
*Francisco José Correia Farias, Geraldo Fernandes de Sousa Filho, Luiz Paulo de Carvalho, Nair Helena Castro Arriel, Rita de Cássia Cunha Saboya*

Supervisão editorial  
*Geraldo Fernandes de Sousa Filho*

Revisão de texto  
*Marcela Bravo Esteves*

Normalização bibliográfica  
*Enyomara Lourenço Silva*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica  
*Geraldo Fernandes de Sousa Filho*

Fotos da capa  
*Fábio Martins Mercante*  
Fonte: Hungria et al. (2013)

**1ª edição**

Publicação digital (2023): PDF

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
Embrapa Algodão

---

Costa, Magna Maria Macedo Nunes.

Fixação biológica de nitrogênio: uma revisão / Magna Maria Macedo Nunes Costa. –  
Campina Grande : Embrapa Algodão, 2023.

PDF (34 p.) : il. color. - (Documentos / Embrapa Algodão, e-ISSN 2966-0343 ; 293).

1. Nutrição vegetal. 2. Adubação. 3. Nutriente mineral. 4. Solo. 5. Fotossíntese. 6. Raiz- caule.  
7. Simbiose. I. Embrapa Algodão. II. Título. III. Série.

CDD 572.545

## Autora

### **Magna Maria Macedo Nunes Costa**

Engenheira-agrônoma, doutora em Nutrição Mineral de Plantas,  
pesquisadora da Embrapa Algodão, Campina Grande, PB



## Apresentação

As pesquisas com fixação biológica de nitrogênio (FBN) na Embrapa tiveram início no ano de 1963, conduzidas pela doutora Johanna Döbereiner no Instituto de Ecologia e Experimentação Agrícola – hoje Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ. Desde então, não pararam mais. Hoje, o Brasil é o maior produtor de soja do mundo sem nenhum gasto com fertilizantes nitrogenados devido ao desenvolvimento de estirpes de *Bradyrhizobium*, que se juntam às raízes dessa cultura, por meio de simbiose, para fornecer todo o N que a planta necessita.

O desenvolvimento dessa tecnologia se estendeu a outras commodities por meio de pesquisas com as simbioses *Rhizobium* x feijoeiro e *Acetobacter* x cana-de-açúcar e a associação *Azospirillum* x milho, trigo, arroz ou *Brachiaria*. Na Embrapa Algodão, pesquisas já foram desenvolvidas com a simbiose *Bradyrhizobium* x amendoim e iniciadas com a associação *Azospirillum* x algodão, com resultados promissores.

Nesse contexto, este documento tem o objetivo de descrever o que é a FBN, os principais tipos de simbiose e associação – bem como a diferença entre ambas –, o processo morfológico e fisiológico da FBN e discutir algumas pesquisas conduzidas na Embrapa Algodão sobre esse tema. Esperamos que a obra contribua e incentive o norteamento de linhas de pesquisa sobre a fixação biológica do N<sub>2</sub> em um amplo escopo de plantas cultivadas, nas mais diversas instituições de pesquisa, uma vez que se trata de uma técnica sustentável de fornecimento de nutrientes e melhoria da estrutura do solo, especialmente no bioma Semiárido.

Ademais, esperamos também que essas discussões sirvam para que instituições de fomento à pesquisa invistam no desenvolvimento de técnicas cada vez mais avançadas destinadas a, quiçá, no futuro, eliminar o uso de nitrogênio industrial em outras espécies de interesse comercial que são capazes de se unir às rizobactérias fixadoras desse elemento da atmosfera, reduzindo significativamente custos de produção. Esta publicação encontra-se alinhada à agenda 2030 através do Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) N° 12 - Produção e Consumo Sustentáveis.

Nair Helena Castro Arriel  
Chefe-Geral da Embrapa Algodão

## Sumário

Introdução.....	9
Alguns exemplos de fixação biológica.....	9
Simbiose leguminosa x rizóbios (soja x <i>Bradyrhizobium</i> e feijão x <i>Rhizobium</i> ) .....	9
Simbiose <i>Alnus</i> x <i>Frankia</i> .....	12
Simbiose <i>Gunnera</i> x <i>Nostoc</i> .....	12
Simbiose <i>Azolla</i> x <i>Anabaena</i> .....	12
Simbiose cana-de-açúcar x <i>Acetobacter diazotrophicus</i> .....	13
Associação Milho x <i>Azospirillum</i> .....	14
A fixação do nitrogênio atmosférico.....	16
Os nódulos .....	17
O estabelecimento da simbiose .....	18
A formação dos nódulos.....	18
A enzima nitrogenase.....	19
Transporte de nitrogênio para a parte aérea.....	20

Pesquisas com FBN na Embrapa Algodão .....	20
Nodulação, trocas gasosas e produção de amendoim cultivado com <i>Bradyrhizobium</i> em solos com diferentes texturas.....	20
Eficiência agrônômica de <i>Bradyrhizobium</i> em amendoim sob diferentes condições ambientais no Nordeste do Brasil .....	21
Caracterização molecular e simbiótica de <i>Bradyrhizobium</i> de amendoim da região semiárida do Brasil.....	22
É possível que inoculação com linhagens de <i>Bradyrhizobium</i> possa reduzir os efeitos do déficit hídrico em amendoim? .....	23
<i>Bradyrhizobium</i> spp. como atenuador do estresse por déficit hídrico em genótipos de amendoim rasteiro baseado em respostas fisiológicas e de expressão de genes .....	25
Efeito de fungicidas sobre a simbiose entre linhagens de <i>Bradyrhizobium</i> e amendoim.....	26
Considerações finais .....	27
Referências .....	27

## Introdução

O ar atmosférico contém 78% de nitrogênio (N), um dos nutrientes essenciais às plantas, na forma oxidada de  $N_2$ , que tem número atômico 7 e massa 14. Essa forma de N, indisponível ao metabolismo das plantas, precisa ser reduzida para ser assimilada aos esqueletos de carbono produzidos na fotossíntese. No entanto, nenhuma planta possui mecanismos bioquímicos que reduzam o  $N_2$ , pois a ligação tripla existente entre os dois átomos que formam a molécula é altamente forte, necessitando de um sistema enzimático bastante energético encontrado apenas em algumas bactérias que vivem no solo, em forma livre ou formando associações simbióticas com as raízes de algumas plantas (Masson-Boivin; Sachs, 2018).

A fixação do  $N_2$  atmosférico é denominada de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) e pode ser realizada pelas bactérias de vida livre, em associação ou simbiose com plantas, que fazem parte das chamadas bactérias promotoras de crescimento de plantas — BCPC.

Na tabela 1 estão descritos alguns tipos de bactérias que podem realizar essa fixação. Nesse contexto, é importante ressaltar que tanto a bactéria como a planta podem viver sozinhas, entretanto, quando estão em simbiose, as plantas suprem as bactérias com os produtos da fotossíntese e, em contrapartida, elas suprem as plantas com nitrogênio em forma assimilável pelo metabolismo vegetal (Taiz; Zeiger, 2016).

## Alguns exemplos de fixação biológica

### **Simbiose leguminosa x rizóbios (soja x *Bradyrhizobium* e feijão x *Rhizobium*)**

Atualmente, o Brasil é o maior produtor de soja (*Glycine max* L.) do mundo, com uma produção de 135,5 milhões de toneladas na safra 2021/22, sem gastos com fertilizantes nitrogenados, o que implica numa economia anual de mais de 10,3 bilhões de dólares (Conab, 2021).

Esse fato deve-se às pesquisas iniciadas no ano de 1963 pela engenheira-agrônoma Johanna Liesbeth Kubelka Döbereiner (1924 – 2000) no

**Tabela 1.** Exemplos de organismos de vida livre, em associação ou simbiose com plantas hospedeiras, que podem realizar a fixação biológica do nitrogênio.

