



A Herança de
**JOHANNA
DÖBEREINER**
para a Ciência Agrícola
Brasileira e Mundial



MCMXVI

A HERANÇA DE JOHANNA DÖBEREINER PARA A CIÊNCIA AGRÍCOLA BRASILEIRA E MUNDIAL

**Anais do Workshop
Realizado em 28 de novembro de 2024**



A HERANÇA DE JOHANNA DÖBEREINER PARA A CIÊNCIA AGRÍCOLA BRASILEIRA E MUNDIAL

**Anais do Workshop
Realizado em 28 de novembro de 2024**

Organizadores

Mariangela Hungria

Maria Vargas

Fábio Bueno dos Reis Junior

Avílio Antônio Franco

Rio de Janeiro
2025



Diretoria da ABC

Triênio 2022-2025

Presidente

Helena Bonciani Nader

Vice-Presidente

Jailson Bittercourt de Andrade

Vice-Presidentes Regionais

Norte: Adalberto Luis Val

Nordeste e Espírito Santo: Jailson Bittercourt de Andrade

Minas e Centro-Oeste: Virgílio A. F. Almeida

Rio de Janeiro: Maria Domingues Vargas

São Paulo: Glaucius Oliva

Sul: Ruben George Oliven

Diretores

Alvaro Toubes Prata

Maria Domingues Vargas

Mariangela Hungria

Roberto Lent

Virgílio Augusto Fernandes Almeida

Diretoria da ABC

Triênio 2025-2028

Presidente

Helena Bonciani Nader

Vice-Presidente

Jailson Bittercourt de Andrade

Vice-Presidentes Regionais

Norte: Adalberto Luis Val

Nordeste e Espírito Santo: Jailson Bittercourt de Andrade

Minas e Centro-Oeste: Virgílio A. F. Almeida

Rio de Janeiro: Maria Domingues Vargas

São Paulo: Glaucius Oliva

Sul: Ruben George Oliven

Diretores

Diretora-Secretária-Geral: Mariangela Hungria

Diretora-Secretária-Institucional: Débora Foguel

Diretor-Tesoureiro: Alvaro Toubes Prata

Diretora de Cooperação Institucional: Virgínia S. T.

Ciminelli

Diretor de Comunicação: Luiz Drude de Lacerda

Coordenação Geral: Mariangela Hungria

Apoio: Kenya Aragão de Carvalho

Edição de Texto: Mariangela Hungria

Capa: Escritório de Design da Universidade Estadual de Londrina

Projeto gráfico e diagramação: Hermano Serviços de Editoração

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)

A Herança de Johanna Döbereiner para a ciência agrícola brasileira e mundial [livro eletrônico] : anais do workshop / organizadores Mariangela Hungria...[et al.]. -- 1. ed. -- Rio de Janeiro : Academia Brasileira de Ciências, 2025.
PDF

Vários autores.

Outros organizadores: Maria Vargas, Fábio Bueno dos Reis Junior, Avílio Antônio Franco.

Bibliografia.

ISBN 978-65-987542-2-8

1. Agricultura 2. Agricultura sustentável
3. Cientistas - Biografia 4. Divulgação científica
5. Döbereiner, Johanna, 1924-2000 6. Pesquisa científica I. Hungria, Mariangela. II. Vargas, Maria. III. Reis Junior, Fábio Bueno. IV. Franco, Avílio Antônio.

25-322165.0

CDD-630

Índices para catálogo sistemático:

1. Brasil : Agricultura : Pesquisa 630

Aline Graziele Benitez - Bibliotecária - CRB-1/3129

Prefácio

Cientistas vivem para o futuro, desenvolvendo pesquisas em uma busca contínua pela inovação, por resultados que permitam o avanço no conhecimento e resultem em melhorias para a sociedade e o planeta. Mas é essencial sempre refletir e reverenciar o passado científico e seu impacto no presente, compreendendo os caminhos da ciência, aprendendo como inspirar novas gerações e mostrando à sociedade o retorno dos investimentos em pesquisa. Assim foi que, em 2024, foi celebrado aquele que seria o centenário de um ícone da pesquisa brasileira, a Dra. Johanna Döbereiner.

Dra. Johanna nasceu em 28 de novembro de 1924, em Aussig, nos Sudetos, na então Tchecoslováquia, filha de um livre-docente de química e de uma mulher à frente de seu tempo, que estimulava a filha a seguir uma carreira. Passou pelas dificuldades da segunda guerra mundial e teve que migrar para a Alemanha por ser proveniente de região com população majoritariamente de origem alemã. Fim da guerra, não pode voltar para a sua terra natal, onde as populações germânicas estavam sendo expulsas ou extermínadas. Viveu como trabalhadora rural e, em 1946, ingressou no curso de Agronomia da Universidade de Munique, onde se graduou em 1950. Em uma época de raro conhecimento sobre microrganismos na agricultura e a importância da fixação biológica do nitrogênio, sua monografia de conclusão do curso abordava "Bactérias de fixação assímbiotica de nitrogênio e a possibilidade de seu aproveitamento para a agricultura". Embora fosse uma monografia teórica, pois os laboratórios haviam sido desativados na guerra, ali estava o primeiro passo traçando seu futuro.

Em 1946, o pai da Dra. Johanna veio para o Brasil, onde trabalhou no Departamento Nacional de Produção Mineral e, em 1950, viabilizou a vinda da filha recém-formada e recém-casada com o colega Jurgen Döbereiner. Desde sua chegada ao Brasil, Dra. Johanna foi incansável em procurar um emprego em microbiologia do solo, conseguindo ser finalmente contratada no Serviço Nacional de Pesquisas Agronômicas do Ministério da Agricultura (SNPA), instituição antecessora da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa agropecuária). Em 1951 já assinava seu primeiro trabalho científico, "Influência da cobertura do solo sobre a flora microbiana". E não parou. Foi pioneira em apontar que a microbiologia do solo nos trópicos era distinta daquela que se conhecia nas regiões temperadas, exigindo o desenvolvimento de novas metodologias e estratégias. Desde que pisou em nossas terras, já se sentia brasileira, sempre mencionava "nossos solos" e, em 1956, se naturalizou. Nunca houve desvios em sua carreira, suas metas eram claras e seu trabalho inovador até o final, nos laboratórios da hoje Embrapa Agrobiologia, em Seropédica, no Rio de Janeiro.

Econômica e ambientalmente, sua maior contribuição certamente foi a de convencer os melhoristas da soja que compunham a "Comissão Nacional da Soja", encarregada de definir os rumos da cultura no Brasil, a utilizar a fixação biológica do nitrogênio e não fertilizantes nitrogenados. Hoje, o Brasil é líder na produção dessa leguminosa e no uso da tecnologia de fixação biológica do nitrogênio, fundamental para a viabilidade econômica da cultura. Cientificamente, sua maior contribuição foi a descoberta de bactérias que também podiam fixar nitrogênio em associação com gramíneas. Por essas contribuições, recebeu muito prêmios e foi candidata ao prêmio Nobel de Química. Formou dezenas de pesquisadores, que hoje são líderes em vários grupos de pesquisa e dão continuidade ao seu trabalho em todas as regiões do Brasil. A grande maioria dos

ex-alunos compõe um Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Microrganismos na Agricultura, o MicroAgro.

As comemorações do centenário da Dra. Johanna foram encabeçadas pela Academia Brasileira de Ciências (ABC) e pela Sociedade Brasileira de Progresso à Ciência (SBPC). Iniciaram em fevereiro de 2024, estenderam-se com exposições no Congresso, sessões em eventos científicos. A última atividade de 2024 foi um workshop realizado na ABC, no dia em que Dra. Johanna completaria 100 anos. O formato do workshop foi distinto, pois o objetivo era o de fazer um balanço sobre a contribuição que a Dra. Johanna em cada linha de pesquisa que desenvolveu, relembrar de fatos que não constam em artigos científicos e indicar a continuidade e o impacto nos dias de hoje. Foi um evento científico e sentimental, que pode ser assistido no canal da ABC.

Para que essas lembranças do workshop não sejam esquecidas, lançamos os anais. São memórias. Os temas apresentados no evento foram transpostos em textos, com fotografias, resgates históricos e a mensagem de que uma mente brilhante, quando encontra apoio para o desenvolvimento de suas pesquisas, traz uma enorme contribuição ao país e para o mundo.

*Helena Bonciani Nader
Presidente da Academia Brasileira de Ciências
Mariangela Hungria
Diretora da Academia Brasileira de Ciências*

Sumário

Dra. Johanna Döbereiner na Ciência, na Agricultura e na Formação de Recursos Humanos

11

A carreira impecável de uma cientista brilhante e seu impacto na ciência agrícola brasileira

Avílio Antônio Franco, Diogenes de Almeida Campos, Ildeu de Castro Moreira

31

Como a crença e a perseverança da Dra. Johanna Döbereiner na capacidade da fixação biológica do nitrogênio da soja impactaram a agricultura brasileira

Mariangela Hungria, Iêda Carvalho Mendes

49

Esforços para a melhoria da fixação biológica de nitrogênio com a leguminosa de maior importância alimentar no Brasil, o feijão-comum

Enderson Petrônio de Brito Ferreira, Ricardo Silva Araujo, Pedro Antônio Arraes Pereira, Helton Santos Pereira, Marcio Vinicius de Carvalho Barros Côrtes

69

Um olhar especial para a fixação biológica de nitrogênio com leguminosas arbóreas em ambientes naturais e reflorestamento

Sérgio Miana de Faria, Fátima Maria de Souza Moreira

83

Johanna Döbereiner e sua grande descoberta: A contribuição de bactérias diazotróficas associadas às gramíneas

Fábio Bueno dos Reis Junior, José Ivo Baldani

97

Importância da quantificação da fixação biológica de nitrogênio em culturas de leguminosas e gramíneas

Segundo Urquiaga, Bruno J. R. Alves, Claudia Jantalia, Robert M. Boddey

109

The legacy of Johanna Döbereiner in Argentina: Microbiology and the agriculture transformation

Mariana Laura Puent, Enrique Rodríguez Cáceres, Julia Elena García, Esteban Rubio, Santiago Adolfo Vio, Raúl Osvaldo Pedraza, María Flavia Luna, José Alfredo Curá, Fabricio Darío Cassán

121

Contribuição da Dra. Johanna Döbereiner para a compreensão da nutrição nitrogenada da cultura de cana-de-açúcar, com a ativa participação de bactérias diazotróficas

Veronica Massena Reis, Segundo Urquiaga

129

Cooperação da Dra. Johanna Döbereiner com o “Helmholtz Center for Health and Environment” de Munique, Alemanha: estudos envolvendo *Azospirillum* e outras rizobactérias diazotróficas

Anton Hartmann, Fabio Lopes Olivares

141

A herança de uma mulher à frente de seu tempo no ensino, na formação e na construção de novas gerações de microbiologistas do solo no Brasil

Fatima Maria de Souza Moreira, Marcos Gervasio Pereira, Cristhiane Oliveira da Graça Amâncio, Everaldo Zonta

Dois Relatos Pessoais Sobre Dra. Johanna Döbereiner

157

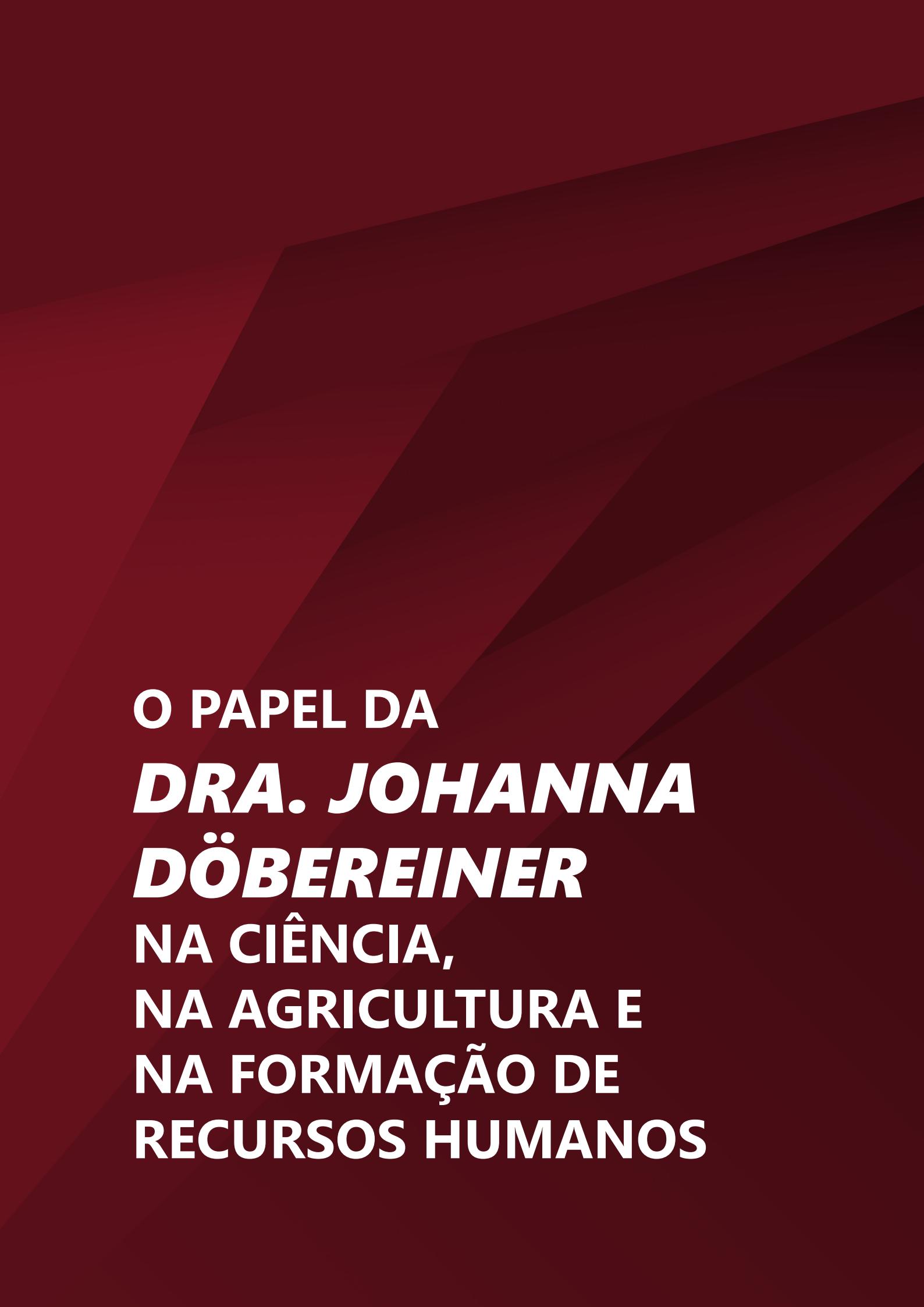
O legado de Johanna Döbereiner: Impactos na pesquisa em bioquímica e biologia molecular da fixação de nitrogênio no Brasil

Fábio de Oliveira Pedrosa

170

Memórias de Nossa Mãe!

Christian Döbereiner, Marlis Arkcoll



O PAPEL DA
**DRA. JOHANNA
DÖBEREINER**
NA CIÊNCIA,
NA AGRICULTURA E
NA FORMAÇÃO DE
RECURSOS HUMANOS

A carreira impecável de uma cientista brilhante e seu impacto na ciência agrícola brasileira

Avílio Antônio Franco¹
Diogenes de Almeida Campos²
Ildeu de Castro Moreira³

Revisado por: Mariangela Hungria

¹Membro Titular da Academia Brasileira de Ciências; Membro Titular da Academia Brasileira de Ciências Agronômicas; Membro Titular da Academia Mundial de Ciências para o avanço da ciência em países em desenvolvimento.

²Membro Titular da Academia Brasileira de Ciências; Coordenador executivo do Museu de Ciências da Terra do Serviço Geológico do Brasil. Av. Pasteur, 404 - 2º Andar - Urca, Rio de Janeiro - RJ, 22290-255.

³Professor da Universidade Federal do Rio de Janeiro e Presidente de Honra da SBPC. Instituto de Física, Bloco A Centro de Tecnologia, Av. Athos da Silveira Ramos, 149 – Cidade Universitária, Rio de Janeiro – RJ, 21941-909.

1. O começo

Johanna Döbereiner nasceu em Ústí nad Labem, anteriormente conhecida pelo seu nome alemão Aussig, uma cidade na Boêmia, na atual República Checa, em 28 de novembro de 1924. Suas melhores lembranças da juventude são de Praga, para onde sua família se mudou muito cedo e onde ela cresceu.

Após a Segunda Guerra Mundial, já na Alemanha, ela sobreviveu trabalhando no cultivo de batatas e na ordenha de vacas. O *hobby* de seu avô de cultivar uvas e a experiência de trabalhar na fazenda certamente influenciaram sua decisão de tornar-se engenheira agrônoma.

Aos 23 anos, iniciou seus estudos de graduação e, em 1950, formou-se como Engenheira Agrônoma pela Escola Superior Weihenstephan, em Freising, perto de Munique, Alemanha. Sua monografia abordou o uso de uma bactéria fixadora de nitrogênio assimbiótica (*Azotobacter chroococcum*) na agricultura.

Nascida Johanna Liesbeth Kubelka, Johanna adquiriu o sobrenome Döbereiner ao casar-se, em 26 de março de 1950, com o veterinário Jürgen Döbereiner (1923-2018), chegando ao Brasil em 15 de novembro de 1950.

2. Primeiros dias no Brasil

Devemos a Paul Kubelka, seu pai, a vinda de Johanna para o Brasil, e ao Dr. Álvaro Barcelos Fagundes, diretor do antigo Serviço Nacional de Pesquisa Agronômica (SNPA), a oportunidade de ela se tornar uma cientista brasileira. Em fevereiro de 1951, Johanna reuniu-se pela primeira vez na sede do SNPA para ser entrevistada pelo Dr. Fagundes. Já no mesmo ano, ambos apresentaram um artigo sobre o efeito da cobertura do solo na microflora, no terceiro Encontro Brasileiro de Ciência do Solo. A crença do Dr. Fagundes no potencial da fixação biológica de nitrogênio na agricultura, combinada com a recente experiência da Dra. Johanna ao escrever sua monografia de graduação foram decisivas para sua admissão no SNPA.

Seu primeiro artigo internacional foi publicado dez anos depois, na revista *Plant and Soil*, explorando bactérias fixadoras de nitrogênio que pudessem beneficiar a cana-de-açúcar, especificamente aquelas do gênero *Beijerinckia* na rizosfera da planta. Johanna acreditou firmemente, durante toda a sua vida, que a fixação biológica de nitrogênio poderia beneficiar sistemas de cultivo de forma sustentável.

3. Carreira científica

Johanna viveu e trabalhou em Seropédica, no Km 47 da antiga estrada Rio-São Paulo, durante toda a sua vida, exceto por dois anos (1961-1963), quando fez seu mestrado em Wisconsin, EUA. Lá, estudou o efeito da toxicidade do manganês na fixação biológica de nitrogênio no feijão. Ela também passou um ano na Estação Experimental de Rothamsted Research, na Inglaterra, onde aprendeu a técnica de redução de acetileno para estimar a atividade da nitrogenase em raízes de *Paspalum notatum*. Essa técnica permitiu um rápido avanço nos estudos de fixação biológica de nitrogênio em plantas sem nódulos.

Ao longo de sua vida, Johanna promoveu uma forte colaboração entre seu laboratório e sua equipe com outros laboratórios relevantes ao redor do mundo, compartilhando ideias, materiais e metodologias sem restrições. Uma de suas maiores qualidades era a abertura para trocar ideias e instigar positivamente a todos, alunos e colegas, sem medo da competição. Ela acreditava que havia muito a ser feito em condições tropicais e que precisávamos agregar forças o máximo que pudéssemos.

Iniciando sua carreira no Serviço Nacional de Pesquisa Agronômica (SNPA) e passando pelo Centro Nacional de Ensino e Pesquisas Agronômicas (CNEPA), depois Departamento Nacional de Pesquisa Agropecuária (DNPEA) no Instituto de Pesquisa Agropecuária do Centro Sul (IPEACS) e, finalmente, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa na Embrapa Agrobiologia, Johanna liderou e impulsionou o avanço das pesquisas sobre a fixação biológica de nitrogênio. Seu trabalho teve grande influência na adaptação das culturas da soja e feijão às condições brasileiras. Ela formou muitos dos alunos mais brilhantes da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e de outras universidades, além de contribuir para a criação do próprio centro de pesquisas: Embrapa Agrobiologia. Brasileira por opção como sempre tinha orgulho de dizer, naturalizou-se Brasileira em 1956.

De 1950 a 2000, Johanna publicou uma média de 3,7 artigos por ano, uma quantidade impressionante, especialmente considerando as limitações tecnológicas da época. Não só a quantidade de publicações, mas principalmente o impacto das informações nelas contidas, fez dela a cientista mulher brasileira mais citada e a quinta cientista brasileira, entre ambos os sexos, mais citada internacionalmente. Seu nome era respeitado em laboratórios ao redor do mundo, e trabalhar com ela era considerado um privilégio.

Johanna foi membro de três Academias de Ciências: a Academia Brasileira de Ciências (ABC), a Pontifícia Academia de Ciências do Vaticano e cofundadora da Academia Mundial de Ciências para o Avanço da Ciência nos Países em Desenvolvimento (TWAS). Hoje, a cadeira 46 da Academia Brasileira de Ciências Agronômicas (ABC) leva seu nome. Ela foi uma das cientistas mais reconhecidas pela comunidade científica nacional e internacional, recebendo inúmeras homenagens e



Figura 1. Lançamento das comemorações do centenário Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ



Figura 2. Busto colocado no prédio Johanna Döbereiner
Doação: Prefeitura de Seropédia, RF
20/02/2024



Figura 3. Inauguração da Biblioteca Johanna Döbereiner
PESAGRO em Niterói, RJ



Figura 4. 63º Fórum Nacional CONSECTI & CONFAP
Brasília, DF – 13 15/03/2024



Figura 5. Homenagem na 76^a Reunião da SBPC
Belém, PA – 11/07/2024



Figura 6. Exposição no corredor do anexo 2 da câmara dos deputados
Brasília, DF – 28/08/2024



Figura 7. Nave do conhecimento Johanna Döbereiner no Parque Oeste
Campo Grande, Rio de Janeiro, RJ – 14/09/2024

prêmios, incluindo uma indicação ao Prêmio Nobel em 1997. Uma descrição completa de seus prêmios pode ser vista no livro de Kristina Michahelles: *Hanne Johanna Döbereiner - Uma vida dedicada a ciência*. (1^a Edição, 2018, ISBN 9788590636106). As homenagens pelo centenário de seu nascimento neste ano foram muitas, incluindo a cerimônia que estamos assistindo hoje na ABC.

4. Seleção e formação de alunos e pesquisadores

Uma das grandes contribuições de Johanna para a ciência brasileira foi a identificação, formação e incentivo a novos cientistas. Ela tinha uma intuição aguçada para tudo, incluindo a capacidade de identificar entre os alunos aqueles que tinham potencial para se tornarem bons cientistas. Persistente, resiliente e muito disciplinada, Johanna usava essas características para testar os recém-chegados.

O laboratório de Johanna ficava dentro de um *campus* universitário e oferecia bolsas de estudo para alunos de graduação, concedidas pelo Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq). Muitos alunos buscavam treinamento em seu laboratório, incluindo um de nós. No primeiro contato, ela costumava dar muitas separatas e livros, todos eles em inglês ou francês, pois havia pouca literatura disponível em português sobre o tema naquela época. Os alunos tinham no máximo uma semana para desvendar aquele mistério e propor uma ideia do que poderia ser feito. Aqueles que voltavam com ideias utilizáveis eram acolhidos e orientados a continuar com o projeto. Johanna se empolgava com os jovens que considerava brilhantes e lhes dava todo o apoio necessário, muitas vezes além do âmbito profissional, exigindo sempre muito trabalho duro, é claro. Com isso, Johanna e os alunos formados em seu laboratório se tornaram cientistas muito importantes, não só no sistema Embrapa, mas também em muitas universidades e instituições de pesquisa. Cientistas formados por Johanna estão entre os mais reconhecidos na ciência: cinco são membros efetivos da Academia Brasileira de Ciências (Avílio Antônio Franco, Fabio Pedrosa, Mariangela Hungria, Fátima Maria Magalhães e Segundo Urquiaga Caballero), três são membros da Academia Brasileira de Ciências Agrárias (Avílio Antônio Franco, Mariangela Hungria e Segundo Urquiaga Caballero) e dois são membros da Academia Mundial de Ciências para o Avanço da Ciência nos Países em Desenvolvimento (Avílio Antônio Franco e Mariangela Hungria). Isso é mais do que em qualquer outra instituição de pesquisa agropecuária no Brasil.

Pedro Arraes, um dos orientados foi presidente da Embrapa, e José Roberto Peres, outro aluno, foi o diretor mais longevo da Embrapa, ocupando a presidência interina algumas vezes. Uma cadeira da Academia Brasileira de Ciências Agronômicas (ABCAG) leva o nome de um dos estagiários de seu laboratório: Newton Pereira Stanford. O atual vice reitor da Universidade Estadual Norte Fluminense (UENF), Fabio Olivares foi seu orientado. O empresário mais importante da área de produção de inoculantes, inicialmente pesquisador do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Paraná, Dr. Solon Cordeiro de Araújo, líder incontestado da melhoria da qualidade dos inoculantes produzidos no Brasil, foi estagiário e vem mantendo forte vínculo com o laboratório de Johanna até hoje.

O treinamento oferecido por Johanna não era apenas para alunos, mas também a muitos cientistas de diferentes países. Desde 1976, a cada dois anos, havia um



Figura 8. Participantes do primeiro curso de julho em 1976

curso intensivo de um mês, trazendo cientistas de maior destaque de laboratórios ao redor do mundo para ministrar cursos e desenvolver projetos de pesquisa. Muitos desses projetos resultaram em avanços significativos na ciência.

5. Importância para o Sistema Embrapa

A Embrapa Agrobiologia tem duas características incorporadas por Johanna que ajudaram muito a aumentar a produtividade do Centro: a formação de alunos em todos os níveis e a publicação dos resultados de pesquisa. A proximidade com a UFRRJ facilitou a formação de alunos, e essas práticas, que ainda não são comuns em alguns institutos de pesquisa, foram disseminadas para todos os centros da Embrapa e outros centros de pesquisa onde ex-estagiários da Embrapa Agrobiologia foram trabalhar. Essa integração é especialmente importante em regiões onde as instituições de pesquisa possuem laboratórios mais bem equipados do que as universidades locais. Trabalhando de forma complementar, essas instituições aumentam a eficiência do uso de recursos públicos e ajudam a identificar talentos, proporcionando-lhes a oportunidade de se tornarem cientistas. O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e as outras agências que oferecem bolsas de estudo para alunos de graduação desempenham um papel fundamental nesse processo.

6. Importância para a economia e sustentabilidade dos sistemas de cultivo.

Nas décadas de 1950 e 1960, a inoculação de leguminosas com rizóbios já era utilizada em alguns países, com a Austrália liderando o avanço da tecnologia para solos tropicais. Nessa época, o professor João Ruy Jardim Freire, do Instituto de Pesquisas e Desenvolvimento Agropecuário do Rio Grande do Sul (IPAGRO), e a empresa Leivas Leite já distribuíam inoculantes de soja, trevo e alfafa de forma limitada, usando cepas de rizóbio importadas.

A realização da quarta Reunião Latino Americana sobre Rhizobium (VI RELAR) em Porto Alegre contou com as principais lideranças da América Latina sobre o tema mostrando a coesão entre os pesquisadores que já existiam naquela época. Dra. Johanna e Dr. Jardim Freire representavam certamente as principais lideranças brasileiras.



Figura 9. Participantes da IV^a RELAR com destaque para as principais lideranças da época e futuras, no desenvolvimento da tecnologia de inoculação de leguminosas com rizóbio:
1- Johanna Döbereiner, 2- João Ruy J. Freire, 3- Carlos Bathyany do Uruguai, 4- Henrique Schiel da Argentina, 5- Solon C. de Araújo, 6- John Thompson da Austrália, 7- Alaides P. Ruschel, 8- Carlos Labandera do Uruguai, 9- Caio Vidor, 10- Avílio A. Franco.

Em 1963, Johanna se juntou ao grupo de cientistas da Comissão Nacional da Cultura da Soja, instituída pelo DNPEA. Essa Comissão, composta por melhoristas e fitotecnistas e especialistas em nutrição de plantas, reunia-se anualmente para validar resultados de experimentos realizados no ano anterior e planejar aqueles a serem realizados por todas as instituições no próximo ano. Com seu grande poder de convencimento, Johanna conseguiu que os melhoristas usassem a inoculação em vez de fertilizantes nitrogenados nos programas de melhoramento. O laboratório do IPEACS forneceria os inoculantes para esses experimentos.

Posteriormente foi incluída uma série de experimentos para testar as variedades de soja mais promissoras com os inoculantes existentes na época. Inicialmente as variedades foram testadas contra os inoculantes de rizóbio disponíveis e, posteriormente, por insistência do Dr. Solon Cordeiro de Araújo, com as melhores cepas de rizóbio disponíveis. O laboratório de Johanna no IPEACS preparava e fornecia os inoculantes. A cooperação entre os melhoristas, agrônomos e microbiologistas do solo brasileiros permitiu adaptar a soja para crescer com alta produtividade nos trópicos, sem a necessidade de fertilizantes nitrogenados. Isso representa cerca de 15 bilhões de dólares por ano para a economia brasileira, com uma produção

estimada de 169 milhões de toneladas de soja em 2024/2025. Johanna e sua equipe foram fundamentais nas etapas iniciais desse processo, antes da criação da Embrapa com o Centro da Embrapa Soja.

A importância de Johanna não se restringiu à cultura da soja. Sua dissertação de mestrado abordou o efeito da toxicidade do manganês na nodulação e fixação de nitrogênio do feijão, e o primeiro projeto de pesquisa de um de nós para uma bolsa de Iniciação Científica do CNPq, sob sua orientação, foi sobre o efeito da calagem do solo com toxidez de manganês na nodulação do feijão. Nessa linha de pesquisa, grande avanço se deu na identificação dos fatores limitantes do solo e do meio ambiente na fixação biológica de nitrogênio e no isolamento e seleção de cepas de rizóbio mais eficientes e mais tolerantes a temperaturas elevadas para a cultura do feijoeiro.

Embora tenha concentrado sua atenção na fixação biológica de nitrogênio em gramíneas, batata e dendê, Johanna sempre acompanhou projetos relacionados a leguminosas, incluindo diversas culturas de grão, leguminosas de pastagem e até mesmo leguminosas arbóreas, como a *Mimosa caesalpiniifolia*. Os estudos sobre nodulação de leguminosas tornaram-se uma das principais áreas de pesquisa de seu laboratório, com o desenvolvimento de tecnologias de cobertura do solo, enriquecimento de pastagens e recuperação de solos degradados, usando leguminosas noduladas e micorrízicas.

7. Importância para o avanço da ciência - fixação biológica de nitrogênio em plantas que não nodulam

Desde sua graduação, Johanna estava muito interessada no efeito de bactérias fixadoras de nitrogênio na produtividade do solo. Seu primeiro projeto de pesquisa no Brasil com o Dr. Fagundes também foi sobre o efeito da microflora, resultando na publicação de seu primeiro artigo internacional: *Bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero Beijerinckia Derx na rizosfera da cana-de-açúcar (Plant and Soil, 1961)*. Seu mestrado focou no feijão, e ela sempre manteve alguns alunos trabalhando na fixação biológica de nitrogênio de leguminosas. No entanto, seu grande entusiasmo e contribuição mais importantes para o avanço da ciência foram nos estudos da interação de bactérias fixadoras de nitrogênio com gramíneas e outras espécies não leguminosas. Trabalhando com ferramentas simples, tenacidade, persistência e muita intuição, Johanna foi pioneira mundial nos estudos da fixação biológica de nitrogênio nessas associações.

O meio de cultura semissólido desenvolvido por Fabio Pedrosa, ainda estudante de graduação, meio esse que recebeu seu nome, permitiu que algumas das bactérias fixadoras biológicas de nitrogênio escolhessem o melhor nível de oxigênio no meio de cultura para crescer e formar uma película visível. Essa técnica foi muito utilizada por Johanna em seus estudos para analisar a interação das bactérias fixadoras de nitrogênio com as raízes das plantas.

Durante sua licença sabática na Estação Experimental de Rothamsted na Inglaterra, em 1969, Johanna incorporou a metodologia de redução de acetileno para estimar a atividade da nitrogenase em laboratório, o que foi fundamental para o avanço dos estudos sobre fixação biológica de nitrogênio em plantas sem nódulos.

A técnica de enriquecimento com ^{15}N utilizada por Helvécio De Polli em sua tese de mestrado no Centro de Energia Nuclear de Agricultura (CENA), foi um marco para validar a incorporação de N_2 em plantas de *Paspalum notatum*, uma gramínea.

Outros estudos demonstraram a presença de bactérias fixadoras de nitrogênio em muitas culturas, como batata-doce e dendê, e altas taxas de fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar, milho e várias gramíneas, tanto na rizosfera e quanto dentro das raízes. Posteriormente, comprovou-se que, além de fixar nitrogênio, essas bactérias também estimulam o crescimento do sistema radicular. Hoje, a inoculação de plantas com essas bactérias é uma realidade, com muitas empresas produzindo inóculo e agricultores utilizando-os.

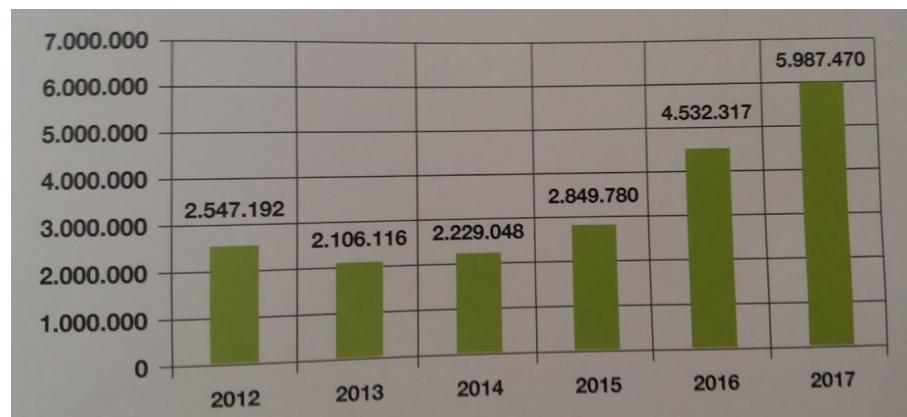


Figura 10. Uso de doses de inóculo contendo *Azospirillum* no Brasil no período de 2012 a 2017 (Araujo, Solon Cordeiro 2018, Caminhos, escolhas e conquistas. ANPII 138 p.)

8. Importância para o avanço da ciência e sustentabilidade dos sistemas de cultivo

A Dra. Johanna contribuiu para a ciência com ética, alta qualidade, tenacidade e persistência, sempre focando nos fundamentos dos processos e na sustentabilidade dos sistemas de cultivo. A praça que fica entre o Ministério de Ciência, Tecnologia e Informação e o Ministério da Agricultura foi nomeada em sua homenagem e simboliza muito da sua filosofia: olhar os fundamentos da ciência, buscando o avanço do conhecimento para resolver problemas práticos.

Ela teve um papel crucial no avanço do conhecimento sobre fixação biológica de nitrogênio e a interação benéfica de microrganismos com plantas, ajudando a tornar a agricultura o principal suporte da economia do Brasil. Sua influência se estendeu ao avanço da ciência conduzida pela Embrapa como um todo e muitos outros centros de pesquisa, pela formação intensiva de cientistas, pela interação com diversos laboratórios ao redor do mundo e pela criação de um Centro de Pesquisa com a missão de maximizar os processos biológicos na produção agrícola com sustentabilidade.

Gostaríamos de encerrar essa parte do nosso depoimento com uma mensagem da Dra. Johanna Döbereiner: "O uso de novas descobertas na fixação biológica de nitrogênio em sistemas agrícolas os tornará mais econômicos, mais produtivos e menos arriscados ao meio ambiente."

9. Atuação na Academia Brasileira de Ciências

Como resultado de suas importantes e inovadoras pesquisas, Johanna Döbereiner foi indicada e eleita por seus pares como membro titular da Academia Brasileira de Ciências em 1977, uma honra que também lhe valeu posteriormente uma indicação ao Prêmio Nobel. Essa indicação ampliou a representação de cientistas na área das ciências agrárias dentro da Academia e valorizou as atividades científicas realizadas nas instituições, onde Johanna trabalhava e ensinava.



Figura 11. Johanna Döbereiner por ocasião de sua posse na Academia Brasileira de Ciências, com Rubens da Silva Santos e Maurício Matos Peixoto, em 19 de abril de 1977. Foto ABC.



Figura 12. Johanna Döbereiner com a família e colaboradores por ocasião de sua posse, em 19 de abril de 1977, na Academia Brasileira de Ciências. Da esquerda para a direita: Avílio Antônio Franco, Dejair Lopes de Almeida, Lorenz Döbereiner, Johanna Döbereiner, Jürgen Döbereiner, Christian Döbereiner e Lilian Döbereiner. Foto ABC.

Seus colaboradores e estudantes, como já dito antes, continuam a avançar suas pesquisas. Eles têm trabalhado incansavelmente para usar a ciência no desenvolvimento da agricultura, na redução da pobreza e no combate à fome.



Figura 13. Johanna Döbereiner em seu escritório de trabalho. Foto ABC.

A indicação para prêmios e homenagens tem sido uma forma efetiva de valorizar o trabalho dedicado e desinteressado dos cientistas que buscam incessantemente ampliar o conhecimento. Com esse objetivo, a Academia indicou Johanna Döbereiner para o *Premio México de Ciencia y Tecnología* 1992. A conquista desse prêmio, como a própria pesquisadora sempre reconhecia, atuou como um chamariz para outros prêmios e honrarias, incluindo sua indicação como membro da prestigiosa Pontifícia Academia das Ciências, no Vaticano.

Por outro lado, de forma desprendida, Johanna Döbereiner deu uma grande contribuição à Academia. Em seu discurso de posse, em 1977, ela reconheceu a preocupação central da instituição, que a recebia, com a ciência, especialmente pela garantia da liberdade de pesquisa. Representando a Academia, ela participou de diversas comissões e eventos, além de servir como membro da Diretoria, como Secretária (1991-95) e depois como Vice-Presidente (1995-97), demonstrando a marcante presença feminina nas atividades científicas.

Entre os eventos mencionam-se a Reunião de Cúpula sobre População da Academia de Ciências do Mundo (*Population Summit of the World's Scientific Academies*), em Nova Déli, Índia, em 1993; a Reunião da Academia de Ciências da América Latina, Santiago, Chile, também em 1993; a diplomação dos Membros Corporativos da Academia Brasileira de Ciências, em 1994; a Quinta Conferência Geral da TWAS em Abuja, Nigéria, em setembro de 1995; a participação nas reuniões da Comissão Mundial Independente sobre os Oceanos a partir de 1995; e a *Science for Sustainable Development in Latin America and the Caribbean*, no Rio de Janeiro, em 1997.

Durante sua participação como membro da Diretoria da ABC, Johanna foi responsável por ações administrativas e modificações estatutárias, incluindo a



Figura 14. Johanna Döbereiner com Mario Vianna Dias, Eduardo Moacyr Krieger e Mauricio Matos Peixoto por ocasião de diplomação dos Membros Corporativos, em 9 de dezembro de 1994. Foto ABC.



Figura 15. Johanna Döbereiner por ocasião de reunião da Comissão Mundial Independente sobre os Oceanos. Da esquerda para direita: Diógenes Campos, Eduardo Krieger, Mário Soares e José Israel Vargas. Foto ABC.



Figura 16. Johanna Döbereiner ladeada por José Israel Vargas e o presidente Fernando Henrique Cardoso, por ocasião da Science for Sustainable Development in Latin America and the Caribbean, no Rio de Janeiro, em setembro de 1997. Foto ABC.

criação da área das Ciências Agrárias no quadro de membros da Academia. Essas ações melhoraram significativamente a atuação da instituição na valorização e promoção das ciências no Brasil.

Outra atuação importante de Johanna foi o seu desvelo em participar do Programa Aristides Pacheco Leão de Vocações Científicas, iniciado em 1994, e que tinha como objetivo possibilitar o estágio de universitários oriundos de regiões menos desenvolvidas do país em laboratório dirigidos por membros da Academia Brasileira de Ciências, durante o período de férias de verão, em regime de tempo integral. Diversos estudantes passaram por seu laboratório, levando conhecimento e prática para suas instituições de origem.

Tem sido lembrado o entusiasmo de Johanna em comentar, por ocasião de receber estudantes da Universidade Estadual de Feira de Santana, na Bahia, do interesse desses estudantes em identificarem bactérias diazotróficas em cactáceas que vicejam sobre fios que se estendem sobre as ruas de várias cidades brasileiras.

Em 1994, ela foi condecorada pelo presidente da República na Ordem Nacional do Mérito Científico, na classe Grã-Cruz. Johanna Döbereiner veio a falecer em 10 de maio de 2000.

Como parte da Quinta Primavera dos Museus – evento organizado anualmente pelo Instituto Brasileiro de Museus (IBRAM) – e alinhado à temática proposta para o ano de 2011, *Mulheres, museus e memórias*, o Museu de Ciências da Terra reverenciou Johanna Döbereiner, uma das mulheres mais lembrada na ciência brasileira.

O que liga o trabalho de Johanna ao acervo do Museu de Ciências da Terra são os fertilizantes, cujos minérios de potássio e fósforo estão presentes no acervo do Museu.

Com materiais do acervo pessoal de Johanna Döbereiner, gentilmente cedidos pela Embrapa e com amostras de minerais do acervo do Museu, foi montada a exposição temporária que se estendeu por toda a semana da Primavera dos Museus (19 a 25 de setembro).

Participaram da cerimônia de abertura da exposição além da equipe do Museu, o Dr. Jürgen Döbereiner, viúvo da homenageada, e o Dr. Avílio A. Franco, que inauguraram a exposição, lembrando a dedicada atividade científica da pesquisadora Johanna.

O mesmo Museu de Ciências da Terra, por ocasião da Semana Nacional de Ciência e Tecnologia de 2016, cujo tema foi *Ciência alimentando o Brasil*, preparou uma nova exposição temporária intitulada *Recursos minerais na agricultura*, na qual apresentava exemplares de minerais de fósforo, como a apatita, e de potássio, como a carnalita e a silvita. Na parte destinada ao nitrogênio, foi apresentado um painel em homenagem a Johanna Döbereiner no qual se salientava a importância de sua pesquisa e de seus colaboradores sobre a fixação biológica do nitrogênio em cultivo de plantas que permitia o consumo de alimentos saudáveis e mais baratos.

10. Johanna Döbereiner e a SBPC

A pesquisadora Johanna Döbereiner teve uma interação significativa com a SBPC ao longo de sua carreira. Foi comum a muitos jovens pesquisadores, entre as décadas de 1950 e 1970, darem início à apresentação pública de seus trabalhos

científicos em reuniões anuais da SBPC. Neste período, a SBPC, uma entidade científica multidisciplinar, acolhia em suas reuniões anuais pesquisadores e estudantes de muitas áreas do conhecimento, mesmo porque existiam ainda poucas sociedades científicas de áreas específicas. Muitas delas, que surgiram nas décadas seguintes, emergiram dos espaços de discussão dentro da SBPC e foram, ao longo do tempo, organizando seus encontros científicos específicos. Nas reuniões anuais da SBPC, que se iniciaram em 1948, a grande maioria dos trabalhos científicos era apresentada por meio de comunicações orais, cujos resumos estendidos eram publicados em suplementos da revista Ciência e Cultura (C&C) da SBPC. Eles foram se transformando em grossos volumes, nas décadas seguintes, em função do grande crescimento no número das comunicações.

Johanna Döbereiner estreou na SBPC na VIII^a Reunião Anual, ocorrida em Ouro Preto em julho de 1956, quando tinha uns cinco anos de Brasil. Ali, tendo Américo Groszmann como coautor, apresentou a comunicação "Diferenças fisiológicas e morfológicas entre tribos de bactérias do gênero *Beijerinckia* isoladas em solo brasileiro". No primeiro parágrafo delinearam claramente o objetivo das pesquisas que iniciavam e ressaltaram a importância da 'pesquisa pura': "Microrganismos têm sido ultimamente objeto de estudos básicos de genética e evolução. Fíéis à tese de que é possível realizar pesquisa pura em organismos de valor econômico, escolhemos as bactérias do gênero *Beijerinckia*, comuns em solos tropicais ácidos, capazes de fixar o azoto livre do ar, colocando-o em forma assimilável pelas plantas" (Groszmann & Döbereiner, 1956a). Logo depois afirmam que "Döbereiner foi quem primeiro observou o gênero no Brasil", em 1955.

No entanto, a primeira referência a Johanna Döbereiner na C&C já surgira um pouco antes, no número 1 do volume 8, de 1956 (Groszmann & Döbereiner, 1956b), quando se noticiou a apresentação de seu trabalho no primeiro encontro realizado pela Região Brasil da Sociedade Internacional de Biometria, em janeiro daquele ano no Instituto Biológico. O trabalho tinha também Américo Groszmann como coautor: "Problemas na análise estatística do crescimento de populações de bactérias". Em 1959, na XI Reunião Anual da SBPC na Universidade da Bahia, em Salvador, em conjunto com Roberto Avahydo, ela apresentou a comunicação "Influência da umidade do solo na população de bactérias do gênero *Beijerinckia Derox*". Este trabalho resultou na publicação de seu primeiro artigo na C&C, com o mesmo título, e no qual ela é apresentada como "Técnico da Secção de Fertilidade do Solo do Instituto de Ecologia e Experimentação Agrícola e bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas" (Döbereiner & Avahydo, 1959). Seu primeiro trabalho em uma revista científica internacional ocorreria dois anos depois.

Sete anos depois, a C&C noticiava a apresentação de trabalho de Johanna Döbereiner no I^o Simpósio Latino-americano de Microbiologia dos Solos, organizado pela Sociedade Botânica do Brasil e que ocorreu na ABC, em janeiro de 1966, com o título "Fixação Simbiótica de Nitrogênio Atmosférico" (Ciência e Cultura, 1966). Em 1976, na XXVIII Reunião Anual da SBPC, ocorrida em Brasília, Johanna foi escolhida como Presidente de Honra da reunião, o que atestava o seu grande prestígio na comunidade científica. Ela fez um discurso na abertura do evento, tendo sido apresentada por Warwick Kerr.

Foi uma reunião tensa e intensa, com grande participação de pesquisadores e estudantes e com discussões políticas inflamadas em pleno governo Geisel e na

SESSÕES ORGANIZADAS PELA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA

SESSÃO INAUGURAL

Quarta-feira, 7 de julho de 1976, às 20:00 h
Ginásio de Esportes Presidente Médici

Abertura da sessão pelo Presidente da SBPC - Oscar Sala

Oradores:

Coordenador da Comissão Executiva Local - Renato Sérgio Balão Cordeiro

Apresentador da Presidente de Honra da Reunião Anual - Warwick E. Kerr

Johanna Döbereiner - Presidente de Honra da 28. Reunião Anual

Apresentação dos Cientistas de Amanhã

Figura 17. Programação da XXVIII Reunião Anual da SBPC. Centro de Memória AIHda SBPC.

capital do país. Como principal homenageada do evento, Johanna Döbereiner fez um discurso na sessão inaugural da XXVIII^a SBPC no Ginásio de Esportes que estava lotado.

Na XXXII^a Reunião Anual da SBPC, em julho de 1980, na UERJ, Johanna foi convidada para fazer uma conferência com o título "Progressos Recentes na Pesquisa sobre a Fixação de Nitrogênio", tendo sido apresentada pelo físico-químico Ricardo Ferreira. Em 1982, ela publicou, junto com José Ivo Baldani, um longo artigo na C&C: "Bases Científicas para uma Agricultura Biológica" (Döbereiner & Baldani, 1982). Escreveram no último parágrafo, à guisa de conclusão: "Concluímos, portanto, que há muitos subsídios científicos para se desenvolver sistemas agrícolas cada vez mais "biológicos", sem prejuízo da produtividade. Eles são economicamente viáveis e deveriam ser muito melhor explorados. Por outro lado, a preocupação exagerada de eliminar de vez qualquer adubação e defensivos químicos sem fundamento



Figura 18. Johanna Döbereiner discursa na Abertura da XXVIII^a Reunião Anual da SBPC, Centro de Memória AIH da SBPC.

científico não somente trará sérios prejuízos para a produtividade agrícola e a sua rentabilidade como ainda afastará o agricultor das reais vantagens dos sistemas agrícolas acima descritos."

A partir de meados da década de 1970 ela e seu grupo de pesquisas passaram a apresentar muitos trabalhos, em geral a cada dois anos, em encontros da Academia Brasileira de Ciências e eles estão referenciados nos Anais da ABC¹. Quando a revista C&C sofreu uma grande transformação em 1990, e passou a ser publicada em inglês sob a coordenação editorial de Luiz Rodolpho Travassos, Johanna se tornou membro do seu Advisory Board, tendo ali permanecido até meados de 2000. Nesse período publicou na C&C, em 1992, o artigo "Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: Endophytic N₂ fixing bacteria" (Döbereiner, 1992).

A revista de divulgação científica Ciência Hoje, criada pela SBPC em 1982 no Rio de Janeiro, fez um perfil de Johanna em seu número de nov/dez de 1983 (Döbereiner, 1983). Ela foi entrevistada por Carlos Chagas Filho e deixou um interessante depoimento sobre sua trajetória pessoal e científica até aquele momento. Em 1989, Johanna e Helvécio De-Polli escreveram um belo artigo de divulgação científica na Ciência Hoje: "Microbiologia, uma bactéria para a agricultura" (De-Polli & Döbereiner, 1989).



Figura 19. Perfil de Johanna Döbereiner no número 9 da Ciência Hoje, 1983.

¹ A primeira referência a Johanna Döbereiner nos AABC refere-se a uma comunicação dela, "Fixação de Nitrogênio em Gramíneas", apresentada pelo acadêmico E. Malavolta e feito em 9 de setembro de 1975 [Döbereiner, 1975].

Entre a década de 1950 e o ano 2000, a C&C trouxe cerca de uma centena de menções a Johanna Döbereiner, noticiando comunicações, artigos, premiações e outras atividades. O gráfico abaixo traz as menções ao nome “Döbereiner” nos periódicos C&C, Anais da ABC (AABC), O Globo e nos jornais e revistas da base da Hemeroteca Digital da Biblioteca Nacional (HD)². Tais menções traduzem parcialmente a presença de Johanna na mídia impressa brasileira em seu período de atuação profissional no Brasil. Vê-se o crescimento de menções nos AABC a partir da década de 1980 e o maior número de citações gerais a ela na década de 1990.

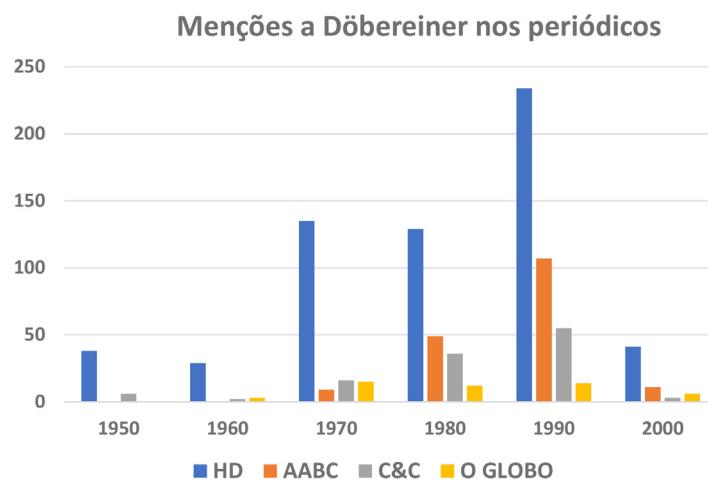


Figura 20. Menções a Johanna Döbereiner em periódicos

Mais recentemente a SBPC teve um papel importante na divulgação da obra de Johanna ao propor ao MCTI e aos Correios e Telégrafos, em 2018, a produção de um selo comemorativo nacional com os nomes dela e de Cesar Lattes, o que foi realizado. Ela foi também motivo de homenagem no Calendário 2020/21 da SBPC, no mês de novembro de 2020.

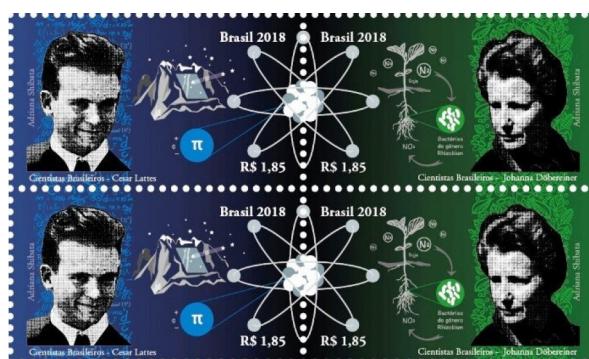


Figura 21. Selo comemorativo de Cesar Lattes e Johanna Döbereiner, 2018.

Em 2023, a SBPC e a ABC criaram comissões para organizar atividades comemorativas do centenário, em 2024, destes dois importantes cientistas. A SBPC, em sua Reunião Anual em Belém, organizou debates sobre as obras desses cientistas

² Na busca nos bancos de dados foi utilizado o sobrenome “Döbereiner”, que permite localizar todas as páginas destes periódicos que fazem referência a este nome. Há alguma falha nisto por causa da presença de outras pessoas com este mesmo sobrenome - como seu marido Jürgen e seu filho Christian - mas sempre em número muito menor (e que foram retirados quando identificados) do que as menções a Johanna Döbereiner, o que não invalida o quadro geral dessas citações.

e de outros, também centenários: Aziz Ab'Saber, Carolina Bori e Berta Ribeiro. Colocou, ainda, grandes painéis sobre cada um deles em lugares estratégicos do campus da UFPA onde a reunião ocorria [Figura 5].

A SBPC, em parceria com a ABC e apoiada por outras instituições como a Embrapa, o CBPF, o MAST e o INCT-CPCT, montou uma bela exposição no Congresso Nacional, no mês de agosto de 2024, "Cientistas do Brasil: Cesar Lattes e Johanna Döbereiner", que, neste momento, está em itinerância por outros estados do país [Figura 6]. A Ciência e Cultura produziu neste ano de 2024 um número especial sobre Johanna Döbereiner, <https://revistacienciaecultura.org.br/?p=7432>, com vários artigos sobre sua obra e que também reproduz o texto por ela escrito para a C&C em 1982. Para a SBPC é um dever homenagear uma cientista que tanto fez pela ciência e pelo país.

11. Referências

- CIÊNCIA E CULTURA, v. 18, n. 3), p. 308, 1966.
- DE-POLLI, H.; DÖBEREINER, J. Microbiologia, uma bactéria para a agricultura. **Ciência Hoje**, v. 7, n. 29, p. 16, 1989.
- DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em gramíneas. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 47, n. 3/4, p. 566-567, 1975.
- DÖBEREINER, J. Perfil: Johanna Döbereiner - Entrevista a Carlos Chagas Filho, **Ciência Hoje**, v. 2, n. 9, p. 68-70, 1983.
- DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: Endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, v. 44, n. 5, p. 310-313, 1992.
- DÖBEREINER, J.; AVAHYDO, E R.. Influência da umidade do solo na população de bactérias do gênero *Beijerinckia* Derx. **Ciência e Cultura**, v. 11, n. 4), p. 208-218, 1959.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. Bases científicas para uma agricultura biológica. **Ciência e Cultura**, v. 34, n. 7, p. 869-881, 1982.
- GROSZMANN, A.; DÖBEREINER, J. Diferenças fisiológicas e morfológicas entre tribus de bactérias do gênero *Beijerinckia* isoladas em solo brasileiro. **Ciência e Cultura**, v. 8, n. 4, p. 242, 1956a.
- GROSZMANN, A.; DÖBEREINER, J. Problemas na análise estatística do crescimento de populações de bactérias. **Ciência e Cultura**, v. 8, n. 1, p. 74, 1956b.

