BRENDA VENTURA DE LIMA

SUBSÍDIOS PARA O MANEJO CULTURAL E FITOPATOLÓGICO DE *CYRTOPODIUM CARDIOCHILUM* (ORCHIDACEAE)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para a obtenção do título *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e Classificação da Biblioteca Central da UFV

T
L732s
2012

Lima, Brenda Ventura de, 1984-
Subsídios para o manejo cultural e fitopatológico de *Cyrtopodium cardiochilum* (Orchidaceae) / Brenda Ventura de Lima. – Viçosa, MG, 2012.
x, 102f. : il. (algumas col.) ; 29 cm.

Inclui anexo.
Orientador: Robert Weingart Barreto.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Orquídea. 2. Fungos fitopatogênicos. 3. Orquídea - Nutrição. 4. Orquídea - Propagação in vitro. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 579.5

BRENDA VENTURA DE LIMA

SUBSÍDIOS PARA O MANEJO CULTURAL E FITOPATOLÓGICO DE *Cyrtopodium cardiochilum* (ORCHIDACEAE)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de Magister *Scientiae*.

APROVADA: 17 de julho de 2012.

Prof. Olinto Liparini Pereira

Profª Maria Catarina M. Kasuya

Prof. Laércio Zambolim
(Coorientador)

Prof. Wagner Campos Otoni
(Coorientador)

Prof. Robert Weingart Barreto
(Orientador)

Aos meus queridos pais, Renato e Penha, pelo amor, apoio e dedicação.

Ao meu marido, Rodrigo, pelo amor, compreensão e paciência.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha fortaleza, por estar sempre presente em minha vida.

Aos meus pais Renato e Penha, pela fiel dedicação, orações, carinho e amor incondicional.

Ao meu marido Rodrigo, pelo grande amor, apoio e paciência nas horas mais difícies.

Ao Prof. Robert Weingart Barreto, pela orientação, apoio, confiança, conselhos, sugestões, críticas, ensinamentos, paciência e pelo incentivo incessante.

Aos meus coorientadores Laércio Zambolim e Wagner Otoni pelas orientações, sugestões, apoio, conselhos e por me recepcioarem em seus laboratórios.

Ao Professor Olinto Liparini Pereira pelos conselhos, incentivo e sugestões.

Ao André Ferreira Santos, pelos valiosos ensinamentos, apoio, amizade e grande contribuição na execução de parte deste trabalho.

Ao Cícero, Alessandra, Mayumi, pela amizade e colaborações na execução de parte deste trabalho.

À Meirielle pela amizade e incentivo para o meu ingresso no mestrado.

À Lidiane, pelo convívio, amizade e grande ajuda na realização dos estudos moleculares.

Ao Davi, Fabiano, Dudu, Bruno, Janaína, pela amizade, ajuda, troca de conhecimentos, e pelo bom convívio.

Aos estagiários e bolsistas do laboratório da Clínica de Doenças de Plantas: Henrique (cebola), Fabiana, Ana Carolina, Bruno (Bruninho), Samlla, pela colaboração na realização de alguns dos experimentos.

Aos funcionários Célio, Henrique, Zosé Orlando, Oswaldo (Ponês), Sueli pelo divertido convívio e pelos seviços prestados.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do Programa de Pós- Graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.

MUITO OBRIGADO

BIOGRAFIA

BRENDA VETURA LIMA, filha de Renato Gomes de Lima e Maria da Penha Ventura Lima, nasceu na cidade de Belo Horizonte-MG, no dia 06 de janeiro de 1984.

Realizou todos os estudos básicos na cidade de Viçosa-MG.

Em 2004, iniciou o curso de graduação em Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em janeiro de 2009.

Em julho de 2010, iniciou o programa de mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa, sob orientação do professor Robert Weingart Barreto.

SUMÁRIO

RESUMO vii

ABSTRACT ix

INTRODUÇÃO GERAL 1

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 9

CAPÍTULO 1: Avaliação do efeito substratos no cultivo de *Cyrtopodium cardiochilum* 12

1. INTRODUÇÃO 12
2. MATERIAL E MÉTODOS 14
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 15
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. 16
5. FIGURAS E TABELAS 18

CAPÍTULO 2: Demanda nutricional de *Cyrtopodium cardiochilum* e efeito do suprimento nutricional sobre o seu crescimento 19

1. INTRODUÇÃO 19
2. MATERIAL E MÉTODOS 20
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 22
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 23
5. FIGURAS E TABELAS 25

CAPÍTULO 3: Cultivo seminífero *in vitro* de *Cyrtopodium cardiochilum:* Influência de concentrações de carvão ativado, sacarose e sais do meio Suprimento (S) 27

1. INTRODUÇÃO 27
2. MATERIAL E MÉTODOS 29
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 30
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 32
5. FIGURAS E TABELAS 35

CAPÍTULO 4: Micobiota fitopatogênica associada à *Cyrtopodium cardiochilum* 39

1. INTRODUÇÃO 39
2. MATERIAL E MÉTODOS 40
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 44
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 52
5. FIGURAS E TABELAS 57

CAPÍTULO 5: Controle químico de fungos causadores de podridões de pseudobulbos em *Cyrtopodium cardiochilum* 75

1. INTRODUÇÃO 76
2. MATERIAL E MÉTODOS 78
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 83
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 87
5. FIGURAS E TABELAS 89

CONCLUSÕES GERAIS 97

ANEXO 99

RESUMO

LIMA, Brenda Ventura de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Subsídios para o manejo cultural e fitopatológico de *Cyrtopodium cardiochilum* (Orchidaceae).** Orientador: Robert Weingart Barreto. Coorientadores: Laércio Zambolim e Wagner Campos Otoni.

Cyrtopodium cardiochilum é uma orquídea nativa que apresenta potencial para produção de extratos para uso cosmético e farmacêutico. Devido ao seu interesse comercial e a ausência de informações na literatura a respeito dos aspectos fitotécnicos e fitopatológicos relacionados à mesma, o presente estudo teve como objetivo gerar informações que contribuam para a domesticação dessa orquídea e seu manejo. Avaliaram-se alguns substratos e combinações: brita de gnaisse, argila expandida, seixo rolado, coco em cubos (coxim) e vermiculita para o cultivo de *C. cardiochilum*. Todos os substratos analisados mostraram-se adequados, destacando-se a mistura de argila + brita na proporção de 1:1 (v/v). Buscou-se também um fertilizante multi-nutriente compatível em função da demanda nutricional de *C. cardiochilum* e testou-se o efeito de diferentes doses desse fertilizante sobre o crescimento de plantas de *C. cardiochilum*. E por meio da análise de curva de dose-resposta inferiu-se que a dose que resultou na máxima produção foi a de 100 mg/vaso/semana. Avaliou-se diferentes combinações de carvão ativado, sacarose e sais do meio Suprimento (S) com a finalidade de se determinar a composição mais favorável para a produção de plântulas de *C. cardiochilum in vitro*. As concentrações de 3,0 g L^{-1} de carvão ativado, 33 g L^{-1} de sacarose e 3,2 g L^{-1} de sais do meio S respectivamente, proporcionaram as maiores produções de massa de matéria seca de plântulas. Também foi feito um levantamento preliminar da micobiota fitopatogênica associada a *C. cardiochilum.* Foram encontradas seis espécies fúngicas: *Sphenospora kevorkianii, Colletotrichum fructicola, Fusarium solani*, *Bionectria ochroleuca*, *Botrytis cinera* e *Alternaria* sp. As quatro primeiras espécies fúngicas foram considearadas as mais importantes tendo sido caracterizadas morfologicamente. Metódos moleculares foram utilizados para esclarecer a identidade de *C. fructicola*, *F. solani* e *B. ochroleuca*. Finalmente, avaliou-se a eficiência de fungicidas no controle de podridões causadas por *F. solani* e *B. ochroleuca* em condições *in vitro* e *in vivo*. No ensaio *in vitro* foram analisados 4 ingredientes ativos (tiram, tiofanato metílico, captan e metalaxyl- M + mancozeb). Tanto para *F. solani* quanto para *B.*

ochroleuca, tiram e tiofanato metílico na concentração de 0,05 g 100 mL^{-1}, 0,025 g 100 mL^{-1}, respectivamente foram eficazes no controle do crescimento micelial. Para o controle químico *in vivo* realizou-se previamente um teste para escolher um ou mais gêneros de orquídea para servirem de substitutos para *C. cardiochilum* nos ensaios *in vivo*, uma vez que há pouca disponibilidade de plantas dessa espécie para uso em experimentos. Realizou-se também um experimento visando avaliar o efeito de inoculações com diferentes concentrações de inóculo, com o objetivo de se determinar qual aquela apropriada para inoculação dos fungos no experimento de controle químico *in vivo*. Dentre os nove gêneros de orquídeas testados como possíveis substitutos para *C. cardiochilum*, *Cattleya* e *Laelia* foram os gêneros escolhidos como modelos. Todas as concentrações de inóculo de *F. solani* e *B. ochroleuca* analisadas (10^3, 10^4, 10^5 e 10^6 esporos⁄mL) foram capazes de causar necroses nas raízes do híbrido de *Cattleya* utilizado (*Laeliacattleya* Tropical Sunset x *Brassolaeliacattleya* Chian T3Y Beauty). Avaliou-se os ingredientes ativos tiram e tiofanato metílico na concentração de 0,05 g 100 mL^{-1} e 0,025 g 100 mL^{-1} respectivamente, no controle de *F. solani* e *B. ochroleuca in vivo* (em plantas infectadas). Porém, os resultados deste experimento foram inconclusivos, uma vez que as plantas inoculadas não desenvolveram sintomas de doenças. Portanto, experimentos futuros serão realizados para tentar esclarecer a lacuna deixada por esta parte do trabalho.

ABSTRACT

LIMA, Brenda Ventura de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2012. **Background for crop and diseases management of *Cyrtopodium cardiochilum* (Orchidaceae).** Adviser: Robert Weingart Barreto. Co-advisers: Laércio Zambolim and Wagner Campos Otoni.

Cyrtopodium cardiochilum is a native Brazilian orchid that has known potential for the production of extracts of interest for the manufacture of cosmetics and pharmaceuticals. The commercial interest in this orchid species and the absence of published information on crop management and disease managements for this species led to the present study. This work served the purpose of generating the background information necessary for the domestication and management of this orchid. Selected substrates and their combinations were tested, for the cultivation of *C. cardiochilum*, namely: gneiss gravel, expanded clay pellets, shingles, coconut shells and. All substrates were equivalent for the orchid cultivation, although the mixture of expanded clay pellets and gneiss gravel at 1:1 (v/v) resulted in the highest values of biomass. A multi-nutrient formulation having a composition compatible with the nutrient requirements of *C. cardiochilum* was prepared and the effect of different doses of this fertilizer on the growth of *C. cardiochilum* was evaluated. The analysis of the dose-response curves allowed it to be inferred that the dose resulting in maximum biomass production was 100 mg/pot/week. Different compositions of culture media for *in vitro* seminiferous cultivation of *C. cardiochilum* – various proportions of activated charcoal, sucrose and salts of the Supply medium (S) - were tested in order to determine the best composition for the production of *C. cardiochilum* plantlets. A composition of 3.0 g L^{-1} of activated charcoal, 33 g L^{-1} of sucrose and 3.2 g L^{-1} of salts of the S medium yielded the highest dry biomass of *C. cardiochilum* plantlets. A preliminary survey of the pathogenic mycobiota associated to *C. cardiochilum* was also conducted. Six fungal species were collected: *Sphenospora kevorkianii, Colletotrichum fructicola, Fusarium solani*, *Bionectria ochroleuca*, *Botrytis cinera* and *Alternaria* sp. The first four fungal species were regarded as the most important and had their morphology examined in detail. Molecular methods were used to further clarify the identity of *C. fructicola*, *F. solani* and *B. ochroleuca.* Finally, fungicides were evaluated for the control of plant rots caused by *F. solani* and *B. ochroleuca in vitro* and *in vivo*. The *in vitro* essay

involved four active ingredients (thiram, thiofanate methyl, captan and metalaxyl- M + mancozeb). Both *F. solani* and *B. ochroleuca* had their mycelial growth in culture effectively inhibitted by thiram and thiofanate methyl at concentrations of 0.05 g 100 mL^{-1} and 0.025 g 100 mL^{-1}, respectively. Prior to the *in vivo* test aimed at evaluating the chemical control of the plant rots a screening of selected orchid species was performed in search for a surrogate species to be used as a substitute for *C. cardiochilum* due to the difficulty of obtaining a sufficiently big and homogenous stand of plants for use in the experiments. Such species should be readily available in the potted orchid market and also susceptible to both *B. ochroleuca* and *F. solani.* A test was also performed aimed at determining the appropriate inoculum concentration to be used in the *in vivo* chemical control experiment. Among the nine orchid genera which were tested *Cattleya* and *Laelia* proved to be adequate surrogates. All inoculum concentrations which were tested for *F. solani* and *B. ochroleuca* (10^3, 10^4, 10^5 e 10^6 spores/mL) were capable of causing necrosis in the stand of surrogate plants - *Cattleya* hybrid (*Laeliacattleya* Tropical Sunset x *Brassolaeliacattleya* Chian T3Y Beauty). An *in vivo* test aimed at evaluating the efficacy of thiram and thiofanate methyl at concentrations of 0.05 g 100 mL^{-1} and 0.025 g 100 mL^{-1} respectively, in the control of rots caused by *F. solani* and *B. ochroleuca* was conducted. Nevertheless, the results of this experiment were not conclusive since none of the inoculated plants (including the positive controls without any fungicide treatment) developed disease symptoms. Another round of experiments aimed at evaluating *in vivo* control of the diseases will be conducted aimed at filling this blank of the work.

INTRODUÇÃO GERAL

O setor de floricultura tem um papel de destaque no segmento da horticultura intensiva do agronegócio brasileiro. Dentre as principais flores comercializadas, podem-se citar rosas, antúrios, helicônias, crisântemos, lírios, gérberas, violetas, azaléias e as orquídeas (Junqueira & Peetz, 2008; Junqueira & Peetz, 2011). No segmento das plantas ornamentais cultivadas no Brasil, os principais produtos exportados são as mudas de orquídeas e de outras plantas ornamentais, além de sementes de flores, folhagens, ramos de plantas, frescos e ou secos para buquês (Curti, 2010).

Em 2010, a comercialização brasileira de flores e plantas ornamentais movimentou um montante de aproximadamente R$ 3,8 bilhões (Junqueira, 2011). Nesse ano, o crescimento do Produto Interno Bruto Brasileiro (PIB) foi de 7,5% e o da floricultura de 15% (Junqueira, 2011). Todavia, o consumo de flores e plantas ornamentais no mercado brasileiro ainda é menor do que em muitos países. Nos países europeus o consumo médio é de US$ 70 a US$ 100 per capita por ano, enquanto no Brasil, devido à falta de hábito e menor poder aquisitivo da população, os valores ficam próximos de US$ 11 per capita (Curti, 2010).

No Brasil, o principal estado produtor de flores é o estado de São Paulo, sendo o município de Holambra responsável por mais de 70% da produção. No entanto, outros estados, tais como Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Paraná e Ceará, dentre outros, contribuem significativamente para produção de flores e plantas ornamentais (Curti, 2010).

As importações brasileiras dos produtos da floricultura, nos primeiros seis meses de 2010, atingiram um valor de US$ 14.271 milhões, valor este muito semelhante aqueles referentes às exportações do primeiro semestre do mesmo ano (US$ 14.287 milhões), fato este não comum no histórico recente do comércio internacional de flores e plantas ornamentais do Brasil (Junqueira & Peetz, 2010). Todavia, mesmo com grande potencial de crescimento na floricultura, o Brasil reduziu sua participação na exportação de flores e plantas ornamentais em 2010 em relação ao ano anterior, devido à crise mundial do último trimestre de 2008 e também pela valorização do real frente ao dólar (Curtis, 2010).

FAMÍLIA ORCHIDACEAE

As orquídeas são consideradas a maior e a mais diversificada família de plantas entre as angiospermas. Estima-se que existam aproximadamente 17.000 a 35.000 espécies e cerca de 2.000 gêneros, além de centenas de milhares de híbridos (Dressler, 1993; Watanabe, 2002), totalizando em 7% das espécies de plantas do planeta (Altafin et al., 2003).

No território brasileiro são conhecidas aproximadamente 2.400 espécies pertencentes a 203 gêneros (Menezes, 1987; Souza & Lourenzi, 2005). Muitas espécies, como *Laelia purpurata* Lindley, *Cattleya warneri* T. Moore e *Cattleya labiata* Lindley são encontradas na Mata Atlântica, região essa considerada o principal hábitat brasileiro das orquídeas (Farias & Ribeiro, 2000).

As orquídeas são adaptadas aos mais variados ambientes, porém é nas regiões tropicais onde é encontrada a maior diversidade (Christenson, 2004). Das espécies já descritas, cerca de 70% são epífitas, 25% terrestres, e 5% crescem sobre diversos tipos de suporte e substratos (Black, 1973; Arditt, 1992; Suttleworth et al., 1997).

Além do seu hábitat de crescimento, as orquídeas também podem ser agrupadas, de acordo com seu tipo de crescimento, em simpodiais e monopodiais (Campos, 1998). Entre as plantas simpodiais, destacam-se os gêneros *Cattleya* e *Laelia*. Enquanto que, os gêneros como *Vanda, Vanilla* e *Phalaenopsis* são exemplos de plantas monopodiais (Farias et al., 2010).

As orquidáceas são muito importantes para manutenção da biodiversidade e são consideradas bioindicadoras ambientais do estado de conservação das florestas, sendo sensíveis às interferências em matas primárias em virtude da ocupação de nichos especializados (Marrara et al., 2007).

IMPORTÂNCIA DAS ORQUÍDEAS

Ornamentação

O uso mais comum das orquídeas é como planta ornamental (Arditti, 1992). As orquídeas enriquecem as composições paisagísticas, em função da diversidade de formas, cores, aromas e tamanhos que as espécies possuem. Seja em uma residência,

uma empresa ou no campo é possível compor um jardim de orquídeas, cultivando-as em locais que propiciem condições adequadas ao seu plantio (Farias et al., 2010).

Alimentação

A mais importante espécie de orquídea utilizada na alimentação humana é *Vanilla planifolia* Andrews. Trata-se de espécie cujas cápsulas são utilizadas na produção de essência ou aromatizante de baunilha, que é largamente utilizada na aromatização de bolos, sorvetes, balas e doces (Arditti, 1992, Araújo, 2012).

Outro exemplo importante é representado pelas orquídeas do gênero *Orchis*. De seus tubérculos se extrai o salepo, um líquido turvo, rico em mucilagem e de sabor adocicado (Suttleworth et al., 1997). Por muitos séculos, na Pérsia e Turquia o salepo vem sendo utilizado no preparo de uma bebida quente e também como espessante para sorvetes (Arditti, 1992).

Medicinal

Algumas plantas do gênero *Cyrtopodium* são utilizadas na medicina popular para cicatrizar lesões, assim como estancar sangue em cortes e lesões. Destas também são produzidas pomadas para tratamento de terçol. O suco dessa orquídea pode ser utilizado no tratamento de abcessos e produção de xaropes para o tratamento de coqueluche e tosse (Vieira, 2000).

Na espécie *Cyrtopodium andersonii* Lamb. ex Andr., orquídea conhecida como 'rabo-de-tatu', seu pseudobulbo é empregado popularmente como antiinflamatório e analgésico. Em um estudo fitoquímico realizado por Barreiro et al. (2004) foi detectada a atividade antiinflamatória do extrato aquoso a 20% do pseudobulbo dessa orquídea e de um polissacarídeo extraído da mesma, a cirtopodina.

Comésticos

De acordo com Arditti (1992), além da vanilina que faz parte da composição de alguns perfumes, há cremes de beleza que são fabricados com base em essências extraídas de espécies do gênero *Cattleya*.

Oléos extraídos de flores de orquídeas são também utilizados na produção de produtos para hidratação da pele (Araújo, 2012).

Outros usos

A haste caulinar de algumas espécies de *Dendrobium* nos países como Filipinas e Nova Guiné é usada para tecelagem e para fazer cestas e braceletes (Araújo, 2012). Em algumas tribos desses países, a seiva produzida por *Cattleya labiata* var. *autumnali*s é utilizada para colar peças de instrumentos musicais (Araújo, 2012).