Organismos Fixadores de N <sub>2</sub> de vida livre	
<i>Azotobacter</i>	<i>Methanococcus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Chromatium</i>
<i>Calothrix</i>	<i>Rhodospirillum</i>
<i>Clostridium</i>	Phyllobacterium
Derxia	
Organismos Fixadores de N <sub>2</sub>	Plantas Hospedeiras
Vida Livre ou Associação	
<i>Azospirillum</i>	Arroz, <i>Brachiaria</i> , Milho, Trigo
<i>Beijerinckia</i>	Cana-de-açúcar, <i>Paspalum</i>
<i>Burkholderia</i>	Arroz, Cana-de-açúcar, Mandioca, Milho
<i>Herbaspirillum</i>	Arroz, Cana-de-açúcar, Feijão, Milho, Trigo
<i>Klebsiella</i>	Arroz, Batata-doce, Milho, Trevo vermelho
Vida Livre ou Simbiose	
<i>Acetobacter</i>	Cana-de-açúcar
<i>Allorhizobium</i>	<i>Neptunia natans</i>
<i>Anabaena</i>	<i>Azolla</i>
<i>Azorhizobium</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	Amendoim, Caupe, Centrosema, Mucuna, Soja
<i>Cupriavidus</i>	<i>Mimosa</i>
<i>Devosia</i>	<i>Neptunia natans</i>
<i>Frankia</i>	<i>Alnus</i> , <i>Casuarina</i> , <i>Ceanothus</i> , <i>Datisca</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>Lotus corniculatus</i>
<i>Nostoc</i>	<i>Gunnera</i>
<i>Ochrobactrum</i>	<i>Acacia mangium</i>
<i>Photorhizobium</i>	<i>Aeschynomene</i>
<i>Rhizobium</i>	Ervilha, Feijão, Lentilha, Trevo
<i>Sinorhizobium</i>	Alfafa

Fonte: Adaptado de Taiz e Zeiger (2016).

Instituto de Ecologia e Experimentação Agrícola, hoje Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ. Ela pesquisou os aspectos limitantes da FBN em leguminosas tropicais, com espécies de bactérias que se associam às raízes da soja para fornecer o N às plantas (Tabela 1). Com o avanço das pesquisas, as espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* foram definitivamente estabelecidas como supridoras de todo o nitrogênio que a soja necessita para se desenvolver plenamente e produzir – 1 kg de N<sub>2</sub>/ha/dia (Hungria et al., 2007).

O sucesso da FBN para a soja está nos benefícios econômico e ambiental para o produtor e para a sociedade. Nessa perspectiva, a tecnologia desenvolvida pela Embrapa tornou mais baixo o custo de produção da cultura, refletindo em ganho econômico para o produtor ao mesmo tempo em que gera divisas para a União. Na esfera ambiental, as vantagens não são menos significativas, uma vez que, ao mesmo tempo em que o N é o nutriente mineral requerido em maior quantidade pelas plantas, os adubos nitrogenados são potenciais contaminantes do ar, do solo e das águas subterrâneas e superficiais, volatilizando-se facilmente quando fornecidos na forma de sais de amônio e lixiviando-se em direção ao lençol freático — quando fornecidos na forma de nitratos, devido à repulsão com as cargas negativas das argilas (Almeida et al., 2018; Silva Junior et al., 2019). Ademais, a FBN na cultura da soja abre um leque de perspectivas para a agricultura moderna, como a chamada agricultura de precisão, em que há uma união dessa prática milenar com tecnologias avançadas como drones, motores elétricos, sensores, softwares e estações meteorológicas (Hammerschmidt et al., 2021).

Outra associação útil de interesse comercial é a simbiose existente entre o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e as estirpes de *Rhizobium tropici* e *Rhizobium fleirei* (Tabela 1). No cenário atual, apesar de não suprir totalmente a cultura do feijão com nitrogênio, como na simbiose soja-rizóbio, pesquisas vêm sendo cada vez mais desenvolvidas no sentido de incrementar essa tecnologia tanto nas pequenas propriedades de agricultores familiares, como nas grandes, altamente tecnificadas e que visam altos rendimentos. Entretanto, algumas limitações têm que ser vencidas no país: poucos programas de melhoramento genético visam aperfeiçoar essa simbiose; a grande sensibilidade das estirpes de *Rhizobium* a estresses ambientais; e a ineficiência desses rizóbios no solo em fixar o N<sub>2</sub> atmosférico, embora seja bastante eficiente em formar nódulos (Hungria et al., 2013).

## **Simbiose *Alnus x Frankia***

Um outro tipo muito comum de simbiose para a FBN ocorre entre plantas actinorrízicas e bactérias do solo do gênero *Frankia* (Tabela 1). Entre esses tipos de plantas, está o gênero *Alnus*. As bactérias do gênero *Frankia*, assim como os rizóbios, formam nódulos nas raízes da planta hospedeira por ocasião da simbiose. Como exemplo, temos a árvore amieiro (*Alnus glutinosa* L.), que, em associação simbiótica com a bactéria *Frankia alni*, fixa o N<sub>2</sub> atmosférico, tornando-o disponível à planta (Pujic et al., 2022).

## **Simbiose *Gunnera x Nostoc***

No caso das plantas do gênero *Gunnera*, herbáceas nativas da América do Sul, a FBN não ocorre nas raízes, e sim em glândulas no caule, as quais são formadas independentemente da presença das bactérias. Dessa forma, os procarióticos do gênero *Nostoc* (Tabela 1), que são cianobactérias, irão se associar a essas glândulas para fixar o nitrogênio do ar; em troca, a planta dispõe à bactéria os fotoassimilados produzidos na fotossíntese (Parniske, 2018).

## **Simbiose *Azolla x Anabaena***

A simbiose entre plantas do gênero *Azolla*, que são pteridófitas aquáticas, e a cianobactéria *Anabaena* (Tabela 1) resulta em uma taxa de assimilação de N atmosférico de 0,5 kg de N<sub>2</sub>/ha/dia (Taiz; Zeiger, 2016). Sob condições aeróbicas, os filamentos de bactérias produzem células especializadas denominadas heterocistos, que têm paredes celulares espessas para controlar a entrada de O<sub>2</sub> no citoplasma. Já sob condição anaeróbica, a *Anabaena* não precisa produzir os heterocistos para a fixação do N<sub>2</sub>. Entretanto, nos dois casos, o nitrogênio só é fixado quando o solo está ausente ou com baixa concentração desse nutriente, representando uma forma de adaptação a essa condição adversa (Kumar et al., 2019). Dessa forma, o complexo simbiótico *Azolla x Anabaena* tem sido bastante utilizado como forma de fornecer nitrogênio às plantas de arroz em países asiáticos (Gunawardana, 2020), tendo grande potencial para substituir a adubação nitrogenada nos campos de arroz do nosso país, contanto que pesquisas sejam direcionadas nesse sentido (Melém Júnior et al., 2003).

## Simbiose cana-de-açúcar x *Acetobacter diazotrophicus*

As gramíneas também podem estabelecer relações simbióticas com organismos fixadores de  $N_2$  atmosférico, mas, nesse caso, não há produção de nódulos: as bactérias colonizam os tecidos vegetais ou se ancoram na superfície das raízes, principalmente nas proximidades das zonas de alongamento e nos pelos radiculares (Marques et al., 2017). Por exemplo, a bactéria *Acetobacter diazotrophicus* vive no apoplasto do caule da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), podendo supri-la com nitrogênio fixado simbioticamente da atmosfera o suficiente para garantir a sua independência dos fertilizantes nitrogenados (Pereira et al., 2019). As Figuras 1 e 2 mostram, respectivamente, as fotos de um campo de cana-de-açúcar e da bactéria *Acetobacter diazotrophicus*, vivendo no apoplasto do caule da cana-de-açúcar, como vista ao microscópio.