Como a crença e a perseverança da Dra. Johanna Döbereiner na capacidade da fixação biológica do nitrogênio da soja impactaram a agricultura brasileira

*Mariangela Hungria¹
lêda Carvalho Mendes²*

Revisado por: Fabio Bueno dos Reis Junior

¹Membro Titular da Academia Brasileira de Ciências; Embrapa Soja, Cx. Postal 4006, CEP 86.085-981, Londrina-PR

²Embrapa Cerrados, Cx. Postal 08223, CEP 73310-970, Planaltina-DF

1. A trajetória da cultura da soja e da carreira da Dra. Johanna Döbereiner no Brasil: decisões que mudaram o agronegócio no país

A soja é considerada uma das plantas cultivadas mais antigas do mundo, com relatos na literatura chinesa que datam de 2500 anos a.C., embora alguns autores sugiram evidências de seu uso já ao redor 5000 a.C. A região central da China seria o provável centro genético primário, expandindo com a migração das populações para a Manchúria e, então, para outros países asiáticos. Por ser uma planta cultivada há milênios, não é possível assegurar a época em que a domesticação iniciou, embora haja indicações de que possa ter ocorrido durante a dinastia Shang (1500 a 1027 a.C.). Muito interessante, os pictogramas de chinês arcaico ilustram a soja com parte aérea, raiz e nódulos. A leguminosa permaneceu no Oriente até a vinda dos primeiros navios europeus, chegando à Europa em 1712, onde foi estudada como curiosidade botânica e, nos Estados Unidos da América (EUA), em 1765, como forrageira (Vargas & Hungria, 1997; Zancopé & Nasser, 2005; Chang *et al.*, 2015; Gazzoni & Dall’Agnol, 2018).

No Brasil, a leguminosa foi provavelmente introduzida na Bahia como *Soja hispida*. Um primeiro artigo descritivo foi publicado em 1882, por Gustavo D’utra e, em 1889, o mesmo autor relatou cultivo bem-sucedido no Instituto Agronômico de Campinas (IAC), em São Paulo (D’utra, 1882, 1899). Em seus artigos o autor se refere à leguminosa como “realmente preciosa” e “que tão maravilhosamente se tem adaptado ao nosso clima”, observações corretas até os dias de hoje.

A partir dos anos 1940 o cultivo da soja moderna, denominada botanicamente *Glycine max* (L.) Merrill, foi impulsionado na Região Sul, nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, estabelecendo-se no Paraná na década de 1960. Curiosamente, nessa época o programa prioritário do governo brasileiro era o de conseguir autossuficiência no fornecimento de trigo (*Triticum aestivum* L.) e a soja entrou como opção de cultura de verão, formando o binômio trigo-soja. Os estudos foram impulsionados pela criação da Embrapa em 1973 e, a seguir, a Embrapa Soja, em Londrina, em 1975, escolhida por sua posição estratégica, cortada pelo trópico de Capricórnio, apropriada para o melhoramento de cultivares para a já tradicional Região Sul e para a nova fronteira da década de 1970, a Região Centro-Oeste (Vargas & Hungria, 1997; Zancopé & Nasser, 2005; Hungria *et al.*, 2006a; Chang *et al.*, 2015; Gazzoni & Dall’Agnol, 2018). O cultivo da soja continuou crescendo e, em 2023, o país se tornou o maior produtor e exportador mundial dessa leguminosa.

Existem várias publicações sobre a trajetória de vida e científica da Dra. Johanna Döbereiner, que aqui será brevemente compilada, pois ajuda a entender o seu papel na história da soja no Brasil. Nascida em 28 de novembro de 1924 em Aussig (nos Sudetos), na então Tchecoslováquia, sofreu todos os tipos de discriminações na segunda guerra mundial. Decidiu cursar agronomia na Alemanha, onde se formou na Universidade de Munique, em 1950. Nesse mesmo ano veio para o Brasil, onde imediatamente começou a procura por um emprego. Seu caráter insistente já era claro e, graças a ele, conseguiu ser contratada em março de 1951 como assistente de pesquisa do Dr. Álvaro Barcellos Fagundes, diretor do Serviço Nacional de Pesquisas Agronômicas do Ministério da Agricultura (SNPA), quando passou a trabalhar no Laboratório de Microbiologia de Solos. Naturalizou-se em 1956. Em declarações, confessou que ainda não tinha muito conhecimento sobre microbiologia, pois seu trabalho de conclusão de curso

na Alemanha havia sido apenas uma revisão bibliográfica. Mas, como tudo que fazia, colocou empenho e veio a se tornar a maior microbiologista do solo do Brasil (Embrapa Agrobiologia, 2003; Michahelles, 2018).

Trabalhando onde hoje é a Embrapa Agrobiologia, em Seropédica, Rio de Janeiro, Dra. Johanna sempre foi uma entusiasta da capacidade de fixação biológica do nitrogênio (FBN) em leguminosas, incluindo a soja. Juntamente com o prof. João Ruy Jardim Freire, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre, organizaram e participaram de reuniões científicas acaloradas (Figura 1), influenciando decisivamente os rumos que a microbiologia do solo e a cultura da soja tomaram no país.



Figura 1. Dra. Johanna Döbereiner e prof. João Ruy Jardim Freire em 1967, na organização do Primeiro Simpósio Latino-americano de Microbiologia do Solo. Fonte: Arquivos Embrapa.

Como a soja é uma planta exótica no Brasil, não havia rizóbios compatíveis com essa leguminosa nos solos brasileiros. Com a expansão da cultura no Rio Grande do Sul na década de 1950, o prof. Freire trouxe estípulas dos EUA e começou a avaliar o desempenho das mesmas nos genótipos de soja e condições edafoclimáticas brasileiras. Também isolava estípulas de nódulos de plantas que se destacavam no campo. Em 1950 estabeleceu a "Coleção de Culturas de Rizóbio SEMIA" (Secção de Microbiologia Agrícola, da UFRGS) e produzia inoculantes para a soja na própria universidade, por solicitação das primeiras indústrias de óleo vegetal. Os estudos realizados pelo prof. Freire resultaram, em 1956, na publicação da primeira lista de estípulas indicadas pela pesquisa para o uso em inoculantes para a soja. Também teve atuação fundamental que resultou, em 1956, na fundação da primeira indústria de inoculantes brasileira, Laboratórios Leivas Leite, em Pelotas (Hungria *et al.*, 1994; Araujo, 2017; Hungria & Nogueira, 2022).

Dra. Johanna, desde o início de sua carreira, foi uma grande entusiasta da condução de ensaios a campo (Figura 2). O grande marco da parceria entre a Dra. Johanna e o prof. Freire ocorreu pela atuação na "Comissão Nacional da Soja", em 1964, em que ambos conseguiram convencer os melhoristas de que o melhoramento da cultura deveria

ser feito com a FBN e não com fertilizantes nitrogenados. Foi uma de suas maiores contribuições e que envolveu, nesse momento certo, uma combinação extraordinária de conhecimento científico, personalidade forte e capacidade de convencimento. Segundo seu depoimento, "Os geneticistas da comissão, todos com formação norte-americana, achavam que trabalhar com bactérias era brincadeira de cientista, que não tinha aplicação alguma. O melhoramento genético da soja nos EUA havia sido feito com adubação nitrogenada. Eles selecionaram a soja que respondia melhor à adubação nitrogenada. Mas eu reagi. Nas reuniões tivemos uma discussão muito forte tentando convencê-los a fazer o melhoramento da soja sem adubo nitrogenado".



Figura 2. Dra. Johanna Döbereiner em ensaio a campo, verificando a fixação biológica do nitrogênio. Fonte: Arquivos Embrapa.

2. Mais do que uma agrônoma apaixonada pelo campo, uma cientista incansável na formulação de hipóteses

O que fez Dra. Johanna única foi a sua enorme curiosidade científica, capacidade de formular hipóteses e trabalhar incansavelmente em suas validações, aliadas ao espírito agronômico e preocupação com o agricultor. Além disso, tinha uma visão sistêmica do processo de FBN, com a clareza de que bons resultados somente seriam alcançados considerando a simbiose, a planta hospedeira, a bactéria e o ambiente.

A seguir, vamos citar alguns exemplos de suas ideias pioneiras na FBN em soja e as confirmações e implicações posteriores.

2.1. Número ou massa de nódulos na avaliação da eficiência da simbiose?

Considerando a simbiose, uma planta com boa capacidade de FBN deveria ser aquela que apresentasse muitos nódulos. Não há relatos escritos, mas, com certeza,

Dra. Johanna constatou que nem sempre um número elevado de nódulos correspondia ao melhor desempenho simbótico, pois há nódulos pequenos, ineficientes.

Avaliações realizadas no início de sua carreira levaram à publicação de um dos seus primeiros artigos científicos na prestigiosa revista "Nature", indicando a relação positiva entre a massa (e não o número) de nódulos e o N acumulado pelas plantas em soja e em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris L.*), nesse último caso salientando as diferenças entre estirpes eficientes e ineficientes (Döbereiner, 1966). Quando encontrava um resultado importante, expandia os estudos para confirmar e reforçar a relevância da descoberta, de modo que a avaliação da massa de nódulos foi citada novamente em trabalho com soja publicado no ano seguinte (Döbereiner & Arruda, 1967) e em outras publicações que se seguiram a essas. Posteriormente, foram inúmeros os estudos em que seus seguidores confirmaram essas constatações. Em soja, por exemplo, na análise de 152 genótipos, Hungria & Bohrer (2000) encontraram correlações significativas entre o N total acumulado nas plantas e a nodulação, mas com $r=0,654$ para massa nodular, reduzindo para $r=0,322$ para número de nódulos.

Até os dias de hoje, considera-se que a massa e não o número de nódulos é o parâmetro mais importante em avaliações da simbiose. Como exemplo, em ensaios conduzidos por duas safras, em seis regiões produtoras de soja, Souza *et al.* (2018) concluíram que o monitoramento da FBN pela soja poderia ser realizado apenas pela determinação da massa da parte aérea e dos nódulos.

2.2. O nitrogênio mineral é antagônico à fixação biológica e há diferenças entre genótipos de soja no desempenho simbótico

O efeito do N mineral na nodulação e na FBN já era objeto de estudos no hemisfério norte. Mas como seria nos solos tropicais, de baixa fertilidade, se mesmo nos estudos conduzidos em outros países havia discordância sobre a magnitude dos efeitos do N? Em trabalho publicado 1967, utilizando ferramentas hoje consideradas simplistas, Dra. Johanna já relatava efeitos negativos do N mineral na soja, mesmo em doses baixas, mas com respostas que variavam com o genótipo da planta (Döbereiner & Arruda, 1967). Nesse mesmo trabalho, apontava para diferenças entre os genótipos na capacidade de FBN, levantando a hipótese de que poderiam ser atribuídas a diferenças no metabolismo do N e do cálcio (Ca). Como o ensaio que resultou nessa publicação foi conduzido em 1965, logo após a reunião da Comissão da Soja, é aceitável supor que Dra. Johanna estava empenhada em acumular evidências para convencer os melhoristas de que havia variabilidade entre genótipos de soja na capacidade de FBN e que o N mineral, mesmo em doses pequenas, era prejudicial à simbiose. Com isso, definia os rumos da FBN com essa leguminosa no Brasil.

No caso do N mineral, o grupo da Embrapa Cerrados foi incansável em demonstrar que a nodulação e a FBN na soja eram prejudicadas por uma prática denominada "dose de arranque" de N (Vargas *et al.*, 1982a; Hungria *et al.*, 1994; Mendes *et al.*, 2003, 2008). Vargas *et al.* (1982b), por exemplo, fazem a corajosa observação de que, embora órgãos de pesquisa recomendavam adubação nitrogenada na soja, "desde 1978/79 tem sido observada, através de vários experimentos de campo conduzidos no CPAC, a inutilidade dessa prática nos solos de Cerrados". Era a trajetória dos discípulos da Dra. Johanna a favor da maximização da FBN tendo continuidade nessa nova fronteira agrícola.

E o pioneirismo da Dra. Johanna nesses dois temas continua até os dias de hoje. A variabilidade entre genótipos de soja na capacidade de FBN foi confirmada várias vezes nas décadas seguintes por seus discípulos (ex: Hungria & Bohrer, 2000), com resultados semelhantes aos pioneiros, ainda que agora utilizando metodologias genômicas (ex: Torres *et al.*, 2015). Em relação ao N mineral, a comprovação de que a soja consegue altos rendimentos sem a necessidade de aplicação de N mineral, nas mais diversas situações, doses, modos de aplicação, genótipos de plantas e sistemas de produção é objeto de avaliações a cada ano (Mendes *et al.*, 2003, 2008; Hungria & Nogueira, 2022).

2.3. A busca incansável por estirpes extraordinárias

Dra. Johanna era uma microbiologista nata, adorava o mundo das bactérias, que acabaram se tornando sua maior obsessão científica. Sempre estava à busca da estirpe “excepcional”, “super”, que traria um grande impacto à agricultura.

2.3.1. Estirpes com “excepcional eficiência”

Em soja, um de seus trabalhos pioneiros consistiu em avaliar o desempenho de 24 estirpes, apontando para uma divisão em dois grupos, com três estirpes com “excepcional eficiência” associada à maior eficiência nodular (Döbereiner *et al.*, 1970). Como em todos os seus estudos, lançava hipóteses e, nesse caso, relatou maior sensibilidade das estirpes eficientes a concentrações crescentes de asparagina *in vitro*. Dentre as estirpes mais eficientes desse estudo estavam algumas que havia recebido do Dr. Don O. Norris, do CSIRO (*Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation*), na Austrália, em 1965 e 1966, incluindo a CB 1809. Certamente a insistência de Dra. Johanna em suas estirpes “excepcionais” levou à inclusão, na lista das estirpes para a soja, da CB 1809, em 1977, agora com a nomenclatura de SEMIA 586 (Hungria *et al.*, 1994). Infelizmente, a SEMIA 586 apresentava problemas de nodulação com uma cultivar importante na época, a IAC-2, razão pela qual não permaneceu na lista. Contudo, a CB 1809 “ressurgirá remodelada” pelo grupo da Embrapa Cerrados, conforme veremos no item 4.1, dando origem à estirpe CPAC 7 que, segundo a opinião das autoras deste capítulo é, de fato, destaque como “excepcionalmente eficiente” (Hungria & Mendes, 2015).

2.3.2. As “super estirpes” dos Cerrados

Preocupada com os problemas de nodulação nos Cerrados, Dra. Johanna investiu fortemente na busca de “super estirpes” que, com o trabalho do ex-aluno José Roberto Rodrigues Peres, levaram à identificação das estirpes 29W e SEMIA 587 (Peres, 1979; Peres Vidor, 1980). Como sempre, Dra. Johanna tinha que elaborar hipóteses. Com a calagem dos solos ácidos do Cerrado, a população de actinomicetos incrementava substancialmente, produzindo estreptomicina, e a hipótese era de que somente estirpes tolerantes a antibióticos, como confirmou que era o caso dessas duas estirpes, seriam bem-sucedidas (Scotti *et al.*, 1982). Embora em análise crítica posterior a hipótese mais plausível é de que a baixa nodulação se devia à qualidade insatisfatória dos inoculantes e à necessidade de maior número de células (Vargas & Hungria, 1997), a tolerância a antibióticos foi definida como uma propriedade intrínseca de uma nova espécie na qual as duas estirpes foram reposicionadas passada uma década, *Bradyrhizobium elkanii* (Kuykendall *et al.*, 1992). E, ainda mais relevante, de fato essas são duas “super

estirpes", pois continuam sendo utilizadas em inoculantes comerciais desde 1979 (Peres & Vidor, 1980; Hungria *et al.*, 1994; Vargas *et al.*, 1994), ou seja, 45 anos!!! Tomando-se como exemplo a SEMIA 587, ainda não foi possível determinar sua capacidade máxima de FBN, pois atendia às necessidades nutricionais de cultivares da década de 1960, que produziam 1000 kg/ha e continuam a suprir totalmente as culturais de hoje, com potencial de produção superior a 6000 kg/ha (Figura 3).

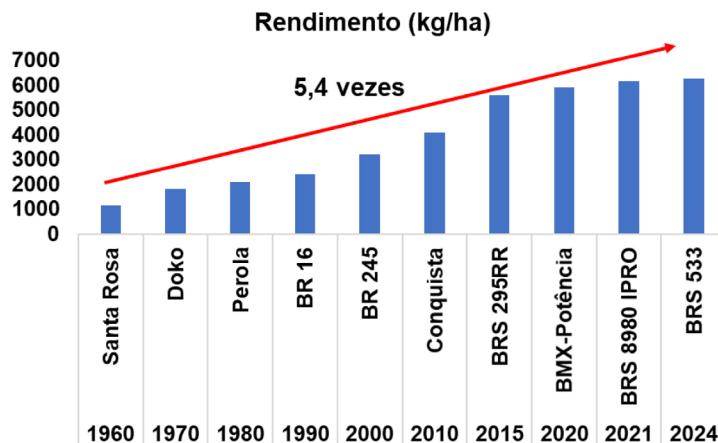


Figura 3. Desempenho da "super estirpe" SEMIA 587, que superou os desafios de nodulação na abertura dos Cerrados. A estirpe foi isolada pelo prof. João Ruy Jardim Freire a partir de uma planta de soja em Santa Rosa-RS, em 1966 e confirmada como eficiente por José Roberto Rodrigues Peres em 1979, sendo utilizada comercialmente desde então.

Na soja, Dra. Johanna ficou extremamente feliz quando o Dr. Harold Evans enviou estirpes mutantes isogênicas Hup^+ (*hydrogenase uptake*) e Hup^- , derivadas da USDA 112. As estirpes com a enzima hidrogenase são capazes de reciclar o H_2 produzido obrigatoriamente pela nitrogenase na redução do N_2 a NH_3 , recuperando parte da energia gasta no processo. Dra. Johanna adorava todo tipo de mutantes para comprovar suas teorias. Ficou muito feliz quando comprovamos ganhos no crescimento da soja com a estirpe Hup^+ , no N acumulado pelas plantas, no transporte de N-ureídos, na eficiência dos nódulos e no índice de colheita de N (Hungria *et al.*, 1989). Hoje, sabe-se que as estirpes de "excepcional eficiência" CB 1809 e CPAC 7 são Hup^+ , sendo a CPAC 7 a única estirpe comercial com essa propriedade (Boddey & Hungria, 1997; Siqueira *et al.*, 2014). Assim, ficaram comprovadas duas hipóteses da Dra. Johanna, a das estirpes "excepcionais" e as "super eficientes energeticamente".

2.3.3. As estirpes "super transportadoras de ureídos"

O novo encanto da Dra. Johanna foi com as estirpes de soja capazes de transportar mais N-ureídos, em trabalho liderado pela Dra. Maria Cristina Prata Neves (Neves *et al.*, 1985). Nesse trabalho, as estirpes foram separadas em dois grupos. Em comparação com o Grupo II, as estirpes do Grupo I apresentavam maior massa nodular, mas com eficiência baixa de FBN, havia maior perda energética com a evolução de H_2 pela nitrogenase, remobilização mais rápida de N das folhas, mas com maior perda de N nas folhas senescedas e as plantas transportavam a mesma quantidade de N, mas menor porcentagem de N como ureídos. As estirpes do Grupo II, no qual estava incluída a CB 1809, apresentavam maior transporte como N-ureídos, eram mais eficientes e resultavam em maior rendimento de grãos.

A relação entre a contribuição da FBN e a %N-ureídos em leguminosas com nódulos determinados, como é o caso da soja e do feijoeiro, é amplamente confirmada até os dias de hoje, inclusive sendo utilizada como metodologia para quantificação da FBN. Como parte da minha história (Mariangela), nessa época também me apaixonei pelos N-ureídos, mas trabalhei com FBN no feijoeiro, milhares de análises. E essa paixão continua até hoje, onde continuo quantificando a contribuição da FBN com a análise de N-ureídos, agora na soja (ex. Hungria *et al.*, 2006b; Moretti *et al.*, 2020).

3. Levar o conhecimento aos agricultores sempre foi uma prioridade

Levar à prática os resultados obtidos na pesquisa sempre foi uma prioridade para a Dra. Johanna. Benefícios para o agricultor e para a agricultura brasileira eram temas que faziam parte de suas preocupações diárias. Para a soja, em 1972, já recomendava a inoculação anual, indicava que com o uso de boas práticas de inoculação não havia necessidade de adubação nitrogenada, que era importante adquirir inoculantes de boa qualidade e alertava para os cuidados no transporte e armazenamento dos produtos e na hora da semeadura (Franco & Döbereiner, 1972). Após meio século, esses mesmos pontos são indicados como essenciais na adoção de boas práticas de inoculação, uma vez que são os que frequentemente mais limitam a FBN (Hungria & Nogueira, 2019, 2022). No início da década de 1970, a soja era uma cultura jovem no país, de modo que é impactante verificar o conhecimento e clareza de conceitos que já eram transmitidas aos agricultores.

4. Duas histórias de legado da Dra. Johanna Döbereiner para a cultura da soja no Brasil

4.1. Soluções inovadoras para os Cerrados

O grupo de pesquisa em Microbiologia do Solo da Embrapa Cerrados (denominada na época como CPAC – Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados) foi criado em 1975, praticamente junto com a fundação desse centro de pesquisa. Era constituído por três capixabas, egressos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e ex-orientandos da Dra Johanna: Jose Roberto Rodrigues Peres, Milton Alexandre Teixeira Vargas e Allert Rosa Suhet, à época com 24, 25 e 27 anos, respectivamente. Dra. Johanna visitou muitas vezes o laboratório de Microbiologia do Solo na Embrapa Cerrados (Figura 4).

Embora o início dos trabalhos tenha coincidido com a expansão da cultura da soja no Cerrado, por orientação da chefia da Embrapa Cerrados os primeiros estudos foram dedicados à FBN em gramíneas, trigo e milho (*Zea mays L.*), tendo em vista os impactos das recentes descobertas da Dra. Johanna com gramíneas. No entanto, após alguns experimentos de campo e em casa de vegetação, o grupo liderado pelo jovem Peres conseguiu demonstrar a relevância de fortalecer a pesquisa sobre FBN na soja para a região dos Cerrados. Em 1977, as pesquisas foram direcionadas para a busca por estirpes



Figura 4. Dra. Johanna Dobereiner em vista ao laboratório de Microbiologia do Solo na Embrapa Cerrados. Fonte: Arquivos Embrapa. Ao fundo da esquerda para a direita os pesquisadores Milton Alexandre Vargas, Lêda Carvalho Mendes e Jose Roberto Rodrigues Peres.

de rizóbios para a soja, eficientes e adaptadas às condições do Brasil Central. Conforme comentado no item 2.3.2, o trabalho de mestrado de Peres resultou na recomendação das estirpes SEMIA 587 e 29W para o uso em inoculantes comerciais. Cabe comentar que a estirpe 29W (= BR 29, =SEMIA 5019) foi isolada por Peres na unidade de pesquisa da Dra. Johanna no Rio de Janeiro. Com essas duas estirpes, começava a história de sucesso da FBN no inóspito Cerrado (Peres & Vidor, 1980; Vargas & Hungria, 1997; Hungria *et al.*, 2006a; Hungria & Mendes, 2015; Hungria & Nogueira, 2022). Em adição à seleção de estirpes, estratégias como o emprego da solução de sacarose (25%) para o preparo da pasta de inoculante (Peres & Vidor, 1980; Vargas & Suhet, 1980; Peres *et al.*, 1986), o aumento da dose de inoculante e o estabelecimento das estirpes de *Bradyrhizobium* por meio da inoculação de sementes da cultura que antecedia à da soja, o arroz (*Oryza sativa* L.) (Peres *et al.*, 1989) foram essenciais para o sucesso da FBN com a cultura na região. Além disso, conforme destacado no item 2.2, os “meninos” do CPAC foram incansáveis na demonstração de que, com o uso de inoculante de boa qualidade, a prática da adubação nitrogenada na semeadura da soja era totalmente desnecessária. A foto clássica, que mostra a resposta da soja a inoculação, veio de um desses experimentos (Figura 5).

Os trabalhos de seleção de estirpes não pararam. Treze anos depois do lançamento das estirpes 29W e SEMIA 587, grande parte das áreas plantadas com soja já havia sido inoculada e apresentava populações estabelecidas de *Bradyrhizobium* spp. A continuidade dos trabalhos de pesquisa culminou com o lançamento, em 1993, de duas estirpes, a CPAC-7 (SEMIA 5080) e a CPAC-15 (SEMIA 5079), que se mostraram mais eficientes que as estirpes 29W e SEMIA 587, lançadas em 1980. Ainda hoje, são essas as quatro estirpes recomendadas para o inoculante comercial de soja no Brasil. Eu, Lêda, participei desses trabalhos a partir de 1986, quando ainda era bolsista de Iniciação Científica de Jose R. R. Peres, no Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Cerrados (minha contratação ocorreu em 1989).



Figura 5. Foto de experimento a campo conduzido na Embrapa Cerrados em 1978, mostrando no primeiro plano uma parcela de soja sem inoculação e ao fundo uma parcela inoculada. (Foto: J. R. R Peres)

A história por trás do lançamento das estirpes CPAC 7 e CPAC 15 é bastante interessante e um excelente objeto de estudo sobre ecologia de rizóbios. Deve ser destacado que, naquela época, esses estudos eram feitos majoritariamente usando a técnica de sorologia conhecida por imunoaglutinação, a partir de nódulos macerados.

O cultivo sucessivo de soja promove o estabelecimento de estirpes de rizóbios no solo, seja por inoculação inicial, ou por contaminação através de sementes. Essas populações de rizóbios interferem na formação de nódulos, podendo reduzir a eficácia das estirpes inoculadas. Em várias partes do mundo, a inoculação em solos com rizóbios já estabelecidos não gera bons resultados em rendimento, devido à baixa concentração de células rizobianas nas sementes e à competitividade das estirpes existentes.

Os pesquisadores da Embrapa Cerrados notaram dois fenômenos importantes: 1) Em 1978, um ano antes do lançamento da estirpe 29W para utilização nos inoculantes comerciais, Vargas *et al.* (1993) observaram a sua predominância em nódulos de soja não inoculada, em propriedades do Triângulo Mineiro que haviam sido inoculadas com outras estirpes em anos anteriores; 2) Em 1986, no campo experimental da Embrapa Cerrados foi verificada, pela primeira vez, a dominância nos nódulos da soja de estirpes pertencentes ao sorogrupo da estirpe SEMIA 566 (que havia sido utilizada em inoculantes comerciais no período de 1966 a 1978), mesmo em áreas onde essa estirpe jamais havia sido introduzida. Essas observações preocuparam os rizobiologistas da Embrapa Cerrados, que estavam envolvidos nos trabalhos de seleção de estirpes para a soja. A disseminação, no solo, de estirpes de rizóbios com baixa eficiência na FBN e alta competitividade pelos sítios de infecção nodular poderia reduzir a produtividade da soja, comprometendo o cultivo da leguminosa no país. Por essa razão, os trabalhos de seleção de estirpes que eram conduzidos em rede nacional, em solos de primeiro cultivo, foram redirecionados e passaram a incluir, também, áreas com populações estabelecidas de rizóbios.

Somado a esse redirecionamento veio o desenvolvimento de uma metodologia inovadora de seleção de estirpes a partir da taxa específica de redução de acetileno (medida indireta dos níveis de atividade de nitrogenase) de nódulos individuais

(Peres *et al.*, 1984). Com essa metodologia, centenas de isolamentos de estirpes de rizóbios foram efetuados na Embrapa Cerrados, principalmente a partir de nódulos coletados nas áreas onde havia sido observada a colonização por estirpes do serogrupo 566. Os isolados identificados dessa forma, além da característica de alta eficiência fixadora, já eram adaptados às condições de solo de cerrado, apresentando boa capacidade competitiva nessas condições. A partir desses isolamentos foi obtida a estirpe 566a, posteriormente rebatizada, em 1990, com o nome de CPAC 15 (SEMA 5079), em homenagem aos 15 anos do então CPAC (Vargas *et al.*, 1992; Peres *et al.*, 1993).

A CPAC-7 (SEMA 5080), por sua vez, foi obtida a partir de uma subcultura da estirpe australiana CB 1809, recebida em 1965 pela Dra. Johanna (item 2.3.1). Exatos 23 anos depois da publicação de 1970, a CB 1809 deu origem à estirpe CPAC 7, tão ou até mais eficiente quanto a parental CB 1809, porém, com alta taxa de competitividade pelos sítios de infecção nodular e com baixa especificidade hospedeira, sendo capaz de nodular a variedade IAC-2 (Vargas *et al.*, 1992; Peres *et al.*, 1993). Foi o par perfeito para acompanhar a CPAC 15 nos inoculantes comerciais, união que completou 30 anos em 2023, rendendo excelentes níveis de produtividade e ganhos (Mendes *et al.*, 2004; Hungria & Mendes, 2015; Hungria & Nogueira, 2022).

Em 2001, um ano após seu falecimento, novamente a contribuição da Dra. Johanna se fez presente na Embrapa Cerrados, com a contratação do pesquisador Fabio Bueno dos Reis Junior, seu orientado desde a graduação e cuja dissertação de mestrado e parte da tese de doutorado foram realizadas sob sua orientação. Aqui também cabe um aparte. Embora eu, Iêda, nunca tenha sido diretamente orientada pela Dra. Johanna, fui guiada por seus ex-orientados, o que me conecta a ela, como acontece com a maioria dos microbiologistas brasileiros. De uma forma ou de outra, todos nós temos uma ligação com a Dra. Johanna. Além disso, tive a oportunidade de participar, em 1990, do renomado curso internacional de FBN na Embrapa Agrobiologia, onde ela atuou como instrutora e fez questão de nos acompanhar em uma visita à Academia Brasileira de Ciências.

Dessa forma é possível estabelecer uma conexão direta entre as pesquisas da Embrapa Cerrados e a Dra. Johanna, por meio do seu incrível legado na capacitação de pesquisadores. Como pesquisadora pioniera, ela não apenas conduziu investigações inovadoras, mas também formou uma geração de cientistas que continuaram e expandiram suas pesquisas.

Na região dos Cerrados, seus ex-orientandos desempenharam papéis fundamentais na aplicação e disseminação dos conhecimentos adquiridos sob sua orientação. Esses pesquisadores levaram adiante o legado de Dobereiner, realizando estudos que confirmaram a eficácia da FBN em soja e a importância de sua utilização em substituição à adubação nitrogenada.

4.2. Reconquistando a importância dos microrganismos com novas tecnologias

Para mim (Mariangela), foi uma decisão difícil deixar a Embrapa Agrobiologia, mas era uma etapa da vida em que eu tinha que priorizar a família. Dra. Johanna ficou muito brava e talvez tenha sido a única vez que não teve a visão de futuro que lhe era peculiar. Disse que eu afundaria a minha carreira porque não havia mais nada a fazer com a

soja. Mas disse que esperaria meu retorno de braços abertos; eu não voltei, mas ela me perdoou. Foi, de fato, um grande equívoco, porque como eu tive que trabalhar desde 1991!!!

O primeiro desafio foi chegar e verificar que a inoculação da soja estava zerada, muitos pensavam como Dra. Johanna, que não era necessário usar inoculantes em áreas que já tinham recebido inoculantes anteriormente, pois as bactérias estavam no solo. Trabalhos clássicos dos EUA mostravam que, de fato, uma população tão baixa quanto 10 células/g de solo já impedia a ação de inoculantes, e eu cheguei a encontrar mais bactérias no solo do que em alguns inoculantes comerciais. Mas, como havia aprendido com a própria Dr. Johanna, tudo pode ser diferente nos trópicos. Comecei então a jornada de ensaios para verificar os efeitos da reinoculação da soja, a visitar cooperativas, a dar palestras. E, então, saiu a primeira tecnologia, que acabou se consolidando até os dias de hoje. A reinoculação, ou inoculação anual da soja resulta em incremento médio de 8% no rendimento de grãos, pois as bactérias do inoculante estão fisiologicamente prontas e próximas às sementes, iniciando mais rapidamente o fornecimento de N para as plantas (Hungria & Mendes, 2015; Hungria & Nogueira, 2019, 2022). Como resultado, de uma média nacional ao redor de 20% de uso de inoculantes em 1991, subimos para o patamar de 85% de toda a área cultivada com soja hoje, ou seja, mais de 37 milhões de hectares. Depois, vieram várias tecnologias, incluindo definição de dose de inoculante, recomendação e estratégias para aplicação de cobalto (Co) e molibdênio (Mo), verificação de incompatibilidade com agrotóxicos, inoculação no sulco, demonstração dos benefícios do plantio direto para a FBN, monitoramento da FBN frente à transgenia e cultivares de hábito determinado e indeterminado, de ciclos de crescimento distintos, determinação da concentração mínima de células de inoculantes para aplicação nas sementes e a eterna luta para evitar a aplicação desnecessária de adubos nitrogenados (Hungria & Mendes, 2015; Hungria & Nogueira, 2019, 2022). Também houve desenvolvimento de metodologias para controle de qualidade de inoculantes, além de muita pesquisa básica, nas quais me peguei várias vezes como Dra. Johanna, querendo formular hipóteses para tudo. Ainda com a soja, houve o lançamento de inoculantes, estabelecendo parcerias público-privadas que são estratégicas para que o resultado da pesquisa chegue de fato ao agricultor. Se Dra. Johanna se autodenominava “uma camponesa no laboratório”, eu passei a me sentir como uma “microbiologista no campo”.

Com a divulgação intensificada das vantagens da reinoculação anual da soja, agricultores passaram a perguntar sobre microrganismos para outras culturas do sistema soja de produção, principalmente o milho e o trigo. E foi aí que Dra. Johanna voltou a entrar firme em minha vida. Ela, a descobridora, a rainha dos *Azospirillum*, passava um bastão para mim, uma pesquisadora de rizóbios. Em 1996 iniciamos um processo de seleção e validação de estirpes de *Azospirillum brasiliense* para essas culturas, que culminou na apresentação oficial dos resultados em assembleia da RELARE (Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologias de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola), em 2004, seguida pelo lançamento dos primeiros inoculantes comerciais em 2009 e 2010 e a publicação do artigo científico nesse mesmo ano, que comprovava incrementos médios de 24% no milho e de 19% no trigo (Hungria *et al.*, 2010). Os temores sobre o lançamento do primeiro inoculante que não fosse com rizóbio para leguminosas foram rapidamente dissipados, pois a aceitação pelos agricultores foi grande. Por parte da pesquisa também houve ampla anuência,

tanto que, passados dez anos, uma meta-análise com 101 ensaios a campo conduzidos e publicados com o milho confirmaram incrementos estatisticamente significativos de 5,4% no rendimento de grãos e de 12,1% no crescimento de raízes (Barbosa *et al.*, 2022). Já não há mais dúvidas, pois a inoculação do milho com as estirpes selecionadas de *A. brasiliense* Ab-V5 (=CNPSO 2083) e Ab-V6 (=CNPSO 2084) já é adotada em 22,4% do cultivo de milho no verão e em 42% do cultivo de inverno.

A seguir, o rumo que a história tomou não poderia ter sido melhor. Quando o *Azospirillum* era usado na cultura prévia à da soja, os agricultores passaram a relatar maior rendimento da leguminosa, levantando à hipótese de benefícios por combinação de processos microbianos. E, assim, surgiu a coinoculação, agora a plenitude para mim, porque unia os meus rizóbios com os azospirilluns da Dra. Johanna, um verdadeiro final feliz, que dobrava os benefícios de rendimento da soja em comparação com a inoculação apenas com rizóbios (Hungria *et al.*, 2013). A tecnologia foi lançada na safra 2013/2014 e, em 2024, já é adotada em 35% de toda a área cultivada com soja.

Finalizo com um trabalho recente, do qual tenho certeza que Dra. Johanna ficaria orgulhosa, porque reuniu pesquisa e entregas aos agricultores. Em cinco anos de trabalho com 3299 agricultores que tinham propriedades com, no máximo, 50 hectares, foram instaladas 273 unidades técnicas de referência para verificar os benefícios da coinoculação da soja. Houve incrementos médios significativos de 35% na nodulação e de 8% no rendimento de grãos, implicando em um lucro para o agricultor de US\$ 111,5/hectare e com mitigação estimada em 350 kg/ha de equivalentes de CO₂ (Prando *et al.*, 2024). Certamente, resultados que deixariam a Dra. Johanna muito feliz.

5. Considerações finais

Considerando os últimos 50 anos, a trajetória da soja no Brasil impressiona. De uma cultura que entrava como alternativa para viabilizar o trigo, passou à *commodity* mais importante, com o país na liderança mundial de produção e exportação. Graças a investimentos em pesquisa, hoje somos líderes em tecnologias para os trópicos, resultando em incremento no rendimento de grãos da soja em taxa muito inferior à de ocupação de novas áreas (Figura 5). Esse crescimento só foi possível graças à visão estratégica de que a cultura deveria expandir adotando o processo de FBN. Essa visão também nos levou à liderança mundial de contribuição da FBN na agricultura. São mais de 100 milhões de doses de inoculantes sendo comercializadas, número que cresce a cada ano (Figura 5). A economia estimada no Brasil pela adoção da FBN na soja em substituição aos fertilizantes nitrogenados é, aplicando os adjetivos que Dra. Johanna tanto apreciava, "extraordinária", "fantástica", estimada, na safra de 2019/2020, em US\$ 15,2 bilhões, além da mitigação de 183 milhões de toneladas de equivalentes de CO₂ que deixam de ser emitidos para o meio ambiente (Telles *et al.*, 2023). O uso de inoculantes segue a taxa de produção de grãos (Figura 6), indicando que o agricultor acredita nos benefícios da FBN. A agricultura brasileira, portanto, deve muito à Dra. Johanna Döbereiner.

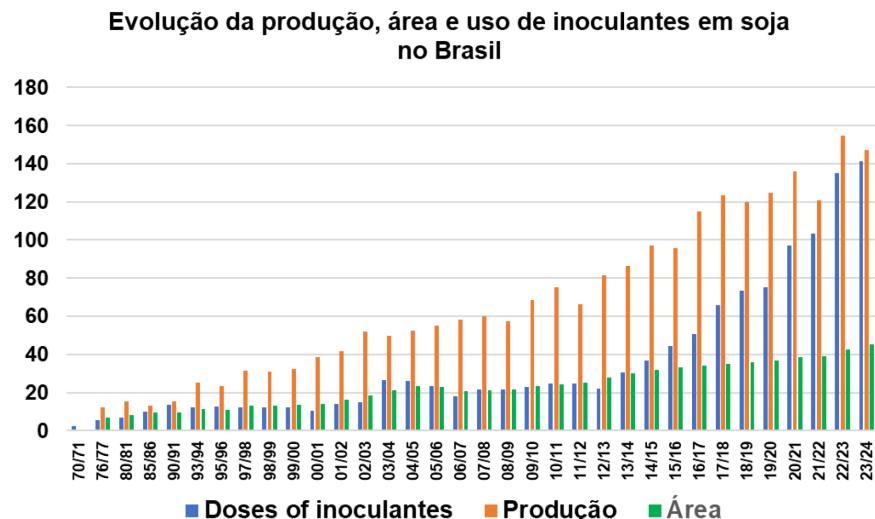


Figura 6. Evolução na produção de soja (milhões de toneladas), área sob cultivo (milhões de hectares) e doses de inoculantes utilizadas na cultura (milhões).

Agradecimentos

Ao CNPq (465133/2014-4) e Fundação Araucária (STI 043/2019), por financiarem nosso INCT (Microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas Visando à Sustentabilidade Agrícola e à Responsabilidade Ambiental – MPCPAgro, MicroAgro), formado majoritariamente por ex-orientados da Dra. Johanna Döbereiner que continuam unidos trabalhando em seus ideais.

Referências

- ARAUJO, S. C. **Caminhos, escolhas e conquistas**. ANPII, 2017. 138 p.
- BARBOSA, J. Z.; ROBERTO, L. A.; HUNGRIA, M. CORRÊA, R. S.; MAGRI, E.; CORREIA, T. D. Meta-analysis of maize responses to *Azospirillum brasiliense* inoculation in Brazil: Benefits and lessons to improve inoculation efficiency. **Applied Soil Ecology**, v. 170, p. 104276, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104276>.
- BODDEY, L. H.; HUNGRIA, M. Phenotypic grouping of Brazilian *Bradyrhizobium* strains which nodulate soybean. **Biology and Fertility of Soils**, v. 25, p. 407-415, 1997. <https://doi.org/10.1007/s003740050333>.
- CHANG, W. -S.; LEE, H. -I; HUNGRIA, M. Soybean production in the Americas. In: LUGTENBERG, B. (ed.). **Principles of plant-microbe interactions**. Switzerland: Springer International Publishing Switzerland, 2015. p. 393-400. https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3_41.
- D'UTRA, G. Cultura do feijão chinez. **Boletim do Instituto Agronômico de Campinas**, v. 3, p. 131-139, 1899.
- D'UTRA, G. Soja. **Jornal do Agricultor**, v. VII, n. 103, p. 185-188, 1882.
- DÖBEREINER, J. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. **Nature**, v. 210, p. 850-852, 1966. <https://doi.org/10.1038/210850a0>
- DÖBEREINER, J.; ARRUDA, N. B. Interrelações entre variedades e nutrição na nodulação e simbiose da soja (*Glycine max* (L.) Merril). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 2, p. 475-487, 1967.

- DÖBEREINER, J.; FRANCO, A. A.; GUZMÁN, I. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.5, p.155-161, 1970.
- EMBRAPA AGROBIOLOGIA. **Johanna Döbereiner**: 50 anos dedicados à Pesquisa em Microbiologia do Solo. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, FAPERJ, 2003. CD-ROM.
- FRANCO, A. A.; DOBEREINER, J. Inoculação da soja. **Informação Técnica**, Série Pesquisas Fundamentais. s.l.: IPEACS, MA, DNPEA, 4/7/1972.
- GAZZONI, D. L.; DALL'AGNOL, A. **A saga da soja**. De 1050 a.C. a 2050 d.C. Brasília-DF: Embrapa, 2018. 199p.
- HUNGRIA, M.; BOHRER, T. R. J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, v. 31, p. 45-52, 2000. <https://doi.org/10.1007/s003740050622>.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Fixação biológica do nitrogênio. In: MEYER, M. C.; BUENO, A. F.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. (ed.). **Bioinsumos na cultura da soja**. Brasília: Embrapa, 2022. p. 143-162.
- HUNGRIA, M.; MENDES, I. C. Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? In: DE BRUIJN, F. (ed.) **Biological nitrogen fixation**, v.2. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2015. p. 1005-1019. <https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch99>.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Tecnologias de inoculação da cultura da soja: Myths, truths and challenges. In: **Boletim de Pesquisa 2019/2020**. Rondonópolis: Fundação MT, 2019. p. 50-62. (Fundação MT. Boletim, 19).
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C.; GRAHAM, P. H. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. In: SINGH, R.P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P. K. (ed.). **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Houston, Texas: Studium Press, LLC, 2006a. p.43-93.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, p. 413-425, 2010. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>
- HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J.; CRISPINO, C. C.; MORAES, J. Z., SIBALDELLI, R. N. R.; MENDES, I. C.; ARIHARA, J. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N₂ fixation and of N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86, p. 927-939, 2006b. <https://doi.org/10.4141/P05-098>.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P.; DÖBEREINER, J. Relative efficiency, ureide transport and harvest index in soybeans inoculated with isogenic HUP mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 7, p. 325-329, 1989. <https://doi.org/10.1007/BF00257827>.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, 49, p. 791-801, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0771-5>.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. (ed.). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 9-89.
- KUYKENDALL, L. D.; SAXENA, B.; DEVINE, T. E.; UDELL, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 501-505, 1992.
- MENDES, I. C.; HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Establishment of *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains in a Brazilian Cerrado oxisol. **Biology and Fertility of Soils**, v. 40, n. 1, p. 28-35, 2004. <https://doi.org/10.1007/s00374-004-0739-1>.

- MENDES, I. C.; HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Soybean response to starter nitrogen and *Bradyrhizobium* inoculation on a Cerrado oxisol under no-tillage and conventional tillage systems. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 81-87, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832003000100009>.
- MENDES, I. C.; REIS JUNIOR, F. B.; HUNGRIA, M.; SOUSA, D. M. G.; CAMPO, R. J. Adubação nitrogenada suplementar tardia em soja cultivada em latossolos do Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1053-1060, 2008.
- MICHAELLES, K. **Hanne, Johanna Döbereiner**: uma vida dedicada à ciência. Rio de Janeiro: Trio Studio Editora e Gráfica Digital, 2018. 102 p.
- MORETTI, L. G.; CRUSCIOL, C. A. C.; BOSSOLANI, J. W.; MOMESSO, L.; GARCIA, A.; KURAMAE, E. E.; HUNGRIA, M. Bacterial consortium and microbial metabolites increase grain quality and soybean yield. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 20, p. 1923-1934, 2020. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00263-5>.
- NEVES, M. C. P.; DIDONET, A. D.; DUQUE, F. F.; DÖBEREINER, J. *Rhizobium* strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. **Journal of Experimental Botany**, v.36, n. 8, p. 1179-1192, 1985. <https://doi.org/10.1093/jxb/36.8.1179>.
- PERES, J. R. R. **Seleção de estípites de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em cultivares de soja (*Glycine max (L.) Merrill*)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: UFRGS, 1979. 81 p.
- PERES, J. R. R.; VIDOR, C. Seleção de estípites de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em cultivares soja (*Glycine max (L.) Merrill*). **Agronomia Sulriograndense**, v. 16, n.2, p. 205-219, 1980.
- PERES, J. R. R.; MENDES, I. C.; SUHET, A. R.; VARGAS, M. A. T. Eficiência e competitividade de estípites de rizóbio para a soja em solos de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 17, n.3, p. 357-363, 1993.
- PERES, J. R. R.; SUHET, A. R.; VARGAS, M. A. T. Estabelecimento de *B. japonicum* num solo de Cerrado pela inoculação de sementes de arroz. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 13, p. 35-39, 1989.
- PERES, J. R. R.; SUHET, A. R.; VARGAS, M. A. T. Sobrevida de *Rhizobium japonicum* na superfície de sementes de soja inoculada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 21, n.5, p. 489-493, 1986.
- PERES, J. R. R.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R. Variabilidade na eficiência em fixar nitrogênio entre isolados de uma mesma estípite de *Rhizobium japonicum*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 8, p. 193-196, 1984.
- PRANDO, A. M.; BARBOSA, J. Z.; OLIVEIRA, A. B.; NOGUEIRA, M. A.; POSSAMAI, E. J.; HUNGRIA, M. Benefits of soybean co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasiliense*: Large-scale validation with farmers in Brazil. **European Journal of Agronomy**, v. 155, p. 127112, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2024.127112>.
- SCOTTI, M. R. M. M. L.; SÁ, N. M. H.; VARGAS, M. A. T.; DÖBEREINER, J. Streptomycin resistance of *Rhizobium* isolates from Brazilian Cerrados. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 54, p. 733-738, 1982.
- SIQUEIRA, A. F.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; SOUZA, R. C.; RODRIGUES, E. P.; BARCELLOS, F. G.; BATISTA, J. S. S.; NAKATANI, A. S.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; VASCONCELOS, A. T. R.; HUNGRIA, M. Comparative genomics of *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15 and *Bradyrhizobium diazoefficiens* CPAC 7: elite model strains for understanding symbiotic performance with soybean. **BMC Genomics**, v. 15, p. 420, 2014. <https://doi.org/10.1186/1471-2164/15/420>.

- SOUZA, R. A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; MACIEL, C. D.; CAMPO R. J.; ZAIA, D. A. M. Conjunto mínimo de parâmetros para avaliação da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 83-91, 2018. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008000100011>.
- TELLES, T.S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Economic value of biological nitrogen fixation in soybean crops in Brazil. **Environmental Technology & Innovation**, v. 31, p. 103158, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103158>.
- TORRES, A. R.; GRUNVALD, A. K.; MARTINS, T. B.; SANTOS, M. A.; RIBEIRO, V. A.; LEMOS, N. G.; SILVA, L. A. S.; HUNGRIA, M. Genetic structure and diversity of a soybean germplasm considering biological nitrogen fixation and protein content. **Scientia Agricola**, v. 72, p. 47-52, 2015. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0039>.
- VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do N₂ na cultura da soja. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (ed.) **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p. 297-360.
- VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R. Efeito de tipos e níveis de inoculantes na soja cultivada em um solo de cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 15, n. 3, p. 343-347, 1980.
- VARGAS, M. A. T.; MENDES, I. C.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. Inoculation of soybean in cerrados soils with established populations of *Bradyrhizobium japonicum*. **Revista de Microbiologia**, v. 25, n.4, p. 245-250, 1994.
- VARGAS, M. A. T.; MENDES, I. C.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. Serological distribution of *Bradyrhizobium japonicum* from Brazilian cerrados areas under soybean cultivation. **Revista de Microbiologia**, v. 24, p. 239-243, 1993.
- VARGAS, M. A. T.; MENDES, I. C.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. **Duas novas estirpes de rizóbio para a inoculação da soja**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1992. 3 p. (EMBRAPA-CPAC. Comunicado Técnico, 62).
- VARGAS, M. A. T.; PERES, J. R. R.; SUHET, A. R. Adubação nitrogenada, inoculação e época de aplicação de calcário para a soja (*Glycine max* L.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 17, p. 1127-1132, 1982a.
- VARGAS, M. A. T.; PERES, J. R. R.; SUHET, A. R. **Adubação nitrogenada e inoculação da soja em solos de Cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1982b. 11 p. (Circular Técnica, 13).
- ZANCOPÉ, G. J.; NASSER, J. M. **O Brasil que deu certo**. A saga da soja brasileira. Curitiba: Tríade, 2005. 280 p.

Esforços para a melhoria da fixação biológica de nitrogênio com a leguminosa de maior importância alimentar no Brasil, o feijão-comum

*Enderson Petrônio de Brito Ferreira
Ricardo Silva Araujo
Pedro Antônio Arraes Pereira
Helton Santos Pereira
Marcio Vinicius de Carvalho Barros Côrtes*

Revisado por: Fabio Bueno dos Reis Junior

*Embrapa Arroz e Feijão, Rodovia Goiânia Nova Veneza, km 12, n° 462, Fazenda Capivara, CEP 75375-000,
Santo Antônio de Goiás, GO.*

1. Introdução

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) desempenha um papel fundamental na alimentação e na economia do Brasil. Como fonte primária de proteína, é parte essencial da dieta brasileira e é consumido de diversas formas em todo o país. Segundo estudo de Kläsener *et al.* (2020), além de ser um alimento básico, o feijão-comum fornece nutrientes importantes e benefícios à saúde, incluindo fibras, vitaminas e minerais. Além disso, o cultivo do feijoeiro é parte integrante de práticas agrícolas sustentáveis, por ser capaz de realizar a fixação biológica de nitrogênio - FBN (Moreira *et al.*, 2017).

A FBN é um processo realizado por bactérias diazotróficas, principalmente do gênero *Rhizobium*, que estabelecem uma simbiose com as raízes do feijoeiro, convertendo o nitrogênio atmosférico em formas que a planta pode utilizar para seu crescimento, podendo reduzir a necessidade de fertilizantes nitrogenados sintéticos e reduzir impactos ambientais, como a emissão de gases do efeito estufa (Souza & Ferreira, 2017). Estudos recentes têm demonstrado que a seleção de estirpes de *Rhizobium*, de variedades mais eficientes, a coinoculação e práticas de manejo adequadas podem potencializar significativamente os benefícios da FBN no feijão-comum (Moreira *et al.*, 2017; Cardoso *et al.*, 2024; Dias *et al.*, 2024; Messias *et al.*, 2024;).

Além da importância agronômica, a FBN também desempenha um papel vital na economia e na redução dos impactos ambientais causados pela atividade agrícola. A redução da dependência de fertilizantes químicos não apenas diminui os custos de produção para os agricultores, mas também mitiga impactos ambientais associados ao uso excessivo de nitrogênio, como a eutrofização de corpos d'água e emissão de gases de efeito estufa (Souza & Ferreira, 2017; Ferreira *et al.*, 2020; Sousa *et al.*, 2022). A compreensão dos mecanismos de interação entre o feijão-comum e as bactérias fixadoras de nitrogênio é essencial para otimizar esta prática e garantir uma produção sustentável e eficiente. Portanto, estudos contínuos sobre a eficiência da FBN no feijão-comum são fundamentais para promover a segurança alimentar e a sustentabilidade agrícola (Stagnari *et al.*, 2017).

Nesse contexto, os trabalhos de pesquisa desenvolvidos pela Dra. Johanna Döbereiner foram voltados à sustentabilidade dos sistemas produtivos, tendo como principal foco o uso de microrganismos fixadores de nitrogênio para o fornecimento desse importante nutriente para as culturas. A Dra. Johanna Döbereiner sempre se encantou com o que constatava observando as paisagens em Seropédica-RJ. Ela se questionava como que a grama continuava tão verde após roçagens e retiradas sucessivas da palha, ou como as frondosas mangueiras poderiam ser tão grandes, tão verdes e produzirem tantos frutos sem que ninguém as adubasse com nitrogênio. Daí surgiu seu grande interesse pelos microrganismos fixadores de nitrogênio de vida livre.

Apesar disso, a Dra. Johanna Döbereiner fez seu curso de mestrado estudando a FBN no feijão-comum, dando contribuições significativas para o entendimento de como o processo de FBN funciona na cultura. Além de ter sido uma das pioneiras no trabalho de pesquisa com FBN no feijão-comum, ela reconhecia a importância do uso da FBN em leguminosas, como soja e feijão, e atuou arduamente para que os melhoristas dessas culturas incorporassem a tecnologia durante o processo de melhoramento.

Suas contribuições para que as pesquisas com FBN no feijoeiro continuassem avançando ajudaram a alcançar o patamar que se observa atualmente, onde resultados de pesquisa a nível de campo indicam que é possível reduzir e/ou eliminar a necessidade

de uso de fertilizantes industrializados, sem reduzir a produtividade das lavouras. Isso se reverte em práticas agrícolas mais sustentáveis, melhoria da segurança alimentar e da sustentabilidade da produção de feijão-comum no Brasil, consolidando o feijão-comum não apenas como um pilar da dieta brasileira, mas também como um símbolo da excelência científica e da pesquisa agrícola no país.

2. O início das atividades de pesquisa da Dra. Johanna Döbereiner com FBN no feijão-comum

No período de 1961 a 1963, a Dra. Johanna Döbereiner foi para Madison, nos Estados Unidos, fazer seu curso de Mestrado na University of Wisconsin, sob a orientação do Dr. Oscar Allen. A dissertação intitulada "Manganese toxicity in the bean (*Phaseolus vulgaris*)-rhizobio symbiosis" tratava do efeito da toxicidade do magnésio sobre a FBN no feijão-comum.

