



**produto biológico à base de rizobactérias
promotoras de enraizamento e crescimento de
eucalipto e outras arbóreas**



**Acelino Couto Alfenas
UFV**



Conteúdo



- 1. Introdução**
- 2. Como nasceu o Rizolyptus?**
- 3. Que são rizobactérias?**
- 4. Interação Universidade/Empresas**
- 5. Fases do desenvolvimento do projeto**
 - Isolamento, seleção e identificação de isolados**
 - Testes semi-operacionais em viveiros florestais**
 - Interação entre isolados de rizobactérias**
 - Solubilização de fosfato**
 - Testes toxicológicos**
 - Transferência de tecnologia para a Bio Soja**
 - Testes do produto formulado**
 - Registro do produto no MAPA**
 - Uso comercial**
 - Controle de qualidade do produto**
- 6. Resumo e conclusões**



Como nasceu o projeto Rizolyptus?



Miniestaca



Recalcitrância à rizogenese



Como aumentar e uniformizar o enraizamento?

Inoculante Rizolyptus à base de rizobactérias?

A photograph of several green tomato plants growing in black plastic pots. The plants are lush and leafy, with some showing small green tomatoes. They are positioned in front of a window with vertical bars, suggesting an indoor or greenhouse setting. The lighting is bright, coming from the window.

Promoção de Crescimento

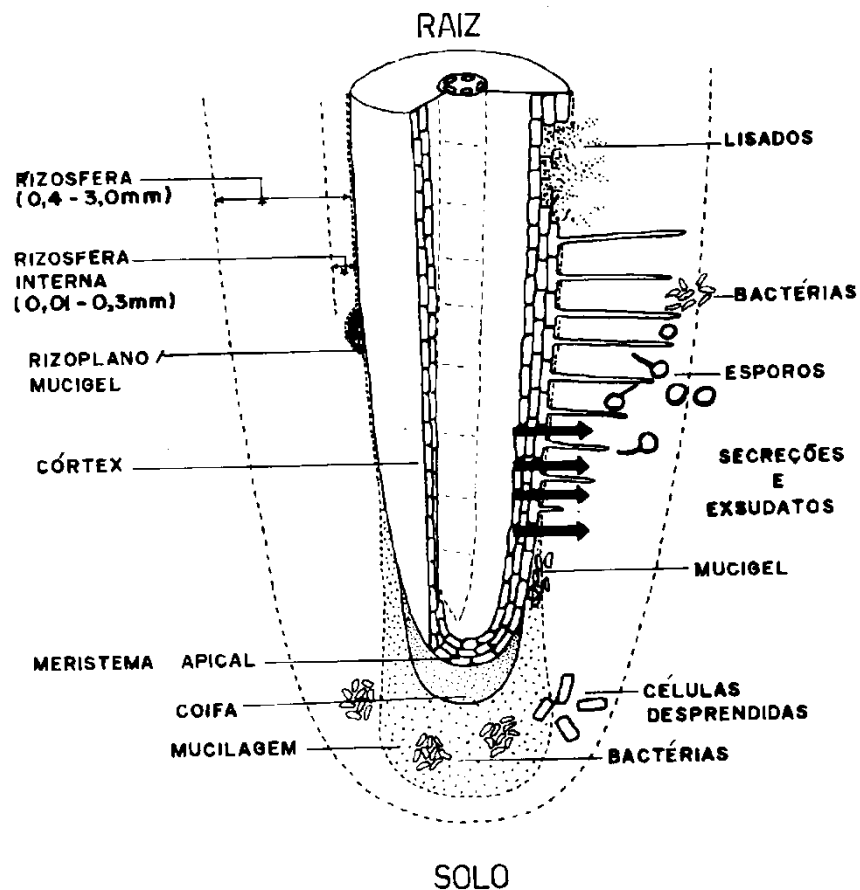
Andréa Moura, Tese de DS. 1996

Produtos biológicos





Que são Rizobactérias?



Objetivos do projeto *Rizolyptus*

- Isolar e selecionar microrganismos eficientes para promoção do enraizamento, crescimento e biocontrole de doenças na propagação clonal do eucalipto;
- Estabelecer as condições ótimas para produção e utilização de um inoculante, considerando as possíveis interações com o sistema de produção;
- Disponibilizar um produto biológico que atenda as exigências ambientais e econômicas do setor florestal.



Via de duas mãos



Universidade



Empresas
Florestais

Parcerias e Cooperação Técnica

UFV/Empresas Consorciadas





FASES DO RIZOLYTUS®



1ª Fase: 1999 - 2001

Isolamento, seleção e identificação de isolados de rizobactérias efetivos para eucalipto

2ª Fase: 2002 - 2003

- ☞ **Testes semi-operacionais em várias empresas florestais**
- ☞ **Ensaio de controle biológico**
- ☞ **Mecanismos de ação de rizobactérias**
- ☞ **Depósitos de patente**
- ☞ **Testes toxicológicos**
- ☞ **Testes de campo**
- ☞ **Testes em outras espécies**

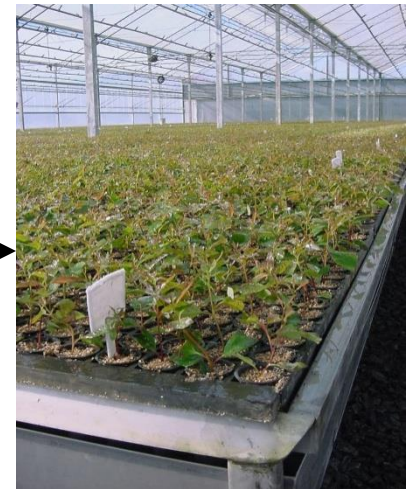
3ª Fase: 2004 - 2005

Contrato de Transferência de Tecnologia UFV/Bio Soja: Maio/2004
Formulação e testes do produto formulado