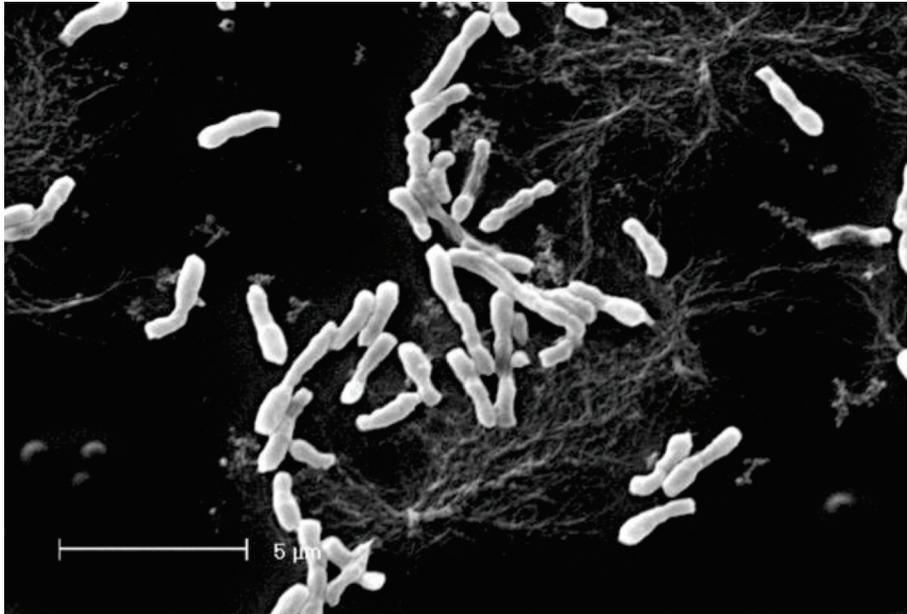
Foto: Cesar José da Silva



**Figura 1.** Campo cultivado com cana-de-açúcar em interação com bactérias fixadoras de nitrogênio *Acetobacter diazotrophicus*.

Fonte: Borges (2021).

Foto: Aline Vieira de Matos Macedo



**Figura 2.** Bactéria *Acetobacter diazotrophicus* no apoplasto do caule da cana-de-açúcar.

Fonte: Macedo (2017).

A simbiose entre a bactéria endofítica *Acetobacter diazotrophicus* e a cana-de-açúcar foi descoberta em 1988 pela pesquisadora Johanna Döbereiner na Embrapa Agrobiologia em Seropédica, no estado do Rio de Janeiro. Desde então, a Embrapa tem desenvolvido várias pesquisas para comprovar a eficácia da *A. diazotrophicus* em suprir nitrogênio atmosférico à cana-de-açúcar, obtendo resultados bastante promissores para o produtor, tanto na redução dos custos com fertilizantes como na diminuição do impacto ambiental associado à fabricação e uso destes (Reis et al., 2009; Procópio et al., 2013; Ferreira et al., 2015; Neves et al., 2017; Santos et al., 2022).

## **Associação Milho x *Azospirillum***

O estudo da associação entre bactérias do gênero *Azospirillum* e gramíneas foi iniciado pela pesquisadora Johanna Döbereiner no ano de 1974. A partir daí, várias pesquisas foram realizadas com a cultura do milho (*Zea mays* L.) em associação com as espécies *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasilense*

(Fukami et al., 2016; Carvalho et al., 2017; Feitosa et al., 2017; Capristo et al., 2019; Magalhães et al., 2019), desde a seleção de estirpes eficientes na FBN até o desenvolvimento de técnicas de inoculação, até que, no ano de 2004, a tecnologia foi oficialmente lançada por um grupo de pesquisa da Embrapa Soja, em Londrina, PR, coordenado pela pesquisadora Mariângela Hungria.

Em 2009, foi lançado, em parceria com a empresa Total Biotecnologia, o primeiro produto comercial para inoculação, o Azotal, o qual teve grande aceitação pelos produtores de milho de todas as regiões do país, pela redução dos custos com fertilizantes nitrogenados e aumento da produtividade. Segundo Hungria (2011), o N fixado pela *Azospirillum* não substitui completamente a adubação nitrogenada, mas pode aumentar a produção de milho em até 30% em relação ao controle não inoculado, podendo proporcionar uma economia de 2 bilhões de dólares por ano ao país. Na cultura do trigo (*Triticum aestivum* L.), a tecnologia pode aumentar a produção em até 18% em relação ao controle, segundo Hungria (2011). Souza (2019) diz que o inoculante reduziu o uso de nitrogênio em 20 kg/ha e aumentou a produtividade do milho em 104% (Figura 3).



Foto: Inocência Junior de Oliveira

**Figura 3.** À esquerda - Milho inoculado com *Azospirillum* + adubação de cobertura; À direita - Milho sem inoculação + adubação de cobertura.

Fonte: Souza (2019).

O gênero *Azospirillum* inclui bactérias de vida livre que proporcionam benefícios devido à capacidade de colonizar os tecidos externos e internos dos vegetais, notadamente das raízes, fixando o  $N_2$  atmosférico, produzindo fitormônios como auxinas, giberelinas e citocininas, solubilizando fosfato, atuando como agente de controle biológico e aumentando a tolerância a estresses abióticos (Vendruscolo; Lima, 2021). Ao contrário das bactérias simbióticas, as associativas como o *Azospirillum* excretam somente uma parte do nitrogênio fixado diretamente à planta associada. Posteriormente, após a morte e mineralização, essas bactérias podem contribuir com aportes adicionais. Dessa forma, o processo supre apenas parcialmente as necessidades em N das plantas (Fukami et al., 2018).

## A fixação do nitrogênio atmosférico

Como já mencionado, a fixação do nitrogênio atmosférico –  $N_2$  – envolve a quebra da ligação tripla existente entre dois átomos desse elemento, e isso requer uma grande quantidade de energia (Masson-Boivin; Sachs, 2018). Quando feito industrialmente, através da síntese de Haber-Bosch, o processo necessita de um elevado aporte de combustíveis fósseis, um ambiente de altas temperatura e pressão e a presença de um metal catalisador, geralmente o ferro. Daí a importância da FBN, que é feita por meio de uma enzima denominada nitrogenase, presente em todos os organismos fixadores de N (Kaba et al., 2019).

Na FBN, elétrons devem ser transferidos ao  $N_2$  para que possa ser reduzido e aí então ficar apto a ser incorporado nos hidrocarbonetos formados na fotossíntese (Dey et al., 2021). Na fixação industrial, usa-se o ferro reduzido para doar esses elétrons (Zhang et al., 2022); na FBN, cabe à nitrogenase essa doação (Einsle; Rees, 2020). Como o oxigênio é um aceptor de elétrons mais forte que o nitrogênio, pode danificar os sítios da nitrogenase, inativando-a irreversivelmente. Daí a necessidade de a FBN ocorrer, obrigatoriamente, sob anaerobiose (Van Langenhove et al., 2019). Dessa forma, cada organismo fixador, ou deve estar sob condição anaeróbica natural ou, se estiver sob condição aeróbica, deve criar um ambiente interno livre de oxigênio, como vimos no caso da simbiose *Azolla* x *Anabaena*, em que são formados heterocistos (Kumar et al., 2019).

## 2.1. Os nódulos

A simbiose entre as bactérias fixadoras de nitrogênio e a planta hospedeira ocorre no interior de estruturas especializadas denominadas de nódulos (Thal et al., 2018). No caso da simbiose *Gunnera x Nostoc*, os nódulos ocorrem em glândulas no caule; já no caso da simbiose leguminosa x rizóbio, os nódulos são formados nas raízes e, no caso das gramíneas, não há formação de nódulos. A Figura 4, a seguir, mostra nódulos contendo *Rhizobium* em raízes de feijão (Hungria et al., 2013).



Foto: Fábio Martins Mercante

**Figura 4.** Nódulos contendo *Rhizobium* em raiz de feijão.

Fonte: Hungria et al. (2013).

Como a nitrogenase é irreversivelmente inativada pelo  $O_2$ , a permeabilidade do ar atmosférico para dentro dos nódulos deve ser regulada a nível tal que os rizóbios possam respirar, mas ao mesmo tempo a enzima não seja desnaturada (Van Langenhove et al., 2019). Para isso, os nódulos possuem uma proteína férrica denominada leg-hemoglobina, que contém um baixo  $K_m$ , ou seja, uma alta afinidade pelo oxigênio. Dessa forma, a cor rosada no interior dos nódulos significa que as bactérias estão respirando ativamente e, ao mesmo tempo, fixando  $N_2$  (Jiang et al., 2021).

