

Área Científica **Florestal**

Código PTDC/AGR-AAM/100577/2008 **Início** 2010/03/01 **Termo** 2013/08/31

Título Biofertilizantes fixadores de azoto para culturas de gramíneas

Programa

FCT

Medida

Projetos de I&D em todos os Domínios Científicos

Instituição Líder Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

Investigador Responsável INIAV Maria Paula Abranches Alvarinhas Fareleira

Orçamento Total 157 700,00€

Orçamento INIAV 57 680,00€

Parceria

IBET	Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica	Nacional
ITQB	Instituto de Tecnologia Química e Biológica	Nacional
INIAV	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.	Nacional

Equipa

Maria Paula Abranches Alvarinhas Fareleira
Ângela Cristina Brandão da Fonseca Oliveira Prazeres
Claudia Verónica Sánchez Lara
Maria da Conceição Pinto Baptista Gonçalves
Paula Scotti Lorenzini Borges Campos Afonso

Resumo

Em ecossistemas naturais e agrícolas, os microrganismos associados a plantas podem desempenhar um papel essencial no seu crescimento, propiciando um desenvolvimento mais saudável e melhor capacidade de adaptação ambiental. Estas interações benéficas podem envolver diferentes mecanismos, tais como o aumento da disponibilidade em nutrientes ou a produção de substâncias estimulantes do crescimento. A capacidade de diversas culturas agronómicas para obter azoto a partir da actividade de microrganismos diazotróficos é desde há muito reconhecida. Ao longo das últimas décadas, estas associações têm vindo a adquirir importância crescente, em particular devido aos níveis inaceitáveis de poluição ambiental resultantes do aumento contínuo dos fertilizantes azotados usados em agricultura. Vários esforços têm sido investidos na tentativa de substituir uma parte desses fertilizantes sintéticos, utilizando a fixação biológica de azoto como forma sustentável de aumentar o rendimento das culturas. A capacidade de algumas culturas cerealíferas, como o arroz, milho ou trigo, para estabelecer associações com microrganismos diazotróficos, quer de vida livre, quer endofíticos, é amplamente reconhecida e a utilização de inoculantes fixadores de azoto começa a ser assumida como uma forma plausível para suprir uma parte significativa das suas necessidades em azoto. Contudo, esta prática está longe de ser generalizada. Por um lado, a escassez de conhecimentos sobre a natureza e contribuição das associações diazotróficas na gestão do azoto em muitas culturas gramíneas dificulta a adequada formulação de biofertilizantes. Por outro, a falta de capacidade adaptativa dos inoculantes a condições ambientais específicas parece ser uma causa comum para o seu fraco desempenho. Isto pode ter um impacto particularmente significativo em zonas marginais, onde a sobrevivência e o desempenho das estirpes introduzidas vai depender em grande parte de boa competência saprofítica e capacidades melhoradas para tolerar as condições locais. Nestas regiões, o impacto da aplicação de fertilizantes azotados pode ser severamente agravado pela falta de estrutura do solo; assim sendo, a introdução de biofertilizantes contendo estirpes de diazotróficos eficazes e adaptáveis nestas áreas vulneráveis, assume particular importância.

Neste projecto, propomo-nos desenvolver um biofertilizante fixador de azoto de elevado desempenho para o azevém anual, uma cultura forrageira extensivamente utilizada em áreas pouco produtivas do sul de Portugal. A estratégia baseia-se no isolamento de diazotróficos nativos de ecossistemas representativos dessas zonas e na realização de uma série de passos de caracterização, seleção, até à obtenção de um conjunto de isolados com boa capacidade colonizadora e de promoção do crescimento desta planta.

O derradeiro objectivo prende-se com uma redução tangível dos requisitos da planta em azoto externo. A selecção de estirpes com múltiplas funções relacionadas com o crescimento das plantas, para além da fixação de azoto, aumentará a probabilidade de melhores níveis de produção.

O plano de trabalho proposto organiza-se em 6 tarefas, que envolverão a sinergia de equipas de investigação com competências complementares em microbiologia do solo e fisiologia de plantas (INRB), microbiologia molecular (IBET) e genética microbiana (ITQB). O trabalho de caracterização bacteriana envolverá a avaliação de uma série de aspectos fenotípicos e genómicos, usando técnicas microbiológicas convencionais e abordagens moleculares. A avaliação fenotípica incluirá parâmetros morfológicos e actividades bioquímicas potencialmente benéficas para o crescimento de plantas. A caracterização molecular irá focar-se na amplificação por PCR e análise de restrição do gene *nifH* (RFLP), codificante da nitrogenase-redutase de ferro na maioria dos diazotróficos conhecidos, e de sequências do DNA ribossomal 16S (ARDRA), assim como em genotipagem por amplificação de sequências repetitivas e hipervariáveis (BOX-PCR), com vista a análise filogenética e de diversidade. Os testes de inoculação envolverão uma avaliação abrangente de parâmetros fisiológicos das plantas, permitindo determinar a eficiência dos isolados diazotróficos como promotores de crescimento do azevém anual. Para monitorizar os padrões de colonização e persistência, utilizar-se-ão estirpes marcadas com um gene relator; a estratégia basear-se-á na incorporação do gene codificante da proteína verde fluorescente (GFP) da medusa bioluminescente, *Aequorea victoria*, e na visualização das estirpes marcadas por microscopia de epifluorescência e confocal.

A realização destes estudos permitir-nos-á conceber a formulação básica para um biofertilizante de azevém anual em ecossistemas típicos do sul de Portugal; este será o primeiro passo no sentido de propor a introdução da biofertilização numa fracção significativa dos sistemas de culturas gramíneas em zonas vulneráveis, visionando um impacto ambiental positivo nestes ecossistemas.