Na América Central, os pseudobulbos ocos das espécies de *Schomburgkia* são utilizados na fabricação de cornetas (Araújo, 2012).

DOENÇAS EM ORQUÍDEAS

As orquídeas de maneira geral são hospedeiras de diversos patógenos, incluindo fungos, bactérias e vírus.

Grande parte das espécies de orquídeas é suscetível a um número consideravél de doenças fúngicas, que acarretam na perda de qualidade de suas folhas, pseudobulbos e flores. As principais doenças fúngicas relatadas em orquídeas são: Podridão negra *(Pythim ultimum* e *Phytophthora cactorum*), Murcha de *Fusarium* (*Fusarium oxysporum*), Antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), Mofo cinzento (*Botrytis cinerea*), Ferrugem (*Sphenospora* sp., *Uredo* sp., e *Hemileia* sp.), Manchas de cercospora (*Cercospora* spp.), Murcha de sclerotium (*Sclerotium rolfsii*), Manchas foliares (*Selenophoma* spp., *Phyllosticta* spp. e *Pestalotiopsis* spp.) e Podridão de raízes (*Rhizoctonia solani*). Estas doenças são geralmente favorecidas por umidade excessiva no substrato e ambiente de cultivo (Faria et al., 2010).

As doenças bacterianas levam a morte das orquídeas em curto espaço de tempo. Temperatura e umidade elevada favorecem a doença. As duas principais doenças bacterianas associadas em orquídeas são: Mancha aquosa ou Mancha marrom (*Acidovorax aveane* subsp. *cattleya*) e a Podridão mole (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* e *Erwinia chrysanthemi*) (Faria et al., 2010).

Diferentes espécies de vírus infectam as orquídeas, no entanto, somente quatro espécies são relatadas em cultivos comerciais e não comercias no Brasil: Vírus do Mosaico do *Cymbidium* (*Cymbidium mosaic virus*- CyMV), Mancha anelar do *Odontoglossum* (*Odontoglossum ringspot tobamovirus*- ORSV), Vírus do

Mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus*- CMV) e Vírus da mancha de orquídea (*Orchid fleck virus* (OFV) (Faria et al., 2010).

Gênero *Cyrtopodium*

O gênero *Cyrtopodium* pertence à subfamília Epidendroideae, tribo Vandae, subtribo Cyrtopodiinae (Menezes, 2000). Embora amplamente distribuído pelo continente americano, o principal centro de diversidade do gênero é o Cerrado Brasileiro, onde 29 espécies foram encontradas (Batista & Bianchetti, 2005). A maioria das espécies do gênero é terrestre, mas espécies rupícolas e epifíticas também são conhecidas (Menezes, 2000).

Entre as espécies de *Cyrtopodium*, observa-se uma variação em relação ao tamanho e forma de seus pseudobulbos. Estes podem ser fusiformes, cilíndrico-fusiformes, cônico-fusiformes, cônico-oblongos, cônico-ovóides, ovóides ou arredondados, medindo desde alguns centímetros até mais de 1 metro de altura. Apresentam folhas herbáceas, bilateralmente alternadas, com nervuras longitudinais proeminentes, tal qual seu pseudopecíolo é ligado à base da bainha que envolve o pseudobulbo (Menezes, 2000).

Suas flores estão dispostas em inflorescências basais, eretas, rígidas, racemosas e normalmente mais altas que as folhas. As flores podem ser vistosas ou pouco ornamentais, pediceladas e com brácteas lanceoladas ou lineares. O labelo é trilobado, com os lobos laterais voltados para cima. As políneas são globosas e ceróides e em número de duas. A cápsula é alongada, dotada de saliências e sulcos (Menezes, 2000).

Ainda, segundo Menezes (2000), espécies do gênero *Cyrtopodium* recebem diferentes denominações populares, de acordo com as regiões de maior ocorrência e em analogia aos aspectos morfológicos e fisiológicos da planta. Em algumas regiões, dos estados de São Paulo e Rio de Janeiro são conhecidas como ‘sumaré’. Já no Nordeste Brasileiro se referem como ‘rabo-de-tatu’ e em Goiás como ‘cola-de-sapateiro’.

Alguns autores consideraram o uso de algumas espécies de *Cyrtopodium* para fins medicinais (Vieira, 2000). Há registros do uso de sumo de *Cyrtopodium punctatum* (L.) Lindl. e *C. paranaensis* Schltr. para cicatrizar lesões, assim como

estancar sangue em cortes e lesões. Devido às suas propriedades medicinais, algumas espécies do gênero *Cyrtopodium* são também conhecidas pelos nomes populares 'bisturi-vegetal', 'bisturi-do-mato' e 'lanceta-milagrosa' (Pio-Corrêa, 1926).

Cyrtopodium cardiochilum Lindl.

Cyrtopodium cardiochilum é tida como sendo planta de hábito tanto terrestre quanto rupícola. No entanto, nas observações feitas nos hábitat nativos da espécie nas regiões serranas dos estados de Minas Gerais e do Rio de Janeiro, a mesma só foi encontrada crescendo sobre rochas, tendo como substrato depósito de húmus (Menezes, 2000).

Cyrtopodium cardiochilum possui pseudobulbos fusiformes de 30 a 60 cm de altura e inflorescência simples ou ramificada. As flores, de aproximadamente 3,5 cm de diâmetro, são arredondadas e amarelas. Os lobos laterais, quando desmembrados e colocados em plano horizontal são voltados para baixo e levemente falciformes. O calo do labelo é composto de crenulações longitudinais com alguns calos papiliformes (Menezes, 2000).

Segundo Barros et al. (2003), espécies do gênero *Cyrtopodium* têm sido confundidas, devido às suas semelhanças, incluindo *C. cardiochilum*, *C. glutiniferum*, *C. andersonii*, e *C. paranaenses*, tornando-se a taxonomia do grupo algo confusa.

As principais diferenças entre as três espécies estão nos respectivos labelos florais (Menezes, 1995). *Cyrtopodium andersonii* apresenta um labelo tendo o mesmo comprimento das sépalas laterais, de âmbito mais largo do que longo quando distendido, séssil ou subséssil com base truncada e lobos laterais curtos. Já as flores do *C. paranaense* são similares àquelas do *C. andersonii*, mas apresentam um calo labelar verrucoso-rugoso de cor alaranjada-avermelhada característico da espécie. *C. cardiochilum* apresenta um labelo séssil cordiforme na parte sob a divisão dos lobos, podendo este ser arredondado ou triangular. A forma inferior do labelo lembra um coração e é a origem do seu nome (Menezes, 1995).

Em estudo realizado por Barreto e Parente (2006) foi demontrado o efeito terapêutico do extrato de bulbos desta espécie. Além disto, estes autores caracterizaram quimicamente o polissacarídeo presente nos extratos obtidos de *C.*

cardiochilum e que é a substância com propriedades terapêuticas produzidas por esta espécie.

Há considerável expectativa sobre o potencial do cultivo desta espécie para a produção de extratos para uso cosmético e farmacêutico (Barreto & Parente, 2006).

No entanto, desde cedo foi possível reconhecer como um aspecto limitante para o aproveitamento de *C. cardiochilum* como fonte de novos produtos de aplicação farmacêutica e cosmética, o completo desconhecimento agronômico sobre esta espécie. Informações sobre a obtenção de material propagativo em quantidade e qualidade apropriadas, as condições requeridas para o cultivo da planta, o conhecimento sobre doenças e pragas que afetam esta espécie, dentre outros, são ainda uma incógnita.

Tendo em vista o claro potencial comercial e industrial da espécie *C. cardiochilum*, decorrente da descoberta da atividade farmacológica e cosmetológica dos extratos obtidos desta espécie, e a mencionada ausência de informações na literatura a respeito dos aspectos fitotécnicos e fitopatológicos desta espécie, elegeu-se como objetivo do presente trabalho a geração de informações úteis à domesticação e manejo dessa espécie de orquídea.

DOMESTICAÇÃO DE PLANTAS

Os primeiros registros de domesticação de plantas datam de aproximadamente 8000 anos AC no Meio Oeste da Europa. Algumas espécies nativas do Brasil foram domesticadas pelas populações indígenas no passado. Exemplos relevantes são o abacaxizeiro, o amendoim, o cacaueiro, o cajueiro, a mandioca e o maracujazeiro. Recentemente, outras plantas são citadas como em fase de domesticação, como as frutíferas do cerrado, várias plantas medicinais e ornamentais, inclusive numerosas espécies de orquídeas (Jorge, 2004; Tombolato et al., 2004).

O processo de domesticação consiste na adaptação de espécies vindas do seu ambiente natural ou nativo a um ambiente criado pelo homem, visando promover condições favoráveis para seu desenvolvimento (Jorge, 2004). Embora no passado esse processo fosse lento e empírico e envolvesse um demorado processo de melhoramento massal das plantas alterando as formas cultivadas em comparação

com as formas de ocorrência espontânea, atualmente o homem conduz objetivamente um processo acelerado de domesticação com base experimental para muitas espécies que possuem reconhecido potencial econômico de exploração. Alguns fatores devem ser levados em conta em todo o processo de domesticação como, aspecto geográfico; agronômicos (clima, solo, melhoramento, diversidade genética); produção (plantio, colheita, propagação, nutrição, doenças); comércio (preços, tempo de produção e estabilidade); comercialização (público alvo, riscos e valores agregados); pesquisa (pesquisas atuais e interesse pela indústria) (Jorge, 2004).

Objetivos específicos:

1. - Esclarecimento de aspectos fitotécnicos

1.1 - Testar diferentes condições *in vitro* sobre a reprodução seminífera de *C. cardiochilum.*

1.2. - Estudar o efeito de substratos no desenvolvimento de *C. cardiochilum.*

1.3. - Avaliar o efeito de suprimento de nutrientes minerais no crescimento de *C. cardiochilum*.

2. - Esclarecimento de aspectos fitopatológicos

2.1. - Realizar o levantamento, a caracterização morfológica e molecular da micobiota fitopatogênica associada a *C. cardiochilum.*

2.2. - Analisar a patogenicidade de cada espécie fúngica potencialmente fitopatogênica.

2.3. - Avaliar a eficiência de fungicidas selecionados sobre os agentes de podridões de pseudobulbos *in vitro* e *in vivo.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altafin VL, Menezes MO, Pitombo LM, 2003. Semeadura *in vitro* de orquídeas para propagação massal. Fundação Pinhalense de Ensino. Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal - SP; (Boletim Técnico, n.7).

Araújo D, 2012. Brazilian orchids. Disponível em www.delfinadearaujo.com/generali/genebr.htm. Acesso em 15 de março de 2012.

Arditti J, 1992. Fundamentals of orchid biology. 1ªed. New York, John Wiley & Sons, 691 p.

Barreiro DN, Parente JP, Cardoso GL, Pereira NA, 2004. Contribuição ao estudo das atividades analgésicas e antiinflamatória do rabo-de-tatu, *Cyrtopodium andersonii* (Orchidaceae). Revista Brasileira de Farmácia, 85(3): 79-80.

Barreto DW, Parente JP, 2006. Chemical properties and biological activity of a polysaccharide from *Cyrtopodium cardiochilum*. Carbohydrate Polymers, 64 (2): 287-291.

Barros F, Batista JAB, Bianchetti LB, 2003. Epitypification and taxonomic elucidation of some Brazilian taxa of *Cyrtopodim* R. Br. (Orchidaceae), 52: 841-849.

Batista JAN, Bianchetti LB, 2005. Two new taxa in *Cyrtopodium* (Orchidaceae) from southern Brazil. Darwiniana, 43: 74-83.

Black PM, 1973. Orquídeas. 1ª ed. Hamlyn Plublishing Group Limited. Tradução Maria Adelaide Freitas Soares. Rio de Janeiro, Livro Técnico S/A, 128 p.

Campos DM, 1998. Orquídeas: Manual prático de cultura. Rio de Janeiro, Expressão e Cultura, 143 p.

Christenson E, 2004. Orchidaceae. In*:* SA. Mori; A. Henderson; DW. Stevenson & NH. Scott (eds.). Flowering plants of the neotropics. Princeton and Oxford, Princeton University Press, 465-468.

Curti GL, 2010-2011. Flores e plantas ornamentais - síntese anual da agricultura de Santa Catarina. Epagri- Cepa- Chapecó.

Dressler RL, 1993. Phylogeny and classification of the Orchid family. Portland, Oregon: Dioscorides Press, 314 p.

Farias LA, Ribeiro R, 2000. Pôster apresenta orquídeas na Mata Atlântica. Revista O Mundo das Orquídeas, 13: 43-45.

Faria RT, Assis AM, Carvalho JFRP, 2010. Cultivo de orquídeas. Editora Mecenas Ltda. Londrina, PR, 208 p.

Jorge, MHA, 2004. A domesticação de plantas nativas do Pantanal. Corumbá: Embrapa Pantanal, 20 p. (Documentos/Embrapa Pantanal, ISSN 1517-1973, 70).

Junqueira AH, Peetz MS, 2008. Mercado interno para os produtos da floricultura brasileira: característica, tendências e importância socioeconômica recente. Revista Brasileira de Horticultura Ornamental, 14(1): 37-52.

Junqueira AH, Peetz MS, 2011. Balanço do comércio exterior da floricultura brasileira. Disponível em www.hortica.com.br/news.php. Acesso em 23 de fevereiro de 2012.

Junqueira AH, 2011. Consumo de flores e plantas ornamentais: momento atual incentive planejamento para o futuro. Disponível em <www.jornalentreposto.com.br/ feira-de-flores/flores/3492-consumo-de-flores-e-plantas-ornamentais-no-brasil-momento-atual-incentiva-planejamento-para-o-futuro>. Acesso em 23 de fevereiro de 2012.

Marrara M; Brescansin RL, Zambom RI, Gagliardo,VC, De Moraes CP, Junior OR, 2007. Florística da família Orchidaceae em fragmento Florestal Semidecidual da fazenda Montevideo, município de Araras, SP, Brasil. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil. Caxambu, MG.

Menezes LC, 1987. *Cattleya labiata* Lindley. Orquideas brasileiras. 1ª ed. Rio de Janeiro, Expressão e Cultura, 112 p.

Menezes LC, 1995. *Cyrtopodium* in Brazil - part 2: The yellow-flowered species. American Orchid Society Bulletin, 248-251.

Menezes LC, 2000. Genus *Cyrtopodium*: espécies brasileiras. Brasília: Ed. IBAMA, 208 p.

Pio-Corrêa M, 1926. Dicionário das plantas úteis do Brasil, Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 6:, 156-157.

Souza VC, Lorenzi H, 2005. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira. Nova Odessa, Instituto Plantarum.

Suttleworth FS, ZIM HSE, Dillon GW, 1997. Orquídeas. Guia dos orquidófilos. 7. ed. Rio de Janeiro, Expressão e Cultura, 158 p.

Tombolato AFC, Veiga RF de Arruda, Barbosa W, Costa AA, Júnior RB, Pires EG, 2004. Domesticação e pré-melhoramento de plantas ornamentais. O Agronômico, 56(1): 12-14.

Vieira AC, 2000. Estudos farmacognósticos do Sumaré- *Cyrtopodium paranaense*. Schltr. (Orchidaceae). Revista Brasileira de Farmácia, 81(1-2): 11-13.

Watanabe D, 2002. Orquídeas: manual de cultivo. São Paulo, Associação Orquidófila de São Paulo, 296 p.

.

CAPÍTULO 1

Avaliação do efeito de substratos no cultivo de *Cyrtopodium cardiochilum* (Orchidaceae)

Brenda V. Lima, André F. Santos, Alessandra F. Fernandes, Cícero F. Guimarães, Robert W. Barreto

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes substratos no cultivo da espécie *Cyrtopodium cardiochilum*. As mudas foram cultivadas em vasos de polietileno, em casa de vegetação com 60% de luminosidade, obtida através de uma tela de polipropileno preta tipo "sombrite". Os tratamentos constituíram-se de brita de gnaisse (granulometria variando de 8-15 mm), argila expandida (15-22 mm de diâmetro), seixo rolado (8-15 mm), coco em cubos (coxim) e vermiculita. Foram analisadas também as combinações de brita e argila expandida, brita e seixo, argila expandida e seixo, na proporção 1:1 (v:v); brita, argila expandida e seixo na proporção 1:1:1 (v:v:v); e brita, argila expandida, seixo e vermiculita na proporção 1:1:1:1 (v:v:v:v). Após seis meses de instalação do experimento foram avaliadas as seguintes variáveis: altura das plantas, diâmetro dos pseudobulbos, número de folhas, produção de massa da matéria seca total (MST) e massa da matéria seca da parte aérea (MSPA) e do sistema radicular (MSR). Utilizou-se o delineamento experimental em blocos casualizados, composto por nove tratamentos e oito repetições. Não houve diferença entre os tratamentos para: altura de planta, número de folhas, diâmetro dos pseudobulbos e MSR. Para a MSPA e MST observou-se diferença entre os substratos, com destaque para o tratamento argila expandida + brita de gnaisse. Conclui-se que todos os substratos testados podem ser utilizados no cultivo de *C. cardiochilum*, destacando-se o substrato argila expandida + brita de gnaisse na proporção de 1:1(v/v).

1. INTRODUÇÃO

Cyrtopodium cardiochilum é uma orquídea brasileira de hábito terrestre ou rupestre, podendo estar distribuída nas regiões de Minas Gerais, Rio de Janeiro e na

região Centro-Oeste do Brasil (Menezes, 2000).

Desde que estudos demonstraram a atividade biológica de extratos do pseudobulbo de *C. cardiochilum* (Barreto & Parente, 2006) surgiu considerável interesse sobre a domesticação e cultivo desta espécie para a produção de extratos para uso cosmético e farmacêutico. Na ausência de informação publicada sobre o cultivo de *C. cardiochilum* faz-se necessária a realização de pesquisas sobre aspectos agronômicos básicos sobre essa potencial nova cultura. Dentre estes, está o esclarecimento sobre os melhores e mais adequados substratos para os futuros cultivos comerciais desta espécie de orquídea.

Para a produção comercial de orquídeas em vasos é necessário a utilização de um bom substrato. As principais características que se deve levar em conta na escolha de um substrato são: densidade, porosidade, disponibilidade de ar e água, condutividade elétrica e pH. Além dessas características, o substrato deve conter alto teor de fibras resistentes à decomposição e ser isento de patógenos, pragas e plantas daninhas. Outros fatores de grande relevância são o custo e a disponibilidade do material na região de culivo (Kämpf, 2000; Fernandez et al., 2006; Jasmim et al., 2006; Kämpf et al., 2006; Yamakami et al., 2006; Assis et al., 2008; Faria et al., 2010).

Os substratos utilizados no cultivo de orquídeas podem ser de origem vegetal como esfagno, turfa, xaxim, caroço de açaí, fibra de coco, casca de arroz carbonizada, casca de pinus, casca de eucalipto, bagaço de cana de açúcar e carvão vegetal, ou de origem mineral, como argila expandida, vermiculita, pedra brita, caco de telha e tijolo (Kämpf, 2000; Souza, 2003). A diversidade de substratos em potencial é muito grande, particularmente quando se considera a possibilidade de combiná-los. Considerando-se aspectos como o custo, disponibilidade e possível adaptação de *C. cardiochilum* aos substratos, analisando-se as condições em que a espécie ocorre na natureza, escolheram-se apenas alguns para a realização de avaliação preliminar.

Diante do exposto objetivou-se no presente trabalho, avaliar a eficácia de diferentes substratos no cultivo da orquídea *Cyrtopodium cardiochilum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no período de julho a dezembro de 2009, em casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa (UFV), localizada na região da Zona da Mata de Minas Gerais, com latitude 20° 45' 14" S e longitude 42° 52' 53".

Foram utilizadas mudas de aproximadamente 25 cm de altura, provenientes de uma área de cultivo experimental localizada em Nova Friburgo, RJ.