## O estabelecimento da simbiose

A simbiose entre as plantas e as bactérias não é obrigatória: os simbiontes podem viver independentes um do outro. Entretanto, sob deficiência de nitrogênio no solo, eles se procuram por meio de uma elaborada troca de sinais químicos. Dessa forma, a planta, ao sentir a falta de N nos seus tecidos, secreta, por meio das raízes, alguns atrativos químicos, em especial flavonoides e betaínas (Phillips et al., 1992). Ao encontrar no solo esses atrativos químicos, as bactérias irão produzir os chamados Fatores Nod, que são moléculas sinalizadoras formadas por oligossacarídeos de lipoquitina (Fernandez-Göbel et al., 2019). Cada espécie de planta hospedeira responde a um Fator Nod específico. Nas raízes das plantas, encontram-se receptores para os Fatores Nod. No caso das leguminosas, esses receptores são lectinas produzidas nos pelos radiculares, as quais serão ativadas por Fatores Nod para facilitar a ligação dos rizóbios com a parede celular das raízes (Coninck; Van Damme, 2021).

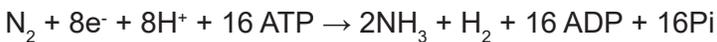
## A formação dos nódulos

Ao se ligar aos pelos radiculares, os rizóbios, por intermédio dos Fatores Nod, provocam um enrolamento do pelo, aglutinando-se no interior. Em seguida, os Fatores Nod vão provocar a degradação da parede celular até que os rizóbios cheguem à superfície externa da membrana plasmática, e comecem a empurrá-la para dentro da célula, formando um canal de infecção, com a ajuda de vesículas derivadas do complexo de Golgi. Esse canal progride radialmente pelas células corticais das raízes até chegar próximo do xilema, no qual vai haver uma 'desdiferenciação' das células-alvo, voltando a se dividirem para formar o primórdio nodular.

Em seguida, os rizóbios vindos do canal de infecção se instalarão no primórdio radicular, onde começam a se dividir, envolvidos pela membrana formada durante a penetração radial, fundida com as membranas da célula-alvo — plasmática e do complexo de Golgi. Depois de atingirem o número necessário de células para formar o nódulo, cessa-se a divisão e começa o aumento do volume celular para formar o denominado bacterioide — organelas endossimbióticas fixadoras de nitrogênio —, vizinho a um vaso xilemático, no qual a membrana que o envolve passa a se chamar membrana peribacterioide. É na interface bacterioide-xilema que vai ocorrer a troca entre os açúcares produzidos pela fotossíntese, disponibilizados pela planta, e o  $N_2$  fixado, disponibilizado pelos rizóbios. Além disso, os nódulos ainda terão, ao final do processo, uma camada de células especializadas em controlar a entrada de  $O_2$  (Darnajoux et al., 2017; Scheifele et al., 2017; Akter et al., 2018; Thal et al., 2018; Carvalho et al., 2019; Zheng et al., 2019).

## A enzima nitrogenase

A fixação biológica do  $N_2$  é feita por meio da enzima nitrogenase, que catalisa a mesma reação da fixação industrial:



Essa enzima possui duas subunidades que não têm atividades separadas uma da outra: uma Fe-proteína e uma MoFe-proteína, ambas irreversivelmente inativadas pelo  $O_2$  (Einsle; Rees, 2020).

Na redução do  $N_2$  a  $NH_3$ , a ferredoxina das raízes doa oito elétrons para a Fe-proteína que, por sua vez, muda de conformação com a ajuda de 16 ATPs, os quais são hidrolisados, e passa os elétrons para a MoFe-proteína, que se reduz e doa finalmente os elétrons para o  $N_2$  e o  $H^+$ , transformando-os em  $NH_3$  e  $H_2$  (Ivleva et al., 2016). Além de reduzir o  $N_2$  e o  $H^+$  *in vivo*, a nitrogenase também é capaz de reduzir, *in vitro*, acetileno a etileno, e essa reação é usada para medir a atividade da enzima em laboratório (Seefeldt et al., 2020).

O processo de redução de  $H^+$  a  $H_2$  compete com a redução de  $N_2$  a  $NH_3$ . Em rizóbios metabolicamente ativos, essa redução de prótons pode consumir de 30% a 60% do ATP disponível para a atividade da nitrogenase, diminuindo a

eficiência na fixação do nitrogênio. Para sanar esse problema, alguns rizóbios desenvolveram evolutivamente uma enzima denominada hidrogenase, que cliva o  $H_2$  e recicla os elétrons para a redução do  $N_2$  (Baginsky et al., 2002).

## Transporte de nitrogênio para a parte aérea

A  $NH_3$  é formada nos rizóbios, mas, antes de ser transportada via xilema para a parte aérea, deve ser convertida em formas orgânicas, uma vez que a amônia é altamente tóxica às células vegetais. Nas leguminosas de clima tropical — como, por exemplo, feijão, caupi, soja e amendoim —, a análise da seiva xilemática indica que essas plantas exportam nitrogênio na forma de ureídeos. Já as leguminosas de clima temperado — como, por exemplo, ervilha, lentilha, grão-de-bico e trevo —, são exportadoras de amidas (Schwember et al., 2019).

## Pesquisas com FBN na Embrapa Algodão

A Embrapa Algodão, Unidade Descentralizada da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, sediada em Campina Grande, PB, tem realizado, em parceria com várias instituições de ensino e pesquisa, algumas investigações com FBN na cultura do amendoim (Melo et al., 2016; Sizenando et al., 2016; Santos et al., 2017; Barbosa et al., 2018; Brito et al., 2019; Santos et al., 2021).

### **Nodulação, trocas gasosas e produção de amendoim cultivado com *Bradyrhizobium* em solos com diferentes texturas**

Melo et al. (2016) investigaram a resposta de três genótipos de amendoim — BR 1, BRS Havana e BRS L7 Bege — à inoculação com *Bradyrhizobium* [estirpe comercial BR 1405 (SEMIA 6144)] em solo de textura média, nas condições do Semiárido da Paraíba. Os autores concluíram que a cultivar que respondeu melhor à nodulação foi a BRS Havana (Tabela 2), sendo, dos três genótipos de amendoim testados, o mais indicado para as condições semiáridas quando inoculados por meio das suas sementes. Nas outras cultivares, a inoculação com SEMIA 6144 não promoveu benefícios consideráveis e não se faz necessário incorporar ao manejo.

**Tabela 2.** Número de nódulos nas raízes de genótipos de amendoim crescidos em solo de textura média.

Genótipos	Controle	Sam	<i>Bradyrhizobium</i>
BR 1	180 Ac	166 Bc	159 Bc
BRS Havana	215Cb	258 Ba	275 Aa
L7 Bege	389 Aa	229 Bb	225 Bb
Média	261	218	220
Coeficiente de variação (%)		23,6	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na horizontal (fontes de N), e de mesma letra minúscula, na vertical (genótipos), não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Sam: sulfato de amônia.

Fonte: Melo et al. (2016).

## Eficiência agronômica de *Bradyrhizobium* em amendoim sob diferentes condições ambientais no Nordeste do Brasil

Sizenando et al. (2016) estudaram dois genótipos de amendoim (BR 1 e L7 Bege) inoculados com duas linhagens de *Bradyrhizobium* (SEMIA 6144 e ESA 123) ou adubados com fertilizante nitrogenado, em três localidades diferentes do Nordeste brasileiro (zona rural das cidades de Abreu e Lima, PE; Campina Grande, PB; e Barbalha, CE, sendo a primeira de clima tropical e as duas últimas de clima semiárido), baseando-se no pressuposto de que a eficiência da associação leguminosa-rizóbio depende dos genótipos da planta e da bactéria e das condições ambientais. Conforme os dados da Tabela 3, o melhor ambiente para a produção de amendoim foi o semiárido de Barbalha, CE; o genótipo que proporcionou a melhor produção de vagens foi o L7 Bege; e a melhor fonte de N para inoculação de sementes de amendoim foi a estirpe ESA 123, a qual os autores indicam para futuros experimentos que objetivem desenvolver inoculantes comerciais recomendados para o cultivo da oleaginosa na região do Nordeste brasileiro.

**Tabela 3.** Média do peso de vagens de genótipos de amendoim crescidos em três ambientes do Nordeste brasileiro, sob quatro fontes de N.

Peso de vagens (g/planta)	
<b>Ambiente (A)</b>	
A1 – Abreu e Lima, PE	36,19 b
A2 – Campina Grande, PB	38,07 b
A3 – Barbalha, CE	46,87 a
<b>Genótipos (G)</b>	
G1 – BR 1	35,86 b
G2 – L7 Bege	44,85 a
<b>Fonte de nitrogênio (N)</b>	
N1 – Sem nitrogênio	31,50 b
N2 – Adubação nitrogenada	40,52 ab
N3 – ESA 123	45,02 a
N4 – SEMIA 6144	44,42 a
Média	40,38
Coeficiente de variação (%)	18,1

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Fonte: Sizenando et al. (2016).