Após voltar para o Brasil ela publicou seu primeiro trabalho no tema, onde relatou que a adição de 40 ppm de manganês a dois solos ácidos afetou a nodulação e a fixação de nitrogênio. Dependendo da cepa de *Rhizobium*, o número de nódulos ou a eficiência na fixação de nitrogênio foram reduzidos. Sob condições menos severas de toxicidade de manganês, a redução do número de nódulos ou da eficiência na fixação de nitrogênio foi compensada por um aumento do tamanho do nódulo. Na ausência de toxicidade de manganês a nodulação e a fixação de nitrogênio do feijão foram abundantes em um solo com pH 4,4. Como observa-se na Figura 1, o teor total de nitrogênio das plantas de feijão que eram dependentes da FBN diminuiu linearmente com o aumento da concentração de manganês nas plantas, o que não ocorreu quando as plantas foram cultivadas com nitrogênio mineral (Döbereiner, 1966).

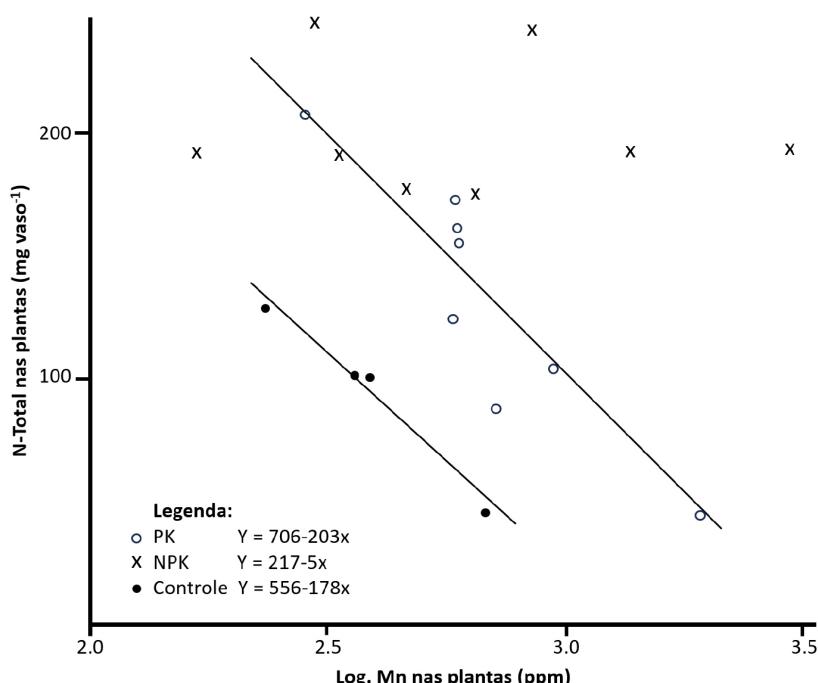


Figura 1. Efeito da absorção excessiva de manganês (log ppm Mn) por plantas de feijão supridas com nitrogênio mineral (NPK) e por plantas de feijão dependentes da fixação simbiótica de nitrogênio (PK, controle) sobre o conteúdo total de nitrogênio (mg N vaso⁻¹).

Fonte: modificado de Döbereiner (1966).

Ainda em 1966, em parceria com outros pesquisadores, ela publicou um artigo onde avaliou-se a influência dos elementos, magnésio, boro e molibdênio sobre a FBN no feijão, em solo ácido com e sem calagem. Observou-se que a calagem aumentou o número de nódulos, o peso seco e o nitrogênio total do feijoeiro. Verificou-se, ainda, que o magnésio aumentou o número de nódulos. Por outro lado, o boro influenciou na nodulação e no crescimento da planta, quando em presença da calagem. O molibdênio diminuiu o número de nódulos, aumentando, no entanto, o nitrogênio fixado por nódulo (Ruschel *et al.*, 1966).

Em 1968 a Dra. Johanna Döbereiner publicou um artigo, em parceria com o Dr. Avílio Franco, onde estudou-se a interação do cálcio e do nitrogênio na nodulação e fixação simbiótica do N atmosférico pelo feijoeiro. Foi relatado que as variedades Venezuela e Rico 23 aumentaram a nodulação com a adubação de 10 ppm de N, variando este aumento com a variedade e os níveis de cálcio empregados (Figura 2). A adubação de 40 ppm de N reduziu a nodulação em todos os tratamentos, com exceção da variedade Rico 23 nos dois níveis menores de cálcio. Nenhuma das variedades fixou quantidades de N equivalentes aos tratamentos de nível máximo de adubação nitrogenada (40 ppm). A que mais se aproximou foi a variedade Venezuela com adubação de 200 ppm de gesso, tendo atingido 95% do N total máximo encontrado nas plantas, enquanto a variedade Rico 23 atingiu apenas 50%. Concluiu-se que diferenças fisiológicas entre variedades, relacionadas com a nutrição de cálcio e nitrogênio, sejam causas das diferenças hereditárias na nodulação (Franco & Döbereiner, 1968).

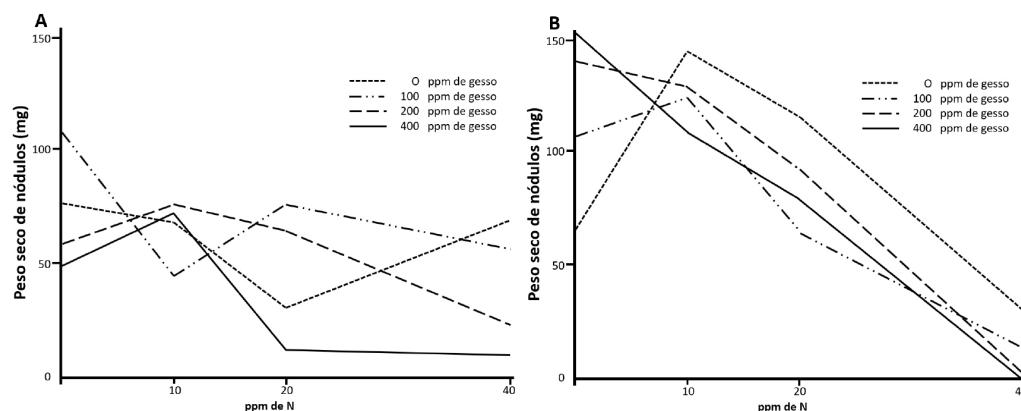


Figura 2. Efeito da adubação de Ca e N na nodulação da variedade de feijão Rico 23 (A) e Venezuela (B). Fonte: modificado de Franco e Döbereiner (1968).

3. A pesquisa com FBN na Embrapa Arroz e Feijão

As atividades de pesquisa com FBN no feijão-comum na Embrapa Arroz e Feijão foram fortemente influenciadas pela Dra. Johanna Döbereiner em função de sua convivência com os Drs. Pedro Antônio Arraes Pereira e Ricardo Silva Araujo na Embrapa Agrobiologia.

Com formação em Engenharia Agronômica (1975-1979) pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, o Dr. Pedro Antônio Arraes Pereira fez um Curso de Especialização em Microbiologia Aplicada (1978-1980) na Embrapa Agrobiologia sob a orientação da Dra. Johanna Döbereiner, avaliando a atividade da enzima nitrato

redutase em *Azospirillum*. Ainda em 1980, o Dr. Pedro Antônio Arraes Pereira integrou a equipe de pesquisa da Embrapa Arroz e Feijão e, em parceria com o pesquisador Dr. Marcelo Grandi, melhorista de feijão-comum, conseguiram colocar um cromatógrafo em operação. A equipe realizou avaliações preliminares da capacidade de FBN no feijoeiro utilizando a metodologia de análise de redução de acetileno.

Em 1981, o pesquisador Ricardo Eiras Moreira Rocha, que atuou na Unidade até 1982, realizou uma das maiores coletas de nódulos de rizóbio nas regiões produtoras de feijão-comum, gerando uma das maiores coleções de culturas de bactérias do solo capazes de nodular o feijoeiro. Em 1982 o Dr. Ricardo Silva Araujo, que foi orientado da Dra. Johanna Döbereiner na Embrapa Agrobiologia, juntou-se à equipe de pesquisa da Embrapa Arroz e Feijão, assumindo a responsabilidade pela seleção de estirpes de rizóbio mais eficientes para a FBN. Simultaneamente, o Dr. Pedro Antônio Arraes Pereira passou a se dedicar exclusivamente à avaliação da capacidade de FBN em diferentes genótipos de feijão-comum.

Da parceria entre os pesquisadores Dr. Pedro Antônio Arraes Pereira e Dr. Ricardo Silva Araujo surgiram os primeiros artigos no tema. Em um deles foi avaliado o potencial de diversos genótipos de feijoeiro para fixação de N_2 atmosférico. Observou-se uma ampla variabilidade no peso da matéria seca dos nódulos e na atividade da nitrogenase dos genótipos estudados. A atividade média da nitrogenase foi maior na floração do que no enchimento dos grãos (Tabela 1), indicando senescência dos nódulos nesta fase fisiológica (Pereira *et al.*, 1984a).

Tabela 1. Variabilidade de 339 genótipos de *Phaseolus vulgaris* L. em alguns parâmetros relacionados com a sua capacidade de fixação biológica de N_2 atmosférico

	Início da floração		Enchimento de grãos	
	Média*	Variação	Média*	Variação
Peso da matéria seca dos nódulos ($mg\ planta^{-1}$)	75,4	7,5 – 263,5	33,5	0 – 225,0
Atividade da Nitrogenase ($\mu Mol\ C_2H_4^{-1}\ planta^{-1}\ h^{-1}$)	6,2	0,3 – 28,8	2,1	0 – 11,1

*Média de 339 amostra. Fonte: modificado de Pereira *et al.* (1984a).

Em relação à nodulação, mais de 40% das cultivares apresentaram massa nodular superior a 92,5 mg de peso de matéria seca de nódulos $planta^{-1}$ (Figura 3). Alguns desses nódulos alcançaram o peso de 200 mg, podendo ser comparados à massa nodular de outras leguminosas tidas como eficientes na simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium*.

Em um outro trabalho foi avaliada a nodulação do feijoeiro plantado após a maturação fisiológica do milho (Tabela 2), sendo observado que o plantio associado estimulou a nodulação e acarretou maior permanência dos nódulos no sistema radicular do feijoeiro do que em monocultivo (Pereira *et al.*, 1984b).

4. Vista da Dra. Johanna Döbereiner à Embrapa Arroz e Feijão

Embora a Dra. Johanna Döbereiner tivesse grande interesse, e seu foco de trabalho fossem os microrganismos fixadores de nitrogênio de vida livre, ela sempre foi uma

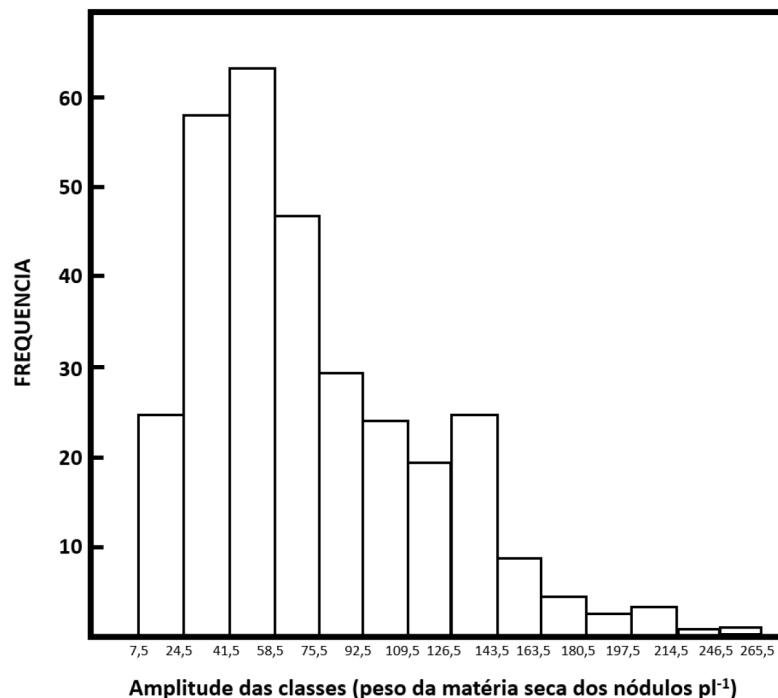


Figura 3. Variabilidade do peso da matéria seca dos nódulos em 339 variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), no estádio de início da floração. Fonte: modificado de Pereira *et al.* (1984a).

Tabela 2. Peso dos nódulos secos de cinco cultivares de feijão plantadas em associação com milho ou solteiro

Variedades	Nódulos secos planta ⁻¹ (mg)					
	<i>R. phaseoli</i>		Testemunha		Nitrogênio	
	A	S	A	S	A	S
Negro Argel	64,9	23,0	53,0	20,6	27,0	6,4
Carioca	50,9	9,7	32,0	17,8	20,4	15,8
Rico 23	36,9	13,4	32,7	6,0	27,2	8,9
Ricobaio	37,1	2,8	31,1	8,2	12,1	4,1
CNF 5	17,4	7,5	25,3	5,3	16,8	5,7
Média de A e S	41,4	7,5	25,3	11,6	20,7	8,2
Média das fontes de N	24,5		18,5		14,5	

Valores médios de três épocas, cada época com três repetições. A - Feijão em associação, S - Feijão solteiro. Fonte: modificado de Pereira *et al.* (1984b).

grande entusiasta do uso da FBN nas leguminosas. Em 1983 ela visitou a Embrapa Arroz e Feijão para participar de uma reunião de criação do Projeto FBN em Feijoeiro, projeto multidisciplinar e multiinstitucional financiado pela Finep (Figura 4).

Em uma segunda visita, em 1985, ela se reuniu com os melhoristas do feijoeiro para convencê-los a fazer o melhoramento na ausência no nitrogênio sintético, substituindo o fertilizante nitrogenado pelas bactérias fixadoras de nitrogênio, visando ao desenvolvimento de cultivares mais responsivas à FBN. Para isso, e já com algumas pesquisas no tema sendo realizadas na época na Embrapa Arroz e Feijão, em 1985 a Dra. Johanna Döbereiner visitou a Unidade, reunindo pesquisadores que atuavam com FBN em diferentes regiões do Brasil.



Figura 4. Equipe da Rede de FBN Feijão reunida na Embrapa Arroz e Feijão em 1983. Da esquerda para a direta, Robert Henson, Marcio Voss, Robert Boddey, Ricardo Araujo, Milton Vargas, Mariangela Hungria, Marli Fiore, Caio Vidor, Cristina Neves, Dra. Johanna Döbereiner, Pedro Antônio Arraes Pereira, Avílio Franco, José Peres.

Após as visitas da Dra. Johanna Döbereiner as atividades de pesquisa com FBN no feijão-comum se intensificaram na Embrapa Arroz e Feijão. As pesquisas envolviam a avaliação da fixação de nitrogênio e crescimento de plantas de feijão comum e seleção de genótipos em diferentes níveis de disponibilidade de fósforo (Pereira & Bliss, 1987; Pereira & Bliss, 1989), seleção de genótipos com elevado número de nódulos (Pereira *et al.*, 1993) e a comparação de métodos de melhoramento para o incremento da fixação simbiótica de nitrogênio no feijão-comum (Pereira & Braidotti, 2001).

A partir da identificação do potencial de fixação de nitrogênio em linhagens de feijão-comum geneticamente diversas (Pereira *et al.*, 1989) e do registro de cinco linhagens de germoplasma de feijão-comum com alta fixação de nitrogênio (Bliss *et al.*, 1989), anos depois ocorreu o registro da Ouro Negro, a primeira cultivar de feijão-comum com alta capacidade de fixação de nitrogênio e alta produtividade (Henson *et al.*, 1993).

Na busca por melhor compreensão dos fatores genéticos envolvidos no processo de fixação biológica de nitrogênio, nos anos 2000 foram iniciadas pesquisas baseadas em marcadores moleculares pelas quais foi realizado um mapeamento genético de um conjunto de marcadores microssatélites em uma população de referência de feijão-comum, resultante do cruzamento entre BAT93 x Jalo EEP558. Dos 264 microssatélites avaliados para polimorfismo, 42,8% apresentaram polimorfismo entre os genitores. Um mapa integrado foi criado totalizando 199 marcadores mapeados em 13 grupos de ligação, com um comprimento observado de 1358 cM e uma distância média entre marcadores de 7,23 cM. Para o mapa construído exclusivamente com microssatélites, 106 marcadores foram colocados em 12 grupos com um comprimento total de 606,8 cM e distância média de 6,8 cM (Grisi *et al.*, 2007).

Apesar dos avanços obtidos até então, em 1998 o Dr. Ricardo Silva Araujo desligou-se da Embrapa e o Dr. Pedro Antônio Arraes Pereira passou a dedicar-se à gestão, tornando-se Chefe Adjunto de Pesquisa e Geral da Unidade a partir de 1989. Assim, o esforço dedicado à pesquisa com FBN na Embrapa Arroz e Feijão foi reduzindo até ser paralisando, retornando em 2007, quando o Dr. Enderson Petrônio de Brito Ferreira, que

também teve um breve contato com a Dra. Johanna Döbereiner no período de 1996 a 1999, durante a Iniciação Científica na Embrapa Agrobiologia, foi contratado como pesquisador.

Nessa retomada das atividades com FBN no feijoeiro, as primeiras ações envolveram convencer a equipe de melhoramento de feijão-comum a trabalhar com FBN. Entre 2007 e 2008 linhagens desenvolvidas sob fertilização nitrogenada foram avaliadas sob inoculação. Contudo, a inserção dessa atividade no projeto de melhoramento ocorreu em 2009. Antes do projeto de melhoramento entrar em execução, em 2008 foi aprovado um projeto MP3 no qual foi avaliada a resposta de genótipos silvestres de feijão-comum à inoculação com *Rhizobium tropici* (Figura 5).



Figura 5. Aspecto visual de diferentes genótipos de feijão-comum inoculados com *Rhizobium tropici*. Da esquerda para a direita: Pioneiro, Pérola, Ouro Negro, NOHR 54 (não nodulante), dois genótipos silvestres promissores (G23576A e G12874A) e dois genótipos silvestres ineficientes (PHA VUL 810 e G23445). Fonte: Enderson Ferreira.

Nesse estudo observou-se que cerca de 70%, 33% e 13% dos genótipos silvestres de feijão-comum (colunas pretas) apresentaram Peso Relativo de Nódulos, Peso Total de Nódulos Secos e Número de Nódulos, respectivamente, significativamente maiores do que a cultivar de referência (Figura 6A, B e C). No entanto, pelo Índice Relativo de nodulação (Figura 6D), cerca de 45% dos genótipos silvestres de feijão-comum apresentaram valores significativamente superiores ao da cultivar de referência, demonstrando grande potencial para serem usados como genitores dentro do programa de melhoramento de feijão-comum.

A partir dos resultados da avaliação da resposta de genótipos silvestres de feijão-comum à inoculação com *Rhizobium tropici*, 11 genótipos (Figura 7), que apareceram entre os melhores, foram selecionados para serem usados como plantas-isca e formar uma coleção de rizóbios a partir de solos coletados em Jussara-GO, Nova Veneza-GO, Unaí-MG, Uberlândia-MG, Araucária-PR e Prudentópolis-PR.

Desses isolamentos originou-se uma coleção com 523 isolados de rizóbio, sendo que cerca de 75% dos isolados apresentaram características morfológicas típicas de estirpes de *Rhizobium* e a maioria dos isolados se agrupou com as estirpes padrões de *Rhizobium tropici* e *R. freirei*, utilizadas no Brasil como inoculante comercial para o feijão-comum (Sampaio *et al.*, 2016).

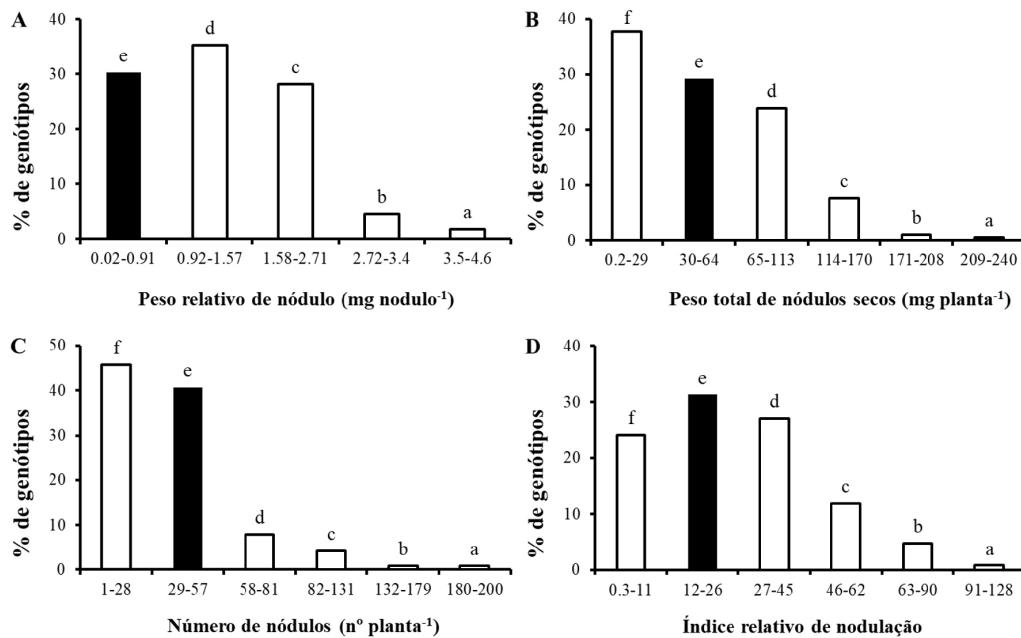


Figura 6. Distribuição percentual dos genótipos selvagens de feijão-comum de acordo com as diferentes classes de Peso relativo do nódulo (A), Peso total do nódulo (B), Número de nódulos (C) e Índice relativo de nodulação (D). As colunas preenchidas em preto indicam os percentuais de genótipos silvestres que agruparam junto com a cultivar de referência (Ouro Negro). Colunas seguidas por letras diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Scott-Knott ($p>0.05$). Fonte: modificado de Ferreira *et al.*, (2010).

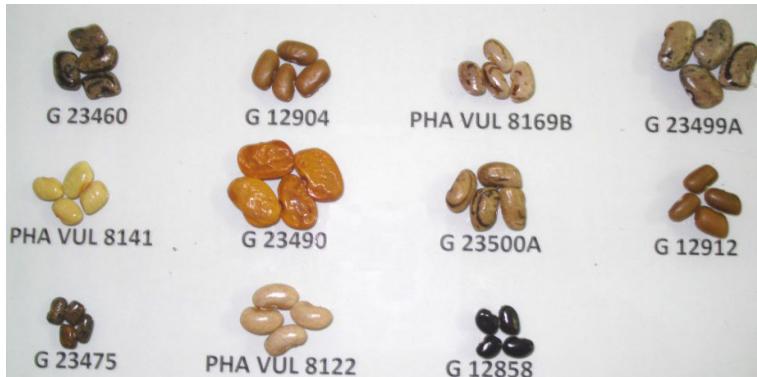


Figura 7. Aspecto visual dos grãos dos genótipos silvestres selecionados para serem utilizados como plantas-isca.

A partir dessa coleção, 17 isolados foram selecionados para serem avaliados em experimento de campo. Moreira *et al.* (2017) observaram que, em nove dos 17 isolados, o porcentual de N derivado da FBN variou de 64,2% a 75,8%, com valores de nitrogênio total derivado da FBN na parte aérea do feijoeiro variando de 802,91 a 1037,56 mg de N planta⁻¹ (Figura 8).

A resposta do feijoeiro à co-inoculação entre *R. tropici* e *Azospirillum brasiliense* foi realizada em sete experimentos de campo, conduzidos Itaberaí-GO (2013), Goianésia-GO (2014), Santo Antônio de Goiás-GO (2014), Unaí-MG (2015), Cristalina-GO (2015), Paracatu-MG (2015) e Santo Antônio de Goiás-GO (2015). Na Figura 9 pode observar a produção de grãos média dos sete experimentos de campo, para cada tratamento. A co-inoculação de duas doses de *R. tropici* e 3 doses de *A. brasiliense* (Rt+Ab3p) resultou

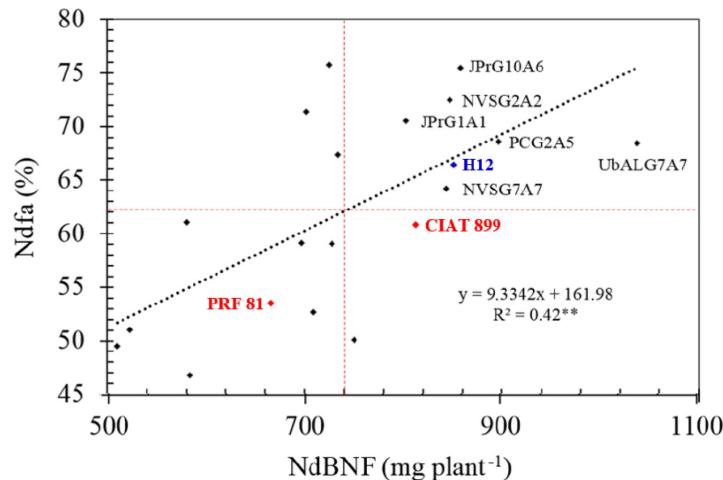


Figura 8. Correlação de Pearson entre a porcentagem de nitrogênio derivado da FBN (NdBNF%) e o nitrogênio total derivado da FBN (NdBNF) na parte aérea, inoculado com novos isolados e estirpes comerciais de *Rhizobium* spp. As linhas pontilhadas vermelhas correspondem à média de cada parâmetro. *($p<0,05$); **($p<0,01$).

em uma produção de grãos superior a 3500 kg ha^{-1} , representando um aumento de cerca de 5% e 26% em comparação aos tratamentos nitrogenado (NfT) e inoculação somente com rizóbio (Rt), respectivamente (Souza & Ferreira, 2017).

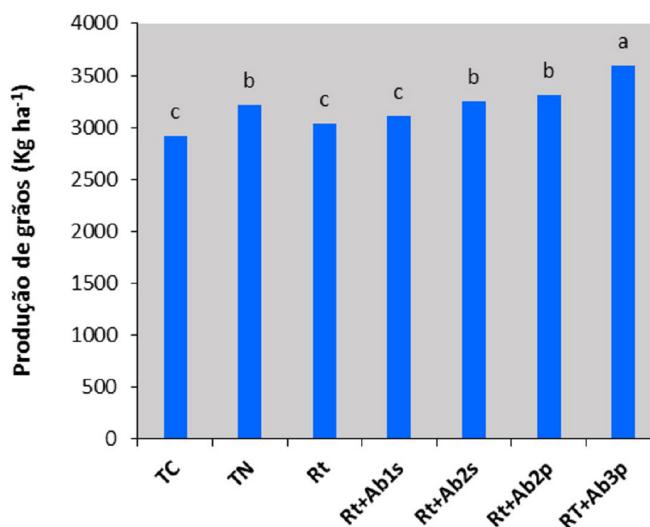


Figura 9. Produtividade do feijão-comum em função de diferentes doses e formas de co-inoculação. TC = não inoculado e sem fertilizante nitrogenado; TN = não inoculado e com 80 kg ha^{-1} de N; Rt = inulação da semente com rizóbio, $2.4 \text{ milhões de células semente}^{-1}$; Ab = inulação com *Azospirillum* (1s- 0.8×10^5 células semente $^{-1}$; 2s- 1.6×10^5 células semente $^{-1}$; 2p- 1.6×10^5 células planta $^{-1}$ e 3p- 2.4×10^5 células planta $^{-1}$). Valores médios de 7 experimentos de campo.

Na análise econômica realizada a partir dos dados dos sete experimentos de co-inoculação sob condições de campo, considerando os valores percentuais médios para os custos de produção e receita líquida dos tratamentos sobre o tratamento nitrogenado (NFT), Ferreira *et al.* (2020) observaram que, embora o tratamento não inoculado e não adubado (NI) apresente um custo de produção cerca de 18% inferior, a receita líquida também foi menor, aproximando-se de -20%. Por outro lado, a coinoculação de duas doses de *R. tropici* e 3 doses de *A. brasiliense* (Rt+Ab3p) apresentou custo

de produção cerca de 10% menor que o tratamento nitrogenado, porém, uma receita líquida aproximadamente 40% superior (Figura 10).

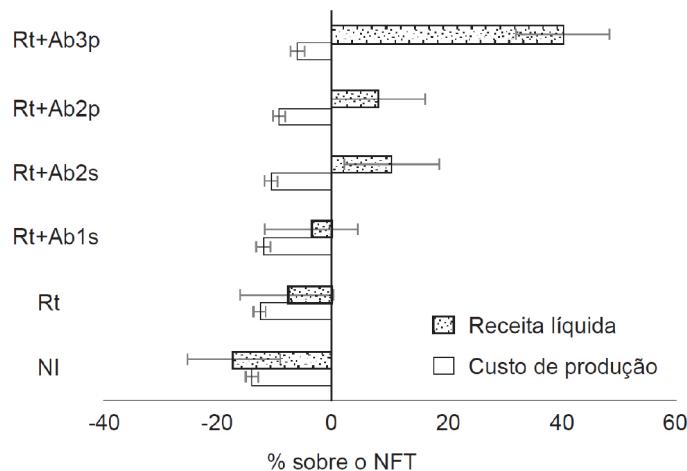


Figura 10. Percentuais de incremento e/ou redução da receita líquida e do custo de produção dos tratamentos em relação ao tratamento nitrogenado (NFT), em feijoeiro cultivado em áreas comerciais de produção sob diferentes formas de fornecimento de N.

5. Estabelecimento da FBN como linha de pesquisa no programa de Melhoramento da Embrapa Arroz e Feijão

A partir de 2007, o programa de melhoramento do feijão-comum da Embrapa Arroz e Feijão, passou a incluir os ensaios de FBN em sua rotina de pesquisa e rede de ensaios, com foco nos grupos comerciais carioca e preto. O primeiro passo, foi avaliar o desempenho dos genótipos elite do programa em sistemas de FBN. Como esses genótipos apresentam alelos favoráveis para caracteres agronômicos de interesse, a identificação de linhagens responsivas à FBN, permitiria seu uso direto pelos agricultores e facilitaria a incorporação da característica por meio de cruzamentos.

Os primeiros experimentos foram realizados na fase de VCU (Valor de Cultivo e Uso), em quatro ambientes do Estado de Goiás, na safra de inverno de 2007/2008. Em cada ambiente, as linhagens elite e cultivares foram avaliadas para produtividade de grãos em dois experimentos lado a lado: um com adubação nitrogenada (20 kg de N ha^{-1} no plantio e 90 kg de N ha^{-1} na cobertura) e outro com inoculação com rizóbio. Os principais resultados para o grupo comercial carioca podem ser encontrados em Pereira *et al.* (2015). Conforme os autores, houve diferenças na produtividade entre as duas fontes de nitrogênio, com uma produtividade de grãos maior obtida através da fertilização mineral nitrogenada. Apesar disso, foram identificados genótipos com produtividade semelhante nos dois sistemas de fornecimento de nitrogênio.

Os experimentos lado a lado foram repetidos nos ensaios de VCU dos anos de 2011 e 2012, avaliando-se 19 linhagens para o grupo carioca e 15 para o grupo preto, em Goiás, Paraná e Distrito Federal, nas safras das águas, de inverno e seca, totalizando uma combinação de onze ambientes. Nesses experimentos, além da produtividade de grãos, também foi avaliada a resistência a doenças como a antracose e mancha angular. Para avaliação dos caracteres de nodulação, mais dois ensaios lado a lado com os mesmos genótipos foram conduzidos na safra das águas de 2013 e de inverno de 2014.

Os ensaios foram realizados para os grupos comerciais preto e carioca e os resultados podem ser visualizados em Dias (2017) e Dias *et al.* (2020). Conforme os autores, assim como observado nos VCUs de 2007/2008, as linhagens apresentaram melhor produtividade de grãos quando avaliadas com adubação mineral nitrogenada. No entanto, as fontes de nitrogênio não influenciaram na seleção dos melhores genótipos para os dois sistemas, sugerindo que as melhores linhagens selecionadas sob adubação mineral podem ser indicadas para ambientes sob inoculação. A inoculação com rizóbio proporcionou maiores índices de nodulação nos genótipos avaliados, no entanto, esta maior nodulação não resultou em maior produtividade de grãos, sugerindo a necessidade de formar populações que combinassegenitores produtivos com genitores de boa nodulação, e realizar a seleção sob inoculação.

Como variabilidade genética suficiente não foi identificada nos ensaios de VCUs, optou-se por recorrer aos ensaios preliminares, que estão em fase anterior ao VCU e continham um maior número de genótipos. Assim, em 2012, as linhagens que compunham os ensaios preliminares dos grupos comerciais preto e carioca foram avaliadas apenas sob inoculação, sendo encaminhadas para os ensaios avançados aquelas de melhor desempenho. Os ensaios avançados foram conduzidos da safra de inverno de 2013 até a safra da seca de 2016, com 12 genótipos para o grupo preto e 15 para o grupo carioca, em um total de 20 ambientes com inoculação e sem adubação com nitrogênio mineral. Entretanto, nenhuma linhagem apresentou produção superior em sistema de FBN. Porém, com as informações do comportamento dos genótipos elite nos ensaios de VCUs, preliminares e avançados, em condições de inoculação, vários genitores promissores puderam ser identificados.

Paralelamente ao estudo das linhagens elite, os genótipos silvestres e os pertencentes a coleção nuclear de germoplasma da Embrapa também foram analisados. Em 2008, 377 genótipos silvestres de feijão-comum do banco ativo de germoplasma da Embrapa Arroz e Feijão foram conduzidos em experimento de casa de vegetação, em Santo Antônio de Goiás - GO, para avaliação de caracteres relacionados à FBN, como número de nódulos, peso de nódulos secos e índice de nodulação. Conforme Ferreira *et al.* (2010), cerca de 45% dos genótipos silvestres de feijão-comum mostraram potencial para serem utilizados como fonte alelos favoráveis para FBN. Dentre eles, quatro genótipos mostraram os melhores resultados, figurando entre as maiores médias de número de nódulos, peso de nódulos secos e índice de nodulação.

De setembro de 2011 a março de 2012, um grupo de 879 genótipos foram avaliados, sendo 261 provenientes da coleção nuclear de feijão-comum do México e 618 da coleção nuclear do Centro Nacional de Agricultura Tropical (CIAT, Colômbia). Ambas as coleções, continham materiais Mesoamericanos e Andinos e estão atualmente mantidos no Banco Ativo de Germoplasma de Feijão-comum da Embrapa. Dos 879 genótipos, 116 com maiores índices de nodulação foram selecionados e avaliados em uma segunda fase, de agosto a outubro de 2012. Ambos os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação, em Santo Antônio de Goiás – GO para avaliação do número de nódulos e peso seco e específico de nódulos. De acordo com Knupp (2015) e Knupp *et al.* (2017), foi encontrada grande variabilidade entre os genótipos dos dois pools gênicos, com muitos mostrando médias superiores as da cultivar Ouro Negro, utilizada como referência. Ao todo, foram selecionados 26 genótipos promissores, por sua alta nodulação e estabilidade de desempenho entre os ensaios realizados.

A partir de 2014, começaram os cruzamentos entre os genótipos identificados como

promissores para FBN. Foram realizados cruzamentos entre linhagens elite (elite x elite), entre linhagens elite e genótipos silvestres (elite x silvestre) e entre linhagens elite e genótipos da coleção nuclear (elite x coleção nuclear), para os grupos comerciais carioca e preto. O objetivo principal era desenvolver populações que seriam conduzidas, desde as primeiras gerações, em condições de inoculação com rizóbio, visando favorecer a expressão da FBN.

Para obtenção das populações segregantes foram realizados cruzamentos em esquema dialélico completo, com oito genitores para o grupo preto e nove para o grupo carioca. As populações foram conduzidas nas gerações F2 até F4 pelo método bulk em quatro ambientes em Santo Antônio de Goiás – GO e Brasília-DF, nos anos de 2015, 2016 e 2017. As populações mais promissoras foram utilizadas para obtenção de linhagens, que foram avaliadas em experimentos denominados testes de linhagens, realizados a partir da coleta de plantas individuais das melhores populações, na geração F5. As linhagens obtidas foram avaliadas para produtividade de grãos, por dois anos (inverno de 2021 e 2022), em Santo Antônio de Goiás – GO, em solos cuja principal fonte de nitrogênio foi a FBN. Os genótipos com melhor desempenho no teste de linhagens serão encaminhados para os ensaios avançados, em múltiplos ambientes.

Em 2015, foram realizados cruzamentos entre genótipos elite x silvestre, seguidos de um retrocruzamento com o genitor elite, para obtenção das populações segregantes para os grupos carioca e preto. As populações foram conduzidas das gerações F2 até F4 pelo método bulk. Na geração F4, em 2018, as melhores populações foram selecionadas para coleta de plantas individuais e obtenção das linhagens F4:5, que foram encaminhadas para os testes de linhagens, conduzidos nos anos de 2019 e 2020. Todas os ensaios foram realizados em Santo Antônio de Goiás - GO, na safra de inverno, sem adubação mineral nitrogenada e com inoculação com rizóbios, com avaliações da produtividade de grãos, massa de 100 grãos e aspecto visual dos grãos. Os genótipos com melhor desempenho nos testes de linhagens foram encaminhados para os ensaios avançados em seis ambientes nos Estados de Goiás e Paraná, nos anos de 2021 e 2022.

Os resultados dos ensaios avançados das linhagens provenientes do cruzamento elite x silvestre para o grupo comercial carioca foram apresentados por Caetano (2023). Conforme o autor, o fornecimento de nitrogênio exclusivamente por FBN não conseguiu desenvolver linhagens, oriundas de germoplasma silvestre, mais produtivas que as cultivares desenvolvidas em sistema com uso exclusivo de nitrogênio mineral e as linhagens oriundas de germoplasma silvestre serão indicadas como genitoras para formação de novas populações base.

A perspectiva é que, destes ensaios avançados, algumas linhagens sejam selecionadas para os ensaios de VCU, com possibilidade de se tornarem cultivares de alta produtividade de grãos, recomendadas para sistemas de FBN. A partir dos detalhes apresentados, nota-se o esforço experimental e de pesquisa que vem sendo feito pelo programa de melhoramento do feijão-comum da Embrapa Arroz e Feijão, com o objetivo de tornar a FBN prática difundida na produção da cultura. A conquista de resultados positivos, sem comprometer os ganhos em produtividade, beneficiaria pequenos e grandes produtores, com a redução direta dos custos de produção, além do meio ambiente, com a diminuição dos danos provocados pelo uso do nitrogênio mineral.

6. Uma nova era de pesquisa em FBN no feijoeiro baseada em ferramentas genéticas

Com a publicação da Resolução Normativa Nº 16 da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (RN16-CTNBio) em 2018, foram estabelecidos os requisitos técnicos para a apresentação de consultas sobre Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMPs). Este marco legal permitiu a distinção entre organismos mutantes obtidos por engenharia genética por meio da transgenia, conhecidos como organismos geneticamente modificados (OGMs) conforme a Lei de Biossegurança Nº 11.105 de 2005, e aqueles obtidos por técnicas denominadas TIMPs, que geram organismos geneticamente editados, ou seja, organismos não geneticamente modificados (não OGMs).

Com base nessa premissa, a Embrapa Arroz e Feijão iniciou, em janeiro de 2022, uma nova linha de pesquisa focada no melhoramento genético de microrganismos benéficos para a agricultura. Entre 2022 e 2023, foram desenvolvidas as primeiras ferramentas para a edição genética de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, utilizando sistemas CRISPR/Cas9. Foram identificados potenciais genes-alvo e iniciada a criação de uma biblioteca de vetores e plasmídeos.

O avanço nesse campo culminou na formalização de uma parceria público-privada em 2023 (Acordo de Cooperação Técnica e Financeira - ACTF), com o objetivo de desenvolver inoculantes de terceira geração para FBN, utilizando bactérias geneticamente editadas com capacidade aumentada para a fixação de nitrogênio. Além disso, foi aprovado um projeto tipo II no Sistema Embrapa de Gestão (SEG), com previsão de início para janeiro de 2025. Essa nova linha de pesquisa, baseada em TIMPs, está gerando grandes expectativas para o futuro da FBN no feijoeiro, especialmente do ponto de vista dos microrganismos.

Com base nas informações apresentadas, uma linha do tempo referente a fatos marcantes e principais atividades de pesquisa em FBN no feijão-comum desenvolvidas na Embrapa Arroz e Feijão está apresentada na Figura 11.

7. Perspectivas futuras

Em relação às ferramentas para edição do genoma das estirpes bacterianas fixadoras de nitrogênio e da planta de feijoeiro, muitos avanços foram sendo conquistados nos últimos anos. Apesar disso, o estabelecimento de novas técnicas, que se enquadrem nas Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMPs) preconizadas na RN16/CTNBio, é altamente desejável. Essas novas tecnologias devem permitir aumentar a velocidade na identificação e manipulação genética de novos potenciais alvos com maior assertividade e eficiência.

Contudo, um dos principais desafios é o entendimento aprofundado do processo de estabelecimento da simbiose. É crucial não apenas estudar o microrganismo ou a planta de forma independente, mas sim compreender a interação simbiótica entre eles. Essa abordagem integrada permitirá uma compreensão mais detalhada do papel de cada região do genoma envolvida na interação, aumentando as possibilidades de gerar novas linhagens melhoradas para ambos os organismos. Apesar dos avanços em dados genéticos e bioquímicos acumulados ao longo dos anos, o acesso a esses dados com um alto grau de curadoria ainda é limitado.

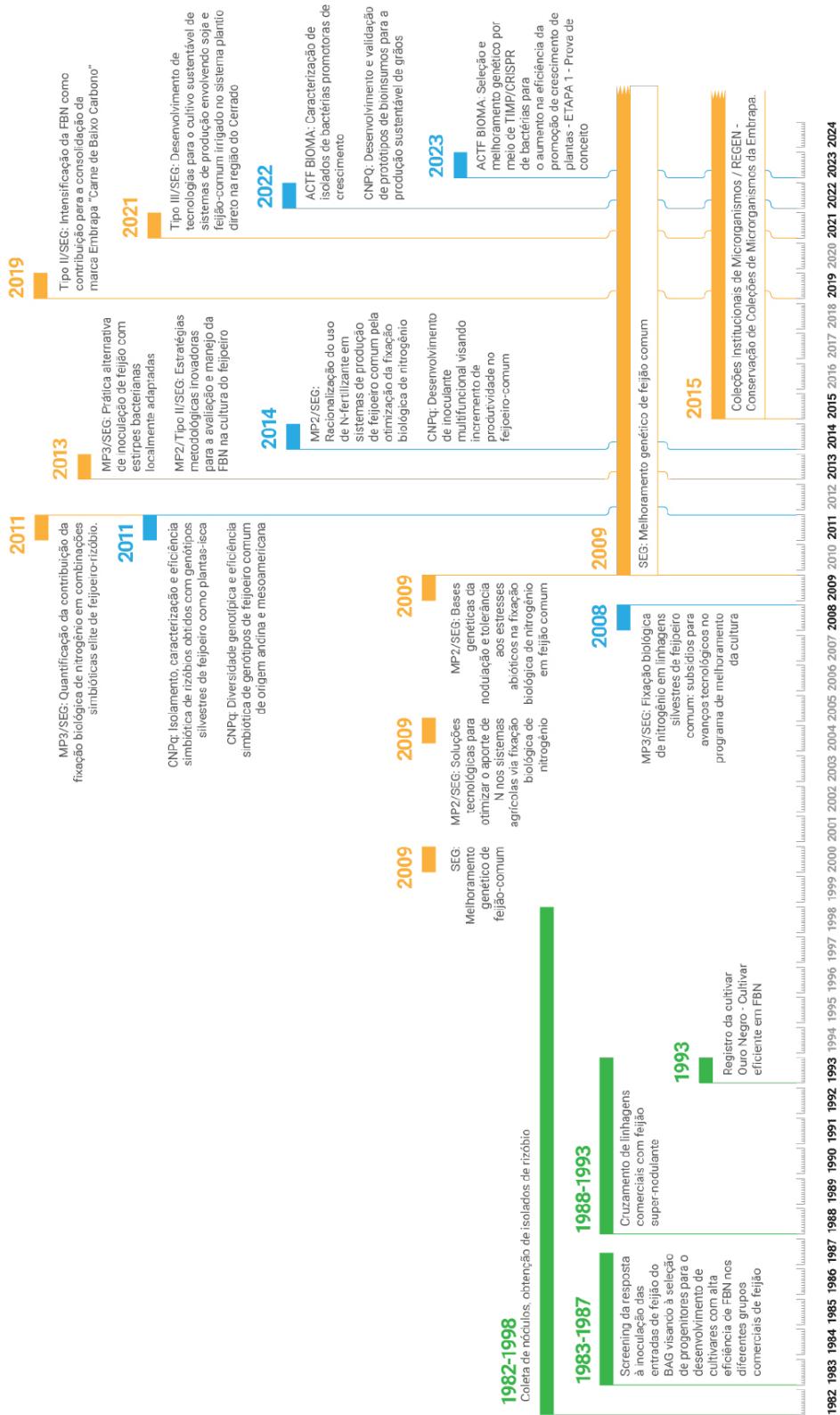


Figura 11. Fatos e atividades de pesquisa relacionadas à FBN no feijão-comum ocorridas na Embrapa Arroz e Feijão.

No que diz respeito à planta de feijoeiro, a literatura demonstra que, ao atingir a fase reprodutiva, há uma competição clara entre os grãos e os nódulos por carboidratos provenientes da fotossíntese. A planta tende a direcionar os fotoassimilados para os grãos em detrimento dos nódulos, que acabam se tornando não funcionais. Para futuras pesquisas, é necessário estudar essa via metabólica com o objetivo de desligar genes responsáveis por esse fenômeno, que é distinto da soja, onde os nódulos permanecem ativos até próximo da colheita.

Para a bactéria *Rhizobium tropici*, embora as rotas metabólicas relacionadas à FBN e nodulação sejam bem documentadas, o sistema de regulação desses processos ainda é obscuro, limitando o número de alvos disponíveis para a edição gênica.

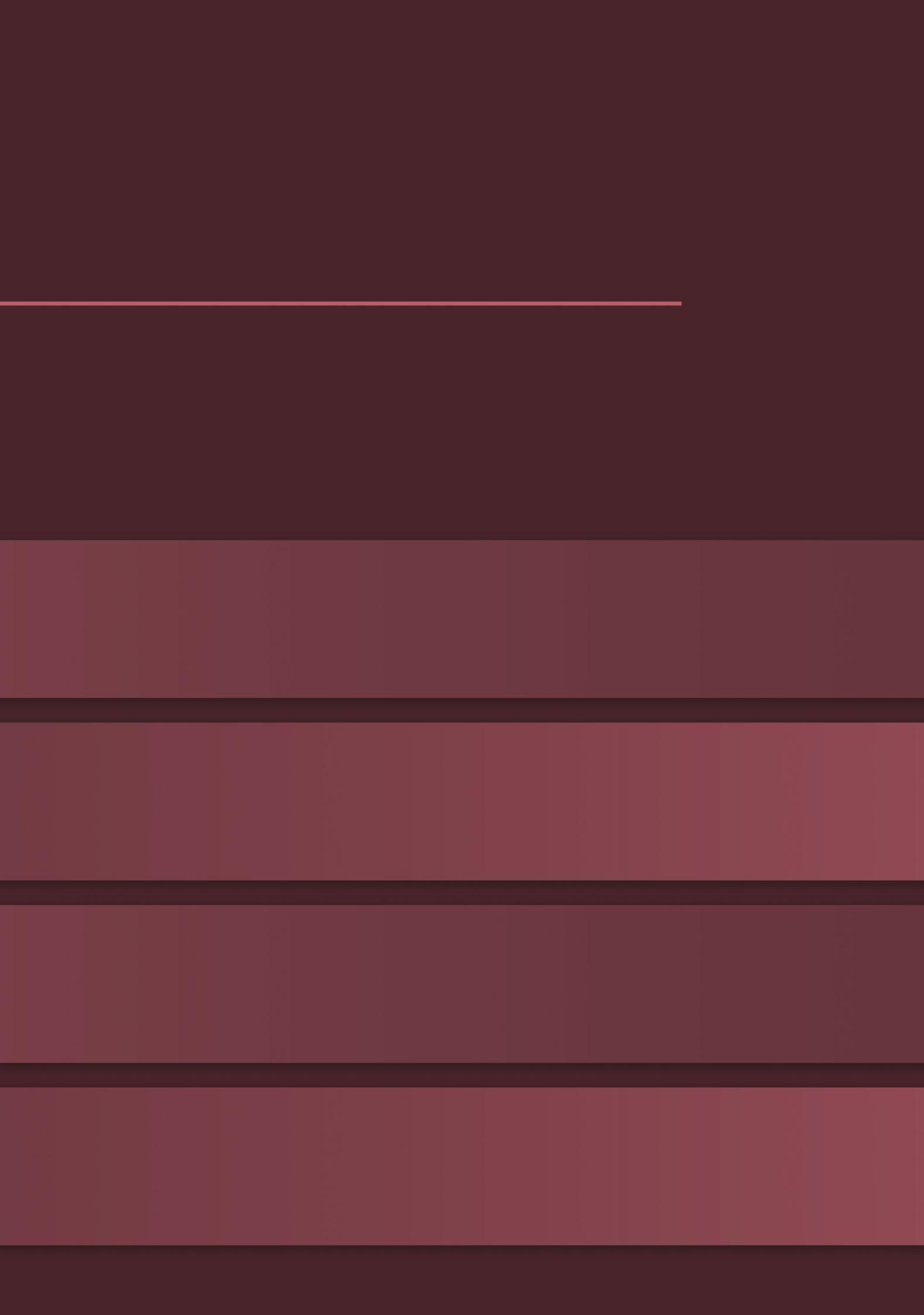
Em resumo, apesar dos desafios persistentes na implementação de ferramentas de manipulação do DNA, tanto para a planta quanto para a bactéria, o maior obstáculo para aumentar a eficiência da FBN no feijoeiro é a identificação de alvos específicos, como genes, promotores ou fatores de transcrição. O aprimoramento da eficiência da FBN requer manipulação desses alvos de forma a possibilitar a utilização do nitrogênio atmosférico como fonte de nutriente para a planta de feijoeiro, de maneira consistente e inequívoca, similar ao que ocorre com a soja.

Referências

- BLISS F. A.; PEREIRA P. A. A.; ARAUJO R. S.; HENSON R. A.; KMIECIK K. A.; MCFERSON J. R.; TEIXEIRA M. G.; Da SILVA C. C. Registration of five high nitrogen fixing common bean germplasm lines. *Crop Science*, v. 29, p. 240-241, 1989. <https://doi.org/10.2135/cropsci1989.0011183X002900010065x>
- CAETANO, J. P. M. **Estabilidade e potencial produtivo de linhagens de feijão-comum desenvolvidas sob fixação biológica de nitrogênio avaliadas em multi-ambientes**. 2023. 69 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)– Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2023.
- CARDOSO, R. M.; MESSIAS, M.; SILVEIRA, P. M.; FERREIRA, E. P. B. Agronomic performance of plant growth-promoting microorganisms and nitrogen sufficiency index in common bean. *Journal of Plant Nutrition*, v. 47, n. 13, p. 2108–2121, 2024. <https://doi.org/10.1080/01904167.2024.2330519>
- DIAS, P. A. S. **Potencial genético de linhagens elite de feijoeiro-comum para fixação biológica de nitrogênio**. 2017. 106 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.
- DIAS, P. A. S.; MELO, P. G. S.; FERREIRA, E. P. B.; MELO, L. C.; SOUZA, T. L. P. O.; FARIA, L. C.; ALMEIDA, V. M.; PEREIRA, H. S. Nitrogen sources on agronomic traits in *carioca* common bean lines developed under mineral nitrogen fertilization. *Bragantia*, v. 83, e20230285. 2024. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.20230285>
- DIAS, P. A. S.; MELO, P. G. S.; MELO, L. C.; SOUZA, T. L. P. O.; FARIA, L. C.; FERREIRA, E. P. B.; PEREIRA, H. S. Production and disease resistance of elite lines previously selected using mineral nitrogen fertilization cultivated with natural versus artificial nitrogen supplementation. *Genetics and Molecular Research*, v. 19, n. 2, gmr18491, 2020. <http://dx.doi.org/10.4238/gmr18491>
- DÖBEREINER, J. Manganese toxicity effects on nodulation and nitrogen fixation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.), in acid soils. *Plant and Soil*, vol. 24, n. 1, p. 153-166, 1966. <https://doi.org/10.1007/BF01373081>

- FERREIRA, E. P. B.; BARBOSA, L. H. A.; KNUPP, A. M.; MATA, W. M.; WENDLAND, A.; DIDONET, A. D.; MELO, L. C.; Del PELOSO, M. J. Identification of high nodulation efficiency among wild genotypes of common beans. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 53, p. 170-171, 2010.
- FERREIRA, E. P. B.; SILVA, O. F.; WANDER, A. Economics of rhizobia and azospirilla co-inoculation in irrigated common bean in commercial and family farming. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.55, e01532, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2020.v55.01532>.
- FRANCO, A. A.; DÖBEREINER, J. Interferência do cálcio e nitrogênio na fixação simbiótica do nitrogênio por duas variedades de *Phaseolus vulgaris* L. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.3, n.1, p. 223-227, 1968.
- GRISI, M. C. M.; BLAIR, M.; GEPTS, P.; BRONDANI, C.; PEREIRA, P. A. A.; BRONDANI, R. P. V. Genetic mapping of a new set of microsatellite markers in a reference common bean (*Phaseolus vulgaris*) population BAT93 x Jalo EEP558. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, p. 691-706, 2007.
- HENSON, R. A.; PEREIRA, P. A. A.; CARNEIRO, J. E. S.; BLISS, F. A. Registration of Ouro Negro, a high dinitrogen-fixing, high-yielding common bean. **Crop Science**, v. 33, n.3, 1993. <https://doi.org/10.2135/cropsci1993.0011183X003300030044x>
- KLÄSENER, G. R.; RIBEIRO, N. D.; CASAGRANDE, C. R.; ARNS, F. D. Consumer preference and the technological and nutritional quality of different bean colours. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 42, e43689, 2020. Doi: 10.4025/actasciagron.v42i1.43689
- KNUPP, A. M. **Seleção de genótipos Mesoamericanos e Andinos de feijoeiro em resposta à inoculação com rizóbio**. 2015. 136 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2015.
- KNUPP, A. M.; FERREIRA, E. P. B.; ARAÚJO, A. P. Variability of nodulation traits in Andean and Mesoamerican common bean gene pools. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 4, p. 252-260, 2017. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2017000400005>
- MESSIAS, M.; ASOBIA, P. C.; FERREIRA, E. P. B. In Furrow Co-inoculation of Rhizobia and Azospirilla Influences the Growth and Productivity of the Common Bean. **International Journal of Plant Production**, v. 17, p. 637-650, 2023. <https://doi.org/10.1007/s42106-023-00259-y>
- MOREIRA, L. P.; OLIVEIRA, A. P. S.; FERREIRA, E. P. B. Nodulation, contribution of biological N₂ fixation, and productivity of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculated with rhizobia isolates. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, p. 644-651, 2017. <http://dx.doi.org/10.21475/ajcs.17.11.06.p310>
- PEREIRA, P. A. A.; ROCHA, R. E. M.; ARAÚJO, R. S. Capacidade de genótipos de feijoeiro de fixar N₂ atmosférico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 19, n. 7, p. 811-815, 1984a.
- PEREIRA, P. A. A.; ROCHA, R. E. M.; ARAÚJO, R. S. Nodulação do feijoeiro em monocultura e associação com fileira de milho maduro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 19, n. 8, p. 951-954, 1984b.
- PEREIRA, P. A. A.; BLISS, F. A. Nitrogen fixation and plant growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) at different levels of phosphorus availability. **Plant and Soil**, n. 104, p. 79-84, 1987. <https://doi.org/10.1007/BF02370628>
- PEREIRA, P. A. A.; BLISS, F. A. Selection of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) for N₂ fixation at different levels of available phosphorus under field and environmentally-controlled conditions. **Plant and Soil**, v. 115, p. 75-82, 1989. <https://doi.org/10.1007/BF02220696>
- PEREIRA, P. A. A.; BURRIS, R. H.; BLISS, F. A. ¹⁵-Determined dinitrogen fixation potential of genetically diverse bean lines (*Phaseolus Vulgaris* L.). **Plant and Soil**, v.120, p. 171-179, 1989. <https://doi.org/10.1007/BF02377066>

- PEREIRA, P. A. A.; MIRANDA, B. D.; ATTEWELL, J. R.; KMIECIK, K. A.; BLISS, F. A. Selection for increased nodule number in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant and Soil**, v. 148, p. 203-209, 1993. <https://doi.org/10.1007/BF00012858>
- PEREIRA, P. A. A.; BRAIDOTTI, W. Comparação de métodos de melhoramento de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) para o incremento da fixação simbiótica de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 31, p. 15-21, 2001.
- PEREIRA, H. S.; MELO, L. C.; FARIA, L. C.; FERREIRA, E. P. B.; MERCANTE, F. M.; WENDLAND, A.; SOUZA, T. L. P. O. Common bean elite lines cultivated under nitrogen fertilization and inoculation with *Rhizobium tropici*. **Ciência Rural**, v. 45, n. 12, p. 2168-2173, 2015. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20141135>
- RUSCHEL, A. P.; BRITTO, D. P. P. S.; DÖBEREINER, J. Fixação simbiótica de nitrogênio atmosférico em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). II. Influência do magnésio, do boro, do molibdênio e da calagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.1, n.1, p. 141-145, 1966.
- SAMPAIO, F. B.; KNUPP, A. M.; FERNANDES, E. P.; MARTIN-DIDONET, C. C. G.; FERREIRA, E. P. B. Morphophysiological characterization of rhizobia isolated from wild genotypes of the common bean. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 6, p. 1502-1511, 2016. <https://doi.org/10.14393/BJ-v32n6a2016-33084>
- SOUZA, M. A.; OLIVEIRA, M. M.; ASOBIA, P. C.; FLORES, R. A.; FERREIRA, E. P. B. Agroeconomic response of inoculated common bean as affected by nitrogen application along the growth cycle. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 43, n. 6, p. 2531-2546, 2022. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2022v43n6p2531>
- SOUZA, J. E. B.; FERREIRA, E. P. B. (2017). Improving sustainability of common bean production systems by co-inoculating rhizobia and azospirilla. **Agriculture Ecosystems and Environment**, v. 237, p. 250-257, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.12.040>
- STAGNARI, F.; MAGGIO, A.; GALIENI, A.; PISANTE, M. Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 4, n. 2, 2017. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0085-1>



Um olhar especial para a fixação biológica de nitrogênio com leguminosas arbóreas em ambientes naturais e reflorestamento

Sérgio Miana de Faria¹

Fatima Maria de Souza Moreira²

Revisado por: Avílio Antônio Franco

¹Embrapa Agrobiologia, km 7 BR 465, Seropédica RJ CEP: 23891-000

²Membro Titular da Academia Brasileira de Ciências; Universidade Federal de Lavras, Trevo Rotatório Professor Edmir Sá Santos Lavras - MG, CEP:37203-202

Introdução

Nossos caminhos nesta área se iniciaram em regiões muito distantes, na Amazônia em 1978 (Fatima) e no Rio de Janeiro em 1979 (Sérgio). Apesar dessa distância, eles se encontraram algumas vezes e certamente Johanna foi quem nos uniu, direta ou indiretamente. Este capítulo trata de nossos principais resultados individuais e em conjunto, inspirados e motivados pela Dra. Johanna e com ela.

