



Emanuel M. de Souza

Núcleo de Fixação de Nitrogênio

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

Universidade Federal do Paraná - Curitiba

NÚCLEO DE FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

Universidade Federal do Paraná

F.O.PEDROSA

L.U. RIGO

E. M. SOUZA

M.B.R. STEFFENS

L.S. CHUBATSU

R. WASSEM

M. G. YATES

C. M. FADEL-PICHETH

L. M. CRUZ

R.A. MONTEIRO

G. KLASSEN

60 pesquisadores, estudantes e técnicos (2007)

<http://www.genopar.org>

<http://www.genopar.org/rubri>

<http://milenio.genopar.org>

<http://proteopar.genopar.org>

Fixação Biológica de Nitrogênio

REGULAÇÃO DO METABOLISMO NITROGENADO BACTERIANO

Determinar os mecanismos envolvidos na regulação do metabolismo nitrogenado, em especial fixação biológica de nitrogênio, das bactérias *Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum brasilense*.



INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA

- 1. Identificar genes de arroz (Oryza sativa) envolvidos com a colonização endofítica de raízes H. seropedicae por sequenciamento de EST's*
- 2. Identificar e caracterizar os genes de H. seropedicae envolvidos na associação com gramíneas.*



BIODIVERSIDADE E METAGENÔMICA

- 1. Determinar a biodiversidade de bactérias não-diazotróficas e diazotróficas do bioma Mata Atlântica paranaense incluindo organismos cultiváveis e não-cultiváveis.***
- 2. Caracterizar a diversidade genética de bactérias associativas e endofíticas diazotróficas incluindo não-cultiváveis, associadas com arroz, milho e cana de açúcar cultivadas em diferentes ecossistemas.***
- 3. Determinar o potencial de bibliotecas metagenômicas de bactérias de solos da Mata Atlântica visando a obtenção de biocatalizadores e compostos com atividade farmacológica.***



GENOMA FUNCIONAL E ESTRUTURAL

- 1. Determinar os proteomas de *Herbaspirillum seropedicae* frente a diferentes condições fisiológicas.***
- 2. Determinar a estrutura tridimensional de proteínas selecionadas de *H. seropedicae*.***
- 3. Determinar a seqüência genômica parcial de *Herbaspirillum rubrisubalbicans****



PLANTAS TRANSGÊNICAS

*1. Construir plantas geneticamente modificadas de cana de açúcar e arroz contendo genes identificados nos genomas de *H. seropedicae* e ou *G. diazotrophicus* capazes de conferir resistência a estresses abióticos.*

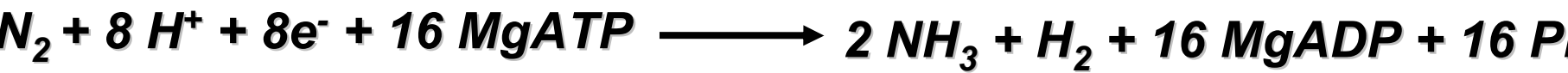


BIOTECNOLOGIA DE INOCULANTE E INOCULAÇÃO

1. Desenvolvimento de inoculantes contendo bactérias de diazotróficas para cana de açúcar (Saccharum spp), milho (Zea mays) e arroz (Oryza sativa).