4ª Fase: 2006 – Uso Comercial
2007 – Registro no MAPA

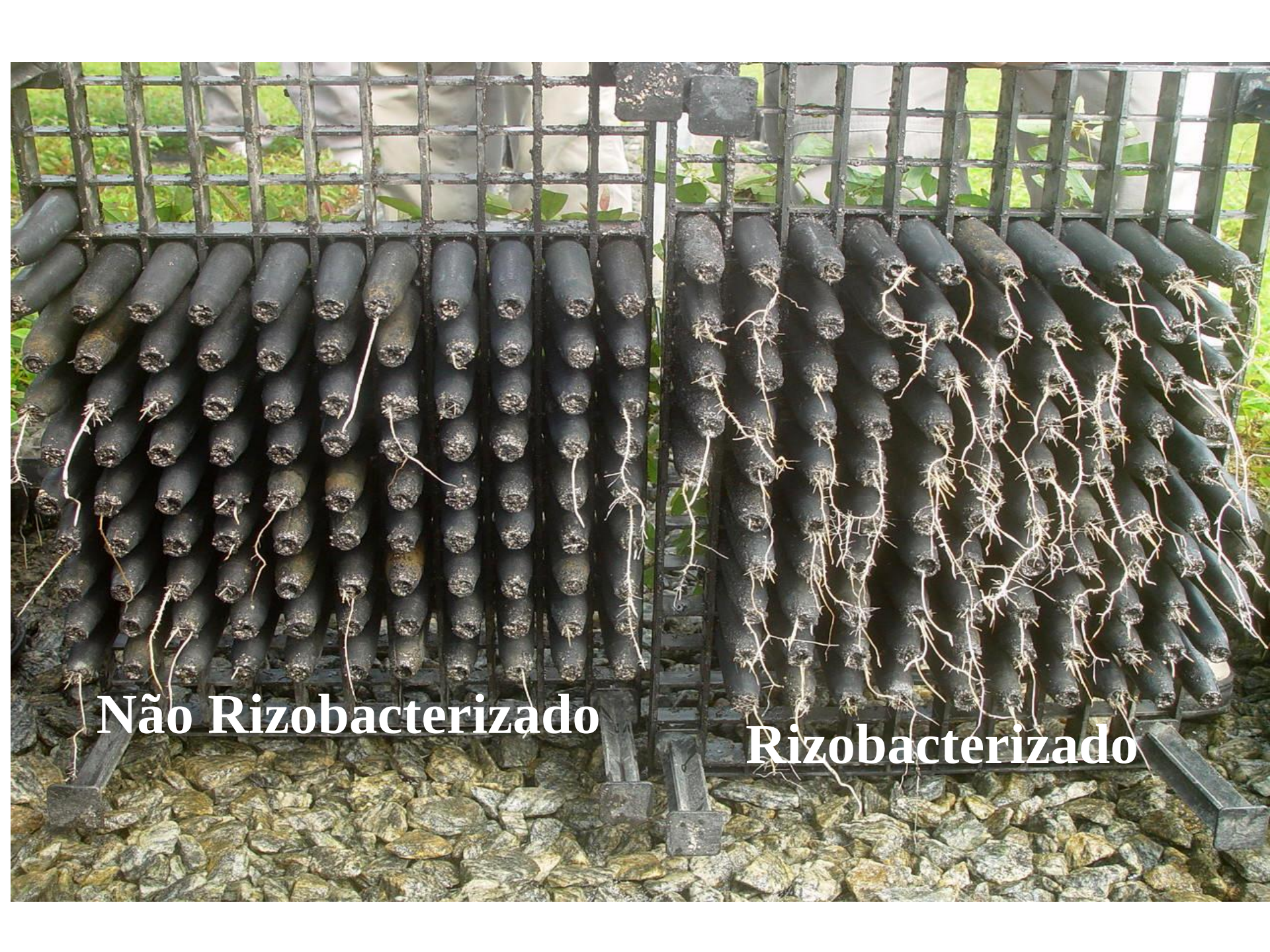


Isolamento e seleção de isolados





Testes semi-operacionais em viveiros das empresas

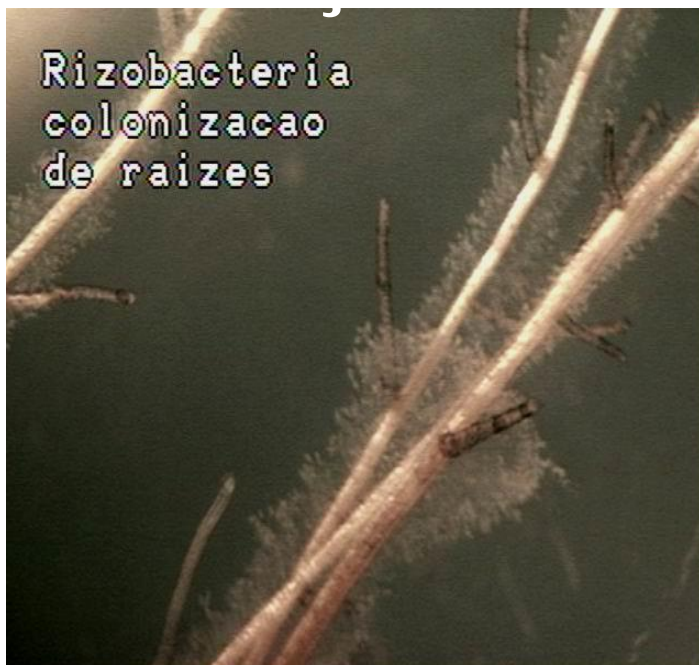


Não Rizobacterizado

Rizobacterizado

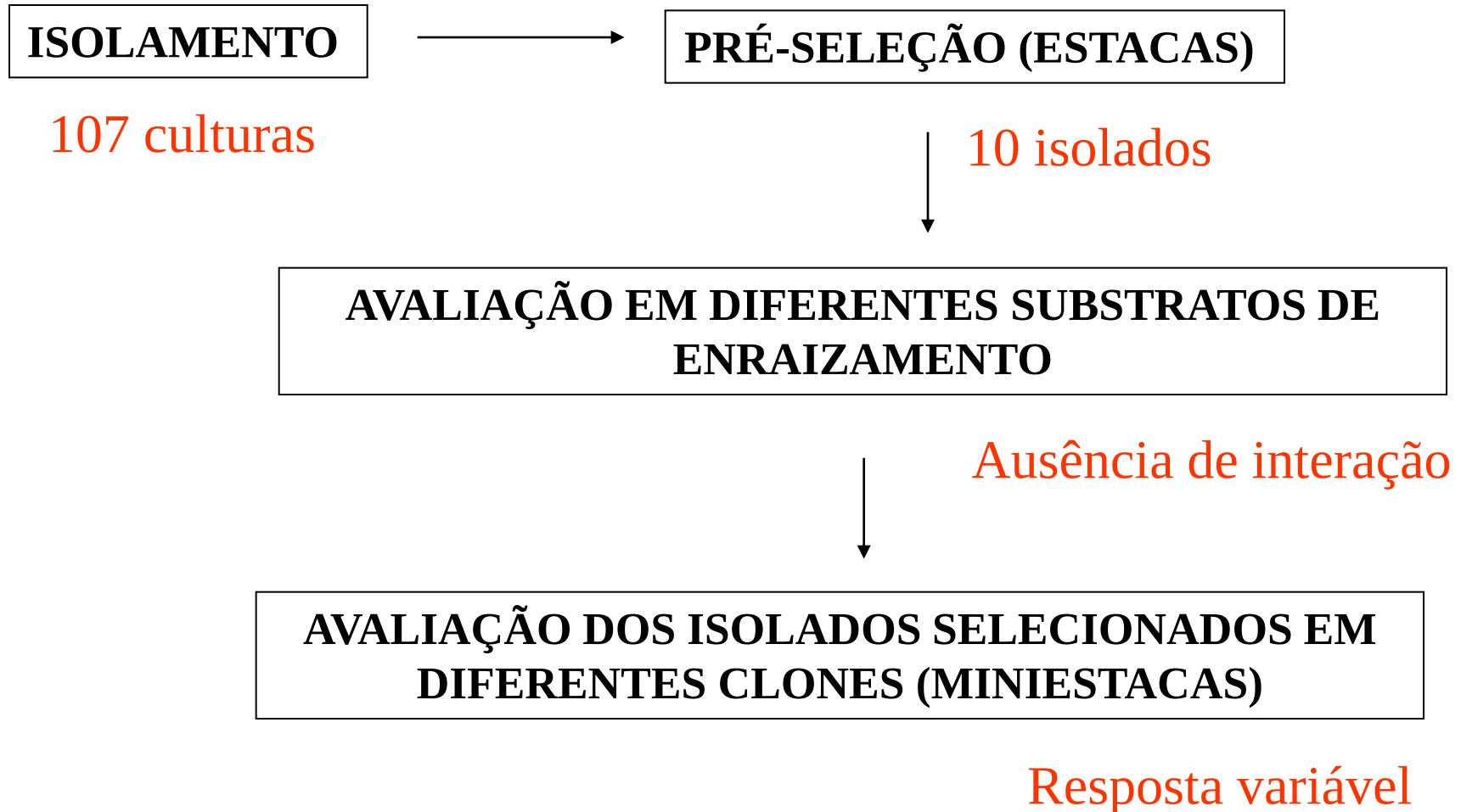


Seleção e colonização de raízes “in vitro” pelas rizobactérias





Conclusões





Identificação dos isolados

Frateuria aurantia (R1)

Stenotrophomonas maltophilia (CIIb)

Bacillus subtilis (S1, S2, 3918)

Pseudomonas sp. (MF4, MF2)

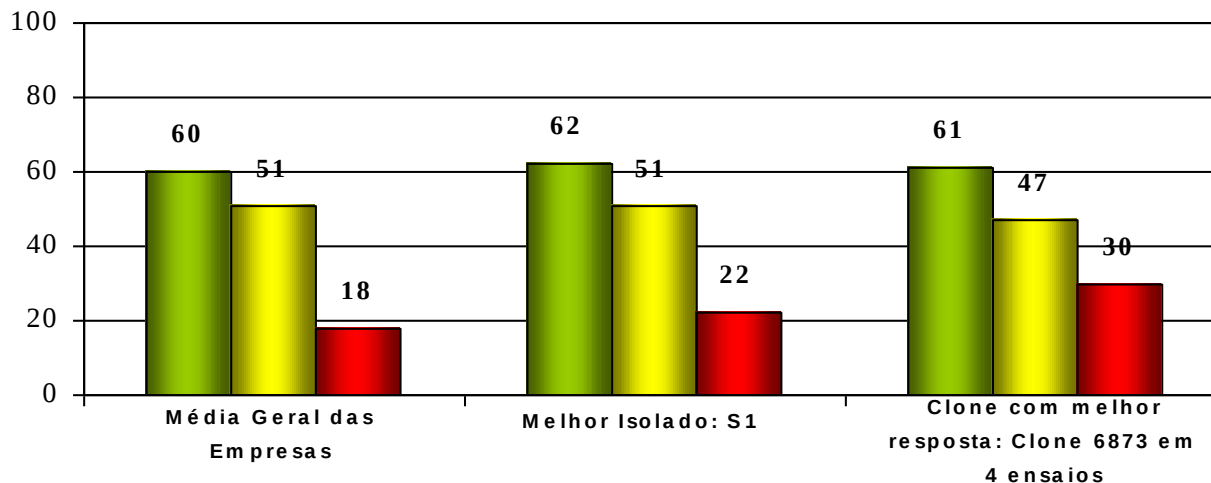
Pseudomonas aeruginosa (FL2)

Pseudomonas fulva (Ca)

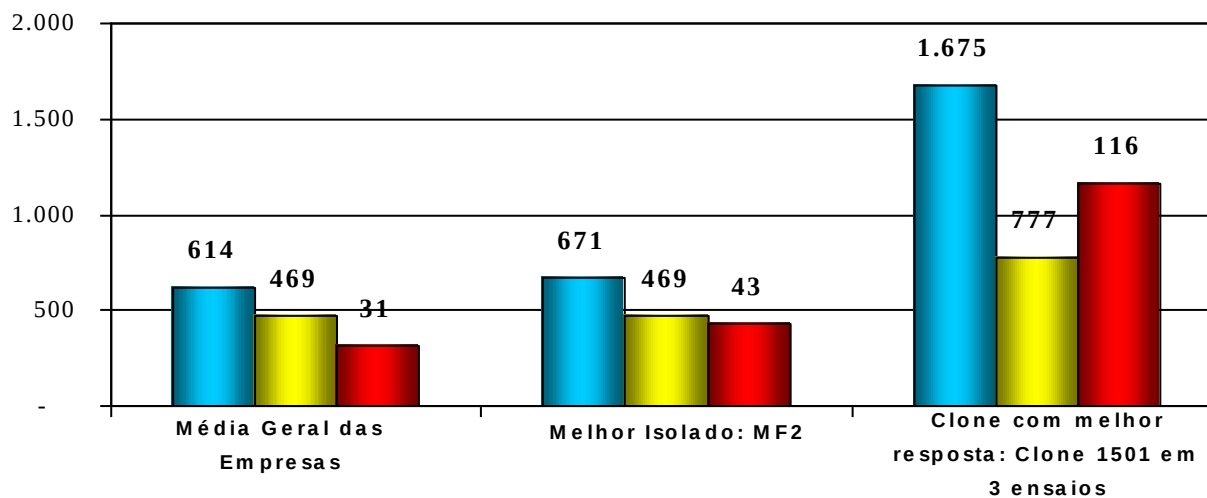


RESULTADO GERAL - 2001

■ Enraizamento (%) ■ Controle (%) ■ Ganhos (%)



■ Matéria Seca (mg) ■ Controle (mg) ■ Ganhos (%)





RESULTADO GERAL - 2002



Melhor isolado x todos os clones

Empresas	Porcentagem de Enraizamento	Matéria Seca de Raiz
ARACRUZ	20	42
CAF	18	64
CENIBRA	4	48
Klabin Riocell	38	68
PLANTAR	10	80
SBS	29	121
VCP	14	84
VERACEL	20	90
Média	19	75



RESULTADO GERAL - 2002



Todos os isolados x todos os clones

Empresas	Porcentagem de Enraizamento	Matéria Seca de Raiz
ARACRUZ	14	21
CAF	14	61
CENIBRA	4	41
KR	26	36
PLANTAR	7	55
SBS	14	68
VCP	10	72
VERACEL	18	53
Média	13	51

RHIZOBACTERIAL PROMOTION OF EUCALYPT ROOTING AND GROWTH

Débora A. Teixeira¹; Acelino Couto Alfenas^{1*}; Reginaldo Gonçalves Mafia¹; Eraclides M. Ferreira¹;
Leandro de Siqueira¹; Luiz A. Maffia¹; Ann H. Mounteer²

¹Department of Phytopathology, Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais State, Brazil; ²Department of Civil and Environment Engineering, Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais State, Brazil

Submitted: May 09, 2005; Returned to authors for corrections: March 09, 2006; Approved: October 13, 2006

ABSTRACT

A total of 107 rhizobacterial isolates, obtained from the rhizosphere of eucalypt clones were tested as rooting inducers of cuttings and mini-cuttings planted in substrate composed of carbonized rice husk and vermiculite (1:1). Cuttings and mini-cuttings were planted in conical plastic tubes containing treated and untreated (control) substrate and kept under intermittent mist irrigation at 26-28°C. After 35 days, rooting percentage and dry root matter of cuttings were evaluated. Ten isolates capable of providing gains of up to 110% in root formation and up to 250% in root biomass over non-inoculated control cuttings were selected. Gains in rooting varied according to clone and isolate tested. The greatest gains were obtained for the mini-cuttings exhibiting the lowest rooting efficiency. Among the ten isolates tested, only 3918 (code R98) and MF4 (code R87), produced 3-indole-acetic acid *in vitro*, at concentrations of 0.7 and 0.67 µg ml⁻¹, respectively. Significant increases in rooting and root dry matter of cuttings grown on rhizobacteria-inoculated substrate were found when compared to untreated or indole-butyric acid (IBA) treated mini-cuttings.