Para o cultivo de *C. cardiochilum* foram analisados os seguintes substratos: brita de gnaisse (granulometria variando de 8-15 mm), argila expandida (15-22 mm diam), seixo rolado (8-15 mm diam), coco em cubos (Padrão 11- Amafibra) e vermiculita. Foram analisadas também as combinações de brita de gnaisse e argila expandida, brita e seixo, argila expandida e seixo, na proporção 1:1 (v:v); brita, argila expandida e seixo na proporção 1:1:1 (v:v:v); e brita, argila expandida, seixo e vermiculita na proporção 1:1:1:1 (v:v:v:v). Como recipiente, foram utilizados vasos de polietileno de coloração preta, com as seguintes dimensões: 9,8 cm de altura e 12,0 cm de diâmetro de boca. Os vasos foram mantidos em mesas suspensas na casa de vegetação durante o período experimental.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação com 60% de retenção de luminosidade, obtida através de uma tela de polipropileno preta tipo "sombrite". Durante o período experimental, as plantas foram irrigadas manualmente e diariamente. A cada quinze dias foram realizadas adubações com 10 mL por planta do fertilizante B & G Orquídeas ® de formulação 05-06-07 (N-P-K) de concentração de 10 g L^{-1}.

Após seis meses de instalação do experimento foram avaliadas as seguintes variáveis: altura das plantas, diâmetro dos pseudobulbos, número de folhas, produção de massa de matéria seca total (MST) e massa de matéria seca da parte aérea (MSPA) e do sistema radicular (MSR). Com o auxílio de um paquímetro, na posição de maior medida, foi realizada a medição do diâmetro dos pseudobulbos, enquanto que para a avaliação da MSR e MSPA, as mesmas foram mantidas em estufa a temperatura de 68 ^{o} C por 72 h e, em seguida, medido a massa em balança analítica de precisão 0,001 g.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, composto por nove tratamentos e oito repetições, no qual cada repetição se constituiu de um vaso contendo uma planta de *C. cardiochilum*. Foi realizada análise de variância, e a comparação entre as médias feitas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos quanto à altura das plantas, número de folhas, diâmetro do pseudobulbo e massa de matéria seca de raiz (MSR) indicando que, para estas variáveis, todos os substratos proporcionaram condições semelhantes ao desenvolvimento para as plantas (Tabela 1). No entanto, para a massa de matéria seca de parte aérea (MSPA) o substrato argila expandida+ brita de gnaisse, foi o que apresentou maior média, diferindo do substrato coco em cubo (Tabela 1). E para a massa da matéria seca total (MST) também observou-se diferença entre os tratamentos ($p \leq 0,05$), uma vez que o substrato argila expandida + brita de gnaisse também apresentou maior média, diferindo dos substratos com seixo rolado, brita de gnaisse, seixo rolado + brita de gnaisse + argila expandida, seixo rolado + brita de gnaisse + argila expandida + vermiculita e casca de coco (Tabela 1). Esta composição argila expandida + brita de gnaisse na proporção de 1:1 (v/v) provavelmente proporcionou a melhor condição de manutenção do teor de umidade sem encharcamento do sistema radicular. No futuro, novas avaliações de substratos devem partir de modificações desta composição. Talvez com a adição de húmus, posto que em condições naturais *C. cardiochilum* ocorre sobre rochedos em pontos onde há acúmulo de húmus (Menezes, 2000). A brita de gnaisse apresenta coloração cinza e é comumente encontrada em lojas fornecedoras de materiais de construção e em pedreiras. Trata-se de um material barato e favorável para o enraizamento das plantas, sendo que também contribui para reter alguns sais dos adubos. Isso, por vezes provoca queimas em pontas das raízes de algumas espécies, além de pesarem mais que os compostos orgânicos e levarem à estrita dependência de adubação das plantas por não contribuírem para a nutrição das plantas (Neves, 2012). Por esse fato, o recomendado é que a brita seja utilizada em conjunto com outro substrato, o que garante um melhor desenvolvimento radicular das espécies.

A argila expandida é um material inorgânico, inerte que apresenta características semelhantes à das britas, com a diferença de ser um material mais leve, podendo ser usado tanto para o dreno no vaso quanto para composição de mistura de substratos (Oliveira, 2012).

Veloso et al. (2008) testaram como substratos para o cultivo de *C. cardiochilum*, casca de eucalipto, esfagno, fibra de coco e xaxim. E concluíram que a casca de eucalipto é uma alternativa para produção de mudas de *C. cardiochilum.* Esse substrato não foi testado no presente estudo, mas com base nos resultados encontrados, nota-se que seria interessante em futuras investigações comparar a casca de eucalipto com o substrato eleito no presente estudo (argila + brita na proporção de 1:1, v/v) assim como combinações destes substratos.

Outros substratos utilizados (argila expandida, brita gnaisse, coco em cubos, vermiculita e seixo rolado), utilizados sozinhos ou em misturas também possibilitaram um bom desenvolvimento de *C. cardiochilum*, não havendo qualquer substrato que possa ser contra-indicado para o cultivo desta espécie. Conclui-se que a espécie é bastante tolerante quanto ao tipo de substrato inerte utilizado. Nota-se que na lista de substratos utilizados houve a preocupação de se evitar substratos que retém muita umidade. É possível que problemas de crescimento tivessem ocorrido caso tivessem sido incluídos no estudo o cultivo em substratos menos porosos como o solo ou hidrófilos como o esfagno. Uma decisão sobre a utilização de qualquer um dos substratos isoladamente ou em mistura, conforme testado neste estudo, para o cultivo dessa orquídea, vai depender do custo e, ou disponibilidade da matéria prima na região de cultivo.

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que todos os substratos testados podem ser utilizados no cultivo de *C. cardiochilum*, destacando-se o substrato argila expandida + brita de gnaisse na proporção de 1:1(v/v).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Assis AM, Faria RT, Unemoto LK, Colombo LA, 2008. Cultivo de *Oncidium baueri* Lindley (Orchidaceae) em substratos a base de coco. Ciência e Agrotecnologia, 32: 981-985.

Barreto DW, Parente JP, 2006. Chemical properties and biological activity of a polysaccharide from *Cyrtopodium cardiochilum*. Carbohydrate Polymers, 64: 287-291.

Faria TF, Assis MA, Carvalho, JFPC, 2010. Cultivo de orquídeas. Editora Mecenas Ltda, 208 p.

Fernandes C, Corá JE, Braz LT, 2006. Desempenho de substratos no cultivo do tomateiro do grupo cereja. Horticultura Brasileira, 24: 42-46.

Jasmim JM, Toledo RRV, Carneiro LA, Mansur E, 2006. Fibra de coco e adubação foliar no crescimento e na nutrição de *Cryptanthus sinuosus*. Horticultura Brasileira, 24: 309-314.

Kämpf NA, 2000. Viveiros. In: Kampf AN. Produção comercial de plantas ornamentais. Guaíba: Agropecuária.

Kämpf NA, Takane RJ, Siqueira PTV, 2006. Floricultura: técnicas de preparo de substratos. Brasília, LK Editora e Comunicações.

Menezes LC, 2000. Genus *Cyrtopodium*: espécies brasileiras. Brasília: Ed. IBAMA.

Neves, JP, 2012. Muito além do xaxim. Disponível em <http:⁄⁄www.aorquidea.com.br>. Acesso em 20 de março de 2012.

Oliveira S, 2012. Plantasonya. Disponível em <http:⁄⁄ www. plantasonya.blogspot.com.br⁄como plantar orquídeas em vasos>.

Souza M, 2003. Muito além do xaxim. Natureza, 182(2): 32-37.

Veloso TGR, Pereira MC, Guimarães FAR, Torres DP, Oliveira SF, Pereira Ol, Bocayuva M, Kasuya MCM, 2008. Cultivo de *Cyrtopodium cardiochilum* em diferentes substratos. In: Fertbio, Londrina. Anais do FertBio.

Yamakami JK, Faria RT, Assis AM, Oliveira LVR, 2006. Cultivo de *Cattleya* Lindley (Orchidaceae) em substratos alternativos ao xaxim. Acta Scientiarum Agronomy, 28: 523-526.

5. FIGURAS E TABELAS

Tabela 1. Valores referentes à altura de plantas, número de folhas, diâmetro do pseudobulbo, massa da matéria seca de parte aérea (MSPA), massa da matéria seca de raiz (MSR) e massa da matéria seca total (MST) para os nove tratamentos utilizados no cultivo de *Cyrtopodium cardiochilum*, seis meses após o plantio.

Tipos de Substratos	Altura (cm)	Nº de Folhas	Diâmetro (cm)	MSPA (g)	MSR (g)	MST (g)
T1	29,88 a	7,75 a	15,96 a	7,84 ab	2,86 a	10,70 b
T2	29,13 a	8,31 a	16,00 a	9,98 ab	4,73 a	14,70 b
T3	31,25 a	8,38 a	16,25 a	10,54 ab	3,77 a	14,31 b
T4	31,50 a	8,56 a	16,59 a	13,31 a	4,84 a	18,14 a
T5	33,25 a	8,25 a	17,47 a	12,67 ab	4,94 a	17,61ab
T6	28,19 a	8,00 a	15,67 a	11,58 ab	4,08 a	15,66ab
T7	32,88 a	8,50 a	15,58 a	11,73 ab	4,01 a	15,74 ab
T8	33,50 a	7,75 a	16,99 a	9,10 ab	3,53 a	12,64 b
T9	25,38 a	8,00 a	16,61 a	6,11 b	3,10 a	9,20 b
CV(%)	18,08	15,76	16,78	38,67	43,45	35,00

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si, a 5% de significância pelo teste de Tukey; T1 – seixo rolado + brita + argila; T2 – seixo rolado; T3 - brita; T4 - argila + brita; T5 - argila + seixo rolado; T6 - brita + seixo rolado; T7 - argila; T8 – seixo rolado + brita + argila + vermiculita; e T9 – coco em cubo (Padrão 11- Amafibra).

CAPÍTULO 2

Demanda nutricional de *Cyrtopodium cardiochilum* (Orchidaceae) e efeito do suprimento nutricional sobre o seu crescimento

André F. Santos, Brenda V. Lima, Alessandra F. Fernandes, Cícero F. Guimarães, Robert W. Barreto

Resumo

Cyrtopodium cardiochilum é uma planta da família Orchidaceae nativa do Brasil e que ocorre apenas em populações espontâneas pequenas, comumente em paredões rochosos de difícil acesso. Existe interesse em domesticar esta espécie para a produção em larga escala e obtenção de extrato para uso cosmético e farmacêutico. Dentre os estudos necessários para esclarecer procedimentos de manejo apropriados para esta espécie estão os que envolvem a adubação das plantas. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um fertilizante multi-nutriente a partir da demanda nutricional de *C. cardiochilum* e testar o efeito das doses desse fertilizante sobre o crescimento de plantas de *C. cardiochilum*. A composição do fertilizante foi estabelecida a partir dos teores dos nutrientes encontrados nos pseudobulbos dessa espécie. Em seguida, montou-se um experimento no qual seis grupos de sete plantas de *C. cardiochilum,* com um porte de aproximadamente 30 cm foram tratadas com diferentes doses desse fertilizante (0; 28; 69; 124; 207 e 304 mg/vaso/semana). Após seis meses de instalação do experimento, foi avaliada a produção de matéria seca da parte aérea das plantas. E por meio de curva de dose-resposta, pode-se concluir que o regime de adubação que resultou na maior produção de biomassa foi 100,0 mg/vaso/semana.

1. INTRODUÇÃO

Cyrtopodium cardiochilum é uma espécie de planta pertencente à família Orchidaceae e que ocorre na natureza apenas em populações espontâneas pequenas, comumente em paredões rochosos de difícil acesso, nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e na região Centro-Oeste do Brasil (Menezes, 2000). Evidências sobre a atividade biológica de extratos obtidos de seus pseudobulbos indicam seu potencial

para uso na fabricação de cosméticos e fármacos (Barreto & Parente, 2006). Portanto, estudos têm sido realizados visando à domesticação dessa espécie. E como parte desse processo de domesticação, o conhecimento sobre adubação e a dose adequada de nutrientes requeridos pela planta para obter plantas de qualidade é de extrema importância.

As orquídeas tradicionalmente não eram adubadas pelos orquidófilos e nos orquidários comerciais, uma vez, que se acreditava que os nutrientes oriundos dos substratos eram suficientes para o seu crescimento e desenvolvimento (Rodrigues et al., 2010). Todavia, plantas bem nutridas apresentavam antecipação da fase adulta e aumento na resistência a pragas e doenças (Novais & Rodrigues, 2004).

Em condições de escassez de nutrientes, as plantas têm seu desenvolvimento reduzido e as reservas nutricionais são transferidas de partes velhas das plantas para as partes em formação sem ganho expressivo de biomassa. Por outro lado, quando adubações são efetuadas erradamente pode ocorrer desequilíbrio nutricional e as doses aplicadas em excesso podem causar fitotoxidez (Novais & Rodrigues, 2004). Em contrapartida, a falta de qualquer nutriente resultará em crescimento e desenvolvimento mais lento, além de deixar as plantas mais susceptíveis a doenças e pragas e, em situações mais extremas no aparecimento de sintomas visuais de deficiência (Marschner, 1995).

Para a produção de orquídeas em escala comercial, é recomendável a realização de pesquisas com o objetivo de otimizar a adubação, tornando-a mais eficientes e de custo mais baixo para os produtores (Bernati et al., 2004).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo desenvolver um fertilizante multi-nutriente a partir da demanda nutricional de *C. cardiochilum* e testar diferentes doses de nutrientes minerais, a fim de se determinar a dose ideal desse fertilizante para melhor crescimento de plantas de *C. cardiochilum.*

2. MATERIAL E MÉTODOS

Previamente à avaliação do efeito de suprimento de nutrientes minerais sobre o crescimento de *C. cardiochilum* foi feita uma avaliação da produção da matéria seca dos pseudobulbos dessas plantas e dos teores de N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Zn, Mn, B e Cu presentes nesse órgão. Para isso foram coletados pseudobulbos de oito plantas

de *C. cardiochilum* cultivadas em Nova Friburgo, RJ, e esses foram colocados em estufa de circulação forçada a temperatura de 68 ^{o} C até que fosse obtido um peso constante. Então, os pseudobulbos foram moídos e, assim, uma amostra de 0,5 g de cada pseudobulbo foi digerida em 9 mL de mistura de 3:1 de ácido nítrico e perclórico concentrados. O extrato dessa digestão foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL e seu volume completado com água destilada. Posteriormente, as concentrações dos elementos Ca, Mg, S, Fe, Zn, Mn, B e Cu, dessa solução foram quantificadas por espectrofotometria de emissão atômica em plasma induzido. O teor de P foi analisado por colorimetria, utilizando-se o método da vitamina C modificado por Braga e Defelipo (1974), a análise do teor de K foi feita por fotometria de chama. A determinação do N total foi feita pelo método Kjeldahl (Jackson, 1976).

Depois de calculados os teores médios desses nutrientes nos pseudobulbos, foi inferida a demanda nutricional anual média para a produção desse órgão, para isso considerou-se que as plantas emitem um pseudobulbo por ano em cada frente de crescimento, a produção de matéria seca (MS) por pseudobulbo e os teores nutricionais nesse órgão. Para isto foi utilizada a seguinte equação:

$$DN_j = (TN_j \times MS) / f) \qquad **(1)$$

**Adaptado por Santos (2009)

em que DN_j é a demanda do nutriente j (mg ano^{-1}), TN_j é o teor de do nutriente j nos tecidos do pseudobulbo (g kg^{-1} e mg kg^{-1} para macro e micronutrientes, respectivamente), *MS* é a produção de matéria seca do pseudobulbo (g ano^{-1}) e f é o fator de correção (1 e 1000 para macro e micronutrientes, respectivamente). Então, essa demanda foi dividida pelo número de semanas no ano, sugerindo-se, portanto, uma demanda semanal. Em seguida, foi formulado um fertilizante com teores dos nutrientes na mesma proporção em que esses são demandados.

Para se estabelecer o quanto de nutriente deve ser suprido para atender a demanda das plantas de *C. cardiochilum* foi montado um experimento variando a dose do fertilizante: 0; 28; 69; 124; 207 e 304 mg/vaso/semana. Essas doses representaram, respectivamente, 0; 0,28; 0,70; 1,26; 2,10 e 3,08 vezes a demanda nutricional estimada.

O experimento foi conduzido no período de julho a dezembro de 2009, em casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, com latitude 20° 45’ 14” S e longitude 42° 52’ 53”.

Foram utilizadas mudas de aproximadamente 30 cm de altura, provenientes de uma área de cultivo experimental localizada em Nova Friburgo, RJ.

Como recipiente, foram utilizados vasos de polietileno de coloração preta, com as seguintes dimensões: 9,8 cm de altura e 12,0 cm de diâmetro de boca. Os vasos foram mantidos em mesas suspensas na casa de vegetação durante o experimento.

Após seis meses de instalação do experimento a variável avaliada foi a produção de matéria seca da parte aérea. As plantas foram retiradas do substrato (argila expandida + brita de gnaisse), e sua parte aérea lavada em água corrente, identificada de acordo com o tratamento e colocada em cima de jornais para secarem e depois foram mantidas em estufa de circulação forçada a 68 ^{o} C por 72 h e, em seguida, a parte aérea das plantas de cada tratamento foram pesadas em balança semi analítica.

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados com 6 tratamentos e 7 repetições, cada repetição consistindo de um vaso contendo uma planta de *C. cardiochilum*. Sendo que cada tratamento foi referido a uma dose utilizada.

Após a análise de variância dos dados referente à massa de matéria seca da parte aérea foi ajustada uma curva de dose-resposta com a variável avaliada em função das doses do fertilizante.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção anual de matéria seca (MS) acumulada no pseudobulbo, estimada a partir das plantas adultas, foi de 100,0 g/(pseudobulbo × ano). Os teores médios, a demanda dos nutrientes N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Zn, Mn, B e Cu pelo pseudobulbo, os teores desses nutrientes no fertilizante utilizado neste trabalho e as fontes dos nutrientes utilizadas são apresentados nas Tabelas 1 e 2.

A dose do fertilizante, proposto neste trabalho para suprir as demandas nutricionais de *C. cardiochilum*, exerceu efeitos evidentes sobre o crescimento dessa

orquídea (Figura 1 e 2), sendo que os efeitos raiz quadrático, positivo, e linear negativo, foram altamente significativos (Figura 1), evidenciando o aumento na dose do fertilizante até a máxima produção de MS de plantas. O modelo raiz quadrático, é um dos modelos que mais se aproxima com o que acontece na natureza. Neste, teve-se um ponto de máximo, obtido quando se utilizou uma dose de 100,0 mg/vaso/semana, que resultou em uma produção máxima de biomassa das plantas, e a partir desse ponto, quando se utilizou dosagens superiores a 100,0 mg/vaso/semana, observou-se um declínio na produção de biomassa pelas plantas.

Na literatura não existem estudos sobre a nutrição mineral para plantas do gênero *Cyrtopodium*, sendo este o primeiro trabalho sobre nutrição mineral pra esse gênero. No entanto, existem vários trabalhos de fertilização e nutrição de orquídeas referentes aos gêneros *Cattleya*, *Dendrobium*, *Epidendrum* e *Phalaenopsis*. A maioria dos trabalhos se refere o gênero *Phalaenopsis*, tendo em vista a sua grande demanda no mercado e por ser nutricionalmente mais exigente quando comparado com outros gêneros de crescimento e desenvolvimento mais lentos, como *Cattleya* e *Laelia* (Demundo, 2004; Rodrigues et al., 2010). Ochsenbauer (1997) observou um excelente crescimento de *Phalaenopsis* com aplicações semanais de 0,4-1,5 g L^{-1} de um fertilizante 16-9-22. Wang (1996) observou que híbridos de *Phalaenopsis* cultivados em *Sphagnum* apresentaram maior crescimento vegetativo, independentemente do fertilizante usado, na concentração de 200 mg L^{-1}. E Amaral et al. (2010) concluíram que a dose de 1,5 g L^{-1} do adubo mineral Peters® aplicada na adubação de *Phalaenopsis* promoveu aumento linear no número de folhas, área foliar, massa seca das folhas e massa seca total.

Os resultados obtidos com esse trabalho resultaram em informação especialmente útil para viabilizar a produção de *C. cardiochilum* nos cultivos com fins comercias.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaral TL, Jasmim JM, Araújo JSP, Thiébaut JTL, Coelho FC, Freitas CB, 2010. Adubação de orquídeas em substratos com fibra de coco. Ciência e Agrotecnologia, 34(1): 11-19.

Amberger-Ochsenbauer S, 1997. Nutrition and post-production performance of *Phalaenopsis* pot plants. Acta Horticulturae, 450: 105-112.

Barreto DW, Parente JP, 2006. Chemical properties and biological activity of a polysaccharide from *Cyrtopodium cardiochilum*. Carbohydrate Polymers, 64: 287-291.