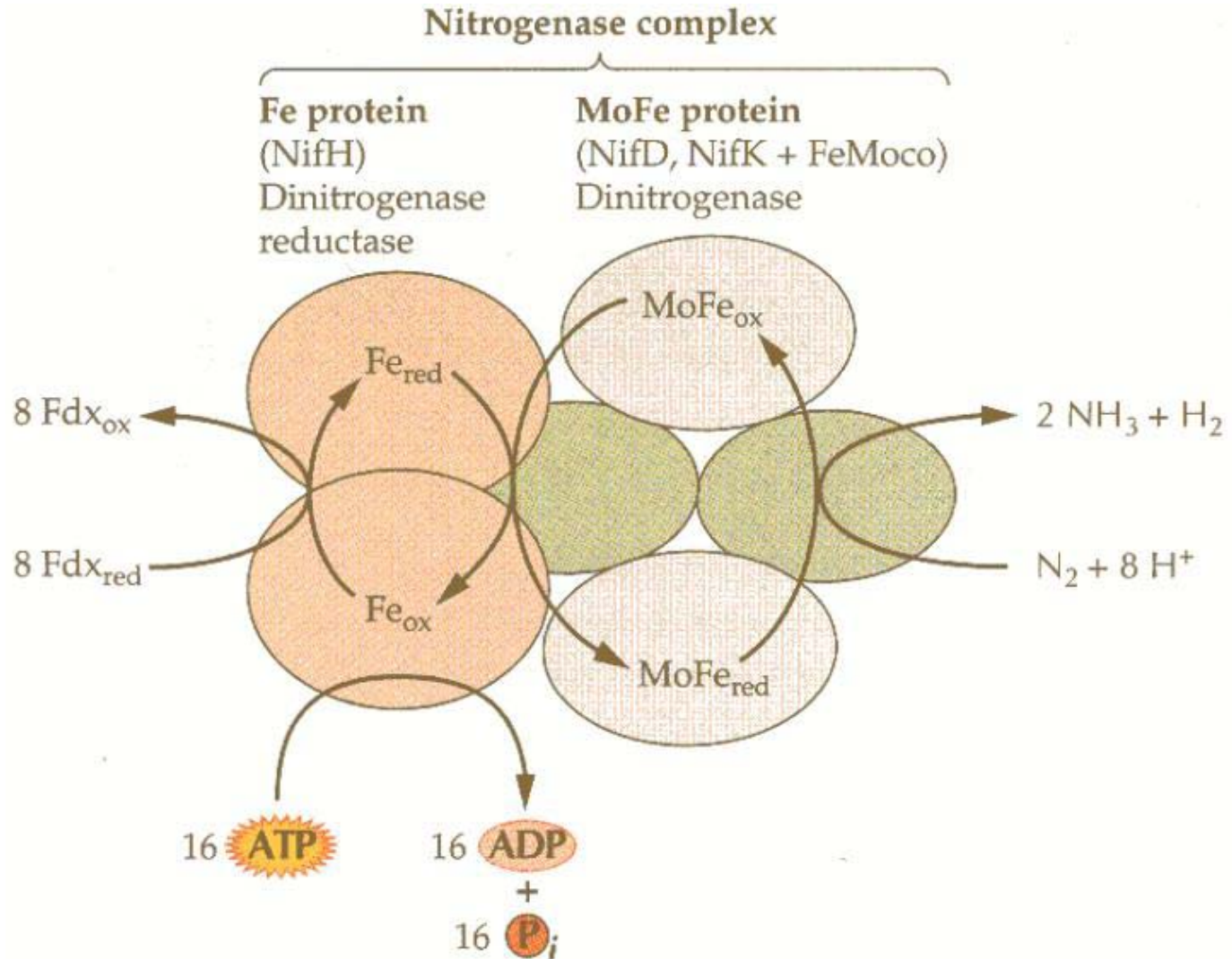


Nitrogenase

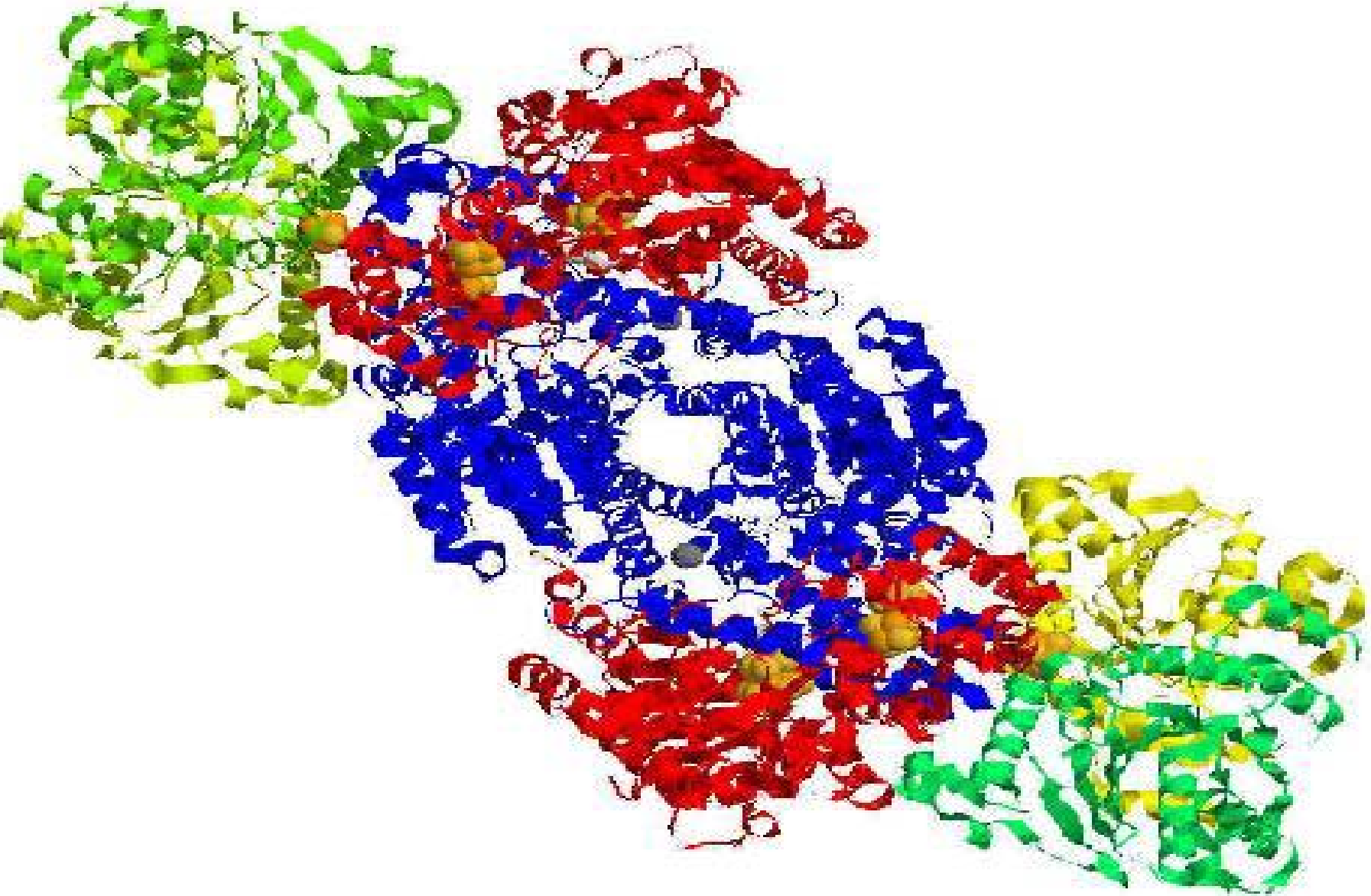


Aproximadamente de 500 Kg de açúcar para cada
100 Kg de N fixado

Nitrogenase



Proteina MoFe:Fe de *Azotobacter vinelandii*



**Somente organismos procariotos
possuem capacidade de fixar
nitrogênio**

Bacteria e Archaea

Rizobactérias Diazotróficas

- Simbióticas
- Endofíticas
- Associativas

Rizobactérias Diazotróficas

Estabelecimento da interação

- Reconhecimento mútuo
- Adaptação do metabolismo

Diazotrofos Simbióticos

Bradyrhizobium

Sinorhizobium

Azorhizobium

Mesorhizobium

Rhizobium

Frankia → **Betulaceae, Casuarinaceae, etc**

Burkholderia → *Machaerium lunatum, Aspalathus
carnosa*

Methylobacterium → *Crotalaria*

Diazotrofos Endofíticos

Herbaspirillum seropedicae

Gluconacetobacter diazotrophicus

Klebsiella sp

Azoarcus sp

Diazotrofos Asociativos

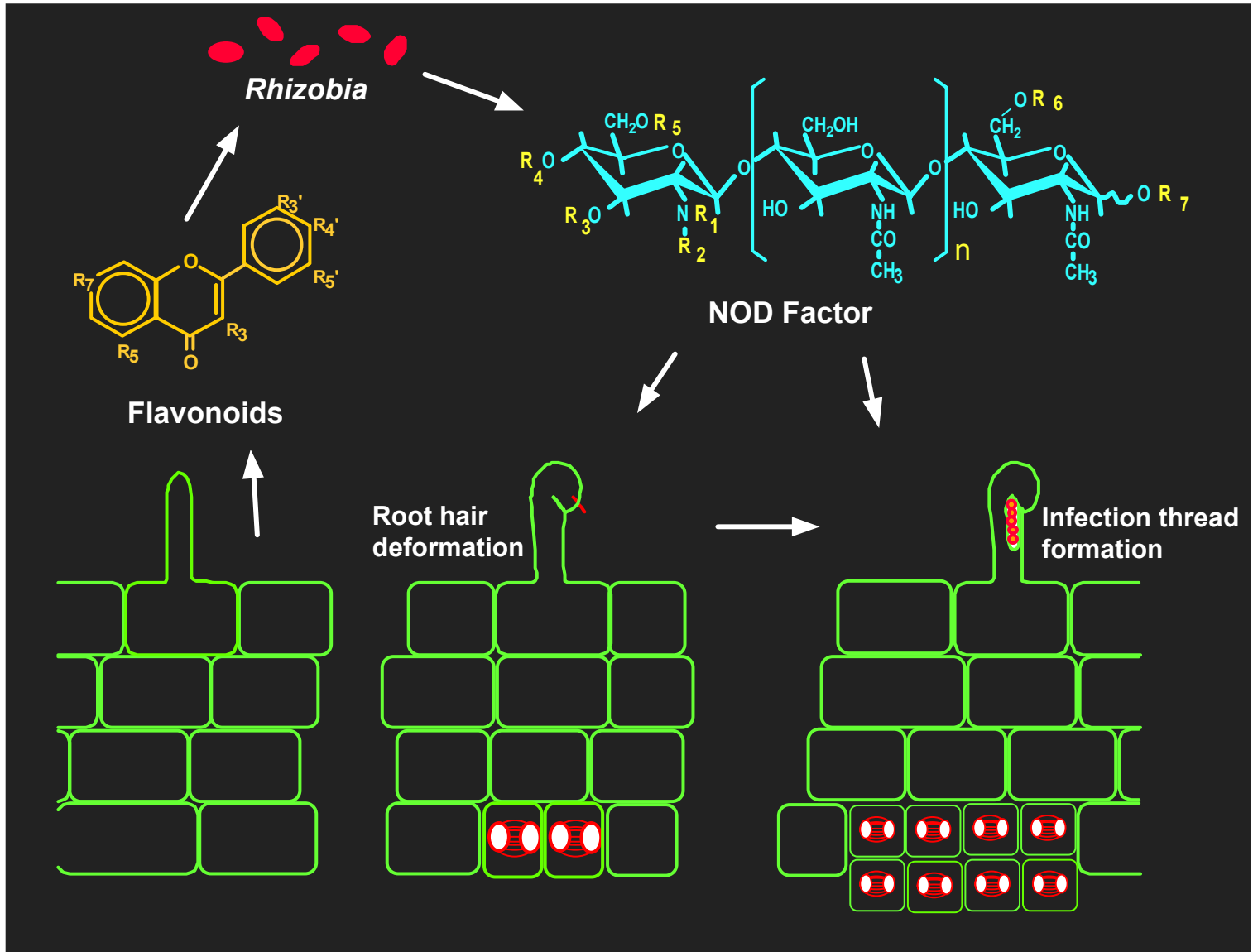
Azospirillum sp

Azotobacter sp

Rizóbios associam-se simbioticamente com legumes



Factores Nod sinalizam para início da simbiose *Rhizobium*-legume



Fixação de Nitrogênio no Brasil

I. Associação Simbiótica (2004)

Soja x *Bradyrhizobium*

Área plantada: 24×10^6 ha.