Contribuição da Dra. Johanna na trajetória de Fátima M S Moreira

Em janeiro de 1976 comecei a estagiar com uma bolsa de IC no Programa de Fixação Biológica de Nitrogênio do SNLCS da Embrapa, sob orientação da Dra. Johanna Döbereiner. Durante minha vida tive poucas oportunidades de conhecer pessoas como ela, com sua dedicação ao trabalho, disciplina e sobretudo com o entusiasmo jovial pela pesquisa que transmitia para seus (suas) alunos(as) e a todos(as) que trabalhavam com ela. Meu primeiro trabalho científico é resultante desta época e claro que, com ela. Após a conclusão do curso de Agronomia em agosto de 1977, fiz um estágio de aperfeiçoamento no Programa de Fixação Biológica de N2, enquanto aguardava meu então marido, concluir o curso de graduação (casei-me durante o curso de graduação). Neste período desenvolvi as atividades que resultaram na apresentação de dois trabalhos em eventos e na publicação de um trabalho.

Nesta fase com Johanna os pontos mais importantes de meu aprendizado foram o conhecimento de técnicas básicas em microbiologia e o interesse pela pesquisa científica, sendo este último decisivamente despertado pela interação com a Dra. Johanna. Após o estágio de aperfeiçoamento, Dra. Johanna ofereceu um contrato de trabalho na Embrapa, para mim e para meu marido Luís Mauro Sampaio Magalhães (que na época também estagiava no Programa). Como queríamos ampliar nossos horizontes, principalmente em direção ao Norte do país, recusamos a proposta e sob recomendação de Dra. Johanna, após aprovação de currículos por uma comissão técnica-científica, ingressamos ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, em 18 de setembro de 1978.

Como minha experiência no Programa de Fixação Biológica de N2 do SNLCS/Embrapa foi voltada para a fixação de N2 associativa, comecei minha pesquisa no INPA, nesta área, fazendo um levantamento de micro-organismos fixadores de N2 associados às gramíneas e à diversas espécies vegetais em ecossistemas amazônicos. Após 1 ano eu havia isolado várias espécies de bactérias fixadoras de N2 com características diferentes das espécies conhecidas. Estes resultados foram apresentados no "International Workshop on Associative N2-fixation" realizado em Piracicaba, no mês de julho de 1979 e publicados posteriormente como capítulo do livro "Associative N2 fixation" em 1981. Como a Dra. Johanna tinha uma filha morando na Amazônia e seu genro trabalhando no mesmo departamento que eu no INPA, o contato científico com ela continuou. Quando mostrei a ela uma espécie parecida com *Azospirillum*, mas com características culturais e outras diferentes das duas espécies então conhecidas, resolvemos que ela seria meu assunto da dissertação de mestrado no convênio INPA/FUA, que versou sobre a caracterização e distribuição de uma nova espécie de bactéria fixadora de nitrogênio (*Azospirillum amazonense*), a terceira descrita do gênero (Magalhães *et al.*, 1983;

Magalhães & Döbereiner, 1984). Sim, nesta data eu usava meu nome de casada: Fatima Maria Moreira Magalhães. Sim, na época, sem possibilidade de sequenciamentos de DNA, a experiência com o gênero nos fazia suspeitar de novas espécies. *A. amazonense* também foi encontrada em espécies arbóreas na Amazônia e especialmente em pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth.). Como também não havia internet a orientação a distância era difícil, devíamos aproveitar momentos de encontro para nos reunir, como numa praia de Salvador em 1981, durante o XVIII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo (Figura 1)



Figura 1. Johanna revisando a dissertação de Fatima Moreira (sentadas) e colegas da Agrobiologia em pé, numa praia em Salvador (CBCS, 1981).
Foto gentilmente cedida por Silvia Regina Goi.

O início do trabalho com leguminosas florestais

Durante o curso de mestrado também iniciei minha experiência com as simbioses de rizóbio com leguminosas, a qual resultou em um artigo publicado na *Acta Amazônica* (Magalhães *et al.*, 1982) e que contou com a Dra. Johanna na coautoria. Este trabalho mostrou pela primeira vez a capacidade de nodulação de novos gêneros e espécies de leguminosas florestais (*Cedrelinga catenaeformis*, *Tachigalia*, *Diplostropis purpúrea*, *Inga urgensis*, *Swartzia corrugata* e *Hymenolobium modestum*) e a incapacidade de nodulação de *Diniza excelsa*. Também orientei quatro alunos do curso de agronomia da Fundação Universidade do Amazonas, os quais deram continuidade à carreira de pesquisador e um deles, no INPA – Luiz Augusto Gomez de Souza, deu continuidade a linha de pesquisa com espécies florestais.

O primeiro trabalho que realizei com as simbioses de rizóbio com espécies florestais e os conhecimentos adquiridos no curso de mestrado em Botânica (e cursos da área de Ecologia) fizeram com que eu identificasse um grande potencial inexplorado nesta área, na Amazônia. Sendo assim, ao final da dissertação elaborei um projeto e o submeti a FINEP que o aprovou em 1984. Este projeto foi desenvolvido de 1984 até o início de 1987. Apesar de poucos recursos financeiros, que na data da liberação ficaram

defasados devido à inflação e por não sofrer correção monetária, obtivemos muitos resultados importantes sobre a capacidade ou incapacidade de nodulação de vários gêneros e espécies e ainda, através dele, pude isolar estirpes de rizóbio para o trabalho de tese do curso de Doutorado, iniciado em 1987 no Departamento de Solos da UFRRJ, com sanduiche na Universidade de Ghent, Bélgica. Ressalta-se que na época tivemos que concorrer por recursos humanos (notadamente mateiros) e de transporte (barcos do INPA) com projetos estrangeiros que faziam coletas na Amazônia brasileira e que tinham recursos financeiros elevados. Apesar disso, coletamos em áreas inóspitas e inexploradas como o arquipélago de Anavilhas pela primeira vez. Foi uma experiência de campo fantástica, percorrendo rios de barco, dormindo em redes, comendo peixe com farinha e desbravando florestas. Nossa equipe, que denominávamos "Os Leguminosos", era bastante motivada, o que contribui para ótimos resultados. Este mesmo projeto foi conduzido no estado de Rondônia, com recursos do Polo Noroeste, resultando na publicação de um trabalho na Acta Amazônica em 1986/87 (Magalhães & Silva) e apresentado na XII RELAR, em 1984.

O relatório final do projeto foi encaminhado a FINEP no início de 1987 e aprovado em junho de 1989. Várias produções científicas resultaram deste projeto neste período, sendo uma delas a monografia de Francisco Wesen Moreira, técnico de nosso setor, que mais tarde se tornou pesquisador e trabalhou com a Saboarana (*Swartzia laevicarpa*), uma espécie madeireira importante que ocorre em área inundadas, este artigo foi publicado na Acta Amazônica (Moreira *et al.*, 1995). Exsicatas de todas as espécies de leguminosas coletadas estão depositadas no herbario do INPA e seus números constam das publicações derivadas deste projeto.

Entre os resultados obtidos no projeto financiado pela FINEP podemos destacar a descoberta de simbioses de rizóbio com 8 gêneros e 96 espécies florestais de Leguminosae sem qualquer referência anterior na literatura sobre esta capacidade, trabalho este publicado no New Phytologist (Moreira *et al.*, 1992), com a coautoria de Sérgio Miana de Faria, que estava retornando de seu doutorado na Escócia, sob orientação da Dr. Janet Sprent. Nesta época eu estava fazendo o curso de doutorado na UFRRJ/Embrapa Agrobiologia. Este trabalho está entre os cinco com maior número de citações no meu CV Lattes! O projeto FINEP possibilitou ainda o isolamento de cerca de 800 estirpes de rizóbio de diferentes áreas da Amazônia. Estas estirpes assim como estirpes de rizóbio da coleção do CNPBS/Embrapa, também isoladas de espécies florestais por Sérgio e Adalis Campelo, entre outros, foram objeto de estudo da tese de Doutorado intitulada: "Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de Leguminosae introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica", orientado pelo Dr. Avílio A. Franco do CNPBS/Embrapa e defendida em 24.05.1991. O primeiro passo em direção a este trabalho de tese foi a liofilização das culturas trazidas no INPA, uma vez que, por falta de equipamento e infraestrutura naquela instituição, elas vinham sendo mantidas em meio com agar inclinado com óleo mineral. As estirpes da Embrapa também foram liofilizadas. Para esta tarefa trabalhei com Rosa Pitard recém-contratada pela Embrapa. Posteriormente, utilizando caracterização cultural para screening e seleção de estirpes para análise numérica computadorizada de perfis de proteína total em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) demonstramos que várias das estirpes isoladas de espécies florestais não eram similares às espécies e gêneros de rizóbio descritos na literatura. O trabalho utilizando a técnica de SDS-PAGE foi realizado no período de 15.12.89 a 13.03.90 na Rijksuniversiteit em Gent, Bélgica com a equipe

liderada pelos Drs. Karl Kersters e Monique Gillis, anteriormente liderada pelo Dr. J. de Ley que desenvolveu o método de hibridização DNA:DNA, e que tinha acabado de se aposentar e deixar o laboratório quando cheguei lá. O artigo oriundo da tese (Moreira *et al.*, 1993), tratando de 171 estípites isoladas de 77 espécies florestais, é um dos cinco com maior número de citações no meu CV Lattes. Esta viagem foi bastante produtiva uma vez que fui, com um objetivo e material já definidos, para um laboratório que domina a técnica e que tem um grande banco de dados. Infelizmente como levei o dobro do número de estípites combinadas no plano de trabalho, não tive tempo de fazer o método de hibridização DNA:DNA, durante os três meses, que correspondiam às férias de minhas filhas, o que resultaria na descrição de novas espécies que foram e têm sido publicadas muito depois da defesa de minha tese. Uma das espécies foi publicada em 1998 (*Mesorhizobium plurifarum*), e incluiu estípites do Brasil (Amazônia e Mata Atlântica) e África (Sudão e Senegal) (Lajudie *et al.*, 1998), pois o grupo francês também tinha várias estípites depositadas no banco de dados de proteína total de Gent e nossas estípites puderam ser comparadas. Ressalto que na época o software Gelcompar (posteriormente Bionumerics) estava sendo desenvolvido e nossos perfis de proteína participaram de seus testes.

O trabalho com algumas estípites de espécies florestais da tese foi aprofundado num estágio a nível de pós-doutoramento, realizado logo após a defesa da tese, no período de 07.06.91 a 05.09.91 no "Centro de Investigacion sobre fijación de nitrógeno" do Departamento de Genética Molecular da "Universidad Nacional Autónoma de México" sob orientação da Dra. Esperanza Martínez, que visitou Dra. Johanna na época de minha defesa. Lá, apliquei a metodologia de mobilidade eletroforética de isoenzimas à parte das estípites da tese, fornecendo mais subsídios para a proposição de novas espécies de bactérias fixadoras de N₂ em simbiose com espécies da família Leguminosae. Uma destas espécies foi publicada em 2006 (Moreira *et al.* 2006), cuja estória relato a seguir.

Simbiose *Azorhizobium doebereinerae* & *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.: um modelo de alta especificidade e eficiência simbiótica similar para todas as estípites

A estória desta espécie é longa e cheia de "coincidências". Em 1984, durante o estágio na ORSTOM-Senegal, com Bernard Dreyfus, posteriormente diretor do IRD na França, conheci a espécie de um novo gênero, que ele iria descrever em 1988-*Azorhizobium caulinodans* isolado de nódulos caulinares e radiculares de *Sesbania rostrata* (Dreyfus *et al.*, 1988). Em 1987 quando comecei o trabalho da tese com a coleção de estípites de rizóbio de espécies florestais que trazia do INPA e da coleção da Embrapa Agrobiologia, verifiquei que duas estípites isoladas de *Sesbania marginata* (Sm1 e Sm5) tinham características culturais em YMA/79 peculiares em relação aos outros gêneros de rizóbio e muito similares a *A. caulinodans*- alcalinização do meio, crescimento rápido e escassa produção de goma. Estas estípites haviam sido isoladas por Adalis Campelo na primeira dissertação sobre simbioses de rizóbio com espécies florestais no Brasil, que foi defendida em 1976 sob orientação de Johanna Döbereiner e as duas (nomeadas BR 5401 e BR 5404) foram posteriormente aprovadas pelo MAPA como inoculante para *Sesbania marginata* (Faria *et al.*, 1997). Em 1989, durante o estágio sanduiche na Universidade de Ghent, o dendrograma construído com base em perfis de proteína

total das cerca de 200 estirpes de leguminosas florestais, obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida e comparados ao banco de dados da UGhent, e que constou da publicação em 1993, mostrou que estas estirpes ficavam num grupo separado, mas próximo de *A. caulinodans*, indicando ser uma nova espécie. Em 1991 quando trabalhei com isoenzimas no curto pós doc de 3 meses na UNAM, seus perfis também foram mais próximos, porém diferentes de *A. caulinodans*. A publicação de 1993 (Moreira *et al.* 1993) revelou que vários grupos podiam representar espécies novas, mas ainda dependiam de testes de homologia DNA-DNA e com relação a possível nova espécie de *Azorhizobium*, também seria bom ter mais estirpes além das duas existentes. Em 1993 quando cheguei na UFLA, meu primeiro orientado de IC (Alexandre Barberi) trabalhou com nodulação em mudas de espécies florestais no viveiro. Dentre estas havia mudas identificadas como *Sesbania sesban*, e novamente me deparei com estirpes isoladas desta espécie que tinham características culturais peculiares em relação aos outros gêneros de rizóbio e muito similares a *A. caulinodans* (Barberi *et al.*, 1998). Em 1995 fiz o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de uma das duas estirpes (BR 5401) no pos doc de um mês no laboratório de Peter Young, na Universidade de York e ficou evidente que se tratava de uma nova espécie (Moreira *et al.*, 1998). No Brasil eu procurava estimular laboratórios que trabalhavam com genética, como o do Dr. Fábio Pedrosa na UFPR, a realizar a homologia DNA:DNA no Brasil, pois esta era nossa principal limitação para descrever espécies novas encontradas em nossa imensa biodiversidade. Tivemos uma reunião sobre isso em Angra dos Reis em 1995 num evento de comemoração a Dra. Johanna Döbereiner. Nesta reunião também procurei agilizar a descrição da nova espécie, sendo o primeiro passo isolar mais estirpes, o que foi feito por Sérgio Faria na mesma região de isolamento das duas primeiras. Mas pela dependência de resultados de homologia DNA:DNA a descrição ainda tardaria. Pouco depois descobri por informação do Dr. Ari Oliveira Filho do DCF/UFLA que a espécie *S. sesban* estudada por meu aluno de IC era na verdade *S. virgata*- syn de *S. marginata*! Eis que eu tinha uma fonte inesgotável de novas estirpes da nova espécie perto de mim! Em 2001 no estágio de pos doc de seis meses na Michigan State University, inclui alguns destes isolados para análise de Rep-PCR e sequenciamento do rRNA 16S. Finalmente em 2002, após participar de um evento em Cocoyoc no México voltei ao laboratório de Esperanza Martinez, em Cuernavaca, que nesta época já fazia homologia DNA:DNA. Este artigo ainda demorou alguns anos para ser concretizado, mas finalmente foi publicado em 2006 com a parceria de pesquisadores de 3 instituições internacionais (os 3 onde tinha realizado os meus pos doc) e 3 nacionais, o de minha origem e realização de trabalhos do doutorado, o atual e o grupo da UFPR, liderado pelo Dr. Fábio Pedrosa. Como o sequenciamento do 16SrRNA em York foi com os primers Y1 e Y2, era necessário um sequenciamento do gene completo o que foi feito pela equipe de Fábio Pedrosa. Nesta época outros trabalhos já estavam sendo realizados no laboratório com esta simbiose, mostrando que ela era muito específica e altamente eficiente (o trabalho de meu orientado de mestrado Marcos Gonçalves, que a denominou *A. johannae*) (Gonçalves *et al.*, 2004), e mostrando diferentes modos de infecção de *A. doeberae* em *S. virgata* sob condições inundadas e não inundadas, da tese de Cleide Bomfetti, (hoje professora da UFVJM) sob orientação da Dra. Marcele Holsters que eu havia conhecido em 1989 na Bélgica (Bomfetti *et al.*, 2013). Outros trabalhos de Ligiane Florentino (hoje professora da Universidade José do Rosário Vellano- Unifenas) mostraram que *S. virgata* estimulava a ocorrência de *A. doeberae* no solo, mas não inibia a ocorrência de outras espécies

e gêneros de rizóbio (Florentino *et al.*, 2009, 2010). Num destes trabalhos (Florentino *et al.*, 2009), nos deparamos com outra nova espécie de bactéria fixadora de N₂, também simbiótica de espécies florestais, que após vários estudos foi identificada como - *Cupriavidus necator* (Silva *et al.*, 2012a). Mas esta é outra de muitas outras estórias.

Em síntese, novas espécies de rizóbios, principalmente de *Bradyrhizobium* têm sido descritas desde então com base em estípulas isoladas de espécies florestais de ecossistemas brasileiros, não só pelo nosso grupo (*B. florestais* da tese de Elaine Martins Costa, hoje professora da UFPI) e *B. campsiandrae* da tese de Daniele Cabral Michel egressa do mestrado na UFRRJ/Embrapa Agrobiologia) (Costa *et al.*, 2028; Michel *et al.*, 2021), mas também pelo da Agrobiologia. Também demonstramos a capacidade de nodulação de *Burkholderia* (*Paraburkholderia*) *fungorum* (Silva *et al.* 2012 b), trabalho da tese de Krisle Silva, hoje pesquisadora da Embrapa Florestas. As novas espécies descritas mais recentemente já incluem o sequenciamento completo do genoma, o que nos proporcionou independência de laboratórios estrangeiros para conhecer nossa biodiversidade bacteriana. Artigos com relação a outras novas espécies já estão sendo preparados.

Contribuição da Dra. Johanna na trajetória de Sérgio Miana de Faria

Em 1979, aos 20 anos, conheci a Dra. Johanna. Eu cursava Engenharia Florestal na UFRRJ e soube que havia bolsas de estudos disponíveis na Embrapa. Após uma rápida entrevista, de três perguntas, ela foi até a biblioteca e trouxe uma pilha de artigos e uns dois livros, tudo em inglês, e me disse para voltar com um projeto de pesquisa. Em seguida, ela me apresentou ao Dr. Helvécio De-Polli que seria o meu orientador. O projeto visava o uso de gomas caseiras para aderir os inoculantes às sementes, que foi aprovado pelo CNPq em maio de 1979. As pesquisas na época enfocavam exclusivamente a parte agronômica, sem considerar as espécies florestais. Gradualmente, comecei a incorporar espécies como sabiá, bracatinga e outras em meus experimentos, substituindo o feijão, centrosema e outras culturas agronômicas e que resultou num artigo publicado na PAB (de Faria *et al.* 1985). Quando Helvécio saiu para realizar seu doutorado fiquei sendo orientado pela Dra. Johanna por um período curto e difícil, pois quando chegava com os resultados que ela tinha proposto na reunião anterior ela já tinha outras ideias e quando eu chegava com os resultados dessas novas ideias ela já tinha outras ideias e assim sucessivamente. Foi ficando uma loucura na minha cabeça, pois não conseguia acompanhar tamanha continuidade de ideias.

Sentindo que a parte florestal não iria se desenvolver como eu gostaria no Setor de Microbiologia do Solo (Antigo nome da Embrapa Agrobiologia), solicitei a Dra. Johanna uma carta de apresentação à Cia Vale do Rio Doce para um estágio em Linhares, onde a Vale ainda possui uma reserva florestal.

Na reserva da Vale, comecei a verificar a nodulação nas espécies florestais nativas daquela região. A Reserva da Vale possuía um herbário fabuloso e confiável, fruto da grande cooperação com cientistas botânicos brasileiros e internacionais e que era administrado pelo Eng. Florestal Renato M. de Jesus. Foram a partir dessas visitas, em todas as minhas férias escolares, que observamos várias espécies e gêneros da família Leguminosa (Fabaceae) que nunca tinham sido observadas quanto a sua capacidade de

nodular e fixar nitrogênio, atividade que ainda desenvolvo, (de Faria *et al.* 1984a, 1984b, 1988, 1989, 2010, Diabate *et al.* 2005).

A partir desses resultados a Dra. Johanna ficou muito empolgada e resolvemos fazer um projeto para a Finep que em 1982 foi aprovado. Primeiro grande projeto que envolvia espécies florestais da Embrapa Agrobiologia financiado por uma agência de fomento.

Durante esse período reforçamos os levantamentos da nodulação em espécies Leguminosas em outros estados como São Paulo e Minas Gerais e na seleção das bactérias mais eficientes na fixação de nitrogênio para as espécies florestais de interesse econômico e ambiental. Em setembro de 1983, a Dra. Johanna promoveu um Simpósio de Fixação de Nitrogênio em Árvores Tropicais com apoio maciço da Finep, CNPq e da National Academy of Sciences que está registrado no volume 19 s/n da Revista PAB (Pesquisa Agropecuária Brasileira), para o qual a Fátima também contribuiu (Bonetti *et al.* e Souza *et al.* 1984). Foi neste Simpósio que conheci por meio da Professora Ariane Peixoto, professor Murça Pires e do colega Haroldo C. Lima, a importância e o significado de catalogar todas as minhas coletas em um herbário seguro. Passei a depositar minhas coletas no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Foi também, por meio deles, que passei a estudar e entender a taxonomia da família.

A Dra. Johanna tinha muitos contatos internacionais. A Dra. Janet Sprent, esteve na Embrapa Agrobiologia em 1984 e teve contato com meu trabalho e se manifestou interessada em estudar a estrutura dos nódulos das espécies que eu havia encontrado nas florestas brasileiras.

Gracias à Dra. Johanna, recebi uma bolsa da Capes em 1985 para desenvolver meus estudos em Dundee, na Escócia, sob a supervisão da Dra. Janet Sprent.

Descobrimos que alguns nódulos, principalmente aqueles oriundos das espécies basais da família Leguminosa, apresentavam cordões de infecção persistentes, semelhantes aos encontrados em *Parasponia* spp. (Trinick 1973, 1979) – o único gênero botânico que nodula com rizóbio da família Cannabaceae (de Faria *et al.* 1986, 1988). As implicações desses achados na evolução da nodulação na família são discutidas no artigo "The innovation of the symbiosome has enhanced the evolutionary stability of nitrogen fixation in legumes" (de Faria *et al.* 2022).

Ao retornar ao Brasil em julho de 1988, a Dra. Johanna me contratou como consultor nacional e, em 1989, fui efetivado como pesquisador da Embrapa. Logo após meu retorno, elaboramos um projeto em parceria com a Fundação Banco do Brasil, que incluía, além do levantamento da ocorrência de nodulação em espécies florestais, a seleção de bactérias eficientes na fixação de nitrogênio e a implantação de experimentos de campo utilizando essas espécies.

Durante esse período, junto com Fátima Moreira, escrevemos um artigo publicado na New Phytologist em 1992 intitulado "Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil".

Um estudante de iniciação científica também fez parte da nossa colaboração. Ederson C. Jesus começou a trabalhar comigo na pesquisa sobre a dependência de micorrizas para a nodulação eficiente em algumas espécies florestais (Jesus *et al.* 2005). Após sua graduação, eu o recomendei para trabalhar com a Fátima Moreira na UFLA, onde sua passagem foi muito exitosa, recebendo menção honrosa no Prêmio Capes de 2009 por sua tese. Hoje, ele é meu colega de trabalho na Embrapa Agrobiologia.

As atividades florestais na Embrapa Agrobiologia já eram uma realidade. Vários

outros projetos foram elaborados visando o uso de leguminosas florestais em diversos sistemas agronômicos, florestais e agroflorestais, mas o que teve maior repercussão e impacto foi o uso dessas espécies em projetos de recuperação de áreas degradadas, principalmente aquelas voltadas para as alteradas pela atividade de mineração (Franco & de Faria 1987).

A Dra. Johanna passou, nesta época, a se dedicar exclusivamente às culturas das gramíneas (Poaceae). Avançamos significativamente em números, mas ainda há muito a ser feito, especialmente na classificação e identificação das bactérias depositadas no acervo da Embrapa Agrobiologia.



Johanna e sua equipe: economia de 1 bilhão de dólares com uso de bactérias

Figura 2. Dra. Johanna e equipe - Revista Veja N° 806 15/02/1984

Conclusão

O Brasil tem a maior diversidade de leguminosas florestais do mundo e certamente teremos muitas descobertas pela frente sobre a simbiose destas com rizóbios, para as quais contribuirão os "descendentes" de Johanna, que já estão na quarta e quinta gerações e espalhados em várias instituições de todas as regiões brasileiras, assim como eu e Fatima. Com Johanna aprendemos a pesquisar, ensinar e formar recursos humanos e todos/as nós temos orgulho de ser e dar continuidade ao seu legado para a ciência brasileira.

Dizeres da Dra. Johanna:

"Se quiser ficar rico, aqui não é o lugar, aqui você poderá crescer e garantir uma família."

"Faça um projeto e submeta aos agentes financeiros após você ter os resultados."

"Divida o seu orçamento com quem precisa, amanhã, é você que poderá precisar."

Agradecimentos

Sérgio Miana de Faria agradece ao CNPq pela bolsa de estudos desde a iniciação científica em 1980; à Capes, FINEP, CNPq, Faperj, Vale, Banco do Brasil e Hydro pelo apoio financeiro aos projetos e possibilidade de formação aos mais de 100 estudantes de IC, Mestrado e Doutorado. Ao Jardim Botânico do Rio de Janeiro, pelo depósito e arquivo de todas as minhas coletas de campo.

Fatima Maria de Souza Moreira agradece ao CNPq pelas bolsas de estudo e produtividade desde 1976, e aos vários projetos financiados pelas agências FINEP, CNPq, Capes, Fapemig, GEF/UNEP, e diversas empresas que permitiram sua produção científica e a formação de recursos humanos de diversos níveis.

Referências:

- BARBERI, A., CARNEIRO, M.A.C., MOREIRA, F.M.S., SIQUEIRA, J.O. Nodulation in leguminous species in nursery conditions at south Minas Gerais state, **Cerne** 4:145–153. 1998.
- BOMFETI, C. A.; FERREIRA, P. A. A.; CARVALHO, T. S.; DE RYCKE, R.; MOREIRA, F. M. S.; GOORMAHTIG, S.; HOLSTERS, M. Nodule development on the tropical legume *Sesbania virgata* under flooded and non-flooded conditions. **Plant Biology** 15: 93-98, 2013. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00592.x>
- BOURNAUD C, DE FARIA SM, DOS SANTOS JMF *et al.* *Burkholderia* species are the most common and preferred nodulating symbionts of the *Piptadenia* group (tribe Mimosae). **PLoS One** 8: e63478. 2013. <https://doi.org/10.1371>.
- BRUNEAU A, QUEIROZ LP, RINGELBERG JJ, BORGES LM, BORTOLUZZI RLC, BROWN GK, CARDOSO DBOS, CLARK RP, CONCEICAO AS, COTA MMT, DEMEULENAERE E, STEFANO RD, EBINGER JE, FERM J, FONSECA-CORTES A, GAGNON E, GREATHER R, GUERRA E, HASTON E, HERENDEEN PS, HERNANDEZ HM, HOPKINS HCF, HUAMANTUPA-CHUQUIMACO I, HUGHES CE, ICKERT-BOND SM, IGANCI J, KOENEN EJM, LEWIS GP, LIMA HC, LIMA AG, LUCKOW M, MARAZZI B, MASLIN BR, MORALES M, MORIM MP, MURPHY DJ, O'DONNELL SA, OLIVEIRA FG, OLIVEIRAACS, RANDO JG, RIBEIRO PG, RIBEIRO CL, SANTOS FS, SEIGLER DS, SILVA GS, SIMON MF, SOARES MVB, TERRA V **Advances in Legume Systematics** 14. Classification of Caesalpinioidae. Part 2: higher-level classification. **PhytoKeys** 240:1–552.2024. 10.3897/phytokeys.240.101716
- CAMPÊLO, A.B. Caracterização e especificidade de *Rhizobium* spp. de leguminosas florestais, Rio de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1976, 122p (Master thesis).
- CHEN W-M, DE FARIA SM, JAMES EK *et al.* *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 57:1055–9. 2007. <https://doi.org/10.1099/ijns.0.64873-0>
- CHEN W-M, JAMES EK, COENYET *et al.* *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 56:1847–51. 2006. <https://doi.org/10.1099/ijns.0.64325-0>
- CHEN, W.M.; DE FARIA, S.M.; CHOU, J.H.; JAMES, E.K.; ELLIOT, G.N.; SPRENT, J.I.; BONTEMPS, C. YOUNG, J.P.W.; VANDAMME, P. *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpiniifolia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 58 (9): 2174-2179, 2008b. <https://doi.org/10.1099/ijns.0.65816-0>

- COSTA, ELAINE MARTINS DA; AZARIAS GUIMARÃES, AMANDA; SOARES DE CARVALHO, TEOTONIO; LOUZADARODRIGUES, TAINARA; DE ALMEIDA RIBEIRO, PAULA ROSE; LEBBE, LIESBETH; WILLEMS, ANNE; DE SOUZAMOREIRA, FATIMA M. *Bradyrhizobium forestalis* sp. nov., an efficient nitrogen-fixing bacterium isolated from nodules of forest legume species in the Amazon. **Archives of Microbiology** 200:743-752, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1486-2>
- DE FARIA S.M., A.A. FRANCO, RM DE JESUS, M DE S MENANDRO, JB BAITELLO, ESF MUCCI, J DÖBEREINER, JI SPRENT. New nodulating legume trees from South-East Brazil. **New Phytologist** 98 (2): 317-328, 1984. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1984.tb02742.x>
- DE FARIA S. M., LEWIS G. P., SPRENT J. I. AND SUTHERLAND J. M. Occurrence of nodulation in the Leguminosae. **New Phytologist** 111:607-619.1989. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1989.tb02354.x>
- DE FARIA S. M., MCINROY S. AND SPRENT J. I. The occurrence of infected cells, with persistent infection threads, in legume root nodules. **Canadian Journal of Botany** 65, 533-538. 1987. <https://doi.org/10.1139/b87-07>
- DE FARIA, S.M., DIEDHIOU A.G., LIMA H.C DE, RIBEIRO R. D., GALIANA A., CASTILHO, A.F, HENRIQUES J. C. Evaluating the nodulation status of leguminous species from the Amazonian forest of Brazil. **Journal of Experimental Botany** 61 (11):3119-3127. 2010. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq142>
- DE FARIA, S.M., LIMA, H.C.DE, SPRENT, J.I. Additional studies of the nodulation status of legume species in Brazil. **Plant and Soil** 200: 185-192.1998. <https://doi.org/10.1023/A:1004365121077>
- DE FARIA SERGIO M., JENS J. RINGELBERG, EDUARDO GROSS, ERIK J. M. KOENEN, DOMINGOS CARDOSO, GEORGE K. D. AMETSITSI, JOHN AKOMATEY, MARTA MALUK, NISHA TAK, HUKAM S. GEHLOT, KATHRYN M. WRIGHT, NEUNG TEAUMROONG, PONGPAN SONGWATTANA, HAROLDO C. DE LIMA, YVES PRIN, CHARLES E. ZARTMAN, JANET I. SPRENT, JULIE ARDLEY, COLIN E. HUGHES AND EUAN K. JAMES. 2022. The innovation of the symbiosome has enhanced the evolutionary stability of nitrogen fixation in legumes. **New Phytologist** 235 (6), 2365-2377. 2022. <https://doi.org/10.1111/nph.18321>
- DIABATE M., MUNIVE, A., DE FARIA S.M., BA, A., DREYFUS B., GALIANA A. Occurrence of nodulation in unexplored leguminous trees native to the West African tropical rainforest and inoculation response of native species useful in reforestation. **New Phytologist** 166 (1): 231-239, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01318.x>
- FRANCO A.A. AND DE FARIA, S. M. The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology & Biochemistry** 29 (5/6): 897-903, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00229-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00229-5)
- DREYFUS, B., GARCIA, J.L., GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen.nov, sp.nov, a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal Systematic Bacteriology** 38 89–98, 1988. <https://doi.org/10.1099/00207713-38-1-89>
- FLORENTINO, LIGIANE APARECIDA; GUIMARÃES, ANA PAULA; RUFINI, MÁRCIA; SILVA, KRISLE DA; MOREIRA, F. M. S. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. **Scientia Agricola** 6: 667-676, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162009000500012>
- FLORENTINO, LIGIANE APARECIDA; SOUSA, PEDRO MARTINS DE; SILVA, JACQUELINE SAVANA; SILVA, KARINA BARROSO; MOREIRA, F. M. S. Diversity and efficiency of *Bradyrhizobium* strains isolated from soil samples collected from around *Sesbania virgata* roots using cowpea as trap species. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 34:1113-1123, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832010000400011>

- GONÇALVES, M.; MOREIRA, F. M. S. Specificity of the legume *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. and its nodule isolates *Azorhizobium johannae* with other legume hosts and rhizobia. **Symbiosis** 36: 57-68, 2004.
- JESUS; E. DA C.; SCHIAVO J. A.; DE FARIA S. M. Dependência de micorrizas para a nodulação de leguminosas arbóreas tropicais. **Revista Árvore** 29(4): 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622005000400006>
- LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; NICK, G.; MOREIRA, FATIMA; MOLOUBA, F.; HOSTE, B.; TORCK, U.; NEYRA, M.; COLLINS, M. D.; LINDSTROM, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarium* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 48:369-382, 1998. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-2-369>
- LEGUME DATA PORTAL. <https://www.Legume data. org/>. Accessed 3. Nov 2023.
- LPWG [The Legume Phylogeny Working Group] (2017) A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **TAXON** 66:44-77.2017. DOI:10.12705/661.3
- MAGALHÃES F.F.M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. **Revista de Microbiologia** São Paulo, v. 15, n.4, p. 246-252, 1984.
- MAGALHAES, F. M. M.; MAGALHÃES, L. M. S.; OLIVEIRA, L. A.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de nodulação em leguminosas florestais de terra firme nativas da região de Manaus-AM. **Acta Amazônica** 12: 509-514, 1982. <https://doi.org/10.1590/1809-43921982123509>
- MAGALHAES, F. M. M.; MOREIRA, F. M. S.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 55:417-430, 1983.
- MAGALHÃES, FÁTIMA M. M.; SILVA, MARLENE F. DA. Associações *Rhizobium* - Leguminosas no Estado de Rondônia. **Acta Amazônica** 17: 7-18, 1987. <https://doi.org/10.1590/1809-43921987175017>
- MICHEL, DANIELE CABRAL; MARTINS DA COSTA, ELAINE; AZARIAS GUIMARÃES, AMANDA; SOARES DECARVALHO, TEOTONIO; SANTOS DE CASTRO CAPUTO, POLYANE; WILLEMS, ANNE; DE SOUZA MOREIRA, FATIMA MARIA. *Bradyrhizobium campsiandrae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterial strain isolated from a native leguminous tree from the Amazon adapted to flooded conditions. **Archives of Microbiology** 203: 233-240, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02022-7>
- MOREIRA, F. M.S.; SILVA, M. F.; de FARIA, S.M. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil. **New Phytologist** 121: 563-570, 1992. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1992.tb01126.x>
- MOREIRA, F.M.S., GILLIS, M, POT, B., KERSTERS, K. FRANCO, A.A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins, **Systematic Applied Microbiology** 16 135-146, 1993. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80258-4](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80258-4)
- MOREIRA, F.M.S., HAUKKA, K., YOUNG, J.P.W. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil, **Molecular Ecology** 7 889-895 1998. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00411.x>
- MOREIRA, F.M.S.; CRUZ, L.; FARIA, S.M.; MARSH, T.; MARTINEZ-ROMERO, E.; PEDROSA, F.O.; PITALD, R.; YOUNG, P.W. *Azorhizobium doeberaeinerae* sp. Nov. Microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Systematic and Applied Microbiology** 29 (3):197-206, 2006. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80258-4](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80258-4)
- MOREIRA, FRANCISCO WESEN; MOREIRA, FÁTIMA MARIA DE SOUZA; SILVA, MARLENE FREI-

- TAS Da. Germinação, Crescimento Inicial e Nodulação Em Viveiro De Saboarana (*Swartzia laevicarpa* Amshoff). **Acta Amazônica** 25:149-159, 1995. <https://doi.org/10.1590/1809-43921995253160>
- MORIM M.P.; FILARDI F. L.R.; SARTORI, Â.L.B.; SIMON M. F.; IGANCI J.R.; LEWIS G.P.; LIMA, H. C.DE; LUGHADHA E.N.; FERNANDES, M. F.; QUEIROZ L. P.; CARDOSO, D. Assembling the Brazilian flora: overview of Leguminosae diversity. **Brazilian Journal of Botany** 2024. <https://doi.org/10.1007/s40415-024-01034-7>
- SILVA, KRISLE DA ; FLORENTINO, LIGIANE APARECIDA ; DA SILVA, KARINA BARROSO ; DE BRANDT, EVIE ; VANDAMME, PETER ; DE SOUZA MOREIRA, FATIMA MARIA ; DE SOUZA MOREIRA, F.M. *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. **Systematic and Applied Microbiology** 35:175-182, 2012a. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.10.005>
- SILVA, KRISLE; DE SOUZA CASSETARI, ALICE; SILVA LIMA, ADRIANA; DE BRANDT, EVIE; PINNOCCK, ELEANOR; VANDAMME, PETER; DE SOUZA MOREIRA, FATIMA MARIA. Diazotrophic *Burkholderia* species isolated from the Amazon region exhibit phenotypical, functional and genetic diversity. **Systematic and Applied Microbiology** 35: 253-262, 2012b. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.04.001>
- TRINICK, M. J. Symbiosis between *Rhizobium* and the non-legume, *Trema aspera*. **Nature** 244, 459, 1973. <https://doi.org/10.1038/244459a0>
- TRINICK, M. J. Structure of nitrogen fixing nodules formed by *Rhizobium* on roots of *Parasponia andersonii* Planch. **Canadian Journal of Microbiology** 25: 565-578, 1979. DOI: 10.1139/m79-082

Johanna Döbereiner e sua grande descoberta: A contribuição de bactérias diazotróficas associadas às gramíneas

*Fábio Bueno dos Reis Junior¹
José Ivo Baldani²*

Revisado por: Maria Domingues Vargas

¹Embrapa Cerrados, Cx. Postal 08223, CEP 73310-970, Planaltina, DF
²Embrapa Agrobiologia, BR. 465, km 7, CEP 23891-000, Seropédica, RJ

Os gramados do Km 47 e o despertar do interesse pela fixação biológica de nitrogênio (FBN) em gramíneas

Dra. Johanna já tinha tido contato com o tema da fixação assímbiotica de nitrogênio na Alemanha, ainda durante seus estudos na Escola Superior de Agronomia Freising-Weihenstephan, tendo inclusive apresentado uma monografia sobre *Azotobacter chroococcum* e sua aplicação na agricultura (Michahelles, 2018). Entretanto, foi apenas após chegar ao Brasil, já trabalhando no então Centro Nacional de Ensino e Pesquisas Agronômicas (CNEPA), no Km 47 da antiga estrada Rio-São Paulo, que seu interesse por esta área de pesquisa foi realmente despertado. Ali, Dra. Johanna começou a questionar por que os gramados daquele local, cultivados com a grama-batatais (*Paspalum notatum* cv batatais), estavam sempre verdes e saudáveis, mesmo sobre um solo com fertilidade tão baixa e sem nenhum tipo de adubação nitrogenada.

Esse questionamento foi o ponto de partida para os estudos que culminaram com o isolamento, caracterização e identificação da bactéria *Azotobacter paspali* (Döbereiner, 1966), proveniente da rizosfera da grama-batatais (Figura 1). Essa bactéria, reclassificada posteriormente como *Azorhizophilus paspali* (Thompson & Skerman, 1979), se associa preferencialmente com *P. notatum* cv. batatais, mas também pode estar presente em associação com outras espécies do mesmo gênero, como *P. plicatum*, *P. dilatatum* e *P. vergatum* (Döbereiner, 1970), não sendo encontrada em amostras de outras espécies vegetais (Döbereiner & Campêlo, 1971). No ano de 1983, Boddey e colaboradores publicaram um trabalho utilizando a técnica de diluição isotópica de ^{15}N , no qual mostraram que *P. notatum* cv. batatais conseguia obter aproximadamente 20 kg N/ha/ano via fixação biológica. Dados recentes mostraram uma alta diversidade de bactérias associadas a diferentes genótipos do gênero *Paspalum*, incluindo *Bacillus*, *Rhizobium*, *Paraburkholderia*, *Enterobacter*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas*, *Dyadobacter* e *Acinetobacter* (Amaral *et al.*, 2022).

A cana-de-açúcar, cultivada por séculos no Brasil sem o uso de fertilizantes nitrogenados, também chamou a atenção da Dra. Johanna. Assim, ainda na década de 1950, ela publicava trabalhos sobre a presença de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a esta cultura (Döbereiner, 1959), descrevendo inclusive uma nova espécie encontrada nas proximidades das raízes, a *Beijerinckia fluminensis* (Döbereiner & Ruschel, 1958). Posteriormente, resultados de pesquisa mostraram que até 60% do N exigido pela cana-de-açúcar pode ser oriundo da FBN (Boddey *et al.*, 2001; Polidoro *et al.*, 2001), dependendo do genótipo da planta, sua interação com bactérias diazotróficas e características edafoclimáticas das áreas de cultivo.

A redescoberta de *Spirillum lipoferum* (*Azospirillum* spp.) e a identificação de novas bactérias diazotróficas associadas a gramíneas

Na esteira das primeiras descobertas realizadas pela Dra. Johanna e sua equipe, somadas à crise do petróleo nos anos 1970, a preocupação com a poluição causada pelo uso de fertilizantes nitrogenados e ao surgimento de métodos que possibilitavam

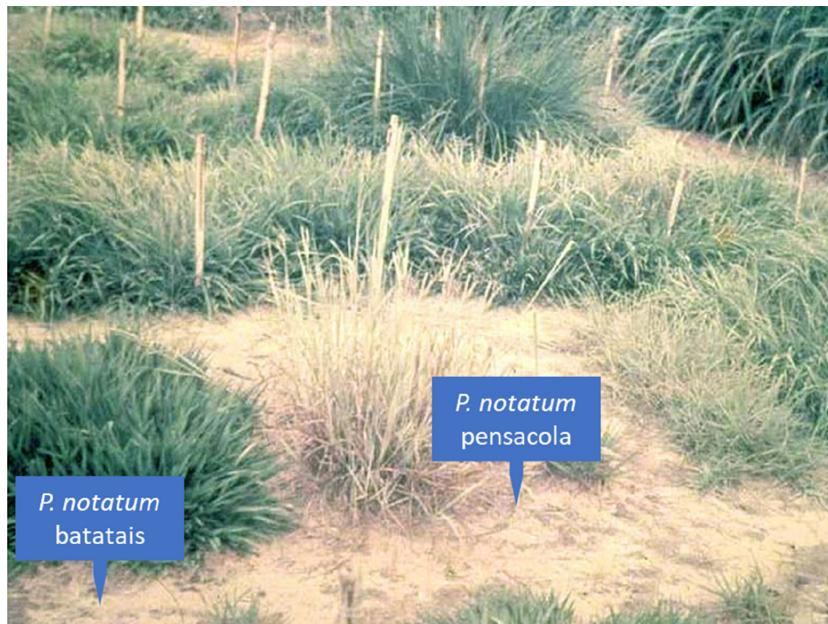


Figura 1. *Paspalum notatum* cv batatais, a grama que forma associação com *Azotobacter pastpali*, ao lado de *P. notatum* cv pensacola, que não se associa com esta bactéria diazotrófica.

Fonte: Arquivos Embrapa.

medir a FBN, como a avaliação da atividade de redução de acetileno (ARA), o interesse pelo tema cresceu no Brasil e no mundo, com especial atenção para as associações de diazotróficos com gramíneas e cereais (Franco & Boddey 1997).

Um fator determinante para as descobertas que vieram a seguir foi o surgimento dos meios de cultivo semi-sólidos sem N (Figura 2), que permitem que as bactérias se desloquem para uma região onde a taxa de difusão de oxigênio está em equilíbrio com sua taxa de respiração, evitando que a presença de O₂ possa inibir a atividade da nitrogenase, complexo enzimático responsável pela FBN (Baldani & Baldani, 2005). Esses meios de cultivo permitiram o que ficou conhecido como a redescoberta da *Spirillum lipoferum* (Döbereiner & Day, 1976), subsequentemente reclassificada como *Azospirillum lipoferum* e possibilitou o isolamento de uma nova espécie identificada como *A. brasiliense* (Tarrand *et al.*, 1978). Na continuidade destes estudos descobriu-se outra espécie, *Azospirillum amazonense* (hoje reclassificada como *Nitrospirillum amazonense* – Lin *et al.*, 2014), originalmente isolada em associação com gramíneas forrageiras cultivadas na região amazônica e Mata Atlântica (Magalhães *et al.* 1983). Atualmente o gênero *Nitrospirillum* é constituído de três espécies (*N. amazonense*, *N. iridis* e *N. viridazotii* – Baldani *et al.*, 2024) e seis novas espécies encontram-se em fase de validação (Zilli *et al.*, dados não publicados).

A partir deste momento (1976-1978) o gênero *Azospirillum* passou a ser um dos mais estudados dentre as rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (RPCV). Hoje o gênero conta com 25 espécies descritas (Cruz-Hernández *et al.*, 2022), mas *A. lipoferum* e *A. brasiliense* continuam em destaque, ocorrendo em grande abundância, principalmente em regiões tropicais, em associação com diversas espécies de plantas (Hartmann & Bashan, 2009). Com o avanço dos estudos sobre essas bactérias descobriu-se que elas possuem, além da FBN, múltiplos modos de ação para promoverem o crescimento das plantas, como a produção de fitormônios, como as auxinas, que estimulam o surgimento de raízes secundárias e o aumento da superfície radicular, resultando numa melhora da



Figura 2. Dra. Johanna no Laboratório de Gramíneas, na Embrapa Agrobiologia, avaliando o crescimento de bactérias diazotróficas em meio semi-sólido sem N. Fonte: Arquivos Embrapa.

absorção de água e nutrientes aumentando, assim, a capacidade da planta de produzir e suportar estresses ambientais; a mobilização de fosfatos; a produção de sideróforos; e o antagonismo contra patógenos (Fukami *et al.*, 2018).

Com o crescimento do conhecimento sobre *Azospirillum* spp., logo surgiu o interesse por sua inoculação nas plantas e inúmeros experimentos foram realizados em vários países. Em uma revisão publicada por Okon & Labandera-Gonzalez (1994), esses autores mostraram que entre 60% e 70% dos experimentos levantados apresentaram resposta positiva à inoculação com *Azospirillum*, com aumentos no rendimento estatisticamente significativos na ordem de 5 a 30%. Diante desses resultados, inoculantes comerciais contendo essas bactérias foram lançados no mercado mundial (Okon & Labandera-Gonzalez, 1994). Uma análise de metadados sobre *Azospirillum* mostrou que o maior número de publicações ocorreu entre as décadas de 70 e 80 e que o tema inoculação/inoculante aparece atualmente com maior número de publicações, principalmente a partir de 2012 (Cassán *et al.*, 2021).

Além de *Azospirillum* spp., o desenvolvimento e utilização dos meios de cultivo semi-sólidos sem N permitiu o isolamento de novas bactérias diazotróficas, inclusive provenientes do interior das plantas (Baldani *et al.*, 2014). Assim, a Dra. Johanna introduziu o conceito de microrganismos endófitos na pesquisa sobre fixação biológica de nitrogênio (Döbereiner, 1992). De maneira geral, um microrganismo endófito é aquele capaz de colonizar, durante parte de seu ciclo de vida, os tecidos internos das plantas sem causar danos (Petrini 1991; Hardoim *et al.*, 2015). A ocorrência de bactérias no interior das plantas tem caráter ecológico importante, com essas bactérias recebendo nutrientes diretamente no interior do vegetal, sofrendo menos estresses ou competição com outros organismos do solo. Além disso, colonizam sítios onde o acesso de O₂ é restrito, evitando a inibição da atividade da nitrogenase (Döbereiner *et al.*, 1995).

A primeira bactéria fixadora de nitrogênio endofítica foi isolada em 1984, a partir de amostras da rizosfera, raízes lavadas e raízes esterilizadas superficialmente de plantas

de milho, sorgo e arroz, dando origem a um novo gênero, *Herbaspirillum* e a espécie denominada *H. seropedicae* (Baldani *et al.* 1986). Outra bactéria do mesmo gênero, *H. rubrisubalbicans*, surgiu com a reclassificação de *Pseudomonas rubrisubalbicans*, uma bactéria responsável pela doença da estria mosqueada em alguns genótipos de cana-de-açúcar, mas que apresenta capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (Döbereiner *et al.*, 1990). O caráter endofítico dessas espécies foi demonstrado por Olivares *et al.* (1996) ao recuperar as bactérias de raízes de plantas de sorgo cujas sementes foram plantadas em solo onde haviam sido previamente inoculadas, mas não detectadas no solo aos 60 dias após a inoculação pela técnica do Número Mais Provável (NMP). No início deste século, o gênero *Herbaspirillum* foi expandido com a descrição da espécie *H. frisingense*, isolada de raízes e folhas de gramíneas forrageiras cultivadas na Alemanha e no Brasil (Kirchhof *et al.*, 2001). Interessante ressaltar que nome "frisingense" é derivado da cidade Frisinga, conhecida hoje como Freising, na Alemanha, onde a Dra. Johanna cursou Agronomia (Michahelles, 2018). O gênero *Herbaspirillum* é atualmente constituído de 13 espécies validadas, porém, somente as três espécies listadas acima são bactérias fixadoras de nitrogênio.

Outra bactéria endofítica identificada neste período pelo grupo liderado pela Dra. Johanna foi a *Acetobacter diazotrophicus* (reclassificada como *Gluconacetobacter diazotrophicus*), inicialmente isolada de raízes e colmos de diversas variedades de cana-de-açúcar cultivadas no Nordeste (PE e AL) e no Sudeste (SP e MG) do Brasil (Cavalcante & Döbereiner 1988). *G. diazotrophicus* apresenta características interessantes, como habilidade de crescimento em meio contendo 10% de sacarose (condição inibitória para alguns outros dizotróficos), capacidade de fixar nitrogênio em pH até 2,5 e manutenção da atividade da nitrogenase mesmo na presença de altas concentrações (25 mM) de nitrato (Stephan *et al.* 1991). O gênero *Gluconacetobacter* é atualmente constituído de 12 espécies validadas, porém somente três espécies possuem a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico.

Bactérias do gênero *Paraburkholderia* (à época denominada *Burkholderia*), caracterizadas por sua versatilidade ecológica e capacidade de promover o crescimento vegetal por meio de diversos mecanismos de ação, também foram alvo desses estudos que levaram à identificação de novas espécies, como a *Paraburkholderia tropica* (Reis *et al.* 2004). No trabalho que deu origem a essa nova espécie, ela foi isolada de plantas cultivadas em distintas regiões geográficas, com climas que variam de subtropical temperado a quente e úmido, da rizosfera e dos tecidos internos de plantas de cana-de-açúcar, milho e teosinto, no Brasil, México e África do Sul. Outra espécie desse gênero descrita pelo grupo é a espécie *Paraburkholderia silvatlantica*, isolada da rizosfera de milho e de raízes de diversas variedades de cana-de-açúcar cultivadas em diferentes regiões canavieiras do Brasil (Perin *et al.*, 2006).