Bernati AC, Faria RT, Carvalho JFRP, Unemoto LK, Assis AM de, 2004. Desenvolvimento vegetativo de plantas de *Dendrobium nobile* Lind. fertirrigadas com diferentes concentrações da solução nutritiva de sarruge. Semina: Ciências Agrárias, 25(1): 13-20.

Braga JM, Defelipo, BV, 1974. Determinação espectofotométrica de fósforo em extratos de solos e planta. Revista Ceres, 21 (113): 73-85.

Demundo, F.A, 2004. *Phalaenopsis*. O mundo das orquídeas, 35: 6-10.

Jackson ML, 1976. Análisis químico de suelos. 3 edicón. Barcelona. Ediciones Omega S. A, 662 p.

Marschner H, 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press Inc, London, 889 p.

Menezes LC, 2000. Genus *Cyrtopodium*: espécies brasileiras. Brasília: Ed. IBAMA, 208 p.

Novais RF, Rodrigues DT, 2004. Nutrição e fertilização de orquídeas. In: Congresso Brasileiro de Botânica. Viçosa, MG. Simpósios, Palestras e Mesas Redondas. Sociedade Botânica do Brasil.

Rodrigues DT, Novais RF, Alvarez VH, Dias JMM, Villani EM de A, 2010. Orchids growth and nutrition in response to mineral and organic fertilizers. Revista Brasileira de Ciência do Solo, 34: 1609–1616.

Santos AF, 2009. Composição mineral do meio de cultura para crescimento *in vitro* de *Cattleya walkeriana.* Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 24 p. (Dissertação de Mestrado).

Wang YT, 1996. Effects of six fertilizers on vegetative growth and flowering of *Phalaenopsis* orchids. Scientia Horticulturae, Amsterdam, 65: 191-197.

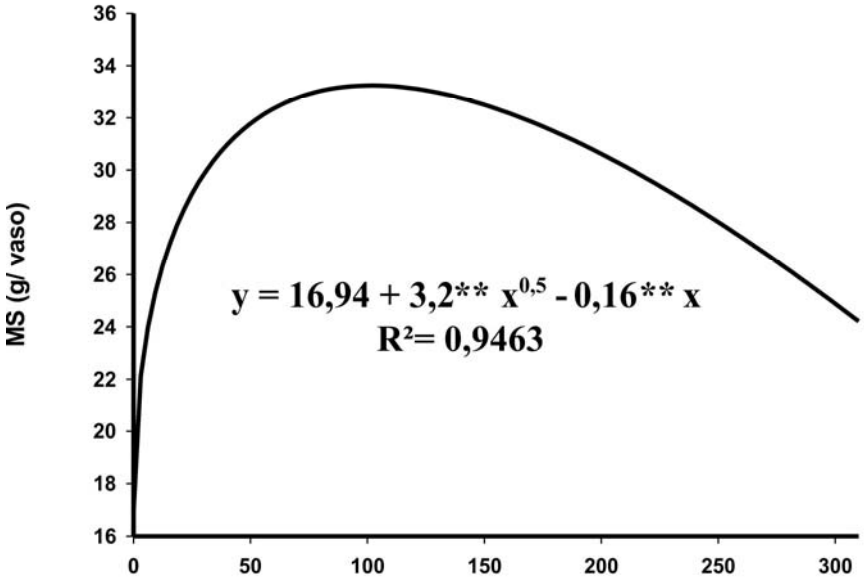
5. FIGURAS E TABELAS

Tabela 1. Teores médios, demanda anual de nutrientes por pseudobulbo de *Cyrtopodium cardiochilum* e teores de nutrientes no fertilizante desenvolvido a partir dessas demandas.

	N	P	S	K	Ca	Mg	Fe	Zn	Cu	Mn	B	Mo
	g kg^{-1}						mg kg^{-1}					
Teor	4,00	0,48	0,60	6,00	5,50	0,50	15,00	4,00	5,00	32,00	14,00	0,70
	mg/pseudobulbo/ano											
Demanda	400	48	60	600	550	50	1,50	0,40	0,50	3,20	1,40	0,07
	dag kg^{-1}											
Fertilizante	7,91	0,95	1,19	11,87	10,88	0,99	0,0297	0,0079	0,0099	0,0633	0,0277	0,0014

Tabela 2. Fonte dos nutrientes do fertilizante e suas concentrações.

Fontes	Concentração (g/L)	Conc./pureza (g/L)
Macro	g/L	g/L
$Ca(NO_3)_2.\ 4H_2O$	29,0835	29,6770
$MgSO_4.7H_2O$	4,5504	4,5733
KNO_3	1,0083	1,0185
KCl	8,4869	8,5124
KH_2PO_4	1,8926	1,9117
Micro	mg/L	mg/L
H_3BO_3	215,6	216,7
CuCl	21,0	23,3
$MnCl_2.H_2O$	310,4	310,4
$ZnCl_2$	22,4	23,3
Na_2.EDTA	269,2	271,9
$FeSO_4.7H_2O$	201,0	203,1
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	3,47	4,2



** siginificativo a 1 % pelo teste de F.

Figura 1. Efeito da dose do fertilizante sobre a produção de matéria seca (MS) de plantas de *Cyrtopodium cardiochilum*.

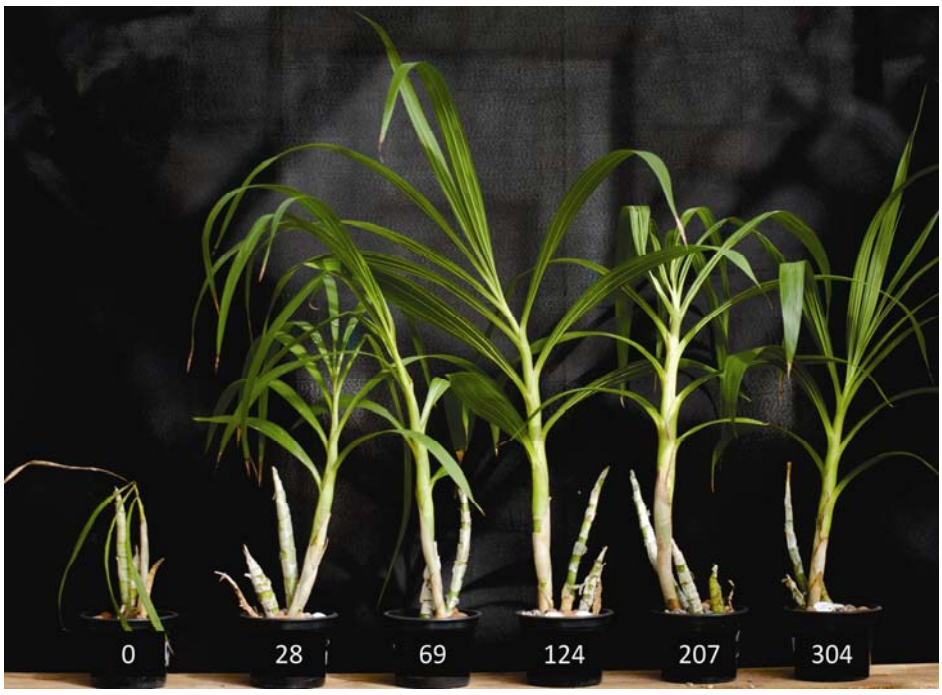


Figura 2. Crescimento de plantas de *Cyrtopodium cardiochilum* em função da dose de fertilizante (mg/vaso/semana).

CAPÍTULO 3

Cultivo seminífero *in vitro* de *Cyrtopodium cardiochilum:* Influência de concentrações de carvão ativado, sacarose e sais do meio Suprimento (S)

Brenda V. Lima, André F. Santos, Cícero F. Guimarães, Alessandra F. Fernandez, Eliane M. Inokuti, Robert W. Barreto

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar diferentes combinações de carvão ativado, sacarose e sais do meio de cultura Suprimento (S) com a finalidade de se determinar a composição mais favorável para a produção de plântulas de *C. cardiochilum.* Um experimento foi conduzido em esquema de delineamento de blocos casualizados com 22 tratamentos e 10 repetições, onde cada tratamento foi representado por uma combinação de teores de carvão ativado, sacarose e sais do meio de cultura Suprimento (S). Após seis meses de cultivo avaliaram-se as variáveis matéria seca de calos e plântulas. A elaboração de uma curva de dose-resposta indicou que a máxima produção de matéria seca de calos seria obtida com a utilização de 0,8 g L^{-1}, 70 g L^{-1} e 8 g L^{-1} de carvão ativado, sacarose e sais do meio S respectivamente. No entanto, uma curva de dose-resposta para plântulas indicou que concentrações de 3,0 g L^{-1}, 33 g L^{-1} e 3,2 g L^{-1} de carvão ativado, sacarose e sais do meio S, respectivamente foram as mais apropriadas para a produção de plântulas de *C. cardiochilum*. Assim, para a produção seminífera de plântulas de *C. cardiochilum in vitro*, é recomendada a adição de 3,0, 33, e 3,2 g L^{-1} de carvão ativado, sacarose, sais do meio S ao meio de cultura, respectivamente.

1. INTRODUÇÃO

Cyrtopodium cardiochilum (Orchidaceae), popularmente conhecida como ‘sumaré-do-mato’, é uma orquídea brasileira de hábito terrestre ou rupestre, que ocorre na natureza em Minas Gerais, Rio de Janeiro e na região Centro-Oeste do Brasil (Menezes, 2000). Embora a planta produza inflorescências vistosas ela não é cultivada comercialmente como ornamental.

Em estudo realizado por Barreto & Parente (2006) foi demontrado o efeito terapêutico do extrato de bulbos desta espécie. Além disto, estes autores caracterizaram quimicamente o polissacarídeo presente nos extratos obtidos de *C. cardiochilum* e que é a substância com propriedades terapêuticas produzidas por esta espécie. Estes estudos geraram interesse pela domesticação e cultivo intensivo dessa espécie para a produção de extratos para uso cosméstico e farmacêutico. Todavia, um dos aspectos limitantes para a viabilização de *C. cardiochilum* como uma nova cultura de exploração econômica é a obtenção de material propagativo em quantidade suficiente. Assim como outras espécies de orquídeas, o crescimento de *C. cardiochilum* é lento e o fornecimento de mudas é restrito a poucos orquidários e em quantidades pequenas e custo elevado. A obtenção de mudas vegetativas a partir de populações naturais da planta é difícil pela dificuldade de acesso aos locais de ocorrência (frequentemente paredões rochosos úmidos), além de ilegal. Logo, uma fonte alternativa de material propagativo é fundamental para a superação desta limitação. O emprego do processo de multiplicação seminífera *in vitro* é um dos processos utilizados para multiplicação de espécies de orquídeas ornamentais de gêneros tradicionais no comércio, permitindo produzir em condições controladas grande quantidade de mudas de alta qualidade, em curto espaço de tempo (Stancato & Faria, 1996; Grattapaglia & Machado, 1998).

Na propagação *in vitro* de orquídeas são utilizados meios de cultura específicos, dependendo da espécie, com a finalidade de proporcionar melhores condições de crescimento. Contudo, para aumentar a eficácia e rapidez na produção de orquídeas, vários elementos, tais como vitaminas, aminoácidos, aditivos orgânicos (água de coco, banana, tomate, etc), sacarose, carvão ativado e sais minerais podem ser adicionados ao meio de cultivo (Arditti & Ernst, 1992).

Não existe um meio de cultura "universal" para orquídeas com balanço adequado para se cultivar quaisquer orquídeas *in vitro*. Inclusive, ainda hoje, não foi esclarecida a razão pelas quais certas combinações de elementos que compõem o meio de cultivo têm dado resultados satisfatórios para uma espécie, enquanto que para outras não há bons resultados (Ventura, 2002).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes combinações dos principais componentes de meios para cultivo *in vitro* de orquídeas - carvão ativado, sacarose e sais do meio S (Santos, 2009) com a finalidade de se

determinar a composição mais favorável para a produção de plântulas de *C. cardiochilum.*

2. MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. Os meios de cultura testados para fins de cultivo seminífero de *C. cardiochilum* foram baseados em variações de teores dos componentes descritos para o meio de cultura Suprimento (S) desenvolvido por Santos (2009) (Tabela 1). E os componentes dos sais do meio S estão listados na Tabela 2. Para a elaboração do meio, o pH foi ajustado em 5,7 ± 0,1, posteriormente distribuídos 40 mL de meio de cultura em frascos de vidro de 350 mL. Após a distribuição dos meios, os frascos foram fechados com tampas transparentes de polipropileno e esterilizados em autoclave a 121° C e pressão de 1,05 kg cm^{-2}, durante 20 min.

Para a semeadura foram utilizadas sementes maduras recém colhidas de cápsulas abertas de plantas de *C. cardiochilum* originárias de plantio experimental em Nova Friburgo, estado do Rio de Janeiro. A desinfestação e o semeio foram realizadas em uma câmara de fluxo laminar. As sementes foram retiradas com uma espátula esterilizada do interior das cápsulas. Vinte miligramas das sementes foram colocados em uma seringa descartável e esterilizada, e em seguida adicionou-se 20 mL de álcool 70%, esta suspensão permaneceu sob agitação manual por 1 min. Após esse período, com o êmbolo da seringa foi descartado o álcool e succionou-se uma solução de 0,25% de hipoclorito de sódio, deixando-se as sementes imersas nesta solução por 15 min sob agitação manual constante. Então, descartou-se a solução de hipoclorito de sódio (conforme descrito acima) e succionou-se 20 mL de água deionizada esterilizada. Posteriormente, a suspensão de sementes foi transferida para um becker esterilizado, completando-se o volume para 60 mL com água deionizada esterilizada. Essa suspensão de sementes foi mantida sobre agitação constante por meio de um agitador magnético, a fim de manter sua uniformidade. Com auxílio de agulha (1,60 x 40 mm) acoplada a uma seringa descartável e esterilizada de 20 mL, succionaram-se 20 mL da suspensão de sementes e injetaram-se três gotas da suspensão em cada um de 220 frascos de vidro esterilizados de 350 mL contendo,

cada um, 40 mL de cada meio de cultura a ser avaliado (Rodrigues et al., 2011). Os mesmos foram fechados com tampa transparente de polipropileno e as bordas protegidas com filme transparente de PVC (Rolopac®).

Os frascos semeados foram colocados em sala de cultivo, a temperatura de 25 ± 2 C, fotoperíodo de 16 h luz e irradiância média de 48 μmol m^{-2} s^{-1}, fornecidas por lâmpadas fluorescentes (Osram®, luz do dia, 40 W).

Durante o período experimental foi realizado uma vez por semana, um sistema de rodízio com todos os tratamentos, com a finalidade de eliminar interferências externas, mantendo assim todos os tratamentos sob condições semelhantes.

O experimento foi instalado em delineamento de bloco casualizados com 22 tratamentos e 10 repetições, onde cada tratamento foi representado por uma combinação de carvão ativado, sacarose e sais do meio S (Tabela 3). As vinte e duas combinações entre carvão ativado, sacarose e sais do meio S, foram obtidas de acordo com a matriz experimental Box Berard aumentada 3 modificada por Leite (1984). Cujo número é definido pela expressão: $2^k + 2k + 2k + 1 + 1$, em que k é o número de fatores envolvidos. Neste trabalho, o k foi igual a 3, referente aos fatores carvão ativado, sacarose e sais do meio S, resultando, dessa forma, nas vinte e duas combinações. Sendo que as concentrações de 1,5 g L^{-1} de carvão ativado, 40 g L^{-1} de sacarose e 4,40 g L^{-1} de sais do meio S foi utilizado como referência, ou seja, como ponto de partida para a elaboração das outras concentrações.

Decorridos seis meses de cultivo, avaliaram-se as variáveis massa da matéria seca de calos e de plântulas. Após a análise de variância foi ajustada uma curva de dose-resposta para cada variável em função da concentração de carvão ativado, sacarose e sais do meio S.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação significativa a 1 e 5 % de significância pelo teste F para os três componentes do meio de cultura avaliados (carvão ativado, sacarose e sais do meio S) e entre as suas concentrações. Ou seja, a resposta morfogênica dos explantes (sementes) foi influenciada pela concentração de carvão ativado, sacarose e de sais do meio S e pelas interações entre esses componentes do meio (Figuras 1, 2 e 3). A

partir de uma curva de dose-resposta pode-se observar que a máxima produção de massa de matéria seca de calos foi obtida com a utilização de 0,8 g L^{-1}, 70 g L^{-1}, 8 g L^{-1} de carvão ativado, sacarose e sais do meio S respectivamente (Figura 1). Para se estabelecer as doses de carvão ativado, sacarose e sais que teriam levado à máxima produção de massa de matéria seca de plântulas de *C. cardiochilum,* utilizou-se uma curva de dose-resposta para a produção de massa da matéria seca de plântulas. E as doses que proporcionaram a máxima produção de plântulas foram: 3,0; 33 e 3,2 g L^{-1} de carvão ativado, sacarose e sais do meio S, respectivamente (Figura 2).

Entre os efeitos proporcionados pela adição de 3,0 g L^{-1} de carvão ativado ao meio de cultura está o favorecimento do enraizamento, a adsorção de substâncias inibitórias produzidas pelo próprio meio ou explante e a liberação de substâncias naturalmente presentes no carvão que beneficiam o crescimento *in vitro* (Pan & Staden, 1998). Ainda segundo esses autores a adição de carvão ativado ao meio de cultura pode promover ou inibir o crescimento *in vitro*, dependendo da espécie e do tipo de tecido utilizado, além da fonte do carvão, pureza e grau de ativação. Em estudo realizado por Moraes et al. (2005) sobre o efeito da atividade do carvão ativado na propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras, verificaram que a a adição de carvão ativado ao meio melhorou a qualidade das plantas *in vitro* e aumentou a capacidade de sobrevivência pós-transplantio para as orquídeas *Laelia flava, Miltonia flavescens* e *Oncidium trulliferum.* Faria et al. (2002) ao estudarem a propagaçaõ *in vitro* de *Cattleya walkeriana,* concluíram que a adição de 2,0 g L^{-1} de carvão ativado ao meio de cultura foi benéfica para a propagação da espécie *in vitro*. No entanto, Ventura (2007) ao estudar o efeito do carvão ativado na germinação, crescimento e desenvolvimento de protocormos de orquídeas *in vitro*, concluiu que as concentrações de carvão ativado testadas não apresentaram efeito positivo para o crescimento e desenvolvimento de protocormos.

A concentração de 33 g L^{-1} de sacarose capaz de promover a máxima produção de plântulas está bem próxima da concentração que geralmente é utilizada nos meios de multiplicação *in vitro* que varia de 2 a 3%. Todavia, apesar da sacarose ser o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos, proporcionando as mais altas taxas de crescimento da maioria das espécies, a concentração ótima de sacarose para induzir morfogênese ou crescimento difere para espécies diferentes e pode depender dos outros constituintes do meio de cultura (Caldas et al., 1990, Neto & Otoni, 2003).

Em estudos realizados por Rego-Oliveira et al. (2003) foi demonstrado que a concentração de 60 g L^{-1} de sacarose foi a mais eficiente para o crescimento de *Oncidium varicosum*. Dinarti et al. (2009) concluiram que é possível utilizar tanto a concentração convencional de sacarose (30 g L^{-1}) como a metade dessa no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana.* Pivetta et al. (2010) ao estudarem o crescimento *in vitro* de *Caularthron bicornutum* em diferentes concentrações de sacarose, concluíram que concentrações de 13 a 29 g L^{-1} proporcionou as maiores médias para o número de raízes, comprimento de raízes e comprimento da parte aérea. E de acordo com Serret et al. (1997) foi possível observar que durante o estágio de multiplicação de *Gardenia jasminoides*, as altas concentrações de sacarose no meio de cultura tiveram um efeito positivo no peso final das plântulas.

Com relação aos sais, observou-se que mesmo quando presente em baixas concentrações (3,2 g L^{-1}), os mesmos foram capazes de promover a máxima produção de plântulas, evidenciando assim, que a concentração de sais no meio de cultivo tem influência direta no crescimento de orquídeas *in vitro*, seja pela falta ou pelo excesso (Park et al., 2004; Figueiredo et al., 2007; Stancato et al., 2008). Rodriguez et al. (2012) ao estudar o cultivo de plântulas de *Cattleya walkeriana*, concluíram que altas concentrações (10 g L^{-1}) de sais no meio de cultura geram prejuízos ao crescimento de plantas dessa espécie de orquídea *in vitro*.