Economia estimada: **US\$ 3 bilhões**

Transferência Potencial de N de rizobactérias

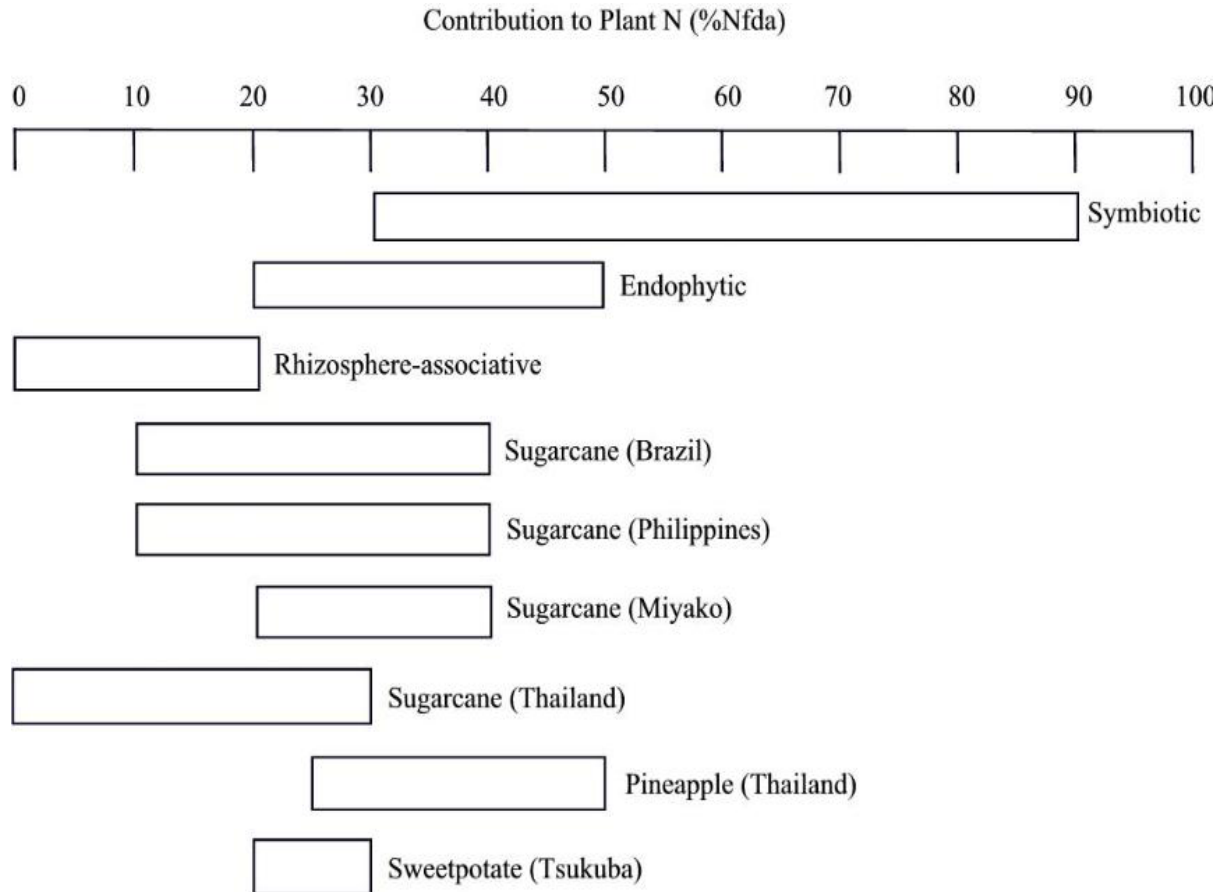


Fig.1 Contribution of fixed N to plant N

%Ndfa = percentage contribution of fixed-N to the accumulation of N in N_2 -fixing plants)

Fixação de Nitrogênio no Brasil

II. Associação Endofítica (2000)

Milho x *Herbaspirillum*/*Azospirillum*

Economia estimada em fertilizante nitrogenado:

Área plantada: 13×10^6 ha.

Uso estimado de fertilizante: 0,6 ton
uréia/(ha.ano)

Economia (30% do total):

~US\$ 400 milhões

Promoção do crescimento vegetal por bactérias da rizosfera

Efeitos diretos:

Melhora da germinação
Melhora do desenvolvimento radicular
Melhora da nutrição mineral
Melhora na utilização de água

- Produção de reguladores de crescimento vegetal: auxinas, giberelinas.
- Fixação biológica de nitrogênio.

Gêneros: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*

Promoção do crescimento vegetal por bactérias da rizosfera

Efeitos indiretos:

Supressão de patógenos fúngicos e bacterianos.

Gêneros: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Burkholderia*.

- Produção de antibióticos e bacteriocinas
- Competição para sítios de colonização e nutrientes na superfície das raízes.
- Indução da resistência sistêmica adquirida da planta contra patógenos bacterianos e fúngicos.
- Produção de quitinases e glucanases que hidrolisam paredes celulares fúngicas

• *Herbaspirillum seropedicae*

• *Azospirillum brasilense*

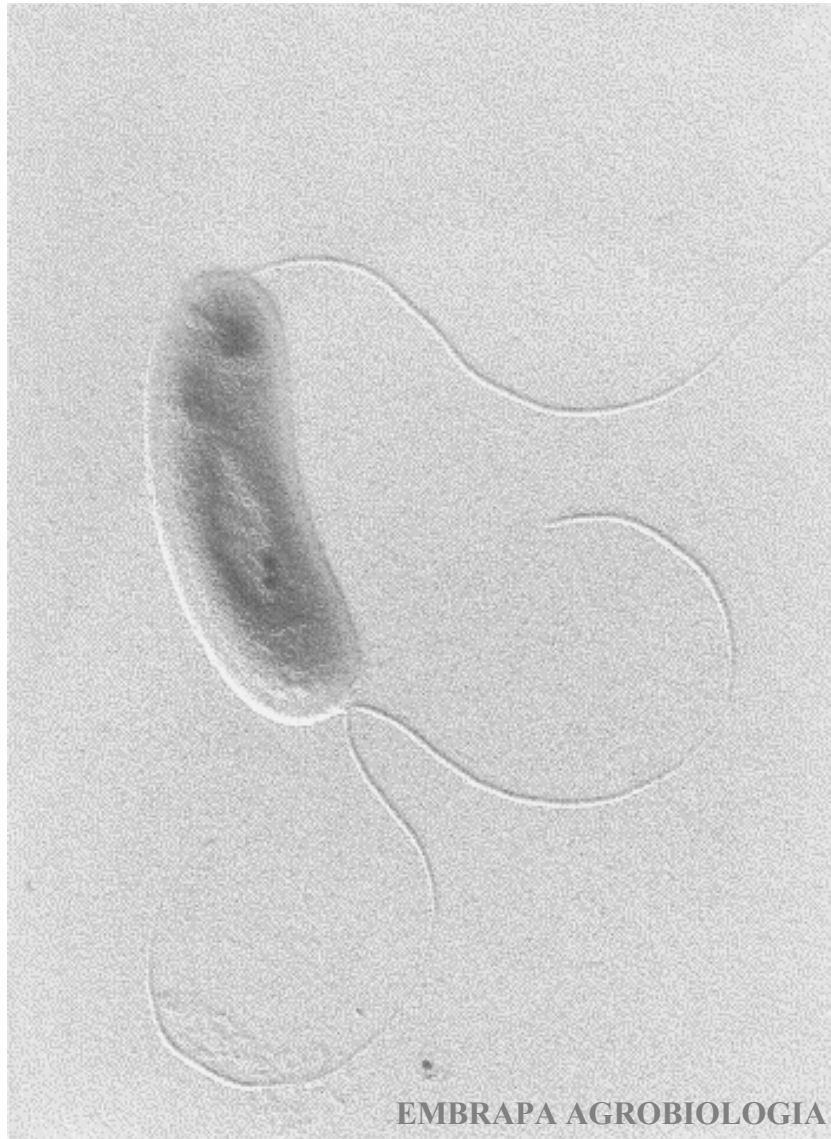
Herbaspirillum seropedicae

- **β -Proteobactéria**
- **Diazotrofo.**
- **Coloniza raízes e partes aéreas.**
- **Associa-se a gramíneas.**

Herbaspirillum seropedicae

- **Produz Ácido Indol Acético (IAA) e Giberilina**
- **Potencial como biofertilizante nitrogenado.**

Herbaspirillum seropedicae



Aumento de biomassa de arroz inoculado com *Herbaspirillum seropedicae*

it

Treatment	Dry weight of roots (mg)*	MPN**
Non inoculated (-N)	55.0 ± 7.4 bc	nd
Nif ⁺ (-N)	72.5 ± 0.6 a	1.8 × 10 ⁵
Nif ⁻ (-N)	68.8 ± 8.8 a	5.0 × 10 ⁵
Non inoculated (+0.2 mM N)	43.7 ± 9.4 c	nd
Nif ⁺ (+0.2 mM N)	67.7 ± 9.4 a	3.0 × 10 ⁴
Nif ⁻ (+0.2 mM N)	66.8 ± 12.6 ab	4.0 × 10 ⁴
Non inoculated (+4 mM N)	51.0 ± 8.1 c	nd
Nif ⁺ (+4 mM N)	55.0 ± 7.6 bc	1.9 × 10 ⁴
Nif ⁻ (+4 mM N)	45.3 ± 13.7 c	0.8 × 10 ⁴

*Average of total dry weight of rice roots per replicate (three plants/vase) is given. Values shown in column followed by the same letter are not significantly different. Analyzed by Duncan method, $P < 0.0001$. Measurements were 30 days after inoculation, without nitrogen addition (-N), in the presence of 0.2 mM (+0.2 mM N) or 4 mM (+4 mM N) of NH_4NO_3 .

**Counts were obtained using MPN estimation in semi-solid NFB medium, 20 days after inoculation. (nd) not detected by reporter enzyme activity assay.