Key words: *Eucalyptus*, cloning, mini-cutting, cutting, rhizobacteria



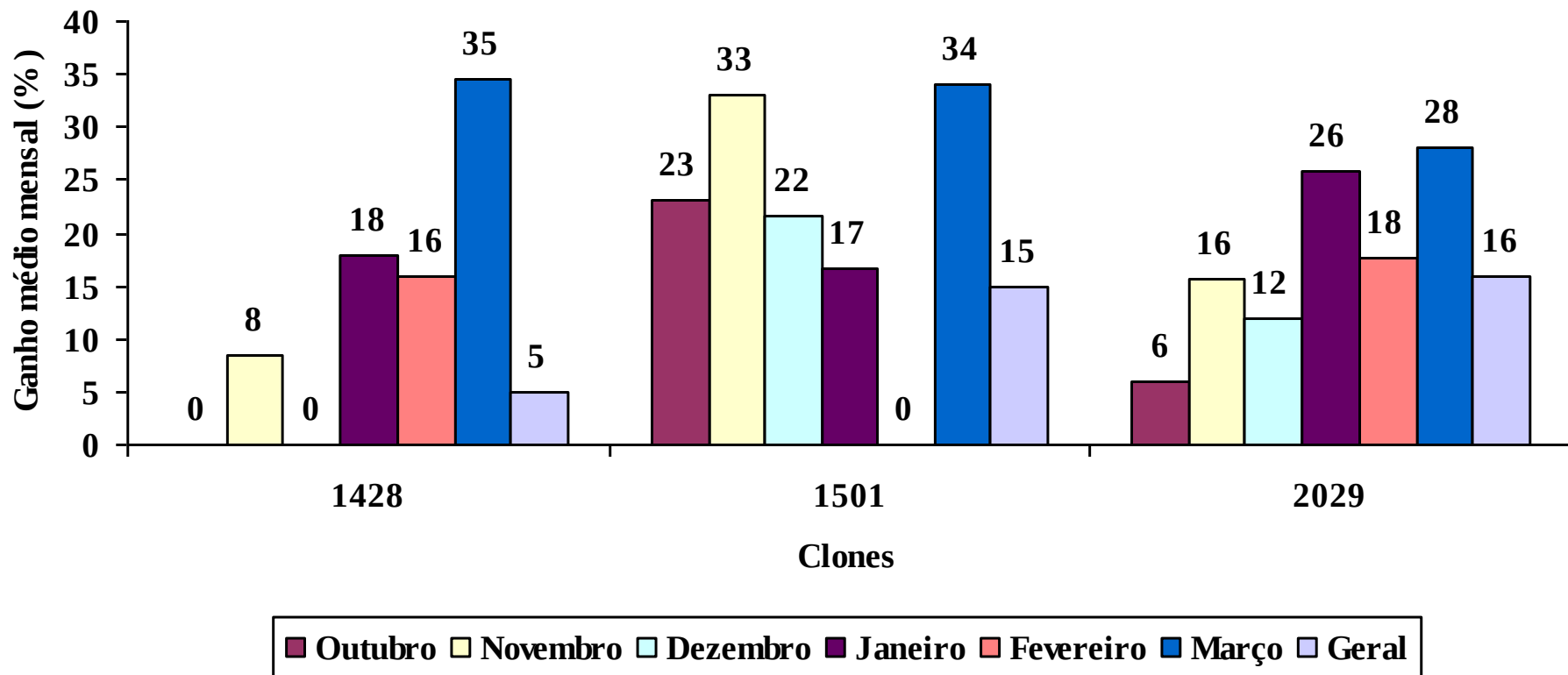
Produção de brotos para estaquia

CLONE 1428





Índice de produtividade de brotos para estaquia



Crescimento no campo de mudas rizobacterizadas no viveiro

- Viveiro: Avaliação aos 30 e 70 dias do estaqueamento;
- Campo: Avaliação aos 2 e 4 meses do plantio;
- Monitoramento das condições meteorológicas;
- Reaplicação do inóculo no ato do plantio;
- Variáveis: E, BR, BPA, HT, D, ID, PR, PG, PF e RAF;
- Tratamentos: S1, 3918 e S1 + 3918;
- Análise de solo.



Não Rizobacterizado

Rizobacterizado

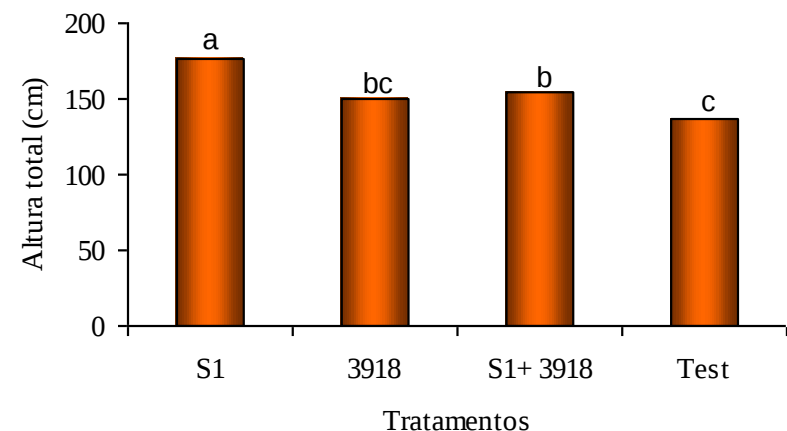
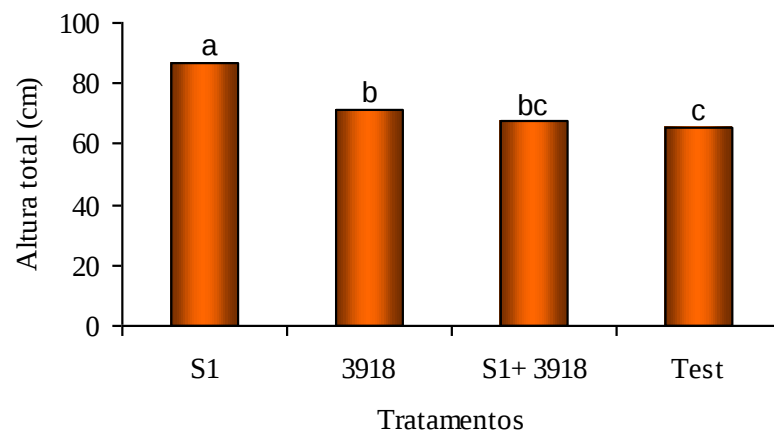
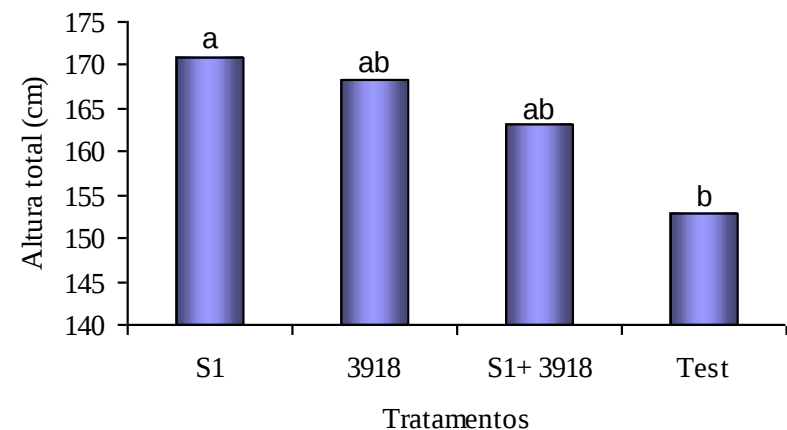
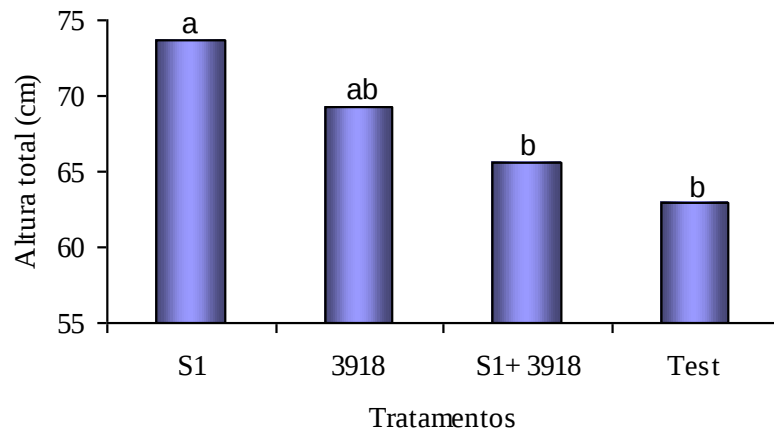


