



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO

UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECOLOGIA BIOPROCESSOS

CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS

LUANNA PINTO VILAR

**LEVANTAMENTO E DIAGNÓSTICO DAS PRINCIPAIS DOENÇAS QUE
OCORREM EM ORQUÍDEAS (*ORCHIDACEAE*) PROVENIENTES DAS REGIÕES
DE CAMPINA GRANDE E BREJO PARAIBANO**

SUMÉ - PB

2016

LUANNA PINTO VILAR

**LEVANTAMENTO E DIAGNÓSTICO DAS PRINCIPAIS DOENÇAS QUE
OCORREM EM ORQUÍDEAS (*ORCHIDACEAE*) PROVENIENTES DAS REGIÕES
DE CAMPINA GRANDE E BREJO PARAIBANO**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Engenheiro de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientador^a: Prof^a. Dr^a. Ana Verônica Silva do Nascimento

SUMÉ – PB

2016

V697I Vilar, Luanna Pinto.

Levantamento e diagnóstico das principais doenças que ocorrem em orquídeas (*Orchidaceae*) provenientes das regiões de Campina Grande e brejo paraibano. / Luanna Pinto Vilar. - Sumé - PB: [s.n], 2016.

46 f.

Orientador^a: Prof^a. Dr^a. Ana Verônica Silva do Nascimento.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Botânica. 2. Orchidaceae - Orquídeas. 3. Plantas ornamentais. I. Título.

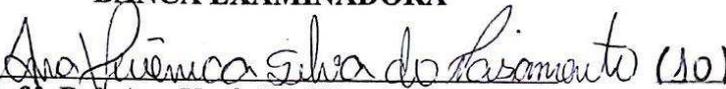
CDU: 582.594 (043.1)

LUANNA PINTO VILAR

**LEVANTAMENTO E DIAGNÓSTICO DAS PRINCIPAIS DOENÇAS QUE
OCORREM EM ORQUÍDEAS (*Orchidaceae*) PROVENIENTES DAS REGIÕES DE
CAMPINA GRANDE E BREJO PARAIBANO**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Engenheiro de Biotecnologia e Bioprocessos.

BANCA EXAMINADORA


Prof.^a Dr.^a Ana Verônica Silva do Nascimento
Orientadora – UFCG/CDSA

BANCA EXAMINADORA


Prof.^a Dr.^a Glauciane Danusa Coelho (9,5)
Examinadora – UFCG/CDSA

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Jean César Farias de Queiroz (10)
Examinador – UFCG/CDSA

NOTA (9,8)

Aprovada em 21 de outubro de 2016.

*À todos que acreditaram no meu potencial e
que contribuíram diretamente ou indiretamente para
tornar este sonho realidade! Principalmente à minha
família, dedico este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Vandecleide Pinto Vilar e meu Pai, José Ismar Vilar, que além do apoio incondicional, guiaram-me, aconselharam-me e mostraram-me o caminho do que é certo, proporcionando todo o suporte para essa conquista. Com certeza sem eles eu não teria conseguido ir tão longe.

À minha irmã, Ilka Pinto Vilar, que inspirou-me e mostrou-me como é importante ser independente e ter seu próprio lugar e que não poupou esforços, para que eu atingisse o meu objetivo.

Ao professor Paulo Brioso da UFRRJ, pelo espaço cedido, paciência e orientação para a conclusão da minha pesquisa.

Aos meus colegas de curso que sempre ajudaram-me no que precisei: Rayane Abreu, Felipe Douglas, Analu Freitas e Tamiles Silva, pois sem essas pessoas para conversar, estudar, dar risadas, brincar e me apoiar, enfim, pra compartilhar os bons e ruins momentos ao longo de todo esse tempo, tudo teria sido mais difícil.

À minha orientadora, Professora Ana Verônica, porque sem o conhecimento, orientação e conselhos dela, essa jornada teria sido impossível de se completar e pela paciência em ser minha orientadora durante esse tempo.

Agradeço a todos que torceram por mim e se fizeram presentes em toda essa jornada.

Muito Obrigado!!!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

Este trabalho teve o objetivo de realizar um levantamento e diagnosticar os principais patógenos causadores de doenças em orquídeas nas microrregiões de Campina Grande e do Brejo Paraibano. Para isto, dez amostras de sete diferentes espécies de orquídeas são coletadas e analisadas a partir da observação da sintomatologia, testes biológicos, caracterização morfológica e testes moleculares. Ao observar os sintomas das amostras, foi possível identificar a infecção por fungos, vírus e infecções mistas comprovando a presença desses patógenos na planta. Como teste biológico, realizou a inoculação mecânica via extrato vegetal, onde, no decorrer de 5 dias, não foi possível a visualização da sintomatologia que comprovassem ou não a infecção de vírus naquelas amostras, sendo assim, necessários mais testes moleculares ou sorológicos por exemplo, para a confirmação da infecção. Na caracterização morfológica, são observados esporos hialinos, unicelulares, elipsoides e fusiformes comprovando a presença do fungo *Colletotrichum* em diferentes espécies de orquídeas. Na caracterização molecular, *primers* específicos para o diagnóstico de antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* são utilizados na realização da PCR. Os resultados obtidos foram positivos para a orquídea da espécie *Cattleya Labiata Rubra*. Com resultados inéditos, o presente trabalho contribuiu para direcionar estudos futuros sobre esses patógenos em orquídeas na região, evitando assim, a proliferação desses patógenos e consequente perda da espécie.

Palavras – chave: Fungos. Identificação. Vírus.

ABSTRACT

Orchids are ornamental plants that most call consumer attention for its unique and diverse beauties. The orchid cultivation moves a significant numbers market with plants of certain species reaching high market value. Diseases of orchids represent a major problem for producers and growers, and in Brazil, the main diseases found in orchids are caused by viruses and fungi. Therefore, this study aimed to carry out a survey and diagnose the main disease-causing pathogens in orchids in microregions of Campina Grande and the Brejo Paraibano. For this, ten samples of seven different species of orchids were collected and analyzed from the observation of symptoms, biological tests, morphological and molecular tests. By observing the symptoms of the samples, it was possible to identify yeast infection, viruses and mixed infections proving the presence of these pathogens in the plant. As biological testing, the mechanical inoculation was performed via the plant extract, where in the course of 5 days was not possible to view the symptomatology which would conclusively prove whether or not the virus infection in those samples, and thus require more molecular or serological tests e.g. , to confirm infection. In the morphological characterization, hyaline spores was observed, unicellular and fusiform ellipsoid confirming the presence of the fungus *Colletotrichum* different species of orchids. Molecular characterization of specific primers for the diagnosis of anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* were used in the PCR. The results were positive for Orchid *Cattleya Labiata* species *rubra*. With new results, this study has contributed to direct future studies on these pathogens in orchids in the region, thus preventing the proliferation of these pathogens and consequente species loss.

Keywords: Fungi. Identification. Virus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem de folha com formação de inúmeros anéis concêntricos, manchas arredondadas irregulares, deprimidas, coalescentes indicando a doença antracnose.....	19
Figura 2 - Imagem de uma folha com pústulas de coloração amarelo-laranja que se desenvolveram de modo concêntrico e formaram regiões cloróticas indicando a doença ferrugem.....	20
Figura 3 - Imagem de uma planta com pequenas manchas circulares, lesões circundadas por um halo de coloração rosada indicando a doença mofo cinzento	20
Figura 4 - Imagem de uma folha basal, amarelecida e seca indicando a doença de murcha de <i>Fusarium</i>	21
Figura 5 - Imagem de uma folha com manchas negras encharcada indicando a doença podridão negra	22
Figura 6 - Imagem de uma folha com área clorótica que, eventualmente, se torna necrótica indicando a doença Cercosporiose	22
Figura 7 - Imagem de uma folha com mosaico, anéis cloróticos e/ou necróticos, manchas cloróticas e/ou necróticas indicando a presença do <i>Cymbidium mosaic virus</i>	24
Figura 8 - Imagens de uma planta com manchas irregulares de colorido vermelho e regiões necrosadas indicando a presença de <i>Odontoglossum ringspot virus</i>	25
Figura 9 - Imagem de uma folha com anéis necróticos concêntricos em torno de uma lesão necrótica central, lesões necróticas ovaladas com halo clorótico e pontuações pequenas e necróticas na superfície foliar indicando a presença do vírus <i>Orchid fleck virus</i>	26
Figura 10 - Espécies de orquídeas das quais as amostras para a pesquisa foram coletadas: A) <i>Spathoglottis unguiculata</i> ; B) <i>Arundina Bambusifolia</i> ; C) <i>Dendrobium bronckartii amabile</i> ; D) <i>Cattleya Labiata</i> ; E) <i>Paradisanthus micranthus (Barb. Rodr) Schltr</i> ; F) <i>Maxillaria sp.</i> ; G) <i>Epidendrum cinnabarinum</i>	30
Figura 11 - A: Equipamentos utilizados em etapas da extração de RNA: A) Amostras pesadas em balança analítica em aproximadamente 0,100 g; B) Vortes utilizado para agitação vigorosa; C) Centrífuga utilizada para separação do RNA; D) pipetas utilizadas para pipetagem.....	31
Figura 12 - Etapas da extração de DNA: A) Almofariz e pistilo com a amostra pulverizada com auxílio de nitrogênio líquido; B) Tubos de polipropileno de 1,5 mL utilizados para o procedimento; C) Amostras sendo aquecidas a 65°C por 10 minutos; D) Resfriamento das amostras em gelo por cinco minutos; E) DNA extraído	33
Figura 13 - Etapas da inoculação mecânica via extrato vegetal: A) Amostra macerada com tampão e celite; B) Inoculação na planta indicadora com auxílio do pistilo; C) Planta indicadora <i>Nicotiana tabacum L</i> inoculada; D) Planta indicadora <i>Chenopodium amaranticolor</i> inoculada	35
Figura 14 - Microscópio óptico utilizado para a caracterização morfológica dos fungos.....	36
Figura 15 - Plantas indicadoras inoculadas: A) Planta <i>Chenopodium amaranticolor</i> ; B) Plantas <i>Nicotiana tabacum L</i>	39
Figura 16 - Microscopia óptica da amostra do fungo encontrado na orquídea <i>Cattleya labiata rubra</i> . A) Crescimento colonial do fungo isolado em meio de cultivo BDA; B) Esporos do fungo	41
Figura 17 - Microscopia óptica da amostra do fungo encontrado na orquídea <i>Cattleya labiata</i> . A) Crescimento colonial do fungo isolado em meio de cultivo BDA; B) Esporos do fungo.....	41
Figura 18 - Microscopia óptica da amostra do fungo encontrado na orquídea <i>Dedrobium bonckartii amabile</i> . A) Crescimento colonial do fungo isolado em meio de cultivo BDA; B) Esporos do fungo..	42
Figura 19 - Análise de amplificação em gel de agarose: A) Análise eletroforética das bandas amplificadas com os primers desenhados para o <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> para as amostras <i>Dendrobium bronckartii amabile (T1)</i> , <i>Paradisanthus micranthus (T2)</i> e <i>Cattleya labiata rubra (T3)</i> e comparadas com o marcador(M) de 1 Kb.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amostras de orquídeas para análises.....	29
Tabela 2 - Sintomatologias das orquídeas infectadas por vírus, fungos e infecção mista.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CymMV	Vírus do mosaico do <i>Cymbidium</i>
ORSV	Vírus da mancha anelar
OFV	Orchid fleck vírus
PCR	Reação em cadeia da polimerase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
RNA	Ácido ribonucleico
RT- PCR	Reação da transcriptase reversa da polimerase
cDNA	DNA complementar
BDA	Batata, Dextrose, Ágar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 CARACTERIZAÇÃO E IMPORTÂNCIA DAS ORQUÍDEAS.....	17
3.2 DOENÇAS CAUSADAS POR FUNGOS.....	18
3.2.1 Antracnose.....	19
3.2.2 Ferrugem.....	19
3.2.3 Mofo cinzento.....	20
3.2.4 Murcha de <i>fusarium</i>	20
3.2.5 Podridão Negra.....	21
3.2.6 Cercosporiose.....	22
3.3 DOENÇAS CAUSADAS POR VÍRUS.....	22
3.3.1 CyMV- <i>Cymbidium Mosaic virus</i>	23
3.3.2 ORSV- <i>Odontoglossum Ringspot virus</i>	24
3.3.3 OFV – <i>Orchid fleck virus</i>	25
3.4 TESTES DE DIAGNÓSTICOS DE VÍRUS E FUNGOS EM PLANTAS.....	26
3.4.1 Testes Biológicos.....	26
3.4.2 Caracterização Morfológica.....	27
3.4.3 Testes moleculares.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 SELEÇÃO, COLETA E CARACTERIZAÇÃO DE ORQUÍDEAS COM CARACTERÍSTICAS DE INTERESSE.....	28
4.2 EXTRAÇÃO DE RNA DAS AMOSTRAS.....	30
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS.....	31
4.4 AMPLIFICAÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIRA DA POLIMERASE – PCR PARA COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES.....	33
4.5 GEL DE AGAROSE 1,5%	34
4.6 ISOLAMENTO DOS FUNGOS.....	34
4.7 INOCULAÇÃO MECÂNICA VIA EXTRATO VEGETAL.....	34
4.8 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	35
5 RESULTADOS E DISCURSSÃO	37
5.1 AVALIAÇÕES DA SINTOMATOLOGIA NAS AMOSTRAS COLETADAS.....	37
5.2 INOCULAÇÃO MECÂNICA VIA EXTRATO VEGETAL.....	39
5.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	40
5.4 TESTES MOLECULARES.....	42
6 CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

A floricultura brasileira é considerada uma atividade econômica importante no agronegócio do país. O potencial dessa atividade, voltado tanto para o mercado interno como externo, é considerável e oferece oportunidades promissoras (REIS, 2011). As orquídeas, da família *Orchidaceae*, são as plantas ornamentais que mais chamam a atenção do consumidor, pelas suas belezas diversificadas.

A família *Orchidaceae*, pertence à ordem *Asparagales* é considerada uma das maiores famílias do reino vegetal. Estima-se que existam 800 gêneros, 35.000 espécies e 120.000 híbridos conhecidos (SOUZA; LORENZI, 2005) entre terrestres, epífitas e rupícolas. As epífitas sobrevivem sobre árvores, realizando a fotossíntese a partir de nutrientes absorvidos pelo ar e pela chuva. As terrestres sobrevivem como “plantas comuns” na terra. E as rupícolas, são consideradas um grupo de orquídeas tipicamente brasileiras que têm as rochas como suporte.

Correspondendo a cerca de 8% de todas as plantas monocotiledôneas, as orquídeas podem ser encontradas praticamente em todos os lugares do mundo. Há uma estimativa que o número de espécies de orquídeas, no país, chegue a 3.000 de 200 gêneros, podendo ser considerado o terceiro país mais rico em espécies (BARROS, 1999).

Na região nordeste, dependendo de cada espécie, as orquídeas podem ser encontradas nas serras, sertão, restinga ou litoral. Diversos gêneros apresentam características de cultivo e potencialidade conveniente para cultivo nesta região, como por exemplo, resistência às queimadas. Durante a época seca, quando se pensa que as orquídeas foram desgastadas totalmente pelo fogo, em possíveis queimadas na região, elas surgem com novos brotos tão logo cheguem às primeiras chuvas. Outra característica que as tornam adequadas para região é sua temperatura ideal de cultivo. As temperaturas mais adequadas para alguns tipos de orquídeas são as dos dias quentes, acima de 30 °C no verão, clima predominante na região.

Com uma química pouco conhecida, outro fator importante sobre as orquídeas, além do seu potencial comercial, é o uso na fitoterapia. O mercado farmacêutico brasileiro oferece extratos das raízes de espécies que promovem a cicatrização de lesões, estancamento de sangue, possuindo também propriedades antimicrobianas e antioxidantes, tornando-as assim uma promissora área do agronegócio. Em vista disso, as orquídeas devem apresentar folhas e flores de boa qualidade, tal como qualquer ornamental, o que implica, entre outros fatores, na ausência de doenças e pragas (CARDOSO, 2005; KUBO, 2006).

Apesar da grande biodiversidade e de todas as vantagens existentes no cultivo de

orquídeas, uma das maiores limitações para a sua produção é a incidência de doenças, principalmente doenças causadas por fungos e vírus. O fungo mais frequente encontrado nas orquídeas é o *Gloesporium*, seguido de *Phytophthora cactorum*, *Pythidium ultimum* e *Botrites cineria*, dentre outros. Em relação aos vírus em orquídeas foram descritas cerca de 30 espécies de vírus, pertencentes a diversos gêneros. De acordo com a literatura, em termos mundiais, o vírus do gênero *Potexvirus* que causa o mosaico do *Cymbidium* (*Cymbidium mosaic virus* - CymMV) e o vírus do gênero *Tobamovirus* que causa a mancha anelar do *Odontoglossum* (*Odontoglossum ringspot virus* - ORSV) são os mais comumente identificados infectando orquídeas de variados gêneros (MORAES, 2013).

O cultivo de orquídeas representa portanto, uma atividade que se configura como uma boa alternativa para diversificação agrícola no nordeste brasileiro e a produção, como forma de renda familiar. Porém, as doenças se tornam um dos principais fatores limitantes para essa produção. Na Paraíba, ainda não existem estudos que mostrem quais são os principais fungos e vírus que atacam e possivelmente matam as orquídeas da região, apesar dos danos e prejuízos que esses microrganismos trazem aos produtores e orquidófilos. Portanto, este trabalho teve como objetivo o levantamento e diagnóstico dos principais vírus e fungos que atacam as orquídeas cultivadas na cidade de Lagoa seca, localizada na região metropolitana de Campina Grande e na cidade de Areia localizada no Brejo paraibano, auxiliando um possível controle e conseqüente redução da incidência desses patógenos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Diagnosticar as principais doenças causadas por fitopatógenos em orquídeas cultivadas na cidade de Lagoa Seca localizada na região metropolitana de Campina Grande e na cidade de Areia localizada no Brejo paraibano

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar amostras foliares das orquídeas localizadas na região de Campina Grande e Brejo paraibano, com sintomas de doenças causadas por fungos e vírus;
- Identificar os principais tipos de vírus e fungos causadores das doenças;
- Realizar teste biológico, a caracterização morfológica e o teste molecular nas amostras colhidas;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CARACTERIZAÇÃO E IMPORTÂNCIAS DAS ORQUÍDEAS

As orquídeas ocorrem em quase todas as regiões da terra, com exceção dos polos e desertos, sendo mais frequente e exuberante nos trópicos (SILVA, 2009). É um dos grupos de plantas mais diversificados, pois, as adaptações a diferentes ambientes e polinizadores fizeram com que as orquídeas desenvolvessem grande variedade de estruturas vegetativas e florais relacionadas à sua sobrevivência (SHIRAKI; DIAZ, 2012).

As orquídeas pertencem à família *Orchidaceae*, que é considerada a mais numerosa de todo o Reino Vegetal, com mais de 800 gêneros, 35.000 espécies e 120.000 híbridos (FARIA, et al., 2010). Divide-se em cinco subfamílias: *Apostasioideae*, *Cypripedioideae*, *Vanilloideae*, *Orchidoideae*, *Epidendroideae*. A família *Apostasioideae*, possui plantas com pólen pastoso, e as flores possuem duas anteras férteis (Diandrae), que se autofecundam espontaneamente e o labelo é muito parecido com as sépalas e pétalas. Na família *Cypripedioideae*, encontram-se plantas também com pólen pastoso e sem pseudobulbos, com caules abreviados ou alongados e folhas de bases embainhadas (SHIRAKI, 2006). Na família *Vanilloideae*, as plantas possuem pólen pastoso, com uma antera fértil incumbente e folhas sem bases embainhadas. Já na família *Orchidoideae*, as plantas possuem folhas herbáceas e a grande maioria possuem pequenas tuberas, além das raízes. Por último, na família *Epidendroideae*, as plantas possuem pólen coeso, com antera incumbente (SHIRAKI, 2006). O Caderno Orquidófilo, 3ª Edição, Ed. Brasil Orquídeas, afirma que dentre essas subfamílias da *Orchidaceae*, existem cerca de três tipos de plantas caracterizadas de acordo com o lugar do seu habitat de origem. Elas são classificadas em epífitas, rupícolas e terrestres. As orquídeas epífitas usam os troncos das árvores como suporte, sem trazer qualquer dano a mesma, pois realizam a fotossíntese a partir de nutrientes absorvidos pelo ar e pela chuva. As orquídeas rupícolas vivem sobre pedras em pleno sol. Muitas vezes protegem a ponta das raízes mergulhando-as por baixo do limo que nasce nas fendas das rochas. Já as orquídeas terrestres apresentam um grande número de formas e coloridos, o que promove um grande fascínio por parte dos orquidófilos. Tem uma forma curiosa de se manter em pé, a disposição das raízes carnosas e o peso muitas vezes maior que a própria parte aérea forma a base de sustentação (APRENDENDO COM AS ORQUÍDEAS, 2011). O cultivo de orquídea movimentou um mercado de números expressivos, sendo que, plantas de determinadas espécies atingem alto valor, alcançando cifras da ordem de milhares de dólares por planta (RODRIGUES, 2005). Assim, pela possibilidade de se estabelecer em diversos habitats, as diversas plantas da família

Orchidaceae despertam grande interesse comercial, uma vez que as orquídeas podem ser cultivadas em grande diversidade de condições (CARDOSO, 2005).

Mesmo apresentando um alto custo de produção, já que as técnicas agrônomicas empregadas são, em geral, exclusivas para o sucesso do cultivo, as orquídeas são muito apreciadas mundialmente (MORAES, 2013). Como possuem um lento desenvolvimento acarretando em um maior tempo de cultivo antes de sua comercialização, as espécies da família *Orchidaceae* apresentam alto custo. Esta característica contribui para elevação do valor unitário dessas plantas (CARDOSO, 2005; VICHATO et al., 2007). Igualmente, deve-se considerar que o elevado número de espécies e híbridos possibilita a ocorrência de grande variedade de formas, tamanhos e cores de folhas e flores, o que também auxilia a tornar essas plantas de grande importância econômica e permite que sejam produzidas em todo o mundo, sempre com grande aceitação no mercado (CARDOSO, 2005).

No Brasil, em 2014 foram comercializados 1.261.011 vasos de orquídeas. Deste total, 30,81% são da espécie *Phalaenopsis*; 18,18% *Dendrobium* e 15,65% são da espécie *Cymbidium* (CEASA, 2015). Em 2015, a produção de flores faturou R\$ 6 bilhões, registrando 8% de crescimento (G1 AGRO, 2016).

Mesmo com a grande importância ambiental e econômica das orquídeas poucos são os estudos científicos visando à identificação e o controle de microrganismos causadores de doenças nessas plantas (SANTOS, 2012). As doenças das orquídeas representam, na atualidade, um grande problema para os produtores e cultivadores e, no Brasil, as principais doenças encontradas nas orquídeas são as causadas por vírus e fungos (SANTOS, 2012).

3.2 DOENÇAS CAUSADAS POR FUNGOS

A base da saúde das plantas é o resultado de vários fatores, tais como: ambiente de cultivo adequado, fornecimento de nutrientes na medida correta, água necessária, luz e temperatura adequadas, dentre outros. Uma planta saudável possui metabolismo eficiente que metaboliza compostos orgânicos simples, em compostos orgânicos complexos. Devido ao acúmulo desses compostos, por qualquer motivo, que fungos e outras pragas a procura desses compostos que servem como alimentos, atacam as plantas, ocasionando doenças. Um dos principais agentes patogênicos que atacam as orquídeas são os fungos, podendo limitar o desenvolvimento dessa planta. A identificação rápida e correta do patógeno constitui a base para o sucesso na estratégia de controle de uma doença (SOUSA, 2010).

3.2.1 Antracnose

A antracnose é uma doença que ataca orquídeas causada por fungos do gênero *Colletotrichum* que é encontrada com frequência em climas tropicais. Esse fungo ocorre principalmente em orquídeas enfraquecidas. Visualmente há formação de inúmeros anéis concêntricos dentro de cada mancha de coloração castanho-pardacenta. Essas manchas são arredondadas a irregulares, deprimidas, coalescentes ou não. Os esporos têm avidez por água, sendo facilmente dispersos pelos respingos da água das chuvas ou de irrigação por aspersão, espalhando eficientemente no ambiente (SHIKARI; DIAZ, 2012).

Figura 1 - Imagem de folha com formação de inúmeros anéis concêntricos, manchas arredondadas irregulares, deprimidas, coalescentes indicando a doença antracnose



Fonte: BLANCO, 2015

3.2.2 Ferrugem

A ferrugem é causada por vários gêneros de fungos, entre eles *Sphenospora*, *Uredo* e *Hemileia*. Essa doença é disseminada pelo vento e por respingos de água. Os sintomas iniciais ocorrem apenas nas folhas, exclusivamente na face inferior. Inicialmente se observam pequenas pústulas de coloração amarelo-laranja ou marrom avermelhada. Essas pústulas, em função da idade, podem enegrecer e se desenvolver de modo concêntrico de forma a lembrar a aparência de um alvo e regiões cloróticas que são observadas na região foliar oposta a pústula. (MANTOVANI, 2013).

Figura 2 - Imagem de uma folha com pústulas de coloração amarela-laranja que se desenvolveram de modo concêntrico e formaram regiões cloróticas indicando a doença ferrugem



Fonte: CRISTINA,2010

3.2.3 Mofo Cinzento

Os agentes causadores do mofo cinzento são os fungos: *Botrytis cinerea* e *Botrytis* sp., que se disseminam pelo vento, ataca pétalas, sépalas e labelo das flores, principalmente as mais velhas. Pode causar sérios prejuízos em cultivos comerciais quando há grande quantidade de flores abertas e próximas (MANTOVANI, 2013). Têm início com pequenas manchas circulares, em qualquer parte da superfície das flores. Em geral as lesões são circundadas por um halo de coloração rosada, com a evolução da doença, observa-se a formação de uma massa pulverulenta de coloração cinza, constituída por um grande número de propágulos. As flores atacadas severamente murcham e caem. (MANTOVANI, 2013).

Figura 3 - Imagem de uma planta com pequenas manchas circulares, lesões circundadas por um halo de coloração rosada indicando a doença mofo cinzento



Fonte: ORQUÍDEA EM FOCO, 2008

3.2.4 Murcha de *Fusarium*

O fungo *Fusarium oxysporum* é um patógeno vascular que infecta orquídeas, principalmente através dos ferimentos resultantes dos cortes em rizomas e raízes, durante a

divisão das plantas para propagação. Os sintomas se iniciam pelas folhas basais, que amarelecem, secam e caem. Ocorre obstrução dos vasos pela formação de estruturas de barreira pela planta (que tenta se defender do fungo) e presença de micélio e esporos do próprio patógeno, resultando em resistência ao livre fluxo da seiva e, conseqüentemente, em sintomas de murcha. Em cerca de 30 dias, a planta pode ter redução no seu desenvolvimento ou até morrer nas raízes e evoluir até tomar a parte aérea. (BACCHI, et al., 2001)

Figura 4 - Imagem de uma folha basal, amarelecida e seca indicando a doença de murcha de *Fusarium*



Fonte: MANTOVANI, 2013

3.2.5 Podridão Negra (Podridão do pseudobulbo)

A podridão negra é causada por fungos dos gêneros *Pythium* e *Phytophthora*. Esse é um dos mais sérios problemas no cultivo de orquídeas. Os sintomas podem ser observados em plantas adultas com infecção produzindo manchas negras encharcadas, que progredem de forma ascendente, da raiz para as folhas das plantas. Com a evolução da doença os órgãos atacados apresentam podridão mole e se destacam, sendo, em casos extremos, observada a morte das plantas. Ocorre o tombamento, quando o ataque ocorre em plantas jovens (MANTOVANI, 2013).

Figura 5 - Imagem de uma folha com manchas negras encharcadas indicando a doença podridão negra



Fonte: MANTOVANI, 2013

3.2.6 Cercosporiose

A Cercosporiose é uma doença causada pelo fungo *Cercospora spp* e ocorre principalmente na parte inferior das folhas das plantas, principalmente nas mais velhas. Na face superior do limbo foliar observa-se uma área clorótica que, eventualmente, se torna necrótica, na área correspondente à lesão na face inferior. É um fungo encontrado tanto em temperaturas baixas como em temperaturas altas e consequentemente tem ampla distribuição (MANTOVANI, 2013)

Figura 6 - Imagem de uma folha com área clorótica que, eventualmente, se torna necrótica indicando a doença Cercosporiose



Fonte: MANTOVANI, 2013

3.3 DOENÇAS CAUSADAS POR VÍRUS

Além das doenças fúngicas, as orquídeas são também atacadas por vírus, minúsculos seres que invadem as células, danificando seus processos metabólicos e de multiplicação, o

que acaba por causar a morte das mesmas (COOKE, 2016).

Embora o Brasil figure como um país altamente promissor no mercado internacional de flores e plantas ornamentais, os problemas fitossanitários, especialmente no que se refere às doenças causadas por vírus, ainda são obstáculos que devem ser superados para o crescimento das exportações brasileiras (DUARTE & ALEXANDRE, 2010). As viroses podem causar sérios prejuízos às culturas visto que, uma vez instaladas, são de difícil controle. A alta incidência dos vírus, em orquídeas cultivadas, pode ser atribuída à grande estabilidade das partículas virais no extrato infectado e à fácil disseminação dos vírus de plantas infectadas para sadias, por meio de tratos culturais e instrumentos de poda (ALEXANDRE, 2012).

Em orquídeas foram descritas cerca de 30 espécies de vírus, pertencentes a diversos gêneros (ALEXANDRE; DUARTE, 2013). Apesar desses vários gêneros e tipos de vírus existentes, o vírus mais frequente em orquídeas são os *Odontoglossum ringspot vírus* - ORSV (*Tobamovirus*) e o *Cymbidium mosaic vírus*- CymMV (*Potexvirus*) (DUARTE, 2012). A alta incidência desses vírus, em orquídeas cultivadas, pode ser atribuída à grande estabilidade das partículas virais no tecido infectado e à fácil disseminação dos vírus de plantas infectadas para sadias, por meio de tratos culturais e instrumentos de poda (ALEXANDRE; DUARTE, 2013).

Outro vírus encontrado frequentemente em orquídeas é o *Orchid fleck vírus*- OFV, sendo muito comum em *Oncidium* na natureza. A inoculação do vírus é feita de forma mecânica por objetos cortantes ou picadas de insetos. O controle é preventivo feito pela desinfecção dos instrumentos de trabalho, pela eliminação dos insetos picadores e pela destruição da planta infectada (JESUS, 2016).

3.3.1 *Cymbidium mosaic vírus* (CyMV)

Muito embora os efeitos sejam, a princípio, pouco aparentes, o CyMV é o vírus mais perigoso, pois, como apresenta sintomas menos graves, muitas vezes as plantas são dadas como saudáveis, o que propicia a extensão da contaminação por toda a coleção (COOKE, 2016). Estes vírus podem induzir mosaico, anéis cloróticos e/ou necróticos, manchas cloróticas e/ou necróticas e, em geral não estão associados à redução de crescimento e morte da planta. Porém, devido à estabilidade dos vírus, são transmitidos por instrumentos de corte e se disseminam pela cultura com facilidade.

Os danos causados por esses vírus são devido à depreciação das plantas, podendo levar a diminuição da produção ou qualidade das folhas e flores (MANTOVANI, 2013). Os sintomas deste vírus nas folhas são dificilmente detectáveis, pois, ocorrem leves riscos

cloróticos nas nervuras. De modo geral, não atrapalha o crescimento da planta, nem sua capacidade de floração (COOKE, 2016). São bastantes variáveis, dependendo de fatores ambientais, idade do tecido vegetal, gênero e variedade da planta, tempo de inoculação, entre outros. Algumas plantas infectadas são assintomáticas e podem ocorrer isoladamente ou em infecção dupla (MANTOVANI, 2013). O CyMV pode infectar uma planta, sem afetar sua produtividade ou vigor, por muitos anos.

Figura 7 - Imagem de uma folha com mosaico, anéis cloróticos e/ou necróticos, manchas cloróticas e/ou necróticas indicando a presença do *Cymbidium mosaic virus*



Fonte: ORQUÍDEA EM FOCO, 2008

3.3.2 *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV)

O ORSV pertence ao gênero *Tobamovirus*, cuja espécie tipo é o *Tobacco mosaic vírus* (MORAES, 2013). 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. Estas manchas ou pintas geralmente possuem regiões necrosadas (mortas). Os brotos podem ficar aleijados (tortos, fortemente pigmentados, e sem vigor) e nas flores, surgem manchas descoloradas, com aspecto de "aquarela desbotada". Ao contrário do CyMV, o ORSV vai degradando o vigor da planta, terminando por matá-la, por inviabilidade de brotação, ao cabo de alguns anos (COOKE, 2016).

Figura 8 - Imagem de uma planta com manchas irregulares de colorido vermelho e regiões necrosadas indicando a presença de *Odontoglossum ringspot virus*



Fonte: ALEXANDRE; DUARTE, 2013

3.3.3 *Orchid fleck vírus (OFV)*

O vírus da mancha das orquídeas *Orchid fleck vírus* é transmitido de forma persistente pelo ácaro *Brevipalpus californicus* (Banks) (KUBO, 2006). Foi detectada pela primeira vez no Japão em orquídeas do gênero *Cymbidium* (DOI et al., 1969; MORAES, 2013).

O OFV foi relatado em vários gêneros de orquídeas pelo mundo: *Angraecum*, *Aspasia*, *Baptistonia*, *Bifrenaria*, *Brassia*, *Bulbophyllum*, *Calanthe*, *Cattleya*, *Coelogyne*, *Colmanara*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Diplocaulobium*, *Dockrillia*, *Encyclia*, *Flickingeria*, *Hormidium*, *Liparia*, *Masdevallia*, *Maxillaria*, *Miltonia*, *Odontoglossum*, *Oncidium*, *Paphiopedilum*, *Pascatorea*, *Phaius*, *Phalaenopsis*, *Polystachya*, *Renanthera*, *Stanhopea*, *Stenia*, *Trigonidium*, *Zygopetalum* (KITAJIMA et al., 2001). Os sintomas de OFV são variados, quando comparados entre os gêneros de orquídeas (MORAES, 2013). De maneira geral, as plantas infectadas por este vírus podem apresentar anéis necróticos concêntricos em torno de uma lesão necrótica central, lesões necróticas ovaladas com halo clorótico e pontuações pequenas e necróticas na superfície foliar (KUBO, 2006).

Figura 9 - Imagem de uma folha com anéis necróticos concêntricos em torno de uma lesão necrótica central, lesões necróticas ovaladas com halo clorótico e pontuações pequenas e necróticas na superfície foliar indicando a presença do vírus *Orchid fleck vírus*



Fonte: MORAIS, 2013

3.4 TESTES DE DIAGNÓSTICOS DE VÍRUS E FUNGOS EM PLANTAS

A diagnose precisa, resultado da correta identificação do agente que está causando doença em uma planta, assim como também informações da sua distribuição na área plantada, são informações extremamente importantes na definição e no estabelecimento de medidas eficientes de controle a serem adotadas. Dessa forma, vários métodos têm sido desenvolvidos para a detecção e identificação de patógenos de plantas, sendo a diagnose de doenças baseada, principalmente, em resultados obtidos nos testes biológicos, sorológicos e moleculares (BASSO, 2014).

3.4.1 Testes biológicos

Os diagnósticos pelo método biológico para detecção de fitopatógenos, principalmente vírus, envolvem apenas observação visual de sintomas exibidos pelas plantas. A transmissão de vírus ocorre por meio da enxertia ou por inoculação mecânica, podendo ser realizado em dois grupos de plantas hospedeiras, denominadas indicadoras, empregadas de acordo com a doença a ser identificada. Na inoculação mecânica, cada amostra deve ser submetida por meio de inoculação mecânica para uma gama de plantas hospedeiras indicadoras que complemente todos os vírus que são potenciais patógenos para a cultura em questão (SANCHES; SAKATE, 2013). As plantas enxertadas são mantidas em casa de vegetação para a avaliação final dos sintomas (LIMA; FAJARDO, 2012).

3.4.2 Caracterização Morfológica

A identificação dos fungos é baseada quase que exclusivamente em sua morfologia tanto macro como microscopicamente (CORRÊA, et al., 2009). A caracterização morfológica microscópica pode ser realizada a partir da microscopia óptica. As técnicas de microscopia têm como objetivo a construção de imagens ampliadas (MANSUR, 2012), onde pode-se observar a estrutura das hifas, micélio e dos esporos dos fungos, para a possível identificação.

3.4.3 Testes Moleculares

Em geral, são testes mais específicos e precisos, por que não se relacionam apenas com proteína, como ocorre nos métodos sorológicos, mas com o genoma viral, incluindo os genes que codificam as proteínas (ZERBINI et al., 2006). A PCR (Reação de cadeia da polimerase) é uma técnica *in vitro*, que permite a amplificação de uma área específica de DNA que fica entre duas regiões do DNA de sequências conhecidas. É utilizada para patógenos cuja sequência de nucleotídeos seja composta de DNA. Para patógenos com sequencias composta de RNA deve-se utilizar a RT(transcrição reversa) para a síntese do DNA complementar (cDNA) antes da realização da PCR (SAKATE; SANCHES, 2013).

Dentre os métodos moleculares, ou seja, aqueles baseados na detecção do ácido nucleico, a transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) é o mais utilizado (NICKEL; FARJADO, 2015). A RT-PCR possibilita a amplificação de fragmentos do material genético do vírus utilizando-se um par de oligonucleotídeos que são complementares às regiões que flanqueiam a sequência a ser amplificada e as enzimas transcriptase reversa (apenas para vírus de RNA) e Taq DNA Polimerase (vírus de RNA e vírus de DNA), esta última, termoestável. A reação ocorre por meio da incubação em termocilador, no qual é submetida, geralmente, de 25 a 35 ciclos sucessivos de desnaturação, anelamento e extensão que resultam na amplificação exponencial (2^n , onde n=número de cópias) do fragmento do DNA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO, COLETA E CARACTERIZAÇÃO DE ORQUÍDEAS COM CARACTERÍSTICAS DE INTERESSE

Inicialmente foi realizado um levantamento da produção e cultivo de orquídeas cultivadas na cidade de Lagoa seca localizada na região metropolitana de Campina Grande e na cidade de Areia localizada no Brejo paraibano, pois são as cidades que mais cultivam orquídeas. Em seguida, foram coletadas dez amostras, como mostra a Tabela 1, de sete espécies diferentes de orquídeas (Figura 10). As mesmas foram guardadas em sacos de papel para evitar perda de amostra até o local da realização da pesquisa.

As orquídeas foram selecionadas considerando sintomas de perda contínua e gradual do vigor da planta, produção reduzida, coloração anormal das folhas, folhas com aparência atípica, brotação irregular, engrossamento e amadurecimento irregular dos ramos, manchas arredondadas, irregulares, deprimidas ou coalescentes, manchas necróticas, pequenas pústulas alaranjadas na parte inferior das folhas, dentre outros, que apontam para a elevada incidência de doenças causadas por vírus ou por fungos.

Os testes biológicos e moleculares para diagnóstico das doenças das amostras coletadas foram realizadas no Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. A caracterização morfológica foi realizada no Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal de Campina Grande na Paraíba (UFCG), no Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA), campus Sumé.

Tabela 1 - Amostras de orquídeas para análises

NOME CIENTÍFICO	NOME POPULAR	MUNICÍPIO DE COLETA
<i>Spathoglottis unguiculata</i>	Orquídea-grapete	Areia
<i>Maxillaria leucaimata Barb. Rodr</i>	Mini Orquídea	Areia
<i>Arundina bambusifolia</i>	Orquídea-Bambu	Areia
<i>Paradisanthus micranthus (Barb. Rodr) Schltr</i>	Não informado	Areia
<i>Cattleya labiata</i>	Não informado	Areia
<i>Epidendrum cinnabarinum</i>	Orquídea crucifixo	Areia
<i>Maxillaria sp.</i>	Mini Orquídea	Areia
<i>Dendrobium bronckartii amabile</i>	Não informado	Lagoa Seca
<i>Cattleya labiata rubra</i>	Não informado	Lagoa Seca
<i>Spatoglottis unghiculata.</i>	Não informado	Areia

Fonte: Elaborado pela autora

Figura 10 - Espécies de orquídeas das quais as amostras para a pesquisa foram coletadas: A) *Spathoglottis unguiculata*; B) *Arundina Bambusifolia*; C) *Dendrobium bronckartii amabile*; D) *Cattleya Labiata*; E) *Paradisanthus micranthus* (Barb. Rodr) Schltr; F) *Maxillaria* sp.; G) *Epidendrum cinnabarinum*



Fonte: Elaborado pela autora

4.2 EXTRAÇÃO DE RNA DAS AMOSTRAS

O método utilizado para a extração de RNA das amostras coletadas das orquídeas foi o descrito no kit de extração de RNA, RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Brasil). Com a utilização desse protocolo, aproximadamente 0,100 gramas de tecido vegetal jovem e com sintomas de doenças foram macerados utilizando cadinho e pistilo, previamente autoclavados, com o auxílio de nitrogênio líquido até obtenção de um pó.

A amostra pulverizada, foi transferida para tubos de polipropileno de 1,5 mL, então foram adicionados 450 µl de tampão RLT. Previamente preparado, o tampão RLT foi feito com a diluição de 990 µl de RLT em 10 µl de β-mercaptanol. Para uma mistura total do conteúdo adicionado, as amostras foram agitadas vigorosamente por 30 segundos em Vortex. A amostra foi transferida para tubo lilás (QIAshredder) colocado em um tubo de polipropileno de 2 mL, proveniente do Kit de extração de RNA utilizado, e centrifugada a 13500 rcf (15000rpm) por 2 minutos.

O sobrenadante foi transferido para um tubo de polipropileno de 1,5 mL com o auxílio de uma micropipeta, então foram adicionados 0,5 de etanol 100% gelado misturado gentilmente pela inversão do tubo. Em seguida, 650 µl da amostra foram transferidos para coluna rosa (Mini Spin Column), proveniente do kit de extração de RNA, e colocado em um outro tubo de polipropileno de 2 mL, centrifugado a 8000 rcf (10000 rpm) por 15 segundos,

com posterior descarte do filtrado. Em seguida, 700 μ l de tampão RM1 foi adicionado ao tubo rosa (Mini Spin Column) e centrifugado novamente a 8000 rcf (10000rpm) por 15 segundos, com posterior descarte de filtrado. Nesse mesmo tubo, 500 μ l de tampão RPE foram adicionados. A amostra foi centrifugada a 8000 rcf (10000rpm) por 15 segundos e o filtrado foi descartado. Esse procedimento foi repetido, com tempo de centrifugação de 2 minutos e descarte do filtrado. A coluna rosa foi transferida para um novo tubo de polipropileno de 1,5 mL, no qual 50 μ l de água (destilada, deionizada e tratada com DEPC e autoclavada) foram adicionados e centrifugados a 8000 rcf (10000rpm) por 1 minuto. Após descarte da coluna, o tubo de polipropileno de 1,5 mL continha o RNA extraído.

Figura 11 - Equipamentos utilizados em etapas da extração de RNA: A) Amostras pesadas em balança analítica em aproximadamente 0,100 g; B) Vortex utilizado para agitação vigorosa; C) Centrífuga utilizada para separação do RNA; D) pipetas utilizadas para pipetagem



Fonte: Elaborado pela autora

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS

O método utilizado para a extração de DNA das amostras coletadas das orquídeas foi o descrito no kit de extração de DNA, DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Brasil). Em torno de 0,100 gramas de tecido vegetal jovem e com sintomas de doenças foram macerados utilizando cadinho e pistilo previamente autoclavados, com o auxílio de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó.

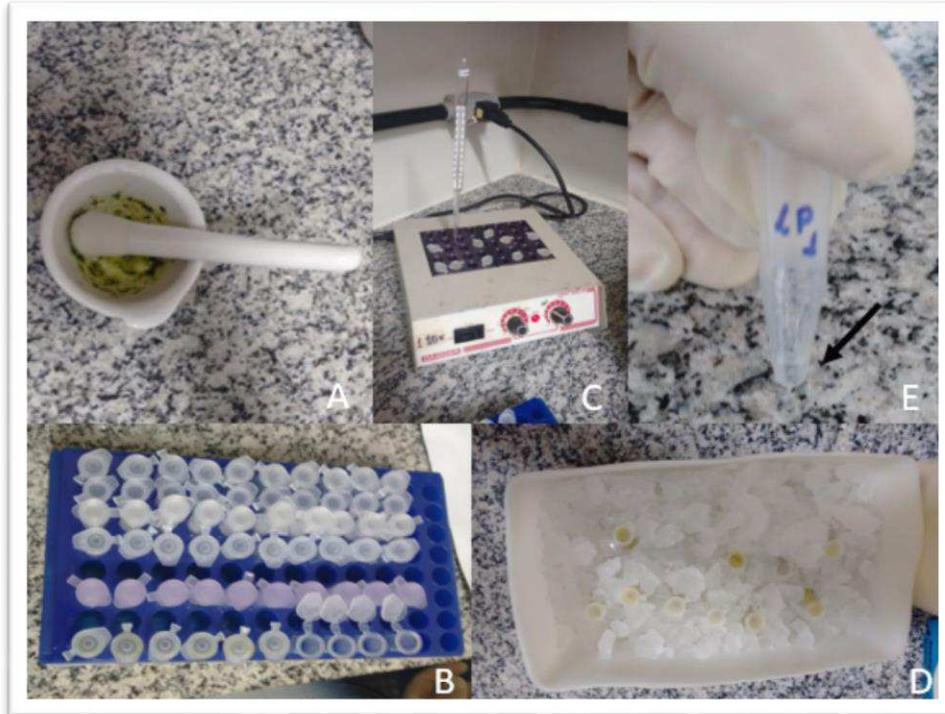
A esse pó foram adicionados 400 μ l tampão AP1, proveniente do kit de extração de DNA, e colocados no Vortex por 1 minuto, sendo posteriormente aquecidas por 10 minutos a 65°C. Um volume de 130 μ l de tampão AP2, também proveniente do kit de extração de DNA foram adicionados às amostras, misturados, incubados por 5 minutos na presença de gelo e centrifugados a 13200 rpm por cinco minutos e meio.

O sobrenadante foi adicionado em minicolunas lilás (Qiashtredder) do kit de extração de DNA, e colocados em tubos de polipropileno de 2 mL e em seguida centrifugados a 13200 rpm por dois minutos e meio. Após o descarte da coluna, 450 µl do filtrado foram transferidos para novos tubos de polipropileno de 1,5 mL, nos quais aproximadamente 675 µl de tampão AP3/E foram adicionados e misturados.

Após esse procedimento, 650 µl da mistura foram transferidos, com auxílio de uma pipeta, para minicolunas brancas (Dneasy mini spin) também do kit de extração de DNA, colocados em tubos de polipropileno de 2 mL e centrifugados a 8000 rpm por um minuto. O filtrado foi descartado e a minicoluna branca foi transferida para um novo tubo de polipropileno de 2 mL e centrifugados a 8000 rpm por um minuto. Novamente o filtrado foi descartado e a minicoluna branca foi transferida para um novo tubo de polipropileno de 2 mL, onde foi adicionado 500 µl de tampão AW e centrifugados a 8000 rpm por um minuto. O filtrado foi descartado e novamente foram adicionados 500 µl de tampão AW e centrifugados a 132000 rcf por dois minutos e meio.

Após o descarte do filtrado, a minicoluna branca foi transferida para um novo tubo de polipropileno de 1,5 mL, onde foram adicionados 50 µl de tampão AE e deixados incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Essa mistura foi centrifugada a 8000rpm por um minuto para eluir e após descartar a minicoluna branca, o DNA extraído se encontrou no tubo de polipropileno de 1,5 mL.

Figura 12 - Etapas da extração de DNA: A) Almofariz e pistilo com a amostra pulverizada com auxílio de nitrogênio líquido; B) Tubos de polipropileno de 1,5 mL utilizados para o procedimento; C) Amostras sendo aquecidas a 65°C por 10 minutos; D) Resfriamento das amostras em gelo por cinco minutos; E) DNA extraído



Fonte: Elaborado pela autora

4.4 AMPLIFICAÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE – PCR PARA O *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES*

Na realização da PCR foi utilizado o DNA extraído das amostras de acordo com o kit de extração de DNA, DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Brasil). Para a PCR, foram adicionados em mini tubos de polipropileno 4 µl de água destilada e autoclavada, 10 µl de REDExtract-N-Amp PCR reaction mix, 1 µl dos *primes* específicos (CgInt (5'-ggCCTCCCgCCTCCgggCgg-3') e ITS4 (5'-TCCTCCgCTTATTgATATgC-3')), e por fim, 4 µl DNA extraído. O ciclo da reação consistiu em 94°C por dois minutos para manter a temperatura ideal, 35 ciclos de 94°C por 40 segundos para desnaturação, 54°C por um minuto para anelamento e 72°C por um minuto e 72°C por cinco minutos para extensão da fita e 4°C por cinco minutos para manter a reação, em um Termociclador PTC 200.

4.5 GEL DE AGAROSE 1,5%

Para o gel de agarose 1,5%, a preparação do gel de agarose consistiu de 1,5 grama de agarose e 100 mL de tampão TAE 0,5% (Tris, Acetato e EDTA). Após solidificação do gel em cuba eletroforética, as amostras foram aplicadas e coradas com brometo de etídeo, comparadas com marcador de peso molecular 1Kb e visualizadas em fotodocumentador.

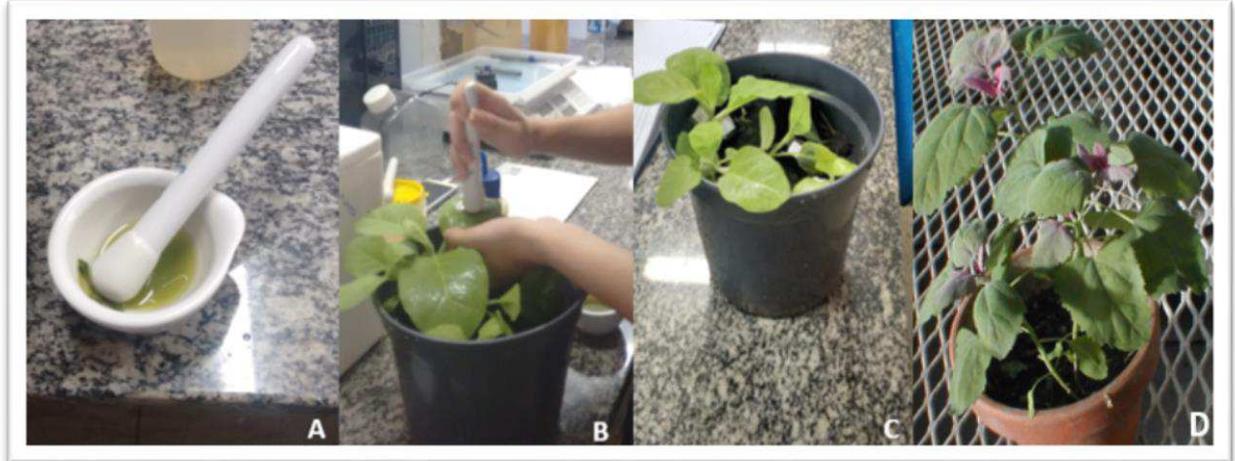
4.6 ISOLAMENTO DOS FUNGOS

Para a realização do isolamento dos fungos, pequenos fragmentos de tecido da região limítrofe entre a área lesionada e a área sadia foram retirados da planta doente, pois nestas áreas que o patógeno se encontra em franca atividade. Em seguida, os fragmentos dos tecidos das amostras foram colocados em água por 15 minutos para que o tecido vegetal se tornasse mais rígido. E foram transferidos para novas placas de Petri com uma diluição de hipoclorito de sódio e água na proporção de 1:4 para a desinfestação dos contaminantes por mais 15 minutos. As amostras foram colocadas novamente em água por 15 minutos e secadas em papel filtro. Após observar as amostras secas foram adicionadas em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) em placas de Petri e colocadas na estufa. Todo o procedimento foi realizado dentro do fluxo laminar para evitar também a contaminação das amostras.

4.7 INOCULAÇÃO MECÂNICA VIA EXTRATO VEGETAL

Para a realização da inoculação mecânica, as plantas indicadoras utilizadas foram a *Nicotiana tabacum L.* e a *Chenopodium amaranticolor*. Primeiramente, uma amostra da planta com sintomas de doenças causadas por vírus foi cortada e macerada na presença de tampão e com uma pequena quantidade do abrasivo celite. Em seguida, o extrato resultante da maceração foi inoculado com ajuda do pistilo em duas folhas da planta indicadora e em seguida lavadas com água para retirar o excesso de tampão. A planta indicadora foi colocada em estufa para esperar o aparecimento dos sintomas.

Figura 13 - Etapas da inoculação mecânica via extrato vegetal: A) Amostra macerada com tampão e celite; B) Inoculação na planta indicadora com auxílio do pistilo; C) Planta indicadora *Nicotiana tabacum L* inoculada; D) Planta indicadora *Chenopodium amaranticolor* inoculada



Fonte: Elaborado pela autora

4.8 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

A caracterização morfológica foi realizada utilizando-se microscopia óptica nas amostras das orquídeas que apresentaram sintomatologia para a incidência de fungos. As amostras das orquídeas *Arundina bambusifolia*, *Spathoglottis unguiculata*, *Spathoglottis unguiculata 1*, *Epipedrum cinnabarinum*, *Paradisanthus micrantes*, *Cattleya labiata rubra*, *Cattleya labiata* e *Dedrobium bonckartti amabile* foram observadas no microscópio Bel photonics (Figura 14). Para a análise microscópica foram retirados amostras dos fungos isolados anteriormente em tubos de ensaio, adicionados em lâminas com corante safranina 2,5% e realizada a observação.

Figura 14 - Microscópio óptico utilizado para a caracterização morfológica dos fungos



Fonte: Elaborado pela autora

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÕES DA SINTOMATOLOGIA NAS AMOSTRAS COLETADAS

Das dez amostras de orquídeas coletadas de acordo com a Tabela 1 foram observados sintomas diferenciados (Tabela 2). As orquídeas *Cattleya labiata rubra*, *Dendrobium bronckartii amabile*, *Epidendrum cinnabarinum*, *Arundina bambusifolia*, *Spathoglottis unguiculata 1* e *Spathoglottis unguiculata* apresentaram sintomas que indicam a presença de infecção por fungos. Para as orquídeas *Maxillaria leucaimata* e *Maxillaria* sp foram observados sintomas que indicam a presença de vírus. Entretanto, as orquídeas *Paradisanthus micranthus* e *Cattleya labiata* apresentaram sintomatologia mista. Esses resultados estão de acordo com Mantovini (2013) que afirmou que as orquídeas podem reagir de maneira distinta a infecção por patógenos.

Tabela 2 - Sintomatologia das orquídeas infectadas por vírus, fungos e infecção mista

ESPÉCIE DE ORQUÍDEA	FOTO DA AMOSTRA	INFECCÃO POR FUNGO	INFECCÃO POR VÍRUS
<i>Dendrobium bronckartii amabile</i>		Descoloração na folha da planta, manchas necróticas e anéis concêntricos ao longo da folha.	-
<i>Cattleya labiata rubra</i>		Necrose do tecido vegetal, clorose, amarelecimento e anéis concêntricos.	-
<i>Epidendrum cinnabarinum</i>		Descoloração na folha, manchas necróticas	-
<i>Cattleya labiata</i>		Anéis concêntricos ao longo da folha e descoloração	Clorose

Continuação

ESPÉCIE DE ORQUÍDEA	FOTO DA AMOSTRA	INFECÇÃO POR FUNGO	INFECÇÃO POR VÍRUS
<i>Arundina bambusifolia</i>		Amarelecimento e necrose	-
<i>Paradisanthus micrantes</i>		Manchas necróticas apresentando halos brancos e descoloração do tecido vegetal	Mosaico
<i>Spathoglottes unguiculata 1</i>		Manchas necróticas apresentando halos brancos e descoloração do tecido vegetal	-
<i>Spathoglottes unguiculata</i>		Manchas necróticas, presença de halos brancos e descoloração	-
<i>Maxillaria sp.</i>		-	Pequenos pontos necróticos e clorose ao longo da folha
<i>Maxillaria leucaimata</i>		-	Pequenos pontos necróticos e clorose ao longo da folha

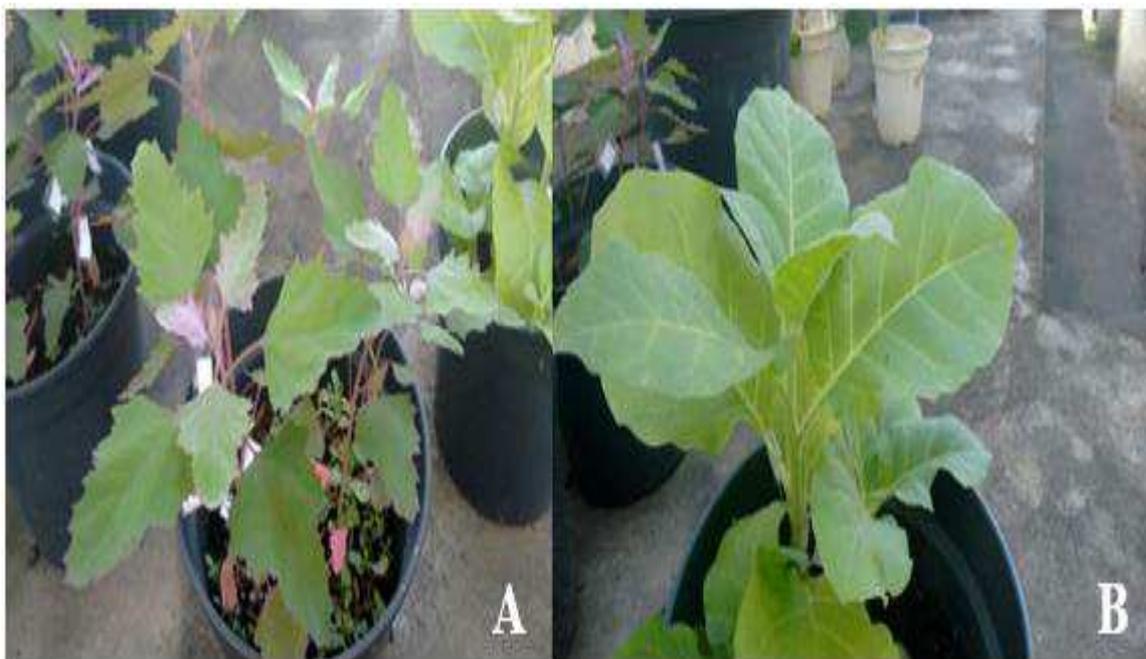
Fonte: Elaborada pela autora

5.2 INOCULAÇÃO MECÂNICA VIA EXTRATO VEGETAL

O teste biológico utilizado para a identificação de vírus nas orquídeas foi a inoculação mecânica via extrato vegetal. Todas as amostras foram inoculadas nas plantas indicadoras, porém, no decorrer de cinco dias não induziram os sintomas como mostra a Figura 15. Esse fato pode ser atribuído a um provável escape, que pode ter ocorrido antes da replicação do patógeno, ou até mesmo devido aos mecanismos de defesa da própria planta, que não permitiram a multiplicação das partículas virais para apresentar a sintomatologia. Entretanto, não é possível afirmar que não houve a infecção dos vírus na planta sem a realização de testes moleculares ou sorológicos.

A baixa porcentagem de transmissão de vírus por meio de extrato vegetal inoculado em plantas de *Nicotiana* e *Chenopodium* também foi observado por Sanches (2007) em que as plantas permaneceram assintomáticas, no entanto o teste molecular RT-PCR, foram detectadas partículas virais.

Figura 15 - Plantas indicadoras inoculadas: A) Planta *Chenopodium amaranticolor*; B) Plantas *Nicotiana tabacum* L.



Fonte: Elaborado pela autora

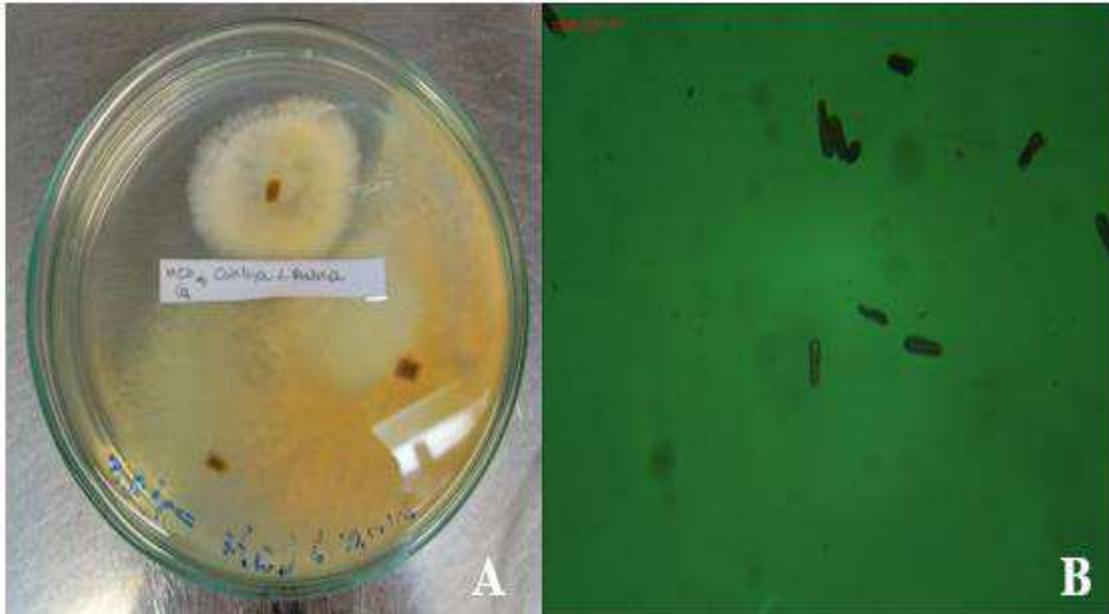
5.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Nas orquídeas *Arundina bambusifolia*, *Spathoglottis unguiculata*, *Spathoglottis unguiculata* 1, *Epipedrum cinnabarinum* e *Paradisanthus micrantesnã* foi possível observar esporos de fungos, apenas hifas e micélio (dados não mostrados). Na figura 16, para a orquídea *Cattleya Labiata Rubra* foi possível observar esporos do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, apresentando conídios hialinos e unicelulares, estando de acordo com os estudos de Almeida (2010) sobre Antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) incidente sobre maracujá (*Passiflora edulis Sims*), que relatou que os conídios do *Colletotrichum gloeosporioides* são hialinos e unicelulares, produzidos no interior de acérvulos subepidérmicos, dispostos em círculos.

Nas orquídeas *Cattleya labiata* e *Dedrobium bonckartii amabile* foram observados conídios elipsoides e fusiformes, mostrados nas figuras 17 e 18, respectivamente, apresentando assim a presença do *Colletotrichum acutatum*. Esse resultado está de acordo com Pereira em 2009, que no seu estudo sobre caracterização e identificação molecular de espécies de *Colletotrichum* associados à antracnose da goiaba no Estado de São Paulo, que afirmou que o *Colletotrichum acutatum* apresenta conídios, geralmente, elipsoides e fusiformes, pelo menos em uma das extremidades, ao invés de ambas as extremidades arredondadas como ocorre normalmente no fungo *Colletotrichum gloeosporioides*.

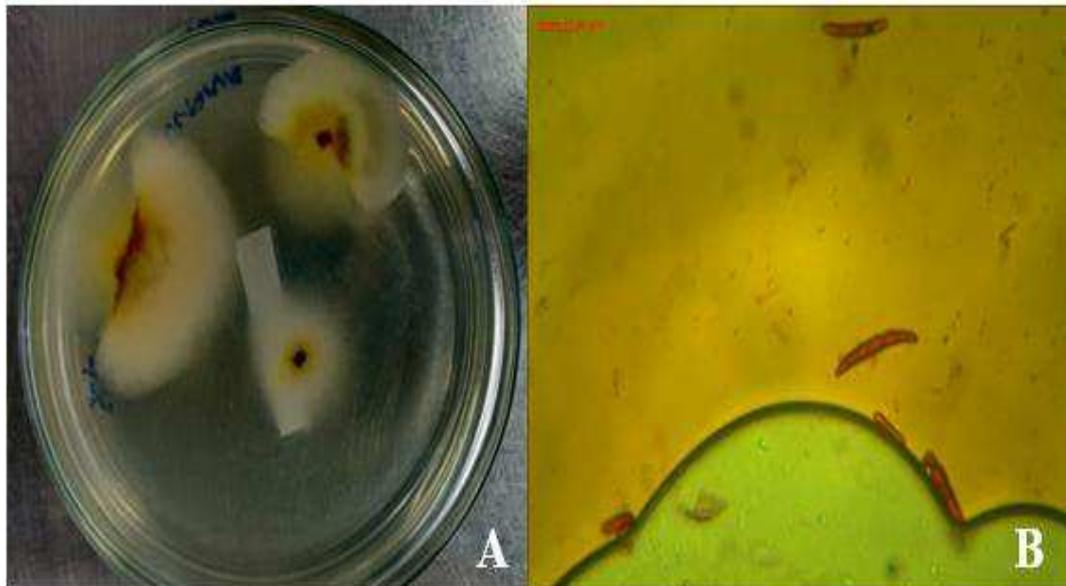
Os resultados apresentados também estão de acordo com Klein (2008), que afirmou que a antracnose é a doença mais frequente em orquídeas da espécie *Cattleya*, e com os estudos de Barros (2009) que relatou a incidência de *Colletotrichum* em orquídeas da espécie *Dedrobium*. Os resultados deste trabalho contribuem para o desenvolvimento de novos estudos mais aprofundados sobre o fungo *Colletotrichum* na região metropolitana de Campina Grande e do Brejo paraibano presentes em orquídeas, já que não existia relatos de ocorrência desse fungo causador da antracnose em orquídeas cultivadas na região, sendo assim o primeiro relato desse fungo associado a orquídeas, abrindo caminhos para posteriores estudos direcionados para um manejo apropriado nos orquidários, afim de diminuir a proliferação desse patógeno. Assim será possível aumentar a produtividade nos cultivos e a vida útil nos orquidários e até mesmo na casa do consumidor, já que o clima da região é adequado à produção dessa família de planta.

Figura 16 - Microscopia óptica da amostra do fungo encontrado na orquídea *Cattleya labiata rubra*. A) Crescimento colonial do fungo isolado em meio de cultivo BDA; B) Esporos do fungo



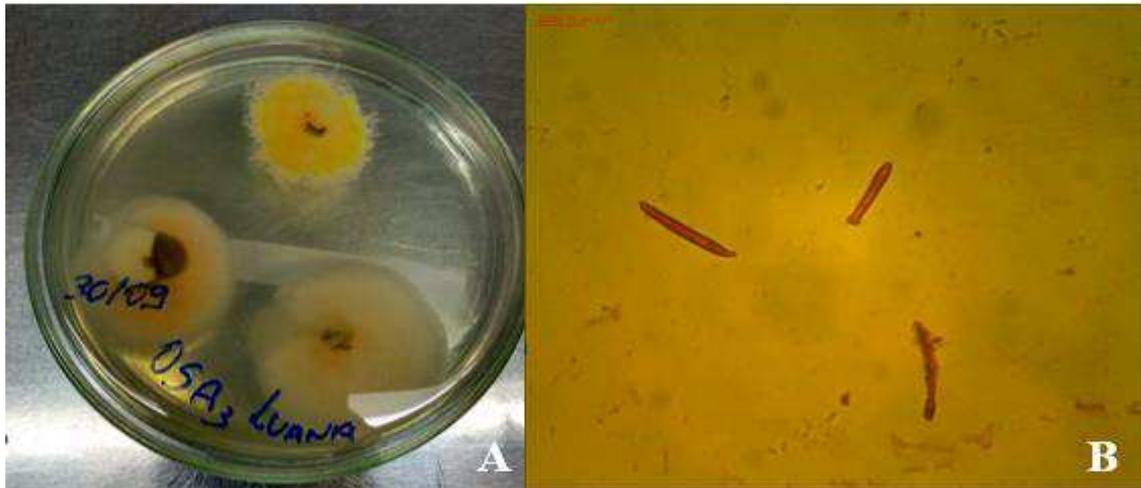
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 17 - Microscopia óptica da amostra do fungo encontrado na orquídea *Cattleya labiata*. A) Crescimento colonial do fungo isolado em meio de cultivo BDA; B) Esporos do fungo



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 18 - Microscopia óptica da amostra do fungo encontrado na orquídea *Dendrobium bonckartii amabile*. A) Crescimento colonial do fungo isolado em meio de cultivo BDA; B) Esporos do fungo

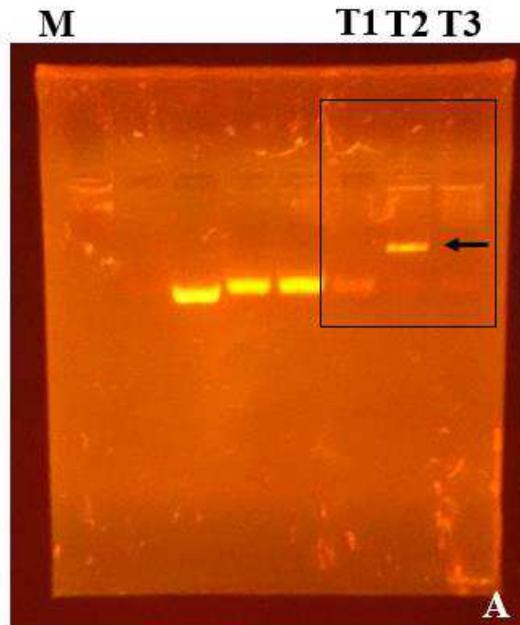


Fonte: Elaborado pela autora

5.4 TESTE MOLECULAR

A Amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase – PCR foi realizada nas amostras com sintomas de antracnose: *Dendrobium bronckartii amabile* (T1), *Paradisanthus micranthus* (T2) e *Cattleya labiata rubra* (T3). O resultado após a análise eletroforética das bandas amplificadas, demonstrou resultados positivos para ocorrência do fungo na orquídea da espécie *Cattleya labiata rubra* (T3), com aproximadamente 450 bp como mostra a Figura 19, e negativo para as demais. Esses resultados estão de acordo com Chowdappa (2009), o autor realizou estudos de caracterização molecular em espécies de *Colletotrichum* causando antracnose em uva. Foram utilizados os primers ITS4 e CgInt específicos para *Colletotrichum gloeosporioides* e obteve-se um fragmento de 450 bp.

Figura 19 - Análise de amplificação em gel de agarose: A) Análise eletroforética das bandas amplificadas com os primers desenhados para o *Colletotrichum gloeosporioides* para as amostras *Dendrobium bronckartii amabile* (T1), *Paradisanthus micranthus* (T2) e *Cattleya labiata rubra* (T3) e comparadas com o marcador (M) de 1 Kb



Fonte: Elaborado pela autora

6 CONCLUSÕES

A observação da sintomatologia indicou que as amostras coletadas das orquídeas apresentaram sintomatologia para a possível infecção por fungos, vírus e mistas (vírus e fungos).

O teste biológico via inoculação mecânica do extrato vegetal não foi possível observar os sintomas da infecção viral no decorrer de cinco dias nas plantas inoculadas indicadoras *Nicotiana* e *Chenopodium*. Este fato pode ter ocorrido por possíveis escapes ou pela interação planta – patógeno com a defesa natural da planta.

Na caracterização morfológica foi observado esporos conidiaishialinos e unicelulares, comprovando a presença de *Colletotrichum gloeosporioides* na orquídea *Cattleya labiata rubra*. E para as orquídeas *Cattleya labiata* e *Dedrobium bonckartti amabile* foram observados conídios elipsoides e fusiformes, os quais comprovaram a infecção pelo *Colletotrichum acutatum*.

Na caracterização molecular utilizando primers específicos para o diagnóstico de antracnose foi observado o fragmento de 450 bp correspondente ao *Colletotrichum gloeosporioides*.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, M. A. V.; DUARTE, L. M. L. **CymMV e ORSV: os vírus mais frequentes em orquídeas**, 2012. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=180>. Acesso em: 06 de set. de 2016.
- ALEXANDRE, M.A.V; DUARTE, L.M.L. **Cymbidium mosaic vírus e odontoglossum ringspot vírus: Vírus mais frequentes em orquídeas**, 2013.
- ALEXANDRE, M.A.V.; DUARTE, L.M.L. (Ed.). **Aspectos fitossanitários das orquídeas**. 2.ed. São Paulo: Instituto Biológico, 2012. 84p. (Boletim Técnico, n.25)
- ALMEIDA, L. P. M. **Antracnose (Colletotrichum gloeosporioides Penz. & Sacc) incidente em maracujá (Passiflora edulis Sims)**, 2010. Disponível em: <http://fitopatologia1.blogspot.com.br/2010/12/antracnose-colletotrichum_4801.html>. Acesso em: 17 de out. de 2016.
- APRENDENDO COM AS ORQUÍDEAS. **Quanto a categoria:** epífita, rupícola, terrestre, húmida, saprófita é classificado quanto ao substrato, 2011. Disponível em: <<http://aprendendocomasorquideas.blogspot.com.br/2011/01/quanto-categoria-epifita-rupicola.html#>>. Acesso em: 26 de out. de 2016.
- BACCHI, et al., **Doenças no solo**. Disponível em <http://www.grupocultivar.com.br/artigos/doencas-no-solo>>. Acesso em: 18 de out de 2016.
- BARROS, A.P.O. et al. **Manchas foliares em Catasetum expansum (Orchidaceae) incitadas por Colletotrichum sp.** IX Jornada de ensino, pesquisa e extensão –JEPEX 2009. Recife, PE: 2009.
- BARROS, F. 1999. **Tendências e pendências na sistemática de Orchidaceae no Brasil**. 50o Congresso Nacional de Botânica - Programa e Resumos. Fundação Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, pp.312-313.
- BASSO, M. F.; FAJARDO, T. V. M.; PIORIBEIRO, G.; EIRAS, M.; ZERBINI, F. M. **Avanços e perspectivas no estudo das doenças virais e subvirais em videira com ênfase na realidade brasileira**. Revisão Anual de Patologia de Plantas. 2014
- BLANCO, C. **Orquídeas com Manchas nas Folhas ? Prevenção e tratamento**, 2015. Disponível em: <<http://www.tudosobreorquideas.com/orquideas-com-manchas-nas-folhas-prevencao-e-tratamento/>>. Acesso em: 04 de out de 2016.
- CARDOSO, J.C. **Pragas das orquídeas: identificação, controle e manejo**. Fundação Sunji Nishimura de Tecnologia Faculdade de Ciências Agrônômicas. 1ª Ed. Pompéia: Bless Editora, 2005. 129 p.
- CEASA. **Orquídeas, paixão à primeira vista**. Abracen, 2015. Disponível em: <http://abracen.org.br/abracen/orquideas-paixao-a-primeira-vista/#.V_EfKPArLIU>. Acesso em: 27 de out. de 2016.

COOKE, R. B. **Doença das orquídeas – Parte II, Vírus.** Disponível em: <<http://www.orquidario.org/palestras/palestra002.htm>>. Acesso em: 26 de set. de 2016.

CORRÊA, et al., **Roteiro de aulas práticas em micologia,** 2009. Disponível em: <http://www.icb.usp.br/bmm/grad/arquivos/pdf_sys/med2009_micologia.pdf>. Acesso em: 10 de 10 de 2016

CHOWDAPPA, P. **Morphological and molecular characterization of Colletotrichum Species causing Anthracnose of grape in India.**2009.

CRISTINA, V. **A orquídea.** 2010. Disponível em <<http://www.aorquidea.com.br/forum/viewtopic.php?t=12385&sid=ceb3de67ff86667d4f842cb669d77471>>. Acesso em: 10 de out de 2016.

DOI, Y.; ARAI, K.; YORA, K. Distribution of bacilliform vírus particles in Lasaki disease and Cymbidium ringspot disease. **Annals of Phytopathological Society of Japan,** Tokyo, v.35, p. 388, 1969.

DUARTE, L. M. L.; ALEXANDRE, M. A. V. **Doenças causadas por vírus em plantas ornamentais,** 2010. Disponível em <<http://www.summanet.com.br/summanet-site/congressos/2010/palestras/p15.htm>>. Acesso em: 30 de ago. de 2016.

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; CARVALHO, J. F. R. P. **Cultivo de Orquídeas.** 1ª Ed. Londrina: Editora Mecenias, 2010. 208 p.

G1 AGRO. **Brasil produz cinco mil variedades de flores:** Indústria brasileira trabalha com experiências genéticas gerando diferentes tipos de flores. 2016. Disponível em: < <http://www.portaldoagronegócio.com.br/notícia/Brasil-produz-cinco-mil-variedades-de-flores-149914>>. Acesso em: 02 de out. de 2016.

JESUS, Samuel. **Saiba como prevenir doenças nas orquídeas evitando que elas morram.** 2016. Disponível em: <<http://planetadasorquideas.com.br/como-prevenir-doenas-orquideas/>>. Acesso em: 28 de set. de 2016.

JESUS, C.C. **Sequenciamento e análise da variabilidade genética de vírus transmitidos por ácaros do gênero *Brevipalpus* no Brasil,** 2016. Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciências, Universidade de São Paulo, Piracicada, 2016.

KLEIN, E. H. S. – **Levantamento e Desenvolvimento de Kit Diagnóstico de Patógenos e Propagação In Vitro de Orquídeas no Estado do Rio de Janeiro,** Dissertação de Pós-graduação em Fitossanidade e Biotecnologia, UFRRJ, 2008, 72F.:il.

KITAJIMA, E.W.; KONDO, H.; MACKENZIE, A.; REZENDE, J.A.M.; GIORIA, R.; GIBBS, A. Comparative cytopatology and immunocytochemistry of Japanese, Australian and Brazilian isolates of Orchid fleck virus. **Journal of General Plant Pathology,** Tokyo, v.67, n.3, p. 231-237, 2001.

KUBO, K. S. **Detecção e variabilidade do gene do nucleocapsídeo de isolados de diferentes regiões geográficas do vírus da mancha das orquídeas (“Orchid Fleck Virus -**

OFV”), 2006. Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Agronomia, Universidade Federal de São Paulo, Piracicaba, 2006.

LIMA, M. F.; **Vírus que infectam plantas**. 2010

LIMA, M. F.; FAJARDO, T. V. M. **Doenças causadas por vírus**. In: LIMA, M. F.; MOREIRA, F. R. B. (Ed.). Uva de Mesa: Fitossanidade. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2012. p. 43-58. (Frutas do Brasil, 14).

MANSUR, H. S. **Técnicas de Caracterização de Materiais**. 2012.

MANTOVANI, C. **Manual de identificação das doenças das orquídeas**. 2013.

MORAES, Letícia Aparecida de. **Incidência e caracterização dos vírus infectando orquídeas no Estado de São Paulo**. 2013. xii , 81 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, 2013. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/97206>> Acesso em: 16 de setembro de 2016

NICKEL, O.; FARJADO, T. V. M. **Técnicas de detecção e estudo de vírus em plantas**. 2015.

EMBRAPA. Bento Gonçalves: 2015.

ORQUÍDEA EM FOCO, 2008. **Mancha-foliar em Orquideas**. Disponível em: <<http://orquideaemfoco.blogspot.com.br/2008/06/mancha-foliar-em-orquideas.html>>. Acesso em: 16 de set de 2016.

PEREIRA, W. V. **Caracterização e identificação molecular de espécies de Colletotrichum associados à antracnose da goiaba no Estado de São Paulo**. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2009

REIS, J.N.P. **Cultivo de orquídeas: Uma opção à agricultura familiar?**. Brasília: IX Encontro Nacional da ecoeco. Outubro, 2011.

RODRIGUES, D. T. **Nutrição e Fertilização de orquídeas in vitro e em vasos**. 2005. Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para a obtenção do título de “*Magister Scientiae*”, 2005.

SANCHES, M. M. **Frequencia de Lettuce big-vein associated virus e Mirafiori lettuce big-vein virus em plantas de alface no Estado e São Paulo e transmissão através de extrato vegetal e solo**. 2007.

SANCHES, M. M.; KRAUSE-SAKATE, R. **Análises para vírus, viróides e fitoplasmas em material vegetal importado**. 2013.

SANTOS, C. D. **Fungos e oomicetos associados a espécies nativas e cultivadas de orquídeas no sul da Bahia Ilhéus**, 2012. Dissertação apresentada, para obtenção do título de mestre em Produção Vegetal, à Universidade Estadual de Santa Cruz, 2012.

SILVA, et al., **Meio de cultura Knudson modificado utilizado no cultivo in vitro de um híbrido de orquídea.** 2009.

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, 2005.

SOUSA, E. M. R.; **Fungos causadores de doenças em orquídeas.** 2010. Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito para obtenção de grau de bacharel em Ciências Biológicas, 2010.

SHIKARI, J. N. **Orquídeas: Como cultivá-las corretamente.** 2006.

SHIKARI, J. N.; DIAZ, E. M. **Orquídeas.** São Paulo: [s.n.], 2012.

VICHIATO, M.R.M. Alongamento de plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. Com pulverização de ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p.16-20, 2007.

ZAMBOLIM, E. M. **Introdução à virologia vegetal.** Viçosa, MG: Editora UFV, 2006.

ZERBINI JUNIOR, F. M.; CARVALHO, M. G.; ZAMBOLIM, E. M. **Métodos de diagnose de viroses vegetais.** In: ZERBINI JUNIOR, F. M.; CARVALHO, M. G.;