Com base nos resultados obtidos no trabalho aqui apresentado foi possível concluir que um meio apropriado para a produção seminífera *in vitro* de *C. cardiochilum* para a produção de plântulas deve conter 3,0 g L^{-1} de carvão ativado, 33 g L^{-1} de sacarose e 3,2 g L^{-1} de sais do meio S ao meio de cultura, respectivamente.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arditti J, Ernst R, 1992. Micropropagation of orchids. 1ª ed. New York, Chinchester, Brisbane, Toronto, Singapore, John Wiley & Sons, 682 p.

Barreto DW, Parente JP, 2006. Chemical properties and biological activity of a polysaccharide from *Cyrtopodium cardiochilum*, Carbohydrate Polymers, 64: 287-291.

Caldas LS, Haridassan P, Ferreira ME, 1990. Meios nutritivos. In: Torres, AC, Caldas LS. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/ EMBRAPA, 37-63.

Dignart SL, Castro EM, Pasqual M, Ferronato A, Braga FT, Paiva R, 2009. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. Ciência e Agrotecnologia, 33: 780-787.

Faria RT; Santiago DC; Saridakis DP; Albino UB; Araújo R, 2002. Preservation of brasilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using *in vitro* propagation. Crop Breeding and Applied Biotechnology, 2: 489-492.

Figueiredo MA, Santos FMS, Silva JOC, Costa FHS & Pasqual M, 2007. Variações no meio de cultura sobre o crescimento *in vitro* em híbridos de orquídea. Revista Brasileira de Biociências, 5: 294-296.

Grattapaglia D, Machado MA, 1998. Micropropagação. In. Torres AC, Caldas, LS, Buso JA (Eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília, DF: Embrapa-SPI, 183-260, 509 p.

Leite RA, 1984. Uso de matrizes experimentais e de modelos estatísticos no estudo do equilíbrio fósforo-enxofre na cultura de soja em amostras de dois Latossolos de Minas Gerais. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 87 p. (Dissertação de Mestrado).

Menezes LC, 2000. Genus *Cyrtopodium*: espécies brasileiras. Brasília: Ed. IBAMA, 208 p.

Moraes L, Faria RT, Cuquel FL, 2005. Activated charcoal for *in vitro* propagation of brazilian orchids. Acta Horticulturae, 683: 383-390.

Neto VBP, Otoni WC, 2003. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? Scientia Horticulturae, 97: 193–202.

Pan MJ, Staden JV, 1998. The use of charcoal *in vitro* culture – a review. Plant Growth Regulation, 26: 155-163.

Park SW, Jeon JH, Kim HS, Parky M, Aswath C & Joung H, 2004. Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. Science Horticulturae, 99: 199-205.

Pivetta KFL, Martins TA, Junior RFG, Gimenes R, Faria RT, Takane RJ, 2010. Crescimento *in vitro* de plântulas de *Caularthron bicornutum* em diferentes concentrações de sacarose. Ciência Rural, 40(9): 1897-1902.

Rego-Oliveira LV, Faria RT, Fonseca ICB, Stancato C, 2003. Influência da fonte e concentração de carboidrato no crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro* de *Oncidium varicosum* Lindl. Semina: Ciências Agrárias, 24: 265-272.

Rodrigues DT, Novais RF, Alvarez V. VH, Dias JMM, Villani EMA, Otoni WC, 2011. *In vitro* germination of *Cattleya intermedia* R. Graham by means of chemical disinfection and without laminar flow. Propagation of Ornamental Plants, 11(3): 119-124.

Rodrigues DT, Novais RF, Alvarez V. VH, Dias JMM, Otoni WC, Villani EMA, 2012. Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea em meios com diferentes concentrações de fertilizante mineral. Revista Ceres, 59(1): 9-15.

Santos AF, 2009. Composição mineral do meio de cultura para crescimento *in vitro* de *Cattleya walkeriana.* Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 24 p. (Dissertação de Mestrado).

Serret MD, Trillas MI, Matas J, Araus JL, 1997. The effect of different closure types, light, and sucrose concentration on carbon isotope composition and growth of *Gardenia jasminoides* plantlets during the micropropagation and subsequent acclimation *ex vitro*. Plant Cell Tissue and Organ, Dordrecht, 47: 217-230.

Stancato GC, Faria RT, 1996. *In vitro* growth and mineral nutrition of the lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem (Orchidaceae) I: Effects of macro and microelements. Lindleyana, 11(1): 41-43.

Stancato GC, Abreu MF, Furlani AMC, 2008. Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. Bragantia, 67: 51-57.

Ventura G.M, 2002. Propagação *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya.* Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 147 p.(Dissertação de Mestrado)

Ventura GM, 2007. Propagação *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya*, em diferentes meios de cultura e irradiância. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 110 p.(Tese de Doutorado)

5. FIGURAS E TABELAS

Tabela 1. Composição e concentração dos nutrientes do meio de cultura Suprimento (S)

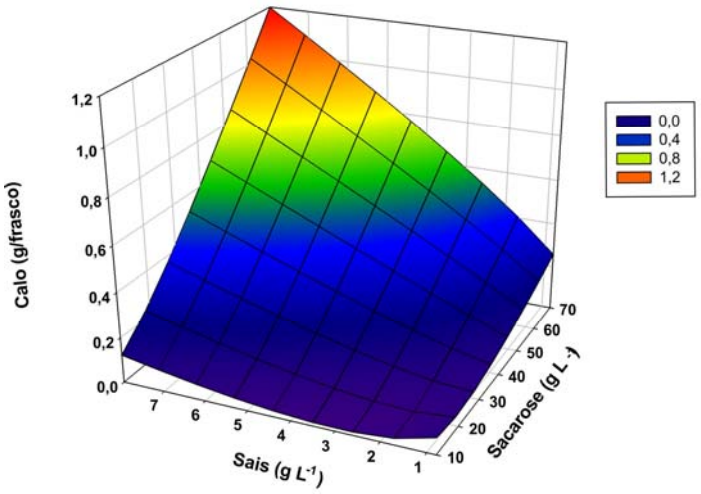
Nutriente	**meio S (**mg L^{-1})
N	328
P	150
K	950
Ca	197
Mg	50
S	113
Fe	6,56
Zn	2,00
Mn	3,28
B	2,19
Cu	0,250
Mo	0,044

Tabela 2. Concentração dos sais no meio de cultura Suprimento (S)

Sais	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	$MgSO_4.7H_2O$	KNO_3	KCl	K_2SO_4	$NH_4H_2PO_4$	H_3BO_3	$MnSO_4.4H_2O$	$ZnSO_4.7H_2O$	$FeSO_4.7H_2O$	$CuSO_4.5H_2O$	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$
	mg L^{-1}								µg L^{-1}			
Concentração	1160	510	886	976	214	557	10,0	10,7	7,0	26,1	786	64,4

Tabela 3. Composição do meio de cultura testado para o cultivo seminífero de *Cyrtopodium cardiochilum* com diferentes combinações de sacarose, carvão ativado e sais do meio Suprimento (S).

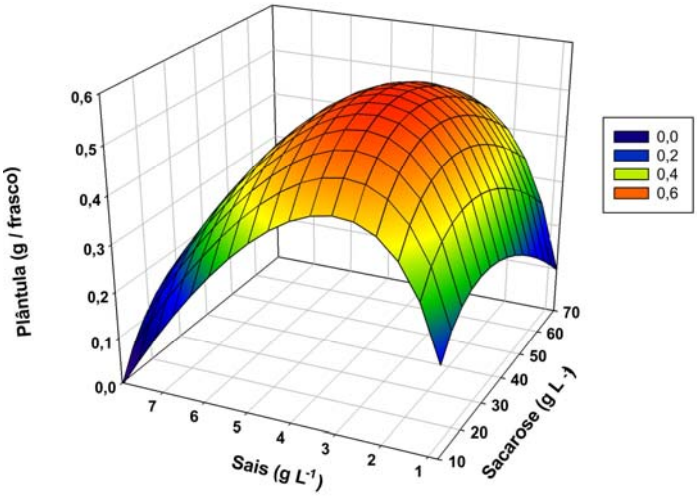
Tratamentos	Sacarose	Carvão Ativado	Sais do meio S
	g/L		
1	25	0,75	2,6
2	25	0,75	6,2
3	25	2,25	2,6
4	25	2,25	6,2
5	55	0,75	2,6
6	55	0,75	6,2
7	55	2,25	2,6
8	55	2,25	6,2
9	17,5	1,5	4,4
10	40	0,375	4,4
11	40	1,5	1,7
12	62,5	1,5	4,4
13	40	2,625	4,4
14	40	1,5	7,1
15	13	0,75	2,6
16	25	0,15	2,6
17	25	0,75	1,16
18	67	2,25	6,2
19	55	2,85	6,2
20	55	2,25	7,64
21	40	1,5	4,4
22	13	0,15	1,16



y = 0,48 + 0,005a - 0,077 c + 0,089*s - 0,104**a^{0,5} + 0,202*c^{0,5} - 0,383 s^{0,5} - 0,00003**a s + 0,008*a s^{0,5} - 0,000067*a c s; R^2 = 0,7161**

*, ** significativos a 1 e 5 % pelo teste F, respectivamente.

Figura 1. Produção de massa da matéria seca de calo, a partir de sementes de *Cyrtopodium cardiochilum*, em função da concentração de sais (s) e de sacarose (a) no meio de cultura quando a concentração de carvão ativado (c) é igual a 0,8 g L^{-1}.



y = 0,056 - 0,022a - 0,383**c + 0,159**s + 0,213**a^{0,5} - 0,687 s^{0,5} - 0,00003**a c - 0,174*c s + 0,002*a s^{0,5} + 0,64**c s^{0,5}; R^2 = 0,8293**

*, ** significativos a 1 e 5 % pelo teste F, respectivamente.

Figura 2. Produção da massa da matéria seca de plântulas, a partir de sementes de *Cyrtopodium cardiochilum*, em função da concentração de sais (s) e de sacarose (a) no meio de cultura quando a concentração de carvão ativado (c) é igual a 3,0 g L^{-1}.

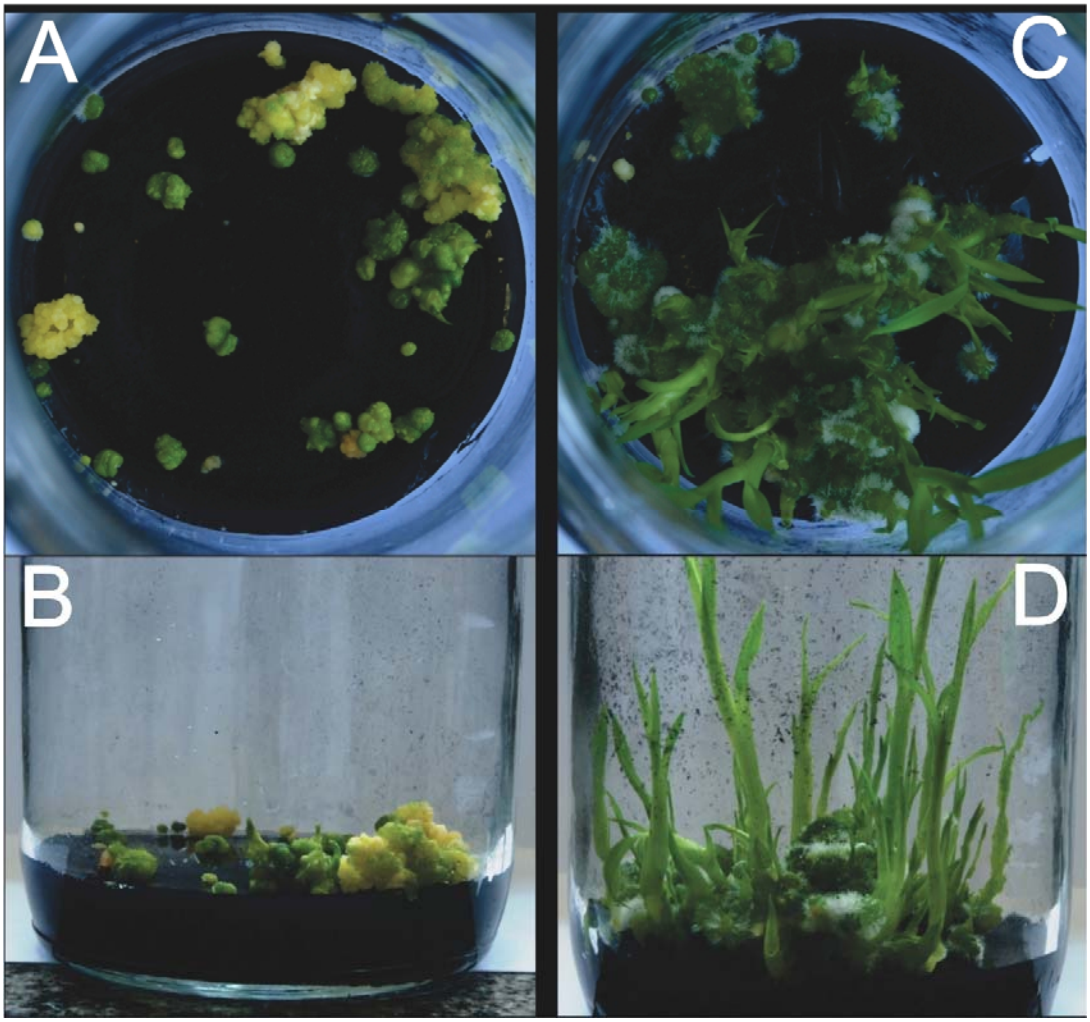


Figura 3. Efeito da concentração de sacarose, carvão ativado e sais do meio S no meio de cultura sobre a morfogênese de *Cyrtopodium cardiochilum*, seis meses após o semeio. **A-B)** Formação de calo em meio de cultura contendo 55; 0,75 e 6,2 g L^{-1} de sacarose, carvão ativado e sais, respectivamente. **C-D)** Formação de plântulas em meio de cultura contendo 40; 2,63 e 4,4 g L^{-1} de sacarose, carvão ativado e sais, respectivamente.

CAPÍTULO 4

Micobiota fitopatogênica associada à *Cyrtopodium cardiochilum* (Orchidaceae)

Brenda V. Lima, Lidiane L. Duarte, Robert W. Barreto

Resumo

Cyrtopodium cardiochilum é uma orquídea nativa que apresenta potencial para produção de extratos para uso cosmético e farmacêutico. Estudos têm sido efetuados visando à domesticação desta espécie. E como parte deste processo de domesticação, é importante a pesquisa sobre os patógenos que ocorrem sobre as populações naturais da planta ou em coleções. Entre os anos de 2009 e 2011 foram efetuadas coletas preliminares de *C. cardiochilum* apresentando manchas foliares e podridões de pseudobulbos, no estado do Rio de Janeiro, principalmente em localidade no município de Nova Friburgo, e em cultivo experimental em Viçosa, Minas Gerais. Seis espécies fúngicas foram identificadas. O exame da morfologia e análises de sequências de regiões selecionadas do genoma permitiu a identificação dos fungos como: *Bionectria ochroleuca* (podridão de pseudobulbos), *Colletotrichum fructicola* (antracnose), *Fusarium solani* (podridão de raízes e pseudobulbos) e *Sphenospora kevorkianii* (ferrugem). Além destes uma ocorrência isolada de *Botrytis cinerea* e de *Alternaria* sp. foi registrada em plantas debilitadas por problemas fisiológicos.

1. INTRODUÇÃO

Cyrtopodium cardiochilum popularmente conhecida como 'sumaré-do-mato', é uma orquídea brasileira de hábito terrestre ou rupestre (Menezes, 2000). Evidências acerca da atividade biológica de extratos obtidos do pseudobulbo de *C. cardiochilum* indicam seu grande potencial para uso na fabricação de cosméticos e fármacos (Barreto & Parente, 2006). Como se trata de uma espécie nativa que ocorre em populações limitadas, sua exploração extrativista representaria uma ameaça para a espécie. Estudos têm sido efetuados visando à domesticação desta espécie. Pouco existe publicado sobre esta espécie e as condições para o seu manejo e cultivo são

desconhecidas. Como parte do processo de domesticação de uma espécie vegetal é importante a pesquisa sobre os patógenos que ocorrem sobre as populações naturais da planta ou em coleções. Somente oito espécies fúngicas foram registradas em associação com plantas do gênero *Cyrtopodium*: *Bionectria ochroleuca* (Schwein.) Schroers & Samuels, *Colletotrichum orchidearum* Allesch., *Mycosphaerella cattleyae* E.K. Cash & A.M.J. Watson, *Phyllosticta himantogloss* Petr., *Sphenospora kevorkianii* Linder, *Stenella cyrtopodii* Dorn.-Silva, Pereira-Carv. & Dianese, *Uredo cyrtopodii* Syd. & P. Syd. e *Uredo nigropuncta* Henn (Farr & Rossaman, 2012; Mendes & Urben, 2012). No entanto, nenhuma dessas espécies foi relatada em associação com *C. cardiochilum*.

O status de completo desconhecimento sobre os fungos associados a *C. cardiochilum*, justifica o presente e pioneiro estudo. Desta forma, todos os relatos de associações fungo-hospedeiro são considerados novos para a ciência e são apresentados a seguir.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de folhas e pseudobulbos com sintomas de *C. cardiochilum* foram coletadas entre 2009 e 2011 em uma área de cultivo experimental em Nova Friburgo - RJ, em áreas de ocorrência natural no Rio de Janeiro – RJ e a partir de plantas cultivadas em casa de vegetação no Campus da Universidade Federal de Viçosa e, ocasionalmente em plantas mantidas por colecionadores. As amostras foram desidratadas em prensa botânica e, examinadas sob microscópio estereoscópico, com o objetivo de detectar estruturas fúngicas nas áreas lesionadas. Sempre que um fungo reconhecido como cultivável em meio de cultura foi observado, efetuou-se seu isolamento em cultura pura, pela transferência de esporos ou de outras estruturas fúngicas, com ajuda de um estilete esterilizado para placas de Petri contendo o meio CVA (Pereira et al., 2003). As placas foram incubadas a 25 ± 2^{o} C, no escuro.

Lâminas foram preparadas por raspagem das estruturas superficiais dos fungos ou corte de tecido contendo estruturas fúngicas imersas do material vegetal e montadas em lactofenol ou lactofucsina. Medições e ilustrações foram feitas sob um microscópio de luz Olympus BX 51 equipado com câmara clara e câmera digital Olympus Evolt E330.

Para descrição das culturas, isolados selecionados foram semeados centralmente em placas contendo os meios batata-dextrose-ágar (BDA), batata-cenoura-ágar (BCA), meio de aveia-ágar (AA) e extrato de malte-ágar (EMA). As colônias foram incubadas a 25 ± 2º C e com fotoperíodo de 12 h de luz diária [luz proveniente de uma lâmpada BLB (luz negra) 40 W e duas lâmpadas fluorescentes (luz do dia) 40 W, colocadas 35 cm acima das placas]. A coloração das colônias foi descrita utilizando-se a terminologia de Rayner (1970).

Todas as culturas puras foram conservadas em sílica-gel (Dhingra & Sinclair, 1996). As culturas foram depositadas na coleção de cultura da Universidade Federal de Viçosa (COAD) e algumas duplicatas foram enviadas para depósito no Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, Holanda). As amostras foram depositadas no herbário local da Universidade Federal de Viçosa (Herbário VIC).