Rizobacterizado

Não Rizobacterizado

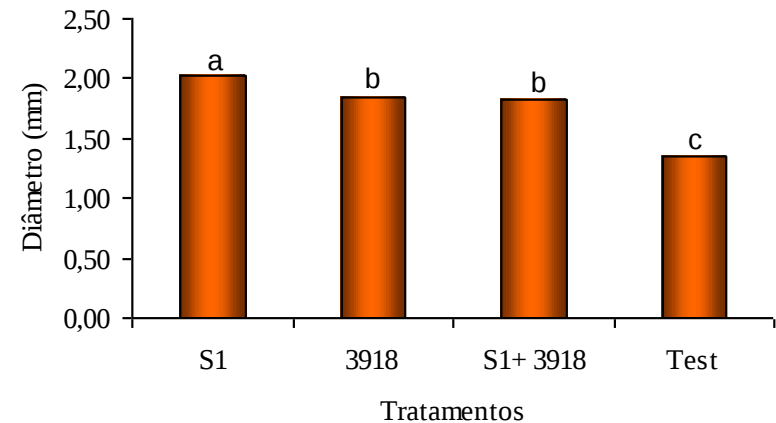
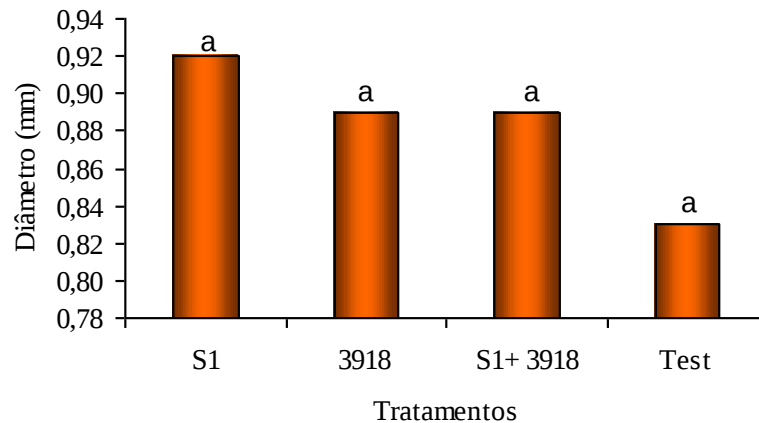
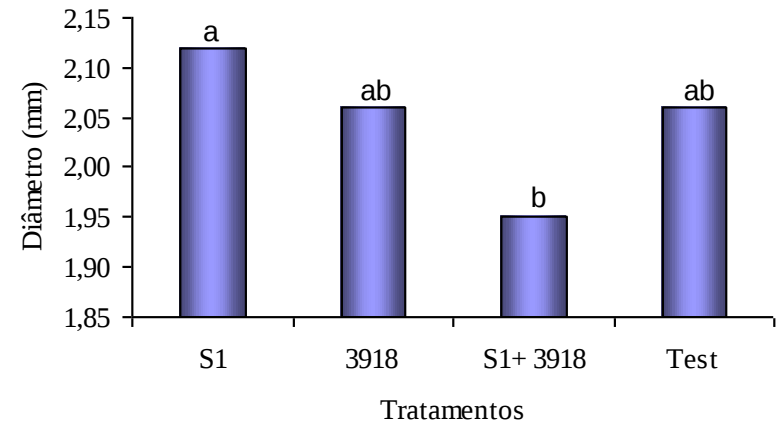
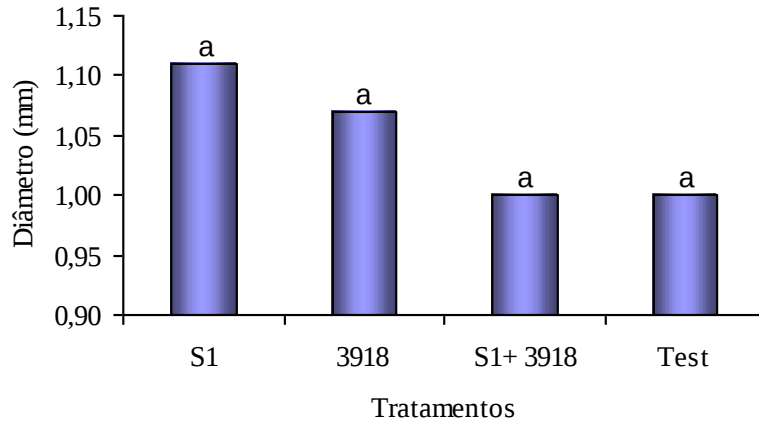


Crescimento das mudas no Campo





Crescimento das mudas no Campo

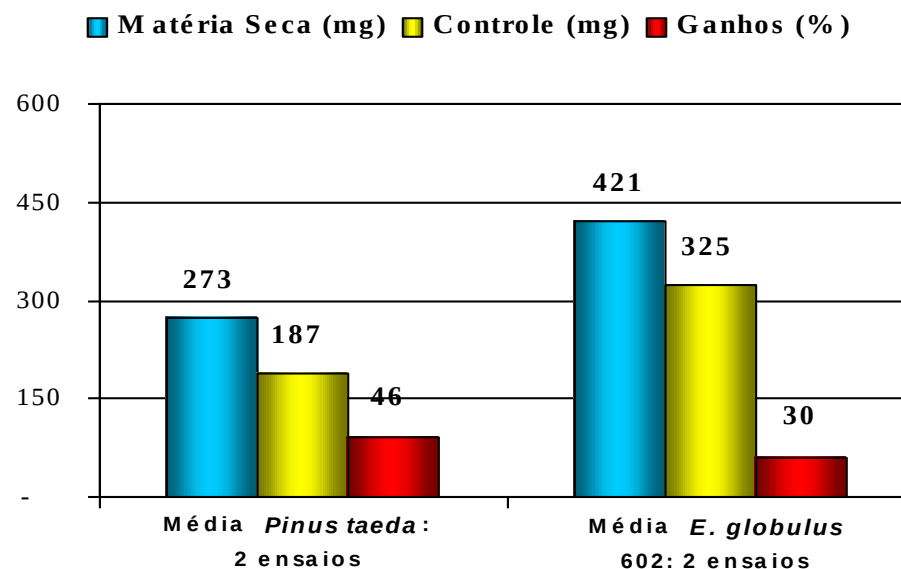
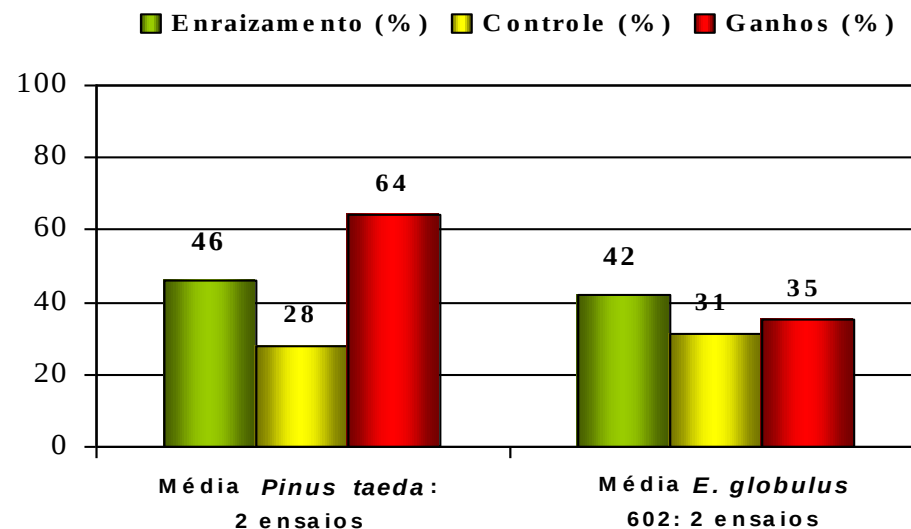


Testes com outras espécies florestais

Rizobactérias para *P. taeda* e *E. globulus*



Rizobactérias para *P. taeda* e *E. globulus*



Rizobactérias em acácia negra



Rizobactérias X Acácia Negra

Rizobactérias em quaresmeira



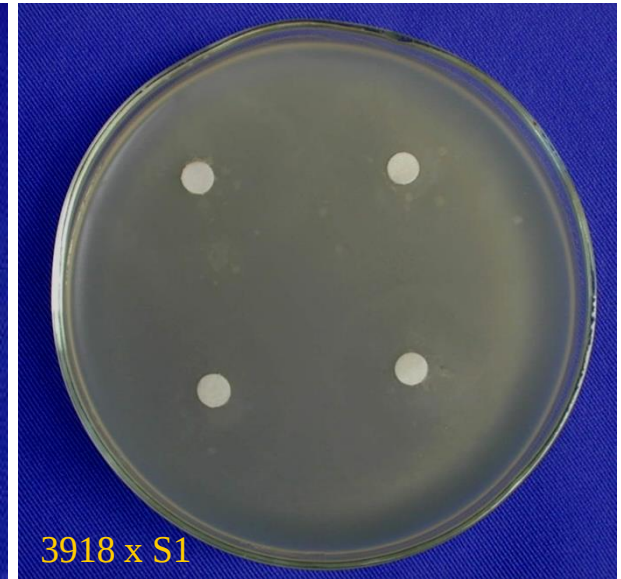
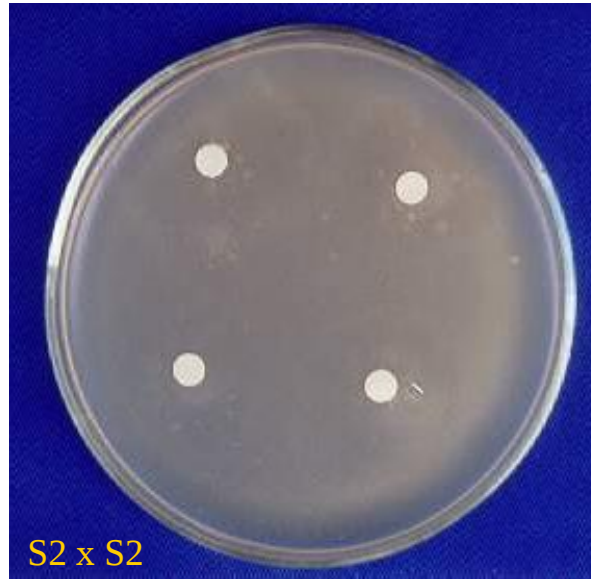
Rizobactérias em sibipiruna





Interação entre isolados de rizobactérias - Antibiógrama

- ➡ Efeito Sinérgico;
- ➡ Dinâmica populacional;



FL2, S1, S2 e 3918 – Isolados de rizobactérias



Interação PGPR x PGPR

Isolados de rizobactérias

Isolados de rizobactérias		S2	3918	RC3	R1	MF4	S1	CIIb	FL2	Ca	MF2
	S2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	3918	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	RC3	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	R1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	MF4	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	S1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	CIIb	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	FL2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	Ca	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	MF2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Compatibilidade (VERDE) e Incompatibilidade entre isolados (VERMELHO)

COMPATIBILIDADE E EFEITO DA MISTURA DE ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIAS NA INDUÇÃO DO ENRAIZAMENTO E CRESCIMENTO DE CLONES DE EUCALIPTO¹

Reginaldo Gonçalves Mafia², Acelino Couto Alfenas², Luiz Antônio Maffia², Eraclides Maria Ferreira² e Leandro de Siqueira⁴

RESUMO – Com vistas ao desenvolvimento de um produto biológico à base de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, este trabalho objetivou avaliar a compatibilidade e o efeito da mistura de isolados de rizobactérias pré-selecionados na indução do enraizamento e crescimento de clones de eucalipto. A compatibilidade entre os isolados de rizobactérias foi determinada por antibiograma nos meios de cultivo de Kado e Heskett e em meio B de King, enquanto o efeito da mistura de isolados foi avaliado por meio da aplicação dos isolados, individualmente ou em misturas, em substrato de enraizamento, empregando-se a mesma proporção de inóculo dos co-inoculantes. Em 64% das possíveis combinações entre dois isolados, não se constataram reações de incompatibilidade. Os isolados VC2 e CIIb foram os mais compatíveis. De forma geral, não se observou sinergia entre misturas de isolados compatíveis, assim como também não ocorreu, geralmente, redução na eficiência da mistura de isolados incompatíveis.

Palavras-chave: *Eucalyptus*, PGPR, biológico e sinergia.

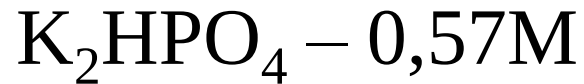
COMPATIBILITY AMONG RHIZOBACTERIA ISOLATES AND EFFECT OF MIXTURE OF ISOLATES IN INDUCING ROOTING AND GROWTH OF EUCALYPTUS CLONES

ABSTRACT – Isolates of rhizobacteria that induced both rooting and growth of eucalyptus clones were previously selected. To assist developing a biological product based on those isolates, the compatibility among them and the effect of mixture of isolates were evaluated. The compatibility among rhizobacteria isolates was assessed by antibiograms in both Kado & Heskett and King B culture media, whereas the effect of isolate mixtures was evaluated by applying the isolates, either alone or mixed but always in the same proportions, in rooting substrate. No antagonism between isolates was observed in 64% of the possible combinations of two isolates. Isolates VC2 and CIIb were the most compatible. In general, it was observed no synergistic interaction in mixture of compatible isolates, as well as no efficiency reduction in mixture of incompatible isolates.

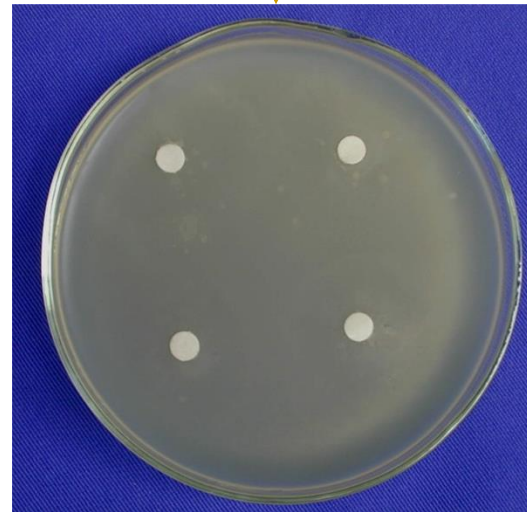
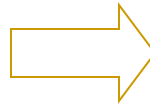
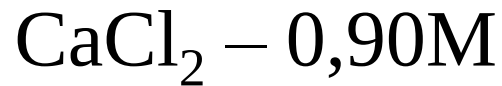
Keywords: *Eucalyptus*, PGPR, biological, and synergy.

Mecanismos de ação das rizobactérias

Solubilização de fosfato



+



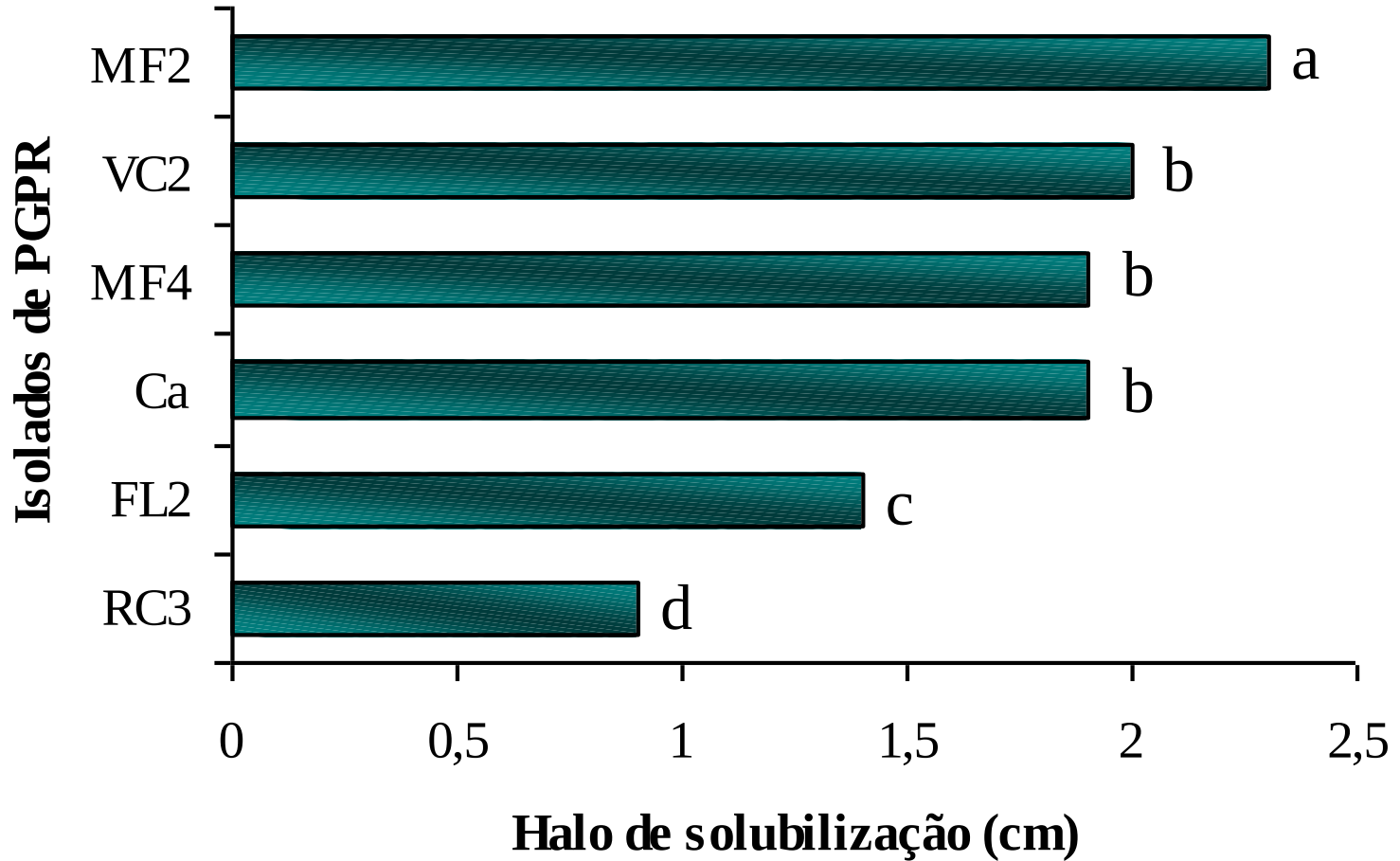


Solubilização de fosfato





Solubilização de fosfato





Testes toxicológicos



0,1 mL (0,2 Abs.)

Análises bioquímicas

- proteínas totais
- colesterol
- triacilgliceróis
- alanina aminotransferase
- aspartato aminotransferase
- fosfatase alcalina
- eritrograma



Transferência de Tecnologia Desenvolvimento do Produto (2003)



Parceria



Universidade Federal de Viçosa



Parcerias e Cooperação Técnica UFV/Empresas Consorciadas

- Em 2004 foi celebrado um Convênio de Parceria e Cooperação Técnica entre a UFRV e as Empresas Consorciadas:

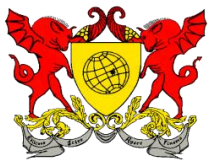
- Aracruz Celulose S/A;
- Bahia Sul Celulose S/A;
- CAF Santa Bárbara Ltda;
- Celulose Nipo-Brasileira S/A;
- Internacional Paper do Brasil;
- Jari Celulose S/A Ltda;
- Klabin S/A;
- Lwarccl Celulose e Papel Ltda;
- Plantar S/A- Planejamento, Técnica e Administração de Reflorestamento;
- Veracel Celulose S/A.



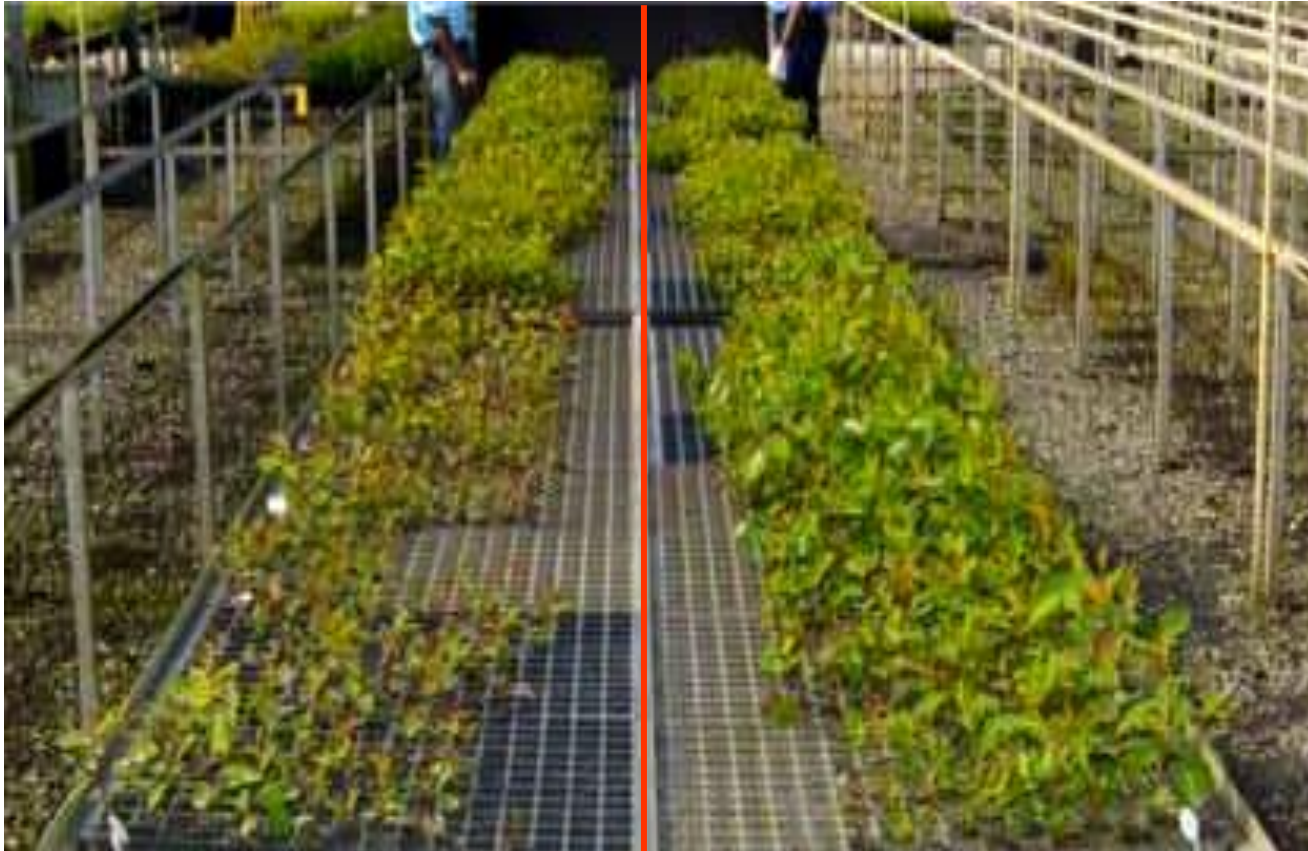
Testes do produto formulado

TURFA X LIQUIDO





Efeito no crescimento das miniestacas



Testemunha

Rizolyptus



Efeito no crescimento





Média de ganhos (%) no enraizamento de 3 clones de eucalipto em relação à testemunha e ao tratamento com AIB

Tratamento	Form. líquida				Form. em pó			
	VER 978	CAF 11	CAF409	Média	VER 978	CAF 11	CAF 409	Média
3918	29,8	10,8	5,2	15,3	0,9	3,9	10,2	5,0
Ca	38,5	5,3	3,2	15,7	13,2	8,4	8,7	10,1
FL2	26,0	14,8	3,0	14,6	0,0	2,3	21,3	7,9
MF2	39,4	18,2	6,8	21,5	9,7	12,7	9,1	10,5
MF4	30,8	18,7	0,0	16,5	8,8	0,0	10,0	6,2
R1	39,4	19,4	7,5	22,1	9,7	5,2	14,9	9,9
S1	11,5	20,6	9,6	13,9	14,9	5,6	16,2	12,3
S2	25,0	22,5	0,0	15,8	13,2	4,5	7,5	8,4
Média dos inoculantes	30,1	16,3	4,4	16,9	8,8	5,3	12,2	8,8
AIB	8,7	10,9	0,0	6,5	0,0	2,9	9,3	4,1



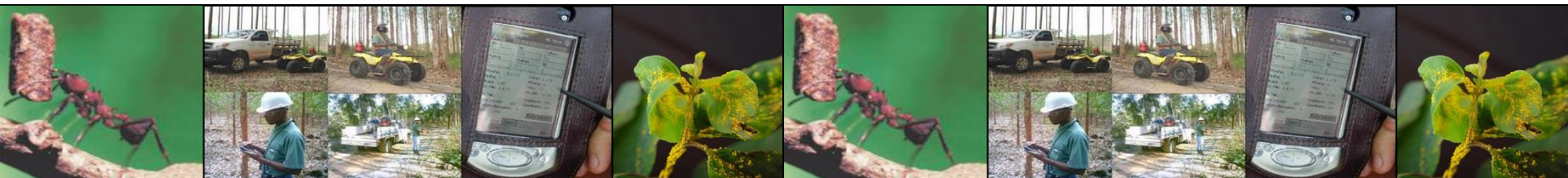
Registro no Ministério da Agricultura, Pesca e Abastecimento (MAPA)

- ~~SP-00581 10012-3, *Pseudomonas* sp UFV - MF2;~~
- ~~SP-00581 10014-0, *P. aeruginosa* UFV - FL2;~~
- SP-00581 10015-8, *Frateuria aurantia* UFV -R1;
- SP-00581 10017-4, *Bacillus subtilis* UFV - S1;
- SP-00581 10000-0, *Bacillus subtilis* UFV - S2;
- SP-00581 10010-7, *Bacillus subtilis* UFV -3918.

Uso do Rizolyptus na Veracel



Daniela Andrade (Veracel)



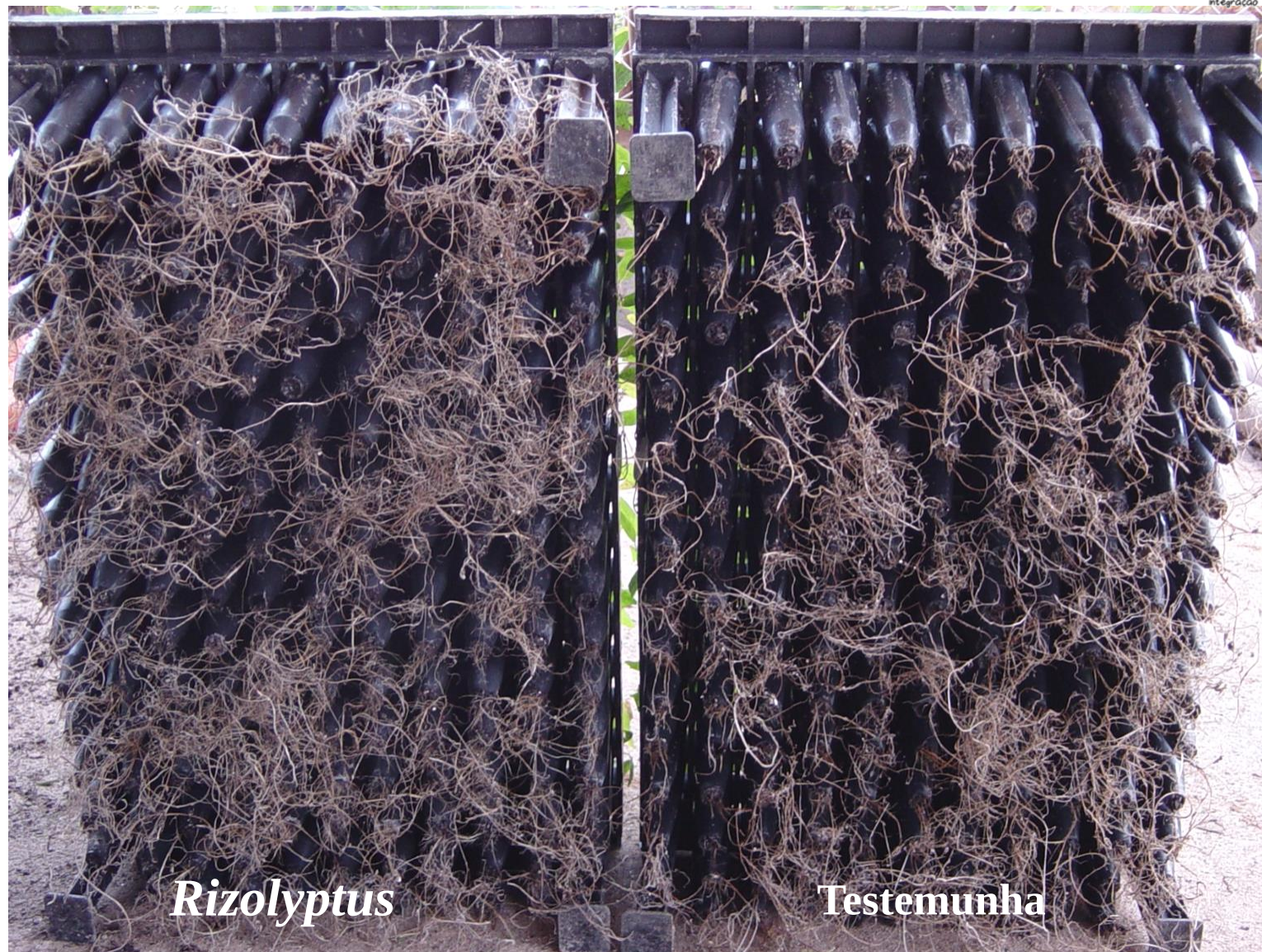


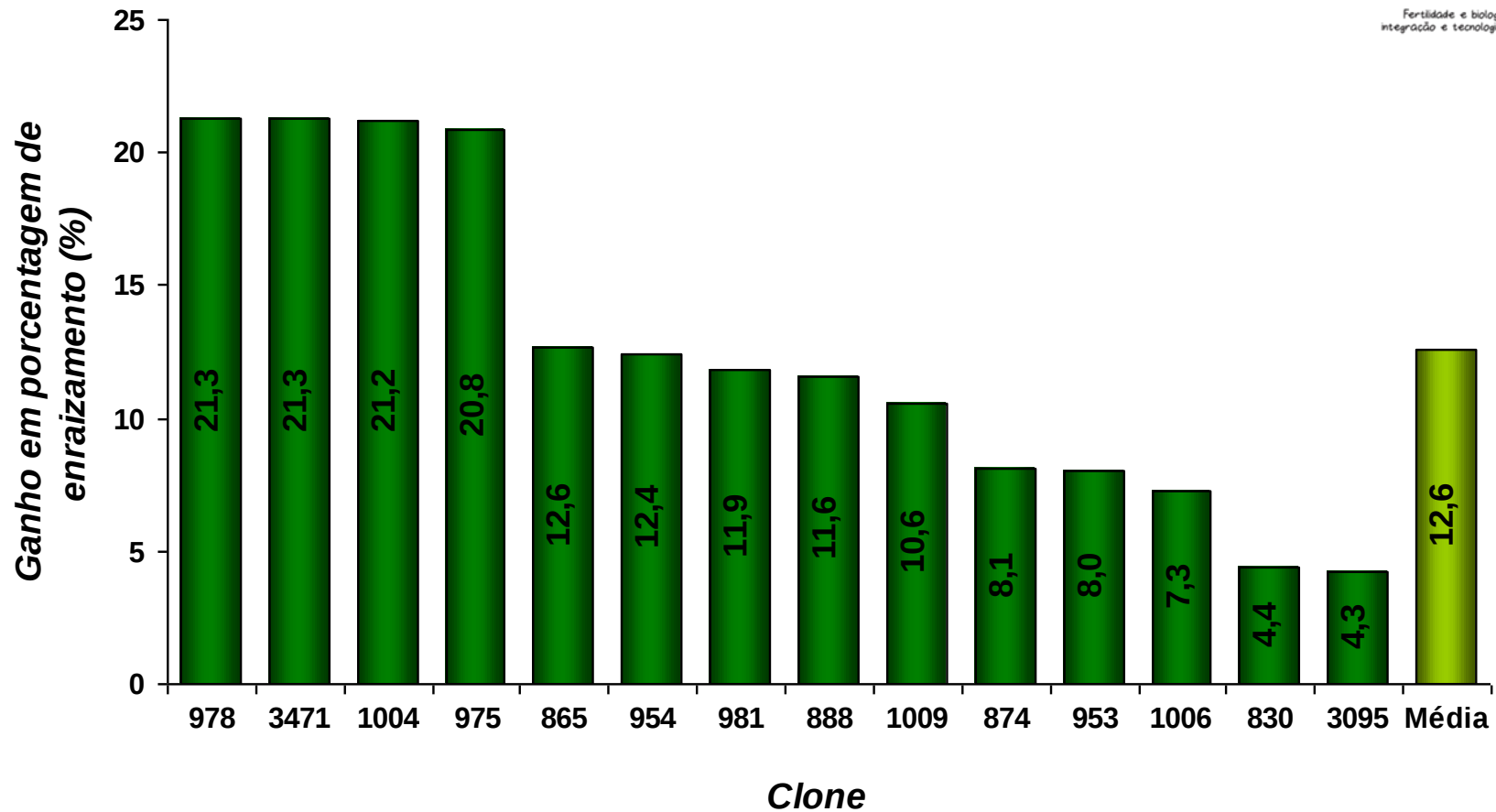
Mudas produzidas com Rizolypus na Veracel



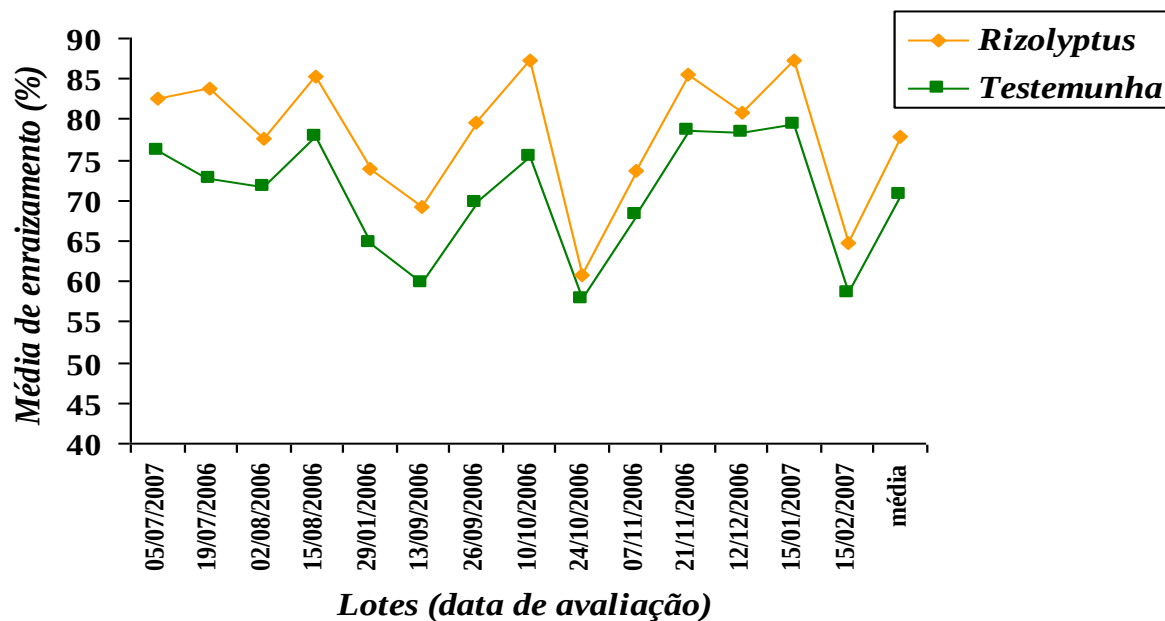
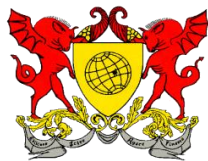


Biomassa radicular





Teste de eficiência do *Rizolyptus*[®] um viveiro florestal no Sul da Bahia



Média de enraizamento (%) dos clones estaqueados em substrato rizobacterizado e testemunha (substrato não inoculado), em cada um dos 14 lotes avaliados com início em julho de 2006 e termino em fevereiro de 2007.





Eficiência do *Rizolyptus*® sobre o enraizamento de um clone de eucalipto, recalcitrante à rizogênes. e a direita plantas tratadas com *Rizolyptus*® na Suzano



Detalhe de muda grande nos tratamentos T3 e T4, aos 60 dae.



Detalhe do sistema radicular de muda grande nos tratamentos T3 e T4, aos 60 dae.



Controle de qualidade: PCR - RFLP

PCR – Polymerase Chain Reaction

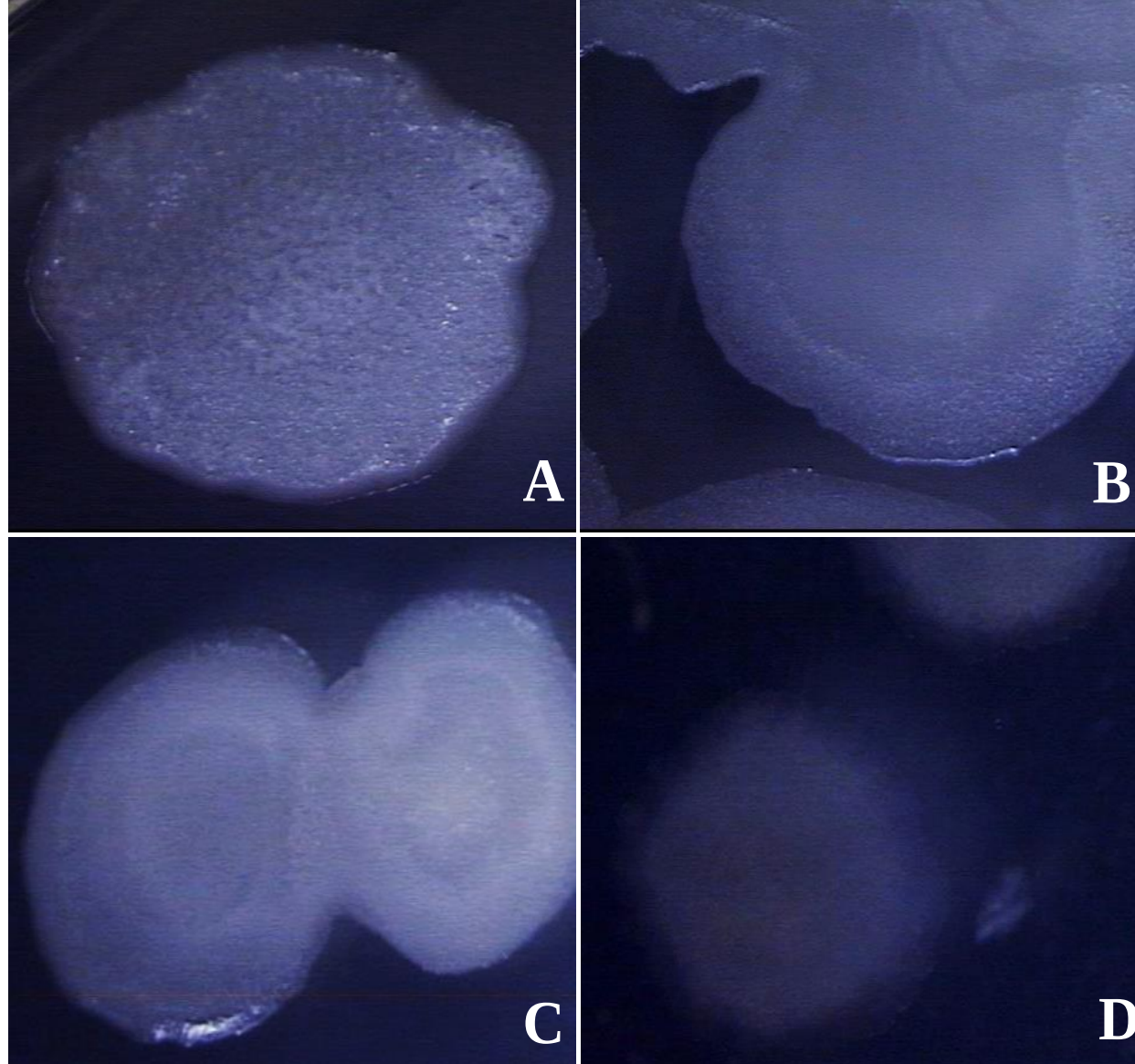
RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism



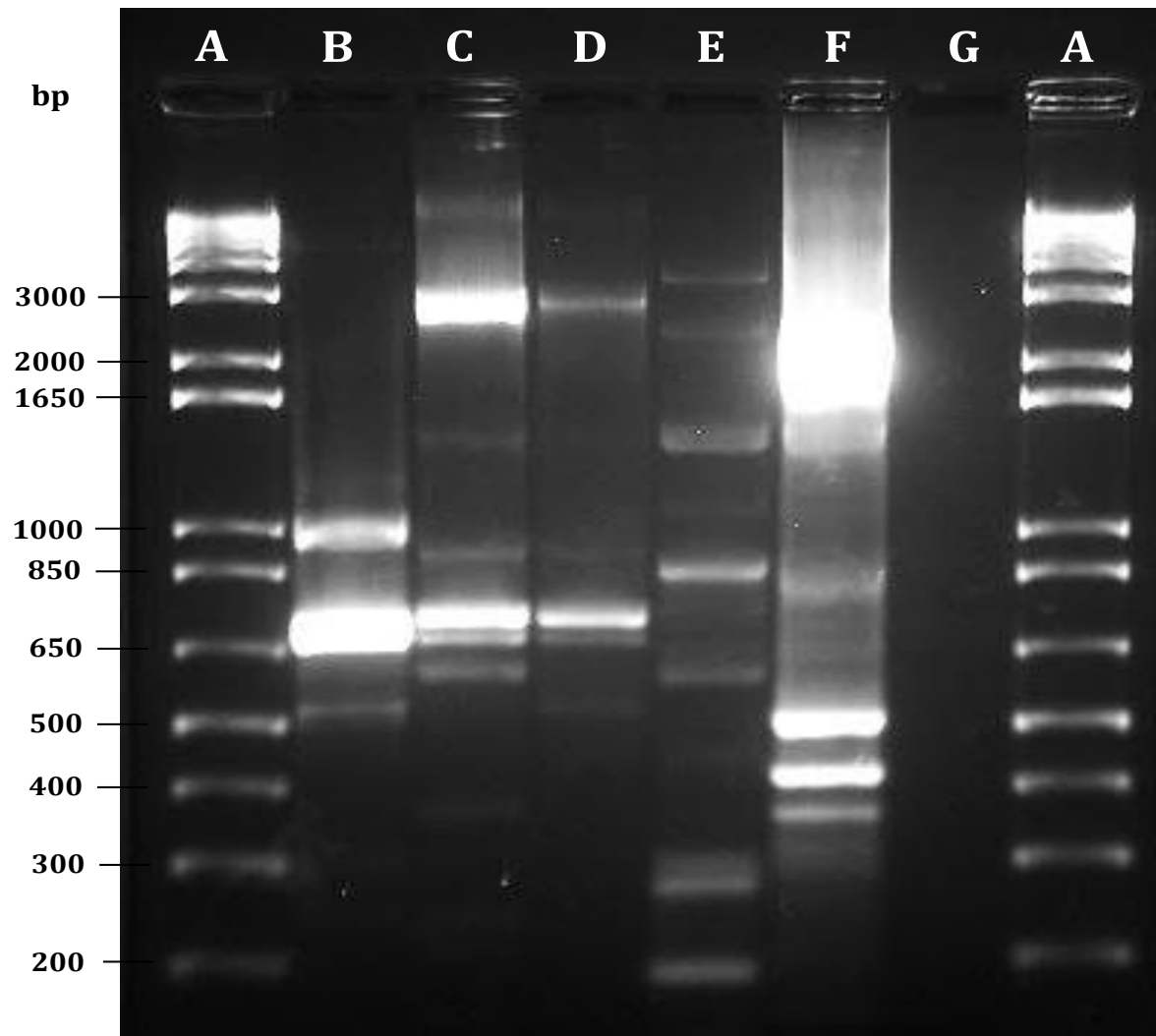
Morfologia e técnica de coloração



Pontos críticos do processo



Detalhe das colônias em meio 523 (Kado & Heskett, 1970) das estirpes de rizobactérias selecionadas. (A) estirpe S1; (B) estirpe S2; (C) estirpe 3918 e (D) estirpe R1.



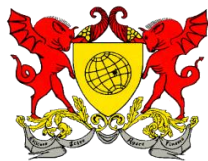
Perfis de restrição do DNA genômico (ERIC-PCR) das estirpes de rizobactérias



Resumo e conclusões



- O Rizolyptus estimula o enraizamento de estacas e a produção de massa seca de raízes de eucalipto e de outras espécies arbóreas.
- A resposta à aplicação do produto varia com a estirpe e o clone.
- O tipo de substrato não afeta a resposta à rizobacterização.
- Melhoria da qualidade do sistema radicular, quanto ao número de raízes secundárias e terciárias e de pêlos absorventes.
- Mudas de eucalipto rizobacterizadas no viveiro apresentaram maior crescimento no campo.



Publicações – artigos



1. CUNHA, et al. Potencial de rizobactérias no crescimento de mudas de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* BENTH). Revista Árvore 37: 211 - 218, 2013.
2. BRUNETTA, et al. Isolamento e seleção de rizobactérias promotoras do crescimento de *Pinus taeda*. Revista Árvore 34: 399 - 406, 2010.
3. MAFIA, et al. Plant growth promoting rhizobacteria as agents in the biocontrol of eucalyptus mini-cutting rot. Tropical Plant Pathology 34: 10 - 17, 2009.
4. MAFIA, et al. Root colonization and interaction among growth promoting rhizobacteria isolates and eucalypts species. Revista Árvore 33: 1 - 9, 2009.
5. MAFIA, et al. Compatibilidade e efeito da mistura de isolados de rizobactérias na indução do enraizamento e crescimento de clones de eucalipto. Revista Árvore 31: 635 - 643, 2007.
6. MAFIA, et al. Efeito de rizobactérias sobre o enraizamento e crescimento de clones de eucalipto em diferentes condições de propagação clonal. Revista Árvore 31: 813 - 821, 2007.
7. MAFIA, et al. Indução do enraizamento e crescimento do eucalipto por rizobactérias: efeito da adição de fonte alimentar e da composição do substrato de enraizamento. Revista Árvore 31: 589 - 597, 2007.
8. TEIXEIRA, et al. Rhizobacterial promotion of eucalypt rooting and growth. Brazilian Journal of Microbiology 38: 118 - 123, 2007.
9. CUNHA, et al. Efeito "in vitro" de antibióticos e rizobactérias no controle de bactérias fitopatogênicas ao *Eucalyptus* spp.. Revista Árvore 30: 871 - 876, 2006.
10. MAFIA, et al. Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. Revista Árvore 29: p.843 - 851, 2005.
11. TEIXEIRA, et al. Evidências de indução de resistência sistêmica à ferrugem do eucalipto mediada por rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. Tropical Plant Pathology 30: 350 - 356, 2005.



Publicações

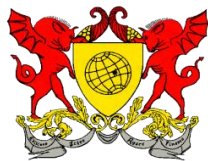


Teses

1. Juliana Margarido Fonseca Couto. Isolamento e seleção de rizobactérias para a produção de mudas de *Pinus* spp. 2006. Tese Ciência Florestal - Universidade Federal de Viçosa.
2. Débora do Amaral Teixeira. Promoção de enraizamento e indução de resistência sistêmica à ferrugem e à mancha-de-cylindrocladium, mediadas por rizobactérias em clones de *Eucalyptus* spp (Patente PI 0101400-5). 2001. Tese Fitopatologia - Universidade Federal de Viçosa

Dissertações

1. Talyta Galafassi Zarpelon. Caracterização de rizobactérias e eficiência do Rizolyptus no enraizamento e crescimento de eucalipto. 2007. Dissertação Fitopatologia - Universidade Federal de Viçosa
2. Jeane de Fátima Cunha. Rizobacterização no crescimento de mudas de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* Benth). 2005. Dissertação Ciência Florestal - Universidade Federal de Viçosa
3. Mario César Gomes Ladeira. Controle biológico de *Quambalaria eucalypti* mediado por rizobactérias. 2004. Dissertação Fitopatologia - Universidade Federal de Viçosa
4. Reginaldo Gonçalves Mafia. Indução do enraizamento e controle biológico de doenças do eucalipto mediados por rizobactérias. 2004. Dissertação Fitopatologia - Universidade Federal de Viçosa



Publicações



Monografias

1. Brígida Maria dos Reis Teixeira. Potencial de rizobactérias para produção de mudas de braúna (*Melanoxylon brauna* Schott) e jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. Allem.). 2006. Curso (Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Viçosa
2. Irislei Francisca Neves. Rizobactérias como promotoras do crescimento de espécies arbóreas ornamentais. 2004. Curso (Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Viçosa
3. Talyta Galafassi Zarpelon. Mecanismos de ação de rizobactérias no controle de fungos patogênicos a mudas clonais de eucalipto. 2003. Curso (Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Viçosa
4. Reginaldo Gonçalves Mafia. Indução do enraizamento e controle biológico de doenças do eucalipto mediados por rizobactérias - Depósitos de Patentes PI0101400-5 e PCT/BR 02/00013. 2002. Curso (Engenharia Forestal) - Universidade Federal de Viçosa
5. Jeane de Fátima Cunha. Seleção de antibióticos e avaliação de rizobacterias para controle de bactérias fitopatogênicas ao *Eucalyptus* sp.. 2001. Curso (Engenharia Forestal) - Universidade Federal de Viçosa

EQUIPE RIZOLYPTUS



Débora

Eng. Florestal
Atual: Univ. Itaúna



Edival

Eng. Florestal
Estudante DS



Fausto

Eng. Florestal
Atual: Duratex



Ernesto

Agrônomo
Atual: Minit. Agricultura



Mário

Eng. Florestal
Atual: Jari Celulose



Leandro

Eng. Florestal
Atual: Suzano Bahia Sul



Reginaldo

Eng. Florestal
Estudante DS



Jeane

Eng. Florestal
Atual: FACIG (Manhuaçu)



Eraclides

Eng. Florestal
Estudante DS



Pablo

Eng. Florestal
Atual: EMFLORS



Talyta

Eng. Florestal
Estudante MS



Fernando

Eng. Florestal
Atual: IEF



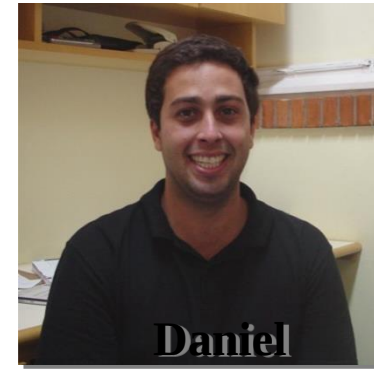
Adriano

Eng. Florestal
Atual: ASIFLOR



Carolina

Eng. Florestal



Daniel

Agrônomo
Bolsista AP



Márcia
Secretária

1ª Reunião Anual - 2002



Reuniões anual (2002)



Reunião Bio Soja - 2003





Reunião Anual - 2004





Equipe – Laboratório de Patologia Florestal (2014)



Acelino
Ph.D.
Orientador



André
Eng. Agrônomo
Pós-Doutorando



Helvio
Eng. Agrônomo
Pós-Doutorando



Leonardo
Eng. Florestal
Pós-Doutorando



Lúcio
Eng. Agrônomo
Pós-Doutorando



Talyta
Eng. Florestal
Pós-Doutorando



Blanca
Bióloga
Estudante DS



Daniele
Eng. Florestal
Estudante DS



Denise
Eng. Florestal
Estudante DS



Natália
Eng. Florestal
Estudante DS



Nilmara
Eng. Agrônoma
Estudante DS



Patrícia
Eng. Florestal
Estudante DS



Angélica
Eng. Florestal
Estudante MS



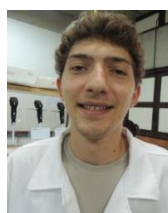
Pollyane
Agronomia
Estudante MS



Marcelo
Eng. Agrônomo
DTI



Daniella
Eng. Florestal
Bolsista IC



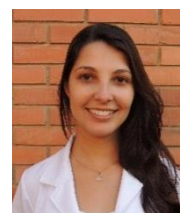
Gustavo
Eng. Florestal
Bolsista IC



Jéssica
Eng. Florestal
Bolsista IC



Lucas
Eng. Florestal
Bolsista IC



Michelle
Eng. Florestal
Bolsista IC



Raul
Eng. Florestal
Bolsista IC



Tamillis
Eng. Florestal
Bolsista IC



Equipe técnica (2014)



Márcia
Assistente
Técnica



Nathália
Técnica de
Sequenciamento



Mara
Laboratorista



Paulo
Auxiliar de
Laboratório



Raquel
Auxiliar de
Laboratório



Obrigado!

Acelino Couto Alfenas
Departamento de Fitopatologia
Universidade Federal de Viçosa
Viçosa – MG – Brasil
Fone: 31 3899-2939
E-mail: aalfenas@ufv.br

Veracel