As bactérias batizadas em homenagem à Dra. Johanna

A dedicação e as contribuições da Dra. Johanna para a pesquisa com a fixação biológica de nitrogênio lhe renderam muitas homenagens, dentre elas o batismo de bactérias, como *Azospirillum doeberinerae* (Eckert *et al.*, 2001) e *Gluconacetobacter johannae* (Fuentes-Ramírez *et al.*, 2001). *Azospirillum doeberinerae* foi isolada a partir de raízes da gramínea *Miscanthus sinensis*, cultivada na Alemanha, enquanto

Gluconacetobacter johannae é proveniente da rizosfera e do rizoplano de plantas de café (*Coffea arabica* L.), cultivadas no México. Uma outra espécie descrita em homenagem a Dra. Johanna foi denominada *Azorhizobium doeberaeinerae*, isolada de nódulos da leguminosa *Sesbania virgata* em trabalho coordenado por uma de suas ex-alunas, a Dra. Fátima Moreira (de Souza Moreira *et al.*, 2006).

Análises taxonômicas da estirpe LMG 2819, pertencente à espécie *Beijerinckia fluminensis*, descrita pela Dra. Johanna e equipe (Döbereiner e Ruschell, 1958), mostraram que ela era distinta desta e das demais espécies do gênero. Isso levou os autores deste trabalho a proporem a criação da nova espécie *Beijerinckia doeberaeinerae*, em reconhecimento a contribuição da Dra. Johanna para a área de pesquisa com bactérias associativas fixadoras de nitrogênio (Oggerin *et al.*, 2009).

A era genômica e pós-genômica de bactérias isoladas pelo grupo da Dra. Johanna

O caso de sucesso do projeto em rede para desvendar o genoma da *Xylella fastidiosa*, financiado pela FAPESP e que rendeu a capa da publicação na revista *Nature* (Simpson *et al.*, 2000), impulsionou novos projetos de sequenciamento envolvendo outras instituições de pesquisa no Brasil, como por exemplo a rede Riogene apoiada pela FAPERJ-RJ e a rede Genopar financiada pela Fundação Araucária-PR. O diferencial em relação a *X. fastidiosa* é que essas novas redes focaram em bactérias benéficas isoladas pelo grupo da Dra. Johanna: a) *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL5, isolada de cana-de-açúcar, com o genoma completo publicado em 2009 (Bertalan *et al.*, 2009) e, b) *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78 (= SMR1) isolada de plantas de sorgo, com o genoma completo publicado em 2011 (Pedrosa *et al.*, 2011).

Os avanços no desenvolvimento de novos equipamentos e técnicas de sequenciamento levaram à redução de tempo de execução e custos do processo e consequentemente permitiram o aumento vertiginoso de genomas bacterianos sequenciados e depositados na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - www.ncbi.nlm.nih.gov). Uma busca na base NCBI (14/10/24) por bactérias pertencentes aos gêneros/espécies descritos pelo grupo da Dra. Johanna indicou 255 genomas sequenciados de espécies de *Azospirillum* (22 completos), 15 de *Nitrospirillum* spp. (01 completo), 121 de *Herbaspirillum* spp. (19 completos), 5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (2 completos), 43 de *Paraburkholderia tropica* (01 completo) e 7 de *P. silvatlantica* (nenhum completo).

Estudos pós-genômicos sobre o papel do apoplasto de cana-de-açúcar em algumas dessas bactérias mostraram o envolvimento de diversos genes no metabolismo, fisiologia, motilidade e na interação com a planta. Por exemplo, proteínas do tipo SST6, flagelo e mecanismos de transdução de sinais foram modulados em *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103 (Polese, 2017), enquanto em *H. seropedicae* estirpe HRC54 alguns dos genes estavam envolvidos com o estágio inicial de estabelecimento da interação planta-bactéria (Pessoa *et al.*, 2021). No caso de *N. amazonense* estirpe CBAmC (reclassificado como *N. viridazotii*) houve uma superexpressão de sistema de defesa contra as espécies reativas de oxigênio e estresse osmótico, dentre outros (Terra *et al.*, 2020). Em *P. tropica* estirpe PPe8 genes que induzem a resposta de defesa da planta e outros relacionados a quimiotaxia e movimento bacteriano foram reprimidos (Silva *et al.*, 2018).

Diversos estudos foram realizados com *H. seropedicae* estirpe Z78 (SMR1) pelo grupo do Dr. Fabio Pedrosa (ex-aluno da Dra. Johanna) e contribuíram muito para o avanço de conhecimento da FBN e interação planta-bactéria. Um trabalho bastante interessante e com potencial biotecnológico foi gerado a partir dos estudos genômicos de *G. diazotrophicus* estirpe PAL5 e a bacteriocina denominada gluconacina. Esta bacteriocina é capaz de inibir o crescimento de doenças em cana-de-açúcar causadas por *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas albilineans*, *X. axonopodis* pv. *vasculorum*, *X. vasicola* pv. *vasculorum* (Oliveira *et al.*, 2018). Estudos posteriores feitos pelo mesmo grupo mostraram que a gluconacina também possui atividade bactericida contra a *Ralstonia solanacearum* e *P. syringae* pv. *tomato*, agentes causais de murcha e mancha bacterianas em tomate. Nesse estudo, o uso da gluconacina reduziu em 66% a severidade da doença em plantas de tomateiro infectadas com os patógenos (Ramos *et al.*, 2023).

Do laboratório ao campo: Os inoculantes para gramíneas chegam aos produtores brasileiros

Nos anos 2000, a Embrapa Soja, em parceria com a Universidade Federal do Paraná (UFPR), realizou um trabalho de seleção de estirpes de *Azospirillum brasiliense* para as culturas do milho e do trigo. Algumas das estirpes testadas apresentaram melhor crescimento e sobrevivência no solo, maior promoção de crescimento das plantas e maior adaptação às tecnologias utilizadas nessas culturas. Como resultado dessa pesquisa, seis estirpes de *A. brasiliense* comprovaram eficiência agronômica e passaram a ser autorizadas para a produção de inoculantes comerciais (Hungria *et al.*, 2006). Assim, uma grande novidade foi o lançamento e a comercialização do primeiro inoculante para milho do mercado brasileiro, que chegou às lojas na segunda quinzena de julho de 2009. Aproximadamente quinze anos depois do lançamento desta tecnologia (safra 2022/2023), dados da Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII) mostram que o uso de inoculantes chegou a mais de 22% da área plantada com milho no Brasil, com avanço gradual a cada safra (ANPII, 2023).

Recentemente, foi publicado um trabalho que apresenta resultados de 30 ensaios a campo que indicam a possibilidade de substituição de 25% do fertilizante nitrogenado, em função da inoculação com *A. brasiliense* na cultura do milho (Hungria *et al.*, 2022). Esses resultados são muito relevantes atualmente, quando vivemos em um cenário marcado pela alta dependência externa e preços elevados desses insumos. Hoje, inoculantes formulados com *A. brasiliense* são produzidos para gramíneas como milho, trigo, arroz, cana-de-açúcar e braquiária. Além disso, são recomendados para a coinoculação da soja e do feijoeiro, juntamente com os rizóbios, somando os benefícios desses organismos, o que resulta em maior nodulação, incrementos na FBN e, consequentemente, maior produtividade dessas culturas. A ANPII afirma que a coinoculação já é adotada por cerca de 35% dos produtores de soja no Brasil (ANPII, 2023).

No ano de 2018, o grupo de pesquisadores da Embrapa Agrobiologia, que deu prosseguimento ao trabalho da Dra. Johanna, lançou o primeiro inoculante voltado para a cultura da cana-de-açúcar. Formulado com a estirpe CBAmC de *Nitrospirillum viridazotii*. Esse inoculante, denominado Aprinza, foi fruto de uma parceria público-privada entre a Embrapa e a empresa BASF, que o está comercializando associado a

outros produtos de ação inseticida e fungicida, com o nome de Kit "Muneo Bio". O inoculante pode acelerar a brotação de gemas e estimular o surgimento de raízes finas secundárias, que são as de maior atividade na absorção de água e nutrientes. Desse modo, plantas inoculadas podem apresentar maior perfilhamento e incremento na área foliar, resultando em aumento na produtividade (Embrapa, 2018).

O boom dos inoculantes atualmente utilizados na agricultura do Brasil

Ao longo dos anos dedicados aos estudos com bactérias diazotróficas associadas a plantas não-leguminosas foram muitos os desafios enfrentados pela Dra. Johanna Döbereiner, desde momentos de escassez de recursos para suas pesquisas, como até mesmo a incredulidade de alguns de seus pares no meio científico. No entanto, mais de 60 anos após o início de seus trabalhos, estamos passando por um momento no qual sua influência é determinante. Os inoculantes têm assumido papel importante como parte de soluções de manejo mais sustentáveis, com potencial para substituir, integral ou parcialmente, insumos sintéticos, a fim de contornar limitações produtivas das culturas agrícolas. Além disso, frente aos novos cenários que se apresentam, com maiores períodos de estresse hídrico e aumentos de temperatura, resultante das mudanças climáticas, esses bioproductos surgem como alternativas para aumentar a resiliência das plantas.

Hoje o Brasil é tido como o país que mais utiliza inoculantes microbianos em sua agricultura (McKinsey & Company, 2022), com um impressionante volume de mais de 130 milhões de doses, de diferentes produtos, sendo utilizado anualmente em nossas lavouras (Dados da safra 2022/2023; ANPPI, 2023). Dentre os microrganismos utilizados na formulação de inoculantes destacam-se as bactérias fixadoras de nitrogênio, simbióticas (Ex.: *Bradyrhizobium* spp., *Rhizobium* spp.) ou associativas (Ex.: *Azospirillum* spp., *Nitrospirillum* spp.); produtores de fitormônios, sejam bactérias (Ex.: *Azospirillum* spp.; *Pseudomonas fluorescens*) ou fungos (Ex.: *Trichoderma* spp.); mobilizadores de nutrientes (Ex.: *Bacillus* spp.; *Pseudomonas fluorescens*; *Trichoderma* spp.; *Glomus* spp.; *Rizobagus* spp.); e promotores de tolerância a estresses abióticos (Ex.: *Bacillus* spp.). Em sua última atualização (30/09/2024), o aplicativo Bioinsumos desenvolvido pelo MAPA/Embrapa, informa que 706 produtos inoculantes têm registro no Brasil. Algo em torno de 50% desses produtos é voltado para a FBN em soja. Entretanto, diversos microrganismos promotores do crescimento de plantas estão presentes em formulações voltadas para várias espécies vegetais não-leguminosas de importância econômica, como o arroz, a braquiária, a cana-de-açúcar, o eucalipto, diferentes hortaliças, o milho e o trigo.

Perspectivas para o futuro dos inoculantes

Recentes avanços na área de inoculantes nos permitem esperar por i) novas formulações, capazes de garantir a viabilidade e estabilidade dos inoculantes durante o armazenamento e transporte, facilitar a aplicação, amenizar problemas de compatibilidade com outros insumos, permitir a pré-inoculação de sementes e melhorar

o desempenho no campo; ii) consórcios capazes de combinar mecanismos de ação de diferentes microrganismos, resultando em maiores benefícios para as plantas; iii) microrganismos melhorados por meio de ferramentas genéticas mais recentes, como a tecnologia CRISPR, que permite a edição de genes e pode ser usada para melhorar suas características benéficas associadas a promoção do crescimento vegetal.

O uso dos inoculantes no Brasil e no mundo, sendo impulsionado por inovações científicas e tecnológicas, pode contribuir para uma agricultura mais eficiente e sustentável, que seja capaz de atender às demandas alimentares de uma população em crescimento, enquanto preserva os recursos naturais. Assim, espera-se que o trabalho iniciado pela Dra. Johanna continue a render frutos por muitas gerações.

Referências

- AMARAL, M.B.; RIBEIRO, T.G.; ALVES, G.C.; COELHO, M.R.R.; MATTA, F.D.P.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. The occurrence of rhizobacteria from *Paspalum* genotypes and their effects on plant. **Scientia Agricola**, v. 79, p. e20200240, 2022. <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2020-0240>.
- ANPII. **ANALISES E ESTATÍSTICAS**, 2022. Disponível em: <https://www.anpii.org.br/estatisticas>. Acesso em: 01/06/2024.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 549-579, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652005000300014>.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropediae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, p. 86–93, 1986. <https://doi.org/10.1099/00207713-36-1-86>.
- BALDANI, J.I., DOS SANTOS, FERREIRA, N., SCHWAB, S., REIS, V.M., DE BARROS SOARES, L.H., SIMOES-ARAUJO, J.L., DOS SANTOS, D. F., BACH, E., CAMACHO, N.N., DE OLIVEIRA, A.M., ALVES, B.J.R.; SILVA, A.L.; ROSSI, C.N.; OLIVEIRA JUNIOR, A.F.; ZILLI, J.E. *Nitrospirillum viridazotii* sp. nov., an efficient nitrogen-fixing species isolated from grasses. **Current Microbiology**, v. 81, p. 144, 2024. <https://doi.org/10.1007/s00284-024-03665-1>.
- BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; VIDEIRA, S.S.; BODDEY, L.H.; BALDANI, V.L.D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and Soil**, v. 384, p. 413-431, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2186-6>.
- BERTALAN, M.; ALBANO, R.; DE PÁDUA, V.; ROUWS, L.; ROJAS, C.; HEMERLY, A.; ... & FERREIRA, P. C. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. **BMC Genomics**, v. 10, p. 1-17, 2009. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-450>.
- BODDEY, R.M.; CHALK, P.M.; VICTORIA, R.L.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J. The use of the ¹⁵N isotope dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of *Paspalum notatum* cv. Batatais. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 1036-1045, 1983. <https://doi.org/10.1139/m83-161>.
- BODDEY, R.M.; POLIDORO, J.C.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R. & URQUIAGA, S. Use of ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N2 fixation to sugar cane and other grasses. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 28, p. 889-895, 2001. <https://doi.org/10.1071/PP01058>.

- CASSÁN, F.; LÓPEZ, G.; NIEVAS, S.; CONIGLIO, A.; TORRES, D.; DONADIO, F.; MOLINA, R.; MORA, V. What do we know about the publications related with *Azospirillum*? A metadata analysis. **Microbial Ecology**, v. 81, p. 278-281, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01559-w>.
- CRUZ-HERNÁNDEZ, M.A.; MENDOZA-HERRERA, A.; BOCANEGRAGARCÍA, V.; RIVERA, G. *Azospirillum* spp. from plant growth-promoting bacteria to their use in bioremediation. **Microorganisms**, v. 10, n. 5, p. 1057, 2022. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10051057>.
- DE SOUZA MOREIRA, F.M.; CRUZ, L.M.; DE FARIA, S.M.; MARSH, T.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; PEDROSA, F.O.; PITARD, R.M.; YOUNG, J.P.W. *Azorhizobium doeberae* sp. nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 197-206, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.09.004>.
- DÖBEREINER, J.; CAMPELO, A.B. Non-symbiotic nitrogen fixing bacteria and tropical soils. **Plant and Soil**, v. 35, p. 457-470, 1971. <https://doi.org/10.1007/BF02661871>.
- DÖBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp. n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 1, p. 357-365, 1966. <https://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/18041>.
- DÖBEREINER, J. Further research on *Azotobacter paspali* and its variety specific occurrence in the rhizosphere of *Paspalum notatum* Flugge. **Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene**, v. 124, p. 224-30, 1970.
- DÖBEREINER, J. Influência da cana de açúcar na população de *Beijerinckia* no solo. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 19, p. 251-258, 1959.
- DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: Endophytic N2 fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, v. 44, p. 310-313, 1992.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: FENDRICK, I.; GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J.; ZAMAROCZY, M. (Eds). **Azospirillum VI and Related Microorganisms**. Berlin: Springer Verlag, 1995. p. 3-14. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79906-8_1.
- DOBREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and di-nitrogen fixing sites. In: **Symposium on nitrogen fixation**. Newton, W.E.; Nymans, C.J. (Eds.). Washington State University Press, Pullman, WA. p. 518-538, 1976.
- DÖBEREINER, J.; PIMENTEL, J.P.; OLIVARES, F.L.; URQUIAGA, S. Bactérias diazotróficas podem ser endofíticas ou fitopatogênicas? **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 62, p 319. 1990.
- DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A.P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**. v. 1, p. 261-272, 1958.
- ECKERT, B.; WEBER, O.B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doeberae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 17-26, 2001. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-17>.
- EMBRAPA. **Inoculante para fixação de nitrogênio para cana é lançado pela Basf e Embrapa**, 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/39688081/inoculante-para-fixacao-de-nitrogenio-para-cana-e-lancado-pela-bASF-e-embrapa>>. Acesso em: 08 de out. 2024.
- FRANCO, A.A.; BODDEY, R.M. Dr. Johanna Döbereiner: A brief biography. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 9-11, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00236-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00236-2).
- FUENTES-RAMÍREZ, L.E.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; TAPIA-HERNÁNDEZ, A.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; WANG, E.T.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp.

- nov., associated with coffee plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1305-1314, 2001. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-4-1305>.
- FUKAMI, J.; CEREZINI, P.; HUNGRIA, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**, v. 8, p. 73, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>.
- HARDOIM, P.R.; VAN OVERBEEK, L.S.; BERG, G.; PIRTTILÄ, A.M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DÖRING, M.; SESSITSCH, A. The hidden world within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, p. 293-320, 2015. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00050-14>.
- HARTMANN, A.; BASHAN, Y. Ecology and application of *Azospirillum* and other plant growth-promoting bacteria (PGPB) - Special issue. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 1-2, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.11.004>.
- HUNGRIA, M.; BARBOSA, J.Z.; RONDINA, A.B.L.; NOGUEIRA, M.A. Improving maize sustainability with partial replacement of N fertilizers by inoculation with *Azospirillum brasiliense*. **Agronomy Journal**, v. 114, p. 2969-2980, 2022. <https://doi.org/10.1002/agj2.21150>.
- HUNGRIA, M.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; CAMPO, R.J. Teste de eficiência agronômica de inoculante contendo *Azospirillum* spp. In: RELARE, 13, 2006, Londrina. **Resumos...** Londrina: Embrapa Soja, 2006.
- KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; HARTMANN A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fiber plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 51: 157-168, 2001. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-157>.
- LIN, S.Y.; HAMEED, A.; SHEN, F.T.; LIU, Y.C.; HSU, Y.H.; SHAHINA, M.; LAI, W.A.; YOUNG, C.C. Description of *Niveispirillum fermenti* gen. nov., sp. nov., isolated from a fermentor in Taiwan, transfer of *Azospirillum irakense* (1989) as *Niveispirillum irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense* (1983) as *Nitrospirillum amazonense* gen. nov. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 105, p. 1149-1162, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0176-6>.
- MAGALHÃES, F.M.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 55, p. 417-430, 1983.
- MCKINSEY & COMPANY. **Global Farmer Insights**, 2022. Disponível em: <https://globalfarmerinsights2022.mckinsey.com/>. Acesso em: 30/10/2024.
- MICHAELLES, K. **Hanne, Johanna Döbereiner: uma vida dedicada à ciência**. Rio de Janeiro: Trio Studio Editora e Gráfica Digital, 2018. 102 p.
- OGGERIN, M.; ARAHAL, D. R.; RUBIO, V.; MARÍN, I. Identification of *Beijerinckia fluminensis* strains CIP 106281T and UQM 1685T as *Rhizobium radiobacter* strains, and proposal of *Beijerinckia doeberae* sp. nov. to accommodate *Beijerinckia fluminensis* LMG 2819. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 59, p. 2323-2328, 2009. <https://doi.org/10.1099/ijss.0.006593-0>.
- OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, p. 1591-1601, 1994. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90311-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)90311-5).
- OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, p. 197-200, 1996. <https://doi.org/10.1007/BF00335935>

- OLIVEIRA, M.M.; RAMOS, E.T.A.; DRECHSEL, M.M.; VIDAL, M.S.; SCHWAB, S.; BALDANI, J.I. Gluconacin from *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 is an active bacteriocin against phytopathogenic and beneficial sugarcane bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, p. 1812–1826, 2018. <https://doi.org/10.1111/jam.14074>.
- PEDROSA, F.O.; MONTEIRO, R.A.; WASSEM, R.; CRUZ, L.M.; AYUB, R.A.; COLAUTO, N. B.; ... SOUZA, E. M. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genetics**, v. 7, e1002064, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002064>.
- PERIN, L.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; BALDANI, J.I.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; REIS, V.M.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1931-1937, 2006. <https://doi.org/10.1099/ijss.0.64362-0>
- PESSOA, D.D.V., DOS-SANTOS, C.M., VIDAL, M.S., BALDANI, J.I., TADRA-SFEIR, M.Z., DE SOUZA, E.M., & SIMOES-ARAUJO, J.L. *Herbaspirillum seropedicae* strain HRC54 expression profile in response to sugarcane apoplastic fluid. **3 Biotech**, v. 11, p. 292, 2021. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02848-y>
- PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews, J.; Hirano, S. (Eds), **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer Verlag, p. 179–197, 1991. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3168-4_9.
- POLESE, V. **O líquido do apoplasto de cana-de-açúcar modulando a expressão de genes na bactéria diazotrófica endofítica *Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpe HCC103**. 2017. 148 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ. <https://rima.ufrj.br/jspui/handle/20.500.14407/9986>.
- POLIDORO J.C., RESENDE A.S., QUESADA D.M., XAVIER R.P., COELHO C.H.M., ALVES B.J.R., BODDEY R.M. & URQUIAGA S. **Levantamento da contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN) para a cultura cana-de-açúcar no Brasil**. Documentos 144 - Embrapa Agrobiologia, p.26, 2001. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/597335>.
- RAMOS, E. T. D. A.; OLIVARES, F. L.; ROCHA, L. O. D.; SILVA, R. F. D.; CARMO, M. G. F. D.; LOPES, M. T. G.; MENESES, C.H.S.G.; VIDAL, M.S.; BALDANI, J. I. The effects of gluconacin on bacterial tomato pathogens and protection against *Xanthomonas perforans*, the causal agent of bacterial spot disease. **Plants**, v. 12, p. 3208, 2023. <https://doi.org/10.3390/plants12183208>.
- REIS, V.M.; SANTOS, P.E.L.; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V.L.D.; SCHMID, M.; BALDANI, J.I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2155-2162, 2004. <https://doi.org/10.1099/ijss.0.02879-0>.
- SILVA, P.R.A.; VIDAL, M. S.; SOARES, C. P.; POLESE, V.; TADRA-SFEIR, M. Z.; SOUZA, E.M.; SIMOES-ARAUJO, J.L.; BALDANI, J.I. Sugarcane apoplast fluid modulates the global transcriptional profile of the diazotrophic bacteria *Paraburkholderia tropica* strain Ppe8. **PLoS ONE**, v. 13, e0207863, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207863>.
- SIMPSON, A. J. G.; REINACH, F. D. C., ARRUDA, P.; ABREU, F. D.; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R.; ... & SETUBAL, J. C. (2000). The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v. 406, p. 151-157, 2000. <https://doi.org/10.1038/35018003>.
- STEPHAN, M.P.; OLIVEIRA, M., TEIXEIRA, K.R.S.; MARTINEZ-DRETS, G.; DÖBEREINER, J. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 77, p. 67–72, 1991. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04323.x>.

- TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R.; DÖBEREINER J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with the descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasiliense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, p. 967–980, 1978. <https://doi.org/10.1139/m78-160>.
- TERRA, L.A.; DE SOARES, C.P.; MENESSES, C.H.; TADRA SFEIR, M.Z.; DE SOUZA, E.M.; SILVEIRA, V.; VIDAL, M.S.; BALDANI, J.I.; SCHWAB, S. Transcriptome and proteome profiles of the diazotroph *Nitrospirillum amazonense* strain CBAmC in response to the sugarcane apoplast fluid. **Plant and Soil**, v. 451, p. 145-168, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04201-y>.
- THOMPSON, J.P.; SKERMAN, V.B.D. **Azotobacteraceae: the taxonomy and ecology of the aerobic nitrogen-fixing bacteria**. Academic Press, London, 1979. 417 pp.

Importância da quantificação da fixação biológica de nitrogênio em culturas de leguminosas e gramíneas

Segundo Urquiaga^{1,2}

Bruno J. R. Alves²

Claudia Jantalia²

Robert M. Boddey³

Revisado por: Mariangela Hungria

¹Membro Titular da Academia Brasileira de Ciências

²Embrapa Agrobiologia, BR. 465, km 7, CEP 23891-000, Seropédica, RJ

³Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, BR-465, Km 7, CEP: 23.897-000, Seropédica, RJ.

1. Esforços do grupo de pesquisa liderado pela Dra. Johanna Döbereiner para quantificar a contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN) nas principais culturas brasileiras

As primeiras observações sobre a importância das estruturas nodulares nas raízes de leguminosas favorecendo o crescimento das plantas datam da segunda metade do século XVI. Contudo, somente cerca de trezentos anos depois, por volta de 1890, Beijerinck comprovou que a inoculação de bactérias induzia a formação de nódulos em leguminosas (Araujo, 2017). Esse interesse em compreender a formação de nódulos nas raízes das leguminosas que deu início às investigações sobre a fixação biológica de nitrogênio (FBN), um processo essencial para o crescimento dessas plantas, que foi desvendado gradualmente.

No caso das gramíneas, a ausência de estruturas visíveis para abrigar bactérias diazotróficas retardou significativamente as pesquisas sobre FBN nessas plantas. A dificuldade em identificar e compreender a associação entre microrganismos fixadores de nitrogênio e as plantas tornou o estudo desse grupo particularmente desafiador.

A questão que logo surgiu foi se a fixação biológica de nitrogênio (FBN) poderia atender à demanda de nitrogênio das culturas agrícolas, sendo essencial quantificar a FBN tanto em leguminosas quanto em outras espécies. A Dra. Johanna teve papel crucial nesse campo, incentivando e promovendo pesquisas sobre o tema. A técnica de redução de acetileno foi uma ferramenta indispensável para os estudos de FBN até o início dos anos 1980. Essa técnica, ao medir a atividade da enzima nitrogenase, permitiu não apenas identificar e caracterizar bactérias diazotróficas, mas também quantificar preliminarmente a FBN em condições controladas, o que foi fundamental para o desenvolvimento de inoculantes mais eficientes.

Devido a limitações metodológicas, até o final da década de 1970, os métodos de quantificação da FBN em diferentes culturas, tanto em casa de vegetação quanto em campo, eram geralmente baseados na diferença de acúmulo de nitrogênio (N) pelas plantas e/ou no rendimento das plantas inoculadas em comparação às não inoculadas. Para determinar o potencial de uma bactéria ou de uma planta para otimizar a FBN, era necessário preparar substratos inertes (como areia, perlita, vermiculita) e soluções nutritivas diversas, o que dificultava obter valores de FBN próximos aos encontrados no campo.

No início dos anos 1980, as técnicas isotópicas com ^{15}N começaram a se difundir, as quais permitiam distinguir na planta com precisão o nitrogênio derivado do solo e aquele proveniente da FBN. Aplicadas nos estudos de FBN em leguminosas, essas técnicas demonstraram que, no caso da soja, a FBN era a principal fonte de nitrogênio, atendendo a pelo menos 80% das necessidades da planta (Alves *et al.*, 2003; Zilli *et al.*, 2021). Como as leguminosas geralmente fixam muito mais N₂ do ar do que as gramíneas, o maior desafio foi adaptar a técnica de ^{15}N para quantificar a FBN em culturas como a cana-de-açúcar, que se tornou fundamental no contexto do recém-criado Programa bioenergético Proálcool. A Dra. Johanna foi essencial na implementação da técnica de ^{15}N para avaliar a contribuição da FBN na nutrição nitrogenada da cana, conseguindo recursos e contratando especialistas no tema. Assim, iniciaram-se, no começo dos anos 1980, os estudos com ^{15}N para quantificação da FBN e ciclagem de nitrogênio em sistemas agrícolas na Embrapa Agrobiologia.

2. Quantificação da FBN em cana de açúcar

A expansão da cultura da cana-de-açúcar impulsionada pelo Programa Proálcool nos anos 1980 despertou o interesse da Dra. Johanna e de seu grupo de pesquisa em buscar alternativas mais sustentáveis para a produção agrícola. Diante do alto consumo de energia fóssil na produção de fertilizantes nitrogenados e da crescente demanda desse insumo na agricultura brasileira, Dra. Johanna e sua equipe identificaram na fixação biológica de nitrogênio (FBN) uma solução promissora para reduzir os custos energéticos e o impacto ambiental da produção de cana. Observou-se que esta cultura poderia alcançar produtividades superiores a 100 Mg/ha de colmos frescos mesmo em solos pobres em nitrogênio disponível, chegando a acumular mais de 200 kg de N/ha. Esse nitrogênio era majoritariamente exportado do campo pela queima da palha para facilitar a colheita manual, sem que o conteúdo de N do solo fosse significativamente reduzido (Stanford & Ayres, 1964; Orlando Filho *et al.*, 1980; Sampaio *et al.*, 1984). Essa observação incentivou a Dra. Johanna a intensificar as pesquisas microbiológicas, e um dos grandes desafios era quantificar a contribuição da FBN na nutrição da cana em condições próximas às de campo, apesar do conhecimento ainda limitado sobre as espécies de bactérias diazotróficas associadas a essa cultura (Döbereiner, 1961; Ruschel, 1982).

Como suporte a essas pesquisas, alguns cientistas (Ruschel, 1975; Vose, 1980; Freitas *et al.*, 1984) realizaram estudos preliminares em campo e em casa de vegetação, aplicando técnicas com o isótopo ^{15}N . Eles descobriram que o processo de FBN estava presente na cana, com uma contribuição que superava 17% do N acumulado pelas plantas. Para confirmar a importância da FBN na cultura, na atual Embrapa Agrobiologia, foi realizado um experimento em vasos com 64 kg de amostras de solo coletadas de áreas produtoras de cana em Campos dos Goytacazes (RJ). Foram cultivadas quatro variedades comerciais de cana, submetidas a dois cortes, e aplicou-se a técnica de balanço de N no sistema solo-planta, utilizando o ^{15}N como indicador. Esse estudo demonstrou que, na variedade CB47-89, a FBN contribuiu de forma significativa para a nutrição nitrogenada da cultura, chegando, em condições de campo, a uma contribuição de até 200 kg de N/ha (Lima *et al.*, 1987). Vale ressaltar que, nesse estudo, não houve inoculação de bactérias diazotróficas, e as plantas cresceram apenas com o inóculo nativo presente nos colmos-sementes e no solo.

Em abril de 1986, com o objetivo de avaliar a contribuição da FBN na nutrição nitrogenada da cana-de-açúcar, foi iniciado um estudo em condições próximas às de campo. Esse experimento avaliou dez genótipos/variedades comerciais de cana, cada um com diferentes exigências de adubação nitrogenada. Para o estudo, foi construído um tanque de concreto com dimensões de 20 m x 6 m x 0,5 m de profundidade, preenchido com solo pobre em N disponível proveniente da camada entre 0,10 m e 0,35 m de um perfil de Argissolo (Figura 1). O solo foi corrigido com calagem e recebeu uma adubação completa com macro e micronutrientes (exceto nitrogênio), além de irrigação para garantir um adequado suprimento de água.

No que diz respeito à adubação com nitrogênio (N), foram aplicadas apenas pequenas quantidades de N marcado com o isótopo ^{15}N , com o objetivo de marcar o N disponível no solo e, assim, distinguir nas plantas o N proveniente do solo daquele derivado da FBN. Os resultados mostraram que, mesmo em solo pobre em N disponível, mas sob condições ideais de manejo, o rendimento de colmos das



Figura 1. Preenchimento do tanque com solo Argissolo e aplicação de nutrientes, incluído ^{15}N -fertilizante, por camadas de 10 cm.

variedades comerciais no primeiro ano variou de 175 a 239 Mg/ha, com acúmulo de 200 a 280 kg de N/ha. Nos dois cortes subsequentes, apenas duas variedades (CB45-3 e SP70-1143) mantiveram altos rendimentos e acúmulo de N, com destaque também para o genótipo selvagem Krakatau (*S. spontaneum*), que demonstrou excelente desempenho (Figura 2).



Figura 2. No terceiro ano, após dois cortes, somente dois genótipos (Krakatau e SP701143) se destacaram como os mais eficientes para FBN.

Aplicando-se duas metodologias — a técnica isotópica de ^{15}N e o balanço total de N no sistema solo-planta, determinou-se que a FBN contribuiu com 49 a 70% da demanda de N das plantas nas variedades comerciais, incluindo o Krakatau, equivalente a 170 a 270 kg de N/ha (Urquiaga *et al.*, 1992). Esses resultados, obtidos sob condições controladas, mas próximas às de campo, não apenas confirmaram como também evidenciaram o alto potencial de contribuição da FBN para a nutrição nitrogenada da cana, justificando a importância desse processo biológico para a economia no uso de fertilizantes nitrogenados. Esses resultados também ajudaram a explicar os altos balanços energéticos positivos da produção de etanol derivado da cana brasileira (9,35) (Boddey, 1993; Soares *et al.*, 2009).

Com base nessas informações e após diversas pesquisas intensivas, especialmente em nível de campo e em experimentos de longo prazo com diferentes variedades de cana, estabeleceu-se que a FBN fornece, em média, 40 kg de N/ha no N acumulado pelas plantas. Isso representa aproximadamente 35% da demanda de N da cultura, sendo suficiente para garantir bons rendimentos. Observou-se também uma resposta



Figura 3. Comparando as variedades de cana RB92579 e RB867515, somente a última mostrou muito boa resposta à inoculação (coquetel de bactérias diazotróficas). Como não houve contribuição da FBN, isto apenas demonstra efeito varietal da cana na ação promotora de crescimento das bactérias inoculadas.

limitada à inoculação com bactérias diazotróficas, o que sugere, na maioria dos casos, uma boa eficiência das populações nativas (Yoneyama *et al.*, 1997; Boddey *et al.*, 2001, 2003; Schultz *et al.*, 2012, 2014; Urquiaga *et al.*, 2012; Monteiro *et al.*, 2021).

É importante ressaltar que, além da FBN, as bactérias diazotróficas produzem hormônios de crescimento vegetal, e o efeito positivo da inoculação na promoção do crescimento da planta pode ser devido tanto à FBN quanto à ação hormonal (Figura 3). Outro ponto a considerar é a aplicação de molibdênio na adubação da cana-de-açúcar, que tem contribuído significativamente para o aumento da FBN e da produtividade em alguns solos. Esse micronutriente, essencial para a planta e especialmente para a síntese e atividade da enzima nitrogenase, frequentemente apresenta baixa disponibilidade em solos ácidos, tornando sua suplementação ainda mais relevante (Boddey *et al.*, 2003).

Desde os primeiros resultados impressionantes sobre a quantificação da contribuição da FBN na cultura (Urquiaga *et al.*, 1992), obtidos sem a necessidade de inoculação de bactérias diazotróficas, observou-se que todos os genótipos e variedades estudadas apresentavam as mesmas espécies de bactérias diazotróficas já conhecidas. Entre essas bactérias estava *Gluconacetobacter diazotrophicus*, isolada do interior dos colmos de cana, utilizando caldo de cana no meio de cultura (Cavalcante & Döbereiner, 1988; Gillis *et al.*, 1989).

A Dra. Johanna sempre enfatizava a importância de realizar esforços para compreender de forma mais profunda o processo de interação entre planta e bactéria diazotrófica, ressaltando que esse entendimento poderia abrir caminho para expandir a FBN de forma eficiente para outras culturas, especialmente gramíneas como milho, trigo e arroz, nas quais o rendimento é fortemente dependente da disponibilidade de N do solo ou da adubação nitrogenada. Além disso, destacava-se a necessidade de entender melhor a interação entre as bactérias no “microbioma”, tanto dentro das plantas quanto na rizosfera. Esses desafios relevantes continuam a impulsionar as pesquisas na área.

3. Impacto da FBN na economia de N-fertilizante e mitigação das emissões de gases de efeito estufa da agricultura brasileira

3.1. Importância econômica da FBN na agricultura brasileira

Com base na área cultivada, rendimento e produção nacional das principais culturas de grãos, cereais e cana-de-açúcar no Brasil, e considerando os indicadores de FBN e o acúmulo de N necessário para produzir uma tonelada do produto comercial de cada cultura (Boddey *et al.*, 2001; Alves *et al.*, 2006, 2015; Herridge *et al.*, 2008; Urquiaga *et al.*, 2012; Guareschi *et al.*, 2019; Monteiro *et al.*, 2021), estimou-se a contribuição da FBN como fonte de N da agricultura brasileira. Na safra 2023/2024, essa contribuição alcançou 10 milhões de toneladas de N, com destaque para a soja, que representa 94,5% desse total por ser a cultura mais cultivada e com maior contribuição da FBN (80%) (Tabela 1).

Tabela 1. Área, rendimento, produção, acumulo de N na planta por tonelada de produto, N derivado da FBN e mitigação da emissão de gases de efeito estufa (GEE), das cinco principais culturas brasileiras. Safra 2023/2024

Cultura ¹	Área ¹ (M ha)	Rend ¹ (kg ha)	Produção (1000 t)	N-planta/ prod. ² (kg N/ Mg prod.)	Total N (1000 t)	FBN (%)	N-FBN (1000 t)	Mitigação de GEE ^{8,9} (1000 t CO ₂ eq)
Soja	46,03	3.202	147.382	80	11.791	80 ³	9.432	207.514
Feijão	2,856	1.138	3.249	38,5	125,13	36 ⁴	45	991
Amendoim	0,255	2.873	734	50	37	65 ⁴	24	525
Cana-de- Açúcar	8,334	85.580	713.214	1	713	35 ^{5,6}	250	5492
Milho	21,059	5.495	115.723	20	2.314	10 ^{3,7}	231	5092
TOTAL	78,534	-	-	-	14.980	-	9.982	219.613

Rend¹: Rendimento. Fonte: ¹CONAB (2024), ²IPNI (2017), ³Alves *et al.* (2003, 2006), ⁴Herridge *et al.* (2008), ⁵Urquiaga *et al.* (2012), ⁶Boddey *et al.* (2001), ⁷Alves *et al.* (2015), ⁸Brock *et al.* (2012), ⁹Robertson *et al.* (2004).

Esses dados revelam um potencial significativo de expansão da FBN em outras culturas (Tabela 1). Considerando que a outra importante fonte de N da agricultura nacional são os fertilizantes sintéticos, que somaram cerca de 6 milhões de toneladas de N consumidas na safra 2023/2024, deduz-se que a FBN é atualmente a principal fonte de N para a agricultura brasileira, respondendo por 62,3% do total de N utilizado.

Considerando o preço atual do N na forma de ureia (45% N), de R\$ 2.152,00 por tonelada, e a taxa de câmbio de R\$ 5,60 por dólar (BC, 14/10/2024), a contribuição da FBN para a agricultura brasileira na última safra equivale a US\$ 8,54 bilhões. Para avaliar o impacto econômico considerou-se apenas o valor líquido do N-FBN acumulado pelas plantas. Como a eficiência de uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos nas condições brasileiras em geral é igual ou mesmo inferior a 50%, esse valor seria dobrado caso esses fossem utilizados.

O impressionante valor econômico do N-FBN representa aproximadamente o triplo do orçamento anual destinado pelo governo brasileiro à pesquisa e desenvolvimento

agropecuário nos últimos anos. Para se ter uma ideia da relevância econômica global desse impacto, esse montante é comparável ao orçamento anual dos Estados Unidos para pesquisa e desenvolvimento no setor agropecuário (Gazzoni & Crestana, 2024).

3.2. Importância da FBN da agricultura brasileira na mitigação ou emissões evitadas de gases de efeito estufa.

Como mencionado anteriormente, a FBN é uma fonte direta de N para a nutrição das culturas, com uma eficiência de uso próxima de 100%, ou seja, sem perdas. Em contraste, a eficiência de uso de fertilizantes sintéticos nitrogenados raramente ultrapassa 50% da dose aplicada (Good & Beatty, 2011; Hawkesford, 2011). Isso significa que metade do N-fertilizante aplicado não é aproveitado pela planta durante seu ciclo de crescimento, resultando em uma parte residual no solo e outra que pode representar um risco ambiental.

Para avaliar o impacto da FBN da agricultura brasileira em relação às emissões evitadas de gases de efeito estufa (GEE), considera-se que a quantidade de N-fertilizante necessário para suprir uma planta deve ser o dobro do total que ela pode obter da FBN. Assim, levando em conta que para cada kg de N-fertilizante sintético aplicado no solo usando a ureia como referência, o fertilizante mais utilizado na agricultura global, são emitidos 11 kg de equivalente CO₂ (CO₂ eq.) (Robertson *et al.*, 2004; Brock *et al.*, 2012), foi possível calcular o impacto da FBN na mitigação de GEE na agricultura brasileira (Tabela 1).

A FBN na Agricultura brasileira tem demonstrado uma significativa contribuição para o cumprimento dos compromissos estabelecidos nos Planos ABC (2010-2020) e ABC+ (2021-2030) (MAPA, 2012; 2021). Durante a execução do Plano ABC, a FBN superou em mais de 150% a meta de mitigação das emissões de GEE, principalmente devido à expansão da cultura da soja. As expectativas para o novo plano ABC+ são igualmente promissoras. Na safra 2023-2024, a meta de mitigação de emissões de CO₂ equivalente, prevista para ser alcançada em 10 anos por meio do uso de bioinsumos, de 23,4 MtCO₂eq., já foi ultrapassada nas primeiras quatro safras desta década, totalizando 31,7 MtCO₂eq.

4. Legado e desafios deixados pela Dra. Johanna Döbereiner associada com a quantificação da FBN na agricultura brasileira.

- A.** Foram identificados genótipos e variedades de soja, feijão, leguminosas forrageiras, leguminosas-adubos verdes, cana-de-açúcar e milho com alto potencial de rendimento e eficiência na FBN.
- B.** Entre as leguminosas, a soja se destaca como a cultura com maior eficiência na FBN (80%), enquanto nas gramíneas, a cana-de-açúcar apresenta uma eficiência de 35%. Nas demais culturas, é necessário avançar significativamente tanto no melhoramento das plantas quanto na compreensão e adequado manejo da parte microbiológica.
- C.** A FBN é a principal fonte de N da agricultura brasileira, representando 62,5% do total de N consumido (16 milhões de toneladas) na última safra agrícola.

- D. Na safra 2023/2024, a FBN contribuiu com 10 milhões de toneladas de N para a agricultura brasileira, sendo que a soja foi responsável por 94,3% dessa contribuição, refletindo principalmente sua alta eficiência para FBN (80%) e a ampla ocupação da área agrícola (46 milhões de hectares). O impacto da FBN na economia de N-fertilizante e na economia do país foi significativo, com uma contribuição equivalente a 8,54 bilhões de dólares, valor que representa aproximadamente o triplo do orçamento que o governo destina anualmente à pesquisa e desenvolvimento agropecuário.
- E. Nos 10 anos do Plano ABC (2010-2020), a tecnologia da FBN contribuiu para mitigar aproximadamente 25 milhões de toneladas de CO₂ equivalente, atingindo 2,5 vezes a meta inicial de 10 milhões de toneladas de CO₂ eq. A soja foi responsável por mais de 95% das emissões evitadas nesse período. No Plano ABC+, que estabelece uma meta de mitigação de 23,4 milhões de toneladas de CO₂ eq. entre 2021 e 2030 por meio do uso de bioinsumos, essa meta já foi superada nas quatro primeiras safras da década, com a soja respondendo por mais de 94% dessa contribuição.
- F. A Dra. Johanna sempre enfatizou que o aumento da eficiência da FBN em culturas como milho, trigo e arroz dependerá do adequado melhoramento das plantas visando a FBN e do entendimento da interação planta-bactéria. Além disso, acreditamos, é fundamental compreender o "microbioma" presente dentro e na rizosfera das plantas. Esses temas de pesquisa ainda necessitam de estudos aprofundados.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq (processo 465133/2014-4) e à Fundação Araucária (STI 043/2019) pelo apoio financeiro recebido para o desenvolvimento do projeto INCT "Microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas Visando à Sustentabilidade Agrícola e à Responsabilidade Ambiental – MPCPAgro, MicroAgro". Também expressamos nossa gratidão ao CNPq e à FAPERJ pelo suporte econômico que possibilitou a realização da maioria de nossas pesquisas. Um agradecimento muito especial (*in memoriam*) à nossa querida Professora Johanna Döbereiner, pela grandiosa oportunidade, inestimável ajuda e permanente estímulo que nos deu para desenvolver nossos trabalhos em benefício da sociedade.

Referências

- ALVES, G. C.; VIDEIRA, S. V.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. **Plant and Soil**, v. 387, p. 307–321, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2295-2>
- ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, v. 252, p. 1–9. 2003. <https://doi.org/10.1023/A:1024191913296>.
- ALVES, B. J. R.; ZOTARELLI, L.; FERNANDES, F. M.; HECKLER, J. C.; MACEDO, R. A. T.; BODDEY, R. M.; JANTALIA, C. P.; URQUIAGA, S. FBN e fertilizantes nitrogenados no balanço de nitrogênio em soja, milho e algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 449–456, 2006.

- ARAUJO, S. C. **Memórias que entrelaçam uma vida com a pesquisa e implantação da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) na agricultura brasileira.** ANPII, 2017.
- BODDEY, R. M. 'Green' Energy from Sugar Cane. **Chemistry and Industry**, v. 10, p. 355–358, 1993.
- BODDEY, R. M.; POLIDORO, J. C.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Use of the 15N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N2 fixation to grasses and cereals. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 889–895, 2001. <https://doi.org/10.1071/pp01058>
- BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future application. **Plant and Soil**, v. 252, p. 139–149, 2003. <https://doi.org/10.1023/A:1024152126541>
- BROCK, P.; MADDEN, P.; SCHWENK, G.; HERRIDGE, D. Greenhouse gas emissions profile for 1tonne of wheatproduced in Central Zone (East) New South Wales: a life cycle assessment approach. **Crop and Pasture Science**, v. 63, p. 319-329. <https://doi.org/10.1071/CP11191>
- CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 108, p. 23–31, 1988. <https://doi.org/10.1007/BF02370096>
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar.** V. 4 – Safra 2023/2024 N. 4. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/>. Acesso:15 de outubro 2024.
- DÖBEREINER, J. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. **Plant and Soil**, v. 15, p. 211–216,1961. <https://doi.org/10.1007/BF01400455>
- FREITAS, J. R.; VICTORIA, R. L.; RUSCHEL, A. P.; VOSE, P. B. Estimation of N2-fixation by sugar cane *Saccharum* sp. and soybean, *Glycine max*, grown in soil with 15N labelled organic matter. **Plant and Soil**, v. 82, p. 257-261, 1984.
- GAZZONI, D. L.; CRESTANA, S. Investimento público em ciências agrárias e retorno dado à erradicação da fome: Ensinamentos do nosso passado e presente. In: Hungria, M. **Segurança alimentar e nutricional: o papel da ciência brasileira no combate à fome.** Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 2024.
- GILLIS, M.; KERTERS, K.; HOSTE, B.; JANSENS, D.; KROPENSTEDT, R. M.; STEPHAN, M. P.; TEIXEIRA, K. R. S.; DÖBEREINER, J.; DELEY, J. *Gluconacetobacter diazotrophicus* sp. nov. a nitrogen fixing acetic acid bacterium associated with sugar cane. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 39, p. 361-364, 1989.
- GOOD, A. G.; BEATTLY, P. Biotechnological Approaches to Improving Nitrogen Use Efficiency in Plants: Alanine Aminotransferase as a Case Study. In: Hawkesford, M.J. (Ed). **The Molecular and Physiological Basis of Nutrient Use Efficiency in Crops**, v. 6, p. 165-191. 2011. <https://doi.org/10.1002/9780470960707.ch9>
- GUARESCHI, R. F.; BODDEY, R.M.; ALVES, B. J. R.; SARKIS, L. F.; MARTINS, M. R.; JANTALIA, C. P.; CABRIALES, J. J. P.; NUNEZ, J. A. V.; URQUIAGA, S. Balanço de nitrogênio, fósforo e potássio na agricultura da América Latina e o Caribe. **Terra Latinoamericana**, v. 37, p. 105-119, 2019.
- HAWKESFORD, M. J. **An Overview of Nutrient Use Efficiency and Strategies for Crop Improvement.** In: Hawkesford, M. J.; Barraclough, P (Eds). **The Molecular and Physiological Basis of Nutrient Use Efficiency in Crops.** p. 3-19, 2011. <https://doi.org/10.1002/9780470960707.ch1>.
- HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B. R. M.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, v. 311, p. 1-18, 2008. doi:10.1007/s11104-008-9668-3.
- IPNI (International Plant Nutrition Institute). **Calculadora de Remoção de Nutrientes.** 2017. < <http://brasil.ipni.net/article/BRS-3268> > (Consulta junho 30. 2024).
- LIMA, E.; BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen fixation associated

- with sugar cane using a 15N aided nitrogen balance. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, p. 165–170, 1987. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90077-0](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90077-0)
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Plano setorial de mitigação e de adaptação às mudanças climáticas para a consolidação de uma economia de baixa emissão de carbono na agricultura: Plano ABC (Agricultura de Baixa Emissão de Carbono)**/Ministério do Desenvolvimento Agrário – Brasília: MAPA/ACS, p. 173, 2012.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Plano Setorial para Adaptação à Mudança do Clima e Baixa Emissão de Carbono na Agropecuária, com vistas ao Desenvolvimento Sustentável – ABC+**. Secretaria de Inovação, Desenvolvimento Rural e Irrigação. – Brasília: MAPA, 2021.
- MONTEIRO, E. C.; SILVA, C. G. N.; MARTINS, M. R.; REIS, V. M.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Strategy for the Sampling of Sugarcane Plants for the Reliable Quantification of N2 Fixation Using 15N Natural Abundance. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 21, p. 2741–2752, 2021. <https://doi.org/10.1007/s42729-021-00561-6>
- ORLANDO-FILHO, J.; HAAG, H. P.; ZAMBELLO, E. J. R. **Crescimento e absorção de macronutrientes pela cana de açúcar, variedade CB41-76 em função da idade em solos do Estado de São Paulo**. Boletim Técnico de Planalsucar 2, p. 1-128. Planalsucar, Piracicaba, 13400, São Paulo, Brasil, 1980.
- ROBERTSON, G.; GRACE, P.; PETER, R. Greenhouse gas fluxes in tropical and temperate agriculture: the need for a full-cost accounting of global warming potentials. In: Tropical Agriculture in Transition-Opportunities for Mitigating Greenhouse Gas Emissions? **Environment, Development and Sustainability**, v. 6, p. 51-63. 2004. <https://doi.org/10.1023/B:ENVI.0000003629.32997.9e>
- RUSCHEL, A. P. Nitrogen-15 tracing of N-fixation with soil grown sugar cane seedlings. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 7, p. 181-182, 1975. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(75\)90017-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(75)90017-6)
- RUSCHEL, A. P. Perspectives on biological nitrogen fixation in sugar cane. In: Biological nitrogen fixation for tropical agriculture (P.H. Graham and S.C. Harris, Eds). **Centro Internacional de Agricultura Tropical**, v. 1, p. 497-502, 1982.
- SAMPAIO, E. V. S. B.; SALCEDO, I. H.; BETTANY, J. Dinâmica de nutrientes em cana-de-açúcar. I. Eficiência na utilização de ureia (15N) em aplicação única ou parcelada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 19, p. 943–949, 1984.
- SCHULTZ, N.; MORAIS, R. F.; SILVA, J. A.; BATISTA, R. B.; OLIVEIRA, R. P.; LEITE, J. M.; URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; MAIA, E.; SÁ, J.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; REIS, V. M. Avaliação agronômica de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 261-268, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012000200015>
- SCHULTZ, N.; SILVA, JÁ.; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; OLIVEIRA, R. P.; CHAVES, V. A.; MORAIS, R. F.; BATISTA, R. B.; OLIVEIRA, R. P.; CHAVES, V. A.; REIS, V. M.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, p. 359-371, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832014000200005>
- SOARES, L. H.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Brazilian ethanol and the mitigation of greenhouse gases emission. **Revista Bioenergia**, v. 6, p. 48-53, 2009.
- STANFORD, G.; AYRES, A. S. The internal nitrogen requirement of sugarcane. **Soil Science**, v. 98, p. 338-344, 1964.
- URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, p. 105–114, 1992. <https://doi.org/10.2136/sssaj1992.03615995005600010017x>

- URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; MORAIS, R. F.; BATISTA, R. B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J. M.; MAIA, E.; SÁ, J.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Evidence from field nitrogen balance and 15N natural abundance data for the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, v. 356, p. 5-21, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1016-3>
- VOSE, P. B. **Introduction to nuclear techniques in agronomy and plant biology**. Pergamon International Library, v. 1, p 1-391, 1980. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-03258-6>
- YONEYAMA, T.; MURAOKA, T.; KIM, T. H.; DACANAY, E. V.; NAKANISHI, Y. The natural 15N abundance of sugarcane and neighboring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). **Plant and Soil**, v. 189, p. 239–244, 1997. <https://doi.org/10.1023/A:1004288008199>
- ZILLI, J. E.; PACHECO, R. S.; GIANLUSSI, V.; SMIDERLE, O. J.; URQUIAGA, S.; HUNGRIA, M. Biological N₂ fixation and yield performance of soybean inoculated with *Bradyrhizobium*. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 119, p. 323–336, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10705-021-10128-7>

The legacy of Johanna Döbereiner in Argentina: Microbiology and the agriculture transformation

*Mariana Laura Puent¹
Enrique Rodríguez Cáceres²
Julia Elena García¹
Esteban Rubio³
Santiago Adolfo Vio⁴
Raúl Osvaldo Pedraza⁵
María Flavia Luna^{4,6}
José Alfredo Curá⁷
Fabricio Darío Cassán⁸*

Reviewed by: Fabio Bueno dos Reis Junior

¹*Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, Argentina.*

²*Planteck Biotecnología, Buenos Aires, Argentina.*

³*Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Floricultura.*

⁴*Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales, CINDEFI (CONICET/UNLP), La Plata, Argentina.*

⁵*Departamento de Ecología, Microbiología Agrícola. Facultad de Agronomía, Zootecnia y Veterinaria, Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina.*

⁶*Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC-PBA).*

⁷*Departamento de Biología Aplicada y Alimentos. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.*

⁸*Laboratorio de Fisiología Vegetal e Interacción planta-microorganismos. Instituto de Investigaciones Agrobiotecnológicas (INIAB-CONICET), Universidad Nacional de Río Cuarto.*

At the beginning of the 1980s, inspired by the discoveries of Dr. Johanna Döbereiner, research in Argentina focused on diazotrophic microorganisms which demonstrated their potential to enhance agricultural productivity. These efforts laid the foundation for optimizing the production of strategic crops in a sustainable manner in the country, thereby promoting the implementation of the observed benefits. This interest stems from the pioneering studies of Döbereiner and Ruschel (1958), who isolated a nitrogen-fixing bacterium from the rhizosphere of sugarcane in tropical Brazilian soils over six decades ago. However, global interest in diazotrophic bacteria associated with grass species emerged following the publication of Döbereiner and Day (1975), which described a bacterium of the genus *Azospirillum*. Since then, several nitrogen-fixing species have been isolated, among them the genera *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, and *Azotobacter*. Döbereiner (1992) introduced the term "diazotrophic endophytic bacteria" to describe diazotrophs capable of colonizing the interior of grass roots and other plant tissues. This classification significantly advanced the understanding of their role in symbiosis and their potential to enhance agricultural productivity. In conclusion, the primary aim of this contribution is to understand how the spark of knowledge ignited by Johanna Döbereiner in Brazil has expanded across the continent, particularly in Argentina. In this country, many of the diazotrophic microorganisms she studied have a rich story to tell, an active presence in contemporary agriculture, and a promising future ahead. Her legacy has not only inspired research and the development of sustainable agricultural practices but has also fostered greater awareness of the importance of microorganisms in agricultural production, enabling science to advance toward new frontiers in the search for solutions to current challenges in agriculture.