## Caracterização molecular e simbiótica de *Bradyrhizobium* de amendoim da região semiárida do Brasil

Santos et al. (2017) avaliaram as relações filogenéticas de *Bradyrhizobium* de amendoim dos solos do Semiárido brasileiro pela análise de sequência dos genes 16S rRNA, *recA*, *nodC* e *nifD* e pela performance simbiótica. Para o estudo, amostras de solo foram coletadas em dois municípios do Semiárido: Barbalha, CE, em solo cultivado com amendoim, e Juazeiro, BA, em solo coberto com *Arachis triseminata* nativo. A importância dessa pesquisa reside no fato de a planta de amendoim ser uma leguminosa nativa da América do Sul e amplamente cultivada no mundo.

Além do mais, é bem adaptada às condições edafoclimáticas desfavoráveis do Semiárido brasileiro, onde é plantada principalmente por pequenos agricultores. Dessa forma, a seleção de novos isolados é importante para entender sua ecologia e aumentar a taxa de N fixado e a produção. Os resulta-

dos revelaram que os isolados bacterianos dos solos de Juazeiro e Barbalha foram classificados dentro do clado *B. japonicum* com bactérias próximas a *B. yuanmingense*, *B. kavangense* e *B. guangxiensis*, indicando altas taxas de transferência horizontal entre os *Bradyrhizobium* dos solos do Semiárido. Além disso, conforme demonstrado na Tabela 4, houve grande eficiência na simbiose dos isolados, em especial o ESA 83.

**Tabela 4.** Massa seca total (MST) e concentração de nitrogênio na parte aérea ( $[N]_{PA}$ ) de amendoim (*Arachis hypogaea* cv. BR1) aos 63 dias após a emergência das plântulas em um experimento de casa de vegetação sob condições controladas. Os dados são advindos da média de quatro repetições.

Tratamento de inoculação	MST (g.planta <sup>-1</sup> )	$[N]_{PA}$ (mg N.g planta <sup>-1</sup> )
ESA 81	4,62 a	20,52 b
ESA 82	4,61 a	18,62 c
ESA 83	5,45 a	24,08 b
ESA 85	3,96 b	18,10 c
ESA 86	3,72 b	21,78 b
ESA 87	3,45 b	21,28 b
ESA 123	5,82 a	22,52 b
SEMIA 6144	4,39 a	21,74 b
Nitrogênio mineral	5,08 a	37,60 a
Controle absoluto	2,35 b	19,86 d
Coefficiente de variação (%)	9,8	5,3

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Santos et al. (2017).

## É possível que inoculação com linhagens de *Bradyrhizobium* possa reduzir os efeitos do déficit hídrico em amendoim?

Barbosa et al. (2018) avaliaram se os efeitos do déficit hídrico em amendoim poderiam ser reduzidos com uso de linhagens de *Bradyrhizobium*. No experimento, três genótipos de amendoim — BRS Havana, CNPA 76 AM e 2012-4 — submetidos à inoculação com as estirpes de rizóbio SEMIA 6144 e ESA 123, sob dois regimes hídricos (com e sem irrigação) foram testados.

Os dados da Tabela 5 sugerem efeitos benéficos da simbiose amendoim-*Bradyrhizobium* sob condições de déficit hídrico, especialmente quando se utiliza a linhagem ESA 123, que é nativa da região semiárida. Dessa forma, nas condições adversas de clima e solo que configuram esse bioma, quente e seco a maior parte do ano, a cultura do amendoim associada à catalase inoculação com a linhagem de *Bradyrhizobium* ESA 123 se constitui em uma alternativa agrícola, notadamente no que diz respeito à produção sustentável.

**Tabela 5.** Médias e percentagens de redução para atividade das enzimas catalase e ascorbato peroxidase e teor de prolina dos genótipos de amendoim CNPA 76 AM, BRS Havana e 2012-4 submetidos a estresse hídrico.

Tratamentos	Catalase ( $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína $^{-1}$ )			Ascorbato Peroxidase ( $\mu\text{mol de ascorbato} \cdot$ $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ ) ( $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína $^{-1}$ )			Prolina ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ de matéria fresca)		
	S/E	C/E	(%)	S/E	C/E	(%)	S/E	C/E	(%)
<b>CNPA 76 AM</b>									
SEMIA 6144	0,45 Bc	0,77 Aa	71	14,18 Ba	19,57 Aa	38	0,19 Ba	0,28 Aa	47
ESA 123	0,60 Ab	0,48 Bb	-20	26,84 Aa	20,50 Aa	-24	0,15 Aa	0,16 Ab	7
C/N	0,86 Aa	0,86 Aa	0	16,18 Ba	16,90 Ba	4	0,16 Ba	0,28 Aa	75
S/N	0,78 Ab	0,85 Aa	9	15,88 Aa	15,88 Ba	-35	0,21 Aa	0,29 Aa	38
<b>BRS Havana</b>									
SEMIA 6144	0,64 Bb	0,86 Ab	34	22,20 Aa	23,32 Ab	5	0,13 Bb	0,29 Aa	123
ESA 123	0,57 Ab	0,33 Bc	-42	13,88 Ab	9,50 Bc	-32	0,15 Ba	0,26 Aa	73
C/N	0,75 Aa	0,34 Bc	-55	18,52 Ba	25,49 Ab	37	0,18 Aa	0,19 Aa	5
S/N	0,34 Bc	1,23 Aa	262	11,85 Bb	33,52 Aa	190	0,19 Ba	0,23 Aa	21
<b>2012-4</b>									
SEMIA 6144	0,71 Ba	1,15 Aa	70	21,51 Aa	23,49 Aa	9	0,20 Ba	0,26 Aa	30
ESA 123	0,56 Ba	0,86 Ab	53	21,87 Aa	15,91 Bb	-27	0,22 Ba	0,29 Aa	32
C/N	0,45 Bb	0,93 Aa	106	23,50 Aa	24,82 Aa	6	0,15 Bb	0,29 Aa	93
S/N	0,37 Bb	0,75 Ab	102	21,22 Ba	25,15 Aa	18	0,13 Bb	0,30 Aa	130

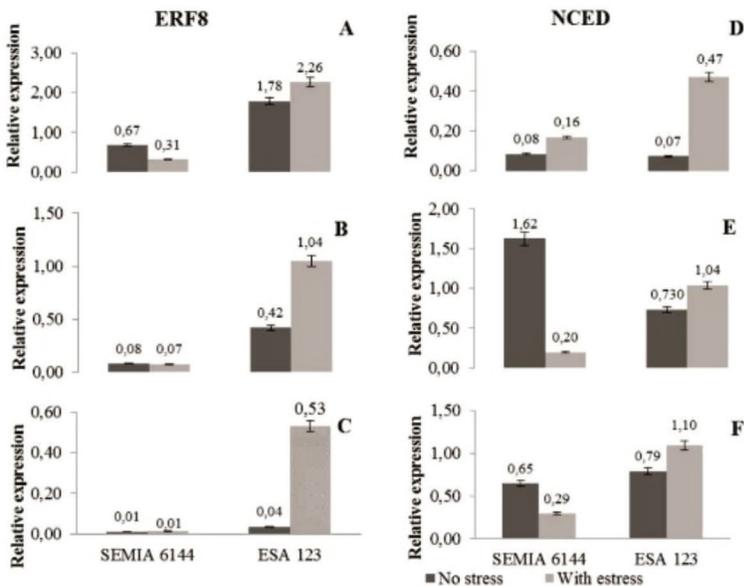
As letras maiúsculas comparam as médias nas linhas entre os dois regimes hídricos e, as minúsculas, nas colunas, os tratamentos dentro do mesmo regime hídrico (Teste de Tukey a 5% de probabilidade).

S/E – sem estresse; C/E – com estresse; C/N – com nitrogênio; S/N – sem nitrogênio

Fonte: Barbosa et al. (2018).