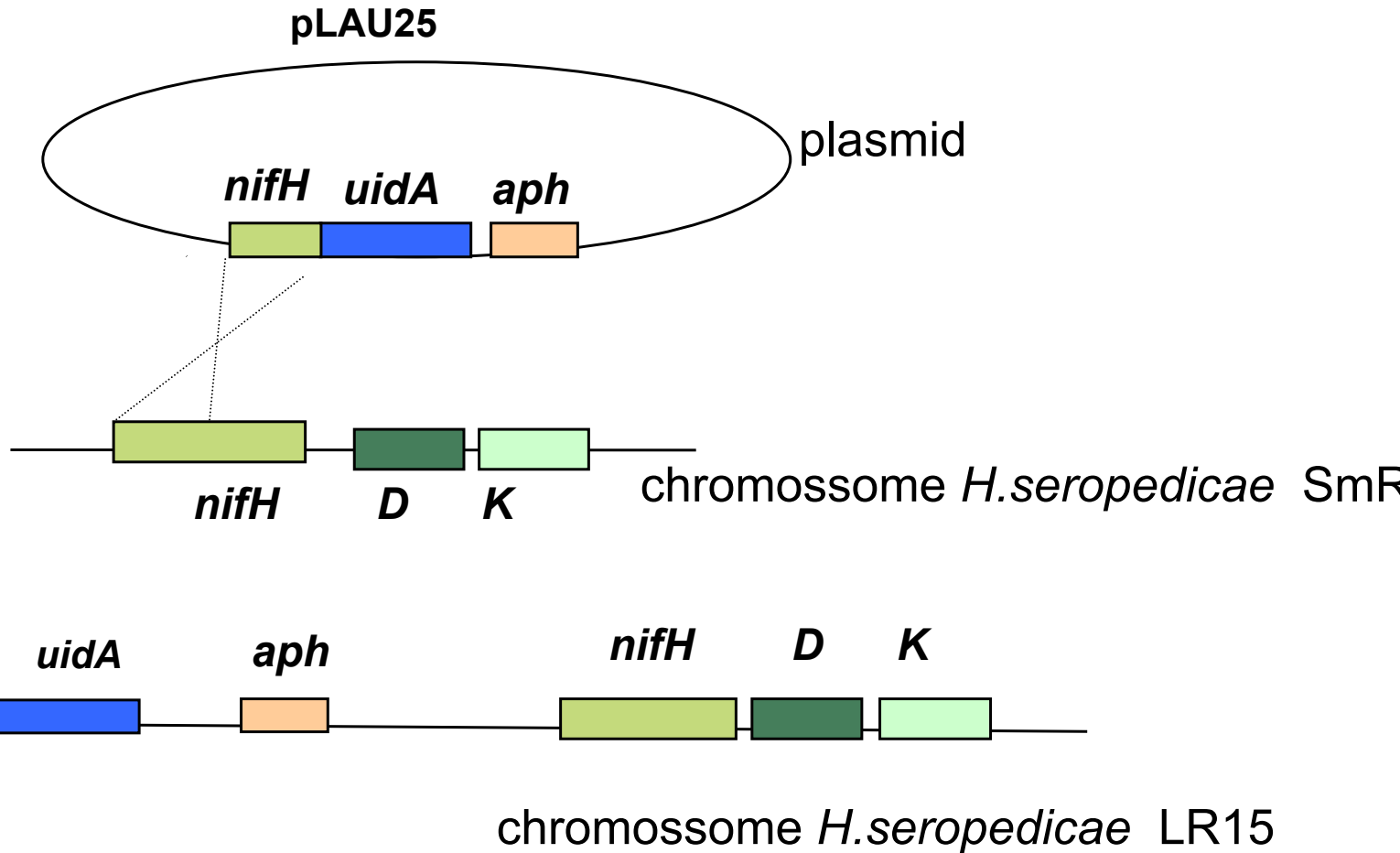
Colonização de gramíneas por *Herbaspirillum seropedicae*

Plant species	Strain	CFU per g of dry weight	
		Root	Shoot ^a
Wheat	LR15	3.9×10^6	7.6×10^4
	IM40	5.7×10^6	9.5×10^4
Sorghum	LR15	3.3×10^8	4.8×10^5
	IM40	1.3×10^8	4.3×10^5
Maize	LR15	3.6×10^6	1.8×10^4
	IM40	3.3×10^6	1.6×10^4

The results are from a representative experiment with three replicates (CV = 11%). Two independent experiments produced similar results.

^aStems plus leaves.

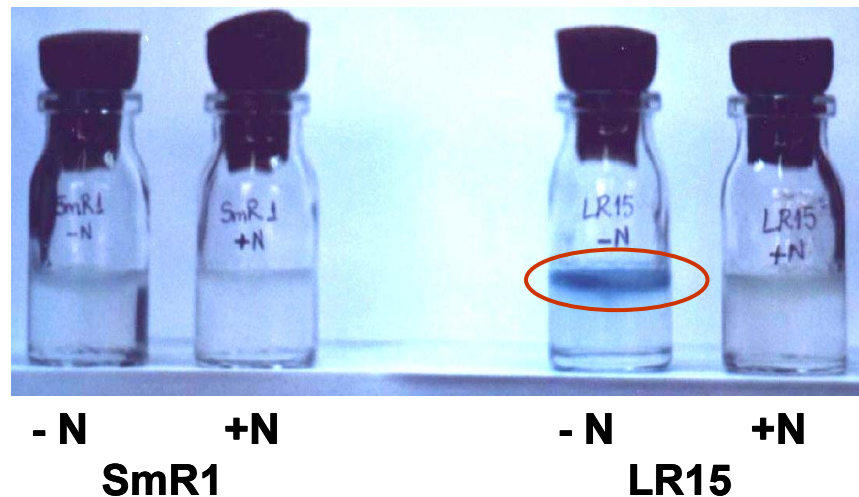
Construção fusão cromossomal *nifH::gusA*



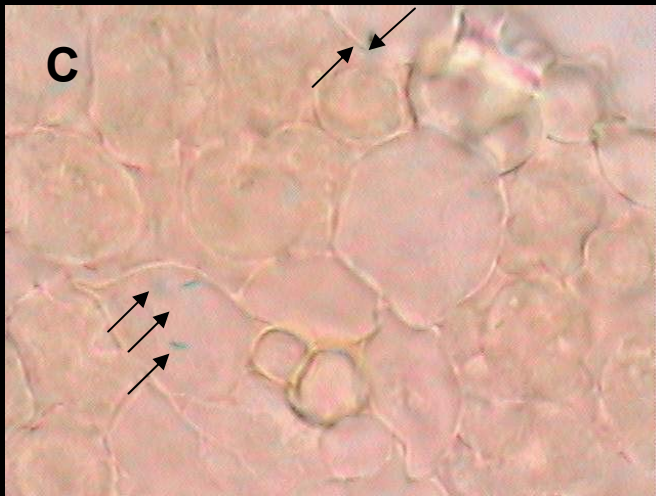
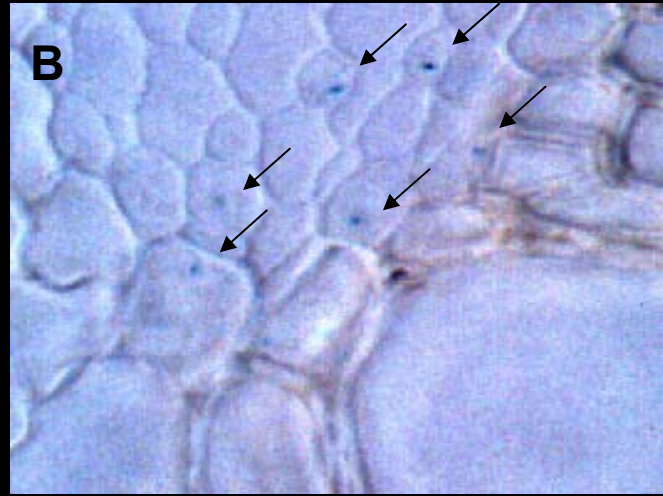
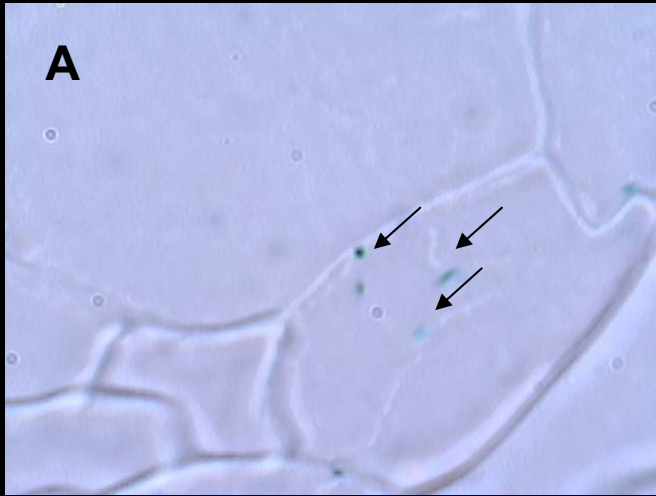
H. seropedicae nifH::gusA

Nitrogenase activity

Strain	N source	ARA nmols of ethylene/min/mg protein
SmR1	+ N	0
	- N	3.34 ± 1.31 a
LR15	+ N	0
	- N	5.26 ± 1.34 a