The genus *Azospirillum*

In 1981, the Department of Microbiology (currently Laboratorio de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal del IMYZA, INTA, Buenos Aires, Argentina) initiated a research project inspired by the recent publications of Johanna Döbereiner in Brazil, to examine strategies for the utilization of atmospheric nitrogen through the inoculation of diazotrophic microorganisms (Figure 1). One of the initial challenges was to isolate native strains of *Azospirillum*. To obtain pure strains, small fragments of roots or soil were inoculated in a semi-solid nitrogen-free medium. However, the researchers encountered a second challenge: developing an isolation methodology that facilitates the efficient identification of colonies belonging to this genus. The tests began with ALM medium (Vincent, 1970), frequently used for rhizobia and containing Congo red dye in its composition. In this culture medium, soil or root suspensions were sown, which gave rise to small colored colonies. The colonies were then transferred to a semisolid NFB medium, and the characteristic pellicle formation associated with diazotrophic bacteria was observed. Microscopic examination revealed the distinctive curved rods of the genus, which contained polyhydroxybutyrate (PHB) granules and exhibited characteristic motility pattern. Afterwards, several culture media were evaluated, using potassium malate and different concentrations of yeast extract as the main sources. As a result of this process, the RC (Rodríguez Cáceres, abbreviated as RC) culture medium was developed, using Congo red (Rodríguez Cáceres, 1982) as a differential dye. This modification facilitated the recognition of the isolates when compared with the Cd

strain of *A. brasiliense* as a reference. Colonies of *Azospirillum* that develop in RC culture medium are characterized by a scarlet red color, dry consistency, irregular edges, and a rough surface. Consequently, 52 isolates were obtained from different areas of the country. In addition, a guide was developed that included various physiological and biochemical tests, which allowed them to be classified within the *A. brasiliense* and *A. lipoferum* species. Currently, the BPCV IMYZA INTA collection (WDCM31) is composed of 60 native and exotic strains from the species *A. argentinense*, *A. brasiliense*, *A. lipoferum*, *A. oryzae*, *A. picis*, *A. zae*, *A. soli*, *A. halopreferans*, *A. formosense*, *A. melinis*, *A. agricola*, *A. palatum*, *A. fermentarium*, *A. rugosum*, *A. baldaniorum*, and *A. canadense*. Starting in 1984, field evaluations revealed that the Az39 INTA strain (isolated from the roots of wheat plants growing in Marcos Juárez, Córdoba, Argentina) exhibited differential activity compared to other isolates, enhancing both the yield and nitrogen content in the grains of wheat plants inoculated with this strain (Rodríguez Cáceres *et al.*, 1996; Rodríguez Cáceres & Di Ciocco, 2003). Based on this information and the trial results obtained by Puente *et al.* (2005), the strain Az39 of *Azospirillum argentinense* (formerly *A. brasiliense*) was recognized as the most promising strain and is consequently recommended for the formulation of microbial bioestimulants for corn and wheat in Argentina so far.

 PRESENTACION DE: Instituto de Microbiología y Zootecnia Agrícola		
UNIDAD	CÓDIGO	
	1.0.0.2.04	
TIPO DE INFORME	Año	CARIS
A	1992	
PROGRAMA	SUBPROGRAMA	NUMERO CLAVI
1.2	1.2.2	3.2-03.0.1
TÍTULO: ACCIÓN DE LOS DIAZOTROPOS RIZOSFERICOS EN EL CULTIVO DE TRIGO Y MAÍZ		
AÑO DE INICIACIÓN	AÑO DE FINALIZACIÓN	AÑO DE REVISIÓN
1981	1993	1990
ÁREA DE PERTENENCIA/ SECTOR	<input type="checkbox"/> MANTENIMIENTO DE RECURSOS <input type="checkbox"/> SERVICIOS <input type="checkbox"/> INVESTIGACIÓN FUNDAMENTAL <input type="checkbox"/> EXTENSIÓN <input type="checkbox"/> PRODUCCIÓN <input checked="" type="checkbox"/> INVESTIGACIÓN APLICADA <input type="checkbox"/> EXPERIMENTACIÓN ADAPTATIVA	
RESPONSABLE	RODRIGUEZ CACERES, Enrique	
LEGAJO	11805	
FINALIDAD: Promover el incremento de la productividad en el cultivo de trigo y maíz mediante el uso de biofertilizantes. Esto permitiría lograr una menor dependencia del uso de compuestos químicos nitrrogenados y reducir eventuales problemas de contaminación de aguas por nitratos y nitrilos.		
OBJETIVOS: Obtenición de organismos diazotróficos (<i>Azospirillum</i> spp. y <i>Bacillus polymyxa</i>) aptos para preparar biofertilizantes.		
GRADO DE RIESGO INTERNO 3 (30-64)	GRADO DE RIESGO EXTERNO 2 (5-30)	
JUSTIFICACIÓN: Algunos hortederos están imposibilitados de proveer metabolitos para la actividad diazotrófica de las bacterias		
ASISTENCIA: Recurrencia de estrés hídrico en el ciclo de crecimiento y en diferentes ciclos agrícolas		

Figure 1. Cover page of the First INTA Diazotrophs Project: Action of Rhizospheric Diazotrophs in Wheat and Corn Crops (1981).

Present and future of genus *Azospirillum* in agriculture

Currently, the use of azospirilla inoculants for crop production is a consolidated practice in South America (i.e., Brazil, Argentina, Uruguay, and Paraguay), where the extensive agriculture is frequent (Cassán & Diaz-Zorita, 2016). In Argentina, Uruguay, and Brazil, there many biological products contain *Azospirillum* as an active principle. However, the first inoculant in the region was registered 28 years ago (1996) in Argentina with the Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) using the name of Nodumax-L by Laboratorios Lopez SRL (Jesús María, Córdoba). It was formulated with *A. argentinense* Az39 (formerly *A. brasiliense*), one decade after the isolation and selection of this strain by Enrique Rodriguez Caceres from the IMYZA-INTA. The inoculant was initially recommended for the treatment of wheat and maize seeds, but it is now recommended for several crops. In Brazil, paradoxically, the first inoculant was registered by Stoller do Brasil SA (Campinas, São Paulo), 13 years after the first one was registered in Argentina. It was named Masterfix L gramineas, and it was formulated with a combination of the *A. brasiliense* Abv5 and Abv6 strains. This product was initially recommended for the treatment of maize and rice seeds, but in the last several years, it has also been recommended for other non-legumes species and in combination with rhizobia for soybean and common bean co-inoculation. Finally, in Uruguay, the first inoculant product was registered in 2015 by Lage y CIA SA (Montevideo, Montevideo) under the name Graminosoil. It contains a combination of *A. argentinense* Az39 and CFN535. The product was initially recommended for the treatment of maize and sorghum. Currently in South America, there are more than 150 products (inoculants) produced by at least 74 companies and most of them are produced in Argentina (90 products). These products (100%) are formulated with *A. argentinense*, and Az39 is the active principle in 75% of the inoculants. In 13 products, Az39 is combined with *A. brasiliense*, *P. fluorescens* or *B. japonicum*. In the last case, this is due to the increase in the number of products registered as a premium technology (co-inoculation) for soybean crop. The rest of the azospirilla inoculants are formulated with single strains (Abv5, AzM3, AzT5, 1003, Tuc 27/85, Tuc 10/1 or 11005). Liquid carriers are most often used to formulate these biological products (94%). This clearly shows the formulation preferences of the companies that are manufacturing these products. Although the use of these biological products has been recommended for a long list of crops, the registration is mainly for wheat, maize, sunflower, and soybean. The other plant species recommend for the treatment are sorghum, grasses, and winter cereals for grazing, rice, barley, cotton, oats, sugar cane, tobacco and lettuce. Based on 2023 data, approximately 26 million doses of azospirilla inoculants are commercialized per year covering almost 28 million ha in South America. Based on more than 350 trials obtained from 12 countries and almost 50 published articles, the impact of *Azospirillum* inoculation was analyzed and the greatest contribution of the inoculation with this bacterium to grain yield was observed in winter cereals (12-14%) followed by summer cereals (12-14%) and soybean (4-8% above the treatment with rhizobia) and positive success frequency of 80% (Cassán *et al.*, 2020). In recent years, the use of this bacterium has increased significantly due to the publication of numerous studies that have shown that its combined use with fertilizers has a high economic and ecological impact as an agricultural practice, reducing greenhouse gas emissions (Hungria *et al.*, 2022).

The genus *Azotobacter*

Azotobacter is a genus that groups aerobic, gram-negative, nitrogen-fixing bacteria that includes seven species: *Azotobacter chroococcum*, *A. armeniacus*, *A. beijerinckii*, *A. paspali*, *A. salinestris*, *A. nigricans* and *A. vinelandii*. The genus was discovered in 1901 and, due to its ability to fix nitrogen, a few years later it began to be studied for use as a bacterial fertilizer (Aasfar *et al.*, 2021). Between the 1930s and 1940s it was used on large surfaces in Russia and Eastern Europe (Grageda-Cabrera *et al.*, 2012). Similarly, to other free-living N-fixing bacteria, its ability to promote plant growth is not only associated with its ability to fix nitrogen, but also with other mechanisms such as the production of phytohormones, nutrient solubilization and siderophore production (Bastakoti *et al.*, 2024). Scientific publications worldwide referring to *Azotobacter* are increasing year by year, mainly from Middle Eastern countries, with India being one of the countries with the largest number of publications (Aasfar *et al.*, 2021). The study of *Azotobacter* in Argentina began in the 1950s, influenced by the research of Johana Döbereiner, who in 1953 published a work on the isolation of this genus from Brazilian soils (Döbereiner, 1953) and a few years later she published the discovery of the species *Azotobacter paspali* (Döbereiner, 1966). Her work in the identification of various species established the foundations for research on *Azotobacter* in the country. Although her main focus was on *Azospirillum*, her findings on the importance of nitrogen-fixing bacteria motivated Argentine researchers to explore the potential of *Azotobacter* as an inoculant to improve soil fertility and crop productivity (Döbereiner, 1992). In this context, Akiyoshi (1957) isolated several strains of *Azotobacter* and carried out morphological and physiological studies on them, although they did not evaluate their effect on plant growth. The first experiences of inoculating crops with *Azotobacter* in Argentina were published by researchers from INTA who carried out experiments inoculating carrot, beet, wheat, and barley crops with strains isolated from Pergamino and Castelar soils, two locations from Buenos Aires province (Giambiagi & Sedeño, 1966). As the research progressed, emphasis was placed on the search for native strains and the development of commercial formulations based on *Azotobacter*, reflecting the influence of Döbereiner on agricultural microbiology in Argentina. In 2006, in the LBPCV, IMYZA, INTA Castelar, a series of *Azotobacter* isolations were carried out from different areas in Argentina (Rubio *et al.*, 2013). The main objective was to obtain strains of *Azotobacter* that can be used as inoculants in commercial formulations. Around 74 soil samples from different locations in Argentina were analyzed and 31 strains with similar characteristics to *Azotobacter* were isolated. ARDRA and partial analysis of the 16S ribosomal gene were performed and it was determined that the strains belonged mostly to the species *A. chroococcum* and to a lesser extent to *A. salinestris* and *A. armeniacus*. The production of siderophores, the solubilization of phosphates and the production of auxins were evaluated in 21 of the isolates obtained. All the strains evaluated produced siderophores and auxins, while no strain solubilized phosphates. In six strains, the capacity to produce indole-3-acetic acid (IAA), gibberellic acid (GA3) and zeatin was analyzed and confirmed, as well as the capacity to fix N₂ by the reduction of acetylene-ethylene. In tests under controlled conditions, positive effects on the early growth of wheat plants were determined. Worldwide, *Azotobacter* is marketed in many countries, however, in Argentina there are still no products approved by SENASA that contain this bacterium as an active principle (SENASA, 2024). In Brazil, there are also no registered products based on this genus on

the market (Andreata *et al.*, 2024, Embrapa, 2024). Therefore, there is significant potential for the development of *Azotobacter*-based formulated products in both countries. To take advantage of this opportunity, it is crucial to continue research, placing a strong emphasis on evaluating efficacy through field trials, encouraging greater collaboration between researchers, agricultural producers, and industry. In this context, IMYZA-INTA has made significant progress in developing a prototype product containing *Azotobacter* and *Bacillus*, as active principles, using isolates obtained from Argentine soils. This effort represents a significant step toward integrating these innovations into the local market and highlights the country's commitment to applied research.

The genus *Gluconacetobacter*

The identification of the first nitrogen-fixing acetic acid bacterium, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, in Brazil (Cavalcante & Döbereiner, 1988) marked a significant milestone in agricultural microbiology. Found within sugarcane plant tissues, this bacterium established a foundational model for studying endophyte-monocot diazotrophic associations (Pedraza, 2008). Despite its discovery, limited knowledge existed about its physiological traits, which are essential for its cultivation in bioreactors (inoculant production) and plant interactions (agricultural applications). In Argentina, the Microorganisms for Application in Agriculture Group at the Center for Research and Development in Industrial Fermentations (CINDEFI), Buenos Aires, began investigating the physiological behavior of *G. diazotrophicus* PAL 3 and PAL 5, both isolated from Brazilian sugarcane. A doctoral thesis (Luna, 2003) examined the expression of the periplasmic aldose oxidation pathway via PQQ-dependent glucose dehydrogenase (GDH-PQQ) employed batch and continuous cultures and revealed that nitrogen fixation and phosphorus solubilization were closely linked to this pathway (Crespo *et al.*, 2011; Luna *et al.*, 2000, 2002, 2006, 2008). In 2010, the Pedraza research group at the National University of Tucumán began investigating *G. diazotrophicus* as well. They demonstrated the bacterium's ability to solubilize phosphorus from insoluble sources (Delaporte-Quintana *et al.*, 2016) and found that varying concentrations of inorganic phosphate modulated intracellular polyphosphate (polyP) levels, which enhanced bacterial survival, stress resistance, and biofilm formation (Grillo-Puertas *et al.*, 2018). Furthermore, they established that *G. diazotrophicus* PAL5 improved iron nutrition in hydroponically grown strawberry plants (Delaporte-Quintana *et al.*, 2020). Both research groups also evaluated the bacterium's growth-promoting effects in crops beyond sugarcane, finding increased yields in tomatoes (Luna *et al.*, 2012) and lettuce (single and in combination with other beneficial bacteria) (Vio *et al.*, 2023). Additionally, they reported enhanced phosphorus content and growth in strawberries (Delaporte-Quintana *et al.*, 2017). In addition, CINDEFI researchers also revealed that inoculum levels of *G. diazotrophicus* as low as 10^2 CFU per seed were sufficient for effective root colonization and subsequent spread in the aerial tissues of wheat and sorghum tissues (Luna *et al.*, 2010). Moreover, the bacterium effectively colonized the seedling roots of lettuce, both individually and alongside other beneficial bacteria (Vio *et al.*, 2023) and that the bacterium efficiently colonized seedling roots of lettuce both alone and in combination with other beneficial bacteria (Vio *et al.*, 2023). Today, based on research from Brazil and Argentina, several companies, including Biobacter, Biótica

Life Science, Koppert, Microvidas, Nova, produce *G. diazotrophicus*-based bioinputs for use in diverse crops, with a focus on sustainability and health safety.

The genus *Herbaspirillum*

Researchers from the laboratory of Dr. Johana Döbereiner (EMBRAPA, Seropédica, Brazil) aimed at isolating new strains of *Azospirillum* spp. from cereal roots and obtained more than 100 isolates that could not be identified by microbiological or molecular techniques as belonging to any of the three strains of *Azospirillum* previously isolated and identified in the laboratory. Therefore, for these isolates they proposed a new genus, *Herbaspirillum* (referring to the habitat of the microorganisms, roots of herbaceous plants). The species *Herbaspirillum seropedicae* is named after the place of the first isolation. And the type or reference strain is strain Z67, which was deposited in the American Type Culture Collection as ATCC 35892 (Baldani *et al.*, 1986). A very interesting feature is that they can establish an efficient interaction with plants of the Poaceae family such as rice, sugarcane and corn, among other species. Studies were carried out with corn inoculated with *H. seropedicae* on nitrogen metabolism in seedlings from 3 to 18 days after inoculation (DAI). It was observed that the bacteria positively affected plant development, nitrogen content and ammonium assimilation enzymatic activities. In addition, nitrogenase activity was detected in the inoculated plants, confirming the interaction between bacteria and corn seedlings. This result indicates that *H. seropedicae* infection may be important for nitrogen metabolism of corn seedlings (Ribaudo *et al.*, 2006). Variations in organic acids and amino acids in rice plants inoculated with *H. seropedicae* in contrast to non-inoculated plants were analyzed to provide information on plant-bacteria interaction. Inoculated plants showed higher contents of key nitrogen-assimilating amino acids that were more than five times higher than those of control plants, in aerial tissues. At the same time, inoculated plants showed malate levels approximately twice from those found in control plants. In addition, both ethylene production and ACS activity were increased due to inoculation with *H. seropedicae*. This is the first report on the involvement of ethylene and malate in the metabolic response of rice to inoculation with *H. seropedicae* (Curzi *et al.*, 2008). However, it could also stimulate plant growth through other mechanisms, such as phosphorus solubilization, siderophore production, plant-defense and modulation of signaling pathways such as ethylene synthesis and increased host plant resistance to stress (Figure 2) (Franz, 2012; Estrada *et al.*, 2013; Rosconi Hill, 2013; Brusamarello-Santos *et al.*, 2012; Curá *et al.*, 2017). The characteristic of establishing an efficient interaction with the Poaceae family is being studied extensively for possible inoculants. In fact, since 2011, the first *Herbaspirillum* inoculant for rice in the world has been on the Uruguayan market. It is a liquid formulation based on isolated strains of *H. seropedicae* and developed by Lage y Cía. S.A., called ENDO-RICE. Unfortunately, with the information available until 2024, it is difficult to find more formulations based on this microorganism in Argentina and in the world.

In conclusion, the influence of Johana Döbereiner on agricultural microbiology in Argentina has been crucial not only in transforming the field but also in laying the groundwork for a more sustainable future in agricultural production. Her research on diazotrophic microorganisms has laid the foundation for a new era in the country's

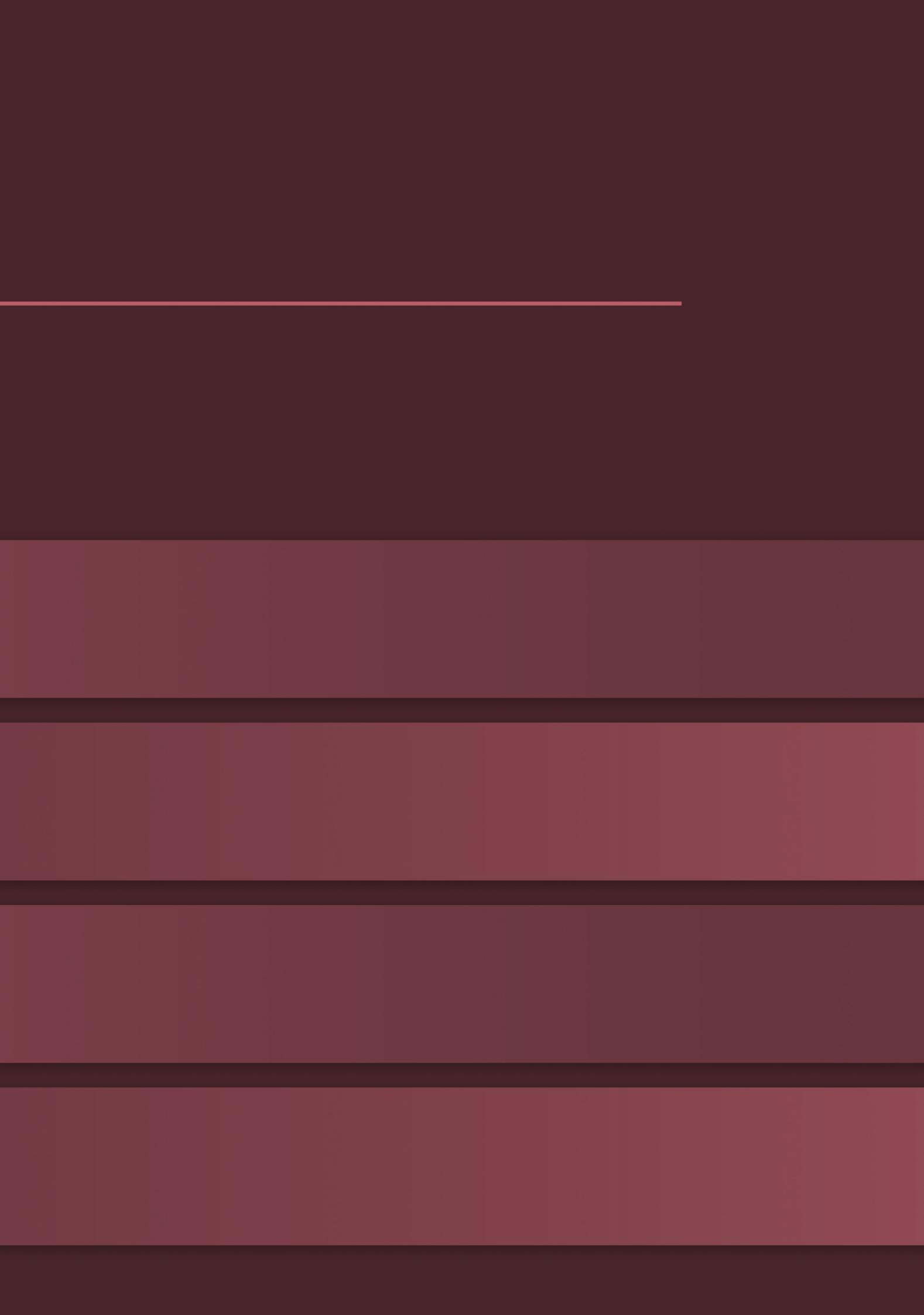
agricultural production, enhancing inoculation techniques that have demonstrated a substantial impact on the yields of several crops. Döbereiner legacy transcends her scientific findings, inspiring a culture of innovation and increasing awareness of the critical importance of microorganisms in agriculture. Its emphasis on soil biology has established Argentina as one of the leading countries in the application of microbial biostimulants, advancing research and development of products that not only improve productivity but also contribute to more sustainable agricultural practices.

References

- AASFAR, A.; BARGAZ, A.; YAAKOUBI, K.; HILALI, A.; BENNIS, I.; ZEROUAL, Y.; MEFTAH KADMIRI, I. Nitrogen fixing *Azotobacter* species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 628379, 2021.
- AKIYOSHI, H. T. **Study of the country's species of the genus "Azotobacter"**. Doctoral dissertation, National University of La Plata. 1952.
- ANDREATA, M. F.; AFONSO, L.; NIEKAWA, E. T.; SALOMÃO, J. M., BASSO, K. R., SILVA, M. C. D., CRUZ ALVES, I.; ALARCON, S.F.; PARRA, M. E. A.; GRZEGORCZYK, K. G.; CHRYSSAFIDIS, A. L.; ANDRADE, G. Microbial Fertilizers: A Study on the Current Scenario of Brazilian Inoculants and Future Perspectives. **Plants**, v. 13, n. 16, p. 2246, 2024.
- BALDANI, J. I., BALDANI, V. L. D., SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. **International Journal of Science and Research**, v. 36, p. 86-93, 1986.
- BASTAKOTI, B.; KHANAL, D.; BANJADE, D. *Azotobacter*: an option for nitrogen fertilizer substitution: a detailed review. **Journal of Wastes and Biomass Management**, v. 6, n. 1, p. 01-04, 2024.
- BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C. C.; PACHECO, F.; ALJANABI, S. M. M.; MONTEIRO, M.; CRUZ, L. M.; BAURA, V. A.; PEDROSA F. O., SOUZA, E. M., WASSEM, R. Differential gene expression of rice roots inoculated with the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 356, p. 113-125, 2012.
- CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 117-130, 2016.
- CASSÁN, F.; CONIGLIO, A.; LÓPEZ, G.; MOLINA, R.; NIEVAS, S.; DE CARLAN, C. L. N.; DONADIO, F.; TORRES, D.; ROSAS, S.; OLIVERA PEDROSA, F.; DE SOUZA, E.; DÍAZ ZORITA, M.; DE-BASHAN, L.; MORA, V. Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. **Biology and Fertility of Soils**, v. 56, p. 461-479, 2020.
- CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 108, p. 23-31, 1988.
- CRESPO, J. M.; BOIARDI, J. L.; LUNA, M. F. 2011. Mineral phosphate solubilization activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus* under P-limitation and plant root environment. **Agricultural Sciences**, 2: 16-22.
- CURÁ, J. A.; FRANZ, D. R.; FILOSOFÍA, J. E.; BALESTRASSE, K. B.; BURGUEÑO, L. E. Inoculation with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum* sp. Bacteria Increases the Tolerance of Maize to Drought Stress. **Microorganisms**, v. 5, p. 41, 2017.
- CURZI, M. J.; RIBAUDO, C. M.; TRINCHERO, G. D.; CURÁ, J. A.; PAGANO, E. A. Changes in the content of amino and organic acids and ethylene production of rice plants in response to the inoculation with *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of Plant Interactions**, v. 3, n. 3, p. 163-173, 2008.

- DELAPORTE-QUINTANA, P.; GRILLO-PUERTAS, M.; LOVAISA, N. C.; RAPISARDA, V. A.; TEIXEIRA, K. R.; PEDRAZA, R.O. Solubilization of different sources of insoluble phosphate by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Revista Agronómica del Noroeste Argentino**, v. 36, n. 1, p. 33-35, 2016.
- DELAPORTE-QUINTANA, P.; GRILLO-PUERTAS, M.; LOVAISA, N. C.; TEIXEIRA, K. R.; RAPISARDA, V. A.; PEDRAZA, R. O. Contribution of *Gluconacetobacter diazotrophicus* to phosphorus nutrition in strawberry plants. **Plant and Soil**, v. 419, p. 335-347, 2017.
- DELAPORTE-QUINTANA, P.; LOVAISA, N. C.; TEIXEIRA, K. R.; RAPISARDA, V. A.; PEDRAZA, R. O. The plant growth promoting bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Azospirillum brasiliense* contribute to the iron nutrition of strawberry plants through siderophores production. **Plant Growth Regulation**, v. 91, p. 185-199, 2020.
- DÖBEREINER J. Azotobacter em solos ácidos. **Boletim do Instituto de Ecologia e Experimentação Agrícolas**, Rio de Janeiro, v.11, n.1, p. 36, 1953.
- DÖBEREINER J. Azotobacter *paspali* n. sp. uma bacteria fixadora de nitrogênio na rhizosfera de *Paspalum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 1, p. 357-365, 1966
- DOBEREINER, J.; DAY, J. M. Nitrogen fixation in the rhizosphere of tropical grasses. **International Biological Programme**, n. 6, p. 39-56, 1975.
- DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N2 fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, v. 44, n. 5, p. 310-313, 1992.
- DOBEREINER, J.; RUSCHEL, A. P. Uma nova especie de *Beijerinckia*. **Revista de Biología**, v. 1, p. 261-272, 1958.
- EMBRAPA. **Bioinsumos** (aplicación móvil). 2024 https://play.google.com/store/apps/details?id=br.embrapa.bioinsumos&hl=es_AR
- ESTRADA, G. A.; BALDANI, V. L. D.; DE OLIVEIRA, D. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant and Soil**, p. 369, p. 115–129, 2013.
- FRANZ, D. R. Interacción de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, de los géneros *Azospirillum* sp. y *Herbaspirillum* sp., con plántulas de *Zea mays* L. sometidas a condiciones de déficit hídrico. **Tesis de grado para acceder el título de Ingeniero Agrónomo (Facultad de Agronomía, UBA)**. 2012.
- GIAMBIAGI, N.; SEDEÑO, A. R. Bacterial fertilization in grassland soils. **IDIA Journal**, v. 103, p. 42-50, 1966.
- GRAGEDA-CABRERA, O. A.; DÍAZ-FRANCO, A.; PEÑA-CABRIALES, J. J.; VERA-NUÑEZ, J. A. Impact of biofertilizers on agriculture. **Mexican Journal of Agricultural Sciences**, v. 3, n. 6, p. 1261-1274, 2012.
- GRILLO-PUERTAS, M.; DELAPORTE-QUINTANA, P.; PEDRAZA, R. O.; RAPISARDA, V. A. Intracellular polyphosphate levels in *Gluconacetobacter diazotrophicus* affect tolerance to abiotic stressors and biofilm formation. **Microbes and Environmental**, v. 33, n. 4, p. 440-445, 2018.
- HUNGRIA, M.; BARBOSA, J. Z.; RONDINA, A. B. L.; NOGUEIRA, M. A. Improving maize sustainability with partial replacement of N fertilizers by inoculation with *Azospirillum brasiliense*. **Agronomy Journal**, v. 114, n. 5, p. 2969-2980, 2022.
- LUNA, M. F. **Características fisiológicas de gluconacetobacter diazotrophicus. Importancia fisiológica de la oxidación periplasmática de aldosas**. Doctoral thesis Fac. Cs. Exactas-UNLP. 2003.
- LUNA, M. F.; APREA, J.; CRESPO J. M.; BOIARDI J. L. Colonization and yield promotion of tomato by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 225-229, 2012.

- LUNA, M. F.; BERNARDELLI, C. E.; GALAR, M. L.; BOIARDI, J. L. Glucose metabolism in batch and continuous cultures of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 3. **Current Microbiology**, v. 52, p. 163-168, 2006.
- LUNA, M. F.; BERNARDELLI, C. E.; MIGNONE, C. F.; BOIARDI, J. L. Energy generation by extracellular aldose oxidation in N₂-fixing *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2054-2057, 2002.
- LUNA, M. F.; BOIARDI, J. L. Growth yields and glucose metabolism of N₂-fixing *Gluconacetobacter diazotrophicus* at different culture pH values. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 587-590, 2008.
- LUNA, M. F.; GALAR, M. L.; APREA, J.; MOLINARI, M. L.; BOIARDI, J. L. Colonization of sorghum and wheat by seed inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 1071-1076, 2010.
- LUNA, M. F.; MIGNONE, C. F.; BOIARDI, J. L. The carbon source influences the energetic efficiency of the respiratory chain of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophicus* **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 564-569, 2000.
- PEDRAZA, R.O. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 25-35, 2008.
- PUENTE, M.; MONTECCHIA, M. S.; PERTICARI, A. Evaluation of *Azospirillum* inoculant strains in wheat. In: **7th International Wheat Congress**, Mar del Plata, BA. Argentina, SAGPyA-INTA, Argentina. 2005
- RIBAUDO, C. M.; RONDANINI, D. P.; TRINCHERO, G. D.; CURÁ, J. A. Influence of *Herbaspirillum seropedicae* on maize nitrogen metabolism. **Maydica**, v. 51, p. 481-485, 2006.
- RODRÍGUEZ CÁCERES, E. Improved Medium for Isolation of *Azospirillum* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, p. 990-991, 1982.
- RODRÍGUEZ CÁCERES, E.; GONZALEZ ANTA, G.; LÓPEZ, J. L.; DI CIOCCO, C. A.; PACHECO BASURCO, J.; PARADA, J. L. Response of field-grown wheat to inoculation with *Azospirillum brasiliense* and *Bacillus polymyxa* in the Semiarid Region of Argentina. **Arid Soil Research and Rehabilitation**, v. 10, p. 13-20, 1996.
- RODRIGUEZ CÁCERES E.; DI CIOCCO, C. A. Factores que condicionan la respuesta de trigo a la inoculación con *Azospirillum brasiliense* Az39 INTA en la pradera pampeana. **Revista de Ciencia y Tecnología**, n. 8, Agosto de 2003, p. 9-16, 2993.
- ROSCONI HILL, F. **Sistemas de adquisición de hierro mediados por sideróforos en *Herbaspirillum seropedicae* Z67**. Tesis doctoral. Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Uruguay. 2013.
- RUBIO, E. J.; MONTECCHIA, M. S.; TOSI, M.; CASSÁN, F. D.; PERTICARI, A.; CORREA, O. S. Genotypic Characterization of Azotobacteria Isolated from Argentinean Soils and Plant - Growth - Promoting Traits of Selected Strains with Prospects for Biofertilizer Production. **The Scientific World Journal**, v. 2013, n. 1, p. 519603, 2013.
- SENASA. <https://aps2.senasa.gov.ar/vademecumFertilizantes/app/publico/productos>. 2024
- VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. International Biological Program Handbook, v. 15, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, UK, 1970.
- VIO, S. A.; GALAR, M. L.; GORTARI, M. C.; BALATTI, P.; GARBI, M.; LODEIRO, A. R.; LUNA, M. F. Multispecies Bacterial Bio-Input: Tracking and Plant-Growth-Promoting Effect on Lettuce var. sagess. **Plants**, v.12, p. 736, 2023.



Contribuição da Dra. Johanna Döbereiner para a compreensão da nutrição nitrogenada da cultura de cana- de-açúcar, com a ativa participação de bactérias diazotróficas

Veronica Massena Reis¹

Segundo Urquiaga^{1,2}

Revisado por: Mariangela Hungria

¹Embrapa Agrobiologia, km 07 – BR 465, CEP 23891-000, Seropédica-RJ

²Membro titular da Academia Brasileira de Ciências.

A trajetória da cultura da cana-de-açúcar e da carreira da Dra. Johanna Döbereiner no Brasil

Nos anos 50, quando a Dra. Johanna Döbereiner chegou no Brasil, as culturas de cana-de-açúcar e café, pela extensão que ocupavam e sua importância econômica, eram as mais relevantes do país. A cana-de-açúcar, a mais difundida, mesmo crescendo em solos de baixa fertilidade e com mínima adubação, apresentava bons rendimentos, sempre se acreditando que a cultura demandava poucos nutrientes e que o solo os forneceria adequadamente, dentre eles o nitrogênio.

Desde o início de sua trajetória no Brasil, a Dra. Johanna deu continuidade aos estudos de fixação biológica de nitrogênio (FBN) iniciados nos seus estudos de graduação na Alemanha, onde graduou-se com a monografia intitulada "Fixação assimbiótica de nitrogênio por *Azotobacter chrococcum* e sua aplicação na agricultura". Sempre mostrou interesse nesse tema da FBN em gramíneas e seus primeiros trabalhos começaram com a cana-de-açúcar, onde no final dos anos 50 descobre uma nova bactéria diazotrófica, a *Beijerinckia fluminensis*, na rizosfera desta cultura (Döbereiner, 1961). Nessa época, descobre também *Azotobacter paspali*, uma bactéria diazotrófica encontrada em *Paspalum notatum* vc Batatais. Nesta pesquisa, Johanna começou chamá-la de bactéria associativa, por estar sempre ligada à rizosfera dessa planta (Döbereiner & Day 1976). Para ela, a presença destas bactérias associadas a cana-de-açúcar e a grama batatais explicariam o porquê destas plantas, mesmo crescendo em solos de baixa fertilidade, se manterem verdes e geralmente sem mostrar sinais de deficiência de nitrogênio.

No caso da cana-de-açúcar, uma cultura que demanda altas quantidades de N para produzir adequadamente, a cultura começou a expandir-se incentivada pelo programa Pro-álcool dos anos 80. Para atender à demanda energética nacional, os estudos sobre a nutrição mineral da cultura foram intensificados. Chamou muito a atenção dos cientistas o fato que esta cultura produzia por longos períodos em solos pobres em N disponível, chegando a atingir produtividades superiores a 100 Mg/ha de colmos frescos e acumulando até 230 kg N/ha. A maior parte deste nitrogênio é exportado do campo, com baixa adubação nitrogenada, sem que o solo se empobreça no seu conteúdo de N (Stanford & Ayres, 1964; Orlando Filho *et al.*, 1980; Sampaio *et al.*, 1984). Esta situação estimulou a Dra. Johanna a intensificar as pesquisas e um dos desafios foi iniciar a quantificação da contribuição da FBN na nutrição da cultura em condições próximas às de campo, mesmo conhecendo-se nesse momento muito poucas espécies de bactérias diazotróficas associadas à cultura (Döbereiner, 1961; Ruschel, 1982). A Dra. Johanna incentivou a aplicação da técnica de ^{15}N para quantificar a contribuição da FBN na nutrição nitrogenada da cana, conseguindo recursos econômicos e contratando profissionais especializados neste tema de pesquisa, e assim se iniciaram os trabalhos no início dos anos 80. O tema da aplicação da técnica de ^{15}N na quantificação da FBN nesta cultura está tratado em outro capítulo nestes anais.

Até 1988, logo após os primeiros impressionantes resultados obtidos de quantificação da contribuição da FBN na cultura (Urquiaga *et al.*, 1992), a pergunta que ficou como desafio foi determinar a(s) bactéria(s) diazotrófica(s) responsável pela FBN na cana. Até esse momento a bactéria mais conhecida associada a cana era *Azospirillum* spp., que também é associada a diversas outras culturas. A Dra. Johanna intensificou os estudos microbiológicos e, justamente nesse ano, adicionando caldo de cana-de-açúcar ao meio de cultura tradicional de isolamento de bactérias diazotróficas,

descobriu a hoje chamada *Gluconacetobacter diazotrophicus*, uma bactéria endofítica presente em plantas que produzem açúcar, suportam altos níveis de pressão osmótica e, não podendo assimilar nitrato, precisa da FBN para crescer, condições reinantes nas plantas de cana (Cavalcante & Döbereiner, 1988; Gillis *et al.*, 1989). Logo depois, outras bactérias diazotróficas endofíticas de cana-de-açúcar também foram isoladas, destacando-se *Herbaspirillum spp.*, que também habitam várias espécies vegetais, não sendo tão específicas para cana-de-açúcar (Baldani *et al.*, 1997; Boddey *et al.* 2003).

Um resultado relevante que chamou muito a atenção da Dra. Johanna foi que as variedades/genótipos de cana com alta e baixa eficiência para FBN (Urquiaga *et al.*, 1992) apresentavam as mesmas bactérias diazotróficas, pelo qual foi possível deduzir que a ativação do processo da FBN nesta cultura dependia da interação planta/bactéria. Este assunto ainda não foi esclarecido pela pesquisa e, nesse sentido, a Dra. Johanna pensava que o adequado conhecimento dessa interação na cana ajudaria muito a aumentar a eficiência da FBN também em outras culturas, como milho, trigo, arroz, entre outras.

Outra questão que apareceu por essa época foi como explicar o fato que a FBN estava presente de forma significativa nos canaviais brasileiros e não nas canas de outras latitudes (Hoesfsloot *et al.*, 2005). A equipe da Dra. Johanna, após discutir com especialistas do melhoramento genético da cultura, lançou a hipótese mais provável, no sentido que no Brasil o melhoramento genético da cana, muito forte nos inícios dos anos 80, tomou como base ou referência a variedade comercial NA56-79, procedente do norte da Argentina, na época uma das mais plantadas aqui, muito rústica, tolerante a solos de baixa fertilidade, muito pouco responsável à adubação nitrogenada e de alto rendimento, características confirmadas no estudo de Urquiaga *et al.* (1992). Por isso, era provável que a característica de eficiência da FBN presente nessa variedade foi transferida para as novas variedades, ou seja, pode ter havido o melhoramento genético da cultura mantendo essa característica favorável, muito diferente das canas melhoradas usando-se altos níveis de N-fertilizante, insumo que diminui a população de bactérias diazotróficas na cultura (Reis Junior *et al.*, 2000).

Com base nestas informações e com o objetivo de definir o manejo da adubação nitrogenada na cultura, realizaram-se intensas pesquisas de campo, a nível de agricultor, para definir as doses de N-fertilizante necessárias para otimizar os rendimentos da cultura como também a resposta a inoculação de bactérias diazotróficas. Diversos estudos foram realizados, mas baseado em experimentos de longo prazo, trabalhando-se com variedades de cana, ficou claro que a FBN na cultura está presente, fornecendo uma média de 40 kg N/ha no N acumulado pelas plantas, representando uma contribuição média de 35% da demanda de N pela cultura, garantindo bons rendimentos. Contudo, deve-se destacar que as bactérias diazotróficas também produzem hormônios de crescimento vegetal e, muitas vezes, a promoção do crescimento das plantas se dá por um efeito conjunto da FBN e da ação hormonal delas nas plantas.

Para otimizar a FBN na cultura é importante destacar a importância da adubação com molibdênio, pois, sendo este nutriente essencial para a síntese da enzima nitrogenase, responsável pela FBN, os níveis de molibdênio exigidos pelas plantas dependentes deste processo são maiores do que aquelas que dependem da adubação nitrogenada. Por isso, em vários experimentos com cana, a aplicação deste nutriente tem contribuído com aumentos significativos da FBN (Boddey *et al.*, 2003).

Mas como explicar a contribuição elevada de N fixado especialmente na cana-

de-açúcar? Nesta época, o conceito de endofitismo levou a pesquisa a mostrar que as bactérias não habitam apenas as raízes, mas toda a planta, passando de uma geração a outra (Döbereiner, 1992; Boddey and Döbereiner, 1995; Baldani *et al.*, 1997). Mostrou-se que algumas espécies de bactérias não sobreviviam no solo, fazendo da planta a responsável por sua transmissão. Bactérias classificadas como endófitas como *Gluconacetobacter diazotrophicus* (antigo *Acetobacter*) e *Herbaspirillum seropedicae*, que habitam o interior dos tecidos vegetais, foram consideradas como espécies importantes para a contribuição da FBN observada na cana e em outros cultivos. Boddey e Döbereiner (1995) descrevem que esta colonização interna, onde a enzima nitrogenase fica protegida do oxigênio e a possibilidade de transferir diretamente para a célula vegetal o N fixado, poderiam explicar as altas contribuições da FBN observada na cana. É interessante observar que, neste trabalho, os autores já citavam a possibilidade de manipular estirpes selecionadas de melhor desempenho para aumentar a contribuição da FBN. Hoje, os cientistas estão utilizando estirpes selecionadas de bactérias diazotróficas para maior excreção de amônia (Batista *et al.*, 2021).

Johanna foi a pioneira em trabalhar com bactérias diazotróficas em plantas não-leguminosas. Descreveu, junto com a equipe da Embrapa e com diversos parceiros internacionais, várias espécies de bactérias, começando com *Azotobacter paspali*, *Beijerinckia fluminensis*, *Azospirillum brasiliense*, *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum amazonense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubribubalbicans* (reclassificação), *Herbaspirillum frisingense* e *Paraburkholderia tropica*. Podemos dizer que Johanna foi a pioneira, abrindo caminho para a internacionalização desta pesquisa brasileira.

Johanna Döbereiner também foi uma educadora ativa, contribuindo para a formação de novas gerações de cientistas e agricultores no Brasil. Sua capacidade de comunicar e espalhar as descobertas científicas ajudou a estabelecer uma base sólida para o estudo da microbiologia agrícola no país. Seu trabalho foi reconhecido internacionalmente, o que ajudou a colocar a microbiologia brasileira em destaque no cenário científico global.

Johanna trabalhou muitos anos na descrição de novas espécies, na ecologia e distribuição destas bactérias, estudando sua interação com várias plantas. Foi seu trabalho pioneiro com cana-de-açúcar que levou a sua equipe a selecionar uma estirpe de *Azospirillum*, hoje denominado *Azospirillum viridazoti*, como o primeiro inoculante recomendado para aplicação na cana-de-açúcar. Desde 2019, o produto desenvolvido em parceria com a iniciativa privada contém uma estirpe selecionada a partir de um coquetel de cinco estirpes, todas isoladas de cana-de-açúcar pelo grupo da Embrapa. Os resultados iniciais mostraram que esta mistura de estirpes atingiu o maior valor de contribuição da FBN, de 31%, em solos mais restritivos comparado ao controle (Oliveira *et al.*, 2006). A aplicação do inoculante batizado de Aprinza aumenta a produtividade da cultura em até 18%. Além de maior acúmulo de massa e de nitrogênio, as plantas crescem mais rápido e com maior massa radicular, resultado da produção de hormônios de crescimento produzido por esta estirpe, especialmente auxinas (Reis *et al.*, 2020). Estes resultados mostram o potencial de aplicação destes microrganismos, pesquisa que Johanna iniciou a mais de 70 anos.

Embora, em vida, Johanna não tenha desenvolvido um produto para as plantas que trabalhou por tantos anos, seu grupo seguiu seus passos e levou a pesquisa do laboratório ao campo. Não podemos esquecer que, hoje, o Brasil também aplica no

campo a bactéria que ela descreveu em 1979, o *Azospirillum brasiliense*. Não só em cereais, mas também na soja, em coinoculação com *Bradyrhizobium* spp., aumentando a nodulação por ter o efeito de promoção de crescimento radicular.

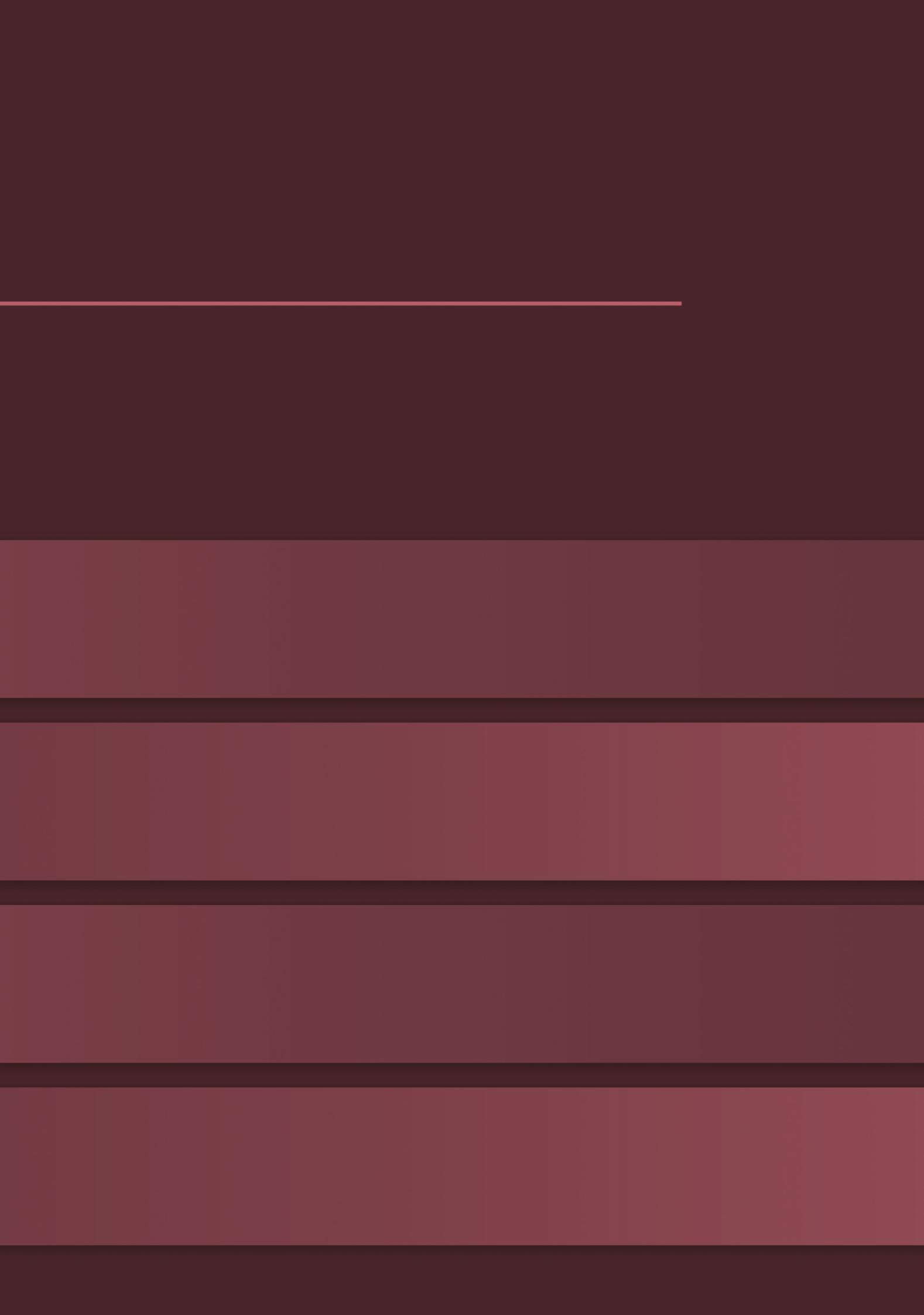
Agradecimento

Ao CNPq (projeto no. 465133/2014-4) por financiarem o INCT – Microrganismos Promotores de Crescimento de Plantas visando à Sustentabilidade Agrícola e a Responsabilidade Ambiental – MPCPAgro, MicroAgro.

Referências

- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. :911–922, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00218-0](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00218-0)
- BATISTA, M. B.; BRETT, P., APPIA-AYME, C., WANG, Y. P., DIXON, R. Disrupting hierarchical control of nitrogen fixation enables carbon-dependent regulation and ammonia excretion in soil diazotrophs. **PLOS Genetics**, v. 17, n. 6, e1009617, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009617>
- BODDEY, R. M. 'Green' Energy from Sugar Cane. **Chemistry and Industry** (London) 17 May, v. 10, p. 355–358, 1993.
- BODDEY, R. M.; DÖBEREINER J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent progress and perspectives for the future. **Fertilizer Researcher**, v. 42, p. 241-250, 1995.
- BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future application. **Plant and Soil**, v. 252, p. 139–149, 2003. <https://doi.org/10.1023/A:1024152126541>
- CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 108, p. 23–31, 1988. <https://doi.org/10.1007/BF02370096>
- DÖBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, v. 13, p.1-3, 1992.
- DÖBEREINER, J. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. **Plant and Soil**, v.15, p. 211–216, 1961.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of micro-organisms and dinitrogen sites; 1976. p. 518-538. In NEWTON, W. E.; C.J.N. NYMAN, C. J. N. (ed.) **Proceedings INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION**, 1., Pullman, WA, 1974. Proceedings... Pullman, WA: Washington State Univ. Press, 1974.
- GILLIS, M.; KERTERS, K.; HOSTE, B.; JANSENS, D.; KROPPENSTEDT, R. M.; STEPHAN, M. P.; TEIXEIRA, K. R. S.; DÖBEREINER, J., DELEY, J. *Gluconacetobacter diazotrophicus* sp. nov. a nitrogen fixing acetic acid bacterium associated with sugar cane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, p. 361–364, 1989.
- HOEFSLOOT, G.; TERMORSHUIZEN, A.; WATT, D. A.; CRAMER, M. Biological nitrogen fixation is not a major contributor to the nitrogen demand of a commercially grown South African sugar-cane. **Plant and Soil**, v. 277, p. 85-96, 2005
- OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M., BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria.

- Plant and Soil**, v. 284, p. 23–32, 2006. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-0025-0>
- ORLANDO-FILHO, J.; HAAG, H. P.; ZAMBELLO, E. Jr. Crescimento e absorção de macronutrientes pela cana-de-açúcar, variedade CB41-76 em função da idade em solos do Estado de São Paulo. **Boletim Técnico de Planalsucar** 2, 1-128, 1980. Planalsucar, Piracicaba, 13400, São Paulo, Brasil.
- REIS JUNIOR, F. B. DOS; REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J. Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic *Herbaspirillum* spp. and *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.) **Plant and Soil**, v. 219, p. 153–159, 2000. <https://doi.org/10.1023/A:1004732500983>
- REIS, V. M.; RIOS, F. A.; BRAZ, G. B. P.; CONSTANTIN, J.; HIRATA, E. S.; BIFFE, D. F. Agronomic performance of sugarcane inoculated with *Nitrospirillum amazonense* (BR11145). **Revista Caatinga**, v. 33, p. 918–926, 2020. <https://doi.org/10.1590/1983-21252020v33n406rc>
- RUSCHEL, A. P. Perspectives on biological nitrogen fixation in sugar cane. In: GRAHAM, P. H.; HARRIS, S. C. (ed.). **Biological nitrogen fixation for tropical agriculture**. Cali, Colombina: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1982. P. 497-502.
- SAMPAIO, E. V. S. B.; SALCEDO, I. H.; BETTANY, J. Dinâmica de nutrientes em cana-de-açúcar. I. Eficiência na utilização de uréia (^{15}N) em aplicação única ou parcelada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 19, p. 943–949, 1984.
- STANFORD, G.; AYRES, A.S. Internal nitrogen requirement of sugarcane. **Soil Science**, v. 98, p. 338-344, 1964.
- URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of American Journal**, v. 56, p. 105–114, 1992. <https://doi.org/10.2136/sssaj1992.03615995005600010017x>



Cooperação da Dra. Johanna Döbereiner com o “Helmholtz Center for Health and Environment” de Munique, Alemanha: estudos envolvendo *Azospirillum* e outras rizobactérias diazotróficas

Anton Hartmann¹
Fabio Lopes Olivares²

Revisado por: Maria Domingues Vargas

¹Helmholtz Center München National Center for Health and Environment Neuherberg, Alemanha. ²Universidade Ludwig-Maximilians de Munique, Faculdade de Biologia, Interações Micro-organismo-Hospedeiro, Planegg, Alemanha.

²Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Laboratório de Biologia Celular e Tecidual & Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para a Agricultura (NUDIBA), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

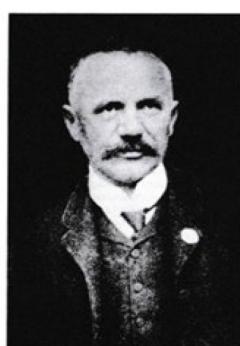
Johanna Kubelka (nome de solteira de Johanna Döbereiner) chegou como refugiada da região de Praga (República Tcheca) em 1945, após a Segunda Guerra Mundial, para a região de Munique (Baviera, sul da Alemanha). Ela trabalhou em algumas fazendas e estudou Ciências Agrárias na Universidade Técnica de Munique (Freising) de 1947 a 1950 (Figura 1).



Figura 1. Visão panorâmica de um local muito significativo da cidade de Freising (Alemanha). As torres gêmeas são o marco da cidade, que não é apenas o local da Universidade Técnica de Munique (onde Johanna Döbereiner cursou agronomia), mas o primeiro local de fabricação de cerveja e abrigou o início da religião católica na Baviera há 1300 anos atrás.

Johanna me contou que ouviu em algumas palestras sobre a importância dos microrganismos do solo associados às raízes para o crescimento e a saúde das plantas. Lorenz Hiltner (professor de microbiologia do solo na Universidade Técnica de Munique, de 1902 a 1923, Figura 2) definiu o termo "Rizosfera" em 1904 (Curl & Truelove, 1985).

Professor Dr. Lorenz Hiltner, visionary pioneer in rhizosphere microbiology and soil bacteriology



1902: Founding director of the Royal Bavarian Agriculture-Botanical Institute, München



1922: Bavarian Institute of Plant Growth and Protection, Justus-Liebig Street, München (destroyed 2nd world war, 1944)



1922: President of the Bav. Institute of Plant Growth and Protection, München, Germany. Died: 6th June 1923

First patent for an effective Rhizobium inoculant to legumes, „Nitragin“ (1900)

Definition of the „Rhizosphere“, as root zone with major influence of plant nutrition and health / control of diseases (1904)

Professor at Technical University of München in Freising

Figure 2. O professor Lorenz Hiltner definiu o termo rizosfera em 1904, seus conhecimentos em microbiologia do solo foram difundidos nas aulas de Ciências Agrárias na Universidade Técnica de Munique (Freising). Pode-se pressupor que as contribuições de Hiltner representaram uma inspiração e tem influência marcante na visão e trajetória científica de Johanna Döbereiner, levando com inigualável maestria a microbiologista do solo para sistemas agrícolas tropicais.