## ***Bradyrhizobium* spp. como atenuador do estresse por déficit hídrico em genótipos de amendoim rasteiro baseado em respostas fisiológicas e de expressão de genes**

Brito et al. (2019) investigaram a interação de *Bradyrhizobium* com genótipos de amendoim para mitigar os efeitos negativos da seca. Para isso, eles analisaram a ação de duas linhagens de *Bradyrhizobium* (ESA 123 e SEMIA 6144) sobre três genótipos de amendoim rasteiro (IAC Runner 886, 2012-33 e 2012-47). Os genótipos inoculados com ESA 123 foram superiores sob condição de déficit (Figura 5), baseado na expressão relativa dos genes *ERF8* e *NCED*, sugerindo um papel-chave desse inoculante na ativação de cascatas metabólicas que levam à proteção da planta sob falta d'água nos seus tecidos. Infere-se daí que a linhagem de *Bradyrhizobium* ESA 123 representa um grande potencial para que a cultura do amendoim enfrente as condições climáticas adversas do Semiárido do Nordeste brasileiro. Os autores concluíram que as plantas inoculadas com *Bradyrhizobium* foram as mais habilitadas em mitigar os efeitos do déficit hídrico.



**Figura 5.** Quantificação relativa da expressão dos genes *ERF8* e *NCED* em genótipos de amendoim inoculados com *Bradyrhizobium* e sob condição de déficit hídrico. A e D- IAC Runner 886; B e E-2012-33; C e F-2012-47.

## Efeito de fungicidas sobre a simbiose entre linhagens de *Bradyrhizobium* e amendoim

Santos et al. (2021) investigaram se o tratamento de sementes com fungicidas, uma prática importante para o controle de fitopatógenos na cultura do amendoim, poderia prejudicar a FBN. Para este fim, eles conduziram um experimento em casa de vegetação utilizando a cv. de amendoim BR 1 submetida a duas combinações de fungicidas [C1: carboxin (200 g L<sup>-1</sup>) + tiram (200 g L<sup>-1</sup>); C2: pyraclostrobin (25 g L<sup>-1</sup>) + thiophanate methyl (225 g L<sup>-1</sup>) + fipronil (250 g L<sup>-1</sup>)] e uma testemunha sem fungicida, dois inoculantes à base de *Bradyrhizobium* spp. (SEMIA 6144 e ESA 123) e uma testemunha com fonte química nitrogenada (nitrato de amônio). Os autores concluíram que a combinação C2 foi a menos tóxica ao *Bradyrhizobium*, proporcionando maior FBN. Com relação aos inoculantes, ESA 123 mostrou-se o melhor quando as sementes são tratadas com fungicidas (Tabela 6). Pesquisas sobre o efeito de fungicidas ou uma mistura destes para o controle de fitopatógenos em leguminosas tropicais são de grande importância pela susceptibilidade dessas plantas a fungos que causam doenças e diminuem a produção em quantidade

**Tabela 6.** Valores médios para número de nódulos e massa seca de nódulos e percentagem de interação entre os tratamentos com fungicidas, fontes de nitrogênio e número de inoculações.

Tratamento	Número de nódulos				Massa seca dos nódulos (g)			
	SEMIA 6144	(%) <sup>(a)</sup>	ESA 123	(%)	SEMIA 6144	(%)	ESA 123	(%)
<b>Uma inoculação</b>								
Sem fungicida	30,00 Aa <sup>(b)</sup>		25,66 Aa		0,028 Aa		0,034 Aa	
C1 <sup>(c)</sup>	8,33 Ab	- 72	8,00 Ab	- 68	0,008 Ab	- 71	0,009 Ab	- 73
C2 <sup>(d)</sup>	23,00 Aa	- 23	27,00 Aa	8	0,031 Aa	10	0,029 Aa	- 14
<b>Duas inoculações</b>								
Sem fungicida	46,00 Aa		20,00 Ba		0,039 Aa		0,027 Ba	
C1	12,00 Ab	- 74	11,33 Aa	- 43	0,028 Aa	- 28	0,018 Ba	- 33
C2	21,00 Ab	- 54	19,00 Aa	- 5	0,030 Aa	- 23	0,023 Aa	- 14

<sup>(a)</sup>Percentagem em relação ao tratamento sem fungicida; <sup>(b)</sup>Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na linha, e de mesma letra minúscula, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a de 5% de probabilidade; <sup>(c)</sup>C1: carboxin (200 g L<sup>-1</sup>) + tiram (200 g L<sup>-1</sup>); <sup>(d)</sup>C2: pyraclostrobin (25 g L<sup>-1</sup>) + thiophanate methyl (225 g L<sup>-1</sup>) + fipronil (250 g L<sup>-1</sup>).

e qualidade. Assim sendo, a cultivar de amendoim BR 1, quando tratada com a combinação de fungicidas pyraclostrobin (25 g L<sup>-1</sup>) + thiophanate methyl (225 g L<sup>-1</sup>) + fipronil (250 g L<sup>-1</sup>) e inoculada com a estirpe de *Bradyrhizobium* ESA 123, tem potencial para maior nodulação na presença da substância química exógena, o que melhorará sua nutrição nitrogenada.

## Considerações finais

A FBN é um importante mecanismo biológico que alguns organismos procarionóticos em simbiose com algumas plantas possuem de retirar o nitrogênio do ar atmosférico e disponibilizar às plantas para a fabricação dos tecidos vegetais. Com isso, há uma diminuição no uso de fertilizantes químicos, contribuindo para uma agricultura mais sustentável.

Dessa forma, é importante que haja investimentos para que a Embrapa desenvolva cada vez mais pesquisas relacionadas a essa ferramenta biológica, especialmente no bioma Semiárido, para que outras *commodities*, a exemplo do que ocorreu com a cultura da soja, possam eliminar 100% do uso de nitrogênio industrial, contribuindo também para a redução dos custos de produção.

Nessa perspectiva, os benefícios dessa tecnologia já têm avançado nas culturas do feijão, cana-de-açúcar, milho, arroz, trigo e *Brachiaria* spp. Na Embrapa Algodão, em particular, o amendoim está sendo contemplado mediante pesquisa com diferentes inoculantes, buscando os benefícios ambientais e econômicos proporcionados pela tecnologia com microrganismos benéficos.

Futuras pesquisas com essa temática devem contemplar, por exemplo, a seleção de linhagens de bactérias mais eficientes no processo de FBN, as relações simbióticas mais apropriadas, o desenvolvimento de veículos apropriados para a comercialização das estirpes e aperfeiçoamentos nos métodos de inoculação.

## Referências

AKTER, Z.; PAGANI, B. B.; LUPWAYI, N. Z.; BALASUBRAMANIAN, P. M.; WILLENBORG, C. Biological nitrogen fixation by irrigated dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 98, n. 5, p. 1159-1167, 2018.

- ALMEIDA, A. M. M.; MENDES FILHO, P. F.; GARCIA, K. G. V.; GOMES, V. F. F.; ALMEIDA, C. L. Density, characterization and efficiency of Nitrogen fixing bacteria in areas of degraded caatinga. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 13, n. 1, p. 16-21, 2018.
- BAGINSKY, C.; BRITO, B.; IMPERIAL, J.; PALACIOS, J. M.; RUIZ-ARGÜESO, T. Diversity and evolution of hydrogenase systems in rhizobia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4915-4924, 2002.
- BARBOSA, D. D.; BRITO, S. L.; FERNANDES, P. P.; FERNANDES-JUNIOR, P. I.; LIMA, L. M. Can *Bradyrhizobium* strains inoculation reduce water deficit effects on peanuts? **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 87, p. 1-11, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-018-2474-z>. Acesso em: 7 jan. 2022.
- BORGES, S. Z. “Preparo do solo e nutrição de plantas” foi tema do 2º Seminário CanaMS 2021. Brasília: Embrapa, 2021. Disponível em: [https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/64971958/preparo-do-solo-e-nutricao-de-plantas-foi-tema-do-2-seminario-cana-ms-2021?p\\_auth=VxipyB1u](https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/64971958/preparo-do-solo-e-nutricao-de-plantas-foi-tema-do-2-seminario-cana-ms-2021?p_auth=VxipyB1u). Acesso em: 23 dez. 2021.
- BRITO, S. L.; SANTOS, A. B.; BARBOSA, D. D.; FERNANDES, P. D.; FERNANDES-JUNIOR, P. I.; LIMA, L. M. *Bradyrhizobium* spp. as attenuators of water deficit stress in runner peanut genotypes based on physiological and gene expression responses. **Genetics and Molecular Research**, v. 18, n. 4, gmr18379, 2019. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/204000/1/Bradyrhizobium-spp.-as-attenuators-of-water-2019.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2022.
- CAPRISTO, D. P.; FACHINELLI, R.; ABREU, H. K. A.; MAGALHÃES, L. S.; CECCON, G. Inoculação com *Azospirillum brasilense* em milho solteiro e consorciado com braquiária em solo arenoso e argiloso. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 15., 2019, Jataí, GO. **Desafios no cultivo do milho safrinha**: resumos expandidos. Jataí, GO: UFG, 2019. p. 264-269. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/209309/1/MS-p.-264.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2022.
- CARVALHO, B. R.; SILVA, T. R.; SANTOS, J. M. R.; NASCIMENTO, R. C.; NÓBREGA, R. S. A.; FERNANDES JUNIOR, P. I. Eficiência agrônômica de novas bactérias diazotróficas isoladas do milho (*Zea mays* L.). In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMIÁRIDO, 12., 2017, Petrolina. **Anais...** Petrolina: Embrapa Semiárido, 2017. 7 p. 313-319. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/162202/1/Artigo.42.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2022.

