



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



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.; KROPPINSTEDT, 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>