Hiltner afirmou que a nutrição das plantas depende, em geral, da composição dos microrganismos do solo na rizosfera - a zona ao redor da planta que atrai bactérias benéficas por meio de exsudações radiculares; no entanto, patógenos também são atraídos pelas excreções radiculares. O professor Hiltner foi o primeiro diretor do recém-fundado Instituto de Pesquisa Agroquímica da Baviera, em Munique, em 1902, onde o papel dos microrganismos associados às raízes no crescimento das plantas foi investigado; ele especialmente introduziu a tecnologia agrícola com o *Rhizobium* fixador de nitrogênio ao lançar a primeira patente "Nitragin" de um inoculante microbiano (Hartmann *et al.*, 2009).

O conhecimento e as reflexões de Hiltner sobre bactérias da rizosfera promotoras do crescimento das plantas foram mantidos vivos nas palestras da universidade, décadas após sua morte. Os estudos de Johanna na Universidade Técnica de Munique provavelmente pavimentaram as bases de sua carreira científica no Brasil, resultando no isolamento e aplicação de várias bactérias rizosféricas simbóticas e promotoras do crescimento das plantas.

As contribuições bem-sucedidas da Dra. Döbereiner para a melhoria da agricultura no Brasil despertaram o interesse de muitos cientistas ao redor do mundo. Quando o Prof. Dr. Walter Klingmüller, professor de genética da recém-fundada Universidade de Bayreuth, na Baviera do Norte, pediu à Dra. Johanna, no final da década de 1970, para lhe enviar algumas de suas bactérias rizosféricas diazotróficas do gênero *Azospirillum*, ela enviou as estirpes-tipo de *A. brasiliense* e *A. lipoferum*. Em 1979, eu estava prestes a concluir minha tese de doutorado na Universidade de Tübingen e procurava uma oportunidade de continuar a pesquisa microbiológica com bactérias ecologicamente relevantes. Fiquei muito feliz em ter a oportunidade de iniciar um trabalho científico com *Azospirillum* na Universidade de Bayreuth (em 1980). Em 1981, o professor Klingmüller organizou workshops internacionais sobre *Azospirillum* na Universidade de Bayreuth. Esses workshops se tornaram um ponto de encontro para a comunidade científica internacional de pesquisadores em *Azospirillum* e microrganismos relacionados, além dos simpósios internacionais regulares sobre fixação de nitrogênio com plantas não leguminosas. A Dra. Johanna participou pessoalmente do segundo workshop sobre *Azospirillum* em Bayreuth, em 1983 (Döbereiner, 1983), apresentando a palestra principal "10 anos de *Azospirillum*". Em 1983, iniciei uma pesquisa de pós-doutorado de dois anos no laboratório do professor Robert H. Burris, na Universidade de Wisconsin, em Madison, EUA. Johanna Döbereiner obteve o grau de "Master of Science" na Universidade de Wisconsin, com estudos sobre a toxicidade do manganês na simbiose *Rhizobium*-feijão. Na década de 1970, o professor Burris ficou muito interessado nos seus resultados sobre *Azospirillum* e iniciou pesquisas com Yaakov Okon, da Universidade Hebraica de Jerusalém, em Rehovot, que tinha uma posição de pós-doutorando. De fato, também fui muito bem recebido e estudei detalhadamente em seu laboratório a regulação da atividade da nitrogenase por amônio e oxigênio em diferentes espécies de *Azospirillum* e isolei a redutase da nitrogenase de *Azospirillum amazonense*, agora denominado *Nitrospirobium amazonense*. Após retornar à Universidade de Bayreuth, ingressei como pesquisador associado no Departamento de Microbiologia (formados pelos Profs. K.H. Stolp, D. Kleiner e O. Meyer), trabalhando em mecanismos regulatórios ecológicos sobre microrganismos do solo, incluindo *Azospirillum*. Em 1988, obtive o título de professor universitário permanente com uma tese de habilitação sobre a "Regulação da atividade de fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético em *Azospirillum* spp.". Após

me mudar do "National Research Center for Health and Environment" em Neuherberg (Munique), em 1989, para o recém-criado "Institute of Soil Ecology" (chefeado pelo Prof. Dr. F. Beese), tive a oportunidade de fundar um grupo de "Ecologia Microbiana Molecular da Rizosfera", focando no gênero *Azospirillum* como bactérias modelo para desenvolver sondas moleculares para identificar e localizar especificamente bactérias na rizosfera e no solo.

No verão de 1995, encontrei novamente a Dra. Johanna no Workshop Internacional em Angra dos Reis-RJ, em comemoração ao seu 70º aniversário (Figura 3a), e no 6º workshop sobre *Azospirillum*, desta vez em Sárvár, na Hungria (Figura 3b). Lá, ela apresentou uma palestra estimulante sobre novas bactérias diazotróficas endofíticas (Döbereiner *et al.*, 1995).



Figura 3. (a) Simpósio Internacional realizado em Homenagem aos 70 anos de Johanna Döbereiner em 1995 (Angra dos Reis-RJ) e **(b)** 6º Workshop sobre *Azospirillum* em 1994 (Sárvár-Hungria). Estas representam iniciativas de intercâmbio e mobilidade científicas entre pesquisadores dos grupos Döbereiner-Hartmann no âmbito dos acordos bilaterais financiados pelo CNPq.

Esses workshops e o Simpósio Internacional sobre Fixação Biológica de Nitrogênio em Plantas não Leguminosas tornaram-se uma plataforma para iniciar cooperações internacionais, e a Dra. Johanna forneceu à comunidade novas bactérias rizosféricas e endofíticas diazotróficas isoladas. Gudrun Kirchhof, em meu grupo, recebeu alguns novos diazotróficos endofíticos (os chamados isolados E) de diferentes plantas cultivadas para uma caracterização filogenética precisa. Ela aprendeu a técnica de sequenciamento de RNA 16S e 23S como padrão ouro de identificação filogenética de bactérias no Departamento de Microbiologia da TU Munique/Freising, no Instituto do Prof. Dr. K.H. Schleifer. No entanto, a Dra. Johanna não ficou satisfeita que algumas de suas bactérias foram claramente identificadas como uma nova espécie de **Burkholderia**, agora denominada *Paraburkholderia tropica* (Reis *et al.*, 2004). No início da década de 1990, Gudrun Kirchhof já estava envolvida na caracterização filogenética de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Baldani *et al.*, 1996). A Dra. Johanna Döbereiner queria cooperar regularmente conosco em um projeto de pesquisa científica e tecnológica Brasil-Alemanha, que foi aprovado como projeto BRA ENV34 e projeto CNPq/PADCT nº 620512/94-6 (Figura 4).

Este projeto conjunto incluiu bolsas de viagem para pesquisadores alemães virem realizar trabalhos de pesquisa conjunta em Seropédica. Do grupo da Dra. Johanna, José Ivo Baldani, Vera Baldani, Veronica Reis, Fabio Olivares e Fabio Bueno dos Reis Jr- além dela própria - visitaram o GSF-Neuherberg (antigo nome do "Helmholtz Center" de Munique) várias vezes. A Dra. Johanna gostou de visitar Munique 40 a 50 anos depois de ter vivido e estudado lá.

**Cooperation of EMBRAPA-Biologia, Seropedicæ, RJ, Brazil and
Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany**

Biological Nitrogen Fixation in non-leguminous crop plants

Funding:

- BRA-ENV 34 and CNPq/PADCT 620512/94-6 (Brasilian-German scientific and technological research cooperaton)
- Ha1708 an Ha1708/9 and INCT/CNPq 573828/2008-3 (German Science and brasilian CNPq-grants)

Research visits of students / researchers between EMBRAPA Seropédica, RJ and Helmholtz Center Neuherberg, München: partner institute:

EMBRAPA Seropédica: Ivo Baldani, Vera Baldani, Veronica Reis, Fabio Olivares, Fabio dos Reis

Helmholtz München: Michael Schloter, Bernhard Asmus, Gudrun Kirchhof, Christine Gündisch, Doreen Fischer, Andreas Hofmann

Joint isolation / description of new diazotrophic bacterial species in Brazil and Germany:

***Herbaspirillum rubrisubalbicans* (1996) from sugar cane**

***Herbaspirillum frisingense* (2001) from C4-energy plant**

Azospirillum doebereinerae* (2001) from *Miscanthus

***Paraburkholderia tropica* (2004) from sugar cane**

Figura 4. Documento digitalizado do projeto BRA ENV34 e projeto CNPq/PADCT nº 620512/94-6 que institucionalizou o convênio Brasil-Alemanha (a principal parceira europeia do grupo da Dra. Johanna Döbereiner). Este convenio durou quase duas décadas com resultados de grande impacto científica e tecnológico no tema de bactérias diazotróficas associadas a plantas não-leguminosas

Do grupo alemão, Gudrun Kirchhof, Bernhard Aßmus e Michael Schloter passaram várias semanas de trabalho de pesquisa em Seropédica. Para a pesquisa de Michael Schloter, que utilizava anticorpos monoclonais específicos de cepa para *A. brasiliense* cepa Sp7 e Sp245 (agora reclassificada como *A. baldaniorum*), desenvolvidos durante seu projeto de doutorado, foi comprovada a colonização endofítica das raízes de trigo pela cepa Sp245, mas não pela cepa Sp7 (Hartmann e Schloter, 1997). Para essa pesquisa, um luminômetro de leitura de placas especial foi trazido para Seropédica. Bernhard Aßmus estudou a localização de *Azospirillum* spp. usando sondas de 16S RNA marcadas com fluorocromos (Aßmus *et al.* 1995) e comprovou a localização endofítica da estirpe Sp245. Gudrun Kirchhof investigou, junto com colegas de Seropédica, diazotróficos endofíticos em plantas gramíneas de interesse energético (Kirchhof *et al.*, 1997) e desenvolveu um ensaio de identificação molecular para *Acetobacter diazotrophicus* (reclassificada como *Gluconacetobacter diazotrophicus*) em tecidos vegetais (Kirchhof *et al.*, 1998). No decorrer dessas investigações, Gudrun Kirchhof e Barbara Eckert, financiadas pela bolsa DFG Ha1708/5 (Deutsche Forschungsgemeinschaft / Fundação Alemã de Pesquisa), isolaram e caracterizaram *Azospirillum doebereinerae* e *Herbaspirillum frisingense* como novas espécies de rizobactérias de *Miscanthus sinensis* e *Pennisetum purpureum* em Freising e em Seropédica (Eckert *et al.*, 2001; Kirchhof *et al.*, 2001).

Ao longo dos anos de visitas contínuas e cooperação bem-sucedida, os parceiros científicos tornaram-se bons amigos, e, claro, a cooperação continuou após a morte da Dra. Johanna em outubro de 2000. Em 2008, foi iniciado um projeto conjunto DFG (Ha 1708/9) e INCT/CNPq (proc. nº 573828/2008-3) para o estudo molecular da fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar cultivada no campo e inoculada na fazenda de pesquisa em Seropédica (Fischer *et al.* 2012). Além disso, pesquisas conjuntas foram

realizadas por membros de ambos os grupos envolvendo Doreen Fischer/Andreas Hofmann e Veronica Reis/José Ivo Baldani (Oliveira *et al.*, 2009; dos Santos Ferreira *et al.*, 2020). Também foram escritas revisões e capítulos de livros juntos (Baldani *et al.*, 2014 e 2015; Hartmann *et al.*, 2019).

Sou profundamente grato à Dra. Johanna Döbereiner por me ter introduzido ao emocionante mundo das interações benéficas entre microrganismos e plantas; seu pensamento estratégico e abordagens experimentais para isolar e caracterizar bactérias diazotróficas da rizosfera me guiaram durante toda a minha vida científica. Também os membros do meu grupo foram contagiados por esta pesquisa ecologicamente focada e gostam muito de interagir com os colegas da Embrapa (Seropédica). Continuei a visitar a Embrapa (Seropédica) até a morte do Dr. Jürgen Döbereiner, em 16/10/2018. Apresentei vários seminários na Embrapa-Agrobiologia sobre pesquisas atuais sobre diazotróficos associados às raízes. Com minha família, tivemos o prazer de sermos convidados para finais de semana maravilhosos com Johanna e Jürgen no “paraíso tropical do jardim” na fazenda “Porangaba”, na área montanhosa da bela reserva natural da Mata Atlântica.

Impacto do programa de cooperação da Dra. Johanna Döbereiner com o Dr. Anton Hartmann do Centro Helmholtz de Saúde e Meio Ambiente em Munique/Alemanha: um testemunho de Fabio Lopes Olivares.

O programa de cooperação científica Brasil-Alemanha apresentado acima impactou profundamente minha carreira como pesquisador, moldando significativamente meu desenvolvimento científico e minha visão atual sobre o papel da ciência e tecnologia. Sob a supervisão de duas figuras lendárias da microbiologia, Dra. Johanna Döbereiner e Dr. Anton Hartmann, obtive um treinamento de excelência no campo das interações benéficas entre plantas e microrganismos, o que lançou as bases para minha jornada acadêmica. Como um efeito colateral do poder transformador desse ambiente científico formativo tornei-me um professor muito atuante e entusiasmado em microbiologia e biotecnologia na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), onde ingressei em 1999. Atualmente, sou vice-reitor e coordenador de Ciências Agrárias da FAPERJ, além de me interessar pela avaliação cienciométrica e pelos impactos científicos, educacionais e sociais da pós-graduação.

A Dra. Johanna Döbereiner foi fundamental para o desenvolvimento e competitividade da agricultura brasileira através do seu trabalho pioneiro com bactérias diazotróficas em leguminosas, como a soja, e em culturas não leguminosas, como cana-de-açúcar, milho, trigo e arroz. Seu compromisso com o avanço da fixação biológica de nitrogênio revolucionou nossa compreensão das interações planta-microrganismo, aumentando significativamente a produtividade agrícola no Brasil. Trabalhando sob sua orientação como bolsista de aperfeiçoamento científico (CNPq), durante os cursos de mestrado e doutorado e meu tempo de pós-doutorado (de 1990 a 1999), aprendi os aspectos técnicos essenciais e avançados da microbiologia e experimentei sua visão além do tempo para uma agricultura sustentável. Ela consolidou na minha formação uma profunda compreensão da importância ecológica dos diazotróficos e seu potencial para reduzir a necessidade de fertilizantes nitrogenados sintéticos.

Em 1994, tive a oportunidade de realizar um treinamento na Alemanha, sob a orientação do Dr. Anton Hartmann, no "Helmholtz Center for Health and Environment" em Munique, que foi muito marcante (Figura 5).

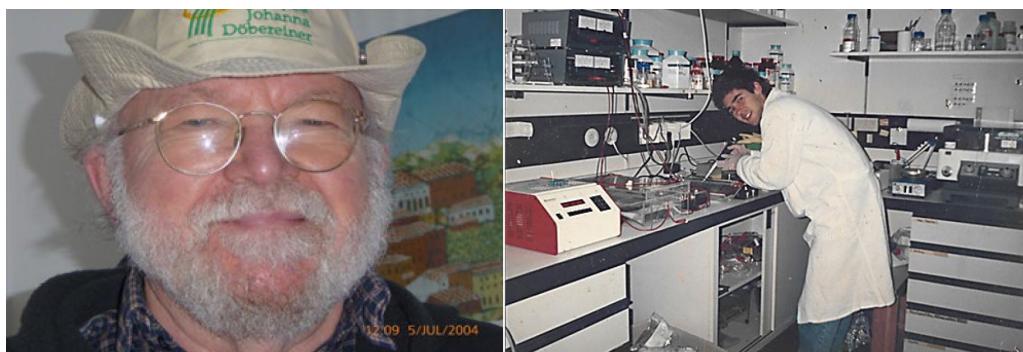


Figura 5. Dr. Anton Hartmann em fotografia datada de julho de 2004 e Fabio Olivares trabalhando no seu laboratório de ecologia microbiana em Munique no ano de 1994.

Essa experiência expandiu minha expertise em ecologia microbiana molecular, permitindo-me aprofundar o entendimento dos mecanismos de colonização microbiana nas raízes das plantas e de como bactérias do gênero *Azospirillum* spp. promovem o crescimento das plantas. A colaboração entre a equipe da Dra. Döbereiner no Brasil e a equipe do Dr. Hartmann na Alemanha foi fundamental na identificação de novas espécies de bactérias diazotróficas, contribuindo para o entendimento mais amplo da comunidade científica sobre a aplicação de técnicas imunológicas e microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) na taxonomia e interação estrutural bactéria-planta. Durante esse período, também tive a oportunidade de fortalecer outras colaborações com o Dr. Euan James ("Dundee University", Escócia), outro pesquisador essencial em minha trajetória científica (Figure 6).

O Dr. Euan James ampliou ainda mais o universo de exploração das interações planta-microrganismo sob uma perspectiva estrutural, utilizando diferentes abordagens microscópicas. Fizemos contribuições seminais sobre como bactérias diazotróficas endofíticas infectam e colonizam endofiticamente os tecidos de plantas gramíneas (James *et al.*, 1994; Olivares *et al.*, 1997; James *et al.*, 1997, 1998, 2001 e 2002). Quase 35 anos após meu primeiro treinamento científico, ainda sou fascinado pelo mundo científico revelado pela microscopia, incorporando o espírito dos primeiros pioneiros na técnica, Anton van Leeuwenhoek e Robert Hooke.

Essas intensas colaborações não só promoveram descobertas científicas, como também facilitaram a troca internacional de conhecimentos, fortalecendo redes de pesquisa internacionais. As visitas de treinamento de pesquisa conjuntas e a colaboração contínua entre a Embrapa Agrobiologia, o "Helmholtz Center" de Munique e a Universidade de Dundee resultaram em abordagens inovadoras para melhorar a produtividade das plantas por meio de inoculantes microbianos, em uma segunda revolução verde, que é atualmente, crítica para a agricultura sustentável.

Com base no meu depoimento como exemplo, posso atestar que a colaboração Brasil-Alemanha, sob a liderança da Dra. Johanna Döbereiner e do Dr. Anton Hartmann, influenciou profundamente minha trajetória pessoal de pesquisa e a de outros colegas pesquisadores atuantes em diferentes instituições no Brasil, consolidando um compromisso com os estudos das interações planta-microrganismo e a suas aplicações

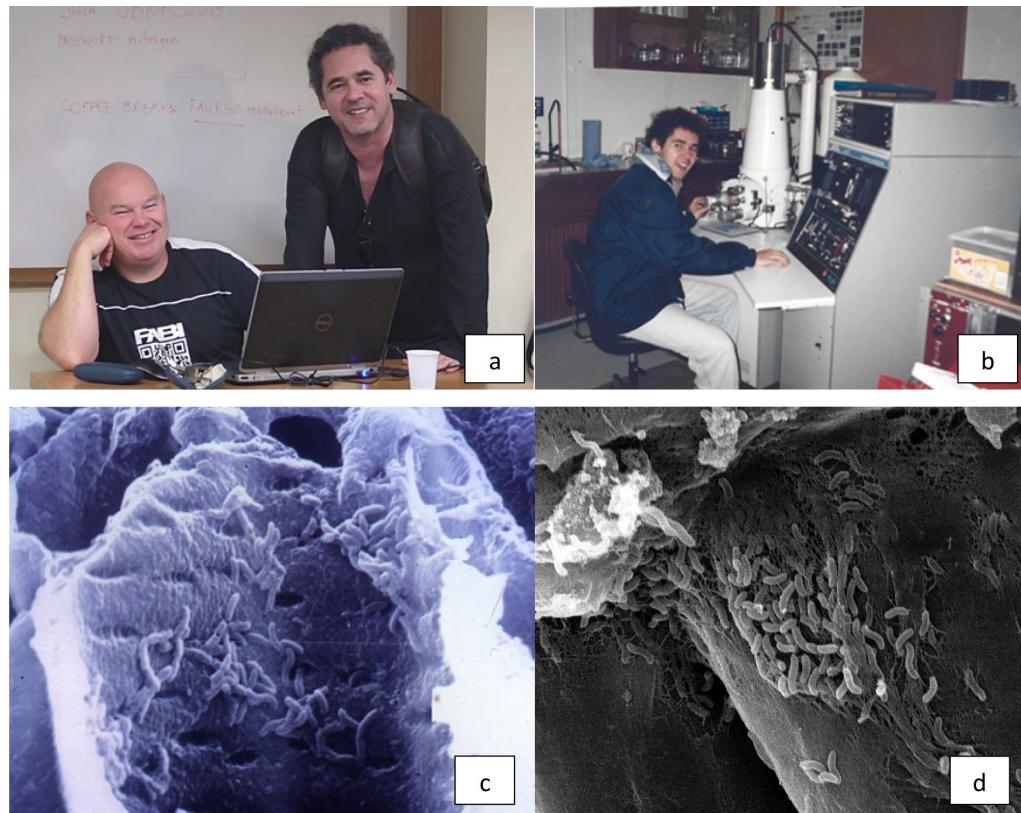


Figura 6. (a) Dr. Euan James (originalmente pesquisador do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade de Dundee (Escócia). Dr Euan foi fundamental na descrição da interação estrutural entre bactérias diazotróficas e plantas da família das gramíneas. (b) Fabio Olivares em treinamento em microscopia na Universidade de Dundee. (c) Microscopia eletrônica de varredura evidenciando bactérias diazotróficas colonizando vasos de xilema (estabelecimento endofítico) e (d) Microscopia eletrônica de varredura de bactérias infectando as plantas através de sítios de emergência de raízes laterais.

na biotecnologia microbiana em agroecossistemas. Isso exemplifica o poder da cooperação internacional no avanço do conhecimento científico e na abordagem de desafios globais na agricultura.

Referências

- ABMUS, B.; HUTZLER P.; KIRCHHOF G.; AMANN R.; LAWRENCE J.R.; HARTMANN. A. *In situ* localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat using fluorescently labeled rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser scanning microscopy. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1013-1019, 1995. <https://doi.org/10.1128/aem.61.3.1013-1019.1995>
- BALDANI J.I.; POT N; KIRCHHOF G.; FALSEN E.; BALDANI V.L.D.; OLIVARES F.L.; HOSTE B.; KERSTERS K.; HARTMANN A.; GILLIS M.; DOEBEREINER J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of *Pseudomonas rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov. and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 802-810, 1996. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-3-802>
- BALDANI J.I.; ROUWS L.; CRUZ L.M.; OLIVARES F.L.; SCHMID M.; HARTMANN A. The Family *Oxalo-*

- bacteriaceae* – chapter 35. In: **The Prokaryotes** – Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2015. pp. 920-974. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_291
- BALDANI J.I.; VIDEIRA S.S.; TEIXEIRA K.R.; DOS SANTOS FERREIRA N.; REIS V.M.; DE OLIVEIRA A.L.M.; SCHWAB S.; DE SOUZA E.M.; PEDRAZA R.O.; BALDANI V.L.D.; HARTMANN A. The Family *Rhodospirillaceae* – chapter 22. In: **The Prokaryotes** – Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2014. p. 534-618. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_300
- CURL E.A.; TRUELOVE C.A. The Rhizosphere. In: **Advanced Series in Agricultural Sciences**, 15, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1985, 280p. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-70722-3>
- DÖBEREINER J. Ten Years *Azospirillum*. In: KLINGMÜLLER (Ed.). **Azospirillum II**, Genetics, Physiology, Ecology. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Stuttgart, 1983, p. 9-23. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-9361-9_1
- DÖBEREINER J.; BALDANI V.L.D.; REIS V.M. (1995) Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.; SIK T., VANDERLEYDEN J. (Eds.) **Azospirillum VI and Related Microorganisms**, 3-14, NATO ASI Series, Vol. G37, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79906-8_1
- DOS SANTOS FERREIRA N.; SANT'ANNA F.H.; REIS V.M.; AMBROSINI A.; VOLPIANO C.G.; ROTHBALLER M.; SCHWAB S.; BAURA V.A.; BALSANELLI E.; PEDROSA; F.C.; PASSAGLIA; L.M.P.; DE SOUZA E.M.; HARTMANN A.; CASSAN F.; ZILLI J.E. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasiliense* Sp245 as the type-strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, p. 6203-6212. 2020. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004517>
- ECKERT B.; WEBER O.B.; KIRCHHOF G; HALBRITTER A. STOFFELS M.; HARTMANN A. *Azospirillum doeberaeinerae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 17-26, 2001. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-17>
- FISCHER D.; PFITZNER B.; SCHMID M.; SIMOES-ARAÚJO S.; REIS V.; PEREIRA W.; ORMENO-ORRILLO E.; HAI B.; HOFMANN A.; SCHLÖTER M.; MARTINEZ-ROMERO E.; BALDANI J.I.; HARTMANN A. Molecular characterization of the diazotrophic bacterial community in non-inoculated and inoculated field-grown sugar cane (*Saccharum* sp.). **Plant and Soil**, v. 356, p. 83-99, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0812-0>
- HARTMANN A.; FISCHER D.; KINZEL L.; CHOWDHURY S.P.; HOFMANN A.; BALDANI J.I.; ROTHBALLER M. Assessment of the structural and functional diversities of plant microbiota – achievements and challenges – a review. **Journal of Advanced Research**, v. 19, p. 3-13, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.04.007>
- HARTMANN A.; ROTHBALLER M.; SCHMID M. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. **Plant and Soil**, v. 31, p. 7-14, 2008. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9514-z>
- SCHLÖTER M.; HARTMANN A. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasiliense* strains studied with strain-specific monoclonal antibodies. **Symbiosis**, v. 25, p. 159-179, 1998.
- JAMES E.K.; GYANESHWAR P.; MATHAN N.; BARRAQUIO W.L.; OLIVARES F.L.; LADHA J. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, p. 894-904, 2002. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.9.894>

- JAMES E.K.; OLIVARES F.L.; BALDANI J.I.; DOEBEREINER J. *Herbaspirillum*, endophytic diazotrophs colonising vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 785-797, 1997. <https://doi.org/10.1093/jxb/48.3.785>
- JAMES E.K.; OLIVARES F.L.; OLIVERA A.L.M.; REIS JUNIOR F.B. DOS; SILVA L.G.; REIS V.M. Further observations on the interactions between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 747-760, 2001. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.357.747>
- JAMES E.K.; OLIVARES F.L.; SPRENT J.I. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 17, p. 77-119, 1998. <https://doi.org/10.1080/07352689891304195>
- JAMES E.K.; REIS V.M.; OLIVARES F.L.; BALDANI J.I.; DÖBEREINER J. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacteria *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, p. 757-766, 1994. <https://doi.org/10.1093/jxb/45.6.757>
- KIRCHHOF G.; BALDANI J.I.; REIS V.M.; HARTMANN A. Molecular assay to identify *Acetobacter diazotrophicus* and detect its occurrence in plant tissues. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 12-19, 1998. <https://doi.org/10.1139/w97-116>
- KIRCHHOF G.; ECKERT B.; STOFFELS M.; BALDANI J.I.; REIS V.M.; HARTMANN A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species occurring in C4-energy plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 157-168, 2001. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-157>
- KIRCHHOF G.; REIS V.M.; BALDANI J.I.; ECKERT B.; DÖBEREINER J.; HARTMANN A. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. **Plant and Soil**, v. 194, p. 45-55, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1004217904546>
- OLIVARES F.L.; JAMES E.K.; BALDANI J.I.; DOEBEREINER J. Infection of mottled stripe-disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, v. 135, p.723-737, 1997. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00684.x>
- OLIVEIRA A.L.M.; STOFFELS M.; SCHMID M.; REIS V.M.; BALDANI J.I.; HARTMANN A. Colonization of sugar cane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 106-113, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.09.004>
- REIS V.M.; ESTRADA-DE LOS SANTOS P.; TENORIO-SALGADO S.; VOGEL J.; STOFFELS M.; GUYON S.; MAVINGUI P.; BALDANI V.L.D.; SCHMID M.; BALDANI J.I.; BALANDREAU J.; HARTMANN A.; CABALLERO-MELLADO J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2155-2162, 2004. <https://doi.org/10.1099/ijns.0.02879-0>
- STOFFELS M.; CASTELLANOS T.; HARTMANN A. Design and application of new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for the *Azospirillum-Skermanella-Rhodocista*-cluster. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 24, p. 83-97, 2001. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00011>

A herança de uma mulher à frente de seu tempo no ensino, na formação e na construção de novas gerações de microbiologistas do solo no Brasil

Fatima Maria de Souza Moreira^{1,2}

Marcos Gervasio Pereira³

Cristhiane Oliveira da Graça Amâncio⁴

Everaldo Zonta³

Revisado por: Mariangela Hungria

¹*Universidade Federal de Lavras, Trevo Rotatório Professor Edmir Sá Santos, CEP 37203-202, Lavras - MG,*

²*Membro Titular da Academia Brasileira de Ciências*

³*Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, BR-465, Km 7,
CEP 23.897-000, Seropédica, RJ*

⁴*Embrapa Agrobiologia, BR. 465, km 7, CEP 23891-000, Seropédica, RJ*

Nestes 100 anos de comemoração do aniversário da Dra. Johanna Döbereiner, além do reconhecimento por sua vasta produção científica, ela deve também ser homenageada em outra área igualmente relevante que foi sua atuação na formação de recursos humanos, e que se iniciou numa época em que o governo federal começava a planejar e estabelecer os programas de pós-graduação no Brasil. A proximidade da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) antiga Escola Nacional de Agronomia (ENA), sem dúvida foi um fator importante, porém, sua atuação ultrapassou barreiras geográficas, não se limitando ao outro lado da antiga estrada Rio São Paulo, pois ela tornou o então Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos/ Programa de Fixação Biológica de Nitrogênio e posteriormente CNPAB (Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia) da Embrapa, num polo de treinamento de pessoal de outros estados brasileiros e até mesmo de outros países. Muitos dos/as vários/ as alunos/as, de Iniciação Científica, Mestrado, Doutorado, ou Pós doutorado, que passaram pelo seu laboratório ou que permaneceram na Agrobiologia, atuam hoje em vários estados brasileiros e expandiram seu legado formando novos recursos humanos que progressivamente formaram novos recursos humanos, multiplicando dessa forma o seu legado. Neste capítulo, são apresentados os primeiros alunos de iniciação científica de Johanna (12 de 1966-1974), além dos 18 mestres/as e doutores/as orientados/as diretamente por ela. Além disso, foram quantificados os recursos humanos (mestres e doutores) orientados por estes 30 orientados/as sendo identificado um total de 725 pós-graduados "descendentes de Johanna", atestando este importante legado de nossa grande mestra. Considerando outras orientações não contabilizadas e os pesquisadores da Agrobiologia e de outras Instituições que tiveram algum tipo de treinamento e que também orientaram, este número é muito mais expressivo demonstrando o valor de uma cientista que não só contribuiu com publicações relevantes para a ciência brasileira, mas também para sua continuidade. Johanna também foi uma referência de mulher forte, competente e determinada não só para suas orientadas, mas para outras mulheres na ciência que hoje, assim como ela, tem contribuição relevante para a ciência brasileira.

INICIAÇÃO CIENTÍFICA - os primeiros orientados

Como já mencionado em outro capítulo, Dra. Johanna Döbereiner obteve seus títulos de graduação em Agronomia, mestrado e doutorado, respectivamente em 1950, 1963 e 1975. O curso de Pós-Graduação em Agronomia -área de concentração em Ciência do Solo da UFRRJ foi criado em 1966 e as primeiras orientações de mestrado e doutorado de Johanna datam de 1971 (Stamford, Newton - mestrado) e 1976 (Tavares, M.- doutorado), respectivamente. Porém, a partir de sua contratação por Álvaro Barcelos em 1951 (primeiro Presidente da Sociedade Brasileira em Ciência do Solo criada em 1947), ela já começou a atuar em orientações de iniciação científica que não aparecem nominalmente em seus currículos, inclusive no Lattes. Para obter informações sobre estes/as orientados/as contou-se com a colaboração dos Doutores Avílio A. Franco (Embrapa) e Fábio O. Pedrosa (UFPR) que estão entre estes orientados e também alguns foram inferidos por terem sido identificados como autores/co-autores nas primeiras publicações de Johanna até 1974 (CD Johanna Döbereiner, 2003). Também foram feitas consultas na Plataforma Lattes desses pesquisadores/professores e nos artigos publicados por eles (Tabela 1). Até as placas das turmas de Agronomia existentes no

prédio principal da UFRRJ foram consultadas! Apesar desta diversidade de fontes de consulta e checagem é possível que nem todos os orientados de IC deste período tenham sido identificados.

Nestas primeiras publicações ressalta-se ainda a intensa colaboração de Johanna com vários/as professores da UFRRJ. Boa parte dos primeiros/as orientados/as de IC de Johanna realizaram seus cursos de pós-graduação no exterior, mas a sua primeira publicação foi com Johanna. A primeira publicação científica de um aluno de IC tem influência marcante na escolha de sua carreira, e Johanna sempre os incluía como autores principais quando eram eles os principais condutores da pesquisa sob sua orientação, dando maior motivação nesta escolha. A maioria de discentes masculinos nesta lista reflete a predominância do gênero nos cursos de Agronomia na época (Oliveira *et al.*, 2017). Dentre as duas orientadas encontradas destaca-se Maria Cristina Prata Neves, a única do curso de Biologia, que foi a primeira a publicar com um pesquisador estrangeiro em uma revista internacional importante: *Soil Biology and Biochemistry*, representando o início de um período de intensa colaboração internacional de Johanna. Maria Cristina também foi orientadora da tese de doutorado Mariangela Hungria, uma das editoras deste livro. Posteriormente ao seu retorno ao Brasil, esses primeiros orientados de IC fizeram e ainda fazem contribuições muito relevantes na formação e recursos humanos e na pesquisa. Eles atuaram em centros diversos da Embrapa e na UFMG, UFRRJ, UFPR e UFES. Nove destes primeiros orientados, já aposentados, orientaram um total 161 mestrandos e 89 doutorandos ao longo de sua trajetória profissional (Tabela 1). Boa parte destes orientados também seguiram orientando outros profissionais. Uma corrente do bem que merece ser ainda pesquisada. Infelizmente não houve tempo hábil de fazê-lo, mas nos dedicamos às orientações dos orientados de mestrado e de doutorado de Johanna que seguem a seguir.

Formação de recursos humanos por mestres e doutores orientados diretamente por Johanna Döbereiner/ Orientados de mestrado e doutorado de Johanna Döbereiner: replicando seus ensinamentos

Johanna orientou 18 estudantes de mestrado e doutorado e, embora este número possa parecer pequeno comparado àqueles de seus orientados, ele reflete um período de início da evolução da pós-graduação no Brasil (Cabral *et al.*, 2000). Não foram encontrados CV Lattes de duas orientadas: Adalis Bezerra Campelo e Margarete Cristina Barcel Ferreira, respectivamente do IPEACS e de instituição não encontrada. Em Cvs Lattes de outros 2, Antonia Volpon e Mauro de Paula (CPDLAMM, Embrapa), não foram encontradas orientações (Tabela 2). Dos 14 que orientaram, 6 eram pesquisadores da Embrapa e 8 eram professores da UENF, UFAC, UFRRJ, UFMG (2), INPA/UFLA e UFRPE e um pesquisador do IAPAR (Tabela 2). Considerando os 14 professores/pesquisadores (6 mulheres e 8 homens) orientadores que foram orientados diretamente por Johanna, tanto no seu mestrado e/ou no seu doutorado, a quantidade total de orientados/as por eles/elas soma um total de 288 mestres e 187 doutores (Tabela 2). Estes números somados aos números dos primeiros orientados/as de IC de Johanna corresponde a um total de 725 profissionais distribuídos em todos os estados de todas as regiões do país, e que também estão formando novos profissionais. Nos CVs Lattes destes orientados/as

(Tabela 1 e 2), a probabilidade do leitor/a encontrar alguém de sua instituição de ensino ou pesquisa no seu estado é muito alta. Além desses, poderiam ser contabilizados os pesquisadores do Centro criado por Johanna - a Embrapa Agrobiologia-, os ICs e alunos de aperfeiçoamento que tiveram sua orientação e tanto outros não contabilizados neste capítulo, os quais certamente constituirão um número muito mais impressionante representando o legado de uma cientista que contribuiu expressivamente para a formação de recursos humanos motivados pela ciência brasileira.

O CURSO DE JULHO - só o ser humano é capaz de transformar sensibilidade em ciência

Pioneira como era, Dra Johanna foi a primeira mulher a integrar o grupo de docentes do programa, e desde o seu ingresso, até o início da década de 80, foi responsável pela disciplina de Microbiologia do Solo, e orientadora de várias dissertações e teses produzidas durante esse. Esta disciplina de Microbiologia do Solo, motivou o renomado e muito procurado "Curso de Julho".

O crescente interesse mundial na Fixação Biológica de Nitrogênio como alternativa aos fertilizantes sintéticos impulsionou a estruturação de instituições científicas direcionadas a este tema, além da criação e consolidação de uma ampla rede de pesquisadoras e pesquisadores pelo mundo. No Brasil não foi diferente, em especial, frente à corrida desenvolvimentista para o reposicionamento do país na política econômica internacional, somado ao enfrentamento à fome, os escassos recursos para aquisição de insumos agropecuários de origem mineral e a abertura de novas fronteiras agrícolas. Foi neste campo fértil que Johanna aproveitou as oportunidades do momento histórico do país para estabelecer pontes com cientistas de diversos locais do mundo sobre a relevância do processo de FBN seja em leguminosas, seja em gramíneas.

Em 1974, sob sua liderança, foi criado o "Programa de Fixação Biológica de Nitrogênio" fruto da cooperação Embrapa/CNPq. Este programa teve como princípio organizar um grupo de cooperação que reunisse especialistas no tema sendo que parte deste grupo atuaria como um "comitê consultivo". Certamente a arquitetura dessa rede foi preponderante para que organizações governamentais, entre elas o CNPq e a própria Embrapa, decidissem apoiar financeiramente os estudos a ela direcionados. Este programa foi fundamental para projetar a FBN como um tema portador de futuro, bem como consolidar o grupo de pesquisadores liderados pela Johanna como um importante núcleo de pesquisa na agricultura tropical e subtropical. Desde então, arriscamos afirmar que a quase totalidade de cientistas que enveredaram pelas linhas de pesquisa conduzidas no "Km 47" passaram por atividades de formação no complexo acadêmico de Seropédica, seja na Embrapa, seja na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e o "Curso de Julho" foi uma importante estratégia metodológica para tal.

O primeiro curso de Julho, denominado "Curso Intensivo de Fixação Biológica de Nitrogênio", foi criado em 1976, e passou a fazer parte da grade de atividades do curso de Pós-graduação em Agronomia – Ciência do Solo onde o mesmo passou a ser oferecido sempre nos anos pares e no mês de julho. O "Curso de Julho" foi concebido como método de treinamento de curta duração, de forma intensiva, que possibilitasse reunir especialistas do Brasil e de outros países em um duplo movimento, o de conhecer o que se fazia em Seropédica e, a partir disso, validar academicamente a relevância dos

trabalhos lá desenvolvidos e o movimento de trazer especialistas em temas que ainda eram gargalos para a equipe local, como forma de qualificar e agregar conhecimento ao que se desenvolvia no Km 47. Dessa forma, com certa antecedência, Johanna reunia o grupo liderado por ela para pensar nestes gargalos, definir os critérios de prioridade dos temas a serem trabalhados e os possíveis nomes a serem convidados. Em diversos momentos o curso contou com aporte financeiro de organizações de cooperação científica e tecnológica ou de cooperação para o desenvolvimento, tais como o próprio CNPq e o IICA (Instituto Interamericano de Coperación para la Agricultura). Entre os ganhos conquistados, afirmamos com segurança que esta iniciativa é um exemplo explícito do conhecimento tácito característico de Johanna, sua capacidade de articulação, sua determinação e sensibilidade, sua capacidade de convencimento, o compromisso com o saber científico e sua incansável empolgação com aquilo que a motivava. Não podemos afirmar ao certo quantas pessoas realizaram o "Curso de Julho", mas em média de 15 a 20 estudantes participaram de cada curso bianualmente, estima-se que mais de 300 pessoas de diversos países, com uma concentração maior para países latino americanos, tiveram sua formação marcada por esta iniciativa que envolvia os alunos regularmente matriculados na disciplina de "Microbiologia do Solo" do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da UFRRJ, disciplina esta sob responsabilidade da Dra Johanna.

Em alguns momentos, a captação de recursos para pesquisas com FBN e que de alguma forma apoiaram a realização do curso, contava com a concessão de bolsas, o que permitiu ainda que estes treinamentos fossem também porta de entrada para a fixação de novos profissionais em diversas instituições de ensino superior, ciência e tecnologia do país. Desde a sua primeira edição em 1976 até 2008, ao todo foram realizadas 17 edições do "Curso de Julho", promovidos por Johanna Döbereiner e continuadas por sua equipe após seu falecimento, em 2000. Nas quase três décadas que se seguiram com esse movimento de treinamentos de curta duração e intercâmbio, formou-se um ambiente propício para a integração entre formuladores de políticas públicas, gestores, profissionais que foram absorvidos pela iniciativa privada para atuar em indústrias de insumos biológicos e o ambiente acadêmico em si.

Somado aos esforços da busca de recursos para viabilizar os cursos, a Academia Brasileira de Ciências, entidade a qual Johanna não apenas integrou, bem como contribuiu como membro da diretoria, foi importante apoiadora para a visibilidade acadêmica dos resultados dos trabalhos executados ao longo das edições dos cursos. Normalmente os inscritos eram divididos por equipes, com tarefas claramente definidas e objetivos traçados para serem alcançados até o final do curso. Somado a isso, os palestrantes e professores também eram convidados a entregar um material escrito que comporia uma coletânea de textos acadêmicos os quais geravam um seminário de encerramento do curso realizado na sede a ABC e a publicação de Anais. O reconhecimento da Academia Brasileira de Ciências ao trabalho de formação liderado por Johanna enfatiza a iniciativa pioneira e de vanguarda das pesquisas que visavam reduzir os impactos ambientais na agricultura e no meio ambiente, preocupação constante de Johanna. Em outubro de 2024, dezesseis anos após a realização da última edição do "Curso de Julho", uma edição histórica foi realizada na Embrapa Agrobiologia como parte das celebrações do centenário da cientista (Foto 1).

Contribuição informal e não quantificável da Dra. Johanna na formação de recursos humanos e na ciência

A atuação da Dra. Johanna Döbereiner no desenvolvimento de profissional de diversas pessoas foi notável, não apenas por meio de orientações formais, como em cursos, orientações de graduação e pós-graduação, mas também por meio de treinamentos informais. Um grande número foi realizado durante a sua trajetória, em geral não se tratavam de ações acadêmicas, mas de aprendizados diretos com a Dr. Johanna, que sempre ofereceu oportunidades para cientistas, técnicos e profissionais, do Brasil e do exterior, para acompanharem suas pesquisas realizadas em campo ou em laboratório. Esse contato direto proporcionava uma experiência prática intensa, fundamental para o aprendizado técnico e metodológico.

Embora não fossem cursos formais, ela frequentemente organizava ou participava de encontros científicos e dias de campo, onde compartilhava técnicas inovadoras de manejo do solo e fixação biológica de nitrogênio. Ainda, a sua disponibilidade para receber pesquisadores de diversas partes do Brasil e do mundo para estágios de curta duração, permitiu a estes um aprendizado prático de metodologias específicas.

Dessa forma, mesmo que não tenha sido possível conferir precisão em valores quantificáveis, a contribuição informal da Dra. Johanna Döbereiner para a formação de cientistas criou um ambiente de aprendizagem intensa, prática e colaborativa, que ultrapassou os limites dos currículos formais. Através do convívio direto com sua pesquisa, inúmeros técnicos, mestres e doutores tiveram a oportunidade de desenvolver habilidades essenciais para a condução de trabalhos científicos de alto impacto e acima de tudo, dar ampla divulgação ao que era desenvolvido pela rede de pesquisadores liderados por ela.

Como forma de eternizar e reconhecer o trabalho de Johanna na formação de diversas pessoas e a sua contribuição para pavimentar os caminhos de mulheres cientistas na Embrapa, em um momento em que as ciências agrárias eram majoritariamente masculinas, em 2024 a Embrapa cria um insígnia para homenagear mulheres cientistas, sendo a primeira delas concedida para uma pesquisadora também da área de insumos biológicos e promoção de crescimento, Christiane Paiva, pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo.

Um legado para a vida de quem conviveu diretamente com ela: Depoimentos que transcendem a difusão de conhecimentos técnicos e científicos

A Dra. Johanna Döbereiner foi uma cientista de destaque que revolucionou a pesquisa agronômica com suas contribuições inovadoras no campo da fixação biológica de nitrogênio. No entanto, seu impacto foi além dos laboratórios e artigos científicos. Com uma visão estratégica e um compromisso inabalável com o desenvolvimento sustentável, Döbereiner desempenhou um papel fundamental na formação de cientistas da área, além obviamente de influenciar políticas públicas e estratégias para a redução do uso de fertilizantes nitrogenados, promovendo práticas mais acessíveis e ecológicas para a produção de alimentos.

Com um legado que ultrapassa a pesquisa acadêmica, Johanna Döbereiner demonstrou que o conhecimento científico deve estar associado à gestão estratégica e à tomada de decisões para a geração de impactos positivos e duradouros. Sua trajetória inspirou e influenciou cientistas de diferentes gerações, que por sua vez, também atuaram e/ou atuam como gestores e formuladores de políticas ao unirem ciência e prática para enfrentar os desafios globais para a produção de alimentos associada à manutenção da sustentabilidade ambiental.

A seguir serão apresentados alguns depoimentos de professores/pesquisadores, que demonstram que a contribuição da Dra Johanna nas suas formações ultrapassou a atividade científica.

ELIANE RIBEIRO

No final do ano de 1978, faltando apenas três meses para terminar o ano, eu fiz um curso com o professor Charles Robert, sobre fungos micorrízicos e gostei muito. Falei com ele que eu gostaria muito de trabalhar nessa linha e me foi recomendado procurar a Dra. Johanna. Quando lá cheguei, ela falou que não trabalhava com fungos micorrízicos. Eu insisti que gostaria de começar a trabalhar aqui com isso, e que via uma grande expectativa de que eles poderiam contribuir na fixação biológica de nitrogênio em espécies arbóreas. Dra. Johanna disse então que era bem interessante o que eu estava falando, mas tinha uma coisa: ela conseguiria uma bolsa de aperfeiçoamento, porém eu tinha que fazer o meu plano de trabalho, em um período de três dias, Me deu algum material para ler, eu fui me concentrar nessa leitura que tinha muita coisa em francês, eu tinha estudado um pouquinho de francês e me uni com a professora Inês Macrini que me ajudou em alguma tradução. Fiz o plano e ela gostou. Com isso comecei a trabalhar com ela e, com o tempo, se deu a abertura do grupo micorrizas, com sucesso, junto com Eduardo Campello, Sérgio Miana e outros colegas. Outra experiência que tive com ela foi quando, em 1985, iniciei o mestrado. Eu já fazia parte do grupo de pesquisadores da Embrapa, quando iniciei o mestrado no PPGA-CS/UFRRJ e eu tive a ideia de já pleitear fazer o doutorado direto, inclusive com o apoio da Dra. Johanna. Ela falou que poderia pleitear sim, mas aqui no Brasil somente duas pessoas conseguiram, ambas da USP. Feita a solicitação, consegui realmente atender todos os critérios e conseguir fazer direto o doutorado. Então, também foi uma coisa que eu agradeço a ela.

FATIMA MARIA DE SOUZA MOREIRA

No meu primeiro emprego como pesquisadora, tive uma chefe que me recomendava só ter filhos quando minha carreira estabilizasse. Como eu queria ter filhos, acabei engravidando, mas tendo pesadelos com ela tirando meu bebê. Minha primeira filha nasceu quando iniciei o mestrado no mesmo instituto onde trabalhava (INPA) e sob orientação da Johanna à distância. Acabei engravidando novamente quando estava escrevendo a dissertação e fiquei com receio que Johanna tivesse a mesma reação da minha chefe. Para minha surpresa quando contei, recebi felicitações efusivas dela me dizendo que a maternidade é maravilhosa.

Ivo BALDANI

Johanna fazia questão de repassar os trabalhos científicos recebidos (separadas) para os jovens pesquisadores e estudantes e destacava os assuntos para cada um. Fazia um esforço enorme para que os seus estudantes participassem dos eventos nacionais e internacionais e, interessante, fazia questão de apresentá-los para os grandes pesquisadores que ela mantinha trabalhos em comum. Ela se empenhava para que os estudantes passassem algum tempo nos melhores laboratórios do exterior para ganhar experiência ou mesmo realizar o mestrado ou doutorado. Da mesma forma, diversos estudantes do exterior (América Latina e Europa) foram treinados por ela e sua equipe como parte de projetos de colaboração internacional. Estava sempre à disposição para ver os experimentos em laboratório e casa de vegetação. Ela sempre estimulava a criatividade dos estudantes sem perder o foco na pesquisa. Não via com bons olhos estudantes que tinham pouco compromisso com as atividades de pesquisa. Em qualquer reunião de pesquisa ela sempre tinha em mãos um caderno para anotar tudo e depois repassar o andamento da pesquisa planejada. Apesar da personalidade forte e rigidez nas cobranças de atividades de pesquisa e compromissos assumidos, tinha sempre um carinho materno e capacidade para compreender e sugerir soluções para problemas pessoais dos orientados e colegas. Um ponto interessante é que ela tinha o "feeling" na escolha dos estudantes que iniciavam as pesquisas sob sua orientação. A maioria dos seus estudantes foram (aposentados) ou são pesquisadores, professores ou mesmo empresários de sucesso na área que envolve o tema da fixação biológica de nitrogênio.

MARIANGELA HUNGRIA

Eu poderia me ater ao brilhantismo de ideias, na redação científica, na luta por recursos financeiros para a condução de projetos e na visão inovadora de sustentabilidade na agricultura da Dra. Johanna. Mas quero ir além, mencionando sua força como personalidade feminina, o que inspirou muitas cientistas, entre as quais me incluo. Eu nunca vi ou ouvi a Dra. Johanna discriminar ou criticar, ou pensar que uma mulher, mãe, ou anúncio de gravidez poderiam ser um obstáculo científico. Essa visão abriu as portas da minha carreira científica. Eu tinha 24 anos, duas filhas de cinco anos, uma com necessidades especiais, não tinha família ou apoio por perto. Mas ela não viu essas limitações em mim, conseguiu ver o meu amor e dedicação à ciência.

SEGUNDO URQUIAGA

A Dra Johanna e eu nos conhecemos num congresso em 1982. Ela me convidou para trabalhar com ela quando eu terminasse meus compromissos. Em junho de 1984 vim à Seropedica como consultor do Instituto Interamericano de Cooperação para Agricultura, órgão da OEA. A Dra Johanna sabia que eu conhecia as técnicas de ^{15}N e me pediu para montar um experimento para quantificar, pela primeira vez, em condições similares a campo, a FBN na cana de açúcar, usando técnicas de ^{15}N . Com o apoio de Robert Boddey, construí um tanque que preenchemos com solo pobre em N disponível e avaliamos 10 genótipos de cana. Ela me deu todo o apoio necessário. Ela acompanhava

tudo. Foi uma brilhante incentivadora. Os resultados foram fantásticos, o que serviu para que ela pedisse ao presidente da Embrapa a minha contratação nesta Unidade da Embrapa. Como os resultados indicaram que a FBN era muito diferente dependendo da variedade, ela diz que deveríamos pesquisar mais essa interação planta-bactéria diazotrófica, para depois do devido entendimento poder estender a FBN para outras culturas como milho e cereais, assunto que ainda precisa ser estudado adequadamente. Ela foi uma grande incentivadora e me dava sempre o maior apoio, como uma mãe. Sinto muito a falta dela

VERA BALDANI

A maior influência da Dra Johanna foi na minha formação pessoal e transcendeu a academia. Não poderia ser diferente. Nos conhecemos sem falar em ciência. Foi amor e cumplicidade à primeira vista. Com ela, aprendi que casamento é um contrato vitalício, educação de filhos e uma metodologia de longa duração, exige qualidade no tempo de dedicação e deve estar em acordo com a sociedade, críticas são bem-vindas quando acompanhadas de sugestões e, principalmente, ter humildade para trocar e compartilhar conhecimentos e acolher pessoas é nosso dever maior.

Considerações finais

Por fim, o legado de Johanna brevemente aqui retratado em números e casos transcende as informações relatadas. O correto ao analisá-las é perceber a dimensão da contribuição de um ser humano comprometido com a humanidade e com a sustentabilidade planetária ao mesmo tempo em que não deixava de se preocupar com os cuidados com a família e seus orientados. A personalidade marcante, o rigor acadêmico e a motivação pelo bom desenvolvimento científico eram percebidas na mesma proporção que o carinho maternal e a capacidade para compreender e sugerir soluções para os desafios pessoais dos orientados e colegas o que tornava a convivência com ela única e singular e que também constituiu como marca identitária da equipe da Embrapa Agrobiologia desde então.



Figura 1. Professores e alunos do “Curso de Julho” realizado em outubro de 2024 na Embrapa agrobiologia

Tabela 1. Primeiros orientados de Iniciação Científica de Johanna Döbereiner até 1974.

Nome	Ano de Graduação na UFRJ*/ Referência da 1ª publicação com Johanna	CV Lattes/mês e ano da última atualização/Número de orientados de mestrado (M) e doutorado (D)	Destaque
Ivan Barbosa Machado Sampaio **	1966/ Sampaio & Döbereiner, 1968	http://lattes.cnpq.br/112439182238729 10 / 2012 7 M / 1 0 D	Professor Emérito da Universidade Federal de Minas Gerais
Egidio Ferrari	1966/ Ferrari & Döbereiner, 1966	Não disponível	
Avílio Antonio Franco	1967/ Franco & Döbereiner, 1967	http://lattes.cnpq.br/9190291942925512 09/2012 21 M / 19 D	Chefe da Agrobiologia/ membro titular da ABC
Roberto Tozani	1967/ Tozani & Döbereiner, 1968	http://lattes.cnpq.br/3003252986949134 06/2012 2M / 2D	Professor da UFRJ
Fábio de Oliveira Pedrosa	1969/ Pedrosa <i>et al.</i> , 1970	http://lattes.cnpq.br/5406483331494130 06/2023 22 M / 22 D	Professor Emérito da UFPR/ membro titular da ABC
Aguinaldo José do Nascimento	1969/ Pedrosa <i>et al.</i> , 1970	http://lattes.cnpq.br/70557855181883 08 / 2018 26 M / 4 D	Professor da UFPR
Walter Coutinho Machado	1967/ Machado & Döbereiner, 1969	Não disponível	
Antonio Carlos Cósper	1970/ Souto <i>et al.</i> , 1970	http://lattes.cnpq.br/8728868099350209 09 / 2024 15 M / 5 D	Universidade Federal do Espírito Santo
Helvecio De-Polli	1971/ De-Polli & Döbereiner, 1973; De-Polli <i>et al.</i> , 1973	http://lattes.cnpq.br/6135156135312536 10 / 2017 20 M / 6 D	Chefe da Embrapa Agrobiologia
Ivanildo Evólio Marriel	1974/ Döbereiner <i>et al.</i> , 1976	http://lattes.cnpq.br/1348392955681743 01 / 2025 36 M / 15 D	Pesquisador da Embrapa Sete-Lagoas
José Roberto Peres	1974/ Nery <i>et al.</i> , 1975	http://lattes.cnpq.br/1825890221904205 05 / 2024	Chefe da Embrapa sede
Miriam Nery	1974/ Nery <i>et al.</i> , 1975	Não foram encontradas orientações	
Maria Cristina Prata Neves	1974/ Neves <i>et al.</i> , 1973; Day <i>et al.</i> 1975	http://lattes.cnpq.br/3106076644053263 10 / 2010 12 M / 6 D	Chefe da Embrapa Agrobiologia

*Com exceção de Maria Cristina Prata Neves que se graduou em Biologia, todos os demais se graduaram em Agronomia. Eles orientaram um total 161 mestrandos e 89 doutorandos. ** atuou como Eng. Agrônomo na Embrapa de 1966-68.