CARVALHO, L. R.; PEREIRA, L. E. T.; HUNGRIA, M.; CAMARGO, P. B.; SILVA, S. C. Nodulation and biological nitrogen fixation (BNF) in forage peanut (*Arachis pintoi*) cv. Belmonte subjected to grazing regimes. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 278, p. 96-106, 2019.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília, v. 1, n. 1, 2021, 100 p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 20 dez. 2021.

CONINCK, T. de; VAN DAMME, E. J. M. Review: The multiple roles of plant lectins. **Plant Science**, v. 313, e111096, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945221002922>. Acesso em: 31 out. 2022.

DARNAJOUX, R.; ZHANG, X.; McROSE, D. L.; MIADLIKOWSKA, J.; LUTZONI, F.; KRAEPIEL, A. M. L.; BELLENGER, J-P. Biological nitrogen fixation by alternative nitrogenases in borealcyanolichens: importance of molybdenum availability and implications for current biological nitrogen fixation estimates. **New Phytologist**, v. 213, p. 680-689, 2017.

DEY, S.; AWATA, T.; MITSUSHITA, J.; ZHANG, D.; KASAI, T.; MATSUURA, N.; KATAYAMA, A. Promotion of biological nitrogen fixation activity of an anaerobic consortium using humin as an extracellular electron mediator. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 6567, 2021.

EINSLE, O.; REES, D. C. Structural Enzymology of Nitrogenase Enzymes. **Chemical Reviews**, v. 120, n. 12, p. 4969-5004, 2020.

FEITOSA, L. H. R.; OLIVEIRA NETO, A. C.; VOGADO, F. R.; FERNANDES JUNIOR, P. I.; LEITE, F. L. C.; SOUZA, H. A. *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada na biomassa do milho cultivado em condições de casa de vegetação. In: REUNIÃO NORDESTINA DE CIÊNCIA DO SOLO, 4.; SIMPÓSIO PIAUIENSE DE CIÊNCIA DO SOLO, 1., 2017, Teresina. **Uso sustentável do solo e segurança alimentar no Nordeste brasileiro – Anais**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2017. 1 p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/194051/1/Paulo-Ivan-2.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2022.

FERNANDEZ-GÖBEL, T. F.; DEANNA, R.; MUÑOZ, N. B.; ROBERT, G.; ASURMENDI, S.; LASCANO, R. Redox systemic signaling and induced tolerance Rresponses during soybean–*Bradyrhizobium japonicum* interaction: involvement of Nod Factor receptor and Autoregulation of nodulation. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 141, 2019.

FERREIRA, E. M.; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I. Análise do efeito do exopolissacarídeo de *Gluconacetobacter diazotrophicus* sobre o processo de colonização e estabelecimento em cana-de-açúcar pelas estirpes que compõem o inoculante de cana. In: SEMANA CIENTÍFICA JOHANNA DÖBEREINER, 15., 2015, Seropédica. **Solo, Ciência e vida**: caderno de resumos. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2015. 1 p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/140412/1/Analise-do-efeito-do-exopolissacarideo2534-11653-1-PB.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2023.

FUKAMI, J.; CERZINI, P.; HUNGRIA, M. Azospirillum: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB express**, v. 8, n. 73, p. 1-12, 2018.

FUKAMI, J.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Assessing inoculation methods of maize and wheat with Azospirillum brasilense. **AMB Express**, v. 6, n. 3, p. 1-13, 2016.

GUNAWARDANA, D. An in silico study of two transcription factors controlling diazotrophic fates of the Azolla major Cyanobiont Trichormus azollae. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 14, e1177932220977490, 2020. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1177932220977490>. Acesso em: 28 out. 2022.

HAMMERSCHMIDT, J. M.; CALÁBRIA, Z. K. P.; CREMONESI, M. V. Precision agriculture: soybean culture in South Brazil. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 20, n. 2, p. 97-111, 2021.

HUNGRIA, M. **Inoculação com Azospirillum brasiliense**: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36 p. (Embrapa Soja. Documentos, 325).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80 p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C.; MERCANTE, F. M. **Tecnologia de fixação biológica do nitrogênio com o feijoeiro**: viabilidade em pequenas propriedades familiares e em propriedades tecnificadas. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 32 p. (Embrapa Soja. Documentos, 338).

IVLEVA, N. B.; GROAT, J.; STAUB, J. N.; STEPHENS, M. Expression of active subunit of nitrogenase via integration into plant organelle genome. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. e0160951, 2016. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0160951>. Acesso em: 31 out. 2021.

JIANG, S.; JARDINAUD, M-F.; GAO, J.; PECRIX, Y.; WEN, J.; MYSORE, K.; XU, P.; SANCHEZ-CANIZARES, C.; RUAN, Y.; LI, Q.; ZHU, M.; LI, F.; WANG, E.; POOLE, P. S.; GAMAS, P.; MURRAY, J. D. NIN-like protein transcription factors regulate leghemoglobin genes in legume nodules. **Science**, v. 374, n. 6567, p. 625-628, 2021.

KABA, J. S.; ZERBE, S.; AGNOLUCCI, M.; SCANDELLARI, F.; ABUNIEWA, A. A.; GIOVANNETTI, M.; TAGLIAVINI, M. Atmospheric nitrogen fixation by gliricidia trees (*Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp.) intercropped with cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Plant and Soil**, v. 435, p. 323-336, 2019.

KUMAR, U.; NAYAK, A. K.; PANNEERSELVAM, P.; KUMAR, A.; MOHANTY, S.; SHAHID, M.; SAHOO, A.; KAVIRAJ, M.; PRIYA, H.; JAMBHULKAR, N. N.; DASH, P. K.; MOHAPATRA, S. D.; NAYAK, P. K. Cyanobiont diversity in six *Azolla* spp. and relation to *Azolla*-nutrient profiling. **Planta**, 249, p. 1435-1447, 2019.

MACEDO, A. V. M. **Estirpes bacterianas**. Brasília: Embrapa, 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-imagens/-/midia/4000003/estirpes-bacterianas>. Acesso em: 23 dez. 2021.

MAGALHÃES, L. S.; FACHINELLI, R.; CAPRISTO, D. P.; CECCON, G. Rotação de culturas e inoculação com *Azospirillum brasilense* no milho safrinha. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 15., 2019, Jataí, GO. **Desafios no cultivo do milho safrinha**: resumos expandidos. Jataí, GO: UFG, 2019. 6 p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/209333/1/MS-p.-357-362.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2022.

MARQUES, A. C. R.; OLIVEIRA, L. B.; NICOLOSO, F. T.; JACQUES, R. J. S.; GIACOMINI, S. J.; QUADROS, L. F. F. Biological nitrogen fixation in C4 grasses of different growth strategies of South America natural grasslands. **Applied Soil Ecology**, v. 113, p. 54-62, 2017.