Expressão de fusão *nifH::gusA* em gramíneas colonizada por *H. seropedicae*



A: Intercellular spaces in rice root

B: vascular tissue, maize stem

C: Rice leaf



THE GENOME PROGRAMME OF PARANÁ STATE

The genome of *Herbaspirillum seropedicae*

Federal University of Paraná, Brazil

Fábio de Oliveira Pedrosa



THE GENOME PROGRAMME OF PARANA - GENOPAR -

Supported by

**THE SECRETARY OF SCIENCE, TECHNOLOGY
AND HIGHER EDUCATION OF THE STATE OF
PARANÁ**

AND

**THE BRAZILIAN NATIONAL RESEARCH COUNCIL/
CNPq
MINISTRY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

BRAZIL

The genome of *Herbaspirillum seropedicae* Z78

Legend:

green = 4 rRNA operons

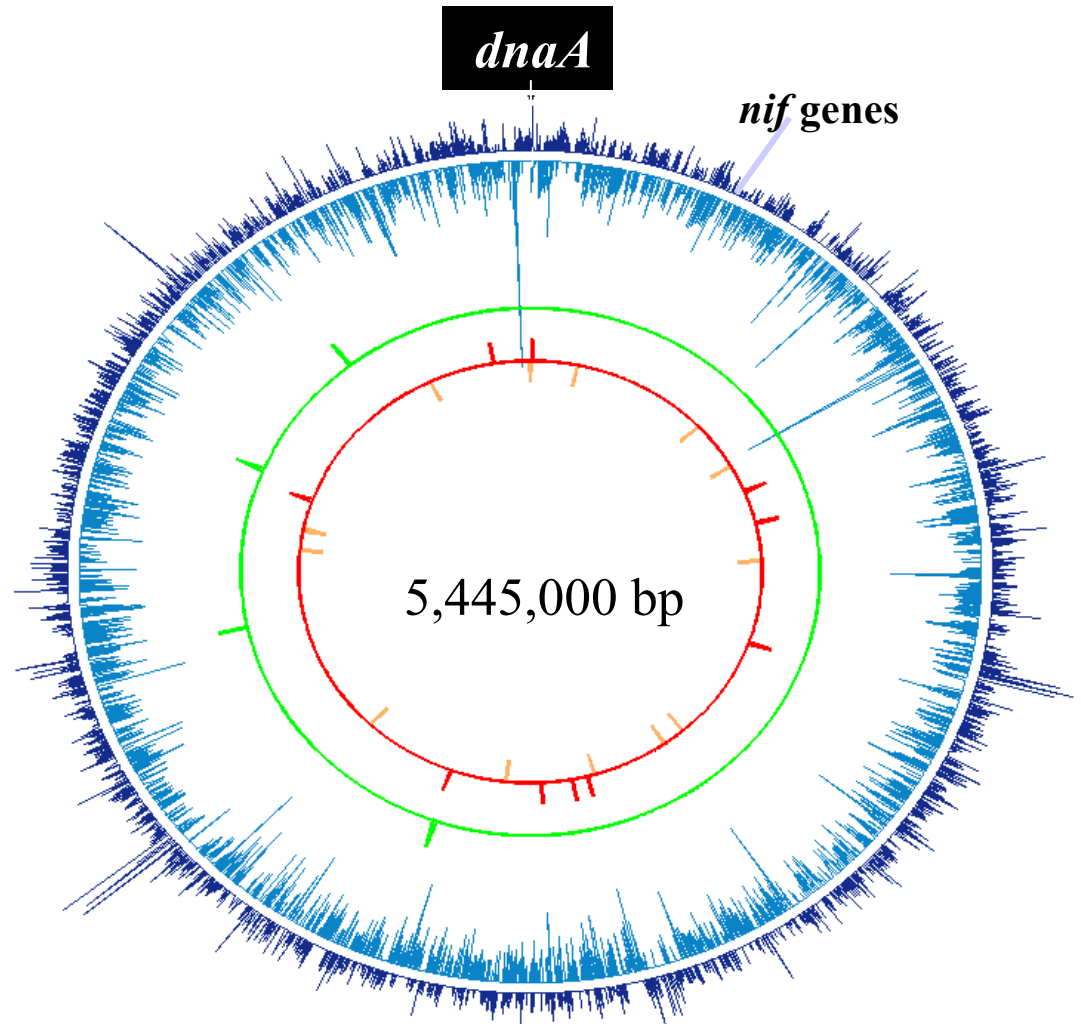