Testes de patogenicidade foram conduzidos para isolados selecionados de fungos não biotróficos. Um dos fungos, reconhecido como pentencente ao gênero *Colletotrichum,* foi cultivado em placas contendo BDA e preparada uma suspensão conidial depois de 10 dias de crescimento por deposição de 10 mL de água e raspagem da superfície das placas com espátula de borracha. A suspensão teve a concentração ajustada para 10^6 esporos/mL com auxílio da câmara de Neubauer. Quatro plantas sem sintomas de *C. cardiochilum* foram selecionadas e quatro folhas de cada planta foram escolhidas para serem inoculadas. Duas destas foram feridas com agulhas previamente esterelizadas enquanto as outras duas foram mantidas intactas. As plantas foram pulverizadas até o escorrimento com a suspensão de conídios e foram cobertas com saco plástico previamente umedecido para simular uma câmara úmida, onde permaneceram por 48 h. Plantas não inoculadas serviram de testemunhas. As plantas foram observadas a cada dois dias para observação do surgimento de sintomas. Quando os sintomas foram visualizados, removeram-se fragmentos do tecido necrosado e estes foram desinfestados superficialmente com solução de álcool 50% por 1min, hipoclorito de sódio a 1% por 3min e água estéril por alguns segundos. Posteriormente, os fragmentos foram depositados em placas de Petri contendo o meio BDA e estas foram acompanhadas para verificação do eventual surgimento de culturas com a morfológica característica de *Colletotrichum.* Para os dois outros fungos identificados preliminarmente como pertencentes aos gêneros *Bionectria* e *Fusarium,* a inoculação foi realizada pela insersão de palitos de

dente previamente colonizados com os respectivos fungos em pseudobulbos sadios. Na testemunha foram introduzidos nos pseudobulbos palitos de dentes sem os fungos. Os palitos foram preparados da seguinte forma: Os palitos foram cortados ao meio e colocados em uma placa de Petri de vidro e posteriormente foram esterelizados. Vários palitos (4 a 6) foram introduzidos de forma aleatória e em diversas regiões do pseudobulbo. Realizada as inoculações, as plantas foram cobertas com saco plástico previamente umedecido para simular uma câmara úmida, onde permaneceram por 48 h. As plantas foram observadas diariamente para detecção de sintomas nos locais de inoculação ou em outras partes (sintomas reflexos). Constatadas evidências de lesão, os pseudobulbos foram retirados das plantas e dissecados com um bisturi esterilizado. Re-isolamentos foram efetuados como descrito acima a partir de fragmentos de tecidos lesionados desinfestados superficialmente e plaqueados para o cumprimento dos postulados de Koch.

Além dos estudos da morfologia de cada um dos fungos, estudos moleculares foram realizados para complementação da caracterização dos isolados identificados preliminarmente como pertencentes aos gêneros *Colletotrichum, Bionectria* e *Fusarium.* Para *Colletotrichum* e *Bionectria,* os estudos foram realizados seguindo os seguintes passos: o kit Fast DNA (BIO 101, Carlsbad, CA) foi utilizado de acordo com a instrução do fabricante para isolar o DNA genômico total, obtido do micélio fúngico crescido em meio EMA por oito dias a 24 ° C. Uma agulha estéril foi utilizada para raspar o micélio a partir da superfície da placa. Os primers ITS4 e ITS5 (White et al., 1990) foram utilizados para amplificar a região espaçadora interna (ITS), bem como a região 5.8S rDNA. Para *Colletotrichum*, um fragmento do gene da calmodulina (CAL) foi amplificado utilizando os primers CAL 228F e CAL737R (Carbone & Kohn, 1999), e para *Bionectria,* parte do gene da beta tubulina (*tub*2) foi amplificada com os primers T1 e T22 (O' Donnell & Cigelnik, 1997).

As condições da reação em cadeia da polimerase (PCR) foram as mesmas para todas as regiões e a reação teve um volume total de 12,5 µl: 1 µl do DNA diluído (40 ng⁄µL), 1×Tampão de PCR, 48 µM de cada dNTPs, 2,5 pmol de cada primer, 1,5 mM de $MgCl_2$ e 0,7 unidades da Taq polimerase (Bioline GmbH, Luckenwalde, Germany). As reações de amplificação foram feitas no Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). O passo inicial de desnaturação foi

feita a 94 ° C por 5 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94 ° C (30 s), anelamento a 52 ° C (30 s), e alongação a 72 ° C (30 s). E uma desnaturação final de 72 ° C (7 min) foi acrescentada. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese a 80 V por 40 min utilizando 0,8% (p/v) de gel agarose contendo brometo de etídio a 0,1 μg/ml em 1× Tris-acetate EDTA tampão (0,4 M Tris, 0,05 M NaAc, and 0,01 M EDTA, pH 7,85) e visualizados sobre luz UV.

Os amplicons foram sequenciados em ambas as direções utilizando os mesmos primers do PCR e o kit para sequenciamento–DYE namic ETTerminator Cycle (Amersham Biosciences, Roosendal, The Netherlands) de acordo com as recomendações do fabricante. Os produtos de PCR purificados foram analisados em um sequenciador ABI Prism 3700 DNA (Perkin-Elmer, Foster City, CA). A sequência consenso foi obtida através das sequências senso e antisenso utilizando SeqMan do pacote Lasergene (DNA star, Madison, WI).

Já para *Fusarium*, o DNA foi extraído pelo método de CTAB (Murray & Thompson, 1980). A amplificação do gene EF-1α e os primers utilizados foram descritos por O'Donnell (2000). Os fragmentos gênicos foram sequenciados nas direções senso e antisenso, em um sequenciador automático MEGA BACE® no Laboratório de Genômica da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os eletroferogramas gerados foram analisados visualmente com o auxílio do programa SeqAssem (Hepperle, 2004), onde a sequência consenso foi obtida.

Para os estudos filogenéticos, as sequências foram organizadas e os outgroups adicionados usando o pacote MEGA 5.0 software e foram ajustadas manualmente para melhorias quando necessário. A inferência Bayesiana foi realizada para todos os dados (Tabelas 1, 2 e 3). Os "Gaps" foram tratados como dados ausentes. O modelo com melhor ajuste evolutivo foi determinado para cada conjunto de dados comparando-se os diferentes modelos evolutivos através do critério de informações Akaike usando PAUP (version 4.0b10; Sinauer Associates, Sunderland, MA) e Mr Modeltest 2.2 (Nylander, 2004). A análise Bayesiana foi realizada utilizando a amostragem em cadeia de Monte Carlo Markov e foram executadas com duas cadeias com 1,000,000 de gerações até que a média do desvio padrão das cadeias foi próxima ou menor 0.01. Utilizou-se o programa Tracer v1.5 (Rambaut & Drummond, 2003) para verificar a convergência das cadeias e árvore consenso foi calculada no Mr Bayes v3.1 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) onde 25% das árvores

amostradas foram descartadas como ‘burnin’. As árvores filogenéticas foram visualizadas no programa Fig Tree v1.3.1 (Rambaut, 2009).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontradas seis espécies fúngicas fitopatogênicas associadas à *C. cardiochilum* sendo as quatro mais relevantes descritas a seguir.

Sphenospora kevorkianii Linder, Mycologia 36, 464-468, 1944. Fig.6

Lesões anfígenas, circulares e escuras com pulverulência alaranjada representando massas de urediniósporos, 0,31-10 x 0,3-0,2 mm. Micélio externo ausente. Micélio interno intercelular, 2,5–4,0 µm diam, ramificado, septado e hialino. Espermagônios e Écios ausentes. Urédias subepidermais, hipófilas, isoladas, 190–537 µm diam. Urediniósporos pedicelados, obovóides a elipsóides, 19–31 x 18–27 µm, marrom-claros a marrom-escuros, equinulados, espessura da parede 1,5–4,0(5,0) µm, poros indistintos. Télias subepidermais, hipófilas, isoladas, 158–632 µm diam. Paráfises teliais numerosas, clavadas, 38–66,5 x 6,0–9,0 µm, alaranjadas, lisas. Teliósporos bicelulares, elipsóides, com presença de gotas de óleo alaranjadas, 20,5-28 x 13–16,5 µm, hialinos, lisos, pedicelados - pedicelos hialinos, subcilíndricos, 16,5–32 x 5,0–10,0 µm.

Material examinado: Nova Friburgo, RJ, Brasil em folhas de *Cyrtopodium cardiochilum*, 06/06/2009, R.W. Barreto (VIC 31907); Nova Friburgo, RJ, Brasil em folhas de *Cyrtopodium cardiochilum*, 02/09/2009, B. V. Lima (VIC 31892); Ervália, MG, Brasil em folhas de *Cyrtopodium glutiniferum* 22/09/2009, B. V. Lima (VIC 31894); Nova Friburgo, RJ, Brasil em folhas de *Cyrtopodium cardiochilum*, 09/07/2011, R. W. Barreto (VIC 31910).

Notas: O gênero *Sphenospora* Dietel pertencente à família Raveneliaceae está presente na África, mas ocorre predominantemente nos trópicos americanos (Linder, 1944). Segundo Farr e Rossman (2012) existem oito espécies de *Sphenospora* descritas: *Sphenospora berberidis* Lagerh. ex Arthur, *Sphenospora copaifera* P. Syd., *Sphenospora kevorkianii* Linder, *Sphenospora mera* Cummins, *Sphenospora pallida* (G. Winter) Dietel, *Sphenospora saphena* Cummins, *Sphenospora smilacina* Syd. &

P. Syd., e *Sphenospora yurimaguasensis* (Henn.) H.S. Jacks. & Holw. Dentre essas espécies, somente *S. mera*, *S. kevorkianii* e *S. saphena* estão associadas à família Orchidaceae. A partir dos caracteres morfológicos analisados, concluiu-se que o isolado foi equivalente a espécie *S. kevorkianii*.

A primeira descrição de *S. kervokianii* foi realizada por Linder em 1944 (Linder, 1944) em *Epidendrum difforme* Jacquin proveniente da Nicarágua.

No Brasil, na família Orchidaceae, *S. kevorkianii* já foi relatado em *Catasetum fimbriatum* (Morren) Lindl., *Catasetum maranhense* Lacerda & da Silva, *Cyrtopodium punctatum* (L.) Lindl., *Epidendrum secundum* Jacq., *Epidendrum xanthinum* Lindl., *Notylia lyrata* F. Moore, *Pleurothallis mentigera* Kraenzl, *Prescottia sclerophylla* Lindley, *Sauroglossum nitidum* (Vell.) Schltr., *Stanhopea graveolens* Lindley e *Zygostates lunata* Lindley (Pereira et al., 2002; Pereira & Barreto, 2004; Hennen et al., 2005; Silva & Figueiredo, 2006; Pereira & Silva, 2009). No entanto, ainda não há relato desta espécie em *C. cardiochilum.* Desta forma, este é o primeiro relato de *S. kevorkianii* em *C. cardiochilum* no Brasil.

Colletotrichum fructicola Prihastuti, L. Cai & K.D. Hyde, Fungal Diversity 39, 89-109, 2009. Fig.7

Lesões em folhas vivas, inicialmente punctiformes, subcirculares, anfígenas, escuras e posteriormente irregulares 0,5–4,5 x 0,5–5,5 mm, tornando-se coalescentes e levando à queima de bordas, pontas ou partes extensas das folhas. Micélio interno indistinto. Micélio externo ausente. Conidiomas acervulares, hipófilos, isolados, setosos, 64–205 µm diam. Setas marrom-escuras 33–69 x 2,5–4,0 µm, 1-3 septos. Conidióforos, células conidiogênicas e loci conidiogênicos indistintos. Conídios mucilaginosos, isolados, cilíndricos com extremidades ligeiramente arredondadas a obtusas, 9,0–26 x 2,5–5,0 µm, asseptados, gutulados, hialinos, lisos. Apressórios moderamente abundantes, marrom–claros a marrom–escuros, com formatos bastante variados, podendo ser ovóides a clavados com bordas inteiras ou lobadas a irregulares, 5,0–24 x 4,0–11,5 µm. Ascocarpos periteciais, semi-imersos, isolados, globosos a subglobosos, 66,5–269 µm diam, parede composta de textura angulares, marrom-clara. Ascos unitunicados, clavados fasciculados, 32–64 x 10–13 µm,

octospóricos, hialinos. Ascósporos cilíndricos a fusiformes, 13–16,5 x 4,0–5,0 µm, gutulados, hialinos, lisos.

Em cultura: crescimento relativamente lento (90 mm diam depois de 29 dias). Em EMA: colônia plana, branca, 'mouse gray' claro a 'mouse gray', com micélio cotonoso e úmido centralmente se tornando sulcado radialmente e predominantemente mais imerso em direção a periferia. Esporulação abundante com formação de peritécios. Em BCA: micélio aéreo ralo, esbranquiçado a 'mouse gray' claro, esporulação pobre, restrita a ascósporos dentro de poucos corpos de frutificação formados centralmente.

Filogenia: A matriz de dados do alinhamento constitui-se: para o gene ITS, 33 isolados foram utilizados, e dos 574 caracteres presentes, 167 foram variáveis e 102 foram informativos para parcimônia; já para a região CAL, 43 isolados foram utilizados, dos 719 caracteres, 374 foram variáveis e 334 foram informativos para parcimônia.

Material examinado: Nova Friburgo, RJ, Brasil em folhas de *Cyrtopodium cardiochilum*, 06/06/2009, R. W. Barreto (VIC 31908); Nova Friburgo, RJ, Brasil em folhas de *Cyrtopodium cardiochilum*, 02/09/2009, B. V. Lima (VIC 31893); Nova Friburgo, RJ, Brasil em folhas de *Cyrtopodium cardiochilum*, 09/07/2011, R. W. Barreto (VIC 31911).

Notas: O gênero *Colletotrichum* introduzido por Corda (1831), pertence ao grupo dos "coelomycetes" e tem como representante da fase teleomórfica o gênero *Glomerella* (Sutton, 1992; Shenoy et al., 2007a; Hyde et al., 2009). *Colletotrichum* tem importância mundial, pois causa doenças em ampla gama de culturas econômicas e plantas ornamentais (Sutton, 1992; Hyde et al. 2009).

Na família Orchidaceae dezesseis espécies de *Colletotrichum* são relatadas em uma variedade de gêneros hospedeiros. São elas: *Colletotrichum bletiae* Halst, *Colletotrichum boninense* Moriwaki, Toy. Sato & Tsukib; *Colletotrichum cinctum* (Berk. & M.A. Curtis) Stoneman, *Colletotrichum cirrhopetali* Sawada, *Colletotrichum cliviae* Yan L.Yang, Zuo Y. Liu, K.D. Hyde & L.Cai, *Colletotrichum crassipes* (Speg.) Arx, *Colletotrichum crossandrae* Patel, Kamat & C.B. Pande, *Colletotrichum dematium* (Pers.) Grove, *Colletotrichum gloesporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., *Colletotrichum karstii* Yan L. Yang, Zuo Y.Liu, K.D. Hyde & L. Cai, *Colletotrichum liriopes* Damm, P.F. Cannon & Crous, *Colletotrichum lujae* Verpl. &

Clem, *C. orchidearum, Colletotrichum phaleonopsidis* Sawada, *Colletotrichum siamense* Prihastuti., L. Cai & K.D. Hyde e *Colletotrichum vanillae* Scalia (Farr & Rossaman, 2012). No entanto, apenas *C. gloeosporioides* já foi relatado no Brasil, em *Cattleya* sp., *Oncidium altissimum* (Jacquin) Swartz, *Stanhopea* sp. e *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews (Mendes & Urben, 2012). E dentre essas dezesseis espécies apenas uma está associada ao gênero *Cyrtopodium*: *C. orchidearum* (Farr & Rossman, 2012). Todavia não há relato na literatura de espécie de *Colletotrichum* associada a *C. cardiochilum*.

Entre os diferentes gêneros anamórficos, *Colletotrichum* é um dos mais fáceis de ser reconhecido. No entanto, a separação entre as diferentes espécies é frequentemente complexa e trabalhosa, devido aos caracteres morfológicos serem insuficientes e muitas vezes coincidentes (Photia et al., 2005; Hyde et al., 2009). Portanto a combinação do uso de ferramentas moleculares com as técnicas morfológicas tradicionais vem sendo utilizada para identificar espécies de *Colletotrichum* (Cannon et al., 2000; Du et al., 2005; Photia et al., 2005; Cai et al., 2009).

O fungo encontrado foi equivalente em todos os caracteres morfológicos analisados às espécies pertencentes ao 'complexo gloeosporioides' e, portanto, estudos filogenéticos foram necessários para se determinar o correto posicionamento do isolado dentro das espécies do complexo. Ambas as análises filogenéticas confirmaram a colocação do isolado dentro do 'complexo gloeosporioides' (Figuras 1 e 2), além de permitir a sua distinção como sendo *Colletotrichum fructicola*, uma vez que eles se agruparam dentro do mesmo clado. Para as análises com o gene da calmodulina (CAL) houve o máximo suporte, com a probabilidade a posteriori igual a 1. Já para a análise com ITS, o suporte foi baixo (0,58).

Além de *C. fructicola*, outras espécies fazem parte do complexo: *Colletotrichum asianum* Prihast., L. Cai & K.D. Hyde, *Colletotrichum horii* B.S. Weir & P.R. Johnst, *Colletotrichum hymenocallidis* Yan L. Yang, Zuo Y. Liu, K.D. Hyde & L. Cai, *Colletotrichum kahawae* J.M. Waller & Bridge, *C. gloeosporioides* e *C. siamense* (Cai et al., 2009; Prihastuti et al., 2009; Yang et al., 2009).

Colletotrichum fructicola foi descrito por Prihastuti et al. (2009) em graõs de café arábica na Tailândia, como sendo um patógeno oportunista (Prihastuti et al., 2009). Até o momento *C. fructicola* foi relatado em *Coffea arabica*, *Coffea* sp.,

Crinum asiaticum, *Dimocarpus longan* e *Carica papaya* (Farr & Rossaman, 2012; Prihastuti et al., 2009; Yang et al., 2009). Portanto esse é o primeiro relato de *C. fructicola* como patógeno de planta da família Orchidaceae.

O teste de patogenicidade foi demonstrado pela presença de lesões inicialmente pontuais, subcirculares, escuras e posteriormente irregulares tornando-se coalescentes (Figura 10). Os sintomas apareceram aos 15 dias após inoculação.

Bionectria ochroleuca var. *fitoparasitica*. Fig 8

Podridão uniforme e marrom dos bulbos com produção de estromas alaranjados na extremidade e em algumas cicatrizes da bainha. Micélio interno indistinto. Micélio externo ausente. Conidióforos dimórficos, cilíndricos a subcilíndricos, ramificados e hialinos. Conidióforos primários do tipo verticilium, 90–160 x 2,5–4,0 µm, com ramificações irregulares, hialinos. Células conidiogênicas fiálidicas, terminais, integradas, cilíndricas a subcilíndricas, 24–42 x 2,0–2,5 µm, hialinas. Conídios mucilaginosos, em grupos, curvos, 3,5–9,0 x 2,0–4,0 µm, hialinos, lisos. Conidióforos secundários do tipo penicilium, 51–141 x 4,0–5,0 µm, geralmente ramificados, hialinos. Células conidiogênicas fiálidicas, terminais, integradas, 9,0–20,5 x 2,5–4,0 µm. Conídios originários dos conidióforos secundários ovais a elipsóides, ligeiramente curvos, 4,0–13,0 x 2,5–4,0 µm, lisos e hialinos. Ascocarpo peritecial, formado em agregados estromáticos, globosos a subglobosos, 170,5–344 µm diam, textura angulares. Ascas unitunicadas, estreitamente clavadas, 43,5–62,5 x 4,0–5,0 µm. Ascósporos elipsóides, podendo ser afilado em direção as extremidades, 9,0–11,5 x 2,5–4,0 µm, bicelulares, ligeiramente verrugosos a lisos, hialinos, podendo apresentar constrição nos septos.

Em cultura: crescimento relativamente rápido (80 mm diam em 14 dias). Em BDA, BCA, AA, EMA: colônias planas de micélio aéreo plumoso, podendo tornar-se pulverulento na periferia, colônias com mistura de coloração branca e salmão ou limão centralmente, formação esparsa de grupos de peritécios, zonação diurna nítida sob fotoperíodo e ausente no escuro, esporulação pobre.

Filogenia: A matriz de dados do alinhamento constitui-se: para o gene *tub*2, 35 isolados foram utilizados, de 616 caracteres, 201 foram variáveis e 153 foram

informativos para parcimônia; para a região ITS, 59 isolados foram utilizados, de 515 caracteres, 177 foram variáveis e 127 foram informativos para parcimônia.

Material examinado: Nova Friburgo, RJ, Brasil, em pseudobulbos de *Cyrtopodium cardiochilum*, 21/11/2009, R. W. Barreto (VIC 31905); Nova Friburgo, RJ, Brasil em pseudobulbos de *Cyrtopodium cardiochilum*, 20/07/2010, R. W. Barreto (VIC 31904).

Notas: Em 1919 o gênero *Bionectria* foi proposto por Spegazzini (1919) para designar algumas espécies de *Nectria* Fr. *Bionectria* foi posteriormente considerado sinônimo de *Nectria* (Müller & Arx, 1962). Atualmente, espécies semelhantes à *Nectria* estão distribuídas em pelo menos 52 gêneros que fazem parte de três famílias: Nectriaceae, Hypocreaceae, e Bionectriaceae, família da qual *Bionectria* é o gênero tipo, e *Clonostachys* descrito por Corda (1839) é o nome aplicado ao anamorfo de *Bionectria* (Rossman, 1999; Schroers, 2001).

Pela comparação dos caracteres morfológicos o fungo encontrado sobre *Cyrtopodium* foi idêntico a *Bionectria ochroleuca,* com exceção do comprimento dos conídios (4,0-13 μm) e conidióforos secundários (51-141 μm) serem ligeiramente maiores do que o relatado por Schroers (2001). Os dados moleculares provenientes dos múltiplos alinhamentos das sequências do gene *tub 2* confirmaram, com alto grau de suporte a identidade do fungo obtido de *C. cardiochilum* como *B. ochroleuca* (Figura 3). Esses resultados estão em desacordo com os resultantes da análise da região ITS (Figura 4). Nesta análise o fungo encontrado sobre *C. cardiochilum* agrupou com *B. coronata.* No entanto, esse resultado não foi considerado confiável, pois os ascósporos de *B. coronata* são unicelulares e os conidióforos são monomórficos, enquanto que o fungo de *C. cardiochilum* tem ascósporos bicelulares e conidióforos dimórficos. Portanto, com base na análise combinada dos dados morfológicos e moleculares, o isolado pertence a *B. ochroleuca*.

O resultado do teste de patogenicidade foi demonstrado por uma necrose acentuada e escura no pseudobulbo (Figura 11). O período de incubação foi de 20 dias.

Bionectria ochroleuca é freqüentemente relatada como sendo hiperparasita de nematóides, carrapatos, myxomycetes e diversos fungos filamentosos (Schroers, 2001). O único outro relato de *B. ochroleuca* associado a tecidos de uma planta é, coincidentemente, um relato antigo feito no Brasil deste fungo (como *Creonectria*

ochroleuca) em *Cyrtopodim punctatum* (L.) Lindl. (Viegas, 1944). Infelizmente, este autor não informou se o fungo foi encontrado por ele associado a uma doença na planta**.** No entanto, neste presente estudo foi demonstrado experimentalmente que o fungo é patógeno da orquídea, todas as etapas do postulado de Koch tendo sido cumpridas. Devido a diferença na ecologia do isolado propõe-se então uma nova variedade de *Bionectria ochroleuca* como *Bionectria ochroleuca* var. *fitoparasitica***.**

Fusarium solani (Mart.) Sacc, Michelia 2, (7), 241-301, 1881. Fig 9

Esporodóquios de cor creme em BDA. Células conidiogênicas terminais, discretas, subcilíndricas, 39,5–115 x 2,5–4,0 µm, hialinas. Monofiálides longas, solitárias, sem fiálides adicionais. Micro-conídios ovais, elipsóides, fusiformes a reniformes, maioria com 0 a 1 septo, 6,5–25,5 x 2,5–5,0 µm. Macro-conídios secos, falcados, isolados com extremidades arredondadas, com 3 ou mais septos, 22–40 x 4,0–5,0 µm. Clamidósporos globosos a ovais e lisos.

Em cultura: crescimento rápido (80 mm, após 7 dias). Em BDA, BCA, AA, EMA: colônias planas centralmente, seguidas de halos concêntricos elevados a ligeiramente elevados, brancas, ou brancas com parte central acinzentada, ou ainda branca com um anel mais ou menos largo cor de couro (‘buff’) a palha, homogeneamente contonosa ou pulverulenta em anel subcentral, frequentemente úmida, periferia irradiada, com zonação diurna sob fotoperíodo e ausência no escuro; esporulação abundante (macro e microconídios).

Filogenia: A matriz de dados do alinhamento constitui-se: para o gene EF 1-α, 40 isolados foram utilizados, e dos 747 caracteres presentes, 312 foram variáveis e 278 foram informativos para parcimônia.

Material examinado: Viçosa, MG, Brasil em pseudobulbos de *Cyrtopodium cardiochilum*, 09/10/2009, B.V. Lima (VIC 31906).

Notas*: Fusarium* spp. é um importante patógeno de plantas, causador de sérias doenças em muitas plantas cultivadas importantes e em ornamentais, como crisântemo, lírios e orquídeas (Benyon et al., 1996; Chang et al., 1998; Ichikawa & Aoki, 2000; Lee et al., 2002).

Na família Orchidaceae, várias espécies de *Fusarium* têm sido relatadas como agente causal de podridões radiculares, podridões secas, e manchas foliares (Benyon

et al., 1996; Chang et al., 1998; Lee et al., 2002). Segundo Farr e Rossaman (2012) existem nove espécies de *Fusarium* descritas na família Orchidaceae: *Fusarium fractflexum* T. Aoki, O'Donnell & K. Ichik., *Fusarium incarnatum* (Desm.) Sacc, *Fusarium moniliforme* J. Sheld., *Fusarium oxysporum* E.F. Sm. & Swingle, *Fusarium proliferatum* (Matsush.) Nirenberg, *Fusarium sacchari* (E.J. Butler & Hafiz Khan) W. Gams, *Fusarium scirpi* Lambotte & Fautrey, *F. solani* e *Fusarium subglutinans* (Wollenw. & Reinking) P.E. Nelson, Toussoun & Marasas. No entanto, nenhuma dessas espécies foi relatada em associação com plantas doentes do gênero *Cyrtopodium*. A caracterização morfológica baseada na descrição de Leslie e Summerell (2006) confirmou a colocação do isolado dentro da espécie *Fusarium solani*. E pela inferência Bayesiana fica claro esse posicionamento, uma vez que o isolado agrupou dentro do clado de *F. solani* com a máxima probabilidade 'a posteriori' (Figura 5), o que demonstra alta congruência entre os dados morfológicos e os dados das análises moleculares.

A patogenicidade foi comprovada pela presença de uma necrose escura e acentuada no pseudobulbo (Figura 12). O aparecimento dos sintomas ocorreu 15 dias após inoculação.

Em orquídeas, *F. solani* tem sido relatado como um patógeno que causa podridão radicular em *Phalaenopsis* (Morita et al., 1992; Kim et al., 2002; Lin et al., 2007; Chen et al., 2008, 2009), podridão seca e podridão radicular em *Cymbidium* (Beyon et al., 1996; Ichikawa & Saito, 1998; Lee et al., 2002) e podridão radicular em *Dendrobium* (Latiffah et al., 2008, 2009). Ainda de acordo com Farr e Rossaman (2012), *F. solani* também é relatado em *Cattelya, Paphipedilum,* e *Vanila planifólia*. No entanto, no Brasil esta espécie ainda não foi encontrada associada a nenhuma espécie de planta da família Orchidaceae (Mendes & Urben, 2012). Desde modo, este é o primeiro relato de *F. solani* como patógeno de orquídeas no Brasil.

Diante do exposto, concluiu-se que este é o primeiro relato de *Sphenospora kevorkianii, Colletotrichum fructicola, Fusarium solani* e *Bionectria ochroleuca* em *Cyrtopodium cardiochilum.* Além destes fungos, uma ocorrência isolada de *Botrytis cinerea* e de *Alternaria* sp. foi registrada em mudas de *C. cardiochilum* debilitadas por problemas fisiológicos originárias do cultivo *in vitro*. Portanto, pelo fato desses fungos não terem causado danos relevantes em plantas originárias de cultivos tradicionais e por se encontrarem de forma isolada, eles não foram estudados.

Dentre os fungos descritos, *F. solani* e *B. ochroleuca* (apodrecedores de pseudobulbos) representam os patógenos mais ameaçadores para os cultivos de *C. cardiochilum*, uma vez que a presença destes patógenos pode acarretar na perda de pseudobulbos. Desta forma, para evitar que esses patógenos inviabilizem os futuros cultivos comerciais de *C. cardiochilum,* é necessário a adoção de medidas de controle para esses patógenos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barreto DW, Parente JP, 2006. Chemical properties and biological activity of a polysaccharide from *Cyrtopodium cardiochilum*. Carbohydrate Polymers, 64: 287-291.

Benyon F, Summerell BA, Burgess LW, 1996. Associations of *Fusarium* species with root rot of *Cymbidium* orchids. Australasian Plant Pathology, 25: 226-228.

Cai L, Hyde KD, Taylor PWJ, Weir B, Waller J, Abang MM, Zhang JZ, Yang YL, Phoulivong S, Liu ZY, Prihastuti H, Shivas RG, McKenzie EHC, Johnston PR, 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. Fungal Diversity, 39: 183-204.

Cannon PF, Bridge PD, Monte E, 2000. Linking the past, present and future of *Colletotrichum* systematics. In: *Colletotrichum* Host Specificity, Pathology and Host-pathogen Interaction (eds. D. Prusky, S. Freeman and M.B.Dickman). APS Press, St Paul, Minnesota, 1-20.

Carbone I, Kohn LM, 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia, 91: 553-556.

Chang M, Hyun IK, Lee YH, Lee DH, 1998. Leaf spot of *Cymbidium hybrida* caused by *Fusarium proliferatum*. Korean Journal Plant Pathology,14: 664-667.

Chen CW, Huang JH, Hsieh TF, 2008. The disease of *Phalaenopsis* caused by *Fusarium* spp. Plant Pathology Bulletin, 17: 78.

Chen JW, Huang JS, Chung WC, Chung WH, 2009. Molecular characteristic and pathogenicity of *Fusarium solani* in *Phalaenopsis*. Plant Pathology Bulletin, 18: 86.

Corda ACI, 1831. Die Pilze Deutschlands. Ed. J. Sturm. Deutschlands Flora, 3. Abtheilung, 3: 1-144.

Corda ACJ, 1839. Prachtflora europäischer Schimmelbildungen. Leipzig, Dresden.

Dhingra OD, Sinclair JB, 1996. Basic plant pathology methods. Boca Raton: Lewis Publisher, 488 p.

Du M, Schardl CL, Vaillancourt LJ, 2005. Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes. Mycologia, 97: 641-658.

Farr DF, Rossman AY, 2012. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Disponível em <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>. Acesso em 12 de abril de 2012.

Hennen JF, Figueiredo MB, Carvalho AA, Hennen PG, 2005. Catalogue of the species of plant rust fungi (Uredinales) of Brazil. Rio de Janeiro, RJ: Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Hepperle D, 2004. Seq Assem©**.** A sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Win32-Version. 2004. Disponível em: <http://www.sequentix.de >

Huelsenbeck JP, Ronquist F, 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. Bioinformatics, 17: 754–755.

Hyde KD, Cai L, Cannon PF, Crouch JA, Crous PW, Damm U, Goodwin PH, Chen H, Johnston PR, Jones EBG, Liu ZY, McKenzie EHC, Moriwaki J, Noireung P, Pennycook SR, Pfenning LH, Prihastuti H, Sato T, Shivas RG, Tan YP, Taylor PWJ, Weir BS, Yang YL, Zhang JZ, 2009. *Colletotrichum* – names in current use. Fungal Diversity, 39: 147-183.

Ichikawa K, Saito H, 1998. Occurrence of dry rote on *Cymbidium* caused by *Fusarium solani*. Proceedings of the Kanto- Tosan Plant Protection Society, 45: 119-21.

Ichikawa K, Aoki T. 2000. New leaf spot disease of *Cymbidium* species caused by *Fusarium subglutinans* and *Fusarium proliferatum*. Journal of General Plant Pathology, 66: 213-218.

Kim WG, Lee BD, Kim WS, Cho WD, 2002. Root rot of moth orchid caused by *Fusarium* spp. Plant Pathology Journal, 18: 225-227.

Latiffah Z, Nur Hayati MZ, Baharuddin S, Maziah Z, 2008. Vegetative compatibility group of *Fusarium* species associated with root and stem rot of orchid. Malaysian Journal of Microbiology, 4: 49–52.

Latiffah Z, Nur Hayati MZ, Baharuddin S, Maziah Z, 2009. Identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with root rot and stem rot of *Dendrobium*. Asian Journal of Plant Pathology, 3: 14–21.

Lee BD, Kim WG, Cho WD, Sung JM, 2002. Occurrence of dry rot on *Cymbidium* orchids caused by *Fusarium* spp. in Korea. Plant Pathology, 18: 156-160.

Leslie J, Summerell B, 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Ames.

Lin Q, Lin G, Huan Y, Zhang N, Liu F, 2007. Identification and binomics of leaf butt rot of *Phalaenopsis*. Chinese Journal of Tropical Crops, 28: 93-97.

Linder DH, 1944. A new rust of orchids. Mycologia, 36: 464–468.

Mendes MAS, Urben AF, 2012. Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em http://pragawall.cenargen.embrapa.br/. Acesso em 12 de abril de 2012.

Menezes LC, 2000. Genus *Cyrtopodium*: Espécies brasileiras: Ed. IBAMA 208 p.

Morita Y, Arie T, Kawarabayashi S, Suyama K, Namba S, Yamashita S, 1992. A new disease of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* caused by *Nectria haematococca*. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 58: 452-455.

Müller E, Arx JA.von, 1962. Die Gattungen der didymosporen Pyrenomyceten. Beitr. Krptogamenfl. Schweinz, 11(2): 1-922.

Murray, MG. Thompson, WF, 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acid Research, Oxford, 8: 4321-4325.

Nylander JAA, 2004. Mr Modeltest v2. Program distributed by the author. Uppsala University: Evolutionary Biology Centre.

O'Donnell K, Cigelnik E, 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. Molecular and Phylogenetic Evolution, 7: 103–116.

O`Donnell K, 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. Mycologia, 92(5): 919-938.

Pereira OL, Cavallazzi JRP, Rollemberg CL, Kasuya MCM, 2002. *Sphenospora kevorkianii*, a rust fungus (Uredinales: Raveneliaceae) on the orchid *Pleurothallis mentigera*. Brazilian Journal of Microbiology, 33: 155–156.

Pereira JM, Barreto RW, Ellison CA, Maffia LA, 2003. *Corynespora cassiicola* f. sp. *lantanae*: a potential biocontrol agent for *Lantana camara* from Brazil. Biological Control, 26: 21-31.

Pereira OL, Barreto RW, 2004. First report of *Sphenospora kevorkianii* (Raveneliaceae) on the orchid *Catasetum fimbriatum* in Brazil. Plant Pathology, 53: 256.

Pereira OL, Silva, M, 2009. Two new hosts, *Epidendrum secundum* and *Epidendrum xanthinum*, for the orchid rust S*phenospora kevorkianii* (Raveneliaceae) in Brazil. Australasian Plant Disease Notes, 4: 62–63.

Photita W, Taylor PWJ, Ford R, Lumyong P, McKenzie HC, Hyde KD, 2005. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. Fungal Diversity, 18: 117-133.

Prihastuti H, Cai L, Chen H, McKenzie EHC, Hyde KD, 2009. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in Chiang Mai, Thailand. Fungal Diversity, 39: 89-109.

Rambaut A, Drummond AJ, 2003. Tracer v1.5. Disponivél em < http://evolve.zoo.ox.ac.uk/>. Acesso em 05 de maio de 2012.

Rambaut A, 2009. Figtree V1.3.1. Disponivél em < http://evolve.zoo.ox.ac.uk/> Acesso em 22 de maio de 2011.

Rayner RW, 1970. A mycological color chart. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey and British Mycological Society, 34 p.

Rossman AY, Samuels GJ, Rogerson CT, Lower R, 1999. Genera of Bionectriaceae, Hypocreaceae and Nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes). Studies in Mycology, 42: 1-260.

Saccardo PA, 1881. Fungi Veneti novi vel critici v. mycologiae Veneti addendi. Series XII. Michelia, 2(7): 241-301.

Schroers HJ, 2001. A monograph of *Bionectria* (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. Studies in Mycology, n. 46.

Shenoy BD, Jeewon R, Hyde KD, 2007 a. Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi. Fungal Diversity, 26: 1-54.

Silva GS, Figueiredo MB, 2006. *Catasetum maranhense*, um novo hospedeiro de *Sphenospora kevorkianii* (Uredinales). Summa Phytopathologica, 32 (2): 197.

Spegazzini C, 1919. Fungi Costaricenses nonnulli. Bol. Acad. Nac. Ci. Córdoba, 23: 541-593.

Sutton BC, 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum*: biology, pathology and control (eds. J.A. Bailey and M.J. Jeger). CAB International, Wallingford: 1-26.

Viegas AP, 1944. Alguns fungos do Brasil II, Ascomicetos. Boletim Técnico da Divisão de Experimentação e Pesquisas. Instituto Agronômico. Bragantia, 4(1-6), 391 p.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor, JW, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. New York: Academic Press.

Yang YL, Liu ZY, Cai L, Hyde KD, Yu ZN, Mckenzie EHC, 2009. *Colletotrichum* anthracnose of Amaryllidaceae. Fungal Diversity, 39: 123-146.

5. FIGURAS E TABELAS

Tabela 1. Lista de isolados de *Colletotrichum* e outgroups incluidos no trabalho, com seus países de origem e hospedeiros.

Isolado	Hospedeiro	Origem	Acesso GenBank	
			ITS	CAL
Colletotrichum asianum isolate BMLI3	*Coffea arabica*	Tailândia	FJ972605	FJ917501
Colletotrichum asianum isolate BPDI4	*Coffea arabica*	Tailândia	FJ972612	FJ917506
Colletotrichum asianum isolate BMLI14	*Coffea arabica*	Tailândia	FJ972615	FJ917503
Colletotrichum boninense strain CSSN1	*Crinum asiaticum*	China	----	GQ849462
Colletotrichum boninense strain MAFF305972	*Crinum asiaticum* var. *sinicum*	Japão	----	HM582004
Colletotrichum cliviae strain CSSK4	*Clivia miniata*	China	----	GQ849464
Colletotrichum cliviae strain CSSS1	*Clivia miniata*	China	----	GU085863
Colletotrichum cliviae strain CSSS2	*Clivia miniata*	China	----	GU085864
Colletotrichum coccodes strain CPOS1	*Solanum tuberosum*	China	----	GQ849468
Colletotrichum dematium strain HKUCC 10413	----	----	----	GQ849455
Colletotrichum fructícola strain CSSX7	*Crinum asiaticum*	China	----	GQ849459
Colletotrichum fructícola strain CSSX7	*Crinum asiaticum*	China	----	GQ849459
Colletotrichum fructícola isolate BPDI16	*Coffea arabica*	Tailândia	FJ972603	----
Colletotrichum fructícola isolate BPDI18	*Coffea arabica*	Tailândia	FJ972602	----
Colletotrichum frutcícola isolate BPDI12	*Coffea arabica*	Tailândia	FJ972611	----
Colletotrichum fructícola RWB 1028B	*Cyrtopodium cardiochilum*	Brasil		
Colletotrichum gloeosporioides strain CBS 953.97	*Citrus sinensis*	Itália	----	GQ849452
Colletotrichum gloeosporioides strain TSG002	*Mangifera indica*	China	AY791890	----
Colletotrichum gloeosporioides CBS 95397	*Citrus sinensis*	Itália	----	FJ917512
Colletotrichum hippeastri strain CSSG1	*Hippeastrum vittatum*	China	----	GQ849469
Colletotrichum hippeastri strain CSSG2	*Hippeastrum vittatum*	China	----	GQ849470
Colletotrichum horii isolate C1180	*Diospyros kaki*	Japão	GQ329690	----
Colletotrichum hymenocallidis strain CSSN2	*Hymenocallis littoralis*	China	----	GQ849463
Colletotrichum hymenocallidis strain CSSN3	*Hymenocallis littoralis*	China	----	GQ849451
Colletotrichum jacksonii isolate 511152EE	*Echinochloa esculenta*	----	EU554130	----
Colletotrichum kahawae IMI 319418	*Coffea arabica*	Quênia	FJ972608	FJ917514
Colletotrichum kahawae voucher 363578	*Coffea arabica*	Quênia	----	FJ917515
Colletotrichum lineola CBS 125337	Apiaceae	República Checa	GU227829	----
Colletotrichum lineola CBS 125339	Apiaceae	República Checa	GU227830	----
Colletotrichum lupini strain BBA 63879	*Lupinus mutabilis*	----	AJ301930	----
Colletotrichum lupini strain BBA 70352	*Lupinus albus*	----	AJ301923	----
Colletotrichum lupini strain BBA 70358	*Lupinus albus*	----	AJ301933	----
Colletotrichum lupini strain BBA 70884	*Lupinus albus*	----	AJ301948	----

a continuar...

continuação....