MASSON-BOIVIN, C.; SACHS, J. L. Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia — the roots of a success story. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 44, p. 7-15, 2018.

MELÉM JÚNIOR, N. J.; MASCARENHAS, R. E. B.; MODESTO JUNIOR, M. S. **Efeito da época de incorporação de *Azolla* para o cultivo de arroz irrigado em Gleissolo, em Várzea do Rio Guamá – Estuário Amazônico**. Macapá: Embrapa Amapá, 2003. 13 p. (Embrapa Amapá. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 64).

MELO, E. B. S.; LIMA, L. M.; FERNANDES-JUNIOR, P. I.; AIDAR, S. T.; FREIRE, M. A.; FREIRE, R. M.; SANTOS, R. C. Nodulation, gas exchanges and production of peanut cultivated with *Bradyrhizobium* in soils with different textures. **Comunicata Scientiae**, v. 7, n. 2, p. 160-166, 2016.

NEVES, B. R. F.; FREITAS, K. M.; ROUWS, L. F. M.; SCHWAB, S.; BALDANI, J. I.; VIDAL, M. S. Efeito do exopolissacarídeo de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5) no processo de colonização e estabelecimento de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar. In: SEMANA CIENTÍFICA JOHANNA DÖBEREINER, 17., 2017, Seropédica. **Ciência e inovação transformando a sociedade – Resumos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2017. 1 p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/178779/1/Efeito-do-exopolissacarideo-de-Gluconacetobacter-.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2023.

PARNISKE, M. Uptake of bacteria into living plant cells, the unifying and distinct feature of the nitrogen-fixing root nodule symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 44, p. 164-174, 2018.

PEREIRA, W.; SOUSA, J. S.; SCHULTZ, N.; REIS, V. M. Sugarcane productivity as a function of nitrogen fertilization and inoculation with diazotrophic plant growth-promoting bacteria. **Sugar Tech**, v. 21, n. 1, p. 71-82, 2019.

PHILLIPS, D. A.; JOSEPH, C. M.; MAXWELL, C. A. Trigonelline and Stachydrine Released from Alfalfa Seeds Activate NodD2 Protein in *Rhizobium meliloti*. **Plant Physiology**, v. 99, n. 4, p. 1526-1531, 1992.

PROCÓPIO, S. O.; FERNANDES, M. F.; TELES, D. A.; SENA FILHO, J. G.; CARGNELUTTI FILHO, A.; VARGAS, L. Tolerância da bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus* a herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 4, p. 610-617, 2013.

PUJIC, P.; ALLOISIO, N.; MIOTELLO, G.; ARMENGAUD, J.; ABROUK, D.; FOURNIER, P.; NORMAND, P. The proteogenome of symbiotic *Frankia alni* in *Alnus glutinosa* nodules. **Microorganisms (Basel)**, v. 10, n. 3, p. 651, 2022.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; URQUIAGA, S. **Recomendação de uma mistura de estirpes de cinco bactérias fixadoras de nitrogênio para inoculação de cana-de-açúcar:** *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11335), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504), *Azospirillum amazonense* (BR 11145) e *MBurkholderia tropica* (BR 11366). Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009. 4 p. (Embrapa Agrobiologia. Circular Técnica, 2009).

SANTOS, A. F.; GONDIM, T. M. S.; FERNANDES JUNIOR, P. I.; LIMA, L. M. Effect of fungicides on the symbiosis between *Bradyrhizobium* strains and peanut. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 51, e69089, 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pat/a/qBbSBpGzhJKTqRhDsjnsMfc/abstract/?lang=en>. Acesso em: 10 jan. 2021.

SANTOS, F. K. N.; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I. Resposta de mini-toletes à inoculação de bactérias diazotróficas com diferentes capacidades funcionais. In: SEMANA CIENTÍFICA JOHANNA DÖBEREINER, 22., 2022, Seropédica. **Solo, Ciência e vida:** caderno de resumos. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2022. 1 p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1146850/1/Resposta-de-mini-toletes-de-cana-de-acucar.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2022.

SANTOS, J. W. M.; SILVA, J. F.; FERREIRA, T. D. S.; DIAS, M. A. M.; FRAIZ, A. C. R.; ESCOBAR, I. E. C.; SANTOS, R. C.; LIMA, L. M.; MORGANTE, C. V.; FERNANDES-JUNIOR, P. I. Molecular and symbiotic characterization of peanut bradyrhizobia from the semi-arid region of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 121, p. 177-184, 2017.

SCHEIFELE, M.; HOBI, A.; BUEGGER, F.; GATTINGER, A.; SCHULIN, R.; BOLLER, T.; MÄDER, P. Impact of pyrochar and hydrochar on soybean (*Glycine max* L.) root nodulation and biological nitrogen fixation. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 180, n. 2, p. 199-211, 2017.

SCHWEMBER, A. R.; SCHULZE, J.; DEL POZO, A.; CABEZA, R. A. Regulation of symbiotic nitrogen fixation in legume root nodules. **Plants**, v. 8, n. 9, p. 333, 2019.

SEEFELDT, L. C.; YANG, Z-Y.; LUKOYANOV, D. A.; HARRIS, D. F.; DEAN, D. R.; RAUGEI, S.; HOFFMAN, B. M. Reduction of substrates by nitrogenases. **Chemical Reviews**, v. 120, n. 12, p. 5082-51064, 2020.

SILVA JUNIOR, J. J.; MIYAMOTO, B. C. B.; COLETI, J. C.; SILVEIRA, J. M. F. J. da. Impacto econômico dos inoculantes na soja: uma análise insumo-produto. **Revista de Estudos Sociais**, v. 21, n. 42, p. 99-121, 2019.

SIZENANDO, C. I. T.; RAMOS, J. P. C.; FERNANDES-JUNIOR, P. I.; LIMA, L. M. de; FREIRE, R. M. M.; SANTOS, R. C. Agronomic efficiency of *Bradyrhizobium* in peanut under different environments in Brazilian Northeast. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 37, p. 3482-3487, 2016.

SOUZA, S. **Inoculante reduz uso de nitrogênio em milho e aumenta produtividade em mais de 100%**. Brasília: Embrapa, 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/45031761/inoculante-reduz-uso-de-nitrogenio-em-milho-e-aumenta-produtividade-em-mais-de-100>. Acesso em: 27 dez. 2021.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 888 p.

THAL, B.; BRAUN, H-P.; EUBEL, H. Proteomic analysis dissects the impact of nodulation and biological nitrogen fixation on *Vicia faba* root nodule physiology. **Plant Molecular Biology**, v. 97, p. 233-251, 2018.

VAN LANGENHOVE, L.; DEPAEPE, T.; VICCA, S.; VAN DEN BERGE, L.; STAHL, C.; COURTOIS, E.; WEENDOM, J.; URBINA, I.; GRAU, O.; ASENSIO, D.; PEÑUELAS, J.; BOECKX, P.; RICHTER, A.; VAN DER STRAETEN, D.; JANSSENS, I. A. Regulation of nitrogen fixation from free-living organisms in soil and leaf litter of two tropical forests of the Guiana shield. **Plant an Soil**, v. 450, n. 1-2, p. 93-110, 2019.

VENDRUSCOLO, E. P.; LIMA, S. F. The Azospirillum genus and the cultivation of vegetables. A review. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**, v. 25, n. 4, p. 236-246, 2021.

ZHANG, Y.; ZHAO, J.; YANG, D.; WANG, B.; ZHOU, Y.; WANG, J.; CHEN, H.; MEI, T.; YE, S.; QU, J. A thiolate-bridged Fe<sup>IV</sup>Fe<sup>IV</sup>  $\mu$ -nitrido complex and its hydrogenation reactivity toward ammonia formation. **Nature Chemistry**, v. 14, p. 46-52, 2022.

ZHENG, M.; ZHOU, Z.; LUO, Y.; ZHAO, P.; MO, J. Global pattern and controls of biological nitrogen fixation under nutrient enrichment: A meta-analysis. **Global Change Biology**, v. 25, n. 9, p. 3018-3030, 2019.

**Embrapa**

---

**Algodão**

MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA E  
PECUÁRIA

GOVERNO FEDERAL  
**BRASIL**  
UNIÃO E RECONSTRUÇÃO

CGPE 18301