red/orange = tRNAs

dark / light blue =

5,079 orfs/genes

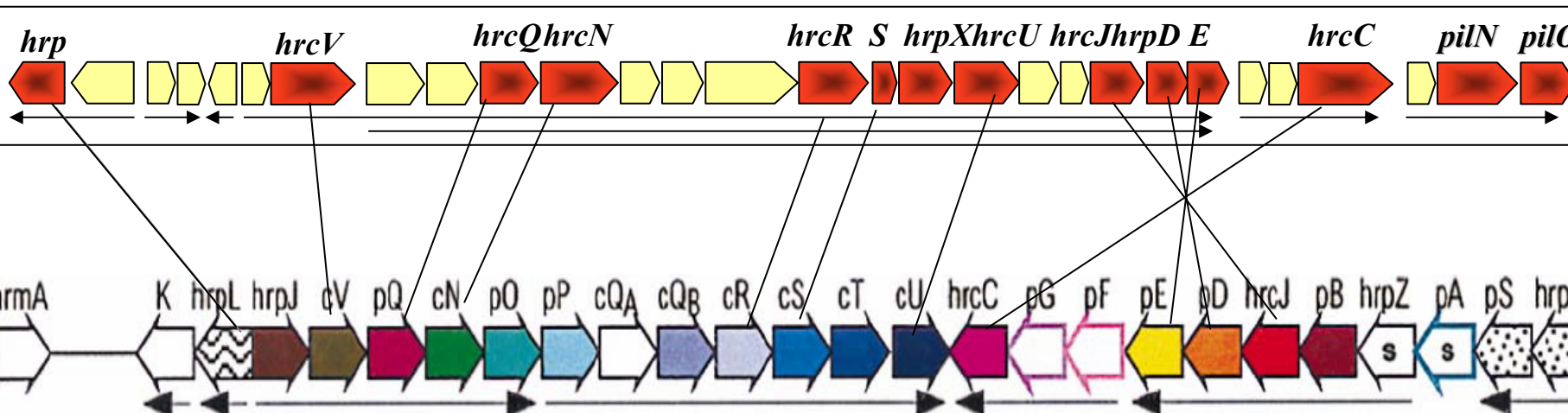
C+G = 63,4%

nif genes cluster:
513000 to 554000



Comparação dos genes *hrp/hrc* de *H. seropedicae* e *P. syringae*

Herbaspirillum seropedicae



Pseudomonas syringae

H. seropedicae *hrp/hrc* genes em vermelho,
orfs hipotéticas em amarelo

TYPE III SECRETION SYSTEM

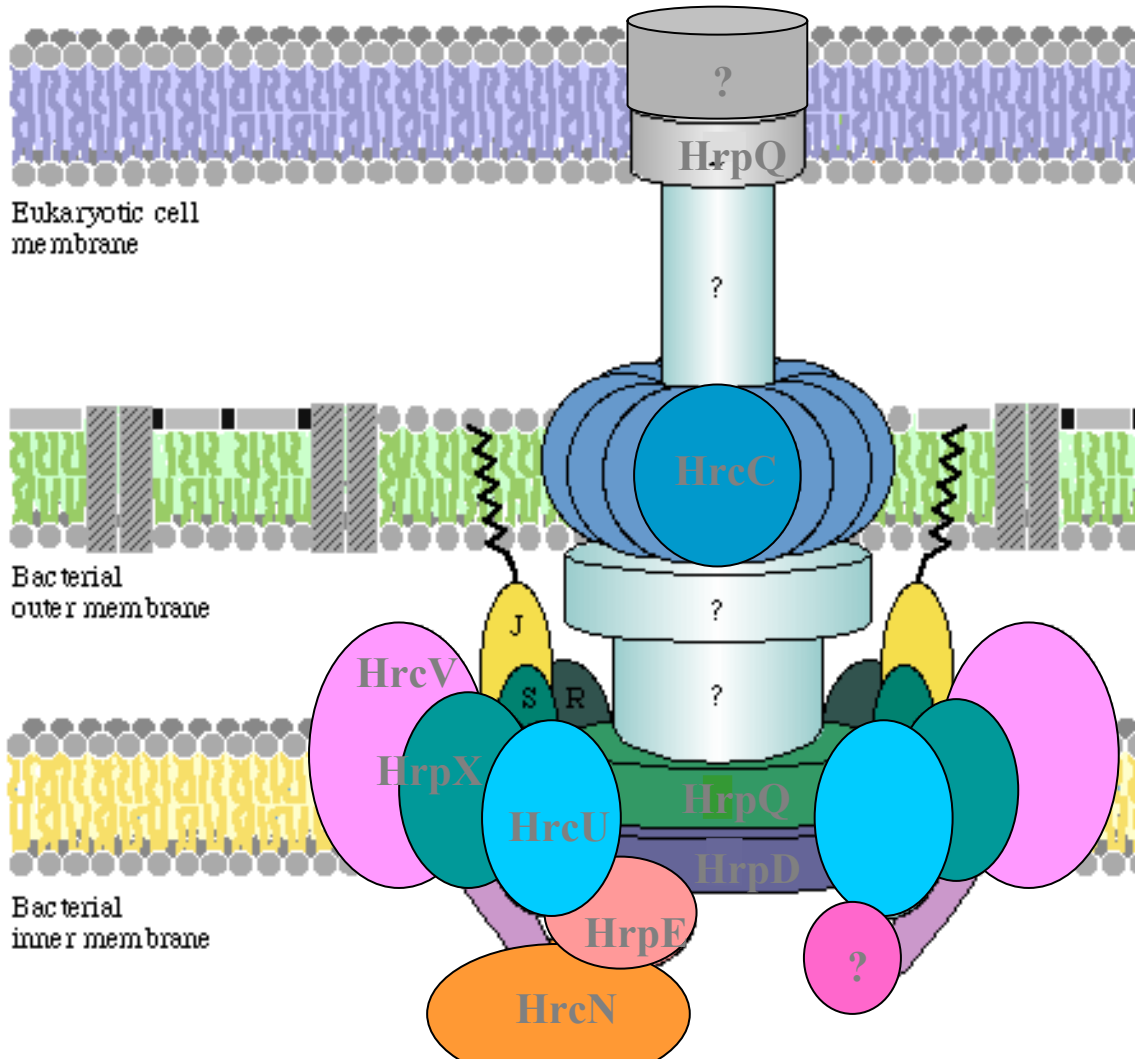
Herbaspirillum seropedicae

H.seropedicae

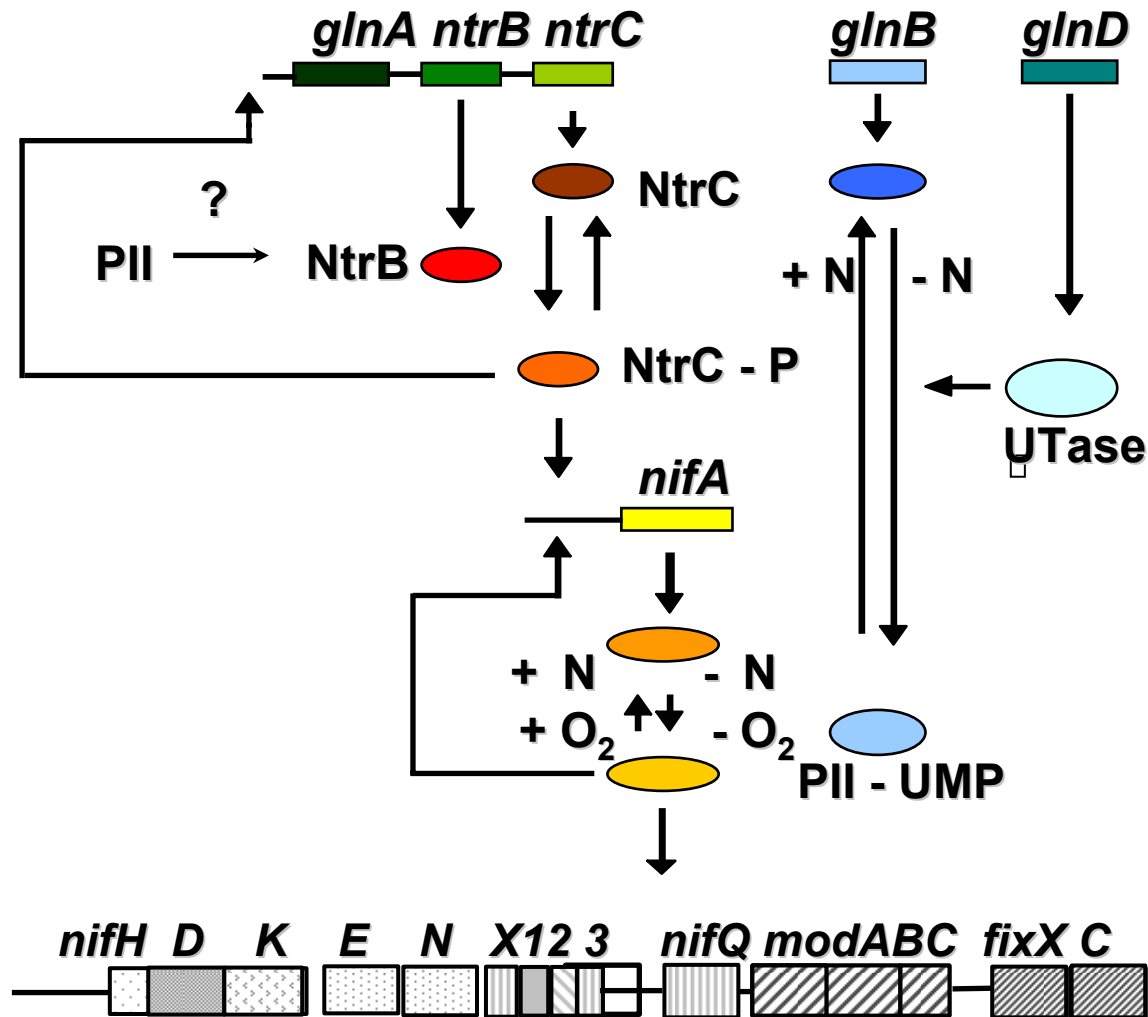
hrcC
hrpQ
 ???
hrcJ
hrpE
hrcN
hrpD
hrcR
hrcS
hrpX
hrcU
hrcV
 ???

Y. pestis

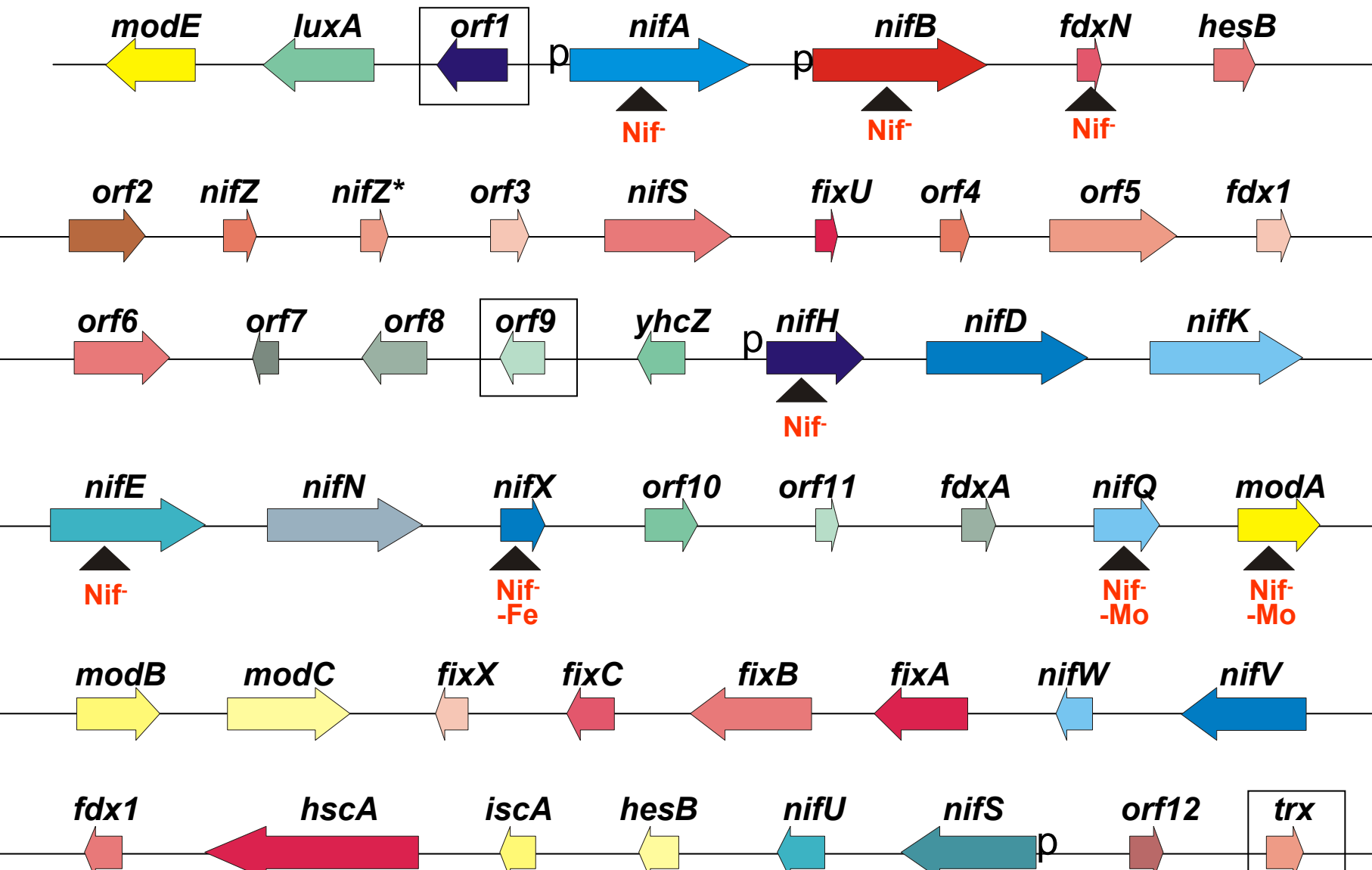
yscC
yscD
yscF
yscJ
yscL
yscN
yscQ
yscR
yscS
yscT
yscU
yscV
yopB