Tabela 2. Quantidade de orientações de mestrado e doutorado por orientados da Profa. Johanna Dobereiner no mestrado (M) e/ou doutorado (D)/Formação de recursos humanos por mestres e doutores orientados diretamente por Johanna Döbereiner

ORIENTADO(A)/Instituição de atuação/ ano de obtenção do título de mestrado (M) e Doutorado (D)	Link CV Lattes	Número de Orientações Concluídas	
		Mestrado	Doutorado
Adalis Bezzera Campello/IPEACS M 1976	Não encontrado	ND	ND
Antonia Garcia Torres Volpon/Centro de Pesquisa e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguêz de Mello/M-79	http://lattes.cnpq.br/2039856953300461	0	0
Margarete Cristina Barcel Ferreira M-85	Não encontrado	ND	ND
Mauro Augusto de Paula/Embrapa/D-92	http://lattes.cnpq.br/0887042422140941	0	0
Newton Pereira Stamford/UFRPE/M-71	http://lattes.cnpq.br/9468744050761278	30	9
Sebastião Manhães Souto/Embrapa/M 76-D 82	http://lattes.cnpq.br/3495085173513224	2	0
Vera Lúcia Divan Baldani/Embrapa/M 80-D- 1996	http://lattes.cnpq.br/7445996639798624	17	15
Fatima Maria Moreira Magalhães (F.M.Souza Moreira)/INPA-UFLA/ABC/M-83	http://lattes.cnpq.br/5206955158181774	72	65
Maria Rita Scotti Muzzi/UFMG/ M-83, D 93	http://lattes.cnpq.br/7448078560265905	33	11
Nadja Maria Horta de Sá/UFMG/M-83	http://lattes.cnpq.br/6251024014330186	6	2
José Ivo Baldani/Embrapa/M-84	http://lattes.cnpq.br/8391182235603982	28	27
Antonio Carlos de Souza Abboud/UFRRJ/M-86	http://lattes.cnpq.br/7139999082801561	23	10
Veronica Massena Reis/Embrapa/M-90, D-94	http://lattes.cnpq.br/9099587982889283	24	22
Eliane de Oliveira/UFAC/M-92	http://lattes.cnpq.br/0845243680964384	3	0
Elcio Liborio Balota/IAPAR/D-94	http://lattes.cnpq.br/4338642774337463	1	1
Fabio Lopes Olivares/UENF/D-97	http://lattes.cnpq.br/3555567955507382	32	22
Fabio Bueno dos Reis Junior/Embrapa/M-98, D-2002	http://lattes.cnpq.br/0338883659293784	4	1
Olmar Baller Weber/Embrapa/D-98	http://lattes.cnpq.br/5636473688930923	13	2
TOTAL		288	187

Referências

- CABRAL, T. L. de O.; SILVA, F. C. da; PACHECO, A. S. V.; MELO, P. A. de . A CAPES E SUAS SETE DÉCADAS: trajetória da Pós-Graduação stricto sensu no Brasil. **Revista Brasileira de Pós-Graduação**, [S. l.], v. 16, n. 36, p. 1-22, 2020. DOI: 10.21713/rbpg.v16i36.1680. Disponível em: <https://rbpg.capes.gov.br/rbpg/article/view/1680>. Acesso em: 1 fev. 2025.
- DAY, J. M. ; NEVES, Maria Cristina Prata ; DOBEREINER, J. . Nitrogenase Activity On The Roots Of Tropical Forage Grasses. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 7, p. 107-112, 1975.
- DE-POLLI, H.; DOBEREINER, J. . Deficiencias de Micronutrientes Em Solo Podzolico Vermelho-Amarelo e Sua Correção Com Pellet de F.T.E. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Agronomia**, Brasília, v. 9, n.10, p. 93-99, 1973.
- DE-POLLI, H.; FRANCO, A. A. ; DOBEREINER, J. . Sobrevivência de Rhizobium em solos de baixada sujeitos a inundaçāo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 8, p. 133-138, 1973.
- DÖBEREINER, J.; MARRIEL, I. E.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 22, p. 1464-1473, 1976.
- FERRARI, E.; DOBEREINER, J. Efeito do revestimento calcáreo das sementes de leguminosas forrageiras plantadas com gramíneas. **Agronomia**, Itaguaí, V.24, p 5-13, 1966
- FRANCO, A. A.; DÖBEREINER, J. Especificidade hospedeira na simbiose com *Rhizobium*-feijão e influência de diferentes nutrientes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 2, p. 467-474, 1967.
- FRANCO, A. A. ; MARRIEL, I.E. . Atividade da Nitrogenase, nitrato redutase e incorporação de N mineral durante o ciclo da soja (*Glycine max*). **Revista Brasileira de Ciência do Solo** (Impresso), v. 10, p. 1, 1976.
- JOHANNA DÖBEREINER: **50 anos dedicados à pesquisa em microbiologia do solo = 50 years dedicated to research on soil microbiology**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 1 CD Rom
- MACHADO, W. C.; DÖBEREINER, J. Estudos complementares sôbre a fisiologia de *Azotobacter paspali* e sua dependência da planta (*Paspalum notatum*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 4, p. 53-58, 1969.
- NERY, M.; PERES, J. R. R.; DÖBEREINER, J. Efeito de micronutrientes na forma de FTE na produção de leguminosas forrageiras e fixação de nitrogênio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 15., 1975, Campinas. **Resumos...** Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1975. p. 27.
- NEVES, M. C. P.; DAY, J. M.; CARNEIRO, A. M.; DÖBEREINER, J. Nitrogenase activity in the rhizosphere of tropical forage grasses. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE OS IMPACTOS GLOBAIS DA MICROBIOLOGIA APLICADA, 4., 1973, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1973. p. 1148.
- OLIVEIRA, DÂMIANY DE PÁDUA ; CASTRO, P. P. ; MACEDO, D. C. C. ; CAMARGO, F. A. O. ; Moreira, Fatima Maria de Sousa . A participação feminina nos cursos de agronomia no Brasil. **Boletim Informativo** (Sociedade Brasileira de Ciência do Solo), v. 43, p. 24-27, 2017.
- PEDROSA, F. de O.; NASCIMENTO, A. J. do; ALVAHYDO, R.; DÖBEREINER, J. Teores de leg-hemoglobina e de molibdênio nos nódulos de soja (*Glycine max*) inoculada com estirpes de *Rhizobium japonicum* de eficiência normal e excepcional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 5, p. 373-379, 1970.
- SAMPAIO, I. B. M.; DÖBEREINER, J. Efeito do sombreamento e do calcário na taxa relativa de fixação de nitrogênio e na eficiência dos nodulos da soja (*Glycine max*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 3, p. 255-262, 1968.

SOUTO, S. M.; CÓSER, A. C.; DÖBEREINER, J. Especificidade de uma variedade nativa de "alfafa-do-Nordeste" (*Stylosanthes gracilis* H.B.K.) na simbiose com *Rhizobium* sp. In: REUNIÃO LATINO AMERICANA DE RHIZOBIUM, 5., 1970, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisa Agropecuária do Centro-Sul, 1970. p. 78-91.

STAMFORD, Newton P. 1971. **Nódulos pretos no estudo da inoculação cruzada e da competição entre estírpes de *Rhizobium* em leguminosas forrageiras tropicais.** Tese de Mestrado em Agronomia. UFRRJ

TAVARES, M.C.D. 1976. **Efeito dos herbicidas no equilíbrio biológico do solo de Cerrado.** Tese de Doutorado em Agronomia. UFRRJ.

TOZANI, R.; DOBEREINNER, J. . Interação do cálcio, magnésio e molibidênio, na nodulação e fixação de nitrogênio em soja (*Glycine Max.*). **SEIVA**, v. 28, n.66, p. 5-16, 1968.

**DOIS RELATOS
PESSOAIS SOBRE
*DRA. JOHANNA
DÖBEREINER***

O legado de Johanna Döbereiner: Impactos na pesquisa em bioquímica e biologia molecular da fixação de nitrogênio no Brasil

Fábio de Oliveira Pedrosa

*Professor Emérito da Universidade Federal do Paraná, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular,
Universidade Federal do Paraná - Curitiba, Paraná
Membro Titular da Academia Brasileira de Ciências*

Como conheci a Dra. Johanna

Conheci a Dra. Johanna em dezembro de 1966, apresentado pelo Professor Roberto Alvahydo. Eu estava no final do primeiro ano do curso de Agronomia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Na ocasião solicitei ao Prof. Alvahydo uma bolsa de monitor na disciplina de Química e ele disse que me concederia a bolsa com a condição de que eu fosse trabalhar com a Dra. Johanna Döbereiner, que estava interessada em compreender a base bioquímica da alta eficiência das estirpes de rizóbios de soja que ela, Avílio Antônio Franco e Iván Guzmán haviam descoberto. Seu objetivo era determinar os níveis de leghemoglobina, molibdênio e a composição de aminoácidos dos nódulos de estirpes "normais" e "excepcionais" do, naquela época, *Rhizobium japonicum*, hoje *Bradyrhizobium spp.*

Naquela época a Dra. Johanna trabalhava no IPEACS – Instituto de Pesquisa Agropecuária do Centro Sul do Brasil localizado do outro lado da Estrada, em frente ao prédio principal da Universidade. A Embrapa só foi criada pelo Decreto nº 73.626 de 26 de abril de 1973, no governo do Presidente Emílio Garrastazu Médici sendo Ministro da Agricultura Luiz Fernando Cirne Lima e majoritariamente implementada por Alysson Paulinelli, um visionário Ministro da Agricultura.



Primeiro encontro

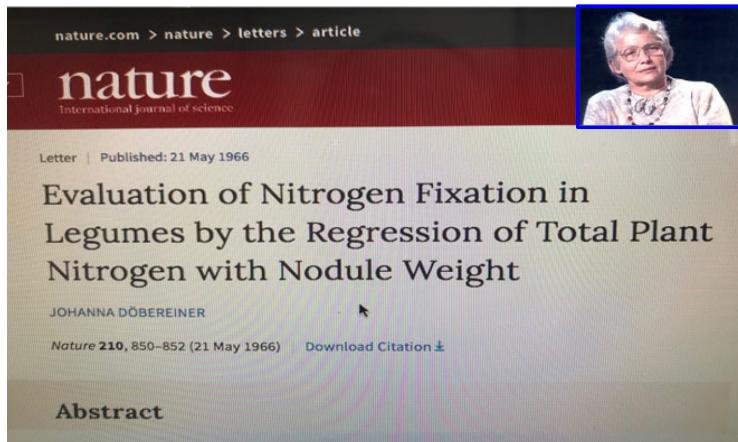
Em nosso primeiro encontro ela falou sobre a fixação de nitrogênio, o projeto que tinha em mente e me deu um livro verde com a obrigação de ler os capítulos sobre bioquímica da fixação de nitrogênio e falar sobre este tema no próximo encontro. Saí animado deste encontro e sonhando com o futuro nesta área.

Lembro que neste ano de 1966, a Dra. Johanna havia publicado um artigo na *Nature* onde descreveu uma forte correlação entre o nitrogênio total da planta e o peso seco dos nódulos (DÖBEREINER, J. 1966. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. *Nature* 210:850-852).

Esta publicação foi um marco em sua carreira científica e iniciou o caminho para consolidá-la como a grande cientista. Foi este procedimento que permitiu a ela, Avílio Antônio Franco e Ivan Guzmán discriminar entre estirpes "normais" e "excepcionais" de *Rhizobium japonicum* (atualmente gênero *Bradyrhizobium spp.*). As estirpes excepcionais fixavam duas vezes mais nitrogênio por peso seco de nódulo que as estirpes normais.

Sem dúvida, a redescoberta de *Spirillum lipoferum* em 1974, hoje *Azospirillum brasiliense* e *A. lipoferum*, e de outras bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre, associativas e endofíticas, e todo o trabalho decorrente destas descobertas, consolidou-a como proeminente cientista mundial.

Não podemos esquecer seu papel fundamental em convencer os geneticistas melhoristas da soja a desenvolver variedades/cultivares responsivas à inoculação de *Bradyrhizobium spp.*, portanto independentes do fertilizante químico nitrogenado, e também seu papel decisivo no estabelecimento do programa Proálcool baseado em cana-de-açúcar no Brasil.



Iniciação Científica

Trabalhei sob sua orientação de janeiro de 1967 a dezembro de 1969, como aluno de iniciação científica, bolsista do então Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

A Dra. Johanna Döbereiner que estava interessada em determinar a base bioquímica que caracterizava as cepas "normais" e "excepcionais" do então *Rhizobium japonicum*, que ela, Avílio e Ivan haviam descoberto.

O projeto que ela tinha em mente era o de determinar os níveis de leghemoglobina, molibdênio e a composição de aminoácidos dos nódulos dessas estirpes. A leghemoglobina é a responsável por transportar oxigênio para o bacteroide de rizóbio no nódulo de leguminosas sob baixas tensões de oxigênio, permitindo a síntese e atividade da nitrogenase, enquanto o molibdênio é componente principal do núcleo FeMoCo, parte do centro ativo da nitrogenase. Com meu colega Aguinaldo José do Nascimento determinamos os teores de molibdênio e de leghemoglobina de nódulos de soja inoculados com as estirpes R54a ("excepcional") e SM1b ("normal"). Os resultados mostraram que os nódulos da estirpe "excepcional" fixavam duas vezes mais nitrogênio por grama de nódulo seco e seus nódulos continham duas vezes mais molibdênio e 27% mais leghemoglobina que a estirpe "normal".

(PEDROSA, F. O.; NASCIMENTO, A. J.; DOBEREINER, J. Teores de leghemoglobina e de molibdênio nos nódulos de soja (*Glycine max*) inoculados com estirpes de *Rhizobium japonicum* de eficiência normal e excepcional. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasil, v. 5, pág. 373-379, 1970).

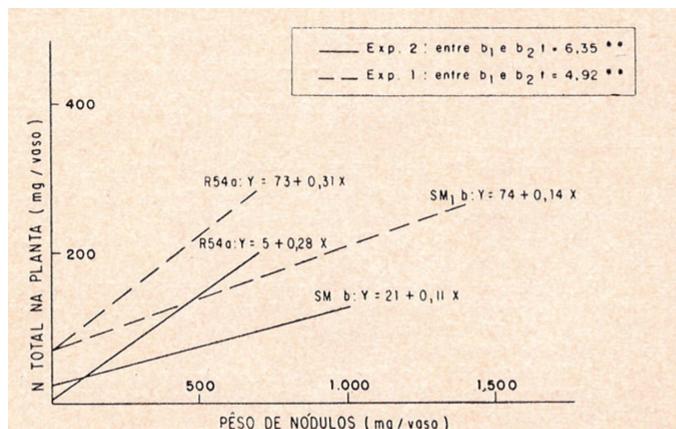


FIG. 1. Regressões do N total sobre o peso seco de nódulos.

Discriminação de estirpes de *Rhizobium japonicum* com L-asparagina

A Dra. Johanna queria desenvolver um método *in vitro* para distinguir estas estirpes e veio com a ideia de testar inibição de crescimento com asparagina. Fiz uma série de experimentos com concentrações crescentes de L-asparagina. Os resultados mostraram que as estirpes excepcionais eram mais suscetíveis a 400 mg/L do que as estirpes normais. (PEDROSA, F. O. ; FRANCO, A. A.; DÖBEREINER, J.. Seleção em meio de cultura com asparagina de estirpes de *Rhizobium japonicum* de eficiência excepcional. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Rio de Janeiro, v. 7, p. 153-163, 1972.

Conteúdo de aminoácidos de nódulos de soja

A análise cromatográfica bidimensional em papel do conteúdo de aminoácidos dos nódulos mostrou que a concentração de ácido gama-aminobutírico era maior na estirpe normal. Este trabalho também permitiu mostrar que o nível de asparagina aumentava após o início da fixação em ambas as classes de estirpes, mas nunca publicamos esses resultados por serem semiquantitativos.

Mestrado em Bioquímica

No final de 1969, quando eu estava terminando o curso de Agronomia, a Dra. Johanna me disse: você deveria continuar na carreira científica, fazer um mestrado em Bioquímica e voltar para o nosso laboratório. Por sugestão do professor Jorge de Almeida Guimarães, me inscrevi e fui aceito para o mestrado em Bioquímica no antigo Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba, com bolsa do CNPq conseguida pela Dra. Johanna.

Comecei o mestrado em março de 1970 com o projeto de pesquisa visando determinar a estrutura dos polissacarídeos extracelulares produzidos por *Derxia gummosa*. A Dra. Johanna concordou com o tema e o primeiro passo foi desenvolver um meio de crescimento definido e que permitisse alta produção de polissacarídeo. Depois de várias tentativas, cheguei a uma formulação que enviei à Dra. Johanna. Ela estava em ano sabático na Estação Experimental de Rothamsted, Inglaterra. Algumas semanas depois ela me escreveu dizendo que o meio era muito bom para o cultivo de *Beijerinckia*, sem a necessidade de fazer placas de sílica gel. Vale lembrar que ela e Alaides Ruschel haviam descrito *Beijerinckia fluminensis* associada a cana-de-açúcar em 1958.

Metabolismo de L-arabinose em *Rhizobium japonicum*

Como não me entusiasmei com química de carboidratos e meu maior interesse era Enzimologia, pois isso seria mais pertinente em trabalhos futuros sobre a Bioquímica da fixação de nitrogênio. Assim, passei a ser orientado pela professora Glaci Zancan

no metabolismo do *Rhizobium japonicum* R54a, estirpe conhecida por ser excepcional na fixação de nitrogênio e que havia trabalhado no laboratório da Dra. Johanna. Após uma longa busca manual no Chemical Abstracts e Biological Abstracts, e sabendo que pentoses e em especial a L-arabinose, eram a fonte de carbono e energia preferencial para rizóbios, iniciei um novo projeto de mestrado visando determinar sua via metabólica, que era desconhecida na época. Determinei a atividade das enzimas e caracterizei os produtos intermediários e final desta via da estirpe R54a (PEDROSA, F.O. & ZANCAN, G.T., 1974. L-Arabinose Metabolism in *Rhizobium japonicum*. J Bacteriol. 119(1):336-8).

Mestrado em Bioquímica 1970 a 1973

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, July 1974, p. 336-338
Copyright © 1974 American Society for Microbiology

Vol. 119, No. 1
Printed in U.S.A.

L-Arabinose Metabolism in *Rhizobium japonicum*

FÁBIO O. PEDROSA AND GLACI T. ZANCAN

Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná and Divisão de Bioquímica do Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Estado do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

Received for publication 25 April 1974

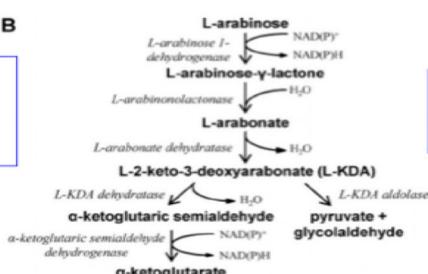
L-Arabinose was metabolized through an oxidative pathway by extracts of a strain of *Rhizobium japonicum*. The findings showed that L-arabinose is converted into 2-keto-3-deoxy-L-arabonate, which is cleaved into glycoaldehyde and pyruvate.



Glaci T. Zancan

B
Herbaspirillum seropedicae
Mathias, A. L. et al.
1989

Rhizobium japonicum R5a
now *Bradyrhizobium elkanii*



Mestrado em Bioquímica 1970 a 1973

Esta era uma via desconhecida em rizóbios e tinha como produtos finais piruvato e glicolaldeído. Em 22 agosto de 1969, Dahms e Anderson, haviam publicado a última enzima desta via, a L-2-ceto-3-desoxi-L-arabonato aldolase (L-KDA-aldolase) em uma *Pseudomonas*, e que a distinguia da via conhecida. Na época a pesquisa bibliográfica, como sabemos, era bem mais difícil e trabalhosa, sem as facilidades atuais da Internet e do Google. Anos depois, meu aluno Álvaro Matias descreveu a via que leva a alfa-ceto-glutarato em *Herbaspirillum seropedicae*.

A importância científica da Dra. Johanna Döbereiner

A importância científica da Dra. Johanna Döbereiner já era muito grande e reconhecida internacionalmente pela relevância de seu trabalho na área de fixação de nitrogênio e sua influência na agricultura brasileira, que ela atraiu para o Seminário Internacional sobre Metodologia e Planejamento de Pesquisa com Leguminosas Tropicais, (25 a 31 de julho de 1970 no IPEACS), importantes pesquisadores da área como Fraser Bergersen e J. M. Vincent da Austrália, Peter Graham do CIAT, Colômbia, Phillip Nutman de Rothamstead, Inglaterra, que exibiu o primeiro filme da infecção de um pelo absorvente de raiz de trevo por rhizobia usando cinematografia time-lapse; um filme impressionante para a época, Carlos Batthyany, Gloria Martinez de Dretz e Carlos

Labandera do Uruguai, Enrique Schiel da Argentina, David Hubbel da Universidade da Flórida, Gainesville, EUA e muitos outros pesquisadores brasileiros e estrangeiros.

Doutorado

Certamente, eu queria continuar minha carreira na área de fixação biológica de nitrogênio associada à Dra. Johanna. Visitei a Dra. Johanna várias vezes durante meu mestrado e, em 1972, já no final do meu mestrado, ela contactou o Professor John Postgate para que eu fizesse o doutoramento com ele na Universidade de Sussex. Houve uma troca de cartas e finalmente fui aceito para começar em setembro de 1973. A Dra. Johanna havia, também, conseguido uma bolsa do CNPq para mim. Bem, eu me preparei. Concluí o mestrado em Bioquímica em março de 1973, passei no concurso para Professor Assistente do Departamento de Bioquímica da UFPR, e para minha surpresa, em julho, o CNPq cancelou a bolsa de doutorado com o argumento de que, como eu tinha mestrado em Metabolismo de Carboidratos, seria uma perda de tempo e de conhecimento se eu mudasse de assunto para fixação biológica de nitrogênio. Eu tinha 25 anos.

Por sorte, a Dra. Déa Amaral Ferreira do Amaral, do nosso Departamento, havia recebido um convite do Dr. Bernard Horecker para fazer um pós-doutorado no recentemente criado Roche Institute of Molecular Biology, em Nutley, New Jersey, EUA, e ela, sabendo da minha situação, me ofereceu para ir em seu lugar e fazer o doutorado. Ela escreveu me apresentando ao Professor Bernard Leonard Horecker, que me aceitou como doutorando na agora Weill Cornell Graduate School of Medical Sciences, Cornell University, Nova York, onde comecei em março de 1974 e terminei em abril de 1977, trabalhando em Enzimologia da enzima frutose 1-6 bisfosfatase de fígado de rato.

Mesmo que as circunstâncias tenham me levado a trabalhar com animais, meu interesse por fixação biológica de nitrogênio e voltar a trabalhar com a Dra. Johanna sempre esteve presente em minha vida.

Visita da Dra. Johanna a Nova York – *Spirillum lipoferum*

Em 1975, recebi um telefonema da Dra. Johanna, que estava em Nova York, me convidando para um almoço com steak. Foi com alegria que a encontrei. Ela, como sempre muito entusiasmada, me contou sobre seus planos e o impacto que a redescoberta de *Spirillum lipoferum* e de seu artigo com Joachim von Bülow no PNAS (VON BÜLOW, J. F. W.; DÖBEREINER, J. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes no Brasil. Proceedings of the National Academy of Sciences, Washington, v.72, p. 2389-2393, 1975), teve na comunidade científica internacional e no Governo Brasileiro.

Neste encontro ela me deu diversas estirpes do então *Spirillum lipoferum*, entre elas Sp7, Br13, RG20a e Sp245. A estirpe Sp7, mais tarde renomeada como *Azospirillum brasiliense*, tem sido meu carro-chefe e minha paixão. Autorizado pelo Dr. Horecker, consegui cultivar essas estirpes em meio Fb semissólido pela primeira vez em 1975. O *Azospirillum brasiliense* ficou preso na minha alma e em mim.

A Dra. Johanna e eu trocamos cartas e ficou claro que na minha volta ao Brasil eu trabalharia com fixação de nitrogênio em *Spirillum lipoferum*.

De férias no Brasil em 1975 visitei o laboratório da Dra. Johanna, logo após o isolamento do então *Spirillum lipoferum*, fiquei surpreso quando Carlinhos, Carlos Alberto Cavalcante, técnico do laboratório da Dra. Johanna, me chamou e disse: "Vem cá, vou te mostrar seu meio de cultura". Ele me mostrou um cartão com a formulação de um meio de crescimento bacteriano intitulado Fb, o meio básico que eu havia enviado à Dra. Johanna para o cultivo de *Dexia*. E eu perguntei "Fb"? e ele disse que a Dra. Johanna havia nomeado este meio com o meu nome.

Retorno ao Brasil

Concluído o Doutorado, voltei ao Brasil em maio de 1977 e imediatamente entrei em contato com a Dra. Johanna. Assim que cheguei ao Brasil, a Dra. Johanna combinou com o Chefe do meu Departamento para que eu passasse uma semana por mês na Embrapa para ajudar no estudo de catalase e hidrogenase em *Spirillum lipoferum* (*Azospirillum brasiliense*) estirpe Sp7 e Br 13, com Marília Penteado Stephan.

O trabalho com Marília sobre a fisiologia da interação da hidrogenase com a atividade da nitrogenase em *Azospirillum brasiliense* foi apresentado no "Workshop Internacional sobre Fixação Associativa de Nitrogênio" que ocorreu no CENA, Piracicaba, Brasil, de 2 a 6 de julho de 1979. Com a Dra. Johanna e Marília, publicamos três artigos, resultados de minhas visitas à Embrapa em 1978 e 1979. 1. PEDROSA, F. O.; STEPHAN, M. P.; DOBEREINER, J. Interaction of nitrogenase and uptake hydrogenase activities in *Azospirillum brasiliense*. In: P B Vose; A P Ruschel. (Org.). In *Associative Nitrogen Fixation*. Boca Raton - Estados Unidos: CRC Press Inc., 1981, v. 1, p. 15-25. 2. STEPHAN, M. S. P.; PEDROSA, F. O.; DOBEREINER, J. Physiological studies with *Azospirillum spp*. In: Vose, P.B; Ruschel, A.P. (Org.). In *Associative Nitrogen Fixation*. Boca Raton: CRC Press Inc, 1981, v. 1, p. 07. 3. PEDROSA, F. O.; STEPHAN, M. P.; DÖBEREINER, J ;YATES, M G . Hydrogen-uptake hidrogenase activity in nitrogen-fixing *Azospirillum brasiliense*. *Journal of General and Applied Microbiology*, Inglaterra, v. 128, p. 161-166, 1982.

Após a publicação do artigo von Bullow & Doberéinrer no PNAS em 1975 e a notoriedade de seu trabalho, o então Ministro do Planejamento do Brasil, João Paulo Reis Velloso, disse-lhe, em suas próprias palavras: "peça o que você quiser em recursos para pesquisa e te daremos". Foi, então, criado o Programa de Fixação Biológica de Nitrogênio (PFBN) e, por orientação da Dra. Johanna, apresentei um projeto de pesquisa para esse Programa. A ideia era estudar o papel de enzimas possivelmente envolvidas na proteção da nitrogenase pelo oxigênio, tema do momento, que Dalton e Postgate (1969) haviam trabalhado em *Azotobacter chroococcum*. Neste projeto estudamos o efeito do oxigênio na fixação e desnitrificação de nitrogênio em *Spirillum lipoferum* e sua associação com gramíneas (1978). Este projeto me permitiu montar um laboratório completo para estudo da fisiologia de bactérias fixadoras de nitrogênio, os chamados diazotrofos, com dois cromatógrafos, oxígrafo, pHmetro e todos os outros equipamentos necessários para começar a trabalhar com *Spirillum*. O projeto durou até 1982. Este projeto foi a base que permitiu que nosso grupo evoluísse na área de fixação biológica de nitrogênio, como descreverei mais adiante. Sem ele e sem o PFBN não teríamos saído do chão.

Simpósio sobre “Limitações e Potenciais da Fixação Simbiótica de Nitrogênio nos Trópicos”

Com sua proeminência internacional, a Dra. Johanna organizou diversos eventos que tiveram a participação dos principais cientistas da área. Em 1977 a Dra. Johanna organizou o importante Simpósio Internacional “Limitações e Potenciais da Fixação Simbiótica de Nitrogênio nos Trópicos”. Este simpósio atraiu importantes pesquisadores internacionais como Winston Brill, David Hubbel, Fraser Bergersen, Harold Evans, Robert Burris, Alan Gibson, Noel Krieg que reestruturou a Taxonomia do *Spirillum lipoferum*, com a criação do gênero *Azospirillum* e as espécies *A. brasiliense* e *A. lipoferum*, Robert Burris, entre muitos outros de diversos países. Este evento consolidou a importância internacional da Dra. Johanna pela comunidade científica dos fixadores de nitrogênio.

Encontro com Geoffrey Yates

Em 1978, a Dra. Johanna me convidou para participar do Curso de Fixação Biológica de Nitrogênio, onde ela me apresentou ao Dr. Marshall Geoffrey Yates, da Unidade de Fixação de Nitrogênio da Universidade de Sussex, Brighton, Inglaterra. Este curso atraia pesquisadores de países latino americanos e da Europa e era ministrado bienalmente. Pena que tenha sido descontinuado. Havia sempre a presença de pesquisadores internacionais ministrando aulas na fronteira da ciência.

A amizade e colaboração com Geoffrey Yates foi duradoura. Uma geração de bioquímicos e biologistas moleculares da fixação de nitrogênio no Brasil foi formada graças ao nosso trabalho colaborativo.

Descoberta da autotrofia em *Derxia gummosa* e Pós-Doutorado em Sussex

A oportunidade de trabalhar com Geoffrey ocorreu quando participei do Simpósio Internacional sobre Fixação de Nitrogênio da Sociedade Fitoquímica da Europa, organizado por ele de 15 a 17 de setembro de 1979 e que ocorreu na Universidade de Sussex. A Dra. Johanna também participou e trouxe diversas estirpes de *Azospirillum spp.* e *Derxia gummosa* para determinar se elas cresceriam autotroficamente em hidrogênio (H_2) e dióxido de carbono (CO_2). *Derxia* foi a única espécie capaz de crescer nestas condições. Em 45 dias, trabalhando longas horas, obtivemos todos resultados para uma publicação, entre estes encontramos uma ribulose 1-5 bifosfato carboxilase ativa, enzima chave na fixação de carbono na fotossíntese. Este trabalho foi publicado (PEDROSA, F. O.; DÖBEREINER, J.; YATES, M.G. Hydrogen-dependent growth and autotrophy carbon dioxide fixation in *Derxia*. Journal of General and Applied Microbiology, v. 119, p. 547-551, 1980).

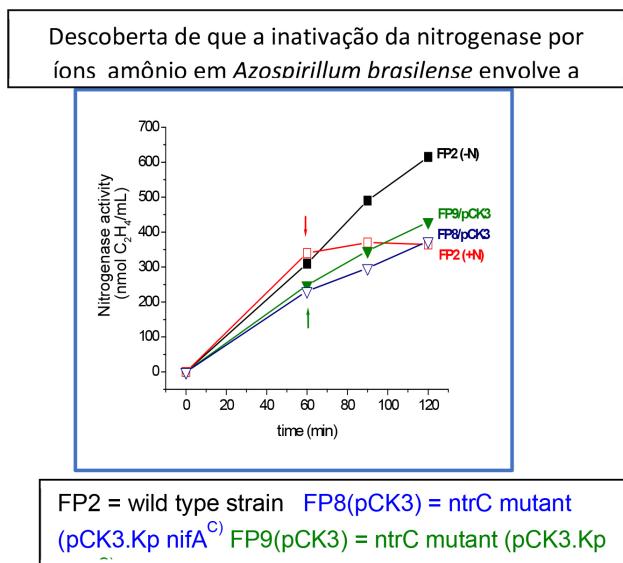
No final de 1981, por sugestão de um diretor do CNPq, que visitava o Departamento de Bioquímica, apliquei e consegui uma bolsa de Pós-doutorado para trabalhar na Unidade de Fixação de Nitrogênio sob a supervisão de Geoffrey Yates, de janeiro de 1982 a dezembro de 1983.

No primeiro semestre de 1982, determinei o efeito de íons níquel e agentes quelantes na atividade da hidrogenase de captação (up-take hydrogenase) em *Azospirillum brasiliense*, *A. lipoferum* e *Dexia gummosa*, que foi publicado (FEMS Microbiology Letters, Holanda, v. 17, p. 101-106, 1983).

Estudos da Regulação da fixação de nitrogênio em *Azospirillum brasiliense* Sp7

Em julho de 1982, sugeri ao Geoffrey que deveríamos iniciar um trabalho sobre a genética da regulação da fixação de nitrogênio em *Azospirillum brasiliense*, Sp7. Inicialmente isolei, em duas etapas, um duplo mutante espontâneo resistente à estreptomicina e ácido nalidíxico – estirpe FP2 (Sp7, Nal^R, Sm^R). Esta estirpe foi mutagenizada com *N*-Metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina e de 770 potenciais mutantes incapazes de fixar nitrogênio, isolei e caracterizei 7 mutantes efetivamente deficientes em fixar nitrogênio, denominados FP3 a FP10. Através de complementação genética, as estirpes FP8 e FP9 como mutantes no gene *ntrC*, que codifica a proteína ativadora de transcrição do metabolismo geral do nitrogênio e a estirpe FP10, mutante no gene *nifA*, que codifica a proteína ativadora de transcrição específica dos genes da fixação de nitrogênio, genes *nif*. O estudo destes mutantes permitiu que propusemos o primeiro modelo de regulação da fixação de nitrogênio em *Azospirillum brasiliense* e gerou duas publicações, além de ter um impacto muito positivo na comunidade.

Durante estes estudos descobrimos o papel fundamental da proteína ativadora de transcrição do metabolismo geral do nitrogênio, a NtrC, no mecanismo de desligamento (*switch-off*) e religamento (*switch-on*) da atividade da nitrogenase induzida por íons amônio.



Além disto, descobrimos que a proteína ativadora de transcrição, NifA, de *Azospirillum brasiliense* é termo-resistente a 37°C, característica fundamental para uma eficiente fixação de nitrogênio nos Trópicos.

A estirpe fixadora de nitrogênio FP2 e os mutantes FP8, FP9 e FP10 foram fundamentais para o desenvolvimento futuro da nossa pesquisa em Curitiba.

A experiência adquirida na Unidade de Fixação de Nitrogênio foi fundamental para as pesquisas que realizaríamos em Biologia Molecular da Fixação de Nitrogênio no Paraná e no Brasil.

Azospirillum brasiliense na Agricultura brasileira

Hoje, as estirpes de *Azospirillum brasiliense* FP2 (também conhecida por Ab-V5) e FP10 (também conhecida por Ab-V6) são amplamente utilizadas e estão tendo um grande e importante impacto na agricultura brasileira como inoculante para milho e como co-inoculante para soja desde 2009/2010. Os dados da Associação Nacional de Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII) mostram que seus associados e não associados comercializaram cerca de 40 milhões de doses de inoculantes contendo ambas estirpes Ab-V5 e Ab-V6.

Em 1987, com meu mestrando Hidevaldo Bueno Machado, desenvolvemos novas estirpes a partir de FP2 (Sp7, Nal^R, Sm^R) capazes de excretar íons NH₄⁺, que foram denominadas HM210, HM14, HM26 e HM053. As cepas HM210 e HM053 foram recentemente aprovadas pelo MAPA como inoculantes para a Agricultura.

Outras estirpes excretoras de íons NH₄⁺ foram recentemente construídas pelo Professor Emanuel M. de Souza e seu doutorando Thiago Moia Apolonio, a série TMA, e estão em teste de campo para determinar suas eficiências agronômicas. A aplicação na Agricultura, com grande sucesso, das estirpes que foram selecionadas ou construídas em meu laboratório me faz sentir realizado na carreira científica.

Marshall Geoffrey Yates

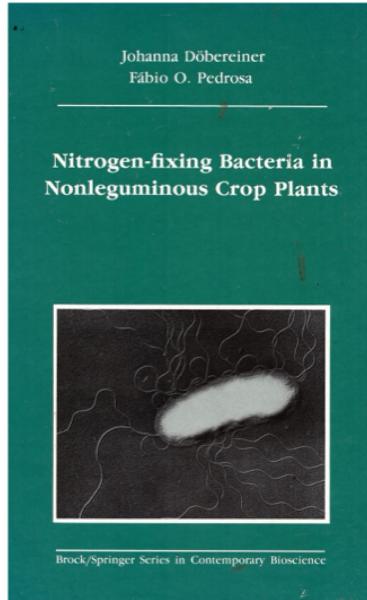
Não posso deixar agradecer ao Geoffrey Yates que foi de grande importância para mim e nosso grupo de pesquisa, abrindo as portas da Unidade de Fixação de Nitrogênio para mim e meus alunos. Geoffrey após sua aposentadoria foi bolsista do CNPq e ficou 4 anos e meio em Curitiba colaborando com nossas pesquisas e nos ajudou a consolidar o Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio da UFPR. Ele desempenhou importante função na formação de uma geração de bioquímicos e biólogos moleculares na área de FBN e participou ativamente na organização do 12º Congresso Internacional sobre Fixação de Nitrogênio, que presidi e ocorreu em Foz do Iguaçu em setembro de 1999.

Co-autoria de livro com a Dra. Johanna

Em 1986, fui honrado com um convite da Dra. Johanna para ser coautor de um livro com ela (DOBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. Nitrogen-fixing bacteria in Nonleguminous Crop Plants. 1.ed. New York: Sci.Tech. Editores/Springer-Verlag, 1987. 155p). Esta publicação foi muito importante para minha carreira científica e reconhecimento. Mais uma vez agradeço à Dra. Johanna por esta oportunidade.

In 1986, I was honored with an invitation from Dra. Johanna to co-author a book. The book was published in 1987 by Springer.

DOBEREINER, Johanna ; PEDROSA, F. O. . Nitrogen-fixing bacteria in Nonleguminous Crop Plants.. 1. ed. New York: Sci.Tech.Publisher/Springer-Verlag, 1987. 155p. :



Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Universidade Federal do Paraná

O impulso inicial dado à minha carreira pela Dra. Johanna e seu Programa Nacional sobre Fixação Biológica de Nitrogênio foi fundamental para o que conseguimos ao longo destes 58/59 anos de mergulho e investimento na área. Durante esta trajetória orientei 23 doutores e 22 mestres. Criei o Núcleo de Fixação de Nitrogênio (NFN) da UFPR em 1984 com os professores Liu Un Rigo e Shigehiro Funayama, que também orientaram inúmeros mestres e doutores na área.

O NFN tem sido protagonista em grandes projetos em rede sobre FBN. Atuei como Coordenador Geral/Principal de importantes iniciativas estaduais e nacionais, incluindo:

Finep/BID (1991-1996), O Programa de Núcleo de Excelência – Pronex/MCT/FINEP/CNPq (1996-2004), o Programa de Apoio do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT/FINEP), Programa Genoma do Paraná – GENOPAR (2001-2005), Rede Proteoma do Paraná – Proteopar (2004-2006), Instituto do Milênio – Melhoramento da Produtividade Agrícola Brasileira via Fixação Biológica de Nitrogênio e Transgenia (2005-2008) Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fixação Biológica de Nitrogênio (2008-2015).

Esses projetos contaram com a participação de diversos grupos de pesquisa de instituições renomadas, incluindo: EMBRAPA (Agrobiologia, Cerrados, Soja, Arroz e Feijão), Universidade Federal do Paraná, Universidade Federal de Santa Catarina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Universidade do Oeste do Paraná, Universidade Estadual de Goiás, Instituto Agronômico do Paraná, Universidade Estadual de Londrina, Universidade Estadual de Maringá, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Universidade Paranaense, Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Participaram destes projetos mais de 250 pesquisadores entre alunos de Iniciação Científica, Mestrados, Doutorados, Pós-doutores e Pesquisadores Principais.

Orientei 23 doutores e 22 mestres na área de Fixação Biológica de Nitrogênio tendo como tema principal o *Azospirillum brasiliense*, estirpe Sp7, isolada pela Dra. Johanna.

O último projeto que coordenei, INCT da Fixação Biológica de Nitrogênio, teve a participação de 67 Pesquisadores, 54 Doutorandos, 106 mestrando, 60 acadêmicos de Iniciação Científica, 17 Pós-doutores e 10 Técnicos, num total de 237 participantes. Os participantes publicaram 57 artigos em periódicos científicos nacionais e 257 em internacionais e graduamos 54 Doutores, 106 Mestres e 17 Pós-doutores.



Durante o desenvolvimento do programa GENOPAR, cujo objetivo foi sequenciar o genoma da bactéria fixadora de nitrogênio *Herbaspirillum seropedicae* — descoberta pela Dra. Johanna —, decidi que era necessário desenvolver a Bioinformática na UFPR, em vez de contratar serviços externos ou enviar os dados para análise em outro laboratório. Essa decisão custou um atraso importante para o projeto, mas também resultou no estabelecimento do grupo que, posteriormente, criou o Programa de Mestrado em Bioinformática da UFPR, em 2009, o terceiro do Brasil na época. Vários softwares foram desenvolvidos em associação com o grupo que ajudamos a estabelecer, entre eles: MSAnalyser, GAAT, SILA, RGF, SweeP, RAFTS3, RAFTS3g, PROCLAT e FGAP.

O Núcleo hoje

O Núcleo de Fixação de Nitrogênio hoje é coordenado e brilhantemente liderado pelo Professor Titular Emanuel Maltempi de Souza e conta com os Pesquisadores Principais Leda Satie Chubatsu, Roseli Wassem, Rose Adele Monteiro, Edileusa Cristina Marques Gerhard, Leonardo Magalhães Cruz, Marcelo Müller dos Santos, Luciano Hernandes Huergo, Ana Claudia Bonatto, Valter Antônio de Baura e seus mestrando e doutorandos.

O apoio valioso da Dra. Johanna em minha carreira teve um efeito exponencial na formação de recursos humanos e no desenvolvimento científico e tecnológico da Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular (Genômica, Proteômica, Metabolômica) da Fixação Biológica de Nitrogênio no Brasil.

Considerações sobre minha mentora científica Dra. Johanna Lisbeth (Kubelka) Döbereiner

A Dra. Johanna foi uma cientista excepcional e uma grande amiga. Sua seriedade no planejamento, condução e análise de um experimento refletia-se na aplicação rigorosa

da análise Estatística em todas as etapas.

Era uma pessoa direta, positiva e franca. Não permitia falha ou descaso na condução de um experimento. No entanto, era a primeira a reconhecer e elogiar um experimento bem feito.

Suas características mais notáveis e admiráveis eram a inteligência, tremenda intuição sobre os fenômenos biológicos, enorme capacidade de trabalho, ousadia e persistência, sem falar em sua excepcional cultura e conhecimento científico. Ela sempre soube reconhecer o potencial de seus alunos e colaboradores.

No início de sua carreira no Brasil, trabalhando com recursos limitados, produziu ciência de alta qualidade. A sua originalidade e independência científica revelam-se na frase que me disse uma vez: "Prefiro ser cabeça de sardinha do que cauda de baleia".

O seu carisma, associado às características que já referi, fizeram dela um poderoso magneto, atraindo centenas de investigadores e estudantes ao seu laboratório, o que lhe permitiu expandir enormemente a sua influência na área da fixação biológica de nitrogênio, com especial relevância às bactérias de vida-livre-associativas e endofíticas.

Ela priorizou a ética na ciência.

Minha gratidão à Família Döbereiner

Conhecer e ser "adotado" pela família Döbereiner durante minha graduação foi um acontecimento ímpar e rara felicidade em minha vida. Fui aceito e fiz grande amizade com os membros da família Döbereiner: Dr. Jürgen, e seus filhos Marlis (Maria Luisa), Christian e Lorenz. Com o Dr. Jürgen aprendi a apreciar e ouvir música clássica com concentração e silêncio. Ele tinha uma grande coleção de música clássica da Deutsche Grammophon. Na primeira vez que ouvi a 5^a Sinfonia de Beethoven com ele, fui profundamente lembrado de que a verdadeira música se aprecia em silêncio, imersos na contemplação. Este gosto e prazer de ouvir música clássica me acompanha. Participei de diversas atividades e viagens de lazer com os Döbereiners. Um destes passeios aconteceu na noite de Ano Novo de 1969 para 1970, quando acampamos numa ilha de Itacuruça e vivemos o espetáculo da fluorescência marinha. Infelizmente, fomos expulsos no dia seguinte pelo segurança da ilha e retornamos a Itacuruça rebocados, já que o barco da família Döbereiner estava sem bateria. Grande aventura!

Em 1970, enquanto estava em Harpenden com sua família, durante seu período sabático, ela me convidou para passar o Natal, o Ano Novo e todo o mês de janeiro. Foram férias inesquecíveis. Com Marlis e Ana Lucia Meireles fomos a Paris (visitamos o Louvre), Colônia (visitamos a casa e vimos o pianoforte do Beethoven) e fomos até aos Alpes. Tenho muitas viagens e histórias para contar deste tempo com os Döbereiners.

Agradeço profundamente à Dra. Johanna por sua excepcional contribuição à Ciência, Economia e Agricultura brasileiras.

Meus sinceros e eternos agradecimentos à Dra. Johanna Döbereiner, por sua orientação e por me garantir as condições para crescer na ciência da fixação biológica de nitrogênio.

Agradeço ao Professor Emanuel Maltempi de Souza a leitura do texto.

Curitiba, 28 de novembro

Memórias de Nossa Mãe!

*Christian Döbereiner
Marlis Arkcoll*

Filhos fazem um tributo familiar para celebrar centenário de Johanna Döbereiner

Publicado originalmente na Revista Ciência e Cultura da Sociedade Brasileira de Progresso para a Ciência. <https://revistacienciaecultura.org.br/?p=7441>



Johanna Döbereiner com seu marido e filhos em 1957. (Foto: Arquivo pessoal. Reprodução)

A chegada ao Brasil em 1950 foi marcada por positivismo e a esperança de uma vida melhor. As lembranças dos nossos pais, de perda, dor, fome e deslocamento, nos acompanharam por toda a vida. Muitas vezes mencionavam os tempos difíceis da guerra, mas sempre se mostravam eternamente gratos pela vida, pela acolhida no Brasil pelos brasileiros, pelo trabalho, pelas amizades e pelas experiências vividas no km 47 da antiga Rio — São Paulo, no Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

A paixão de nossa mãe pelo trabalho sempre foi impressionante, era a sua prioridade. Nós, os filhos, aprendemos desde cedo a sermos independentes, pois naquela época víamos nossos pais apenas nas refeições e na hora de dormir. Durante nossa infância, contamos normalmente com a ajuda de babás alemãs, uma tia e antigas amizades da Prússia Oriental para cuidar de nós.

Em casa, a cozinha ficava a cargo das auxiliares, enquanto nossa mãe se dedicava à preparação de geleias — de amora, laranja, pitanga e jabuticaba — e biscoitos de Natal. Ela raramente se envolvia nas demais tarefas domésticas. Nossas refeições eram momentos em família, no café da manhã, almoço e jantar. Com o tempo, os cardápios foram se adaptando à culinária brasileira, pois as empregadas não se mantinham no emprego com pratos da sua terra natal.

Nos momentos de lazer, nossa mãe adorava fazer crochê e tricô. Costurava todos os seus vestidos e os da Marlise também. Aos sábados, íamos às compras no km 49

(Seropédica) e depois no supermercado Casa Sendas, em Campo Grande. Quando sobrava tempo, visitávamos o centro para comprar tecidos nas Casas Pernambucanas. No caminho ao sítio, parávamos na loja japonesa em Itaguaí para comprar ovos, frutas e legumes frescos. Os finais de semana frequentemente passávamos no Sítio e Reserva Porangaba (RPPN) onde ela descansava e adorava levar os netos nas férias escolares.

Nossa mãe raramente tirava férias para si mesma. Fizemos uma viagem toda a família acampando pelo oeste dos Estados Unidos, durante o seu Mestrado em Madison/Wisconsin no início da década de 1960. Nos últimos nove anos de sua vida, passou o mês de janeiro com Marlis em Stellenbosch, na África do Sul. Lá, além de curtir os netos, fomentava pesquisas e intercâmbios com as universidades locais e aproveitava para comprar belas lãs nos armários.

Ela adorava a praia e sempre voltava renovada após um dia de sol em Itacuruçá, Praia Grande ou Grumari. Outra paixão era descansar em sua rede, onde, após o almoço, passava cerca de 20 minutos ouvindo notícias no rádio antes de voltar ao trabalho no laboratório.

Durante muitos anos, nossa mãe fez aulas de ginástica com Dona Frida (boa amiga), ao som de piano ao vivo no Clube Social do km 47. Com o passar do tempo, ela passou a caminhar do laboratório até em casa, consciente da importância de se manter ativa para preservar a saúde.

A televisão só chegou em nossa casa nos anos 1970, quando os filhos já haviam saído de casa. À noite, ela assistia aos noticiários enquanto fazia tricô ou crochê, e depois revisava teses e trabalhos científicos ao som de música clássica.

Nossa mãe também adorava viajar e participar de reuniões, congressos e cerimônias. De suas viagens, sempre trazia sementes e presentes exóticos, muitos dos quais ainda guardamos com carinho. Tínhamos muito orgulho dos prêmios que ela recebia, e as conversas sobre o laboratório mantinham a ciência sempre presente em nossas vidas.

O Natal tinha uma importância especial em nossa família. Quando o aniversário de nossa mãe se aproximava, no dia 28 de novembro, sabíamos que os preparativos começariam. A primeira tarefa era comprar nozes, castanhas e frutas secas na Rua da Alfândega, no Rio de Janeiro. Ela voltava de ônibus com grandes pacotes, contendo os ingredientes dos biscoitos que ajudava Papai Noel a preparar.

Esses biscoitos eram feitos à noite, e nós, crianças, adormecíamos com o delicioso aroma de cravo, canela e noz-moscada no ar. A primeira leva de biscoitos tinha que estar pronta para o Dia de São Nicolau, em 6 de dezembro. Na véspera, colocávamos as botas de papai na varanda da frente. Na manhã seguinte, encontrávamos biscoitos, frutas secas e, às vezes, batatas, cenouras e pedras, caso não tivéssemos nos comportado bem. Havia também uma vara ao lado das botas, e precisávamos nos comportar até o Natal para garantir nossos presentes.

As festividades começavam no dia 24 de dezembro, com o almoço de sopa de lentilha com linguiça. A árvore de Natal era montada após o almoço, e à noite vestíamos sempre roupas novas. O jantar consistia em camarão como entrada, peixe assado com alcaparras e batatas como prato principal, e a sobremesa era "*Welfenspeise*". Após o jantar, ouvíamos canções natalinas, e ao som de um sininho, éramos convidados a abrir os presentes.

No dia 25, o café da manhã incluía "*Stollen*", e o almoço era peru assado com "*Knödel*" de ameixa e repolho roxo. Até hoje, Marlis mantém essas tradições, adaptando-as às tradições inglesas do marido, David.

Nosso Ano Novo muitas vezes era celebrado na Ilha do Governador com os tios Werner e Glycia Kubelka e primos Claire, Beatriz e Paulo. Apesar da liberdade, sempre tivemos responsabilidades. Nossa mãe, relutante, acompanhava Marlís aos bailes e festinhas da universidade, pois as amigas só podiam ir se uma das mães estivesse presente.

Em 1974, nossa mãe costurou o vestido de noiva de Marlís na velha máquina de costura "Elna". Esteve presente no nascimento de seus três netos, ajudando a cuidar de Stephan, Philip e Vivian. Um dos prêmios que recebeu financiou a compra do Sítio Porangaba, perto de Itaguaí, onde a família se reunia para almoços e conversas nos fins de semana a partir de 1980.

Na década de 1980, nossa mãe passou por uma cirurgia na perna e mais tarde, por uma cirurgia de ponte de safena. Nos anos 1990, começou a se queixar de perda de memória, agravada pela perda de nosso irmão Lorenz em 1996. Nos últimos anos de sua vida, já não conseguíamos ter as mesmas conversas, mas sua força de vontade de trabalhar no laboratório persistiu até o fim, com grande apoio de colegas e ex-alunos da Embrapa.

Nossos pais sendo imigrantes, sempre valorizaram a nova vida que construíram no Brasil. Depois de tudo o que passaram durante a Segunda Guerra Mundial, o Brasil foi um verdadeiro paraíso para eles. Tornaram-se resilientes, sempre enfrentando os desafios com coragem e gratidão.



Marlis Arkcoll é economista pela Unicamp, diretora de Planejamento e Orçamento da SUFRAMA, fundadora e diretora da empresa Resulta Exporters (Pty) Ltd.



Christian Döbereiner é geólogo pela UFRJ, PhD pela Universidade de Dundee com carreira no setor de óleo e gás e desenvolvendo um modelo de negócio sustentável em corredor ecológico da Serra Geral (SC).

"Tínhamos muito orgulho dos prêmios que ela recebia, e as conversas sobre o laboratório mantinham a ciência sempre presente em nossas vidas."

"Um dos prêmios que recebeu financiou a compra do Sítio Porangaba, perto de Itaguaí, onde a família se reunia para almoços e conversas nos fins de semana a partir de 1980. Ciência sempre presente em nossas vidas."

"Sua força de vontade de trabalhar no laboratório persistiu até o fim, com grande apoio de colegas e ex-alunos da Embrapa."



Figura 1. Johanna Döbereiner em sua casa em Seropédica, interior do Rio de Janeiro.
(Foto: Arquivo pessoal. Reprodução)

Dra. Johanna Döbereiner foi uma das mentes científicas mais brilhantes do século XX e uma das figuras mais influentes na construção da agricultura tropical sustentável. Imigrante em tempos turbulentos, encontrou no Brasil o solo fértil para transformar ideias ousadas em ciência de impacto global. Visionária, persistente e profundamente comprometida com o país que escolheu como seu, deixou um legado que moldou a agricultura brasileira e influenciou gerações de pesquisadores no mundo inteiro.

Este livro celebra o centenário dessa cientista extraordinária, resgatando não apenas sua trajetória profissional, mas também a força de suas convicções, sua capacidade de inovação e o alcance de suas descobertas — da fixação biológica do nitrogênio em leguminosas às associações com gramíneas, que abriram caminho para uma nova compreensão da fertilidade do solo nos trópicos.

Organizados a partir do workshop realizado pela ABC e pela SBPC, os textos reunidos nesta obra combinam rigor científico, memória afetiva e reflexão crítica. São relatos de especialistas que conviveram com sua influência direta, ou que seguiram trilhas por ela abertas, revelando como seu trabalho continua a inspirar novas gerações, impulsionar avanços tecnológicos e fortalecer a agricultura sustentável no Brasil e no exterior.

Mais do que anais de um evento, este livro é um tributo: uma homenagem à mulher que revolucionou a ciência do solo, transformou práticas agrícolas, formou dezenas de pesquisadores e mostrou, com brilho e humildade, que o conhecimento científico é uma das maiores heranças que se pode deixar a um país.



Apoio:

