

UFRRJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA APLICADA

DISSERTAÇÃO

LEVANTAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE KIT
DIAGNÓSTICO DE PATÓGENOS E PROPAGAÇÃO *IN VITRO*
DE ORQUÍDEAS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

EVERALDO HANS STUDDT KLEIN

2008



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA
APLICADA**

**LEVANTAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE KIT DIAGNÓSTICO
DE PATÓGENOS E PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS NO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

EVERALDO HANS STUDDT KLEIN

Sob a Orientação do Professor Associado

Dr. PAULO SERGIO TORRES BRIOSO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração em Fitopatologia

Seropédica, RJ

Julho de 2008

584.4

K641

T

Klein, Everaldo Hans Studt, 1966-

Levantamento e desenvolvimento de kit diagnóstico de patógenos e propagação In Vitro de orquídeas no Estado do Rio de Janeiro / Everaldo Hans Studt Klein - 2008.

72f. : il.

Orientador: Paulo Sergio Torres Briosso.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia.

Bibliografia: f. 64-68.

1. Orquídea - Doenças e pragas - Propagação in vitro - Teses. 2. Orquídea - Teses. 3. Fitopatologia - Teses. I. Briosso, Paulo Sergio Torres. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia. . III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA
APLICADA**

EVERALDO HANS STUDT KLEIN

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, área de Concentração em Fitopatologia Aplicada.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM ____/____/____

Dr. Paulo Sergio Torres Briosso/ UFRRJ
(Orientador)

Dr. Carlos Frederico de Menezes Veiga/ UFRRJ
(Presidente)

Dra. Luciana Pozzer/ MAPA-RJ

Dr. Cleber Furlanetto/ UNIOESTE-PR

DEDICATÓRIA

À minha esposa Lana e aos meus filhos Hans Lucas e Anni Lívia que, ao longo desses dois anos de estudos, se viram afastados de minha presença por diversas vezes e pela oportunidade concedida por Deus de formarmos uma família unida e feliz, ofereço este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade de vir a esse mundo com a possibilidade de adquirir tantos conhecimentos maravilhosos ao longo de minha caminhada e vida acadêmica.

Agradeço à minha mãe, Ina pelo apoio e amor infinitos com os quais me conduziu ao longo da minha vida, desde minha infância, quando passeávamos pelos jardins, estimulando-me a descobrir flores e formas de vida e a apreciar a natureza, até os dias atuais, me ajudando a identificar plantas doentes em sua coleção de orquídeas e me cedendo plantas para a realização dos meus estudos; pelo apoio material e moral em todos os momentos, agradeço, sem sequer encontrar palavras que expressem completamente o meu profundo sentimento de gratidão.

À minha esposa Lana, pelo apoio e compreensão pelos dias e noites que me ausentei do nosso lar para me dedicar a esse curso e a escrita dessa dissertação. Agradeço por me estimular a tornar mais esse sonho realidade.

À UFRRJ, querida e linda escola, aonde tive o privilégio de me graduar Engenheiro Agrônomo em 1991, agradeço, por me receber novamente, me ofertando a oportunidade de realizar esse curso de Pós-graduação. Como foi bom voltar, após 15 anos e sentir-me fazendo parte dela novamente.

Ao professor Paulo Sergio Torres Brioso, pela sua orientação e ensinamentos proporcionados ao longo do curso, agradeço por todas as chamadas de atenção, críticas, elogios, que me guiaram até o fim desse trabalho. Muito obrigado.

Ao professor João Pedro Pimentel, pela amizade e ensinamentos, não apenas adquiridos em sua disciplina, na sala de aula, mas em todos os momentos que tivemos a oportunidade de estarmos juntos. Meu muito obrigado.

Aos demais professores do Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, agradeço pela dedicação e ensinamentos recebidos.

Aos funcionários do Departamento Entomologia e Fitopatologia, agradeço a amizade, atenção, apoio e ajuda que recebi ao longo do curso para realizar todas as atividades no laboratório e na casa de vegetação.

Aos colegas de curso, agradeço pela amizade, pelas brincadeiras e toda a ajuda que tive de vocês para realizar os trabalhos.

A CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, agradeço pelo apoio financeiro concedido através de bolsa de estudo.

BIOGRAFIA

Everaldo Hans Studt Klein, filho de Ina Marta Studt e Manfred Reinhard Klein, nascido em 21 de dezembro de 1966, na Cidade do Rio de Janeiro. Concluiu o 2º Grau, no Colégio Cruzeiro, na mesma cidade, em 1984. Foi aprovado no vestibular para o Curso de Agronomia pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) em 1985. Em 1987 passou a ser estagiário do Departamento de Fitopatologia e em 1989 foi aprovado na seleção para monitor da disciplina Fitopatologia Geral, no Instituto de Biologia da mesma Universidade. Formou-se em 1991, passando a trabalhar como autônomo, nas áreas de consultoria e paisagismo. Em 2003 retornou aos estudos, realizando o curso de pós-graduação *lato sensu* “Manejo de Doenças de Plantas” pela Universidade Federal de Lavras, MG, obtendo o Título de Especialista em Manejo de Doenças de Plantas, em 2004 com o Trabalho intitulado “Manejo de Doenças em Orquidários Comerciais para o Estado do Rio de Janeiro”, sob a orientação do Professor Ricardo Magela de Souza. No mesmo ano fez o “Curso de Cultivo e Reprodução de Orquídeas” no Centro de produção Vegetal – Plantech, em Atibaia, S.P., ministrado pela Bióloga Sandra Takebayashi. Em 2006 ingressou no Curso de Pós-graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, ao nível de Mestrado, na UFRRJ, como primeiro colocado na seleção, passando a contar com bolsa de estudos da CAPES. Em 2007 passou a formar o corpo docente do SENAC-Teresópolis, ministrando o Curso Básico em Paisagismo, nesta cidade.

RESUMO

KLEIN, Everaldo H. S. **Levantamento e desenvolvimento de kit diagnóstico de patógenos e propagação *in vitro* de orquídeas no Estado do Rio de Janeiro.** 2008. 71p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Biologia, Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Foi realizado levantamento das principais doenças que ocorrem em orquídeas no Estado do Rio de Janeiro, através de coleta de plantas em várias Localidades, no período de abril de 2006 a junho de 2008. Cinquenta e três plantas tiveram suas doenças e patógenos identificados, dos quais 35,9% das plantas estavam infectadas por fungos, sendo 17% por *Fusarium oxysporum*, 13,2% por *Colletotrichum gloeosporioides*, 1,9 % por *Botrytis sp.*, 1,9% por *Puccinia sp.* e 1,9% por *Phyllosticta capitalensis*. 51% das plantas estavam infectadas por vírus com infecções simples e duplas de *Cymbidium mosaic virus* - CymMV e *Odontoglossum ringspot virus* - ORSV. 1,9 % estavam infectadas pela bactéria *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* e 3,8 % por nematóides do gênero *Aphelenchoides*. Foram identificados os nematóides *Aphelenchoides fragariae* e *A. ritzemabosi* infectando orquídeas híbridas, sendo esse o primeiro relato de parasitismo desses nematóides em orquídea e de *A. ritzemabosi* em *Asplenium nidus* L., no Brasil. Foi feito também o primeiro registro da ocorrência *Cymbidium mosaic virus* – CymMV infectando plantas da espécie *Arundina bambusifolia* Lindl. no Estado do Rio de Janeiro. Com base na identificação dos patógenos desse levantamento, desenvolveu-se um kit diagnóstico para os principais fitopatógenos de orquídea. Objetivou-se testar três substâncias de propriedades fungistáticas em meio de cultivo de propagação de orquídeas, utilizando-se como plantas-teste *Sophronitis cernua* Lindl. e *Epidendrum ellipticum* Grah.. Das substâncias testadas, apenas canela em pó (*Cinnamomum zeylanicum* J.Presl), na dosagem de 6 gramas / litro influenciou positivamente a germinação de sementes de *Epidendrum ellipticum* Graham, sendo que o acréscimo de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) comercial picado nas doses de 3, 5 e 6 g/l causou a inibição da germinação *in vitro* das sementes de *Epidendrum ellipticum* Graham. e *Sophronitis cernua* (Lindl.) Hook. O acréscimo de alho (*Allium sativum* L.) em pó comercial nas doses de 6 e 10 g/l, também inibiu a germinação *in vitro* das sementes de *Epidendrum ellipticum* Graham.

Palavras-chave: Doenças de plantas, orquídeas, micropropagação.

ABSTRACT

KLEIN, Everaldo H. S. **Survey and development of diagnostic kits for pathogens and *in vitro* propagation of orchids in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 2008.** 71p. Dissertation (Master Science in Plant Protection and Applied Biotechnology). Instituto de Biologia, Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

It was conducted a survey of the major diseases that occur in orchids in the State of Rio de Janeiro, through collection of plants in various localities in the period April 2006 to June 2008. Fifty-three plants had their diseases and pathogens identified, of which 35.9% were infected by fungi, being 17% by *Fusarium oxysporum*, 13.2% by *Colletotrichum gloeosporioides*, 1.9% by *Botrytis* sp., 1.9% by *Puccinia* sp. and 1.9% by *Phyllosticta capitalensis*. 51% of the plants were infected by virus with simple and double infections of *Cymbidium mosaic virus* - CymMV and *Odontoglossum ringspot virus* - ORSV. 1.9% were infected by the bacterium *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and 3.8% by nematodes of the genus *Aphelenchoides*. The nematodes *Aphelenchoides fragariae* and *A. ritzemabosi* were identified infecting hybrid orchids, which is the first report of parasitism of these nematodes in orchid and of *A. ritzemabosi* parasiting *Asplenium nidus* L. in Brazil. It also made the first record of the occurrence of *Cymbidium mosaic virus* - CymMV infecting Bamboo orchid *Arundina bambusifolia* Lindl. in the State of Rio de Janeiro. Based on the identification of pathogens of that survey, it was developed a diagnostic kit for the main diseases of orchids. Aiming to test antimycotic properties of three substances in culture medium for cultivation of orchids, using as test- plants *Sophranitis cernua* Lindl. and *Epidendrum ellipticum* Grah. Of the substances tested, only powdered cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* J. Presl), at the dose of 6 grams / liter positively influenced the germination of seeds of *Epidendrum ellipticum* Graham, and the addition of clove (*Syzygium aromaticum*) at doses of 3, 5 and 6 grams / liter caused the inhibition of *in vitro* germination of seeds of *Epidendrum ellipticum* Graham. and *Sophranitis cernua* (Lindl.) Hook. The addition of commercial garlic (*Allium sativum* L.) powder in doses of 6 and 10 grams / litre, also inhibited *in vitro* germination of seeds of *Epidendrum ellipticum* Graham.

Keywords: Diseases of plants, orchids, micropropagation.

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BDA	Batata-dextrose-Agar
BLC	Brassolaeliocattleya
CymMV	<i>Cymbidium mosaic virus</i>
g	grama
l	litro
L	Laelia
LC	Laeliocattleya
M	Molar
ORSV	<i>Odontoglossum ringspot virus</i>
pH	potencial hidrogeniônico
SiO ₂	Dióxido de Silício
FeNA EDTA	Etilenodiaminotetracetato de ferro e sódio
NPK	Nitrogênio-fósforo-potássio

SUMÁRIO

Capa.....	i
Contra-capa.....	ii
Ficha catalográfica.....	iii
Folha de Aprovação.....	iv
Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vi
Biografia.....	vii
Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
Lista de Siglas, Abreviaturas e Símbolos.....	x
Índice de Tabelas.....	xv
Índice de Figuras.....	xvii
Introdução.....	1
As orquídeas.....	1
O mercado da floricultura.....	1
A fitossanidade.....	2
Objetivos.....	3
Revisão de Literatura.....	4
A reprodução das orquídeas.....	4
Sistemas de propagação.....	4
Os meios de cultura para micropropagação.....	5
Os meios de cultura alternativos.....	6
A contaminação.....	6
As doenças que atacam as orquídeas.....	7
Doenças fúngicas.....	7
Podridão negra.....	7
Murcha de Fusarium ou Podridão de raiz e pseudobulbo.....	7
Antracnose.....	8
Ferrugem.....	8
Mofa cinzento.....	9
Mancha de Cercospora ou cercosporiose.....	9
Murcha de Sclerotium ou Podridão da base.....	9

Manchas foliares de Phyllosticta	10
Podridão das raízes	10
Podridão de raízes de <i>Cylindrocarpon</i>	11
Podridão de raízes de <i>Cylindrocladium</i>	11
Mancha foliar de <i>Fusarium</i>	11
Mancha foliar e de bulbos	11
Mancha de <i>Macrophoma</i>	11
Outras manchas foliares	11
Crosta negra da baunilha	12
Doenças bacterianas	12
Mancha aquosa ou mancha marrom	12
Podridão mole	12
Viroses	13
<i>Cymbidium mosaic virus</i>	13
<i>Odontoglossum ringspot virus</i>	13
Orchid Fleck Vírus	14
Cucumber mosaic virus	14
Vírus ainda não relatados no Brasil	15
Nematóides	17
<i>Aphelenchoides bessey</i>	17
<i>Aphelenchoides fragariae</i>	17
<i>Aphelenchoides ritzemabosi</i>	18
<i>Aphelenchoides composticola</i>	18
<i>Pratylenchus scribneri</i>	18
CAPÍTULO I: OCORRÊNCIA DE DOENÇAS EM ORQUÍDEAS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO	24
Resumo	24
Abstract	24
Introdução	24
Material e Métodos	25
Resultados e Discussão	27
Conclusão	32

CAPÍTULO II: OCORRÊNCIA DE ESPÉCIES DE <i>Aphelenchoides</i> EM ORQUÍDEA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.....	33
Resumo.....	33
Summary.....	34
Conteúdo.....	34
Literatura Citada.....	38
CAPÍTULO III: OCORRÊNCIA DE CymMV EM ORQUÍDEAS DO GÊNERO ARUNDINA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.....	42
Resumo.....	42
Abstract.....	42
Referências bibliográficas.....	46
CAPÍTULO IV: PROTÓTIPO DE KIT DIAGNÓSTICO DE FITOPATÓGENOS DE ORQUÍDEAS.....	47
Uso pretendido.....	48
Amostra e cuidados com o Kit.....	48
Como o teste funciona.....	48
Resultados.....	49
Material suplementado pelo Kit.....	49
Precauções e limitações.....	49
CAPÍTULO V: MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS PARA PROPAGAÇÃO <i>in vitro</i> DE ORQUÍDEAS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.....	51
Introdução.....	51
Materiais e Métodos.....	52
Resultados e Discussão.....	55
Conclusão.....	60

DISCUSSÃO.....	61
CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
ANEXO.....	68

ÍNDICE DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1. Tabela de rápida identificação dos fitopatógenos associados a orquídeas.....	18
---	----

CAPÍTULO I: OCORRÊNCIA DE DOENÇAS EM ORQUÍDEAS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Tabela 1. Plantas coletadas para realização dos estudos, período e local de coleta.....	25
Tabela 2. Tipos de doenças e patógenos encontrados nas plantas coletadas.....	27
Tabela 3. Relação de plantas coletadas e seu respectivo diagnóstico.....	27
Tabela 4. Percentual de ocorrência de cada patógeno nas plantas coletadas no Estado do Rio de Janeiro (abril de 2006 a junho de 2008).....	29
Tabela 5. Gêneros das plantas coletadas infectadas com vírus.....	31

CAPÍTULO IV: PROTÓTIPO DE KIT DIAGNÓSTICO DE FITOPATÓGENOS DE ORQUÍDEAS

Tabela 2. Detecção da presença de vírus em plantas de Orquídea a partir de teste sorológico com tiras embebidas com antissoros específicos (Tiras Imunocromatográficas).....	50
---	----

CAPÍTULO V: MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS PARA PROPAGAÇÃO *in vitro* DE ORQUÍDEAS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Tabela 1. Tratamentos do primeiro experimento e seus respectivos valores de pH, após a solidificação do meio.....	52
Tabela 2. Tratamentos do segundo experimento com pH ajustado para $6,4 \pm 2$ antes de sua solidificação.....	53
Tabela 3. Resultados 10 meses após a semeadura dos frascos.....	56
Tabela 4. Frascos contaminados no segundo experimento, 12 dias após a semeadura.....	56
Tabela 5. Resultados aos sete meses e 23 dias após a semeadura dos frascos.....	57
Tabela 6. Número de sementes germinadas em cada frasco de cada tratamento. Dados Reais.....	59

Tabela 7. Número de sementes germinadas em cada frasco de cada tratamento com os valores transformados.....	59
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I: OCORRÊNCIA DE DOENÇAS EM ORQUÍDEAS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Figura 1. *Cattleyas* híbridas 67 (A), 54 (D) e 45 (G) com sintomas de mosaico nas pétalas, devido a infecção dupla de CymMV e ORSV. Orquídea 67: lesões necróticas nas folhas (B). Lesões cloróticas em *Chenopodium amaranticolor* após inoculação dos extratos das folhas das orquídeas 67 (C) e 54 (E) respectivamente. Resultado do teste “Immunostrip”, da Empresa norte-americana Agdia, acusando, pela presença de três bandas coloridas na tira, a infecção dupla de CymMV e ORSV (F). *Cattleya* híbrida 45: lesões necróticas nas folhas (H) e pseudo-bulbos (I).....31

Figura 2. *L. crispera* apresentando manchas de *Colletotrichum gloeosporioides* nas pétalas (A). Sintomas severos de infecção simples de CymMV na planta 16 (B). Lesões causadas nas folhas de *Cattleya hybrida* por *Aphelenchoides fragariae* (C). *Denphalium sp.* com sintomas de ferrugem causado por *Puccinia sp* (D). Detalhes das pústulas de ferrugem na região ventral das folhas (E). Lesões cloróticas locais em *Solanum melongena* L.(F).....32

Figura 3. Plantas de *Phalaenopsis hybrida* (A) e *Denphalium sp.* (B) apresentando floradas normais, apesar da infecção dupla de CymMV e ORSV e infecção simples de CymMV, respectivamente. *Cattleya hybrida* com os sintomas de *Botrytis sp.* nas pétalas (C).....32

CAPÍTULO II: OCORRÊNCIA DE ESPÉCIES DE *Aphelenchoides* EM ORQUÍDEA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Figura 1. *Aphelenchoides fragariae*: Folhas de orquídeas apresentando lesões necróticas (A, B e C) devido à infecção; Cauda do macho apresentando mucro caudal (D); Folhas de *Begonia x tuberhybrida*, após 60 dias da inoculação e folha sadia da mesma planta (E); Lesões necróticas em *Asplenium nidus*, após 150 dias da inoculação (F).....40

Figura 2. - *Aphelenchoides ritzemabosi*: orquídeas apresentando lesões necróticas nas folhas (A) devido à infecção; região do metacorpo, mostrando aparelho valvular bem refringente, estilete e lábios (B); extremidade da cauda e mucro caudal (C); Sintomas em folha de *Begonia x tuberhybrida*, após 35 dias da inoculação (D); Sintomas em folha de *Chrysantemum sp.*,

após 19 dias da inoculação. À direita inoculada e à esquerda, sadia (E); Sintomas em *Asplenium nidus* L., após 180 dias de inoculação (F).....41

CAPÍTULO III: OCORRÊNCIA DE CymMV EM ORQUÍDEAS DO GÊNERO ARUNDINA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Figura 1. Orquídea *Arundina bambusifolia*: Folhas novas apresentando lesões necróticas (A); Flor de uma planta sadia (B); Flor apresentando malformação e mosaico (C); Lesões necróticas em haste floral (D); Aborto de novas brotações (E); Teste imunocromatográfico da empresa norte-americana Agdia para o *Cymbidium mosaic virus* (F).....45

CAPÍTULO V: MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS PARA PROPAGAÇÃO *in vitro* DE ORQUÍDEAS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Figura 1. *Sophronitis cernua* (A); Cápsula com sementes (B); Sementes vistas ao microscópio ótico. Somente as sementes escuras possuem endosperma e são, portanto viáveis (C).....54

Figura 2. *Epidendrum ellipticum* (A); Cápsula e sementes (B); Câmara de fluxo laminar durante a semeadura (C); Visualização de sementes ao microscópio ótico. A semente da esquerda é inviável, já à da direita, possui endosperma(D); Frascos na câmara de crescimento (E).....55

Figura 3. Percentual de contaminação em cada tratamento.....58

Figura 4. Percentual de germinação em cada tratamento.....58

Figura 5. Resultado da germinação *in vitro* após 353 dias da semeadura. O Meio Básico foi o único que permitiu o desenvolvimento dos protocormos até a fase de plântula, com folhas e raízes desenvolvidas (A e B). Os tratamentos que receberam canela em pó como ingredientes não obtiveram esse mesmo desenvolvimento (C, D e E).....60

DISCUSSÃO.....61

CONCLUSÃO.....63

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....64

ANEXO: RESUMO DE TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS.....69

1. INTRODUÇÃO

1.1 As orquídeas.

As orquídeas constituem, provavelmente, a maior família das angiospermas com cerca de 850 gêneros e 20.000 espécies (SOUZA & LORENZI, 2005), além de mais de 30.000 híbridos já produzidos. Elas podem ser encontradas do ártico até os trópicos, desde o nível do mar até mais de 4.000 metros de altitude, vegetando em árvores, rochas e solo.

O Brasil é conhecido no cenário internacional como um dos países com flora e fauna mais exuberantes e diversificadas, mas o desmatamento e a exploração econômica extrativista não sustentada vêm colocando em risco as espécies nativas de orquídeas em nossas florestas. A biodiversidade da Floresta Amazônica, por exemplo, é apontada pelas comunidades científicas como a maior do planeta.

No Brasil ocorrem cerca de 200 gêneros e 2.500 espécies de plantas da família Orquidaceae Juss. (SOUZA & LORENZI, 2005), o que corresponde a mais de 10% do número de espécies de orquídeas do mundo, além de uma quantidade incerta de espécies que ainda não foram catalogadas, ocorrendo espécies exclusivamente brasileiras.

Apesar da aparente resistência, as orquídeas são extremamente sensíveis, agindo como um sensor de alerta para botânicos nas áreas em desmatamento. Em mata parcialmente derrubada, são as orquídeas as primeiras a mostrarem ataques de pragas e doenças devido ao desequilíbrio ambiental (SEGATTO, 2001). Elas também são utilizadas pela cosmetologia, na produção de perfumes. Do gênero *Cyrtopodium* R.Br., 1813, popularmente chamada de "cola-de-sapateiro", por exemplo, é extraído um sumo de seus pseudobulbos usado na colagem de couro, papel e madeira. Essa goma também é usada, em Goiás, para encerar os liços de teares manuais primitivos. O *Cyrtopodium* R.Br., 1813 é usado com fins medicinais no interior do país, onde sua goma ajuda a cicatrizar lesões, assim como estancar o sangue em cortes e feridas. Com a planta também se produz uma pomada que auxilia no tratamento do terçol. Das plantas do gênero *Vanilla* Plum. ex Mill., 1754 extrai-se a essência de baunilha utilizada mundialmente na gastronomia (SEGATTO, 2001).

A exemplo de algumas espécies de animais da fauna nacional, as orquídeas em extinção são vistas como raridades. Raridade que também está diretamente ligada à dificuldade de cultivo. As orquídeas raras dificilmente sobrevivem quando retiradas dos locais em que nascem. Assim, espécies raras são encontradas nos seus *habitats* naturais, mesmo que seja em grandes populações de plantas. A variedade morfocromática também é causa da raridade, como uma flor branca ou uma semi-alba em meio a uma população de flores vermelhas. Devido a sua beleza e valor, muitas orquídeas são retiradas de nossas matas, correndo risco de entrarem em extinção. Essas plantas não são lembradas em trabalhos de reflorestamento e repovoamento de áreas degradadas, sendo sua importância biológica ignorada pelas autoridades competentes, assim como ocorre com a maioria das espécies epífitas, tão ricas em nossas matas nativas.

1.2 O mercado da floricultura

Para o mercado da floricultura, a orquídea é uma das flores mais valorizadas, devido à sua beleza e exotismo. Existe em todo o mundo um grande número de adeptos da orquidofilia, que buscam trazer para as suas coleções a maior variedade de formas e dimensões. O agronegócio da floricultura nacional é expressivo e tem aumentado muito nos últimos anos. Ele é responsável por cerca de 40.000 empregos diretos nos demais elos de sua cadeia produtiva: fornecimento, distribuição, transporte, comércio varejista e arte floral. Esse número se amplia bastante nos períodos festivos do calendário brasileiro: Páscoa, Dia das Mães e dos

Namorados, Finados, Natal e Ano Novo. Ocasões em que os quase 12.000 pontos de venda de flores e plantas ornamentais existentes no país necessitam aumentar a força de trabalho, ampliando o mercado para floristas e entregadores em até 100%. Em termos de inferências produtivas fiscais (ICMS, PIS/CONFINS, FUNRURAL e outros), estima-se que propicie à União, Estados e municípios, a arrecadação de recursos na ordem de R\$ 235,5 milhões (SEAG, 2007). A floricultura nacional se faz presente também nas exportações, tendo contribuído, em 1999, com cerca de US\$ 13,1 milhões na balança comercial brasileira, e faturamento de US\$ 1,5 bilhões no mesmo ano, o que significa um crescimento de 89%, em relação a 1995. Em 2004, exportações recordes de flores e plantas ornamentais do Brasil atingiram US\$ 23,5 milhões, sendo que o setor de mudas de plantas ornamentais, no qual as orquídeas se inserem, exportou os maiores valores, acumulando, no ano, um faturamento da ordem de US\$ 11,387 milhões, representando 48,46% do valor total exportado pela floricultura do País.

1.3 A fitossanidade

Produtores e colecionadores cultivam inúmeras variedades e espécies em um mesmo local, geralmente protegidos em estufas, cada uma com grande probabilidade de reagir de maneira distinta a patógenos. Surgem assim, para os cultivadores, inúmeras dificuldades relativas à diagnose e controle de doenças, abrindo-se um complexo e estimulante campo para os fitopatologistas (GIORIA *et al.*, 2003). As práticas preventivas constituem as mais importantes no cultivo de orquídeas, principalmente pela incidência de viroses, para as quais ainda não existe um controle curativo.

Nos Estados Unidos, por exemplo, há mais de 130 doenças identificadas que afetam, em maior ou menor grau, as orquídeas, sendo essas causadas por fungos, bactérias e vírus (COOKE, 1999). No Brasil não é diferente, apesar de haverem poucos estudos sobre o assunto, principalmente com relação ao parasitismo de nematóides fitoparasitos.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

- identificar as principais doenças que ocorrem em orquídeas no Estado do Rio de Janeiro;
- desenvolver um kit diagnóstico para os principais fitopatógenos identificados;
- desenvolver um meio de cultura alternativo, menos dispendioso e mais acessível ao pequeno produtor de mudas;
- testar alguns componentes naturais para servirem como defensivos naturais contra os microrganismos contaminantes que possam surgir durante o processo de micropropagação.
- colaborar com a preservação de nossas orquídeas nativas através da pesquisa em torno da micropropagação dessas plantas em condições de laboratório.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. A reprodução das orquídeas

A reprodução sexuada das orquídeas é um tanto incomum. Em apenas um fruto de orquídea é possível encontrar mais de 800.000 diminutas sementes.

A reprodução das orquídeas por sementes pode ser feita por dois métodos: o simbiótico e o assimbiótico.

O simbiótico é o método de reprodução das orquídeas na natureza. As orquídeas possuem hábito micotrófico, ou seja, são fisiologicamente dependentes de seus fungos simbiontes (BERGMANN & ALEXANDRE, 1998). As sementes de orquídeas, ao contrário de todas as demais sementes, não possuem reservas nutritivas, são desprovidas de endocarpo, com tamanho muito pequeno, contendo um embrião de aproximadamente 0,1 mm que, durante a germinação, dilata-se para formar uma pequena estrutura denominada protocormo ou protocormóide. Naturalmente ocorre a deiscência das cápsulas e as sementes são lançadas no ambiente, entretanto, essas sementes para germinarem e gerarem novas plantas, necessitam de condições especiais de temperatura, umidade e associações com micorrizas.

O método assimbiótico ou cultura *in vitro* de sementes de orquídeas, foi estabelecido por Lewis Knudson em 1922. Assim, os métodos *in vitro*, embora geralmente de custo elevado, têm uma capacidade produtiva elevadíssima e com resultado mais seguro, tendo sido adotados pelos estabelecimentos comerciais e até mesmo pelos orquidófilos.

3.1.1. Sistemas de propagação

Existem vários sistemas de propagação de orquídeas, os mais simples são variações de algum processo de propagação assexuada podendo ser divisão de touceiras; divisão de pseudobulbos; divisão de bulbos velhos e, indução de brotamento a partir de hastes florais. Entretanto, estes processos, embora bastante simples e com resultados seguros, têm uma capacidade reprodutiva limitada, pois sempre dependem de algum indivíduo adulto para ser partido para formar uma nova planta, que necessita de dois até oito anos para formar um novo adulto (CAMPOS, 2002).

A micropropagação é hoje uma alternativa que maximiza a propagação de várias espécies, tendo como vantagem a fixação de ganhos genéticos em populações clonais e a obtenção de um grande número de plantas sadias e de alta qualidade, em pequeno espaço físico e em curto tempo, independentemente de fatores climáticos limitantes (RAMOS & CARNEIRO, 2007). A micropropagação é realizada por meio dos processos de cultura de meristemas e sementeiras.

Na cultura de meristemas, um meristema da orquídea é retirado, colocado em meio de cultura para que ele se multiplique em milhares de plântulas, que serão clones da planta mãe. Já na sementeira, duas plantas são cruzadas ou então uma planta excepcional é autofecundada, o que aumenta a variabilidade genética. O resultado é o mesmo que ocorre na natureza: variedades com cores e formatos distintos.

Outro processo reprodutivo que aumenta a possibilidade de variações morfocromáticas é a hibridação. No entanto, seu principal objetivo é alcançar flores grandes, de boa forma e textura, flores planas, que não tenham pétalas viradas para trás, e com cores únicas.

Os tradicionais meios de cultura utilizados para a micropropagação por sementes ou cultura de meristemas são inacessíveis para pequenos produtores ou para entidades que visam propagar essas espécies para repovoamento de áreas nativas reflorestadas e parques Nacionais

e Estaduais ou Áreas de Preservação Ambiental, o que tornam bem-vindas todas as novas informações que colaborem para esse fim.

3.2. Os meios de cultura para micropropagação

Além da tradicional fórmula de Knudson, nos anos subseqüentes outros métodos de micropropagação, utilizando as mais diferentes fontes de explantes, foram testadas com sucesso. Até os dias de hoje utiliza-se a tradicional fórmula C de Knudson, aperfeiçoada pelo autor em 1946, para a cultura assimbiótica em laboratório. A reprodução de orquídeas por semente teve a partir dessa conquista de Knudson, um desenvolvimento extraordinário em todo o mundo e o trabalho de reprodução de orquídeas passou a ser realizado em laboratórios de biotecnologia, com equipamentos de alto custo (CAMPOS, 2002).

Em 1960, George Morel, trabalhando em laboratório na França, modificou o meio C de Knudson, utilizando a orquídea *Cymbidium*, conseguindo realizar a primeira reprodução assexuada partindo de gemas apicais. Atualmente, os centros de biotecnologia, a cada dia que passa, são os responsáveis pelas inovações nessa área. Morel produziu milhares de plantas em um ano, a partir de um único ápice de um broto (meristema).

A clonagem de orquídeas por cultivo de meristemas se converteu assim na primeira aplicação comercial da propagação vegetativa *in vitro*.

Em 1962, os cientistas Murashige e Skoog desenvolveram um novo meio de cultura, denominado MS, que é utilizado na micropropagação de praticamente todas as espécies de interesse econômico. O meio MS foi uma das primeiras formulações melhoradas usadas em cultura de tecidos de plantas, apresentando altos níveis de nitrato de potássio e amônio (MURASHIGE & SKOOG, 1962).

Visando o aprimoramento desta técnica para cada espécie, diversos pesquisadores em todo o mundo dão a sua contribuição e os tradicionais meios de cultura recebem modificações e adições de novos componentes.

A adição de carvão ativado até 2g L^{-1} , por exemplo, é largamente utilizada com a finalidade de eliminar substâncias tóxicas produzidas pelo explante. Concentrações em torno de 0,3% são usadas quando se deseja enraizamento *in vitro*, pois auxiliam na ação das auxinas e promovem a fixação dos compostos fenólicos produzidos pelo explante. Sugere-se, em alguns casos, o aumento da concentração de auxina, quando na presença de carvão ativado (GUERA & NODAI, 2006).

Uma das mais importantes aplicações da cultura de meristemas é a possibilidade de se obter plantas livres de patógenos, sendo os vírus os mais temidos pelos produtores de orquídeas, uma vez que plantas infectadas não podem ser tratadas, sendo eliminadas em orquidários sérios. Esse processo também é chamado de limpeza clonal. Podemos, assim produzir clones sadios a partir de uma planta matriz infectada por vírus. FREITAS-ASTUA & REZENDE (1998) obtiveram 100% de mudas de *Cymbidium* livre de vírus através da quimioterapia de meristemas, adicionando o produto virazole (Ribavirim) na concentração de 30 ppm ao meio de cultura para sub-cultivo, com a seguinte composição: (ingredientes por litro) 20,0 g açúcar, 2,6 g hyponex, 9,4 g Agar, 1,0 g peptona, 1,0 g carvão ativado, 50,0 g caldo de batata, 30,0 mg FeNa EDTA, 2,4 mg piridoxina, 0,06 mg tiamina e 100,0 mg ácido ascórbico, que não causaram problemas de fitotoxidez.

3.2.1 Meios de cultura alternativos

Com o objetivo de baratear e simplificar os meios de cultura e a micropropagação em si, vários pesquisadores se empenharam para criar novos meios que pudessem ser feitos fora de laboratórios, sem o custo de equipamentos e insumos de preços elevados e produtos químicos corrosivos e perigosos, podendo ser preparados e manipulados por qualquer pessoa.

Uma receita de meio de cultura muito utilizada e amplamente divulgada em livros, em revistas e na *Internet* é composta por água de coco verde, banana nanica, tomate cereja, mamão, abacate, batata, açúcar, gelatina ágar-ágar, carvão em pó e água destilada. Essa receita é utilizada por vários profissionais e amadores com resultados surpreendentes, entusiasmados pelo seu baixo custo e resultados, em alguns casos, até melhores do que os tradicionais meios usados em sofisticados laboratórios de biotecnologia (CAMPOS, 2002). Em qualquer feira livre ou mercado de produtos para culinária caseira podemos adquirir os componentes para esse meio de cultura. Estas receitas quando feitas com todos os componentes de cultivo orgânico, sem agrotóxicos, podem receber a semente após a esterilização, sem necessidade de correção de nível de acidez (pH), não havendo necessidade de potenciômetro que é de custo elevado (CAMPOS, 2002).

Unemoto *et al* (2007) tiveram êxito recente com um meio de cultura simplificado, contendo apenas adubo comercial de formulação NPK (6-6-8), na concentração de 3,0 ml/l adicionado de sacarose, ágar e carvão ativado, para crescimento *in vitro* de *Oncidium nanum* e *Cattleya forbesii*. Além da facilidade do preparo e baixo custo dos componentes utilizados, outro fator favorável é a não utilização dos compostos nitrato de amônia e nitrato de potássio, utilizados no meio MS e cuja obtenção é controlada pelo Ministério da Defesa que consta no Decreto nº 3665 de 20 de novembro de 2000 (BRASIL, 2000), por serem produtos químicos de interesse militar.

3.3. A contaminação

Um dos maiores problemas da produção industrial de mudas é a porcentagem de contaminação do meio nutritivo por fungos e bactérias oportunistas durante as etapas de propagação *in vitro*. Em laboratórios de vários países, do total de contaminação, as perdas causadas por fungos foram de 10-35%. Em biofábricas brasileiras, já foram registradas mais de 30% de contaminação, mesmo com todos os cuidados de assepsia. Assim, os fungicidas e bactericidas incorporados ao meio de cultura para minimizar os problemas de contaminação tem apresentado efeitos positivos na multiplicação de plantas cultivadas tanto *in vitro* como *in vivo*. COLOMBO *et al.* (2004) relataram que doses de 0,1 e 0,2 g/l do ingrediente ativo clorotalonil foram positivas para a propagação *in vitro* de *Laelia lundii*, propiciando um melhor desenvolvimento vegetativo, enraizamento e proporção de pegamento de mudas, durante a etapa de aclimatização, para essa espécie e também para *Cattleya loddigesii*.

Diversos autores relatam as propriedades antimicrobianas de alguns condimentos muito populares como o manjeriço (*Ocimum sanctum* Linn.), alho (*Allium sativum* L.), canela (*Cinnamomum burnannil* Meissn), cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.), controlando e inibindo o crescimento de alguns fungos como *Absidia glauca*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Colletotrichum capsici*, *Eurotium repens*, *Fusarium moliniforme*, *Penicillium spp.*, *Rhizopus nodosus* (SHELEF, 1983).

Há relatos da eficiência da canela em pó controlando a doença podridão negra, cujos agentes etiológicos são os fungos *Pythium ultimum* e *Phytophthora cactorum* (WATANABE, 2002). Segundo Campos (2002), *Pythium ultimum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *cattleyae*, este

último, agente etiológico da doença murcha ou podridão de raiz e pseudobulbo em orquídeas, teriam a sua ação neutralizada pela ação de uma calda de cebola ou cebolinha.

Com base nessas informações, resolvemos testar o efeito desses condimentos como agroquímicos alternativos, na propagação por sementeira *in vitro* em espécies de orquídeas e gerar um meio-de-cultura alternativo, com propriedades antimicóticas e antibacterianas e de fácil aquisição nas prateleiras dos supermercados.

3.4. As Doenças que atacam as orquídeas

As orquídeas, apesar de serem consideradas relativamente rústicas com relação ao cultivo e manejo, são suscetíveis a um número considerável de doenças. A seguir descreveremos as principais doenças relatadas em orquídeas no Brasil e no exterior, comentando sobre a sua patogenicidade específica e sintomas ocasionados nas plantas infectadas.

3.4.1. Doenças fúngicas

3.4.1.1. Podridão negra:

Agentes etiológicos: *Pythium ultimum* Trow e *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn.) J. Schöt.

Hospedeiros relatados: *P. ultimum* foi relatado em *Bothriochilus*, *Brassia*, *Coelogyne*, *Cymbidium*, *Huntleya*, *Laelia*, *Renanthera* e *Vuylstekeara*; enquanto que a infecção com *P. cactorum* foi constatada em *Aerides*, *Ascocentrum*, *Epicattleya*, *Galeandra*, *Gongora*, *Maxillaria*, *Paphiopedilum*, *Potinara*, *Rhynchostylis*, *Rodriguezia*, *Schomburgkia*, *Trichocentrum* e *Trichocidium*. Foram relatados ambos os fungos em *Ascocenda*, *Brassavola*, *Brassocattleya*, *Brassolaeliocattleya*, *Cattleya*, *Cyrtopodium*, *Dendrobium*, *Epidendrum*, *Laeliocattleya*, *Oncidium*, *Phaius*, *Sophrrolaeliocattleya*, *Vanda* e *Phalaenopsis* (GIORIA *et al.*, 2003).

Etiologia: *P. ultimum* e *P. cactorum* representam um dos mais sérios problemas da orquidicultura. São fungos altamente agressivos durante os períodos de alta umidade e temperatura de 10°C a 22°C (*P. ultimum*) ou 10°C a 20°C (*P. cactorum*). Produzem zoósporos biflagelados disseminados quase que exclusivamente por água livre, portanto sua introdução na cultura pode se dar principalmente por meio de água de irrigação e/ou chuva, substratos e vasos contaminados. Produzem oósporos que são esporos de origem sexuada e de resistência.

Sintomas: “Damping-off” ou tombamento de mudas em sementeiras e plântulas, liquidando todas as plantas em poucos dias. Em plantas adultas, a infecção produz manchas encharcadas, tipicamente negras, que progridem em forma ascendente, da raiz para as folhas. Os órgãos atacados adquirem consistência mole e se destacam da planta. Sintomas são observados em raízes, hastes, pseudobulbos ou folhas, sendo a penetração do fungo preferencialmente pela raiz e/ou colo da planta. Em casos extremos, a planta morre dentro de 1 a 2 meses.

3.4.1.2. Murcha de Fusarium ou Podridão de raiz e pseudobulbo:

Agente etiológico: *Fusarium oxysporum* Schletend, *f.sp. cattleyae* V. Foster

Hospedeiros relatados: *Aerides*, *Ascocenda*, *Brassavola*, *Brassocattleya*, *Brassolaeliocattleya*, *Bulbophyllum*, *Catasetum*, *Cattleya*, *Cycnoches*, *Cymbidium*, *Lycaste*, *Oncidium*, *Phalaenopsis*, *Potinara*, *Sophrolaeliocattleya* e *Vanda*.

Etiologia: o fungo é favorecido por temperatura na faixa de 25°C a 30°C. É um patógeno vascular que infecta as plantas através das raízes ou ferimentos nos rizomas, produzidos principalmente durante a divisão das plantas para propagação. Produz clamidósporos, que são esporos de resistência ou sobrevivência.

Sintomas: A doença também é conhecida por “canela seca”, por originar-se geralmente como uma podridão seca nas raízes das plantas, subindo pelo rizoma e atingindo o pseudobulbo, onde geralmente tem evolução lenta. Por matar as gemas, a planta sofre um longo processo de decadência, culminando com a morte após um ano ou mais. É facilmente visível ao se cortar essa parte da planta. Frequentemente, esta doença pode estar associada à presença de nematóides que, ferindo as raízes, facilitam a colonização das plantas pelo fungo patogênico (BERGMANN & ALEXANDRE, 1998). A infecção se dá geralmente por meio de substrato, vasos e ferramentas de corte contaminadas (GIORIA *et al.*, 2003).

3.4.1.3. Antracnose:

Agente etiológico: *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.

Hospedeiros relatados: *Aerides*, *Aliceara*, *Angraecum*, *Ansellia*, *Ascocenda*, *Ascocentrum*, *Brassavola*, *Brassia*, *Brassocattleya*, *Brassolaeliocattleya*, *Bulbophyllum*, *Catasetum*, *Cattleya*, *Cattleytonia*, *Cochleanthes*, *Cymbidium*, *Cyrtopodium*, *Dendrobium*, *Doritis*, *Epicattleya*, *Epidendrum*, *Eria*, *Gongora*, *Gramatophyllum*, *Huntleya*, *Ionopsis*, *Laelia*, *Laeliocattleya*, *Lycaste*, *Maxillaria*, *Miltonia*, *Neomoorea*, *Odontocidium*, *Odontoglossum*, *Oncidium*, *Paphiopedilum*, *Peristeria*, *Pescatorea*, *Phaiocalanthe*, *Phaius*, *Phalaenopsis*, *Phragmipedium*, *Pleurothallis*, *Renades*, *Rhynchostylis*, *Rodriguezia*, *Schomboepidendrum*, *Schomburgkia*, *Sophrolaeliocattleya*, *Spathoglottis*, *Stanhopea*, *Trichopilia*, *Vanda*, *Vandopsis*, *Vanilla*, *Vulstekeara*, *Wilsonara* e *Zygopetalum*.

Etiologia: Fungo de distribuição mundial; porém, é encontrado com maior frequência em climas tropicais e subtropicais. Seu desenvolvimento é favorecido por umidade elevada, períodos de dias encobertos e temperaturas entre 10°C e 20°C. A sua disseminação ocorre basicamente com o auxílio da água, necessitando de ferimentos, injúrias mecânicas ou causadas por frio, sol, etc., para ocorrer a infecção. O excesso de nitrogênio também favorece o ataque desse patógeno.

Sintomas: O patógeno ataca todas as partes da planta, porém, geralmente os sintomas são mais frequentes nas folhas. Inicialmente ocorre uma descoloração parda em forma circular levemente deprimida e bastante definida. A lesão aumenta rapidamente de tamanho e, sob condições favoráveis, pode atingir todo o limbo foliar. O centro da lesão é sempre deprimido, de coloração castanho-pardacenta e com inúmeros anéis concêntricos. Em flores o sintoma é semelhante ao produzido por *Botrytis cinerea* (GIORIA *et al.*, 2003).

3.4.1.4. Ferrugem:

Agentes etiológicos: *Sphenospora kevorkianii* Linder = *Uredo nigropunctata* P.Henn.; *Sphenospora mera* Cumm.; *S. saphena* Cumm.; *Uredo epidendri* P. Henn, *Uredo behnickiana* P. Henn. e *Hemileia oncidii* Griffon & Malbl.

Hospedeiros relatados: *Batemannia*, *Bletia*, *Bletilla*, *Brassavola*, *Brassia*, *Bulbophyllum*, *Capanemia*, *Catasetum*, *Cattleya*, *Caularthron*, *Cochlioda*, *Cycnoches*, *Cyrtopodium*, *Dendrobium*, *Encyclia*, *Epicattleya*, *Epidendrum*, *Gongora*, *Hexisea*, *Huntleya*, *Ionopsis*, *Laelia*, *Leochilus*, *Lockhartia*, *Lycaste*, *Masdevallia*, *Maxillaria*, *Miltonia*, *Mormodes*, *Notylia*, *Odontoglossum*, *Oeceoclades*, *Oncidium*, *Pelexia*, *Peristeria*, *Pescatorea*, *Ornithocephalus*, *Phaius*, *Pleurothallis*, *Polystachya*, *Rodriguezia*, *Schomburgkia*, *Sigmatostalix*, *Sobralia*, *Spathoglottis*, *Stanhopea*, *Trichoceros*, *Trichopilia*, *Trigonidium*, *Xylobium*, *Zygopetalum* e *Zygostates*. O presente trabalho comprovou a possibilidade desse tipo de doença infectar plantas da espécie *Dendrobium phalaenopsis*, conhecidos como *Denphal*.

Etiologia: Fungos endoparasitas, favorecidos por alta umidade relativa e temperaturas amenas, especialmente nas regiões baixas e úmidas, onde o vapor d'água condensa-se à noite. Os esporos são disseminados pelo vento e respingos de água.

Sintomas: A doença se manifesta somente nas folhas, quase que exclusivamente na face inferior, onde inicialmente observam-se pequenas pústulas de coloração amarelo-laranja ou marrom-avermelhada. Essas pústulas, em função da idade, podem enegrecer e se desenvolver de modo concêntrico, lembrando a aparência de um alvo. Manchas cloróticas são observadas na região foliar oposta à pústula (GIORIA *et al.*, 2003). Essa doença é frequente em espécies de *Oncidium* sob condição de alta umidade. *Hemilea oncidii* difere das demais por não produzir pústulas, aparecendo como uma cobertura de coloração amarela recobrando as partes infectadas. Os fungos causadores de ferrugens são caracterizados por altas taxas de reprodução (BERGMANN & ALEXANDRE, 1998).

3.4.1.5. Mofo cinzento:

Agente etiológico: *Botrytis cinerea* Pers e *Botrytis* sp.

Hospedeiros relatados: *Aerides*, *Ascocentrum*, *Brassia*, *Brassocattleya*, *Brassolaeliocattleya*, *Broughtonia*, *Calanthe*, *Cattleya*, *Cycnoches*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Doritaenopsis*, *Epidendrum*, *Laelia*, *Laeliocattleya*, *maxillaria*, *Miltonia*, *Oncidium*, *Paphiopedilum*, *Phaius*, *Phalaenopsis*, *Potinara*, *Trichoglottis*, *Vanda* e *Vanilla*.

Etiologia: patógeno facultativo, que sobrevive em matéria orgânica saprofiticamente, na forma de escleródio e/ou micélio dormente. O fungo é favorecido por condições de alta umidade, baixa ventilação e temperaturas amenas, entre 16°C e 18°C. Ataca exclusivamente pétalas, sépalas e labelo das flores. Flores mais velhas têm maior susceptibilidade às infecções. A disseminação de conídios ocorre principalmente pelo vento (GIORIA *et al.*, 2003).

Sintomas: Inicialmente surgem minúsculas pintas marrons, que crescem até destruir totalmente as flores.

3.4.1.6. Mancha de Cercospora ou cercosporiose:

Agentes etiológicos: *Cercospora odontoglossi* Prill. & Delacr., *C. angraeci*, *C. dendrobii*, *C. epipactidis*, *C. persisteriae* e *Cercospora* spp. (BERGMANN & ALEXANDRE, 1998)

Hospedeiros relatados: cerca de 70 gêneros de orquídeas são afetados por esta doença, sendo os mais importantes: *Brassavola*, *Cattleya*, *Cymbidium*, *Epidendrum*, *Laelia*, *Miltonia*, *Odontoglossum*, *Oncidium* e *Sophranitis*.

Etiologia: Apesar da ocorrência dessa doença ser relativamente comum, não parece ter importância no cultivo dessa ornamental (GIORIA *et al.*, 2003). Esses fungos são favorecidos por estações com alta umidade relativa, principalmente as chuvosas, apresentando, no entanto, alta capacidade de adaptação às diversas condições climáticas. Doença frequente em vasos coletivos de plântulas.

Sintomas: Apresentam-se como áreas irregulares e amareladas, na face inferior das folhas, que progridem para deprimidas pardo-púrpuras com centro pardo-claro e com pontuações de coloração negra (frutificação do fungo). Na face superior do limbo, na área correspondente à lesão na face inferior, surge uma área clorótica, que eventualmente se torna necrótica, (GIORIA *et al.*, 2003).

3.4.1.7. Murcha de Sclerotium ou Podridão da base:

Agente etiológico: *Sclerotium rolfsii* Sacc.

Hospedeiros relatados: *Cattleya*, *Cynoches*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Phaius*, *Phalaenopsis*, *Spathoglottis* e *Vanda*.

Etiologia: Esse patógeno sobrevive de maneira saprofítica em restos de cultura, na forma de micélio e escleródio, por cinco anos ou mais. A disseminação ocorre através da água de irrigação ou chuva e por meio de solo ou substrato contaminado. Alta umidade, teor elevado de matéria orgânica no substrato e temperaturas elevadas (acima de 26°C) favorecem a ocorrência do patógeno (GIORIA *et al.*, 2003).

Sintomas: Presença de micélio cotonoso primeiramente na base da planta, podendo espalhar-se por todo o pseudobulbo e folhas. Com a evolução da doença, pode-se visualizar a formação de escleródios com cerca de 1mm de diâmetro (GIORIA *et al.*, 2003), que são estruturas esféricas com aproximadamente 2 mm de diâmetro, a princípio brancas e depois castanhas ou marrons, lembrando sementes de mostarda. Essas formações são estruturas de resistência do fungo, originadas pelo enovelamento e segmentação das suas hifas vegetativas. Tendo como função resistir a condições ambientais desfavoráveis, podem passar longos períodos até germinar novamente quando as condições forem favoráveis, tornando a infectar novas plantas (BERGMANN & ALEXANDRE, 1998). A infecção pelo fungo provoca o apodrecimento dos tecidos vegetais da base da planta, acarretando obstrução do fluxo de seiva e conseqüentemente, amarelecimento e queda de folhas.

A ocorrência dessa doença é esporádica, normalmente ligada a substrato contaminado. Sendo assim, o problema é facilmente contornado através da higienização do substrato.

3.4.1.8. Manchas foliares de Phyllosticta:

Agente etiológico: *Phyllosticta capitalensis* Hospedeiros relatados: cerca de 74 gêneros de orquídeas são atacadas por esse fungo, entre elas, *Aspásia*, *Brassolaeliocattleya*, *Catasetum*, *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Encyclia*, *Epidendrum*, *Laelia*, *Laeliocattleya*, *Maxillaria*, *Miltônia*, *Odontocidium*, *Odontoglossum*, *Phalaenopsis* e *Vanda* (UCHIDA, 1994).

Etiologia: *Phyllosticta* sp., forma estruturas escuras, chamadas de picnídios, caracterizados por serem ostiolados, lenticulares e globosos, sendo imersos no tecido hospedeiro e apresentando apenas pequenas projeções perceptíveis na epiderme. A faixa

ótima para crescimento micelial situa-se entre 25°C e 28°C, sendo a sobrevivência do fungo viável em restos de cultura.

Sintomas: Esse fungo aparentemente não prejudica o desenvolvimento da planta, mas deteriora a qualidade visual para comercialização. As folhas atacadas apresentam manchas castanhas escuras circulares ou ovaladas, com bordos bem definidos e centro de coloração pardo-clara onde podem ser observados os picnídios do fungo. Dependendo da espécie infectada, podem surgir halos amarelados ao redor das lesões.

3.4.1.9. Podridão das raízes:

Agente etiológico: *Rhizoctonia solani* Kuhn.

Hospedeiros relatados: *Aerides*, *Aliceara*, *Brassavola*, *Brassocattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Doritaenopsis*, *Epicattleya*, *Epidendrum*, *Laeliocattleya*, *Oncidium*, *Paphiopedilum*, *Phalaenopsis*, *Potinara*, *Schomburgkia*, *Sophrolaeliocattleya*, *Trochocentrum* e *Vanda*.

Etiologia: Fungo favorecido por alta umidade do ar e do substrato e temperatura ao redor de 28°C, podendo sobreviver em restos de cultura, saprofiticamente, ou ainda, na forma de escleródios. Possui ampla gama de hospedeiros, podendo ser disseminado principalmente, por água e substrato contaminado. É cosmopolita e pode destruir orquídeas suscetíveis em qualquer idade.

Sintomas: “Damping-off” ou tombamento de mudas em sementeiras e plântulas. Ocorre raramente em plantas adultas de *Phalaenopsis* e *Cattleya*. Causa a deteriorização do sistema radicular, com sintomas reflexos de murcha na parte aérea. Segundo GIORIA *et al.* (2003), existem relatos deste fungo acarretando podridão seca e marrom na região basal de pseudobulbos de plantas adultas, causando perda de vigor e falta de novas brotações. O desenvolvimento da doença é lento. Plantas com essa podridão perdem o vigor de forma lenta com progressivo amarelecimento das folhas e pseudobulbos que se tornam finos e contorcidos. Novos brotamentos tornam-se raros (BERGMANN & ALEXANDRE, 1998).

3.4.1.10. Podridão de raízes de *Cylindrocarpon*:

Agente etiológico: *Cylindrocarpon radicola*. Wr.

Etiologia: Fungo de solo, largamente distribuído, ataca principalmente as raízes de plantas já enfraquecidas, sendo que a infecção se concentra nos tecidos mais próximos à superfície do solo.

Sintomas: As plantas atacadas perdem o vigor e atrasam o seu crescimento. Em casos graves, as raízes morrem e apodrecem até a região basal da planta (FAST, 1980).

3.4.1.11. Podridão de raízes de *Cylindrocladium*:

Agente etiológico: *Cylindrocladium sp.*

Sintomas: semelhantes aos da doença anterior. Os tecidos atacados enegrecem e definham. A infecção que se inicia geralmente na região do colo pode se alastrar para as raízes, assim como para as partes aéreas das plantas (FAST, 1980).

3.4.1.12. Mancha foliar de *Fusarium*:

Agente etiológico: *Fusarium moniliforme* Sheldon.

Hospedeiros relatados: O gênero *Dendrobium phalaenopsis* e seus híbridos.

Sintomas: Os sintomas iniciais da doença são pequenos pontos de coloração marrom-avermelhados nas folhas, que vão crescendo até tornar o limbo foliar pálido e quebradiço (crestamento). Em casos severos as folhas secam, o que é pouco comum. Segundo Fast (1980), esse mesmo fungo foi relatado nos Estados Unidos causando “damping-off” em sementeiras de *Cymbidium* e manchas em flores de *Cattleya*.

3.4.1.13. Mancha foliar e de bulbos:

Agente etiológico: *Diplodia sp.*

Hospedeiro relatado: *Cattleya spp.*

Sintomas: Manchas marrons nas folhas e bulbos (FAST, 1980).

3.4.1.14. Mancha de Macrophoma:

Agente etiológico: *Macrophoma sp.*

Hospedeiros relatados: *Cymbidium*, *Dendrobium* e *Cattleya*.

Sintomas: Manchas alongadas marrons com bordos negros em folhas e bulbos.

3.4.1.15. Outras Manchas foliares:

Agentes etiológicos: *Selenophoma dendrobii* Abiko e *Pestalotiopsis sp*

Hospedeiros relatados: *Dendrobium*

Sintomas: Esses fungos causam manchas foliares de coloração parda, arredondadas ou ovais, com bordos bem delimitados e a parte central mais clara. O manejo correto da cultura nos orquidários previne a ocorrência dessas doenças, destacando-se evitar o excesso de nutrientes e irrigação e proporcionar aumento de circulação de ar entre as plantas (BERGMANN & ALEXANDRE, 1998).

3.4.1.16. Crosta negra da baunilha:

Agente etiológico: *Mycoleptodiscus indicus* (V.P. Sahni) B. Sutton

Hospedeiros relatados: *Vanilla fragans*

Sintomas: manchas necróticas no caule, frutos e folhas, inicialmente circulares, escuras, planas, 1-5 mm de diâmetro, tornando-se posteriormente elipsóides e fusiformes ou irregulares, tomando uma coloração castanho-acinzentada, chegando a atingir por confluência, 20 mm de comprimento por 10 mm de largura. Sobre as lesões notam-se pequenas crostas negras que são os esporódios do fungo causal (BEZERRA & RAM, 1986).

3.4.2. Doenças bacterianas

3.4.2.1. Mancha aquosa ou mancha marrom:

Agente etiológico: *Acidovorax cattleya* (syn. *Pseudomonas cattleyae* (Pav.) Sav.).

Hospedeiros relatados: cerca de 41, entre eles, *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Odontoglossum*, *Paphiopedilum* e *Phalaenopsis*.

Etiologia: *Acidovorax cattleya* é uma bactéria Gram negativa, aeróbia estrita, baciliforme, móvel por meio de flagelos polares do tipo lofotríquia. Sua disseminação ocorre basicamente por insetos, água de irrigação ou de chuva e mudas contaminadas (GIÓRIA *et al.*, 2003). Segundo (BERGMANN & ALEXANDRE, 1998) *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* também estaria associada à doença.

Sintomas: No início, surgem manchas pardas circulares nas folhas, com aspecto aquoso, que crescem rapidamente, tornando-se deprimidas, escuras ou pardecintas, bem delimitadas, semelhantes à queimadura de sol. Causa morte de plântulas ou atinge folhas e pseudobulbos de plantas adultas. Em *Phalaenopsis*, quando as manchas atingem o centro da planta, esta morre dentro de alguns meses (COOKE, 1999). Em plantas simpodiais, como *Cattleya*, a bactéria fica restrita a algumas lesões em poucas folhas mais velhas, sendo não letal e sem importância.

3.4.2.2. Podridão mole:

Agente etiológico: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones 1901)

Hauben *et al.* 1999 emend. Gardan *et al.* 2003 (syn. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) e *Dickeya chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Samson *et al.* 2005 (syn. *Pectobacterium chrysanthemi*).

Hospedeiros relatados: *D. chrysanthemi* foi constatada infectando *Miltonia* e *Phalaenopsis*, e *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* em cerca de 16 gêneros, entre eles *Cattleya*, *Cymbidium*, *Laelia*, *Miltonia*, *Oncidium*, *Phalaenopsis* e *Vanda*.

Etiologia: são bactérias Gram negativas, anaeróbias estritas, móveis por flagelos peritríqueos, possuem ampla gama de hospedeiros, sendo pectinolíticas e oportunistas. Aproveitam-se da alta umidade relativa do ar (próxima a 100%), temperatura na faixa de 20°C a 30°C e de um estado de debilidade da planta, como ferimentos, para o início da infecção. Há casos de infecções que têm início em pseudobulbos velhos e que são oriundas de aberturas naturais, originadas da queda de folhas nos mesmos. A penetração ocorre também pelas lenticelas sob condições de alta umidade. Sua disseminação ocorre por insetos, água de irrigação ou de chuva.

Sintomas: segundo GIÓRIA *et al.* (2003), ocorrem principalmente em plantas que apresentam folhas não eretas ou com ângulo de inserção de aproximadamente 90°, as quais propiciam o acúmulo de água e favorecem o desenvolvimento do patógeno. Observam-se em folhas e pseudobulbos, lesões foliares inicialmente anarcasadas evoluindo para podridão mole ou mela, que acabam, praticamente destruindo toda a área afetada. Odor fétido de exsudados é um forte indicativo de infecção por essas bactérias.

3.4.3. Viroses

As viroses são as doenças mais graves das orquídeas, por sua facilidade de disseminação, perdas de valor e impossibilidade de tratamento. Assim, a única forma de

controle, nos dias atuais, é a erradicação de plantas atacadas, somado a outras medidas de prevenção de contágio. Segundo COOKE (1990), pode-se afirmar que, após o grau de contaminação visível atingir 20 ou 30% das plantas de determinada produção, o melhor é descartar e eliminar a coleção toda, pois as chances são de que a maioria das plantas, também esteja contaminada, embora ainda sem sintomas. Além disso, muitas vezes, a detecção de vírus é dificultada pelo fato que os mesmos se apresentam, comumente, com distribuição irregular na planta, sua concentração variar enormemente em diferentes condições ambientais e pela presença de substâncias (taninos, látex, compostos fenólicos) na planta infectada, que dificultam ou impedem a detecção do patógeno. Assim, devido à distribuição irregular do vírus na planta é necessário, para aumentar a probabilidade de obtenção de resultados confiáveis e reprodutíveis, que diversas amostragens sejam realizadas de uma única planta e pelo menos duas diferentes técnicas de detecção sejam empregadas, como testes biológicos e sorológicos, por exemplo (RIVAS, 2000).

É bastante comum a infecção dupla de vírus em orquídeas como, por exemplo, o CymMV e ORSV infectando juntos a mesma planta. Os vírus podem ser detectados em diferentes partes da planta, inclusive no pólen (BERGMANN & ALEXANDRE, 1998).

Apresentamos a relação dos vírus que já foram relatados infectando orquídeas no mundo.

3.4.3.1. Cymbidium mosaic vírus:

Agente etiológico: *Cymbidium mosaic virus* – CymMV. Gênero: Potexvirus

Hospedeiros: esse vírus infecta orquídeas de diversos gêneros em vários países, geralmente com alta incidência, os principais são *Cymbidium*, *Vanilla*, *Cattleya* e *Phalaenopsis*.

Etiologia e sintomas: Vírus capaz de induzir uma diversidade de sintomas em plantas infectadas, dependendo de fatores ambientais e idade do tecido vegetal. O sintoma mais comum é o mosaico, podendo ocorrer leves riscos cloróticos nas nervuras das folhas e pequena redução no número e tamanho das flores. Podem ainda mostrar sintomas severos de manchas anelares ou irregulares, cloróticas ou necróticas nas folhas (GIORIA *et al.*, 2003). Inicialmente, nas flores não há sintomas, mas, passados alguns dias, entre sete e quinze, dependendo da espécie, surgem riscos ao longo das nervuras dos segmentos florais, fruto da destruição do floema floral. Estes riscos são marrons em flores brancas e esbranquiçados em flores lilases e vermelhas. Ocorre necrose e/ou descontinuidade da coloração natural das sépalas e pétalas (“collor break”). Esse vírus pode infectar uma planta, sem afetar sua produtividade ou vigor, por muitos anos (COOKE, 1999), dificultando a identificação e detecção, baseando-se apenas nos sintomas visuais.

3.4.3.2. Odontoglossum ringspot virus:

Agente etiológico: *Odontoglossum ringspot virus*. – ORSV. Gênero: Tobamovirus.

Hospedeiros: ampla distribuição mundial e nacional. Identificado primeiramente em *Odontoglossum grande*, ataca praticamente todos os gêneros cultivados comercialmente.

Etiologia e sintomas: este vírus, embora altamente destrutivo, tem seu controle facilitado pelos seus sintomas, bastante característicos e facilmente visíveis. Nas folhas, são manchas irregulares de colorido vermelho a roxo. Essas manchas ou pintas geralmente possuem regiões necrosadas. Em *Odontoglossum*, causa lesões circulares nas folhas. Os

brotos podem ficar tortos, fortemente pigmentados e sem vigor. Nas flores surgem manchas descoloradas, com aspecto de aquarela desbotada. Ao contrário do CymMV, o ORSV vai degradando o vigor da planta, terminando por matá-la em alguns anos, por inviabilidade de brotação (COOKE, 1999).

Obs: Ambos os vírus infectam praticamente todas as espécies cultivadas, mas até o momento não foram encontradas em orquídeas selvagens. Podem ocorrer isoladamente ou em infecção dupla, sendo que neste caso os sintomas causados são indistinguíveis em diversos gêneros de orquídeas. Os dois vírus acima são bastante estáveis, não possuem vetores conhecidos e não há evidências de transmissão por sementes. São transmitidos através de instrumentos de corte infectados e, possivelmente, através de vasos e substrato contaminado (GIORIA *et al.*, 2003).

Obs.2: O ORSV, embora uma variante do tobacco mosaic vírus (TMV), é espécie distinta. Por sua vez, o TMV não infecta orquídeas. Apesar de não haver contaminação de orquídeas com ORSV através de contato manual de resíduos de cigarros, há risco de surgimento de novos tipos de vírus comuns às duas plantas que, assim como o TMV, poderiam estar presentes em alta concentração nos cigarros nacionais (COOKE, 1999). Daí provém a proibição de se fumar no interior de orquidários comerciais.

3.4.3.3. Orchid fleck virus:

Agente etiológico: *Orchid fleck virus* – OFV

Segundo o International Committee of Taxonomy of Viruses - ICTVdB, esse vírus ainda não se encontra classificado em gênero, família ou ordem. Sinônimos: *dendrobium leaf streak virus*, *dendrobium virus*, provavelmente *laelia red leafspot*, *short orchid virus*, *orchid virus*, *phalaenopsis chlorotic spot virus* (PhaCSV), *phalaenopsis hybrid virus*, *phalaenopsis virus* (ICTVdB, 2006).

Hospedeiros: *Odontoglossum*, *Cattleya*, *Laelia* e *Oncidium* entre outros.

Sintomas: os sintomas causados por esse vírus são variáveis, de acordo com o gênero de orquídea infectada. Sintomas do tipo anéis necróticos espalhados pelo limbo foliar e intercalados por áreas aparentemente normais, são os mais comuns, porém, em *Odontoglossum* aparecem sintomas de manchas amarelas nas folhas.

Foi demonstrada no Japão, a transmissão do OFV pelo ácaro *Brevipalpus californicus*, que já foi relatado no Estado de São Paulo, sendo, portanto seu possível vetor aqui no Brasil. Não há relatos sobre a transmissão do OFV por sementes ou através de instrumentos de corte (GIORIA, 2003). As espécies de fumo *Nicotiana glutinosa* e *N. tabacum* foram susceptíveis ao OFV, assim como o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), sendo, portanto, possíveis hospedeiros alternativos destes vírus.

3.4.3.4. Cucumber mosaic vírus:

Agente etiológico: *Cucumber mosaic virus* – CMV. Gênero *Cucumovirus*.

Hospedeiros: *Phalaenopsis*, em Taiwan e *Dendrobium nobile* no Brasil.

Etiologia e sintomas: é um vírus de distribuição mundial, capaz de infectar mais de 700 espécies vegetais, entre elas a trapoeraba (*Comellina* sp.), fumo e pimentão. É transmitido

por diversas espécies de afídeos de maneira não persistente (picada de prova). Apesar disso, sua incidência não parece ser comum em orquídeas. O sintoma ocasionado caracteriza-se pela presença de estrias brancas e deformações nas flores. NOBREGA (1947) relatou, entre os sintomas, atraso no crescimento, clorose generalizada, redução no tamanho de folhas e encurtamento de entrenós, além de mosaico com áreas de coloração verde-claro e verde-escura, manchas cloróticas difusas, entre as nervuras e riscas brancas dispostas ao longo das nervuras.

3.4.3.4. Vírus ainda não relatados no Brasil, segundo RIVAS, 2006:

3.4.3.4.1 *Dendrobium vein necrosis virus* – DVNV. Gênero: *Closterovirus*

Hospedeiros: *Dendrobium phalaenopsis*, na Alemanha (ICTVdB Management, 2006), em casa de vegetação e na Florida, EUA .

Etiologia e sintomas: mosaico nas flores, ocorrência de listras brancas em flores de tonalidade lilás. Manchas necróticas em nervuras foliares (JIMÉNEZ, 2002).

3.3.5.1. *Tomato ringspot virus* – ToRSV. Gênero: *Nepovirus*

Hospedeiros: *Ponthieva racemosa* (Walter) Mohr (YAO *et al.*, 1994), *Cymbidium*.

Etiologia e sintomas: não relatados em literatura.

3.3.5.2. *Bean yellow mosaic virus* – BYMV. Gênero: *Potyvirus*

Hospedeiros: *Dactylorhiza foliosa*, *Masdevallia* spp. e outros.

Há um relato, em 2007, da ocorrência do BYMV em *Dactylorhiza foliosa*, na Ilha da Madeira, causando mosaico, manchas e listras cloróticas nas folhas e também em várias espécies de orquídeas nos EUA, Alemanha e Japão (SKELTON, 2006).

3.3.5.4. *Calanthe mild mosaic virus* – CalMMV.

Hospedeiros: *Calanthe*, *Phalaenopsis* sp., *Tetragonia*, *Cymbidium*

Etiologia e sintomas: Esse vírus foi relatado no Japão, provocando leve mosaico foliar e “colour breaking” ou mosaico nas flores, em *Calanthe*. É transmitido mecanicamente ou pelo afídeo *Myzus persicae* de maneira não-persistente. Foi relatado na Índia em *Cymbidium* (SINGH, 2007). Causa ainda malformação de folhas.

3.3.5.3. *Ceratobium mosaic virus* – CerMV. Gênero: *Potyvirus*

Hospedeiros: *Ceratobium*

Etiologia e sintomas: CerMV foi detectado em cerca de um terço de mais de 100 plantas, representando cerca de 33 gêneros em duas coleções da Austrália. (MACKENZIE, 1998), causando clorose e malformação de folhas.

3.3.5.4. *Clover yellow vein virus* – CIYVV (= *Dendrobium mosaic virus*). Gênero: *Potyvirus*.

Hospedeiros: *Dendrobium*

Etiologia e sintomas: não relatados em literatura.

3.3.5.5. *Dasheen mosaic virus* – DsMV . Gênero: *Potyvirus*

Hospedeiros: *Spiranthes cernua* (JORDAN, 2000)
Etiologia e sintomas: não relatados em literatura.

3.3.5.6. *Cypripedium chlorotic streak virus* – CypCSV. (= *Cypripedium necrotic leafstripe virus*). Gênero: *Potyvirus*
Hospedeiros: *Cypripedium*
Etiologia e sintomas: não relatados em literatura.

3.3.5.7. *Habenaria mosaic virus* – HaMV. Gênero: *Potyvirus*
Hospedeiros: *Habenaria radiata*
Etiologia e sintomas: HaMV ocorre no Japão e pode ser transmitido mecanicamente e por vetor. Causa forte clorose foliar sistêmica em *Habenaria radiata* (ICTVdB, 2006).

3.3.5.8. *Turnip mosaic virus*- TuMV . Gênero: *Potyvirus*
Hospedeiros: *Calanthe* (HAMMOND & Lawson, 1988). *Orchis* (LESEMANN & VETTEN, 1985).

Etiologia e sintomas: Relatado na Alemanha, causa mosaico e redução de crescimento, mas as flores permanecem assintomáticas.

3.3.5.10. *Vanilla mosaic virus* – VanMV . Gênero: *Potyvirus*
Hospedeiros: *Vanilla tahitiensis*, *Vanilla pompona*
Etiologia e sintomas: Relatado pela primeira vez na Polinésia Francesa em 1986. Provoca mosaico e mal-formação de folhas de *Vanilla*. Transmitido de forma não-persistente por *Myzus persicae* (Aphididae), (BRUNT *et al.*, 1996).

3.3.5.11. *Vanilla necrosis virus* (= *Watermelon mosaic virus* – WMV) Gênero: *Potyvirus*
Hospedeiros: *Vanilla fragans*.
Etiologia e sintomas: O vírus provoca manchas e listras cloróticas e mal formação das margens das pontas das folhas, evoluindo para manchas marrons e necróticas locais, que também são formadas nos frutos, causando “die-back”. Sua transmissão se dá de forma não-persistente pelos vetores *Aphis gossypii* e *Myzus persicae* (Aphididae), além de transmissão mecânica e enxertia (BRUNT *et al.* 1996).

3.3.5.12. *Dendrobium leaf streak virus* – DLSV
Sinônimo de Orchid fleck virus – OFV

3.3.5.13. *Laelia red leafspot virus* – LRLV
Sinônimo de Orchid fleck virus – OFV

3.3.5.14 *Cymbidium ringspot virus* – CymRSV. Gênero: *Tombusvirus*.
Hospedeiros: *Cymbidium*
Etiologia e sintomas: Causa manchas anelares cloróticas foliares, mais intensas quando ocorre infecção dupla com *Cymbidium mosaic virus*. Esse vírus não é transmitido por vetores, somente por inoculação mecânica e por contato entre hospedeiros (ICTVdB, 2006).

3.3.5.15. *Impatiens necrotic spot virus*– INSV. Gênero: *Tospovirus*
Hospedeiros: *Oncidium*, *Phalaenopsis spp.*

Etiologia e sintomas: Relatado nos EUA. Tospovirus são transmitidos de uma planta a outra por diversas espécies de tripes, sendo a mais comum, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera). O sintoma observado em *Phalaenopsis spp.* (de flores brancas) é de presença de manchas anelares cloróticas e necróticas em folhas, semelhantes a alvos (BAKER, 2007).

3.3.5.16. Tomato spotted wilt virus – TSWV. Gênero: *Tospovirus*

Hospedeiros: *Oncidium*, *Phalaenopsis*, *Brassia gireoudiana*, *Cattleyaskinneri*, *Cattleya*, *Stel.*, *Trichopilia*, *Elleanthus caricoides*, *Maxilaria ringens*, *Maxilaria*, *Mormodes*, *Pleurothallis*, *Scaphiglottis bidentata*, *Stanhopea* e outros.

Etiologia e sintomas: igual INSV para *Phalaenopsis spp.* Em *Oncidium*, esse vírus causa de manchas anelares cloróticas a lesões necróticas de 1-2 cm de diâmetro (HU *et al.*, 1993). JIMÉNEZ (2002) descreve sintomas de mal formação foliar, que vão desde folhas dobradas, nervuras engrossadas e redução do tamanho das folhas. O autor relata ainda a formação de manchas brancas, amarelecimento e necrose foliar.

3.3.5.17. Tobacco rattle virus – TRV. Gênero: *Tobravirus*

Hospedeiros: *Elleanthus*, *Epidendrum*, *Maxilaria*, *Mormodes*, *Oncidium*, *Pleurothallis*, *Prosteche*, *Sobralia*, *Stelis*, *Orchis*.

Etiologia e sintomas: Ocorre na Costa Rica, causando mosqueado e amarelecimento foliar em orquídeas nativas enviveiradas (JIMÉNEZ, 2002), além de deformações foliares. Em *Orchis*, causa mosaico foliar e redução do crescimento (LESEMANN & VETTEN, 1985).

3.3.5.18. Phalaenopsis chlorotic spot virus –PhCSV. Gênero: *Potyvirus*

Hospedeiros: *Phalaenopsis*

Etiologia e sintomas: Vírus de recente relato, em Taiwan, causando manchas cloróticas em folhas de *Phalaenopsis* (YOU *et al.* 2008). Segundo o ICTVdB (2006) esse vírus seria um sinônimo do OFV.

3.3.5.19. Cypripedium calceolus virus - CypCV. Gênero: *Potyvirus*

Hospedeiros: *Cypripedium calceolus*.

Etiologia e sintomas: o vírus ocorre na Alemanha causando listras cloróticas e necróticas e deformações foliares na espécie acima (ICTVdB Management 2006).

3.4. Nematóides

A maioria dos relatos de nematóides parasitando orquídeas são bastante recentes. Em especial, destacam-se os do gênero *Aphelenchoides* Fischer, 1894, conhecidos como nematóides foliares.

3.4.1. Aphelenchoides bessey Christie (1942)

É conhecido como o agente etiológico da “ponta branca” em plantas de arroz irrigado. É também causador do “nanismo em plantas de morango”. É um nematóide de distribuição mundial, infectando além das duas culturas citadas, orquídea, cebola, alho, milho doce, batata-doce, soja, cana de açúcar, gramados, seringueira, violeta africana, crisântemo, *Hibiscus brachenridgii* e hortências, entre outros (Franklin e Siddiqi, 1972). HENRÍQUEZ (2002) relata a ocorrência desse nematóide no Chile, em plantas provenientes de Taiwan.

3.4.2 *Aphelenchoides fragariae* (Ritzema Bos, 1891) Christie, 1932

É conhecido como o nematóide do morangueiro, causando nessas plantas crescimento lento, porte reduzido, encurtamento dos entrenós entre outros sintomas, deixando as folhas quebradiças e com tamanho reduzido. Ataca diversas outras plantas ornamentais, como avencas (AGRIOS, 2005). Este patógeno infecta plantas de orquídea híbrida (*Cattleya hybrida* Lindl.), causando amarelecimento e necrose foliar.

3.4.3. *Aphelenchoides ritzemabosi* (Swartz, 1911) Steiner & Buhner, 1932

É conhecido como o nematóide foliar do crisântemo, sendo bastante disseminado pelos EUA e Europa. ocorrendo comumente em jardins, infectando além de crisântemo, dália, zinnia e morangueiro (AGRIOS, 2005).

3.4.4. *Aphelenchoides composticola* (Franklin, 1957)

Nematóide associado à orquídea *Laelia tenebrosa* R.A. Rolfe (SILVEIRA *et al.* 1992). Normalmente não é um parasita preocupante, por apresentar também hábito micófago, sendo importante em cultivos comerciais de cogumelos comestíveis.

3.4.5. *Pratylenchus scribneri* Steiner, 1943

Nematóide parasita de raízes. Mencionado na Instrução Normativa nº 7 da CTNBio, publicada no Diário Oficial da União, de 09 de junho de 1996, que apresenta as Normas provisórias para a importação de vegetais geneticamente modificados destinados à pesquisa. Nessa publicação aparece como Praga Quarentenária A1 para orquídeas, ao lado de milho, tomate, beterraba, cebola, soja e batata. Descrito pela primeira vez no Tennessee, EUA, em batata, em 1889, está associado a diversas espécies vegetais, inclusive orquídeas, não havendo citação para gêneros. Infecta raízes e causa lesões radiculares.

Com as informações acima, desenvolveu-se a Tabela 1 com as informações mais importantes para o diagnóstico de doenças em orquídeas.

Tabela 1: Quadro para rápida identificação dos fitopatógenos associados a orquídeas.

Doença	Agente etiológico	Sintomas
Podridão negra	<i>Pythium ultimum</i> Trow e <i>Phytophthora cactorum</i> (Lebert & Cohn.) J. Schöt.	“Damping-off” ou tombamento de mudas em sementeiras e plântulas. Em plantas adultas, a infecção produz manchas encharcadas, tipicamente negras, que progridem em forma ascendente. Em casos extremos, a planta morre dentro de 1 a 2 meses.

Murcha de Fusarium	<i>Fusarium oxysporum</i> Schletend, <i>f.sp. cattleyae</i> V. Foster	A doença também é conhecida por “canela seca”, por originar-se geralmente como uma podridão seca nas raízes das plantas, subindo pelo rizoma e atingindo o pseudobulbo, onde geralmente tem evolução lenta. Por matar as gemas, a planta sofre um longo processo de decadência, culminando com a morte após um ano ou mais.
Antracnose	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Penz.	Geralmente os sintomas são mais frequentes nas folhas. Inicialmente ocorre uma descoloração parda em forma circular levemente deprimida e bastante definida. A lesão aumenta rapidamente de tamanho e, sob condições favoráveis, pode atingir todo o limbo foliar. O centro da lesão é sempre deprimido, de coloração castanho-pardacenta e com inúmeros anéis concêntricos.
Ferrugem	<i>Sphenospora kevorkianii</i> Linder= <i>Uredo nigropunctata</i> P.Henn.; <i>Sphenospora mera</i> Cumm.; <i>Saphena</i> Cumm.; <i>Uredo epidendri</i> P. Henn, <i>Uredo behnickiana</i> P. Henn. e <i>Hemileia oncidii</i> Griffon & Malbl.	A doença se manifesta somente nas folhas, quase que exclusivamente na face inferior, onde inicialmente observam-se pequenas pústulas de coloração amarelo-laranja ou marrom-avermelhada. Essas pústulas, em função da idade, podem enegrecer e se desenvolver de modo concêntrico, lembrando a aparência de um alvo. Manchas cloróticas são observadas na região foliar oposta à pústula
Mofo cinzento	<i>Botrytis cinerea</i> Pers e <i>Botrytis sp.</i>	Ataca exclusivamente pétalas, sépalas e labelo das flores. Inicialmente surgem minúsculas pintas marrons, que crescem até destruir totalmente as flores.
Mancha de Cercospora	<i>Cercospora odontoglossi</i> Prill. & Delacr., <i>C. angraeci</i> , <i>C. dendrobii</i> , <i>C. epipactidis</i> , <i>C. persisteriae</i> e <i>Cercospora</i> . <i>spp.</i>	Apresentam-se como áreas irregulares e amareladas, na face inferior das folhas, que progridem para deprimidas pardo-púrpuras com centro pardo-claro e com pontuações de coloração negra. Na face superior do limbo, na área correspondente à lesão na face inferior, surge uma área clorótica, que eventualmente se torna necrótica.

Murcha de Sclerotium	<i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc.	Presença de micélio cottonoso primeiramente na base da planta, podendo espalhar-se por todo o pseudobulbo e folhas. Com a evolução da doença, pode-se visualizar a formação de escleródios com cerca de 1mm de diâmetro. A infecção pelo fungo provoca o apodrecimento dos tecidos vegetais da base da plantas e conseqüentemente, amarelecimento e queda de folhas.
Manchas foliares de Phyllosticta	<i>Phyllosticta capitalensis</i> Henn. 1908	As folhas atacadas apresentam manchas castanhas escuras circulares ou ovaladas, com bordos bem definidos e centro de coloração pardo-clara onde podem ser observados os picnídios do fungo. Dependendo da espécie infectada, podem surgir halos amarelados ao redor das lesões.
Podridão das raízes	<i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn.	“Damping-off” de mudas em sementeiras e plântulas. Deteriorização do sistema radicular, com sintomas reflexos de murcha na parte aérea. Plantas com essa podridão perdem o vigor de forma lenta com progressivo amarelecimento das folhas e pseudobulbos que se tornam finos e contorcidos. Novos brotamentos tornam-se raros
Podridão de raízes de Cyindrocarpon	<i>Cylindrocarpon radicolica</i> . Wr.	As plantas atacadas perdem o vigor e atrasam o seu crescimento. Em casos graves, as raízes morrem e apodrecem até a região basal da planta.
Podridão de raízes de Cyindrocladium	<i>Cylindrocladium sp</i>	Os tecidos atacados enegrecem e definham. A infecção que se inicia geralmente na região do colo pode se alastrar para as raízes, assim como para as partes aéreas das plantas.
Mancha foliar de Fusarium	<i>Fusarium moniliforme</i> Sheldon	Os sintomas iniciais da doença são pequenos pontos de coloração marrom-avermelhados nas folhas, que vão crescendo até tornar o limbo foliar pálido e quebradiço (crestamento). Em casos severos as folhas secam.
Mancha foliar e de bulbos	<i>Diplodia sp.</i>	Manchas marrons nas folhas e bulbos.

Mancha de Macrophoma	<i>Macrophoma sp.</i>	Manchas alongadas marrons com bordos negros em folhas e bulbos.
Outras Manchas foliares	<i>Selenophoma dendrobii</i> Abiko e <i>Pestalotiopsis sp.</i>	Manchas foliares de coloração parda, arredondadas ou ovais, com bordos bem delimitados e a parte central mais clara.
Crosta negra da baunilha	<i>Mycoleptodiscus indicus</i> (V.P. Sahni) B. Sutton.	Manchas necróticas no caule, frutos e folhas, inicialmente circulares, escuras, planas, 1-5 mm de diâmetro, tornando-se posteriormente elipsóides e fusiformes ou irregulares, tomando uma coloração castanho-acinzentada, chegando a atingir por confluência, 20 mm de comprimento por 10 mm de largura. Sobre as lesões notam-se pequenas crostas negras.
Mancha aquosa ou mancha marrom	<i>Acidovorax cattleya</i> (syn. <i>Pseudomonas cattleyae</i> (Pav.) Sav.).	No início, surgem manchas pardas circulares nas folhas, com aspecto aquoso, que crescem rapidamente, tornando-se deprimidas, escuras ou pardecintas, bem delimitadas, semelhantes a queimadura de sol. Causa morte de plântulas ou atinge folhas e pseudobulbos de plantas adultas.
Podridão mole	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> e <i>Dickeya chrysanthemi</i> .	Lesões foliares inicialmente anarcasadas em folhas e pseudobulbos, evoluindo para podridão mole ou mela, que acaba, praticamente, destruindo toda a área afetada. Odor fétido de exsudados é um forte indicativo de infecção por essa bactéria.
Vírus do Mosaico do Cymbidium	<i>Cymbidium mosaic virus</i> – CymMV	O sintoma mais comum é o mosaico, podendo ocorrer leves riscos cloróticos nas nervuras das folhas e pequena redução no número e tamanho das flores. Podem ainda mostrar sintomas severos de manchas anelares ou irregulares, cloróticas ou necróticas nas folhas. Ocorrem riscos ao longo das nervuras dos segmentos florais, marrons em flores brancas e esbranquiçados em flores lilases e vermelhas. Ocorre necrose e/ou descontinuidade da coloração natural das sépalas e pétalas (“collor break”).
Mancha anelar de Odontoglossum	<i>Odontoglossum ringspot virus</i> . – ORSV	Manchas ou pintas irregulares de colorido vermelho a roxo nas folhas, geralmente com regiões necrosadas.

		Em <i>Odontoglossum</i> , causa lesões circulares nas folhas. Os brotos podem ficar tortos, fortemente pigmentados e sem vigor. Nas flores surgem manchas descoloradas. O vírus vai degradando o vigor da planta, terminando por matá-la em alguns anos, por inviabilidade de brotação.
Orchid Fleck Virus	<i>Orchid fleck virus</i> – OFV	Anéis necróticos espalhados pelo limbo foliar e intercalados por áreas aparentemente normais são os sintomas mais comuns; porém em <i>Odontoglossum</i> , aparecem manchas amarelas nas folhas.
Vírus do Mosaico do Pepino	<i>Cucumber mosaic virus</i> – CMV	Estrias brancas e deformações nas flores, atraso no crescimento, clorose generalizada, redução no tamanho de folhas, encurtamento de entrenós, mosaico e manchas cloróticas difusas entre as nervuras.
<i>Dendrobium vein necrosis virus.</i>	<i>Dendrobium vein necrosis virus</i> – DVNV	Não relatado no Brasil. Hospedeiros relatados: <i>Dendrobium phalaenopsis</i> , na Alemanha e na Florida, EUA . Causa mosaico nas flores, com listras brancas em flores de tonalidade lilás.
<i>Tomato ringspot vírus*</i>	<i>Tomato ringspot virus</i> – ToRSV	Não relatado no Brasil. Hospedeiros relatados: <i>Ponthieva racemosa</i> e <i>Cymbidium</i> . Não obtivemos informação sobre sintomas.
<i>Bean yellow mosaic virus</i>	<i>Bean yellow mosaic virus</i> – BYMV	Não relatado no Brasil. Provoca mosaico, manchas e listras cloróticas nas folhas de <i>Dactylorhiza foliosa</i> , tendo sido já relatada sua ocorrência em várias espécies nos EUA, Alemanha e Japão.
<i>Calanthe mild mosaic virus</i>	<i>Calanthe mild mosaic virus</i> – CalMMV	Não relatado no Brasil. Foi relatado no Japão, provocando leve mosaico foliar e “ <i>colour breaking</i> ” ou mosaico nas flores, em <i>Calanthe</i> .
<i>Ceratobium mosaic vírus</i>	<i>Ceratobium mosaic virus</i> – CerMV	Não relatado no Brasil. Causa clorose e malformação de folhas.
<i>Clover yellow vein vírus.</i>	<i>Clover yellow vein virus</i> – CIYVV (= <i>Dendrobium mosaic virus</i>).	Não relatado no Brasil. Não obtivemos informação sobre sintomas.
<i>Dasheen mosaic virus</i>	<i>Dasheen mosaic virus</i> – DsMV	Não relatado no Brasil. Não obtivemos informação sobre sintomas.
<i>Cypripedium chlorotic streak vírus</i>	<i>Cypripedium chlorotic streak virus</i> – CypCSV (= <i>Cypripedium necrotic leafstripe virus</i>) .	Não relatado no Brasil. Não obtivemos a informação sobre sintomas.

<i>Habenaria mosaic virus</i>	<i>Habenaria mosaic virus</i> – HaMV	Não relatado no Brasil. Causa forte clorose foliar sistêmica em <i>Habenaria radiata</i> .
<i>Turnip mosaic virus</i>	<i>Turnip mosaic virus</i> - TuMV	Não relatado no Brasil. Não obtivemos informação sobre sintomas.
<i>Vanilla mosaic virus</i>	<i>Vanilla mosaic virus</i> – VanMV	Não relatado no Brasil. Provoca mosaico e mal-formação de folhas de <i>Vanilla</i> .
<i>Vanilla necrosis virus</i>	<i>Vanilla necrosis virus</i> (=Watermelon mosaic virus – WMV)	Não relatado no Brasil. Provoca manchas e listras cloróticas e malformação das margens das pontas das folhas, evoluindo para manchas marrons enecróticas locais, que também são formadas nos frutos, causando “die-back”.
<i>Dendrobium leaf streak virus</i>	<i>Dendrobium leaf streak virus</i> –DLSV (=Orchid fleck vírus – OFV)	Sintomas semelhantes a OFV.
<i>Laelia red lefspot virus</i>	<i>Laelia red lefspot virus</i> – LRLV (=Orchid fleck vírus – OFV)	Sintomas semelhantes a OFV.
<i>Cymbidium ringspot virus</i>	<i>Cymbidium ringspot virus</i> – CymRSV	Não relatado no Brasil. Causa manchas anelares cloróticas foliares em <i>Cymbidium</i> , mais intensas quando ocorre infecção dupla com <i>Cymbidium mosaic virus</i> .
<i>Impatiens necrotic spot virus*</i>	<i>Impatiens necrotic spot virus</i> – INSV	Não relatado no Brasil. Provoca manchas anelares cloróticas e necróticas, semelhantes a alvos em <i>Phalaenopsis</i> .
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	<i>Tomato spotted wilt virus</i> – TSWV.	Não relatado no Brasil. Provoca manchas anelares cloróticas e necróticas, semelhantes a alvos em <i>Phalaenopsis</i> . Em <i>Oncidium</i> , esse vírus causa de manchas anelares cloróticas a lesões necróticas de 1-2 cm de diâmetro. Pode ocorrer ainda, malformações foliares, que vão desde folhas dobradas, nervuras engrossadas e redução do tamanho das folhas. Relata ainda sintomas de manchas brancas, amarelecimento e necrose foliar.
<i>Tobacco rattle virus</i>	<i>Tobacco rattle virus</i> – TRV	Não relatado no Brasil. Causa mosqueado e amarelecimento foliar. Em <i>Orchis</i> , causa mosaico foliar e redução do crescimento.
<i>Phalaenopsis chlorotic spot virus</i>	<i>Phalaenopsis chlorotic spot virus</i> –PhCSV	Não relatado no Brasil. Causa manchas cloróticas em folhas de <i>Phalaenopsis</i> .
<i>Cypripedium calceolus virus</i>	<i>Cypripedium calceolus virus</i> - CypCV	Não relatado no Brasil. Ocorre na Alemanha causando listras cloróticas e

		necróticas e deformações foliares em <i>Cypripedium</i> .
Nematóides do gênero <i>Aphelenchoides</i>	<i>Aphelenchoides bessey</i> Christie (1942); <i>Aphelenchoides fragariae</i> (Ritzema Bos, 1891) Christie, 1932; <i>Aphelenchoides ritzemabosi</i> (Swartz, 1911) Steiner & Buhner, 1932.	Folhas com amarelecimento, que aumentam de tamanho passando à marrom escuro e, em seguida, negras com aspecto enrugado e encharcado.
Nematóides do gênero <i>Pratylenchus</i> *	<i>Pratylenchus scribneri</i> Steiner, 1943.	Lesões radiculares.

* Pragas quarentenárias A1 (BRASILIA, 2007).

CAPÍTULO I

OCORRÊNCIA DE DOENÇAS EM ORQUÍDEAS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Everaldo H.S. Klein¹ * & Paulo S.T. Brioso²

¹Mestrando do Programa de Pós-graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, UFRRJ; ²Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário/ Área de Fitopatologia/ DEF/ IB/ UFRRJ, BR 465, km 07, C. Postal 74585, 23.851-970, Seropédica (RJ), Brasil.

E-mail para correspondência: studt.everaldo@uol.com.br

*Bolsista CAPES, Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor.

Resumo

Com o objetivo de identificar as doenças que ocorrem em orquídeas no Estado do Rio de Janeiro, 53 plantas foram analisadas. 35,9 % das plantas estavam infectadas por fungos, sendo que 17,0 % por *Fusarium oxysporum*, 13,2 % por *Colletotrichum gloeosporioides*, 1,9 % por *Botrytis sp.*, 1,9 % por *Puccinia sp* e 1,9 % por *Phyllosticta capitalensis*. 51 % das plantas estavam infectadas por vírus com infecções simples e duplas de CymMV e ORSV. 1,9 % estavam infectados pela bactéria *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* e 3,8 % por nematóides do gênero *Aphelenchoides*.

Palavras-chave: Orquídeas, doenças.

Abstract

Aiming to identify the diseases that occur in orchids in the state of Rio de Janeiro, 53 plants were analyzed. 35,9 % of the plants were infected by fungi, of them, 17 % by *Fusarium oxysporum*, 13,2 % by *Colletotrichum gloeosporioides*, 1,9 % by *Botrytis sp.*, 1,9 % by *Puccinia sp.*, and 1,9 % by *Phyllosticta capitalensis*. 51 % of the plants were infected by virus with simple and double infections of CymMV and ORSV. 1,9 % were infected by the bacterium *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and 3,8 % by nematodes of the genus *Aphelenchoides*.

Keywords: Orchids, diseases.

Introdução

As doenças das orquídeas são, na atualidade, um grande problema para os produtores e cultivadores dessas plantas. Doenças de etiologia bacteriana e fúngica são bastante comuns, sendo, porém, evitadas através de táticas de manejo, além de ser possível o tratamento para as plantas já infectadas, o que é importante em culturas de alto valor agregado e perene. O problema é mais acentuado nos casos de infecções virais, pois não possibilitam tratamento para as plantas infectadas, devendo as mesmas ser descartadas para eliminar a fonte de inóculo, além de perderem o valor comercial.

Os fitopatógenos associados às doenças das orquídeas são facilmente transmitidos para plantas sadias, através de instrumentos de corte durante as atividades de limpeza e

desmembramento de mudas, o que tem gerado grandes prejuízos para os orquidários em todo o Brasil.

O objetivo desse trabalho foi o de levantar e registrar os possíveis fitopatógenos associados às doenças que ocorrem em orquídeas no Estado do Rio de Janeiro.

Material e Métodos

Para avaliarmos a ocorrência de doenças em orquídeas no Estado do Rio de Janeiro, foram coletadas 78 plantas, sintomáticas das quais somente 51 foram analisadas, em diversas localidades. As coletas das plantas se concentraram na região Serrana do Estado, nas cidades de Teresópolis e Petrópolis, no Distrito de Itaipava, principal região produtora de orquídeas, além de serem, também, um pólo distribuidor dessas plantas para floriculturas da Capital e demais cidades do Estado. Coletaram-se plantas também em residências e orquidários comerciais nos Municípios de Maricá (Região Litorânea), Itaboraí (Grande Niterói), Rio de Janeiro (Capital), Seropédica (Baixada Fluminense). As plantas coletadas encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Plantas coletadas para realização dos estudos, período e Município de coleta.

Espécies coletadas	Período	Local de coleta
1) <i>Colmanara</i> "Wild Cat"	abr/06	Teresópolis
2) <i>Odontoglossum</i> sp.	Abr/06	Teresópolis
3) <i>Cattleya</i> híbrida	Abr/06	Itaipava
7) <i>Miltonia</i> sp.	Abr/06	Teresópolis
8) <i>Denphalium</i> sp.	Abr/06	Itaipava
11) LC Alexis sauer "Arara" x (C. chocolate drop x L. Briegerii)	Abr/06	Itaipava
12) <i>Dendrobium</i> sp.	Abr/06	Itaipava
13) <i>Cymbidium</i> sp.	Abr/06	Itaipava
14) C. Virginia Ruiz x C. Rubens Ribeiro	Abr/06	Itaipava
16) <i>Cattleya</i> híbrida	Abr/06	Teresópolis
17) <i>Odontocidium</i> "cherry baby"	Mai/06	Teresópolis
18) <i>Cattleya</i> híbrida	Mai/06	Teresópolis
19) <i>Maxilaria</i> <i>bradei</i>	Jun/06	Teresópolis
20) <i>Cattleya</i> híbrida	Jun/06	Teresópolis
21) <i>Denphalium</i> sp.	Jun/06	Teresópolis
22) BLC Saga (Fortune "Oracle" x C. Ambe glow "Magnificent")	Jun/06	Teresópolis
25) <i>Phalaenopsis</i> híbrida	Jul/06	Teresópolis
28) <i>Phalaenopsis</i> <i>amabilis</i>	Ago/06	Maricá

31) <i>Oncidium sp.</i>	Ago/06	Maricá
33) <i>Potinara Lake Land Britt</i>	Ago/06	Maricá
35) <i>Cattleya hibrida</i>	Ago/06	Maricá
37) <i>Phalaenopsis híbrida</i>	Ago/06	Teresópolis
40) <i>Cattleya hibrida</i>	Ago/06	Teresópolis
42) <i>Cattleya hibrida</i>	Ago/06	Teresópolis
43) <i>Cattleya hibrida</i>	Ago/06	Teresópolis
44) <i>Trichoglottis sp.</i>	Ago/06	Rio de Janeiro
45) <i>Cattleya hibrida</i>	Ago/06	Teresópolis
46) <i>Cattleya hibrida</i>	Set/06	Teresópolis
47) <i>Rhynchostylis gigantea</i>	Set/06	Rio de Janeiro
48) <i>Phaius sp.</i>	Set/06	Teresópolis
49) <i>Ascocentrum sp.</i>	Set/06	Seropédica
52) <i>Cattleya hibrida</i>	Out/06	Teresópolis
53) <i>Cattleya hibrida</i>	Nov/06	Teresópolis
54) <i>Cattleya hibrida</i>	Nov/06	Itaipava
55) <i>Cattleya hibrida</i>	Nov/06	Itaipava
56) <i>Cattleya hibrida</i>	Nov/06	Seropédica
58) <i>Rhy. gigantea</i> “White”	Nov/06	Rio de Janeiro
59) <i>Cattleya hibrida</i>	Nov/06	Itaipava
60) <i>Cattleya hibrida</i>	Nov/06	Itaipava
62) <i>Encyclia odoratissima</i>	Jan/07	Teresópolis
64) <i>Brassolaeliocattleya</i> - BLC (Maria Aparecida Barani x C. Dinah)	Fev/07	Teresópolis
65) <i>Cattleya sp.</i>	Fev/07	Campo Grande
66) <i>Laelia crispa</i>	Fev/07	Teresópolis
67) <i>Cattleya hibrida</i>	Fev/07	Itaipava
68) <i>Miltonia sp.</i>	Fev/07	Teresópolis
69) <i>Miltonia sp.</i>	Fev/07	Teresópolis
70) <i>Vanda hibrida</i>	Abr/07	Teresópolis
71) <i>Arundina bambusifolia</i>	Out/07	Teresópolis
72) <i>Miltonia clowesii</i>	Mar/08	Teresópolis
74) <i>Cattleya hibrida</i>	Abr/08	Itaipava
76) <i>Cattleya hibrida</i>	Mai/08	Itaipava

77) <i>Cattleya hibrida</i>	Jun/08	Teresópolis
78) <i>Miltoniopsis hibrida</i>	Jun/08	Teresópolis

Obs: O número de cada planta corresponde à sua ordem de coleta. O fato de faltarem alguns números nessa ordem, é porque algumas plantas que foram coletadas em mau estado, não tendo sido possível a identificação de patógenos associados a elas.

Das plantas analisadas, foram identificados diversos fitopatógenos. Os fungos e bactérias associados às doenças foram isolados em meio de cultura BDA segundo procedimento descrito por AGRIOS, 2004 e identificados ao microscópio ótico através da chave proposta por SILVEIRA, 1995, no caso de fungos. Bactérias foram identificadas por testes de Gram e físico-químicos. Nematóides foram extraídos de folhas sintomáticas pela técnica do liquidificador aliada à centrifugação em solução de sacarose mais caolin (COOLEN & D'HERDE, 1972), fixados em solução de formalina 4 %, conforme Tihohod, 1993 e identificados ao microscópio ótico, pelas suas características morfológicas, através da chave elaborada por Cares & Huang, 2000. Os vírus foram identificados através de testes biológicos e imunocromatográficos. Nos testes biológicos, plantas de *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn e *Solanum melongena* L. foram inoculadas mecanicamente, utilizando-se como fonte de inóculo segmentos de folhas das orquídeas coletadas, trituradas em solução de fosfato de sódio 0,01 M pH = 7,6, na proporção de 1 g de amostra para 9 ml de solução tampão. Utilizou-se celite (produto a base de SiO₂) como abrasivo.

Nos testes imunocromatográficos utilizou-se um kit da Empresa Norte-Americana Agdia, denominado teste “ImmunoStrip”, no qual um segmento foliar de orquídea é inserido num saco plástico contendo 3 ml de solução tampão e, em seguida, é triturado. Introduce-se no macerado uma fita, que, ao se umedecer com a solução pode revelar até quatro diagnósticos: infecção simples de CymMV, infecção simples de ORSV, infecção dupla de ambos os vírus ou planta isenta de infecção por estes vírus.

Resultados e Discussão

Foram identificados os seguintes fitopatógenos e doenças correlatas (Tabela 2) dentre as plantas coletadas. Na tabela 3, estão relacionadas as plantas coletadas, pelo seu número de coleta e seus respectivos diagnósticos de suas doenças.

Tabela 2: Tipos de doenças e patógenos encontrados nas plantas coletadas

Doenças fúngicas	<i>Fusarium oxysporum</i> Schletend, f. sp. <i>cattleyae</i> V.; <i>Puccinia</i> sp Pers.; <i>Botrytis</i> sp.; <i>Phyllosticta capitalensis</i> Henn. 1908.; <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Penz.
Doenças bacterianas	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> (Jones 1901) Hauben et al. 1999 emend. Gardan et al. 2003.

Doenças viróticas	<i>Cymbidium mosaic virus</i> ; <i>Odontoglossum ringspot virus</i> .
Doenças causadas por nematóides	<i>Aphelenchoides fragariae</i> (Ritzema Bos, 1891) Christie, 1932; <i>A. ritzemabosi</i> (Swartz, 1911) Steiner & Buhner, 1932.

Tabela 3. Relação de plantas coletadas e seu respectivo diagnóstico

planta 1	Infecção simples de CymMV
planta 2	Murcha de <i>Fusarium</i>
planta 3	Infecção dupla de CymMV e ORSV
planta 7	Infecção de <i>Phyllosticta</i> . Infecção simples de ORSV
planta 8	Ferrugem. Infecção simples de CymMV
planta 11	Planta sadia
planta 12	Planta sadia
planta 13	Planta sadia
planta 14	Planta sadia
planta 16	Infecção simples de CymMV
planta 17	Antracnose e infecção de vírus não identificado
planta 18	Murcha de <i>Fusarium</i>
planta 19	Antracnose e infecção de vírus não identificado
planta 20	Antracnose
planta 21	Murcha de <i>Fusarium</i> . Infecção dupla de CymMV e ORSV
planta 22	Infecção dupla de CymMV e ORSV
planta 25	Antracnose infecção dupla de CymMV e ORSV
planta 28	Podridão mole. Infecção dupla de CymMV e ORSV
planta 31	Murcha de <i>Fusarium</i>
planta 33	Infecção simples de CymMV
planta 35	Murcha de <i>Fusarium</i>
planta 37	Antracnose
planta 40	Murcha de <i>Fusarium</i>
planta 42	Murcha de <i>Fusarium</i>
planta 43	Murcha de <i>Fusarium</i>
planta 44	Infecção simples de CymMV
planta 45	Infecção dupla de CymMV e ORSV
planta 46	Infecção simples de CymMV
planta 47	Planta sadia
planta 48	Antracnose
planta 49	Planta sadia
planta 52	Mofo cinzento
planta 53	Infecção com nematóides foliares <i>Aphelenchoides fragariae</i>
planta 54	Infecção dupla de CymMV e ORSV
planta 55	infecção simples de ORSV

planta 56	Planta sadia
planta 58	Planta sadia
planta 59	Infecção simples de ORSV
planta 60	Infecção simples de ORSV
planta 62	Murcha de <i>Fusarium</i>
Planta 64	Infecção com nematóides foliares <i>Aphelencoides</i>
planta 65	Infecção simples de ORSV
planta 66	Antracnose nas pétalas e infecção simples de CymMV
planta 67	Infecção dupla de CymMV e ORSV
Planta 68	Infecção de vírus não identificado
Planta 69	Infecção de vírus não identificado
planta 70	Planta sadia
planta 71	Infecção simples de CymMV
planta 72	Infecção simples de CymMV
planta 74	Infecção simples de CymMV
planta 76	Infecção simples de ORSV
planta 77	Infecção dupla de CymMV e ORSV
planta 78	Infecção dupla de CymMV e ORSV

Conforme os resultados obtidos, elaborou-se a Tabela 4 que apresenta os percentuais de cada fitopatógeno encontrado, bem como o de plantas sadias.

Tabela 4. Percentual de ocorrência de cada patógeno nas plantas de orquídea coletadas no Estado do Rio de Janeiro (abril de 2006 a junho de 2008).

Patógeno	Nº de plantas infectadas	% de plantas infectadas
<i>Fusarium oxysporum</i>	9	17,0
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	7	13,2
<i>Botrytis sp.</i>	1	1,9
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	1	1,9

<i>Phyllosticta capitalensis</i>	1	1,9
<i>Puccinia sp</i>	1	1,9
Infecção simples de CymMV	10	18,9
Infecção simples de ORSV	6	11,3
Infecção dupla de CymMV e ORSV	11	20,8
Infecção por nematóides <i>Aphelenchoides sp.</i>	2	3,8
Plantas sadias	9	17,0
Vírus não identificados	4	7,5

O presente trabalho detectou 35,9 % de plantas infectadas com doenças de etiologia fúngica. É um número bastante elevado, porém esperado, uma vez que, foram coletadas apenas plantas sintomáticas, para o desenvolvimento dos trabalhos. A murcha causada pelo fungo *Fusarium oxysporum*, f. sp. *cattleyae*, apelidada de “canela-seca” é uma doença bastante comum e foi observada em 17 % das plantas estudadas, ocorrendo em *Odontoglossum*, *Cattleya híbrida*, *Denphalium*, *Oncidium* e *Encyclia*.

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* foi a doença fúngica de maior incidência, ocorrendo em 13,2 % das plantas coletadas, ocorrendo em *Cattleya*, *Maxilaria*, *Odontocidium Phaius*, *Phalaenopsis*, causando manchas nas folhas e em *Laelia crispa*, causando manchas nas sépalas das flores (Figura 2 A). *Colletotrichum gloeosporioides* é um fungo oportunista que pode atacar qualquer parte da planta, porém ocorrendo com maior frequência nas folhas de plantas injuriadas pelo frio, raios de sol, ferimentos físicos ou enfraquecidas por sistema radicular pouco desenvolvido (BERGMANN & ALEXANDRE, 1998).

O mofo cinzento, doença provocada pelos fungos *Botrytis cinerea* e *Botrytis sp.* teve uma única ocorrência nas plantas coletadas, em flores de *Cattleya*, apesar de ser muito comum em ambiente de temperatura amena e umidade elevada (BERGMANN & ALEXANDRE, 1998), infectando as pétalas e sépalas das flores de diversos gêneros. A mancha foliar de *Phyllosticta* também teve uma ocorrência, em *Miltonia*, sendo essa uma doença que pode ser facilmente controlada através de melhoria de condições de cultivo (BERGMANN & ALEXANDRE, 1998).

A bactéria *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* também foi isolada em BDA e identificada por teste de Gram e seu odor característico. A inoculação de um fruto de pimentão com um palito que foi submerso na colônia de bactérias isoladas causou apodrecimento do fruto em poucos dias, característica que é atribuída a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, diferenciando esta de *Dickeya chrysanthemi*. A doença conhecida como podridão mole, causada por esta bactéria, foi encontrada apenas em uma amostra de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume, o que sugere que a ocorrência dessa doença pode estar relacionada a erro no manejo da cultura, que é sensível ao excesso de umidade, tão necessário para a disseminação dessa bactéria.

O presente trabalho também apresentou o primeiro relato da ocorrência de nematóides foliares do gênero *Aphelenchoides* infectando orquídeas *Cattleya híbrida* no Estado do Rio de Janeiro, bem como a ocorrência de um tipo de ferrugem, causado por um fungo do gênero *Puccinia* em *Denphalium*.

Testes biológicos e imunocromatográficos permitiram a identificação e caracterização dos agentes fitopatogênicos responsáveis pelos sintomas induzidos por vírus nas orquídeas coletadas. A inoculação mecânica em plantas indicadoras induziu, sintomas típicos causados por CymMV e ORSV. Observaram-se lesões necróticas locais em *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn (Figuras 1C e 1E) e lesões cloróticas sistêmicas em *Solanum melongena* L.

Alguns resultados obtidos pela nossa pesquisa relativos a viroses, se aproximam dos resultados obtidos por outros trabalhos, como o de Freitas-Astua *et al.* (1999) que, estudando a ocorrência de vírus em orquídeas no Estado de São Paulo, encontrou uma incidência média de 11% dos vírus CymMV e ORSV contra os 11,3 % de ORSV encontrados no presente trabalho, em infecções simples. Já as infecções simples de CymMV foram bem superiores, atingindo 18,9 %. O presente trabalho também fez o primeiro relato da incidência de CymMV em *Arundina bambusifolia*. A infecção dupla de CymMV e ORSV foi bastante comum, ocorrendo em 22 % das plantas (Figura 1), valor bem mais elevado do que o encontrado por Freitas-Astua *et al.*, (1999), que foi de 2,83% de infecção dupla nas 282 plantas da coleção de orquídeas da ESALQ/USP e 3,58% de infecção dupla nas 1422 plantas coletadas em orquidários comerciais daquele Estado. Tanaka *et al.* (1997), por sua vez, encontrou 71% de infecções simples de CymMV, valor bem mais elevado do que o nosso e 13 % de infecção simples de ORSV, valor próximo ao nosso resultado (12%), em um estudo com 442 orquídeas na Tailândia, entre 1992 e 1994.

Se somarmos as infecções simples e duplas desses dois vírus, teremos 51 % de incidência o que é um valor bastante alto, considerando a facilidade de transmissão e a impossibilidade de tratamento dessas doenças. Convém ressaltar que, algumas dessas plantas encontravam-se sem sintomas visíveis, o que agrava ainda mais esse tipo de doença, pela dificuldade de identificação e destruição imediata das plantas infectadas. Os gêneros de orquídeas infectadas com os vírus pesquisados estão descritos na Tabela 5.

Algumas plantas sem sintomas típicos de vírus mostraram-se infectadas, como foi o caso da planta 8 (*Denphalium*), que foi coletada devido aos sintomas de ferrugem. No ano seguinte (2007), o sintoma não se repetiu, emitiu bela floração normal; porém, o teste imunocromatográfico acusou a presença de infecção de CymMV. Assim, também o resultado da planta 25 (*Phalaenopsis*) nos surpreendeu, apesar das folhas apresentarem uma consistência anormal, flácidas, sua floração foi normal. O teste imunocromatográfico acusou infecção dupla de CymMV e ORSV. Existe a possibilidade das infecções virais não causarem danos às flores destas espécies. Pode ocorrer que produtores multipliquem essas plantas, sem desconfiar de suas doenças. Outra possibilidade é a de que havia poucas partículas virais na planta, por ocasião da época em que os testes foram realizados, não afetando, assim, a coloração normal das flores (Figura 3 A e B).

Quatro plantas coletadas são suspeitas de serem portadoras de vírus (não identificados pelos testes até o momento utilizados), por apresentarem mosaico, manchas e lesões necróticas em flores, folhas e pseudobulbos e, no entanto, obtiveram resultado negativo no teste imunocromatográfico. São elas: a planta 17, *Odontocidium*, que provocou lesões cloróticas em berinjela; a planta 19, *Maxilaria*, que provocou lesões cloróticas em berinjela, porém não provocou sintomas em *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn; a planta 68, *Miltonia*, cujo teste biológico provocou lesões locais cloróticas em *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn; e a planta 69, também do gênero *Miltonia*, que não proporcionou resultados nos teste biológicos. A diagnose viral dessas plantas deverá ser concluída com futuros testes moleculares.

Tabela 5. Gêneros das plantas coletadas infectadas com vírus.

Patógeno	Gêneros infectados
CymMV	<i>Arundina, Cattleya, Colmanara, Denphalium, Miltonia, Potinara, Trichoglottis.</i>
ORSV	<i>Cattleya, Miltonia.</i>
CymMV + ORSV	<i>Brassolaeliocattleya, Cattleya, Denphalium, Miltoniopsis, Phalaenopsis.</i>
Vírus não identificados	<i>Odontocidium, Maxilaria, Miltonia</i>

Apesar da alta incidência de viroses, não obtivemos plantas infectadas com algumas doenças bastante graves como a podridão-negra, causada por *Pythium ultimum* Trow e *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn.) J. Schöt. ou a Murcha de *Sclerotium*, causada por *Sclerotium rolfsii* Sacc., fitopatógenos de distribuição mundial que causam “damping-off” e apodrecimento dos tecidos vegetais da base da planta, respectivamente.

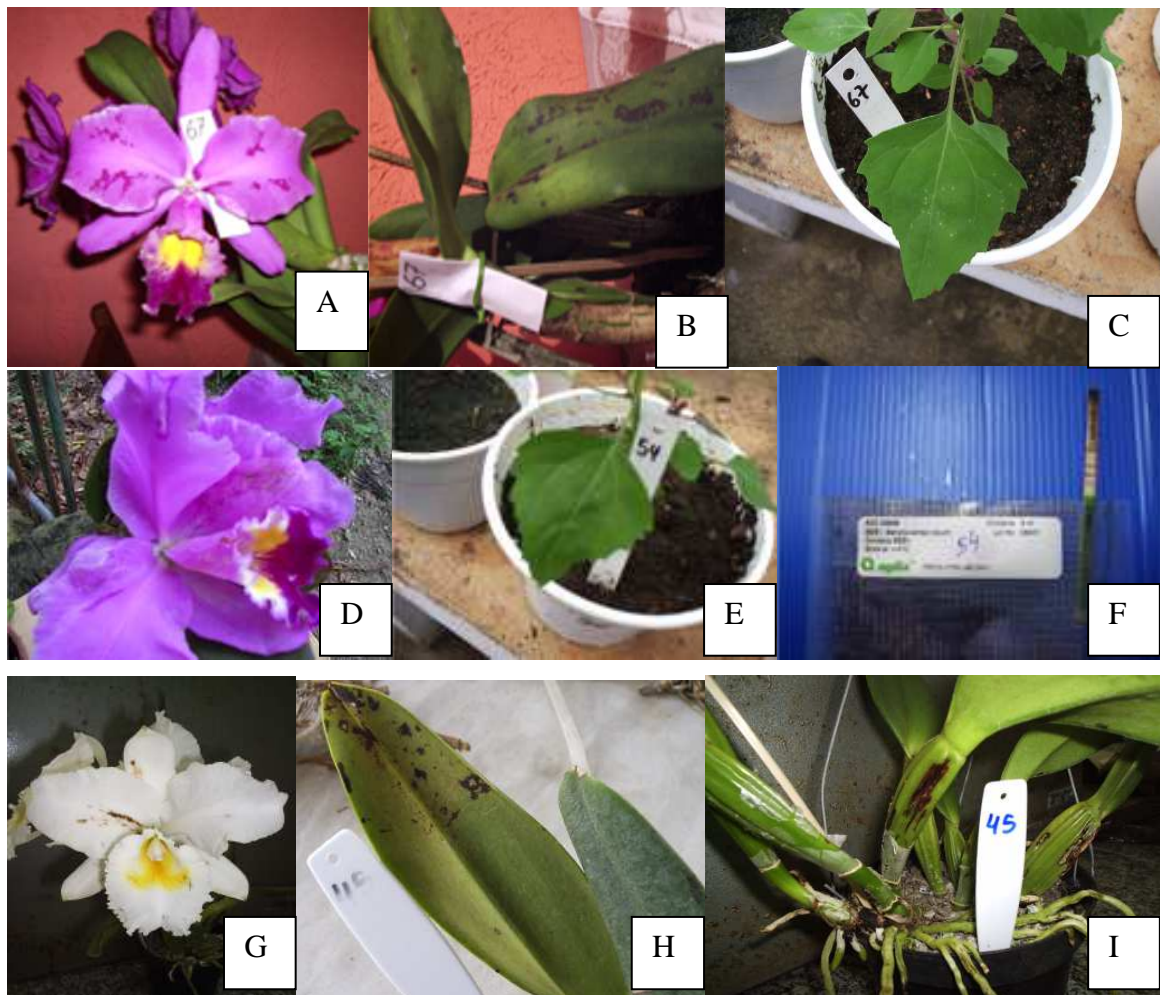


Figura 1: *Cattleyas* híbridas 67 (A), 54 (D) e 45 (G) com sintomas de mosaico nas pétalas, devido a infecção dupla de CymMV e ORSV. Orquídea 67: lesões necróticas nas folhas

(B). Lesões cloróticas em *Chenopodium amaranticolor* após inoculação dos extratos das folhas das orquídeas 67 (C) e 54 (E) respectivamente. Resultado do teste “Immunostrip”, da Empresa norte-americana Agdia, acusando, pela presença de três bandas coloridas na tira, a infecção dupla de CymMV e ORSV (F). *Cattleya hibrida* 45: lesões necróticas nas folhas (H) e pseudobulbos (I).

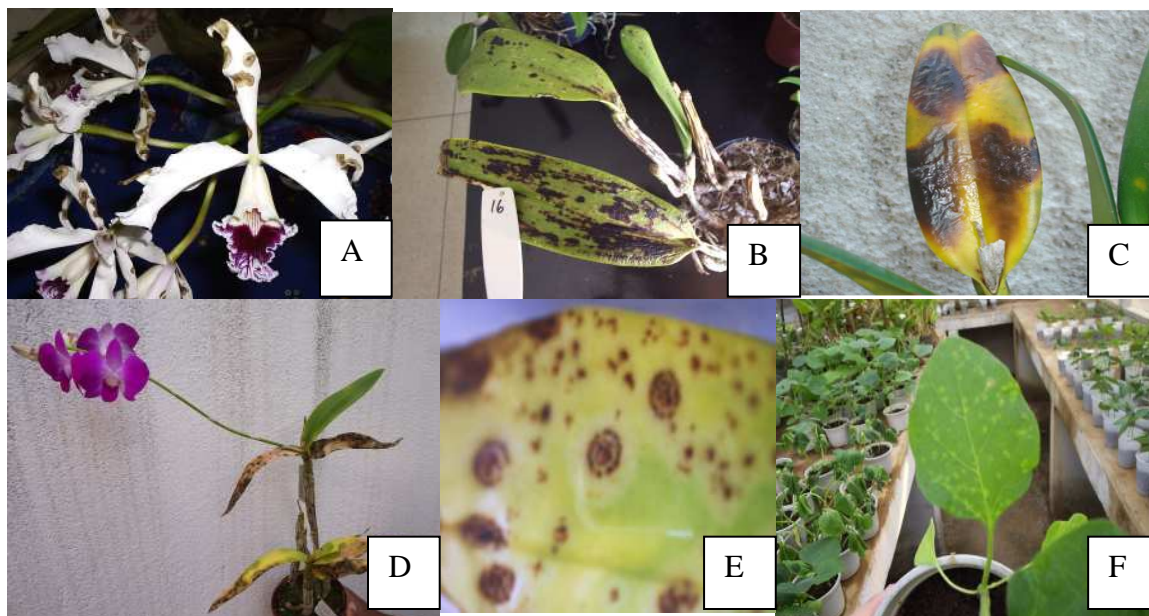


Figura 2: *L. crista* apresentando manchas de *Colletotrichum gloeosporioides* nas pétalas (A). Sintomas severos de infecção simples de CymMV na planta 16 (B). Lesões causadas nas folhas de *Cattleya hibrida* por *Aphelenchoides fragariae* (C). *Denphalium sp.* com sintomas de ferrugem causado por *Puccinia sp* (D). Detalhes das pústulas de ferrugem na região ventral das folhas (E). Lesões cloróticas locais em *Solanum melongena* L.(F).



Figura 3: Plantas de *Phalaenopsis hibrida* (A) e *Denphalium sp.* (B) apresentando floradas normais, apesar da infecção dupla de CymMV e ORSV e infecção simples de CymMV, respectivamente. *Cattleya hibrida* com os sintomas de *Botrytis sp.* nas pétalas (C).

Conclusão

Apesar da alta incidência de doenças entre as plantas coletadas, surpreendeu-nos encontrar 18% de plantas saudáveis entre elas, apesar de apresentarem alguns sintomas como manchas cloróticas e necróticas nas folhas. Uma vez que somente plantas suspeitas de estarem doentes

e plantas sintomáticas foram coletadas, o estudo nos mostra que não podemos diagnosticar doenças em orquídeas apenas pelos sintomas visuais, que podem ser confundidos com sintomas provocados por doenças abióticas, como reações da planta ao excesso de frio ou escaldadura provocada pelo sol, ou ainda por deficiências minerais e ataques de insetos. As plantas saudáveis poderão ser utilizadas como matrizes para sua micropropagação. Torna-se imprescindível que produtores façam testes de fitossanidade em plantas destinadas a matrizes, uma vez que plantas infectadas podem não apresentar sintomas visíveis.

CAPÍTULO II

OCORRÊNCIA DE ESPÉCIES DE *Aphelenchoides* EM ORQUÍDEA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Ocorrência de Espécies de *Aphelenchoides* em Orquídea no Estado do Rio de Janeiro

Everaldo H.S. Klein¹, Rhadyson S. Nascimento¹, João P. Pimentel² & Paulo S.T. Brioso²

¹Bolsista da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes),
Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor, Programa de Pós-graduação em
Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,
Rodovia BR 465 km 07, C. Postal 74585, 23851-970, Seropédica (RJ) Brasil.

²Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário, DEF, IB, UFRRJ, 23851-970, Seropédica
(RJ) Brasil.

Autor para correspondência: studt.everaldo@uol.com.br

Recebido para publicação em: 31 / 03 / 2008. Aceito para publicação em: / / 2008

Revista Nematologia Brasileira

Resumo – Klein, E.H.S., R.S. Nascimento, J.P. Pimentel & P.S.T. Brioso. 2008. Ocorrência de espécies de *Aphelenchoides* em orquídea no estado do Rio de Janeiro.

Plantas de orquídea híbrida (*Cattleya hybrida* Lindl.) coletadas no município de Teresópolis, Rio de Janeiro, apresentando amarelecimento e necrose foliar, foram analisadas

visando à identificação do patógeno associado aos sintomas. Foram detectados os nematóides de parte aérea, *Aphelenchoides fragariae* e *A. ritzemabosi*, causando lesões no limbo foliar das orquídeas coletadas. Foi possível demonstrar a patogenicidade e multiplicação desses nematóides em orquídea (*Cattleya hybrida* Lindl.), crisântemo (*Chrysanthemum sp.* L.), asplênio (*Asplenium nidus* L.) e begônia (*Begonia x tuberhybrida* Voss.). Trata-se do primeiro relato de parasitismo de *A. ritzemabosi* e *A. fragariae* em orquídea e de *A. ritzemabosi* em *Asplenium nidus* no Brasil.

Palavras-chaves: *Cattleya hybrida*, nematóide foliar, detecção.

Summary - Klein, E.H.S., R.S. Nascimento, J.P. Pimentel & P.S.T. Brioso. 2008. Occurrence of *Aphelenchoides* species in orchids at Rio de Janeiro State

Plants of hybrid orchids (*Cattleya hybrida* Lindl.), collected in the city of Teresópolis, Rio de Janeiro State, showing yellowing and leaf necrosis, were analyzed for identification of the pathogen associated with these symptoms. The foliar nematodes *Aphelenchoides fragariae* and *A. ritzemabosi* were detected causing injuries across the leaf lamina of the collected orchids. Additionally, the pathogenicity and multiplication of these nematodes were demonstrated in orchids (*Cattleya hybrida* Lindl.), chrysanthemum (*Chrysanthemum sp.* L.), asplenium (*Asplenium nidus* L.) and begonia (*Begonia x tuberhybrida* Voss.). It is the first report of *A. Ritzemabosi* and *A. fragariae* parasiting orchids and *A. ritzemabosi* parasiting bird's-nest fern (*A. nidus*) in Brazil.

Key words: *Cattleya hybrid*, leaf nematode, detection.

Conteúdo

O Brasil é conhecido no cenário internacional como um dos países com flora e fauna mais exuberantes e diversificadas, abrigando mais de 3.500 espécies de plantas da família

Orquidaceae, o que corresponde a 10 % do número de espécies de orquídeas do mundo. A importância do estudo das doenças das orquídeas se dá pelo fato delas serem cada vez mais valorizadas no mercado brasileiro e internacional, sendo significativa a sua parcela de contribuição para as exportações desse segmento do mercado de flores e plantas ornamentais do nosso País. No Brasil, mais de 20 gêneros de fitonematóides foram detectados em associação com plantas ornamentais. Destes, *Aphelenchoides* está entre os quatro gêneros considerados como principais, devido à frequência com que ocorrem e à intensidade das perdas causadas (Oliveira *et al.*, 2007). *Aphelenchoides ritzemabosi* (Swartz, 1911) Steiner & Buhner, 1932 e *Aphelenchoides fragariae* (Ritzema Bos, 1891) Christie, 1932 são nematóides foliares que atacam as plantas a partir do solo, quando as mesmas apresentam um filme de água proveniente de chuvas, irrigação ou orvalho. Assim, com a umidade, os nematóides movimentam-se externamente pelos ramos e folhas, a partir do solo e subindo pelas plantas até atingir os pontos de ataque, nas folhas, penetrando pelos estômatos e passando a viver nos espaços intercelulares, aonde completam o seu ciclo (Tihohod, 1993). Como características que diferenciam as duas espécies, *Aphelenchoides fragariae* possui saco uterino pós-vulvar mais largo que a metade da distância vulva-ânus, estilete de 10-11 μm , cauda alargada, conóide, desprovida de mucro caudal terminal e campo lateral com duas linhas. Já *Aphelenchoides ritzemabosi* possui saco uterino pós-vulvar largo, com comprimento superior a metade da distância vulva-ânus, estilete de 12 μm , região caudal conóide com a extremidade da cauda terminando em uma projeção com dois a quatro espinhos, e campo lateral com quatro linhas (Escuer & Bello, 2000).

Plantas de orquídea (*Cattleya hybrida* Lindl.) coletadas em um jardim residencial na cidade de Teresópolis (RJ), em 2006, apresentavam as folhas com amarelecimento, que aumentavam de tamanho passando à marrom escuro e, em seguida, negras, finalmente a necrose tomava toda a lâmina foliar, em curto espaço de tempo. Tais folhas tinham um

aspecto enrugado e encharcado, semelhantes às lesões de etiologia bacteriana. Em 2007, foi coletada no mesmo município, um exemplar da orquídea híbrida *Brassolaeliocattleya* - BLC (Maria Aparecida Barani x C. Dinah), com sintomas semelhantes a anterior, causando a queda foliar antes que os sintomas ocupassem todo o limbo. Dessa forma o presente trabalho teve como objetivo identificar os patógenos associados aos sintomas e assinalar a sua ocorrência em orquídea no estado do Rio de Janeiro. Patógenos estes que podem se tornar um sério problema fitossanitário, principalmente para o cultivo comercial de orquídeas e de outras ornamentais.

Folhas com a sintomatologia acima descrita foram dessecadas e observadas ao microscópio estereoscópico, revelando a presença de nematóides em todos os estágios nos tecidos lesionados. Uma parte dos nematóides foi fixada com formalina 4% e identificada ao microscópio ótico segundo chave elaborada por Cares & Huang (2000).

Com o objetivo de testar a patogenicidade desses nematóides em outras plantas ornamentais, procedeu-se à extração mediante a trituração de folhas sintomáticas seguida de peneiramento, coleta e inoculação dos nematóides em *Asplenium nidus* L. para aumentar o inóculo, uma vez que essa planta é conhecida como hospedeira desses nematóides (Huang *et al.*, 1982). Quando as folhas das mudas de asplênio inoculadas passaram a exibir os sintomas de lesões necróticas, os nematóides foram extraídos através de trituração das folhas sintomáticas e peneiramento. Inoculou-se, com o auxílio de uma pipeta, um ml de suspensão em água, contendo cerca de 1200 indivíduos.ml⁻¹, em folhas de orquídea (*Cattleya* x *híbrida* Lindl.), asplênio (*Asplenium nidus* L.), begônia (*Begonia* x *tuberhybrida* Voss.) e crisântemo (*Chrysantemum* sp. L.), através de uma técnica que consiste em se embeber um chumaço de algodão com o inóculo e fazer uma barreira física com fita adesiva e vaselina sólida, obrigando os nematóides a penetrarem pelos estômatos das folhas das plantas para sobreviver. A seguir, as plantas inoculadas foram cobertas com sacos plásticos transparentes, formando

uma câmara úmida mantida por seis dias. Durante esse período, as plantas permaneceram no laboratório, sobre uma bancada bem iluminada. Quando os sacos foram retirados, as plantas foram colocadas em casa de vegetação, sob condições normais, porém com sombreamento.

Através de estudos morfológicos e morfométricos dos espécimes extraídos da primeira planta, foi possível observar a cauda alargada, conóide, sem mucro caudal terminal, além dos valores: Fêmea: L= 0,45 a 0,80; A= 45 a 60; B= 8 a 15; C= 12 a 20; V= 64 a 71, caracterizando a espécie *Aphelenchoides fragariae* (Ritzema Bos, 1891) Christie, 1932. Já nos nematóides extraídos da segunda planta, foi possível observar a presença de três mucros caudais dispostos sobre uma estrutura em forma de coroa, além do valor de L que variava entre 0,77 a 1,2 mm, caracterizando a espécie *A. ritzemabosi* (Swartz, 1911) Steiner & Buhner, 1932 (Monteiro & Ferraz, 1990).

Os resultados relativos à patogenicidade foram obtidos na inoculação de crisântemo, begônia e asplênio com 19, 35 e 63 dias, respectivamente. É possível que, por terem as folhas mais tenras, estas foram rapidamente colonizadas pelos nematóides. Em orquídea, somente as plantas das quais os nematóides foram extraídos é que reproduziram sintomas após a re-inoculação, demonstrando que a ocorrência dessa doença está associada, possivelmente, ao fator genético.

O presente trabalho comprovou a possibilidade do nematóide *Aphelenchoides fragariae* e *A. ritzemabosi* de infectar orquídeas híbridas, assim como ocorre com outras espécies de *Aphelenchoides*, como *A. besseyi* (Henríquez *et al.*, 2002) e *A. composticola* (Silveira *et al.*, 1992). No Brasil, já foram relatadas espécies de *Aphelenchoides* em plantas ornamentais como *A. ritzemabosi* em *Begonia sp. L.*, *Begonia x hiemalis* Fotsch, *Chrysanthemum morifolium* L. e em *Chrysanthemum sp. L.* (Oliveira & Kubo, 2007). *A. fragariae* já havia sido relatado em *Asplenium nidus* (Huang *et al.*, 1982) e *Dizygotheca elegantissima* (Veitch) R.Vig. & Guillaumin cultivar *Castor variegata* (Oliveira, 2001). Há ainda relatos de

Aphelenchoides sp. em *Chrysanthemum* sp. (Oliveira & Kubo, 2007), *Gladiolus grandiflorus* L. (Silveira *et al.*, 1986), *Polypodium* sp. L. (Silveira *et al.*, 1986), *Rosa* sp. Hort. (Ferraz, 1980), *Sinningia speciosa* (Lodd.) Hiern. (Cesnik, 1959), *Saintpaulia* sp. Wendl. (Silveira *et al.*, 1986), *Tibouchina* sp. Cogn. (Huang *et al.*, 1982).

Trata-se do primeiro relato de parasitismo de *Aphelenchoides fragariae* e de *A. ritzemabosi* em orquídea e, de *A. ritzemabosi* em *Asplenium nidus* L., no Brasil.

Literatura Citada

- CARES, J.E. & S.P. HUANG. 2000. Taxonomia atual de fitonematóides: chave sistemática simplificada para gêneros – parte I. Revisão Anual de Patologia de Plantas: 185-235.
- CESNIK, R. 1959. Nematodeos que parasitam a gloxínia (*Sinningia speciosa*). Revista de Agricultura, 34 (2): 131-138.
- ESCUER, M.& BELLO, A. 2000. Nematodos del género *Aphelenchoides* de interés fitopatológico y su distribución em España. Bol. San. Veg. Plagas, 2000. P.49-63.
- FERRAZ, S. 1980. Reconhecimento das espécies de fitonematóides presentes nos solos do Estado de Minas Gerais. Experimentiae, 26(11): 255-328.
- HENRÍQUEZ, E. *et al.* 2002. Detección de nemátodos foliares en frutilla en Chile, y determinación taxonómica de *Aphelenchoides besseyi* en plantas de orchideas provenientes de Taiwan: Servicio Agrícola y Ganadero Departamento Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias Agrícola y Pecuaria. Chile. XII Congreso Nacional de Fitopatología resúmenes, 2002. Em http://www.fitopatologiachile.cl/trabajos02/XII.html#Articulo_26. Acesso em 22/02/2008.

- HUANG, C.S., J.P. PIMENTEL, E.C. VIEGAS & O. KIMURA. 1982. Ocorrência de *A. fragariae* em *Asplenium nidus* no Estado do Rio de Janeiro. *Fitopatologia Brasileira* 7(3): 568.
- MONTEIRO, A.R. & L.C. FERRAZ. 1990. Curso de Identificação de Nematóides Parasitos de Plantas USP-ESALQ - Departamento de Zoologia/ FEALQ. Piracicaba, SP. 313p.
- OLIVEIRA, C.M.G. 2001. Nematóides parasitos de plantas. In: IMENES, S.L & ALEXANDRE, M.A.V. (Eds.), *Pragas e doenças em plantas ornamentais*, CD-ROM (ISBN 85-88694-01-8).São Paulo. Instituto Biológico, p.38-47.
- OLIVEIRA, C.M.G. & R.K. KUBO. 2007. Novos assinalamentos de nematóides de parte aérea (*Aphelenchoides spp.*) em plantas de begônia no Brasil. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, 12(2): 134-137.
- OLIVEIRA, G., R.K. KUBO, S.R. ANTEDOMENICO, A.R. MONTEIRO & M.M. INOMOTO. 2007. Ocorrência de nematóides fitoparasitos em plantas ornamentais nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, 13(2): 135-141.
- SILVEIRA, S.G.P., S.M. CURI & P.C. STEFANINI. 1986. Nematóides de plantas detectados pela Seção de Nematologia do Instituto Biológico de São Paulo, Brasil. *Biológico*, 52: 91-104.
- SILVEIRA, S.G.P., S.M. CURI, R.S. RAMOS & C. SINIGAGLIA. 1992. Ocorrência do nematóide *Aphelenchoides bicaudatus* em cebola e *A. composticola* em orquídea. *Nematologia Brasileira*, 16: 89.
- TIHOHOD, D. 1993. *Nematologia Agrícola Aplicada*. FUNEP, Jaboticabal. 372 p.

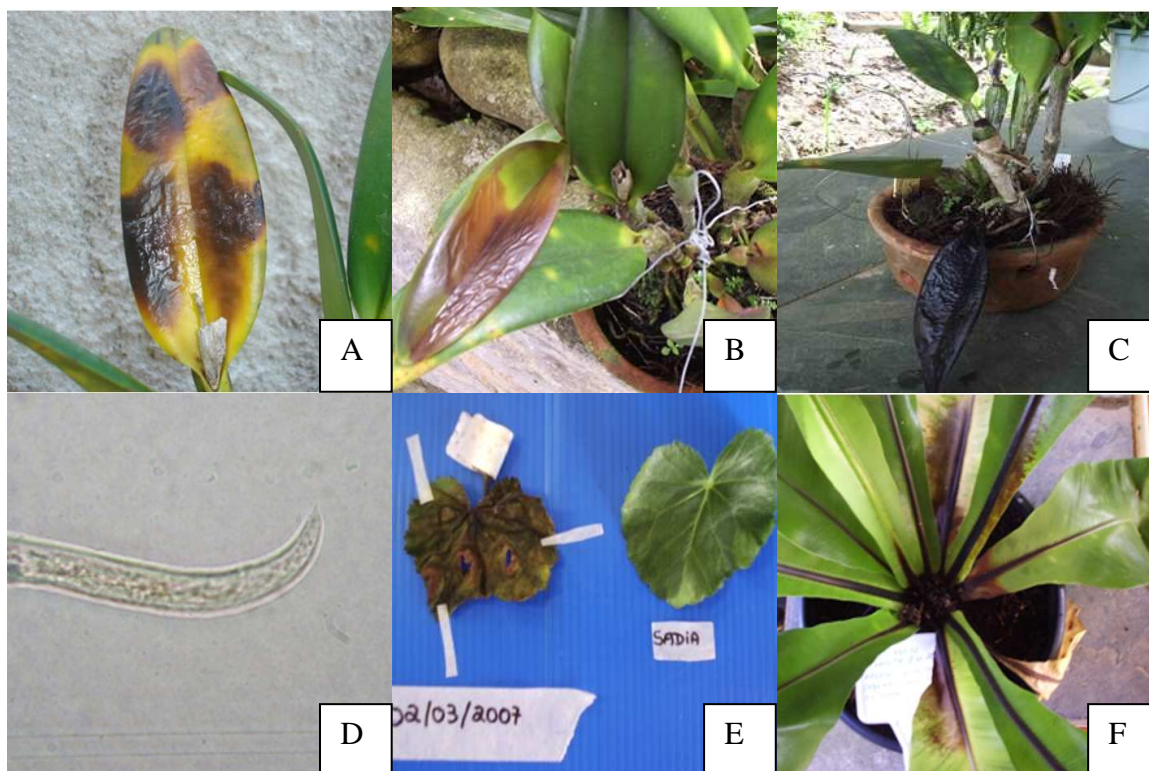


Figura 1 - *Aphelenchoides fragariae*: Folhas de orquídeas apresentando lesões necróticas (A, B e C) devido à infecção; Cauda do macho sem mucro caudal (D); Folhas de *Begonia x tuberhybrida*, após 60 dias da inoculação e folha sadia da mesma planta (E); Lesões necróticas em *Asplenium nidus*, após 150 dias da inoculação (F).

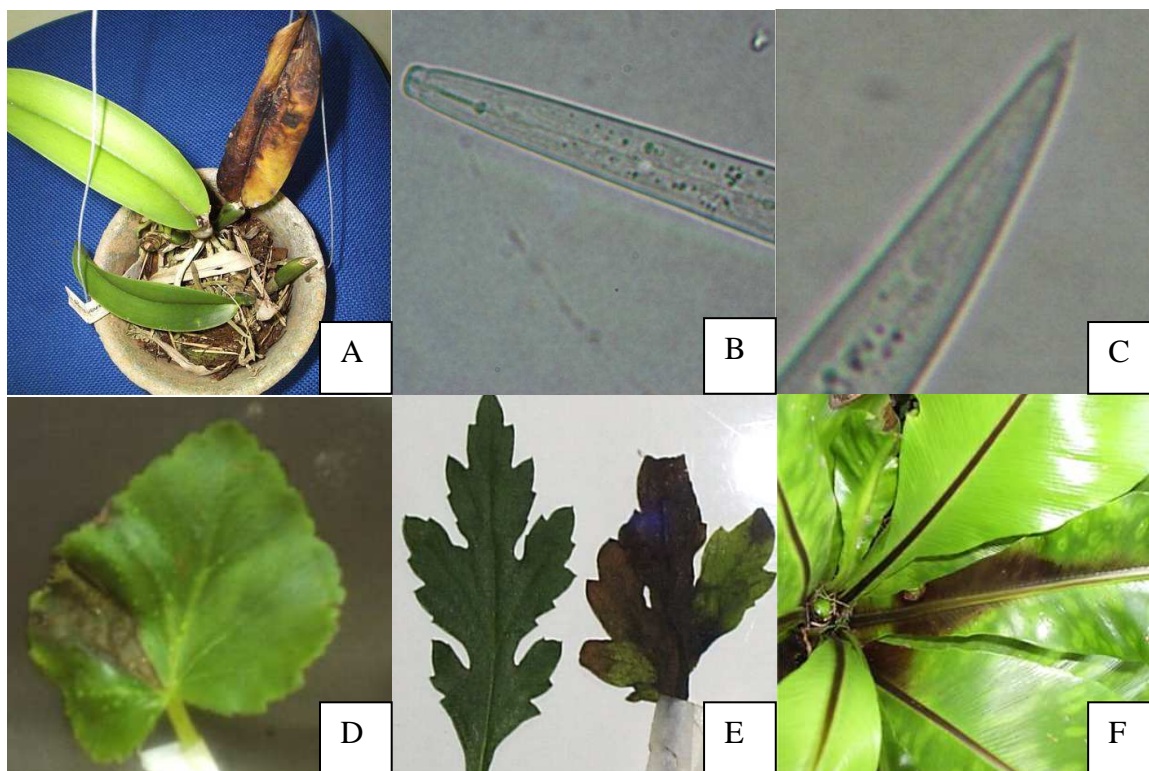


Figura 2 - *Aphelenchoides ritzemabosi*: orquídeas apresentando lesões necróticas nas folhas (A) devido à infecção; região do metacorpo, mostrando aparelho valvular bem refringente, estilete e lábios (B); extremidade da cauda e mucro caudal (C); Sintomas em folha de *Begonia x tuberhybrida*, após 35 dias da inoculação (D); Sintomas em folha de *Chrysanthemum sp.*, após 19 dias de inoculação. À esquerda, folha sadia da mesma planta (E); Sintomas em *Asplenium nidus*, após 180 dias de inoculação (F).

CAPÍTULO III

OCORRÊNCIA DE CymMV EM ORQUÍDEAS DO GÊNERO ARUNDINA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO¹

EVERALDO HANS STUDT KLEIN² e PAULO SERGIO TORRES BRIOSO³

¹ Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor.

² Mestrando do Programa de Pós-graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada (UFRRJ). Bolsista CAPES. *E-mail*: studt.everaldo@uol.com.br.

³ Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário/ DEF/ IB/ UFRRJ, CP 74585, CEP. 23851-970, Seropédica, RJ. *E-mail*: brioso@bighost.com.br. Bolsista CNPq.

Recebido para publicação em: 16/ 02/ 2008. Aceito para publicação em:..../..../ 2008.

Revista Brasileira de Horticultura Ornamental

Resumo

Plantas da espécie *Arundina bambusifolia* Lindl. foram coletadas no município de Teresópolis, RJ, com sintomas típicos de presença de vírus: manchas nas flores e folhas, encarquilhamento de botões florais e aborto de novas brotações. O presente trabalho tem por objetivo registrar a ocorrência desta doença no Estado do Rio de Janeiro, em uma espécie de grande importância para o mercado de paisagismo na atualidade e identificar o seu patógeno. Testes sorológicos confirmaram a presença do *Cymbidium mosaic virus* infectando essas plantas.

Palavras-chave: *Potexvirus*, orquídea-bambu

Abstract

Occurrence of CymMV in orchids of the genus *Arundina* in the State of Rio de Janeiro.

Plants of *Arundina bambusifolia* Lindl. were collected in the municipality of Teresópolis, RJ, exhibiting typical symptoms associated with the presence of viruses: necrotic spots on flowers, stems and leaves, malformation of the flower buds and abortion of new canes. This

work aims to report the occurrence of this disease in the State of Rio de Janeiro, affecting an orchid species of great importance for the market of landscaping and floriculture at the present time. Serologic tests confirmed the presence of the *Cymbidium mosaic virus* infecting these plants.

Keywords: *Potexvirus*, Bamboo orchid

As orquídeas da espécie *Arundina bambusifolia* Lindl. são muito populares sendo bastante comum a sua presença em jardins residenciais, tanto na Capital como no interior do Estado do Rio de Janeiro, provavelmente devido à sua fácil propagação, que se dá por divisão de touceiras ou mudas formadas espontaneamente nos ramos, o que tornou o seu valor comercial bastante acessível. Conhecida como orquídea-bambu, a *Arundina* é terrestre, ereta, semi-herbácea, rizomatosa, entouceirada, originária do sudeste asiático (WATANABE, 2002), com 1,20-2,00 m de altura, de ramagem e florescimento extremamente decorativo. Inflorescências com flores branco-lilases e labelo roxo são formadas o ano todo, principalmente na primavera e no verão, e são cultivadas à meia-sombra ou a pleno sol, em jardineiras e renques, acompanhando muros, muretas e paredes, ou em grupos formando conjuntos isolados (LORENZI & SOUZA, 2001). Pelo fato de produzir grande quantidade de flores praticamente o ano todo, o que é uma exceção na família *Orchidaceae*, essa planta se tornou muito importante para o mercado de paisagismo e plantas ornamentais.

A planta infectada foi coletada em outubro de 2007, em um jardim residencial de Teresópolis, região serrana do Estado do Rio de Janeiro, apresentando sintomas como redução no tamanho das flores, com descontinuidade da coloração natural das sépalas e pétalas, mosaico e manchas necróticas nas folhas e hastes florais. No Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário/ Departamento de Fitopatologia e Entomologia/ Instituto de Biologia/ UFRRJ, diagnosticou-se através da realização de teste sorológico (imunocromatográfico) da Empresa Agdia, conforme recomendação do fabricante, a presença do *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) infectando a planta (Figura 1). Esse kit diagnóstico que foi utilizado acusa a presença dos vírus *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) e *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV), tanto em infecções simples como em infecções duplas. O resultado obtido determinou a infecção simples de CymMV. A possibilidade de existir a presença de outro vírus, também comum em orquídeas, o *Orchid fleck virus* (OFV), infectando a referida planta foi descartada com resultados negativos obtidos em teste biológico (inoculação de extratos foliares de orquídea em folhas expandidas de *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn).

O CymMV é comum em orquídeas, infectando cerca de 25 gêneros, incluindo os mais comerciais, como *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Miltonia*, *Oncidium* e *Sophranittis* (GIORIA *et al.*, 2003). O CymMV é capaz de induzir uma diversidade de sintomas em plantas infectadas, dependendo de fatores ambientais, idade do tecido vegetal e genótipo da amostra (PASQUAL *et al.*, 2005). O sintoma mais comum é o mosaico, podendo ocorrer clareamento das nervuras foliares e pequena redução no número e tamanho das flores. Sintomas severos incluem o aparecimento de lesões anelares ou irregulares, cloróticas ou necróticas nas folhas (GIORIA *et al.*, 2003), necrose e/ou descontinuidade da coloração natural das sépalas e pétalas (Figura 1). Esse vírus pode infectar uma planta, sem afetar sua produtividade ou vigor, por muitos anos (COOKE, 1999), dificultando a identificação baseada apenas nos sintomas visuais.

O CymMV pertence ao gênero *Potexvirus*, caracterizado por apresentar partículas alongadas e flexuosas, de 480 nm de comprimento e 13 nm de diâmetro. Apresenta virions estáveis, altamente infectivos e sem envelope (ICTVdB, 2007). É um vírus de transmissão exclusivamente mecânica, ou por contato, com a ausência de insetos vetores (FRANCKI, 1984). É comumente disseminado por ferramentas de poda contaminadas (FREITAS-ASTUA *et al.*, 1999).

A sua presença nessas plantas de valor ornamental torna-se desastrosa pela perda da beleza de todos os órgãos da planta, como folhas e pseudobulbos e principalmente pelos sintomas causados nas flores, que vão desde o aborto de botões florais, sua malformação, formação de flores com tamanho reduzido e regiões com mosaico e descoloração das cores naturais e até a presença de tecidos necrosados (FREITAS-ASTUA *et al.*, 1999). Nas plantas coletadas, verificou-se também a morte de brotações novas, lesões necróticas em hastes florais e malformação das flores. A doença é bastante séria devido à grande utilização dessa planta em paisagismo na atualidade e pelo fato de a doença não possuir cura ou tratamento. O presente relato ainda sugere a inexperiência de alguns produtores que permitem que plantas infectadas sejam conduzidas ao mercado.

Para se evitar a disseminação do agente causal dessa doença, tanto os orquidófilos e funcionários de orquidários, assim como outros produtores de plantas ornamentais que se aventuram a propagar esta espécie, devem estar sempre com equipamento mínimo de proteção para evitar a contaminação das plantas, como luvas de látex e um *spray* com solução desinfetante para limpar as mãos e ferramentas, já que através de práticas culturais, como poda, troca de vaso e limpeza, pode haver transmissão de uma planta e outra. Podem-se utilizar

produtos à base de quaternários de amônio e hipoclorito de sódio. As ferramentas de corte devem ser imersas por dois minutos nesses produtos antes de serem utilizadas em uma nova planta. O uso de pequenos maçaricos portáteis, assim como o bico de *Bunsen*, também tem sido uma solução prática e rápida para a esterilização dessas ferramentas, já que o CymMV é permanentemente destruído por exposição à temperaturas acima de 150°C por alguns segundos (COOKE, 1999). A aquisição de matrizes saudáveis e a destruição de plantas infectadas também são fundamentais para se evitar novas contaminações (KLEIN, 2004).

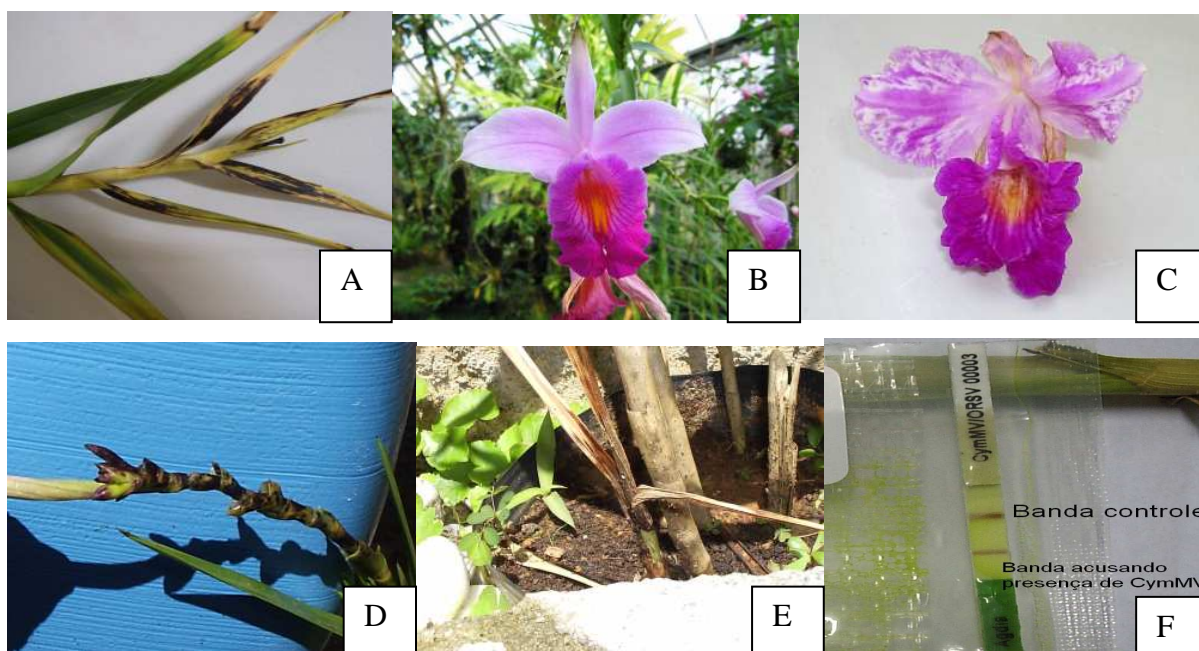


Figura 1. Orquídea *Arundina bambusifolia*: Folhas novas apresentando lesões necróticas (A); Flor de uma planta sadia (B); Flor apresentando malformação e mosaico (C); Lesões necróticas em haste floral (D); Aborto de novas brotações (E); Teste imunocromatográfico da empresa norte-americana Agdia para o *Cymbidium mosaic virus* (F).

Figure 1. *Arundina bambusifolia* orchid: New leaves exhibiting necrotic spots (A); Flower of a healthy plant (B); Flower exhibiting malformation and mosaic (C); Necrotic spots of the flower buds (D); Abortion of new canes (E); Immunochromatographic test (Agdia Inc.) detecting *Cymbidium mosaic virus* (F)

Referências bibliográficas

1. COOKE, R.B. Doenças das Orquídeas Parte II Vírus. Disponível em <<http://www.orquidario.org/palestras/palestra02.htm>> em 12/12/2007.
2. FRANCKI, R.I.B. Plant Viruses Online Descriptions and Lists from the VIDE Database. *Cymbidium mosaic potexvirus*, 1984. Disponível em: <<http://image.fs.uidaho.edu/vidе/descr274.htm>> Acesso em 29/11/2007.
3. FREITAS-ASTUA, J.; REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W. Incidence of Orchid Viruses in the State of São Paulo, Brazil. Brasília. Fitopatologia Brasileira, 24 (2) 1999. p. 125-130.
4. GIORIA, R.; SOUZA, A.P.; PEDRAZZOLI, D.S.; KITAJIMA, E.W.; KIMATI, H.; REZENDE, J.A.M.; VENDRAMIM, J.D.R; PARRA, J.R.P. Doenças e Pragas que Atacam as Orquídeas. Taubaté. Editora Brasil Orquídeas, 2003. 64p.
5. ICTVdB - The Universal Virus Database International Committee of Taxonomy of Viruses version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA ICTVdB Management (2006). 00.056.0.01.007. *Cymbidium mosaic virus*. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/00.056.0.01.007.htm>> Acesso em 29/11/2007
6. KLEIN, E.H.S. Manejo de Doenças em Orquidários Comerciais do Estado do Rio de Janeiro. Monografia realizada para conclusão do curso *Latu-sensu* em “Manejo de Doenças de Plantas”, 2004. Lavras; UFLA, 2004. 31p.
7. LORENZI, H.; SOUZA, H.M. Plantas Ornamentais do Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras 3^a ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2001. 1120p.
8. PASQUAL, M.; ARAÚJO, A.G.; RODRIGUES, V.A.; OLIVEIRA, A.C. Cultivo de Orquídeas. Informe Agropecuário 26 n.227, 2005. p. 85-94.
9. WATANABE, D. Orquídeas: manual de cultivo. São Paulo: AOSP – Associação Orquidófila de São Paulo, 2002. 296p.

CAPÍTULO IV

“Kit *Phytorquídea* PARA DIAGNÓSTICO DE FITOPATÓGENOS EM ORQUÍDEAS”

Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário

(L.O.D.F.) / UFRRJ

Uso Pretendido

O kit *Phytorquídea* para o diagnóstico de fitopatógenos em orquídea foi desenvolvido para identificar e caracterizar os possíveis agentes infecciosos (como bactérias, fungos, nematóides, vírus), a partir de partes vegetais (caules, folhas, flores) de orquídeas.

Amostra e Cuidados com o Kit

A amostra sintomática ou não de plantas de Orquídea deve ser dividida em quatro partes, sendo que três destas partes serão utilizadas em cada um dos testes abaixo: biológico, físico-químico e sorológico. A parte restante embalada em papel alumínio, identificada e mantida em temperatura ao redor de 10°C a 15 °C para possíveis testes moleculares, quando necessário.

A parte biológica (Plantas Indicadoras) do kit *Phytorquídea* deve ser mantida em casa de vegetação, tomando-se o cuidado de se identificar o número do registro da amostra inoculada e a data da inoculação (transmissão mecânica).

A parte físico-química deve ser feita com o auxílio de microscópio ótico e Microscópio Estereoscópico em ambiente adequado para tal fim.

A parte sorológica deve ser feita com tiras imunocromatográficas em ambiente adequado para tal fim.

Como o teste funciona

As amostras de plantas de orquídeas sintomáticas devem ter seus sintomas comparados com o descrito na Tabela 1 (**Tabela de rápida identificação dos fitopatógenos associados a orquídeas**) constante do Kit.

Para se detectar a presença de vírus em plantas de orquídea a partir de teste biológico, inicialmente deve-se semear as plantas indicadoras de vírus (*Chenopodium amaranticolor* e *Solanum melongena* cultivar “preta comprida”) e proceder a inoculação mecânica conforme descrito abaixo:

1. Semear a planta indicadora em vasos contendo solo autoclavado;
2. Pesar 1 g de tecido foliar, transferir para almofariz, adicionar 0,2 g de celite e 9 ml de Tampão de Inoculação, depois macerar com auxílio de um pistilo;
3. Inocular a suspensão nas folhas novas e recém expandidas da planta indicadora;
4. Lavar as folhas inoculadas, com o auxílio de um pisete, com água de torneira.

Para se detectar a presença de vírus em plantas de orquídea a partir de teste sorológico com tiras embebidas em antissoros específicos (Tiras Imunocromatográficas) para vírus deve-se proceder da seguinte forma:

- 1 - Cortar, com o auxílio de tesoura (previamente desinfestada com álcool), amostras de tecidos vegetais e pesá-los, em balança analítica, nas seguintes proporções: 0,15 g para amostras de folhas, flores, raízes ou 0,03 g de amostras de caule;
- 2 - Transferir para almofariz e adicionar um ml da solução de extração;
- 3 - Macerar as amostras em almofariz com o auxílio de pistilo, coar entre gazes, coletar o extrato e depositar em tubo de polipropileno de 1,5 ml;
- 4 - Introduzir a Tira Imunocromatográfica até 0,5 cm submergida no extrato tamponado da amostra;
- 5 - Deixar em repouso por 30 minutos e observar a reação na fita;

6 - Comparar o resultado obtido com o descrito na Tabela 2 (no final desse capítulo, na página 50) associado ao Kit.

Para se detectar a presença de fungos em plantas de orquídea a partir de teste físico-químico deve-se observar a presença de possíveis estruturas fúngicas ao microscópio estereoscópico, confeccionar a lâmina (através de raspagem com estilete ou corte semifino com gilete da parte vegetal sintomática) contendo uma gota da solução corante seguido da observação, após colocação da lamínula, em microscópio ótico e identificação morfológica das estruturas visualizadas. Observação: Quando necessário, colocar com antecedência de dois a três dias a amostra em câmara úmida para estimular a presença de possíveis estruturas fúngicas.

Para se detectar a presença de bactérias ou nematóides em plantas de orquídea a partir de teste físico-químico, deve-se confeccionar a lâmina (através de corte semifino com gilete na parte contendo o sintoma) contendo uma gota da solução BN seguido de observação, após colocação da lamínula, ao microscópio ótico e identificação morfológica das estruturas visualizadas na solução a partir da área lesionada.

Resultados

1. Teste Biológico:

O resultado deve ser observado 10 a 15 dias após a inoculação, através de sintoma (lesão clorótica) na planta inoculada indicando a presença de vírus.

2. Teste Físico-químico:

O resultado deve ser observado logo após a colocação da lâmina ao microscópio ótico indicando a presença de bactéria, fungo ou nematóide.

3. Teste Sorológico:

O resultado deve ser observado 30 minutos após a colocação da tira imunocromatográfica, indicando a presença de vírus.

Material suplementado pelo Kit

- Celite;
- Gaze;
- Sementes das plantas indicadoras de vírus;
- Solução BN;
- Solução Corante;
- Solução de Extração;
- Tabela 1;
- Tabela 2;
- Tampão de Inoculação Mecânica;
- Tiras Imunocromatográficas;

Precauções e Limitações

- Os testes foram otimizados para serem usados com o protocolo pertencente ao Kit. O desvio deste protocolo pode invalidar os resultados do teste.
- As plantas infectadas por vírus devem ser mantidas em casa de vegetação, para que não ocorra mistura entre os materiais.

Tabela 2: detecção da presença de vírus em plantas de orquídea a partir de teste sorológico com tiras embebidas em antissoros específicos (Tiras Imunocromatográficas).

VÍRUS	FAMÍLIA	TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO*/ N°
<i>Bean yellow mosaic virus - BYMV</i>	<i>Potyviridae</i>	N° 1
<i>Calanthe mild mosaic virus - CalMMV</i>	<i>Potyviridae</i>	N° 2
<i>Ceratobium mosaic virus - CerMV</i>	<i>Potyviridae</i>	N° 3
<i>Clover yellow vein virus - CIYVV</i>	<i>Potyviridae</i>	N° 4
<i>Cucumber mosaic virus - CMV</i>	<i>Bromoviridae</i>	N° 5
<i>Cymbidium mosaic virus - CymMV</i>	<i>Tombusviridae</i>	N° 6
<i>Cymbidium ringspot virus - CymRSV</i>	<i>Tombusviridae</i>	N° 7
<i>Cypripedium calceolus virus - CypCV</i>	<i>Potyviridae</i>	N° 8
<i>Cypripedium chlorotic streak virus - CypCSV</i>	<i>Potyviridae</i>	N° 9
<i>Dasheen mosaic virus - DsMV</i>	<i>Potyviridae</i>	N° 10
<i>Dendrobium leaf streak virus - DLSV</i>	<i>Rhabdoviridae</i>	N° 11
<i>Dendrobium vein necrosis virus - DVNV</i>	<i>Closteroviridae</i>	N° 12
<i>Habenaria mosaic virus - HaMV</i>	<i>Potyviridae</i>	N° 13
<i>Impatiens necrotic spot virus - INSV</i>	<i>Bunyaviridae</i>	N° 14
<i>Laelia red leafspot virus - LRLV</i>	<i>Rhabdoviridae</i>	N° 15
<i>Odontoglossum ringspot virus - ORSV</i>	-	N° 16
<i>Orchid fleck virus - OFV</i>	<i>Rhabdoviridae</i>	N° 17
<i>Phalaenopsis chlorotic spot virus - PhCSV</i>	<i>Potyviridae</i>	N° 18
<i>Tobacco rattle virus - TRV</i>	-	N° 19
<i>Tomato ringspot virus - ToRSV</i>	<i>Comoviridae</i>	N° 20
<i>Tomato spotted wilt virus - TSWV</i>	<i>Bunyaviridae</i>	N° 21
<i>Turnip mosaic virus - TuMV</i>	<i>Potyviridae</i>	N° 22
<i>Vanilla mosaic virus - VanMV</i>	<i>Potyviridae</i>	N° 23
<i>Vanilla necrosis virus - VNV</i>	<i>Potyviridae</i>	N° 24

* Coloração alterada na tira imunocromatográfica específica para o vírus.

CAPÍTULO V

PROPAGAÇÃO *in vitro* DE ORQUIDEAS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Everaldo H.S. Klein¹ * & Paulo S.T. Brioso²

¹Mestrando do Programa de Pós-graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, UFRRJ; ²Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário/DEF/ IB/ UFRRJ, BR 465, km 07, C. Postal 74585, 23.851-970, Seropédica (RJ), Brasil.
E-mail para correspondência: studt.everaldo@uol.com.br
Bolsista CAPES, *Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor

Introdução

Muito exploradas, no passado, pela sua beleza e exotismo, muitas de nossas espécies de orquídeas correm o risco de extinção. São, portanto, bemvindas novas informações e estudos a respeito de sua propagação, em especial a propagação *in vitro*, largamente utilizada pelos orquidários comerciais, obtendo-se daí excelentes percentuais de germinação, possibilitando a produção massal e sua queda de preço no mercado, tornando-as cada vez mais populares entre os brasileiros e representando significativamente o setor da floricultura em nossas exportações.

Sophronitis Lindl. é um gênero de orquídeas epifíticas ou litofíticas que ocorre em florestas úmidas ou campos rupestres do Brasil oriental e são geralmente reconhecidas por suas flores vermelhas, tendo sido utilizadas extensivamente para hibridação, para fornecer pequeno tamanho ou fornecer coloração vermelha à progênie.

Com o objetivo de baratear e simplificar os meios de cultura e a micropropagação em si, vários pesquisadores se empenharam para criar novos meios que pudessem ser feitos fora de laboratórios, sem o custo de equipamentos e insumos de preços elevados e uso de produtos químicos corrosivos e perigosos, podendo ser preparados e manipulados por qualquer pessoa.

Segundo Guerra & Nodari (2006), entre os principais componentes de uso mais freqüente nos meios de cultura, encontramos os constituintes orgânicos: carboidratos (a sacarose, a glicose e a frutose nos níveis de 2% a 5%), aminoácidos e aminas, vitaminas (a mais comumente usada em cultura de tecidos é a tiamina (B1), que é solúvel em água) e algumas misturas complexas, como proteínas hidrolisadas, sucos de laranja e tomate, leite e água de coco, extrato de leveduras, polpa de banana, hexitóis (como o inositol, que é considerado estimulador de processos de crescimento *in vitro* e pode servir como fonte de carboidrato), compostos fenólicos (atuam em processos que promovem o desenvolvimento aéreo enquanto que os derivados fenólicos estão envolvidos com a iniciação de raízes), ácidos orgânicos (O ácido ascórbico e o ácido cítrico são usados para prevenir o escurecimento de tecidos excisados de plantas) e purinas e piridiminas (a concentração mais usada varia de 40 a 160 mg/L. As bases nitrogenadas citosina e guanina podem também promover o crescimento

de cultura de calo. A adenina ou o sulfato de adenina estimulam o crescimento de brotações in vitro).

Uma receita de meio de cultura muito utilizada e amplamente divulgada em livros, revistas e na *Internet*, tem a seguinte composição: 50 g banana prata, semi-madura, com casca; 50 g mamão (polpa sem casca) tipo Bahia; 50 g tomate sem pele e sem semente; 120 ml de água de coco verde; 20 g de açúcar cristal; 1 g de carvão moído; 20 g de Agar-agar; água destilada – completada para 1 litro, aproximadamente 700 ml. Essa receita, que chamaremos de meio-básico ou MB, é utilizada por vários profissionais e amadores com resultados surpreendentes (CAMPOS, 2002 b), entusiasmando pelo seu baixo custo e bons resultados. Segundo alguns autores, essa fórmula não exige a correção do nível de acidez (pH) no final do processo de preparo do meio de cultura.

O objetivo deste trabalho foi o de testar novos ingredientes naturais, também de fácil aquisição e de conhecidas propriedades fungistáticas, para compor uma fórmula já conhecida de meio de cultura para cultivo de orquídeas, sendo *Sophronitis cernua* Lindl. (Figura 1 A) e *Epidendrum ellipticum* Grah.(Figura 2A) as espécies escolhidas para serem propagadas.

Materiais e Métodos

Foram adicionados ao MB os seguintes componentes: canela, alho, alecrim, manjeriço e cravo-da-índia. Com os componentes e concentrações escolhidos, desenvolveu-se um experimento comparativo, verificando-se o pH após o preparo de cada meio de cultura. Os sete tratamentos do experimento encontram-se na tabela 1. Devido a resultados negativos em relação ao desempenho de vários meios de cultura desse experimento, fez-se novo experimento com novos tratamentos, dessa vez com concentrações inferiores dos componentes naturais adicionados ao MB, além de terem o seu pH ajustado para $6,4 \pm 2$. Os tratamentos do segundo experimento estão relacionados na Tabela 2.

Tabela 1: Tratamentos do primeiro experimento e seus respectivos valores de pH, após a solidificação do meio.

Tratamentos	pH
Meio básico	5,0
Meio básico +10 g/l de canela em pó comercial	4,5
Meio básico + 10 g/l de alho em pó comercial	4,5
Meio básico + 10 g/l de alecrim seco (folhas) comercial	4,5
Meio básico + 10 g/l de manjeriço seco (folhas) comercial	5,0
Meio básico + 10 g/l de cravo-da-índia comercial picado	4,5
Meio MS*	5,0

*Meio Murashige & Skoog Basal 4,4 g/l da Empresa Sigma, código M5519, lote 65K23481, Exp. 06/07.

Tabela 2: Tratamentos do segundo experimento com pH ajustado para $6,4 \pm 2$ antes de sua solidificação.

Meio básico
Meio básico +10 g/l de canela em pó comercial
Meio básico +6 g/l de canela em pó comercial
Meio básico +5 g/l de canela em pó comercial
Meio básico + 10 g/l de alho em pó comercial
Meio básico + 6 g/l de alho em pó comercial
Meio básico + 10 g/l de cravo-da-índia comercial picado
Meio básico + 6 g/l de cravo-da-índia comercial picado
Meio básico + 3 g/l de cravo-da-índia comercial picado
Meio MS modificado, acrescido de 1 gL^{-1} de carvão ativado em pó e 30 gL^{-1} de sacarose, na forma de açúcar comercial e 10 gL^{-1} de Ágar-Ágar .

No preparo dos meios de cultura do primeiro experimento, misturaram-se os componentes de cada meio no liquidificador, deixando o Ágar-Ágar por último, que é colocado na mistura com o liquidificador funcionando. Aqueceu-se a mistura até a fervura para dissolução do Ágar, agitando-se o meio com bastão de vidro por algumas vezes durante este processo (que dura aproximadamente 12 minutos).

Verificou-se o pH de cada meio de cultura, que, segundo Campos (2002), é perfeitamente aceitável em torno de 5,0 para a maioria das orquídeas. Optamos, então não fazer nenhum ajuste de pH. O pH dos meios foi avaliado através de papel de Tornassol da firma MERK Universal indikator pH 0-14.

Ainda quente, verteu-se o meio de cultura para frascos de vidro (aproximadamente 30 ml por frasco) e fechamos os frascos com as tampas BIO-Sama PP-74, da Empresa Samavidros, próprios para cultivo “in vitro” de orquídeas. Os frascos com o meio foram esterilizados em seguida, em autoclave por 20 minutos a 120°C .

Uma solução desinfetante com água destilada (200 ml) e água sanitária (100 ml) (hipoclorito de sódio) foi preparada para uso durante o processo de semeadura e colocada em pulverizador de 500 ml de capacidade. Pulverizou-se com o spray da solução desinfetante, todo o material usado para a semeadura, antes de ser introduzido na capela. A capela também foi desinfetada com a solução e limpa com toalha de papel, permanecendo em seu interior uma lamparina de álcool acesa e os frascos de meio de cultura.

Esterilizou-se a cápsula (fruto maduro) de sementes (Figura 1 B) deixando-a mergulhada na solução desinfetante por cinco minutos, abrindo-se ela com um bisturi esterilizado. Em um frasco vazio, colocou-se uma pequena quantidade da solução desinfetante para lavar as sementes por cerca de 10 minutos, período no qual o vidro com a suspensão de sementes, foi agitado algumas vezes. Com uma seringa descartável de 10 ml e agulha de 30/8, retirou-se todo o líquido (água + hipoclorito) e descartou-se. Acrescentou-se água esterilizada ao vidro com sementes, aproximadamente 150 ml. Recolheu-se, com uma outra seringa de injeção esterilizada, a solução de sementes. Em seguida, fez-se a quantificação das sementes, através da contagem na lâmina de Peters, que comporta um ml da solução de sementes. Foram feitas três leituras, ao microscópio ótico, das quais se tirou a média. A primeira contagem apresentou 487 sementes/ml de suspensão, das quais apenas 21 eram viáveis. A segunda apresentou 348 sementes/ml, das quais também 21 eram viáveis e a terceira apresentou 448 sementes/ml com apenas 11 sementes viáveis (Figura 1 C). A média foi de 427,66 sementes/ml com apenas 17,66 sementes viáveis, ou seja, 4,13 %. Afrouxamos as tampas dos

vidros, já dentro da capela para iniciarmos a sementeira. Abrimos cuidadosamente e parcialmente os vidros. Em cada vidro deixamos cair 10 gotas da suspensão ou aproximadamente 0,4 ml. A partir da quantificação feita, obtivemos a expectativa de ter em cada frasco 85,5 sementes, das quais 3,53 viáveis. Tapamos imediatamente e agitamos os vidros com movimentos suaves e circulares, para espalhar as sementes na superfície do meio de cultura. Cada frasco foi identificado com o nome da orquídea, o tipo de meio de cultura e a data da sementeira. Após a sementeira, os frascos foram levados para a câmara de crescimento, onde permaneceram, com acesso restrito, para se evitar contaminação e com iluminação fluorescente (comum, luz do dia, quatro lâmpadas de 20 W por prateleira) com fotoperíodo regulado através de um timer, de 12 horas-luz por dia e 2000 lux de luminosidade. Sendo a temperatura ideal de 25 °C, nos meses mais quentes do ano, a temperatura nas horas mais quentes do dia foi controlada com condicionador de ar. No preparo dos meios de cultura do segundo experimento, todos os tratamentos tiveram seu pH corrigido para $6,4 \pm 2$ e os frascos vedados com filme de polietileno para evitar novas contaminações, logo após a sementeira. As sementes usadas desta vez foram da orquídea *Epidendrum ellipticum* Grah. (Figura 2 A), espécie largamente distribuída pelo Brasil e Américas, sendo encontrada em hábitos rupícolas, terrestres ou epífita, tamanha a sua capacidade de adaptação e florescimento em janeiro. A sementeira ocorreu da mesma forma que no experimento anterior, sendo que desta vez, ao invés de se utilizar uma seringa de farmácia, utilizou-se uma pipeta de precisão Labmate P-5000 ajustada para 2,0 ml, volume este da solução de sementes introduzida em cada frasco. A contagem realizada na lâmina de Peters revelou 161 sementes/ml das quais 112 sementes/ml eram viáveis (com endosperma), ou seja, 69,56 % (Figura 2 D). Os frascos semeados com os meios foram levados para a câmara de crescimento com fotoperíodo ajustado em 12 horas/ luz/diária e luminosidade de 3000 lux (Figura 2 E).

Aos 143 dias após a sementeira, acrescentamos a cada frasco 1ml de solução nutritiva autoclavada por 20 minutos a 120°C, de um fertilizante foliar de marca comercial, na diluição de 5 ml L⁻¹. O pH da solução foi de 7 (medido após a autoclavagem). As garantias que o fabricante dá em relação a esse produto é a seguinte: Nitrogênio (N): 8%; Fósforo P₂O₅ solúvel em água: 9%; Potássio K₂O: 9%, Magnésio (Mg): 0,6%; Enxofre (S): 1 %; Boro (B): 0,02 %; Cloro (Cl): 1 %; Cobalto (Co): 0,005%; Cobre (Cu): 0,2%; Ferro (Fe): 0,15%; Manganês (Mn): 0,02 %; Molibdênio (Mo): 0,005 %; Zinco (Zn): 0,35%. Esse procedimento foi realizado com o intuito de incrementar o crescimento dos protocormos, sem replicá-los para outros frascos com meios de cultura próprios pra crescimento.

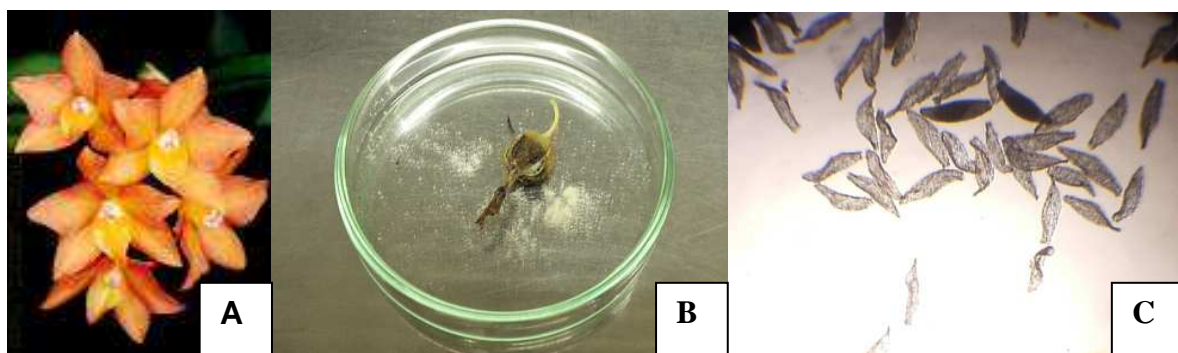


Figura 1. *Sophronitis cernua* (Lindl.) Hook (A); Cápsula com sementes(B); Sementes vistas ao microscópio óptico. Somente as sementes escuras possuem endosperma e são, portanto, viáveis (C).

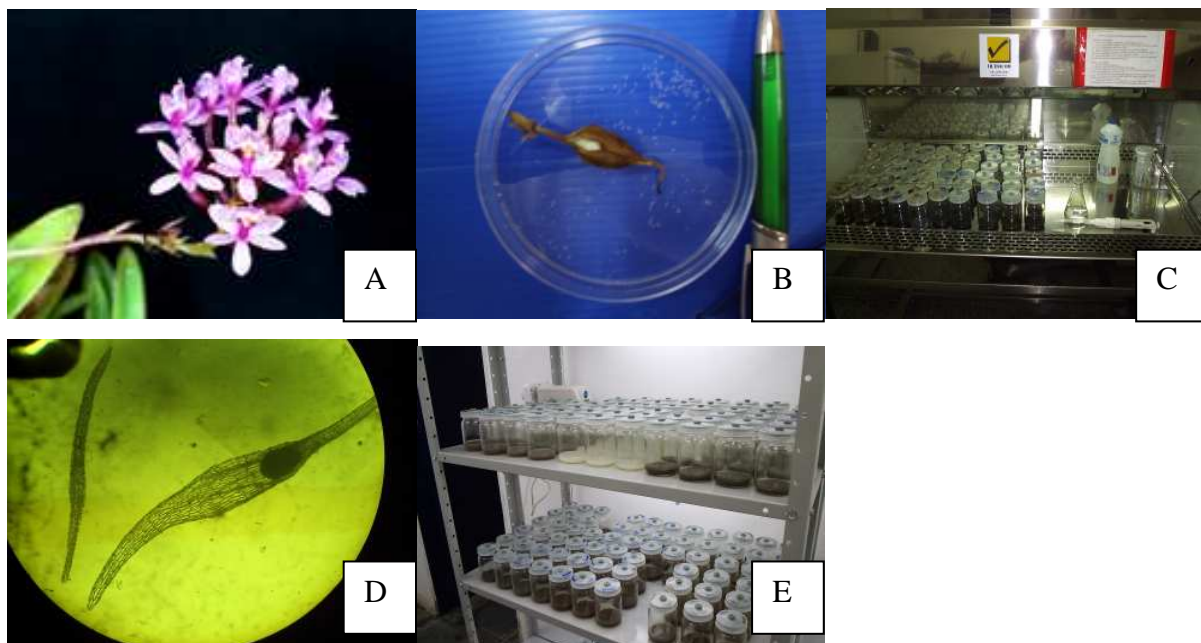


Figura 2. *Epidendrum ellipticum* Graham (A); Cápsula e sementes (B); Câmara de fluxo laminar durante a sementeira (C); Visualização de sementes ao microscópio óptico. A semente da esquerda é inviável, já a da direita, possui endosperma. (D) Frascos na câmara de crescimento (E).

Resultados e Discussão

No primeiro experimento, os tratamentos MB e MB + alho 10 gL^{-1} foram os únicos que apresentaram um desenvolvimento das sementes até o nível de protocormos até o período de 10 meses da sementeira, o que também não é um bom resultado, visto que essa etapa da germinação pode ser alcançada por algumas espécies já aos 27 dias após a sementeira.

Nos outros tratamentos, foi observada a fase de entumescimento, seguido de amarelecimento e morte das sementes.

O tratamento MB + cravo-da-india foi o único que não apresentou nenhuma contaminação, mostrando a importância que esse componente pode ter como antimicrobiano. O fato desse meio de cultura não ter proporcionado nenhum esboço de germinação demonstra que ele também inibiu a germinação das sementes de orquídeas na concentração de 10 gL^{-1} ou que ele tenha acidificado demais o meio.

Acreditamos que o pH abaixo e/ou igual a cinco deve ter sido o responsável pelo resultado negativo em relação a germinação de sementes de orquídea nos demais tratamentos, sendo, a exceção o tratamento MB + alho ainda permitiu um certo desenvolvimento das sementes à nível de protocormos.

Foram observadas contaminações ao longo de todo o período do experimento, sugerindo falta de assepsia no ambiente e a não vedação correta dos frascos pelas tampas Bio-Sama PP-74.

O MB ainda foi o meio de cultura com melhor desempenho para a germinação das sementes de orquídeas *Sophronitis cernua* Lindl. O meio MS não serviu de parâmetro comparativo, como era esperado, uma vez que não obtivemos germinação nesse meio, por motivos desconhecidos.

Cerca de 10 meses após a sementeira, coletamos o resultado do primeiro experimento, verificando a situação apresentada na Tabela 3, aonde o entumescimento significa a primeira etapa da germinação das sementes, quando elas adquirem a coloração verde e já são vistas

com facilidade a olho nu. A fase de protocormos é a seguinte, que pode ser caracterizada pela forma pontiaguda em uma das extremidades.

Tabela 3. Resultados 10 meses após a semeadura nos frascos.

Tratamento	Nº inicial de frascos	Frascos sem contaminação	Sementes entumescidas com coloração verde	Protocormos	Contaminação (%)
MB	20	14	66	17	30
MB + canela	20	13	0	0	35
MB + alho	20	16	17	4	20
MB + alecrim	20	15	0	0	25
MB + manjeriço	20	10	0	0	50
MB + cravo da índia	20	20	0	0	0
MS	20	15	0	0	25

A grande quantidade de valores iguais a zero nos motivou a realizar o segundo experimento, desta vez utilizando os tratamentos que consideramos mais interessantes e com o cuidado de corrigir o pH.

No segundo experimento, após 12 dias da semeadura já pudemos constatar nove frascos contaminados por fungos. Esta rápida contaminação sugere a falta de assepsia correta nas etapas de desinfestação das sementes, uma vez que a cápsula já se encontrava aberta (hipótese mais provável) e/ou na semeadura, quando as tampas dos frascos são rapidamente abertas por alguns segundos dentro da câmara de fluxo laminar vertical. Os frascos que apresentaram contaminação estão relacionados na Tabela 4.

Tabela 4. Frascos contaminados no segundo experimento, 12 dias após a semeadura.

MEIO	Nº DE FRASCOS CONTAMINADOS
MB	2
MS	0
MB + ALHO 10 g/l	0
MB + ALHO 6 g/l	1
MB + CANELA 10 g/l	0
MB + CANELA 6 g/l	0
MB + CANELA 5 g/l	3
MB + CRAVO 3 g/l	2
MB + CRAVO 5 g/l	0
MB + CRAVO 6 g/l	1

A Tabela 4 demonstra que os meios de cultura contendo cravo-da-índia também são contaminados e que essa substância, apesar de já ter conhecidas propriedades antimicóticas, ainda assim não consegue resolver o problema da contaminação de meios de cultura *in vitro*.

Após 19 dias da semeadura foi possível observar a primeira fase da germinação das sementes em alguns frascos, que é o entumescimento das sementes quando estas adquirem a cor esverdeada. Essa fase pôde ser observada nos seguintes tratamentos: MB, MB + canela 5

g/l, MB + canela 6 g/l e MB + canela 10 g/l. Observação que sugere que as sementes nesses tratamentos encontraram melhores condições de germinação e que a canela não está inibindo o processo.

Tabela 5. Resultados aos sete meses e 23 dias após a semeadura dos frascos.

Tratamento	Nº inicial de frascos	Frascos sem contaminação (N ⁰)	Sementes intumescidas com coloração verde	Protocormos	Contaminação (%)
MB	6	3	38	14	50
MS	6	6	1	0	0
MB+ALHO 10 g/l	6	4	0	0	33,3
MB+ALHO 6 g/l	6	5	1	0	16
MB+CANELA 10 g/l	6	6	72	1	0
MB+CANELA 6 g/l	6	6	115	4	0
MB+CANELA 5 g/l	6	3	52	0	50
MB+CRAVO 3 g/l	6	4	0	0	66,6
MB+CRAVO 5 g/l	6	6	0	0	0
MB+CRAVO 6 g/l	6	5	0	0	16

Esses dados confirmam os anteriores mostrando a boa germinação nos meios contendo canela, porém não diferindo do MB no que se refere a contaminações, como se observou no tratamento com canela 5 g/l. Já os tratamentos com canela 6 e 10 g/l não sofreram contaminações. O cravo-da-índia demonstrou inibir a germinação das sementes de orquídeas porém não inibiu o crescimento dos fungos contaminantes, como ocorreu no primeiro experimento. O gráfico que aparece na Figura 3 foi obtido em função do percentual de contaminação de cada meio-de-cultura. Analisando-se a germinação das sementes, considerando-se a contagem que foi realizada, na qual obtivemos 224 sementes viáveis em cada 2,0 ml de solução de sementes, que foi introduzida em cada frasco, obtivemos o gráfico que aparece na Figura 4, em função do percentual de germinação de cada tratamento, considerando-se como germinadas, as sementes intumescidas somadas aos protocormos formados.

Figura 3:

Gráfico 1: Percentual de contaminação em cada tratamento

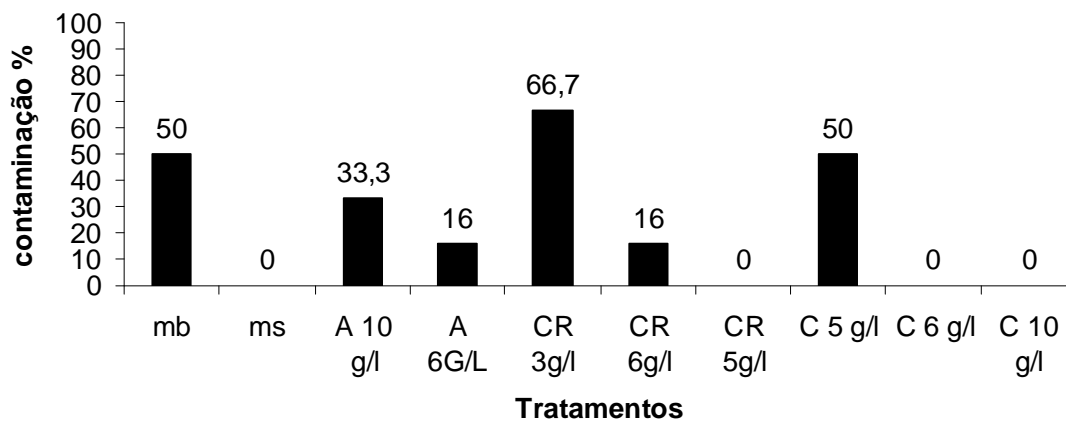
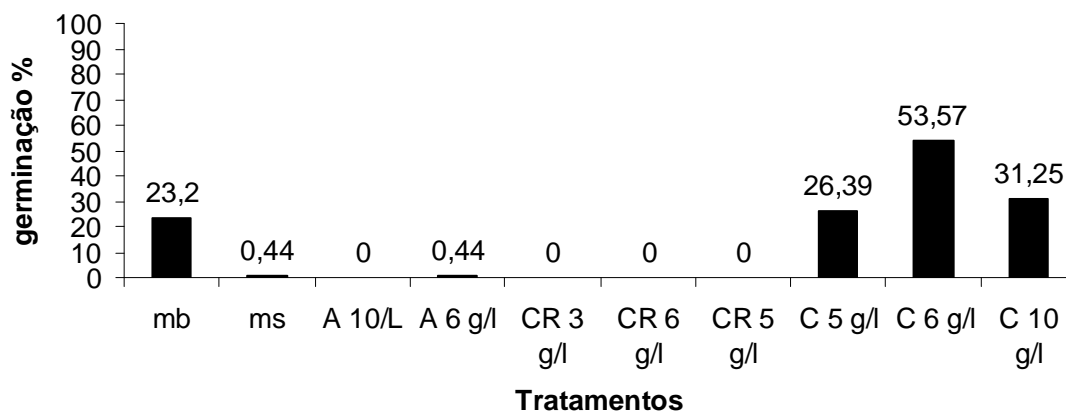


Figura 4:

Gráfico 2: Percentual de germinação em cada tratamento



Foi feita a análise estatística para avaliar a germinação das sementes de orquídeas em cada meio, considerando-se os 10 tratamentos do segundo experimento com seis repetições (cada frasco). A tabela 6 apresenta os dados reais da germinação de cada frasco. Os dados reais foram transformados em dados relativos, obtendo-se a raiz-quadrada de cada valor + 5. Os resultados obtidos pelo teste de Tukey com 5% de significância são apresentados na Tabela 7.

Tabela 6: Número de sementes germinadas em cada repetição de cada tratamento. Dados reais. Para frascos que sofreram contaminação, considerou-se o valor da germinação igual a zero, devido à necessidade de descarte desses frascos.

MB	MS	Alho 10g/l	Alho 6 g/l	Cravo 3 g/l	Cravo 6 g/l	Cravo 5 g/l	Canela 5 g/l	Canela 6 g/l	Canela 10 g/l
30	0	0	0	0	0	0	24	39	20
4	0	0	0	0	0	0	3	6	12
4	1	0	0	0	0	0	32	29	10
0	0	0	0	0	0	0	0	23	8
0	0	0	0	0	0	0	0	9	2
0	0	0	1	0	1	0	0	14	18

Tabela 7: Número de sementes germinadas em cada frasco de cada tratamento com os valores transformados.

Tratamentos	Média da germinação
MB	3,10 bc
MS	2,27 c
Alho 10g/l	2,23 c
Alho 6 g/l	2,27 c
Cravo 3 g/l	2,23 c
Cravo 6 g/l	2,27 c
Cravo 5 g/l	2,23 c
Canela 5 g/l	3,50 abc
Canela 6 g/l	4,86 a
Canela 10 g/l	4,00 ab

Valores transformados para raiz quadrada de cada valor + 5, para permitir a análise comparativa dos valores iguais a zero. Os valores contidos na segunda coluna representam a média da germinação de cada tratamento. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Por esta análise, apesar de o tratamento MB +canela 6g/l ter demonstrado a melhor taxa de germinação, não diferiu estatisticamente dos tratamentos MB + canela 10 g/l, e MB + canela 5 g/l. Acharmos importante, no entanto, o fato de o tratamento que recebeu a adição de canela 6 g/l, ter superado o MB em termos de permitir uma maior taxa de germinação, mostrando que a canela pode ser um aditivo interessante aos meios de cultura destinados a germinação de sementes de orquídeas *Epidendrum ellipticum* Graham . O MB, se mostrou equivalente aos tratamentos com adição de 5 e 10 g/l de canela em pó, no entanto, curiosamente não diferiu estatisticamente dos meios que receberam alho e cravo da índia como aditivos, que, por sua vez, demonstraram inibir o processo germinativo das sementes.

Outro resultado que nos foi permitido observar, aos 353 dias, ou seja, quase 1 ano após a semeadura *in vitro*, foi a de que o MB, que não recebeu nenhum ingrediente novo, foi o único que permitiu um desenvolvimento dos protocormos à fase de plântula, exibindo folhas e raízes formadas. Os outros meios que permitiram a germinação das sementes, ou seja, os meios MB + canela-em-pó 5, 6 e 10 g/l, não permitiram esse desenvolvimento dos protocormos. Seria necessário, a partir de agora, repicar os protocormos para frascos contendo meio-de-cultura nitrogenados, próprios para crescimento, como sugere FILHO (2008). A Figura 3 ilustra esse resultado.

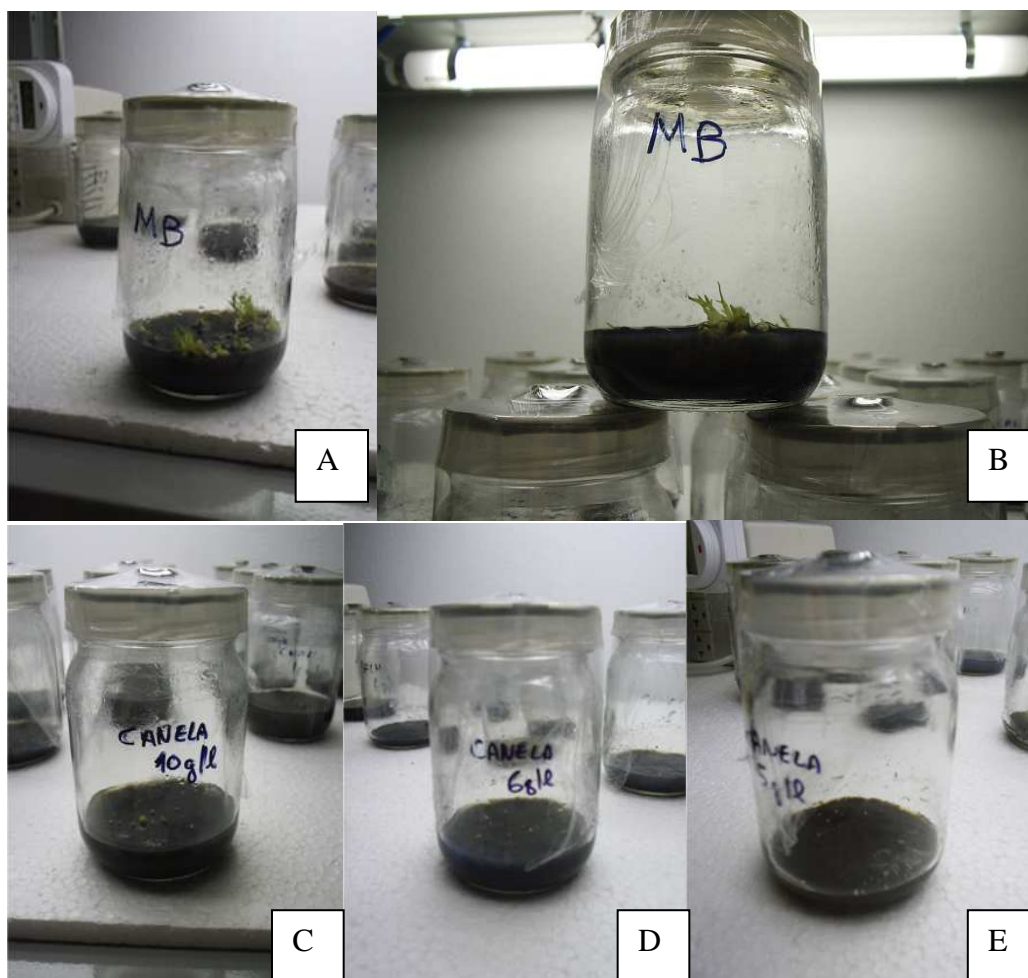


Figura 5: Resultado da germinação *in vitro* passados quase 1 ano (353 dias) após a semeadura. O MB foi o único que permitiu o desenvolvimento dos protocormos até a fase de plântula, com folhas e raízes desenvolvidas (A e B). Os tratamentos que receberam canela em pó como ingredientes não obtiveram esse mesmo desenvolvimento (C, D e E).

Conclusão

O acréscimo de canela em pó, de marcas comerciais, ao meio de cultura alternativo MB, na dose de 6 gramas / litro, influenciou positivamente a germinação de sementes da espécie *Epidendrum ellipticum* Graham. No entanto, nem esse nem os outros tratamentos que receberam canela em pó como ingredientes, permitiram o desenvolvimento dos protocormos ao nível de plântulas, num período de 353 dias. O acréscimo de cravo-da-índia comercial picado nas doses de 3, 5 e 6 g/l causou a inibição da germinação *in vitro* das sementes de *Epidendrum ellipticum* Graham e *Sophronis cernua* (Lindl.) Hook. O acréscimo de alho em pó comercial nas doses de 6 e 10 g/l também inibiu a germinação *in vitro* das sementes de *Epidendrum ellipticum* Graham. Somente o MB proporcionou o desenvolvimento dos protocormos de *Epidendrum ellipticum* Graham até o estágio de plântulas, com raízes e folhas formadas, no espaço de tempo de 353 dias.

DISCUSSÃO

De acordo com o levantamento das doenças que ocorrem em orquídeas, realizado no presente trabalho, verificamos que muitos patógenos que ocorrem em orquídeas em países desenvolvidos, como Japão, Alemanha e EUA, ainda não foram relatadas no Brasil. O que é uma boa notícia, também nos serve de alerta, em relação aos cuidados que devemos ter ao importarmos material propagativo do exterior. Já que a horticultura ornamental está se tornando cada vez mais significativa no nosso País, é comum que, produtores importem plantas para servirem de matrizes, buscando novidades para o mercado interno e externo. Verificamos que somente o nematóide *Pratylenchus scribneri* se encontra classificado como praga quarentenária A1, pela Instrução Normativa nº 52, de 20 de novembro de 2007, que estabelece a lista de pragas quarentenárias A1 e A2, que demandam atenção do sistema brasileiro de defesa fitossanitária. Nessa mesma lista, *Tomato ringspot virus*, que infecta orquídeas muito apreciadas, como *Cymbidium*, também aparece como praga quarentenária A1. Essa lista, que revoga a I. N. nº 38 de 14/10/1999, também apresenta os vírus *Impatiens necrotic spot virus* – INSV e *Tomato ringspot nepovirus* – ToRSV como pragas quarentenárias A1 (BRASILIA, 2007), o que mostra que as nossas autoridades competentes já demonstram a preocupação com o assunto.

De todas as doenças encontradas, as viroses são as mais preocupantes, pela perda que causam em todo o mundo. Devido ao alto grau de incidência, é necessário indexar material sadio para propagação vegetativa. Orquídeas provenientes de outros países deveriam ser testadas através de métodos rápidos de identificação dos principais vírus, antes de serem introduzidas em nosso País. Dentre os vírus que infectam orquídeas, os mais comuns são o CymMV e o ORSV (RIVAS *et al.*, 2000). O teste “ImmunoStrip”, da Empresa norte-americana Agdia para detecção de CymMV e ORSV em infecções simples e duplas, se mostrou bastante rápido e eficiente em relação a esses dois vírus, sendo que o fabricante adverte que, o teste não acusa a presença dos vírus, caso a titulação dos vírus nas plantas testadas, seja muito baixa. Esse fato foi possível de ser observado ao longo desse estudo, quando o teste “ImmunoStrip” apresentou resultado positivo para o CymMV, enquanto testes biológicos foram negativos para a mesma planta. A baixa concentração de vírus, sua distribuição irregular nas plantas, questões ambientais (luz, temperatura e nutrientes) e fatores intrínsecos à hospedeira, fazem com que os sintomas induzidos pelos vírus em orquídeas variem enormemente, fazendo com que, na prática, plantas aparentemente sadias podem estar infectadas, bem como plantas com sintomas podem apresentar resultados negativos (RIVAS *et al.*, 1996).

HU *et al.* (1993) comentam em seu estudo sobre detecção de vírus em orquídeas no Havaí, que, em áreas de produção que possuíam diversas espécies de orquídeas, algumas delas com oito a 12 anos de idade, a incidência de CymMV em híbridos de *Dendrobium* de quatro a oito anos de idade, foi maior que 90 %. Entretanto, em orquidários novos, ou então produtores que se dedicavam a poucas espécies, que prestavam mais atenção a práticas preventivas de controle de viroses, a incidência foi muito baixa, chegando, em média, a 2 %. Esses dados comprovam que o controle de doenças viróticas pode ser obtido através de práticas culturais preventivas, adicionadas ao uso de material propagativo sadio. A ocorrência de CymMV em espécies ainda não relatadas no Estado do Rio de Janeiro, como ocorreu com *Arundina bambusifolia*, coletada em Teresópolis, sugere a inexperiência de alguns produtores que permitem que plantas sejam infectadas nas produções e que sejam conduzidas ao mercado desta forma.

Outro fato interessante que se observa é a maior expressão de sintomas nas plantas com infecção dupla de CymMV e ORSV, em relação as que apresentam infecção simples. TANAKA *et al.* (1997) detectaram, em *Oncidium*, 79% de plantas com infecção simples de

CymMV que não apresentavam sintomas, enquanto que plantas com infecção dupla, apresentavam mosaico e manchas nas folhas em 90% dos casos.

O presente trabalho fez o primeiro relato de parasitismo de *Aphelenchoides fragariae* e de *A. ritzemabosi* em orquídea e de *A. ritzemabosi* em *Asplenium nidus*, no Brasil, mostrando que ainda se tem muito a pesquisar em relação a nematóides em orquídeas e também em outras culturas, no nosso País.

A presença de um protótipo de kit de diagnóstico fitossanitário para os fitopatógenos de orquídeas auxiliará em muito os produtores e pesquisadores iniciantes nesta cultura.

A micropropagação com meios de cultura alternativos surgiu como alternativa para pequenos produtores e orquidólogos, que pretendem propagar suas orquídeas até como hobby, utilizando-se de poucos recursos sem grandes investimentos com equipamento de laboratório e reagentes químicos, como fazem as grandes empresas de biotecnologia. No entanto, os resultados obtidos mostram que o meio alternativo que chamamos de meio básico (MB), não foi tão inferior aos meios tradicionais. O resultado da germinação *in vitro*, obtida neste trabalho com *Epidendrum ellipticum*, passados 353 dias após a sementeira, para se obter plântulas com cerca de um cm de altura, com folhas e raízes formadas, foi obtida por COLOMBO *et al.* (2004) em 270 dias usando sementes de *Cattleya loddigesii* e *Laelia lundii* em meio MS, modificado com metade da concentração dos macronutrientes e acrescido de 1 g L⁻¹ de carvão ativo, 30 g de sacarose e 7 g L⁻¹ de agar e pH ajustado para 6,4 ± 0,1. Uma diferença, portanto de apenas 83 dias (menos de 3 meses), que poderia justificar uma grande redução de investimentos, até para pequenas empresas de micropropagação e orquidários. A adição de um adubo foliar líquido, de marca comercial aos frascos com protocormos, aos 143 dias após a sementeira, foi positiva para se evitar a repicagem destes para um outro meio-de-cultura de crescimento, com composição mais rica em nitrogênio, prática comum nos laboratórios de biotecnologia. Nesta etapa, há sempre o risco das contaminações provocarem a perda de material, mesmo fazendo-se a operação em câmeras de fluxo laminar.

CONCLUSÃO

Podemos concluir, pelo presente trabalho, que foi possível fazer um diagnóstico preliminar dos principais fitopatógenos de orquídeas no Estado do Rio de Janeiro, desenvolver um protótipo de kit de diagnóstico de fitopatógenos para a cultura de orquídea e aplicar o protocolo elaborado na micropropagação de orquídeas, com vantagens sobre os protocolos tradicionais.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology** 5th ed. San Diego. Academic Press. 2005. 922 p.
- ARAÚJO, K. C. L. *et al.* **Cultura “in vitro” da Orquídea *Oncidium ceboleto* Swartz.** Disponível em: <http://www.ufrn.br/sites/pDroducao_ct/sec8_8.html> Acesso em 13 jun.2008.
- BAKER, C.; DAVIDSON, D; SCOATES, C. **White *Phalaenopsis* Ringspots – Mystery Solved.** Plant Pathology Circular No. 406 Fla. Dept. of Agric. & Consumer Services, May/June 2007 Division of Plant Industry. Disponível em <<http://www.doacs.state.fl.us/pi/enpp/pathology/pathcirc/pp406.pdf>> . Acesso em 26 jun. 2008.
- BERGMANN, E.C. & ALEXANDRE, M.A.V. **Aspectos Fitossanitários das Orquídeas.** Boletim Técnico do Instituto Biológico, São Paulo, n.11, p.5-51, jun., 1998.
- BEZERRA, J.L. & RAM, A. **A crosta-negra da baunilha (*Vanilla fragans*) causada por *Mycoleptodiscus indicus* (Moniliales, Hiphomycetes).** Fitopatologia Brasileira, v.11 p.717-724.out. 1986.
- BRASIL, Ministério da Defesa. **Decreto n. 3665, de 20 de novembro de 2000.** Dá nova redação ao Regulamento para a Fiscalização de Produtos Controlados (R-105). Disponível em: <<http://www.planalto.gov.br/CCIVIL/decreto/D3665.htm>>. Acesso em 26 jun.2008.
- BRASILIA, **Instrução Normativa nº 52, de 20 de novembro de 2007.** Brasília, 2007. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=18212>>. Acesso em 26 jun.2008.
- BRUNT, A. A.; CRABTREE, K.; DALLWITZ, M.J.; GIBBS, A.J.; WATSON, L.; ZURCHER, (eds.) (1996 onwards). **Vanilla mosaic potyvirus.** Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996. Disponível em: <<http://image.fs.uidaho.edu/vide/descr864.htm>>. Acesso em 24 set. 2006.
- CAMPOS, D. M. DE. **Orquídeas: micropropagação e quimioterapia de Meristemas.** Rio de janeiro. Expressão e Cultura, 2002.a
- CAMPOS, D. M. DE. **Orquídeas: Manual prático de Reprodução** 2^a ed. Rio de Janeiro. Expressão e cultura, 2002.b
- CARES, J. E. & S. P. HUANG. **Taxonomia Atual de Fitonematóides: Chave Sistemática Simplificada para Gêneros – Parte I.** Revisão Anual de Patologia de Plantas – RAPP v.8, 2000.
- COLOMBO, L.A.; FARIA, R. De T.; CARVALHO, J. F. R. P.de; ASSIS, A. M.; FONSECA, I.C.de B. **Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento in vitro de duas espécies de orquídeas brasileiras.** Acta Scientiarum. Agronomy, Maringá, v. 26, n. 2, p.253-258, 2004.

COOKE, R.B. **Doenças das Orquídeas Parte II Vírus**. Disponível em <<http://www.orquidario.org/palestras/palestra02.htm>> . Acesso em 12/12/2007.

COOLEN, W.A. & D'HERDE, C.J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. State Agricultural Research Centre, Ghent, 1972, 77 p.

FAST, G. **Orchideenkultur**. Stuttgart: Ulmer, 1980.

FILHO, J.G.de L. **Curso de Introdução ao Estudo e Cultivo de Orquídeas da Sociedade Brasileira de Orquidófilos**, edição de 1983. Disponível em <http://www.damianus.bmd.br/> Acesso em 26 jun.2008.

FRANKLIN, M.T. & Siddiqi, M.R. *Aphelenchoides besseyi*. Commonwealth Institute of Helminthology Descriptions of Plant-parasitic Nematodes Set. 1, No. 4. 1972.

FREITAS-ASTUA, J. & REZENDE, J.A.M. **Obtenção de *Cymbidium* livre da mancha anelar do *Odontoglossum* através da quimioterapia de meristemas**. Brasília. Fitopatologia Brasileira, 23 (2) junho 1998. p. 158-160.

FREITAS-ASTUA, J.; REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W. **Incidence of Orchid Viruses in the State of São Paulo, Brazil**. Brasília. Fitopatologia Brasileira, 24 (2) junho 1999. p. 125-130.

GARA, I.W.; KONDO, H.; MAEDA, T.; INOUE, N.; TAMADA, T. **Calanthe mild mosaic virus, a new potyvirus causing a mild mosaic disease of Calanthe orchid in Japan**. Journal of Phytopathology . Vol. 146, no. 7, pp. 357-363. Aug 1998.

GIORIA, R.; SOUZA, A. P. de; PEDRAZZOLI, D. S.; KITAJIMA, E. W.; KIMATI, H.; REZENDE, J.A.M.; VENDRAMIM, J. D.; PARRA, J.R. P. **Doenças e pragas que atacam as orquídeas**. Taubaté. Editora Brasil Orquídeas, 2003.

GUERRA, M.P. & NODAI, R.O. **Apostila de Biotecnologia** – CCA / Universidade Federal de Santa Catarina. Edição da Steinmacher, 2006. Disponível em: <<http://www.cca.ufsc.br/ldgv/Apostila%20Biotecnologia.pdf>> .Acesso em 30 jul.2007.

HAMMOND, J.; LAWSON R.H. **A Strain of Bean Yellow Mosaic Virus is aphid-transmitted from orchid**. ISHS Acta Horticulturae 234, VII International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants, Italy, 1988. Disponível em: <http://www.actahort.org/books/234/234_43.htm>. Acesso em 20 jun.2008.

HENRÍQUEZ, E. *et al.* 2002. **Detección de nemátodos foliares en frutilla en Chile, y determinación taxonómica de *Aphelenchoides besseyi* en plantas de orquídeas provenientes de Taiwan**. Servicio Agrícola y Ganadero Departamento Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias Agrícola y Pecuaria. Chile. XII Congreso Nacional de Fitopatología resúmenes, 2002. Disponível em: http://www.fitopatologiachile.cl/trabajos02/XII.html#Articulo_26. Acesso em 22/02/2008.

HU, J.S.; FERREIRA, S.; WANG, M.; XU, M.Q. **Detection of Cymbidium Mosaic Virus, Odontoglossum Ringspot Virus, Tomato Spotted Wilt Virus, and Potyviruses Infecting Orchids in Hawaii.** *Plant Disease*. Vol. 77 n.5 :464-468., 1993.

ICTVdB Management (2006). 00.074.0.01.005. **Cymbidium ringspot virus.** In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/00.074.0.01.005.htm>>. Acesso em 26 jun.2008.

ICTVdB Management (2006). 00.017.0.81.016. **Dendrobium vein necrosis virus.** In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA, 2006. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/00.017.0.81.016.htm>> Acesso em 25 jun. 2008.

ICTVdB Management (2006). 00.057.0.01.025. **Dendrobium mosaic virus.** In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/00.057.0.01.025.htm>>. Acesso em 26 jun.2008.

ICTVdB Management (2006). 00.057.0.81.041. **Habenaria mosaic virus.** In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/00.057.0.81.041.htm>>. Acesso em 26 jun. 2008.

JIMÉNEZ, J.G.C. **Identificación de los virus que afectan orquídeas nativas em dos viveros del Valle Central de Costa Rica.** 79 p. 2002. Dissertação (Licenciatura em Biologia) – Facultad de Ciências, Escuela de Biología. Ciudad Universitária Rodrigo Facio, Costa Rica. 2002.

JORDAN, R.; GUARAGNA, M.A.;KINARD, G.; LYNN, S. **Detection and first report of Dasheen Mosaic Virus and second potyvirus infecting the terrestrial orchid *Spiranthes cernua*.** *Acta Horticulturae* 568: X International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants. 2000. Disponível em <http://www.actahort.org/members/showpdf?booknr=568_37>. Aceso em 26 jun. 2006.

LESEMANN, D.E. & VETTEN, H.J. **The occurrence of Tobacco Rattle and Turnip Mosaic Viruses in *Orchis* ssp., and of an Unidentified Potyvirus in *Cypripedium calceolus*.** *Acta Horticulturae* 164: 45-54. VI International Symposium on Virus Disease of Ornamental Plants. R. K. Horst, Ithaca, NY, USA , 1985.

MACKENZIE A. M.; NOLAN, M.; WEI K, J.; CLEMENTS M. A.; GOWANLOCK D.; WALLACE B.J.; GIBBS A.J. **Ceratobium mosaic potyvirus : another virus from orchids.** *Archives of virology*. Springer, Wien. Vol. 143, n°5, pp. 903-914, 1998.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. **A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures.** *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, p. 473-479, 1962.

NOBREGA, N. R. **Uma doença de vírus em orquídea.** *Biológico*, São Paulo, v.13, p.62, 1947.

RIVAS, E.B.; DUARTE, L.M.L., ALEXANDRE, M.A.V., CHAGAS, C.M. **Viroses em orquídeas no Estado de São Paulo.** *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.63, n.1, p.31-35, jan/jun.,1996.

RIVAS, E.B.; DUARTE, L.M.L.; ALEXANDRE, M.A.V.; PEZANI, E.F. **Deteção de *Odontoglossum Ringspot Virus* através de RT-PCRE.** *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.67 (supl.), p.1-145, 2000.

RIVAS, E.B. **Viroses de Plantas Ornamentais e Medidas de Controle.** XIV Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico. Plantas Ornamentais. Pariquera-Açu – SP. 6 e 7 de abril de 2006. Disponível em: <<http://www.biologico.sp.gov.br/rifib/XIVRifib/rivas.PDF>>. Acesso em: 20 jun. 2008.

SEAG. Secretaria da Agricultura, Pecuária e Pesca. Portal do Governo do Estado do Espírito Santo. Setor - **Floricultura.** Disponível em: <http://www.seag.es.gov.br/setores/floricultura/?cd_matia=79&cd_site=52> . Acesso em 19 jun.2007.

SEGATTO, J. **Brasil tem 10% das espécies de orquídeas conhecidas no mundo.** Agência Brasil – Abr. Brasília, 2001. Disponível em: <http://www.radiobras.gov.br/ct/2001/materia_170801_3.htm>. Acesso em 20 mar.2008.

SILVEIRA, Verlande, D. **Micologia** 5^a ed. Rio de Janeiro. Âmbito Cultural. 1995. 336 p.

SILVEIRA, S.G.P., S.M. CURI, R.S. RAMOS & C. SINIGAGLIA. **Ocorrência do nematóide *Aphelenchoides bicaudatus* em cebola e *A. composticola* em orquídea.** *Nematologia Brasileira*, 16: 89, 1992.

SHELEF, L. A. **Antimicrobial effects of spices.** *Journal of Food Safety*, Connecticut, v. 6, n. 1, p 29-44, Aug. 1983.

SINGH, M.K.; SHERPA, A.R.; HALLAN, V.; ZAIDI, A A. **A potyvirus in *Cymbidium spp.* in northern Índia.** *Australasian Plant Disease Notes*, 2007, 2, 11–13. Disponível em: <http://www.publish.csiro.au/?act=view_file&file_id=DN07005.pdf>. Acesso em 30 jun. 2008.

SKELTON, A.; DALY, M.; NIXON, T.; HARJU, V.; MUMFORD, R.A. **First record of Bean yellow mosaic virus infecting a member of the orchid genus *Dactylophiza*.** *New Disease Report. The British Society for Plant Pathology*, 2006. Disponível em <<http://www.bspp.org.uk/ndr/july2006/2006-55.asp>>. Acesso em 26 jun. 2008.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. p.106. 2005.

TANAKA, S.; NISHII, H.; ITO, S.; KAMEYA-IWAKI, M. **Detection of Cymbidium mosaic Potexvirus and Odontoglossum Ringspot Tobamovirus from Thai orchids by Rapid Immunofilter Paper Assay.** Plant Disease, vol.81, n.2 p. 167-170, fev.1997.

TIHOHOD, D. 1993. **Nematologia Agrícola Aplicada.** FUNEP, Jaboticabal. 372 p.

UNEMOTO, L.K.; FARIA, R.T.; VIEIRA, A.O.S.; DALIO, R.J.D. **Propagação in vitro de Orquídeas Brasileiras em Meio de Cultura Simplificado.** R. Bras. Agrociência, Pelotas, v.13, n.2, p. 267-269, abr-jun, 2007.

WATANABE, D. **Orquídeas: manual de cultivo.** São Paulo: AOSP – Associação Orquidófila de São Paulo, 2002.

YAO, J.M.; TAINTER, F.H.; ZIMMERMANN, M.T. **The Occurrence of Tomato Ringspot Virus in *Ponthieva racemosa*.** Plant Disease 78:925, 1994.

YOU, X.Z., CHING, C.C., YUH, K.C., FUH, J.J. **Identification and characterization of a potyvirus causing chlorotic spots on Phalaenopsis orchids.** European Journal of Plant Pathology, V. 121 n.1 May 2008 p.87-95. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/q60126x2425x3083/>. Acesso em 26 jun. 2008.

ANEXO

RESUMOS DE TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

- 127** FERRUGEM EM ORQUIDEAS DO GENERO *Denphalium* NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL/ Rust in orchids of the *Denphalium* sort in the state of Rio de Janeiro, Brazil. E.H.S. KLEIN¹, P.S.T. BRIOSO²; ¹Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada/DEF/IB/UFRRJ.; ²Laboratório Oficial de Diagnostico Fitossanitario/DEF/IB/UFRRJ, Caixa Postal 74585, Seropédica-RJ, 23851-970. E-mail: brioso@bighost.com.br.

As orquídeas constituem, uma das maiores famílias das angiospermas com mais de 25.000 espécies e híbridos catalogados. As orquídeas do gênero *Denphal* ou *Denphalium* ocupam cada vez mais espaço no mercado de orquídeas de vaso e para corte, sendo comum nas floriculturas de todo o Estado. Objetivando identificar o fitopatógeno associado a plantas do gênero *Denphal* com sintomas foliares de pústula,

coletadas em 2006 no RJ, procedemos a observação ao microscópio ótico de cortes foliares sintomáticos corados com azul de Porrier. Foi possível observar uredosporos e, raros teliosporos bicelulares, com pedicelos livres sem apêndices, caracterizando o gênero *Puccinia*. Trata-se, portanto, de uma "Ferrugem" ainda não relatada no Estado e no referido gênero de orquídea.

- 128** CARACTERIZAÇÃO SINTOMATOLÓGICA DE *Didymella bryoniae* EM MELOEIRO NOBRE./Symptoms of gummy stem blight in muskmelon. F. GASPAROTTO^{1,2}, J.B. VIDA⁴; J.R. VERZIGNASSI¹, S.M. BONALDO^{1,4}; D.J. TESSMANN¹; J.C.T. COLELLA¹ Univ. Est. de Maringá, 87020-900, Maringá, PR; ²Bolsista CAPES; ³Embrapa/CPATU; ⁴Bolsista CAPES/PRODOC.

A podridão gomosa (*D. bryoniae*) tem sido a principal doença em meloeiro nobre cultivado em ambiente protegido na Região Norte do Paraná. Em mudas, antes do transplante, os sintomas não se têm manifestado, com a doença permanecendo em estado latente. Tanto em casa-de-vegetação, quanto em campo, após o transplante, geralmente os sintomas iniciais aparecem no caule na região de inserção das folhas cotiledonares e estão associados à sua senescência: pequenas manchas

oliváceas-claras, aquosas, evoluindo para manchas de coloração palha clara, às vezes corticosas, se estendendo tanto ascendente como descendente. Em algumas plantas ocorre o fendilhamento do caule na região da lesão. Manchas velhas tomam a coloração escura, onde ocorre a formação de estruturas de frutificação de cor escura, mais comumente picnidio e em menor número peritécio. Sob baixa umidade do ar, a exsudação de goma é rara e mais freqüente sob alta umidade.

- 129** PATOGENICIDADE E AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Myrothecium roridum* EM FOLHAS DE FEIJÃO /Pathogenicity and aggressiveness of *Myrothecium roridum* isolates on beans. F.S. BARBOSA; L.A. CORDEIRO; M.L. PAZ LIMA, FACTU, Faculdade de Ciências e Tecnologia de Unai, 38610-000, Unai, MG.

Avaliou-se a agressividade e patogenicidade de oito isolados de *Myrothecium roridum* sob folhas de feijão (*Phaseolus vulgaris*). Foram utilizados oito isolados de oriundos de melão, algodão, soja e pepino (MT, MA, SC e TO), sendo repicados em meio batata-dextrose-ágar (BDA). Discos de micélio foram colocados em três folíolos com ferimentos e três folíolos sem ferimentos de feijão cv. Pérola. Em ambos os experimentos foram avaliados por um período de cinco dias após a inoculação a presença ou ausência de sinais do fungo nas folhas (patogenicidade), logo após foi avaliado o tamanho das lesões no tempo (agressividade) e o intervalo em dias da presença de sinais do patógeno

(período de latência, PL). No último dia de avaliação tanto em folhas com ferimentos e folhas sem ferimentos o isolado Myr 18 (soja, MA) foi o mais agressivo. Em folhas com ferimento o PL foi menor - dois dias (Myr 13, 14 e 18), e sem ferimentos o PL foi de três dias (Myr 13, 14, 18 e 25) no primeiro experimento. No segundo experimento novamente PL foi menor - dois dias para o isolado Myr 18, com ferimentos e para tratamentos sem ferimentos o PL foi de três dias para os isolados Myr 18 e 13. Neste trabalho o isolado oriundo de soja-*Leguminosae* do estado do Maranhão como mais agressivo em folhas de feijoeiro.

- 130** DIAGNOSE DE DOENÇAS DE PLANTAS NO OESTE CATARINENSE, DE 2004 A 2006/Plant disease diagnosis in the west of Santa Catarina, from 2004 to 2006. G.F. THEODORO¹; D.H. HERBES²; F. VAVASSORI²; C. DEDORDI²; R.R. CHIARELLO². ¹UFMS, CP 9, 79560-000, Chapadão do Sul, MS; ²UNOCHAPECÓ, CP 747, 89809-000, Chapecó, SC.

Foram avaliadas 542 amostras de plantas com suspeita de estarem doentes, no Laboratório de Fitopatologia da Epagri/Cepaf, em Chapecó, SC, de set./02 a jul./06, oriundas de SC (93,4%), RS (5,3%) e PR (1,3%). A diagnose foi realizada por meio da sintomatologia, caracterização do agente etiológico e, quando necessário, teste de patogenicidade. Em SC, as amostras procederam de Chapecó (30,8%), Caxambu do Sul (7,5%), Xaxim (3,7%), entre outros, e foram enviadas, principalmente, por escritórios municipais de agricultura (43,7%), cooperativas (16,4%), pesquisadores (14,6%) e produtores rurais

(13,5%). Os agentes etiológicos foram fungos (69,7%), bactérias (13,4%), vírus (4,8%), nematóides (4,1%) e outros (1,2%). Cerca de 7,0% das doenças tiveram causa abiótica. As doenças foram classificadas, de acordo com McNew, no grupo cinco (46,2%), três (27%), seis (9,5%), quatro (8,4%), um (6,1%) e dois (2,8%). Houve prevalência de grandes culturas (37,6%), frutíferas (23,1%), hortaliças (17,3%), essências florestais (11,4%), plantas de cobertura e forragens (6,1%), plantas ornamentais (3,6%) e plantas medicinais (0,9%).

- 131** INCIDÊNCIA DE DOENÇAS EM MILHO CULTIVADO NO OESTE CATARINENSE DURANTE A SAFRA 2005/06/Incidence of diseases in corn cultivated in the west of Santa Catarina during the 2005/06 cropping season. G.F. THEODORO¹; D.H. HERBES²; C. DEDORDI²; R.R. CHIARELLO². ¹UFMS, CP 9, 79560-000, Chapadão do Sul, MS; ²UNOCHAPECÓ, CP 747, 89809-000, Chapecó, SC.

0006

Eficácia de fungicidas no controle da ferrugem da soja. Neves¹, D.L.; Ribeiro¹, G.C.; Pagnocelli¹, A.; Campos¹, H.D.; Silva¹, L.H.C.P.; Secco¹, M.D. ¹Universidade de Rio Verde – FESURV. E-mail: campos@fesurv.br. Efficacy of fungicides in the rust soybean control.

Com o objetivo de avaliar o efeito de fungicidas no controle da ferrugem soja, um experimento foi realizado em Rio Verde, GO. Dentre os tratamentos, além da testemunha não tratada, utilizaram-se diferentes dosagens do fungicida trifloxistrobina em mistura com tebuconazol, prothioconazol ou ciproconazol, com ou sem a adição de óleo metilado de soja. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso em quatro repetições. Avaliaram-se a severidade da doença, desfolha, rendimento e seletividade. Na última avaliação todos os tratamentos que receberam aplicação controlaram significativamente a severidade da doença em relação à testemunha, tanto na metade inferior quanto superior da planta. A severidade da doença na testemunha chegou a 100% na metade inferior e a 59% na metade superior. Nos tratamentos que receberam aplicação de fungicidas, a severidade foi inferior a 2,92% e 0,60% para as metades inferior e superior das plantas, respectivamente. Não foi observado efeito de dose ou da adição de óleo nesta avaliação. Enquanto a desfolha na testemunha foi de 80%, nos tratamentos com fungicidas, esta foi inferior a 17,62%. Ao se avaliar o rendimento da cultura, verificou-se que todos os tratamentos apresentaram maiores pesos de mil grãos e produtividade em relação à testemunha. A partir do estádio R5.4, foram verificados sintomas leves de fitotoxidez nos tratamentos contendo trifloxistrobina + prothioconazol, na maior dosagem, e trifloxistrobina + tebuconazol, quando da adição de óleo.

0007

Eficácia dos fungicidas flutriafol + tiofanato metílico e tiofanato metílico no controle da antracnose na cultura da soja. Neves¹, D.L.; Marcório², G.C.; Ribeiro¹, G.C.; Campos¹, H.D.; Silva¹, L.H.C.P. ¹Universidade de Rio Verde – FESURV. ²Engenheiro Agrônomo. E-mail: campos@fesurv.br. Efficacy of flutriafol + thiophanate methyl and thiophanate methyl in the soybean anthracnose control.

Com o objetivo de avaliar a eficácia dos fungicidas flutriafol + tiofanato metílico e tiofanato metílico, no controle da antracnose soja, um experimento foi realizado em Montividiu, GO. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso em 4 repetições. A eficácia dos fungicidas foi realizada com base na incidência da doença, peso de mil grãos e produtividade. Plantas tratadas com fungicidas apresentaram menor incidência em trifolios em relação à testemunha não tratada. Ao se avaliar a incidência da doença nas vagens, apenas os tratamentos que receberam aplicação dos fungicidas flutriafol + tiofanato metílico, independente da dosagem utilizada, e tiofanato metílico na maior dose, diferiram significativamente da testemunha. Em relação ao rendimento da cultura, ao se avaliar o peso de mil grãos observou-se que não houve diferenças significativas entre os tratamentos contendo flutriafol + tiofanato metílico, nas doses de 60+300 e 70+350 g i.a./ha, tiofanato metílico, na menor dose, epoxiconazol + pyraclostrobina e ciproconazol + azoxystrobyna que produziram significativamente mais que a testemunha. A produtividade na testemunha foi de 2529,88 kg/ha e nos melhores tratamentos variou de 2797,00 kg/ha (tiofanato metílico na menor dose) a 2892,82 kg/ha (flutriafol + tiofanato metílico na dose de 60+300 g i.a./ha). Não observou sintomas de fitotoxidez.

0008

Contribuição do tratamento de sementes de soja no manejo da ferrugem asiática. Togni^{1*}, D.A.J.; Menten¹, J.O.M.; STASIEVSKI¹, A. ¹ESALQ/USP, LEF/Setor de Fitopatologia, Piracicaba/SP. *CNPq. E-mail: diogoalq@yahoo.com.br; ²Arysta Life Science. Contribution of soybean seed treatment on asiatic rust management.

O tratamento de sementes de soja com produtos eficazes pode contribuir no manejo da ferrugem asiática. Assim, objetivou-se comparar diferentes produtos fitossanitários, aplicados via tratamento de sementes, no manejo da ferrugem asiática da soja (FAS), por meio do período residual dos mesmos e da diminuição da severidade da doença. Sementes de soja,

cultivar Conquista, foram tratadas com carboxim+tiram (50+50g i.a./100kg sementes) e diferentes produtos (ciproconazol+azoxistrobin (10+25); epoxiconazol (2,5); difenoconazol (48); fluquinconazol (50); flutriafol (10); flutriafol TS (5); flutriafol+tiofanato metílico (10+50); tebuconazol (10); tebuconazol+trifloxistrobin (10+5); tetraconazol (10); triticonazol (25); acibenzolar-S-methyl (2,5) e pó de rocha (2%). As sementes foram semeadas em campo (15 sem/m). Verificou-se que ciproconazol+azoxistrobin e epoxiconazol foram fitotóxicos, diminuindo a germinação das sementes. Fluquinconazol, flutriafol TS, flutriafol+tiofanato metílico, tebuconazol, tebuconazol+trifloxistrobin, triticonazol, acibenzolar-S-methyl e pó de rocha, mostraram efeito residual sobre a FAS até os 61 dias após a semeadura, diminuindo a severidade da doença. Tebuconazol+trifloxistrobin diminuiu a desfolha da planta. Tebuconazol e tebuconazol+trifloxistrobin reduziram a área abaixo da curva de progresso da doença.

0009

Ocorrência do nematóide foliar *Aphelenchoides* em orquídea no Estado do Rio de Janeiro. Klein, E.H.S.¹; Nascimento, R.S.¹; Brioso, P.S.T.¹; Pimentel, J.P.². ¹Mestrando do Programa de Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, UFRRJ. E-mail: studt.everaldo@uol.com.br; ²Área de Fitopatologia/DEF/IB/UFRRJ. BR 465, Km 47 Seropédica, RJ, CP 74585-23.851-970. Occurrence of foliar nematodes *Aphelenchoides* in orchids in the State of Rio de Janeiro.

As orquídeas são plantas de alto valor agregado, usadas como flor de corte, ou como plantas envasadas. Em 2006 foi coletada em Teresópolis (RJ), plantas de *Cattleya* híbrida, com lesões locais amareladas, evoluindo para necrose de toda a lâmina foliar. Observando-se folhas dissecadas sintomáticas em microscópio ótico, constatou-se, nos tecidos lesionados, grande quantidade de nematóides. Objetivando identificar e testar a patogenicidade dos mesmos, procedeu-se a extração mediante a trituração de folhas sintomáticas seguida de peneiramento e calibração do inóculo para 1200 indivíduos.ml⁻¹ sendo inoculadas folhas de *Cattleya*, asplênio, begônia, crisântemo, violeta africana e azaléia. Parte dos nematóides foram fixados e identificados ao microscópio ótico. Das plantas inoculadas, foi possível demonstrar a patogenicidade e multiplicação em orquídea, crisântemo e asplênio com sintoma de necrose, que o patógeno era do gênero *Aphelenchoides*. Tais dados demonstram a importância deste patógeno, para o mercado de floricultura.

0010

Avaliação de diferentes tipos de cobertura de canteiro no controle de víruses em alface. Borges¹, L.M.; Pavan², M.A.; Silva³, N.; Sakate⁴, R.K.; Albuquerque⁴, F.A.; Echer¹, M.M. ¹Engenheira Agrônoma, Maringá, PR; ²Depto. de Defesa Fitossanitária, UNESP/FCA, Botucatu-SP; ³Depto. de Agricultura e Melhoramento de Plantas, UNESP/FCA, Botucatu-SP; ⁴Dpto. de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, PR. E-mail: lucianamborges@bol.com.br. Evaluation of different mulch types in lettuce viruses control.

Com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes coberturas de canteiro no controle de fitovíruses na cultura da alface (*Lactuca sativa L.*) tipo lisa, foi realizado um experimento na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Produção São Manoel, pertencente à Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP, Campus Botucatu, no período de primavera/verão. Foram avaliados quatro tipos de cobertura: palha de arroz, solo nu, túnel plástico e túnel telado. A operação de colheita foi realizada aos 35 dias após o transplântio. Avaliou-se a incidência de *Lettuce mosaic virus* (LMV-II), *Lettuce mottle virus* (LeMoV) e *Tospovirus* através da contagem do número de plantas com sintomas e da coleta de amostras, que foram submetidas a testes moleculares, testes de inoculação mecânica em hospedeiras diferenciadas e análise de microscopia eletrônica. Constatou-se, nos diferentes tratamentos, as seguintes porcentagens de plantas com virose: 8,48% (palha de arroz), 10,84% (solo nu), 5,14% (túnel plástico) e 8,89% (túnel tela). Confirmou-se, nas amostras coletadas, a presença de LeMoV (3,84%), *Tospovirus* (16,16%) e LMV-Common (60,82%).

100 INFLUÊNCIA DOS MÉTODOS DE SUPERACÇÃO DE DORMÊNCIA NA VIABILIDADE E SANIDADE DE SEMENTES DE ALGODÃOZINHO-DO-CAMPO (*Cochlospermum regium*). Influence of methods of break the dormancy in the viability and sanity of seeds of "little cotton" (*Cochlospermum regium*). R.F. ROSSI¹; S.M. KULCZYNSKI¹; M.M.M. BARBOSA¹; L.A. FREITAS¹; L.L. DOS REIS¹ & A.M. FERNANDES¹. ¹Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Rod. MS 306 km 6,4, 79540-000, Cassilândia-MS.

O algodãozinho-do-campo é uma planta nativa do cerrado que apresenta indicações medicinais populares. O objetivo deste trabalho foi a caracterização da qualidade fisiológica e sanitária de sementes de algodãozinho. Os tratamentos foram constituídos de: escarificação com H₂SO₄ concentrado por 90 e 150 min, umedecimento inicial do substrato com solução de KNO₃ a 0,2%, imersão em água quente a 100°C e a 85°C (banho-maria) por 1 min, teste de frio 5°C (geladeira) por 7 e 14 dias de armazenamento, escarificação com lixa e testemunha, utilizado-se em DIC. As sementes foram submetidas ao "Blotter Test", a

25°C e fotoperíodo de 12 horas. A sanidade das sementes foi conduzida juntamente com o teste de germinação aos 14 dias, onde houve a incidência dos seguintes microorganismos: *Aspergillus niger* spp., *A. flavus* spp., *Cladosporium* spp., *Curvularia* spp., *Penicillium* spp. e *Rhizopus* spp. Os melhores resultados de germinação foram encontrados nos tratamentos com lixa e banho-maria (85°C) com a menor incidência de fungos. Não houve relação entre as espécies de fungos encontradas e os tratamentos realizados.

101 OCORRÊNCIA DE *Aphelenchoides ritzemabosi* EM ORQUÍDEA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. / Occurrence of *Aphelenchoides ritzemabosi* in orchids in Rio de Janeiro State. E.H.S. KLEIN*, R.S. NASCIMENTO*, J.P. PIMENTEL & P.S.T. BRIOSO**. Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário (L.O.D.F.), Área de Fitopatologia, DEF/IB/UFRRJ, CP 74585, 23851-970, Seropédica-RJ.

As orquídeas são plantas de alto valor agregado e importantes para o mercado de floricultura no Brasil e no mundo. Em 2007, foi coletada em Teresópolis (RJ), um exemplar da orquídea híbrida BLC (Maria Aparecida Barani x C. Dinah), com lesões locais amareladas, evoluindo para necrose, ocasionando a queda prematura de folhas. Objetivando-se identificar o fitopatógeno envolvido procedeu-se a observação de secções foliares sintomáticas ao microscópio óptico. Constatou-se, nos tecidos lesionados, grande quantidade de nematóides em to-

dos os estágios. Uma parte dos nematóides foram fixados e identificados pelas características morfométricas ao microscópio óptico. Foi possível a identificação da espécie *Aphelenchoides ritzemabosi*, sendo este o primeiro relato de parasitismo de *Aphelenchoides ritzemabosi* em orquídea no Estado do Rio de Janeiro. Tal nematóide pode vir a se tornar um problema fitossanitário de importância para o cultivo de orquídeas e outras plantas ornamentais no Brasil.

102 INCIDÊNCIA DE *Fusarium* spp. EM SEMENTES DE PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.). / Incidence of *Fusarium* spp. in meek pinion seeds (*Jatropha curcas* L.). M.M.M. BARBOSA¹; S.M. KULCZYNSKI¹; A.M. FERNANDES¹; R.F. ROSSI¹; L.L. DOS REIS¹ & L.A. FREITAS¹. ¹Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Rod. MS 306 km 6,4 CEP 79540-000 Cassilândia-MS.

O gênero *Fusarium* spp. é um dos principais fitopatógenos de plantas, com ampla distribuição causando redução na germinação de sementes, podridão de raiz e colmo e morte de plântulas. Este trabalho teve como objetivo avaliar a incidência de *Fusarium* spp. em três lotes de sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) provenientes de diferentes localidades: Cassilândia-MS (lote 1), Eldorado-MS (lote 2) e Paraguai (lote 3). A sanidade foi determinada pelo emprego do *Blotter Test* com e sem assepsia com hipoclorito de sódio (1%) por 3 minu-

tos. Foram utilizadas 200 sementes, as quais foram incubadas a temperatura de 25 (± 2)°C e fotoperíodo de 12 horas. O lote que apresentou menor incidência de *Fusarium* spp. foi o lote 1 não diferindo estatisticamente do lote 3. A maior ocorrência de *Fusarium* spp. em sementes de pinhão-manso foi verificado no lote 2 diferindo dos demais. Sementes com e sem assepsia superficial não apresentaram diferenças estatísticas entre os lotes 1 e 2 em relação à incidência de *Fusarium* spp., porém no lote 3 houve maior incidência em sementes com assepsia.

103 QUALIDADE SANITÁRIA DE SEMENTES DE *Brachiaria brizantha* COMERCIALIZADAS EM CASSILÂNDIA-MS. / Sanitary quality of seeds of *Brachiaria brizantha* marketed in Cassilândia-MS. L.S. DUARTE¹; S.M. KULCZYNSKI¹; M.M.M. BARBOSA¹; A.M. FERNANDES¹; R.F. ROSSI¹; L.L. DOS REIS¹ & L.A. FREITAS¹. ¹Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Rod. MS 306 km 6,4 CEP 79540-000 Cassilândia-MS.

A presença de patógenos nas sementes, independentemente de sua transmissibilidade pode afetar o vigor e o rendimento a campo, portanto o sucesso de qualquer cultura tem como fator preponderante o uso de sementes livres de microorganismos. Este trabalho objetivou avaliar a qualidade sanitária de semen-

tes de duas cultivares de *Brachiaria brizantha* (Marandú e MG5) provenientes de duas agropecuárias (Procampo e Agrofort). A qualidade sanitária foi determinada através do *Blotter test* sem assepsia e a fisiológica através da germinação e vigor. Todos os genótipos de braquiária estudadas apresen-

6 e 10 dias após a infecção. Bibliotecas subtrativas de cDNA foram construídas e a maioria dos fragmentos diferenciais obtidos apresentou tamanhos de 0.1 a 1.5 Kb. Estes fragmentos foram clonados em vetor pGem-T-Easy (Promega) e seqüenciados. Foram obtidas 628 seqüências válidas, que formaram 284 clusters. Deste total, 169 clusters foram formados por uma única seqüência e o maior cluster agrupou 25 seqüências. O cluster mais populoso mostrou

similaridade com a proteína RNase S-like protein, envolvida na defesa contra patógenos. Outros genes envolvidos com a interação planta-patógeno foram identificados incluindo oxidase, metiltransferase, cisteína-protease e lipoxigenase. Foram também analisados genes expressos apenas no genótipo suscetível e foi observado que a maioria apresentou similaridade com proteínas de função desconhecida.

HISTOPATOLOGIA COMPARADA DE GENÓTIPOS DE *Coffea arabica* RESISTENTE E SUSCETÍVEL INFECTADOS POR *Meloidogyne incognita* [COMPARED HISTOPATHOLOGY OF *Coffea arabica* RESISTANT AND SUSCEPTIBLE GENOTYPES INFECTED WITH *Meloidogyne incognita*] Albuquerque, E.V.S.¹; Costa, P.M.¹; Gomes, A.C.M.¹; Falcão, R.¹; Ribeiro, V.F.¹; Eira, M.T.S.¹; Pereira, A.A.¹; Nicole, M.²; Carneiro, R.M.D.G.¹; Grossi-de-Sá, M.F.G.¹. ¹Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia, CEP 708849-970 Brasília, DF, Brasil. ²IRD. E-mail: erikavs@cenargen.embrapa.br

O cafeeiro da espécie *Coffea arabica* é altamente suscetível a fitonematóides, sendo *Meloidogyne incognita* uma das espécies mais agressivas. Este trabalho visou a caracterização da resistência do genótipo UFV 408-28 de *C. arabica* a *M. incognita* raça 1 e o estudo dos mecanismos de resistência e suscetibilidade. Esse genótipo apresentou redução de 86 % no fator de reprodução (FR) do nematóide (7,8) quando comparado ao controle suscetível cv. Catuai Vermelho, IAC 15 (55,1). Cortes histológicos foram realizados em raízes dos genótipos suscetível e resistente, inoculadas com 10.000 juvenis de segundo estágio (J2) e avaliadas aos 2, 4, 6, 7, 8, 10, 14, 28 e 34 dias após a inoculação (dpi). Nas plantas suscetíveis, observou-se o início da infecção aos 2 dpi com a presença de J2 no córtex. Aos 6 dpi, verificou-se a

migração dos J2 para o cilindro vascular e indução de células gigantes. Subseqüentemente, observou-se a formação de galhas e o desenvolvimento de J3/J4 após 28 dpi. No genótipo resistente, verificou-se resposta de hipersensibilidade (HR) de 6 a 14 dpi. Não foi detectada a formação de J3 ou J4 na planta resistente até 28 dpi. Os resultados obtidos confirmaram que: ocorreu penetração em ambos os genótipos; ocorreu HR na planta resistente, indicando que o mecanismo de resistência é do tipo gene-gene incompatível. Esses dados são importantes para a posterior identificação dos genes diferencialmente expressos em *C. arabica* em resposta à infecção por *M. incognita*.

OCORRÊNCIA DE *Meloidogyne incognita* EM *Lysimachia congestiflora* NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO [OCCURRENCE OF *M. incognita* IN *Lysimachia congestiflora* IN THE STATE OF RIO DE JANEIRO, BRAZIL] Nascimento, R.R.S.; Klein, E.H.S.; Pimentel, J.P. UFRuralRJ, Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biologia aplicada Departamento Entomologia e Fitopatologia, Instituto de Biologia. Seropédica, RJ, CEP 23890-000 E-mail: rhadyson@bol.com.br

A Lisimáquia (*Lysimachia congestiflora*) é uma planta ornamental que vem se destacando cada vez mais no segmento de paisagismo, pelas suas qualidades múltiplas de utilização, seja em canteiros como planta rasteira de forração, seja como planta pendente em vasos e jardineiras. Planta da família das Primuláceas, é conhecida por ser resistente a pragas e doenças e por tolerar temperaturas baixas. O presente trabalho teve por objetivo registrar a ocorrência no Estado do Rio de Janeiro, de uma doença até então não relatada. O quadro sintomatológico da

enfermidade caracteriza-se por um amarelecimento das folhas, nanismo, definhamento e até morte de plantas sempre associado à presença de galhas nas raízes. Plantas exibindo esse quadro foram dissecadas sob microscópio estereoscópio, permitindo a extração de fêmeas de nematóide do gênero *Meloidogyne*. Após análise de configurações perineais sob microscópio óptico chegou-se a conclusão tratar-se de *Meloidogyne incognita*. As plantas doentes foram coletadas em dezembro de 2006, em Teresópolis, na região Serrana do Estado do Rio de Janeiro.