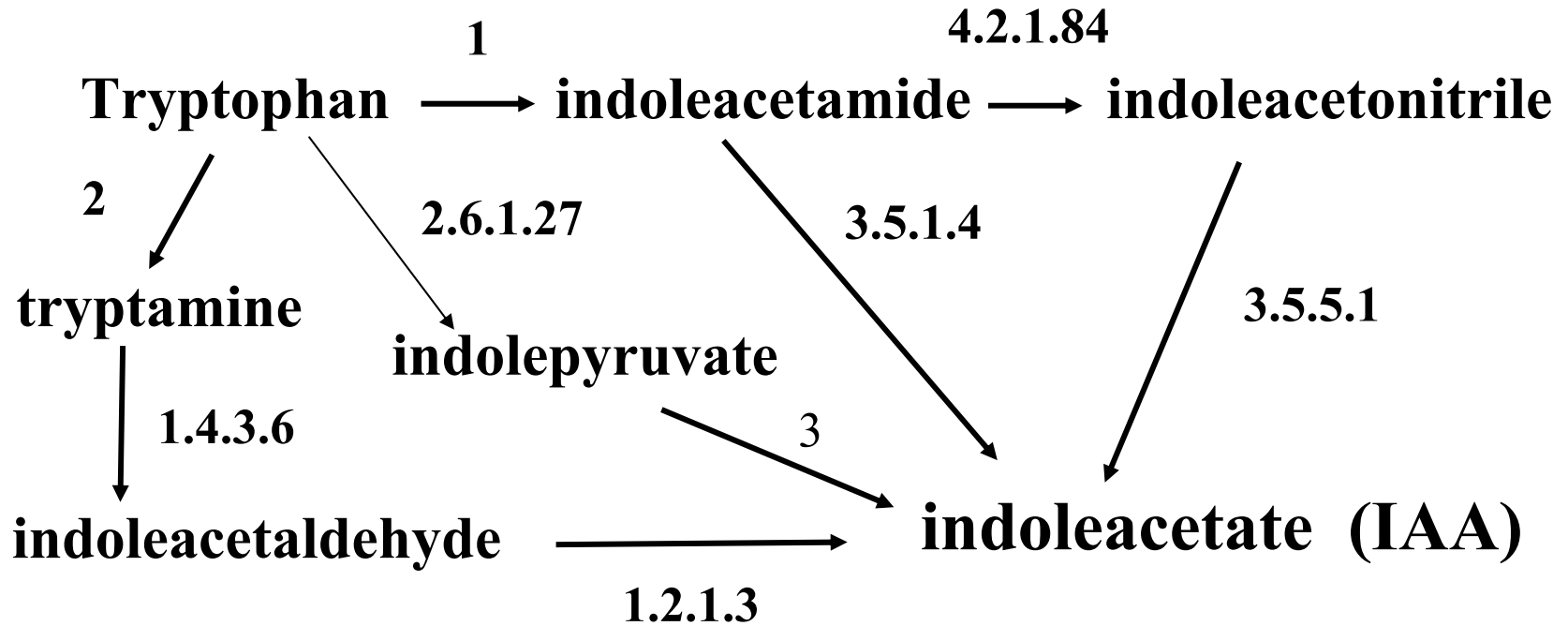
Regulação da fixação nitrogênio em *Herbaspirillum seropedicae*



Structural organization of the *nif* genes in the *Herbaspirillum seropedicae* genome



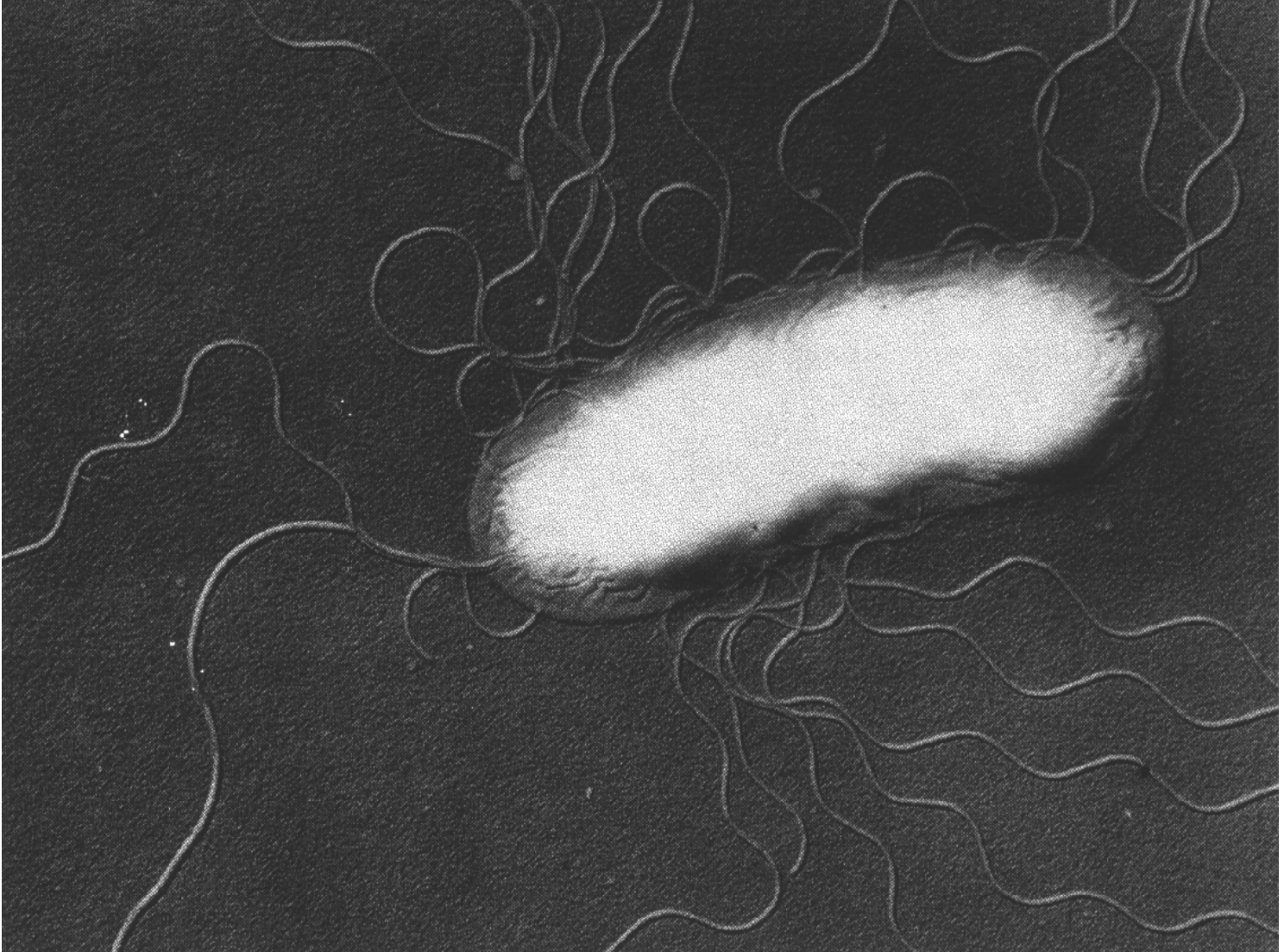
Possíveis vias de síntese de IAA em *Herbaspirillum seropedicae*



1 - monooxygenase
2 - decarboxylase

3. Indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase

Azospirillum brasilense



Azospirillum brasilense

- 1. Bactéria fixadora de nitrogênio aeróbica.**
- 2. Gram negativa, espiralada, móvel.**
- 3. Flagelo polar em meio líquido**
- 4. Flagelo polar e cílios laterais em meio sólido.**
- 5. realiza todas as fases do ciclo do nitrogênio exceto nitrificação.**
- 6. Quimiorganotrófica.**
- 7. Hidrogenase positiva.**
- 8. Fixa N_2 sob condições limitantes de NH_4^+ e O_2**

Azospirillum brasilense

Características Favoráveis como Promotora do crescimento vegetal

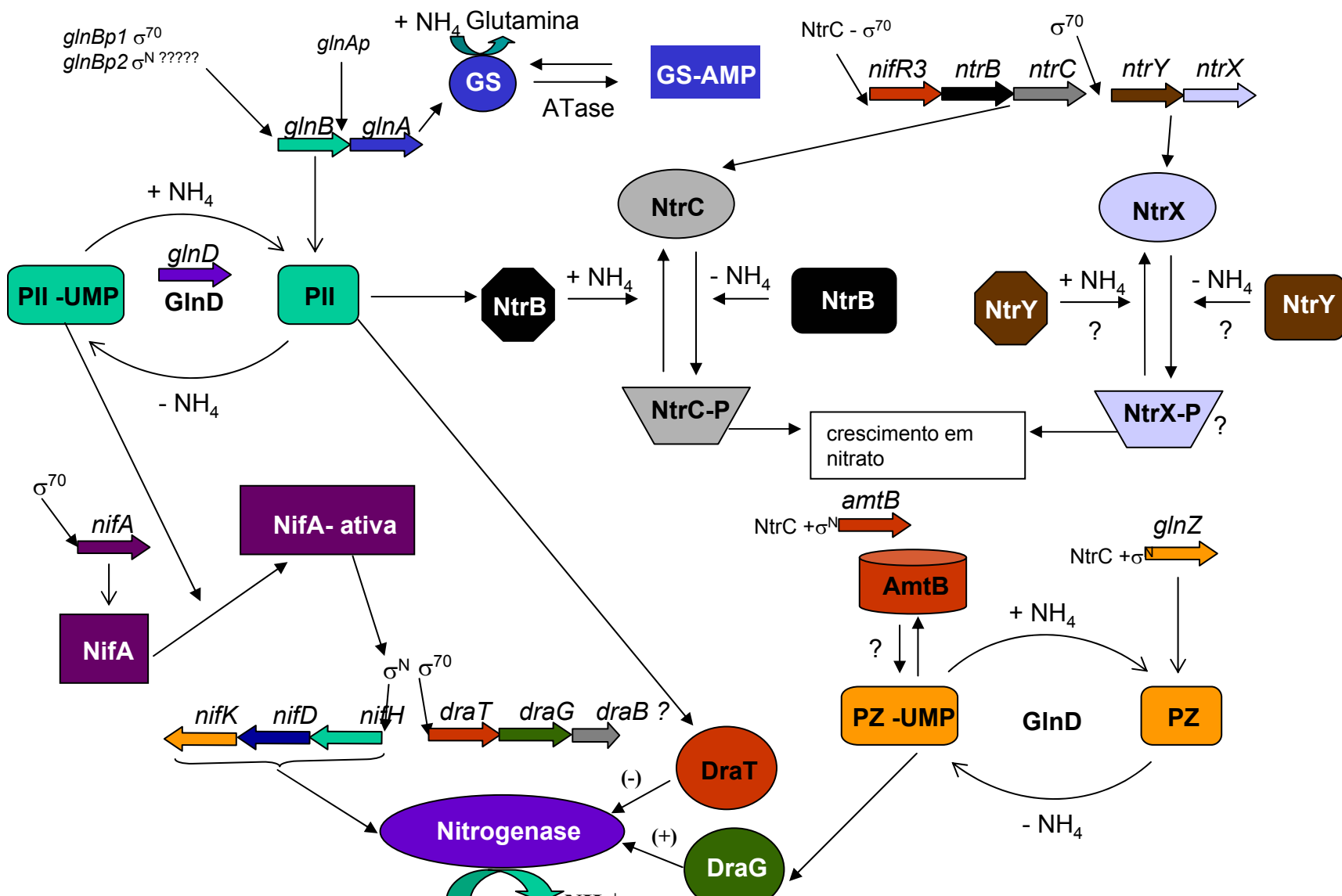
- **Endofítica**
- **Associa-se a gramíneas como milho, trigo, arroz, sorgo e não-gramíneas.**
- **Produz fitormônios como auxinas, giberelinas e citocininas.**
- **Fixa N₂ em condições tropicais (35-40°C).**
- **Ocorrência universal**

Azospirillum brasilense

Excreta parte do nitrogênio fixado (NH_4^+) diretamente para a planta associada.

- 5 a 18% do N-fixado transferido.
- Decorrencia do rígido mecanismo de regulação da síntese e atividade da nitrogenase e do eficiente sistema de captura de NH_4^+

Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*



Efeitos da inoculação de gramíneas com *Azospirillum brasilense*

- 1. Promove o desenvolvimento do sistema radicular:**
 - aumento da densidade dos pelos absorventes
 - aumenta o número e volume das raízes laterais
- 2. Aumenta a absorção de nutrientes pela planta associada (água, fosfato, cátions).**
- 3. Aumenta a resistência da planta a estresse hídrico**
- 4. Aumenta a respiração das raízes ativando enzimas da via glicolítica e do ciclo dos ácidos tricarbóxicos.**

Efeito da inoculação de Milho com estirpes de *Azospirillum brasilense* sobre a atividade da nitrogenase e peso seco

Estirpe de <i>A. brasilense</i>	Atividade da nitrogenase (nmol C_2H_4 /h.planta)	No. de <i>Azospirillum</i> $\times 10^9$ g.peso seco de raízes	Peso seco por Planta (g)	Aumento em peso seco (%)
Controle	0	0	1,97	0
Sp-7	101	1,23	3,05	55
Sp-80	80	1,03	2,22	13
Cd	99	0,8	2,84	44
Cd-1	77	0,9	2,21	17

Cohen et al. 1980

Efeito da inoculação de Milho com estirpes de *Azospirillum brasilense* sobre a atividade da nitrogenase, peso seco e conteúdo de N

Estirpes de <i>A. brasilense</i>	Atividade da nitrogenase (nmol C ₂ H ₄ /h.planta)	N-Total por Planta (mg)	(%)	Peso seco por Planta (g)	Aumento em peso seco (%)
Controle	0	20,80	0	4,53	0
Sp-7	351	26,77	30	5,72	26
Cd-1	410	25,24	21	5,46	20

Cohen et al. 1980

Efeito da inoculação de cultivares de Milho com nóculo misto de estirpes de *Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum* sobre o N-total e a produtividade

Cultivar	N-total		Produtividade de grãos	
	(kg/ha)	(%)	(Kg/ha)	(%)
	Controle - Inoculado		Controle - Inoculado	
Dekalb 4F-37	134 - 109	- 23	7344 - 5563	- 32
Morgan 318	68 - 94	+ 38	3745 - 5243	+ 40
Dekalb 3F-24	104 - 152	+ 47	6453 - 7550	+ 17
CMS 29	92 - 88	- 4	1792 - 3476	+ 94
CMS 22	92 - 130	+ 38	2934 - 4020	+ 37
BR 201	123 - 139	+ 13	2199 - 2660	+ 21

Rendimento de grãos da cultivar de trigo Embrapa 16 inoculada com *Azospirillum brasilense* Sp245 e *A. lipoferum* 25

15 kg N/ha na semeadura

Tratamento	Produtividade	Aumento na Produtividade	
	(kg/ha)	(kg/ha)	(%)
sem inoculante	3.127	0	(0,0)
Sp245	3.802	675	(21,5)
25	3.595	468	(14,9)

15 kg N/ha na semeadura e 45kg/ha de N no estágio de duplo anel

Tratamento	Produtividade	Aumento na Produtividade	
	(kg/ha)	(kg/ha)	(%)
sem inoculante	3.652	0	(0,0)
Sp245	4.040	388	(10,6)
25	3.882	230	(6,3)

**RESULTADOS DE 20 ANOS DE
EXPERIMENTAÇÃO COM INOCULAÇÃO DE
GRAMÍNEAS COM *AZOSPIRILLUM brasilense*
E *A. lipoferum***

“APESAR DAS ALEGAÇÕES DOS CRÍTICOS DE QUE A INOCULAÇÃO COM RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL (PGPR), LEVA A **RESULTADOS INCONSISTENTES** NO CAMPO,... OS DADOS INDICAM UMA TAXA DE SUCESSO DE 60-70%, COM AUMENTOS DE 5 A 30% ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVOS NO RENDIMENTO DE GRÃOS “
(OKON & LABANDERA-GONZALEZ, 1994)

INOCULAÇÃO DE GRAMÍNEAS COM *Azospirillum*

1. COMPETITIVIDADE COM A POPULAÇÃO NATIVA DE *AZOSPIRILLUM* PELA PLANTA ASSOCIADA.
2. PRESENÇA DE *AZOSPIRILLUM* NATIVOS MASCARANDO OS EFEITOS DA INOCULAÇÃO.
3. CONDIÇÕES DOS SOLOS N-SUFICIENTE. REPRESSÃO DA FIXAÇÃO DE N₂.
4. INTERAÇÃO ESPÉCIE/ESTIRPE BACTERIANA COM A ESPÉCIE/ CULTIVAR VEGETAL
5. CONDIÇÕES CLIMÁTICAS.

NÚCLEO DE FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

Universidade Federal do Paraná

F.O.PEDROSA

L.U. RIGO

E. M. SOUZA

M.B.R. STEFFENS

L.S. CHUBATSU

R. WASSEM

M. G. YATES

C. M. FADEL-PICHETH

L. M. CRUZ

R.A. MONTEIRO

G. KLASSEN

60 pesquisadores, estudantes e técnicos (2007)