Isolado	Hospedeiro	Origem	Acesso GenBank	
			ITS	CAL
Colletotrichum musae isolate BTL31	Banana	Tailândia	----	HQ596297
Colletotrichum musae isolate BTL32	Banana	Tailândia	----	HQ596298
Colletotrichum navitas CBS 125086	*Panicum virgatum*	----	GQ919067	----
Colletotrichum navitas strain 9032d	*Panicum virgatum*	----	GQ919068	----
Colletotrichum nicholsonii isolate 511115PD	*Paspalum dilatatum*	----	EU554126	----
Colletotrichum nicholsonii isolate 510916PD	*Paspalum dilatatum*	----	EU554122	----
Colletotrichum orchidearum strain CORCG3	*Cymbidium hookerianum*	China	----	HM582014
Colletotrichum orchidearum strain CORCX6	*Cattleya* sp.	China	----	HM582015
Colletotrichum paspali isolate 305403PN	*Paspalum notatum*	----	EU554100	----
Colletotrichum paspali isolate 510000PN	*Paspalum notatum*	----	EU554123	----
Colletotrichum rusci CBS 119206	*Ruscus* sp.	Itália	GU227818	----
Colletotrichum siamense isolate BPDI2	*Coffea arabica*	Tailândia	FJ972613	FJ917505
Colletotrichum siamense strain CORCX8	*Arundina graminifolia*	China	----	HM582003
Colletotrichum siamense isolate BMLI15	*Coffea arabica*	Tailândia	----	FJ917504
Colletotrichum simmondsii strain BRIP 28519	*Carica papaya*	Austrália	----	GQ849454
Colletotrichum sp. AS3.9616	----	----	EF369491	----
Colletotrichum sp. AS3.9617	----	----	EF369490	----
Colletotrichum sp. HHP-2009b isolate BPDI12	*Coffea arabica*	Tailândia	----	FJ917507
Colletotrichum sp. HHP-2009b isolate BPDI16	*Coffea arabica*	Tailândia	----	FJ917508
Colletotrichum sp. HHP-2009b isolate BPDI18	*Coffea arabica*	Tailândia	----	FJ917509
Colletotrichum spaethianum CBS 100063	*Lilium* sp.	Coréia do Sul	GU227808	----
Colletotrichum spaethianum strain CSSX10	*Hymenocallis littoralis*	China	----	GQ849449
Colletotrichum spaethianum strain CSSX3	*Hymenocallis littoralis*	China	----	GQ849456
Colletotrichum spaethianum strain CSSX5	*Hymenocallis littoralis*	China	----	GQ849448
Colletotrichum sublineolum strain BRIP14028	----	----	DQ195716	----
Colletotrichum sublineolum strain S3.001	----	----	DQ003114	----
Colletotrichum trichellum strain HKUCC 10378	----	----	----	GQ849466
Colletotrichum truncatum CBS 120709	*Capsicum frutescens*	Índia	GU227877	GQ849453
Colletotrichum truncatum CBS 151.35	*Phaseolus lunatus*	Estados Unidos	GU227862	----
Colletotrichum verruculosum strain IMI 45525	*Crotalaria juncea*	Zimbábue	GU227806	----
Glomerella acutata CBS 29467	*Carica papaya*	Austrália	FJ972610	FJ917511
Glomerella acutata BRIP28519	*Carica papaya*	Austrália	FJ972601	FJ917510
Glomerella truncata strain CSST3	*Hymenocallis* sp.	Tailândia	----	GQ849471
Glomerella truncata strain CSST5	*Hymenocallis* sp.	Tailândia	----	GQ849458
Glomerella truncata strain CSSX2	*Crinum asiaticum*	China	----	GQ849457
Glomerella truncata strain CSSX4	*Hymenocallis littoralis*	China	----	GQ849450
Glomerella truncata strain CSSX9	*Hymenocallis littoralis*	China	----	GQ849461
Glomerella tucumanensis (Outgroup)	*Saccharum officinarum*	Indonêsia	FJ972606	FJ917513

Tabela 2. Lista de isolados de *Bionectria* e outgroups incluidos no trabalho, com seus países de origem e hospedeiros.

Isolado	Hospedeiro	Origem	Acesso GenBank	
			tub2	rDNA
Bionectria apocyni CBS 130.87	*Apocynum cannabinum*	EUA	AF358168	AF210688
Bionectria oblongispora CBS 100285	*Orixa japonica*	Japão	AF358169	AF358248
Bionectria kowhaii CBS 461.95	*Sophora microphylla*	Nova Zelândia	AF358170	AF358250
Bionectria ochroleuca CBS 438.68	------	República Checa	AF358163	-----
Bionectria ochroleuca CBS 916.97	*Yucca* sp.	México	AF358164	-----
Bionectria Ochroleuca CBS 194.57	*Lilium auratum*	EUA	AF358165	AF358237
Bionectria ochroleuca CBS 406.95	*Salix* sp.	França	AF358167	AF358249
Bionectria ochroleuca CBS 193.94	*Pteridium aquilinum*	Guiana	AF358159	AF210686
Bionectria sp. RWB 1060[a]	*Cyrtopodium cardiochilum*	Brasil		
Clonostachys rosea f. catenulata CBS 126.72	Solo	Ucrânia	AF358202	-----
Clonostachys rosea f. catenulata CBS 154.27	Solo	EUA	AF358160	AF358231
Clonostachys rosea f. Catenulata CBS 443.65	Solo	EUA	AF358166	AF358233
Clonostachys rosea f. catenulata CBS 221.72b	Solo	Alemanha	AF358203	AF358234
Clonostachys rosea f. rosea CBS 100502	Papelão podre	França	-----	AF358200
Clonostachys rosea f. rosea CBS 117.23	*Solanum tuberosum*	França	-----	AF358201
Clonostachys rosea f. rosea CBS 226.48	Raízes de cenoura	EUA	AF358198	-----
Clonostachys rosea f. rosea CBS 704.97	Solo	EUA	AF358197	-----
Clonostachys rosea f. Rosea CBS 912.97	*Ixodes* sp.	EUA	AF358199	-----
Clonostachys rosea f. rosea CBS 710.86	Esclerócios de *Sclerotinia*	Holanda	AF358161	AF358235
Clonostachys rosea f. rosea CBS 376.55	*Acer palmatum*	EUA	AF358162	AF358239
Bionectria byssicola CBS 101918	*Persea americana*	Nova Zelândia	AF358150	-----
Bionectria byssicola CBS 293.78	-----	EUA	AF358152	-----
Bionectria byssicola CBS 364.78	Madeira	Venezuela	AF358153	-----
Bionectria byssicola CBS 365.78		Venezuela	AF358154	-----
Bionectria byssicola CBS 914.97	*Uganda Alchorea branches*	-----	AF358151	AF358252
Clonostachys rhizophaga CBS 100004	Solo	EUA	AF358157	-----
Clonostachys rhizophaga CBS 906.72	Solo	Chile	AF358155	-----
Clonostachys rhizophaga CBS 202.37	*Ulmus americana*	EUA	AF358156	AF358225
Clonostachys rhizophaga CBS 361.77	Cultura contaminante	Suiça	AF358158	AF358228

a continuar ....

continuação...

Isolado	Hospedeiro	Origem	Acesso GenBank	
			tub2	rDNA
Bionectria capitata CBS 218.93	Casca de árvore	Japão	AF358188	AF358240
Clonostachys agrawalii CBS 533.81	----	Índia	AF358187	AF358241
Bionectria sporodochialis CBS 101921	Casca de árvore	EUA, Porto Rico	AF358149	AF210685
Bionectria zelandiaenovae CBS 197.93	Casca de *Coprosma* sp.	Nova Zelândia	AF358186	-----
Bionectria zelandiaenovae CBS 100979	*Agathis australis*	Nova Zelândia	-----	AF358229
Bionectria zelandiaenovae CBS 232.80	Casca de *Coprosma* sp.	Nova Zelândia	AF358185	AF210684
Clonostachys compactiuscula CBS 729.87	Solo	Alemanha	AF358193	AF358242
Bionectria compactiuscula CBS 913.97	Casca de *Fagus* sp.	EUA	AF358194	AF358245
Bionectria compactiuscula CBS 592.93	Casca de *Fagus* sp.	França	AF358192	AF358247
Bionectria compactiuscula CBS 919.97	Galhos de *Acer* sp.	EUA.	-----	AF210690
Clonostachys rogersoniana CBS 582.89	Solo	Brasil	AF358189	AF210691
Bionectria solani CBS 101926	Inflorescência morta de Palmeira	Venezuela	AF358179	AF358230
Bionectria solani CBS 101924	*Hypoxylon* sp.	Jamaica	AF358180	AF358232
Clonostachys solani f. nigrovirens CBS 183.30	Solo	Holanda	AF358222	-----
Clonostachys solani f. nigrovirens CBS 223.72	Solo	Alemanha	AF358223	-----
Clonostachys solani f. nigrovirens CBS 229.74	Tubérculo de *Solanum tuberosum*	Holanda	AF358224	-----
Clonostachys solani f. nigrovirens CBS 142.91	Ovos de *Arion ater*	Alemanha	AF358178	AF358244
Clonostachys solani f. solani CBS 191.31	-----	EUA	AF358176	-----
Clonostachys solani f. solani CBS 697.88	Casca de árvore	Alemanha	AF358216	-----
Clonostachys solani f. solani CBS 708.86	Madeira	Canadá	AF358175	-----
Clonostachys solani f. solani CBS 228.74	Tubérculo de *Solanum tuberosum*	Holanda	-----	AF358243
Clonostachys solani f. solani CBS 752.68	Casca de árvore	Alemanha	AF358221	AF358246
Clonostachys solani f. solani CBS 702.97	Fruta podre de *Aesculus hippocastanum*	França	AF358177	AF210687
Bionectria aureofulvella CBS 102837	Casca de árvore	Austrália	AF358220	-----
Bionectria aureofulvella CBS 200.93	Casca de *Polylepis sericea*	Venezuela	AF358182	-----
Bionectria aureofulvella CBS 195.93	Raízes de árvores	Nova Zelândia	AF358181	AF358226
Bionectria pseudochroleuca CBS 187.94	------	Guiana Francesa	AF358174	-----
Bionectria pseudochroleuca CBS 191.94	Palmeira apodrecida	Guiana Francesa	AF358173	-----
Bionectria pseudochroleuca CBS 220.93	Palmeira	Guiana Francesa	AF358172	-----
Bionectria pseudochroleuca CBS 192.94	Casca de árvore	Guiana Francesa	AF358171	AF358238
Bionectria pseudostriata CBS 120.87	Casca de árvore	Indonêsia	AF358184	-----
Bionectria pseudostriata CBS 119.87	Casca de árvore	Indonêsia	AF358183	AF358251
Bionectria samuelsii CBS 699.97	Casca de árvore	Venezuela	AF358190	AF358236
Bionectria samuelsii CBS 700.97	Casca de árvore	EUA, Porto Rico	-----	AF210689
Clonostachys divergens CBS 967.73b	Solo	Alemanha	AF358191	AF210677

a continuar...

continuação...

Isolado	Hospedeiro	Origem	Acesso GenBank	
			tub2	rDNA
Bionectria ralfsii CBS 102845	Casca de árvore	Austrália	AF358219	AF358253
Bionectria ralfsii CBS 102851	Casca de árvore	Austrália	AF358218	-----
Bionectria ralfsii CBS 703.97	Casca de árvore	Nova Zelândia	AF358217	-----
Bionectria ralfsii CBS 129.87	Casca de árvore	Nova Zelândia	AF358195	AF210676
Bionectria epichloë CBS 101037	*Sasa* sp.	Japão	AF358209	AF210675
Clonostachys miodochialis CBS 997.69	Solo	Holanda	AF358210	AF210674
Bionectria pityrodes CBS 102033	Casca de árvore	Ilhas Maurício	AF358212	AF210672
Bionectria pityrodes CBS 246.78	Casca de árvore	Brasil	-----	AF210673
Bionectria grammicospora CBS 209.93	Árvore morta	Guiana Francesa	AF358206	AF210678
Bionectria grammicosporopsis CBS 115.87	Casca de *Metrosideros* sp.	Nova Zelândia	AF358204	AF210679
Bionectria grammicosporopsis CBS 102843	Casca de árvore	Austrália	-----	AF358254
Bionectria grammicosporopsis CBS 111.87	Casca de *Coprosma* sp.	Nova Zelândia	-----	AF358255
Bionectria grammicosporopsis CBS 102834	Casca de árvore	Austrália	-----	AF358256
Bionectria subquaternata CBS 107.87	Madeira	Venezuela	AF358207	-----
Bionectria lucifer CBS 100008	------	EUA, Porto Rico	AF358208	AF210683
Bionectria levigata CBS 948.97 (Outgroup)	*Buxus sempervirens*	França	AF358196	AF210680
Clonostachys intermedia CBS 508.82	Solo	Holanda	AF358205	AF210682
Clonostachys chlorina CBS 287.90	Solo	Brasil	-----	AF210681
Bionectria rossmaniae CBS 211.93	Casca de cipó	Guiana Francesa	-----	AF210665
Bionectria rossmaniae CBS 210.93	Casca de galhos	Guiana Francesa	AF358213	AF358227
Bionectria sesquicillii CBS 180.88	Galhos e Liquéns	Guiana	AF358214	AF210666
Clonostachys candelabrum CBS 504.67	Solo	Holanda	-----	AF210668
Clonostachys phyllophila CBS 685.96	-----	Cuba	-----	AF210663
Clonostachys phyllophila CBS 921.97	Folhas de *Viscum album*	França	-----	AF210664
Bionectria setosa CBS 917.97	Galho apodrecido	EUA, Porto Rico	-----	AF210669
Clonostachys setosa CBS 834.91	*Trophis racemosa*	Cuba	AF358211	AF210670
Bionectria coronata CBS 696.93	Folhas de *Buxus sempervirens*	França	AF358215	AF210667

Tabela 3. Lista de isolados de *Fusarium* e outgroups incluidos no trabalho, com seus países de origem e hospedeiros.

Isolado	Hospedeiro	Origem	Acesso GenBank
			EF-1α
Fusarium acuminatum IBE000005	Sementes de arroz	China	EF531236
Fusarium acuminatum IBE000006	Raízes de trigo	China	EF531237
Fusarium ambrosium NRRL 20438	-----	-----	AF178332
Fusarium ambrosium NRRL 22346	-----	-----	FJ240350
Fusarium avenaceum VI01036	*Hordeum vulgare*	Noruega	AJ543516
Fusarium avenaceum VI01203	*Triticum aestivum*	Noruega	AJ543520
Fusarium hostae NRRL29647	-----	-----	AF324327
Fusarium hostae RBG3994	-----	-----	HQ667160
Fusarium lateritium MT-F140	Aspargo	Canadá	AY337435
Fusarium lichenicola NRRL 28030	Patogênico em humanos	Tailândia	DQ246877
Fusarium lichenicola NRRL 32434	Patogênico em humanos	Alemanha	DQ246977
Fusarium miscanthi MUCL53235	-----	-----	HQ683751
Fusarium miscanthi NRRL26239	-----	-----	AF324332
Fusarium nisikadoi NRRL25183	-----	-----	AF324330
Fusarium nygamai FRC M1374	Sorgo	Austrália	AY337445
Fusarium oxysporum ER 1259	Lentilha	Itália	EU259818
Fusarium oxysporum ER 1260	Lentilha	Itália	EU281659
Fusarium phaseoli MAFF 239038	-----	-----	AB674291
Fusarium phaseoli NRRL22276	-----	-----	AY220186
Fusarium proliferatum MT-F147	Aspargo	Canadá	AY337420
Fusarium proliferatum KSU 12913	-----	-----	AY660014
Fusarium redolens NRRL 25123	-----	-----	JF740748
Fusarium sacchari FRC M8399	*Musa sapientum*	Honduras	AY337447
Fusarium sacchari NRRL 52794	-----	-----	JF740862
Fusarium sinensis IBE000007	Sementes de trigo	China	EF531235
Fusarium sinensis IBE000008	Raízes de trigo	China	EF531238
Fusarium solani NRRL 52798	-----	-----	JF740866
Fusarium solani VI04898	Biofilme	Noruega	FN689821
Fusarium subglutinans FRC M3696	Milho	EUA	AY337444
Fusarium torulosum VI01185	*Avena sativa*	Noruega	AJ543613
Fusarium torulosum VI01411	-----	-----	AJ543614
Fusarium tricinctum VI01156	*Hordeum vulgare*	Noruega	AJ543627
Fusarium tricinctum VI01419	-----	-----	AJ543626
Fusarium tucumaniae NRRL31096	*Glycine max*	Argentina	AY220181
Fusarium tucumaniae NRRL31100	*Glycine max*	Argentina	AY220185
Fusarium virguliforme NRRL 22825	*Glycine max*	EUA, Indiana	GU170635
Fusarium virguliforme NRRL 36898	*Glycine max*	Argentina	FJ919493
Fusarium pseudograminearium RBG3580 (Outgroup)	-----	-----	HQ667168

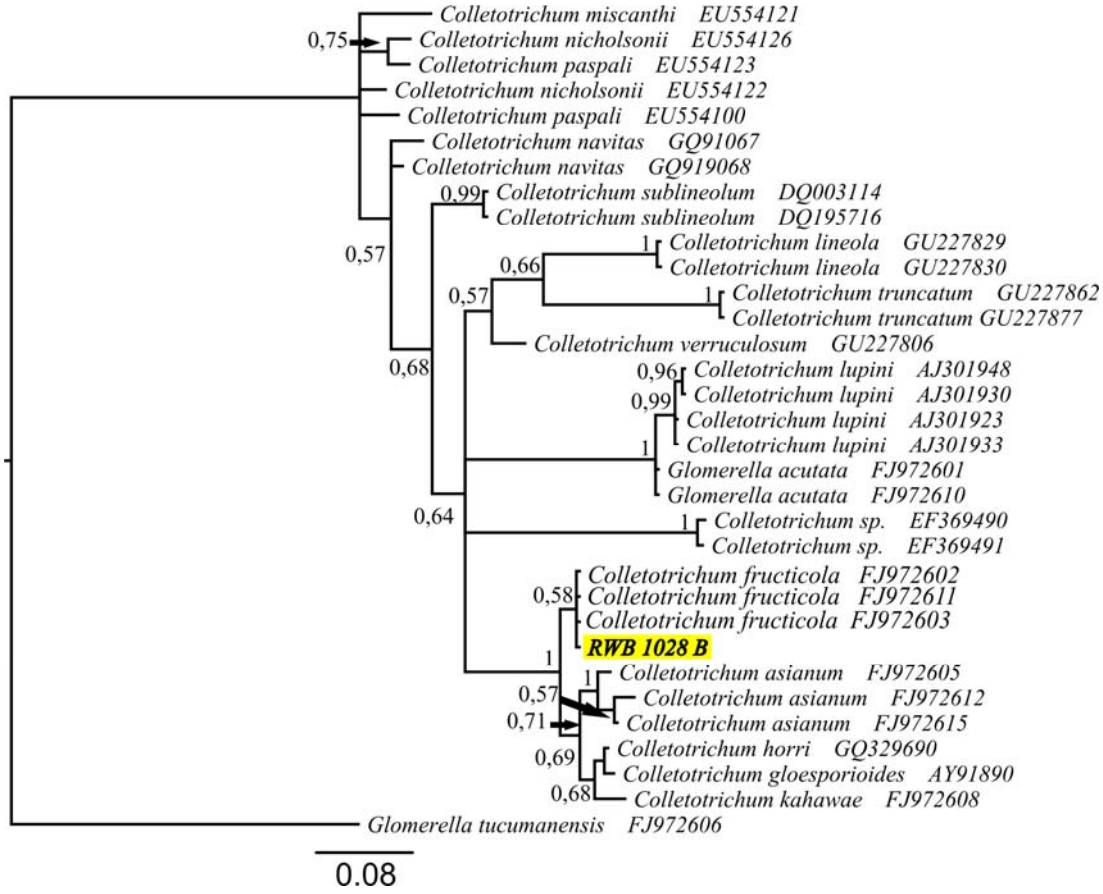


Figura 1. Relações filogenéticas de isolados de *Colletotrichum* inferidas pela análise Bayesiana de parte da região ITS. Os números acima das linhas representam os valores de probabilidade a posteriori. Destaque em amarelo para *Colletotrichum fructicola*, isolado RWB 1028 B, obtido de *Cyrtopodium cardiochilum*.

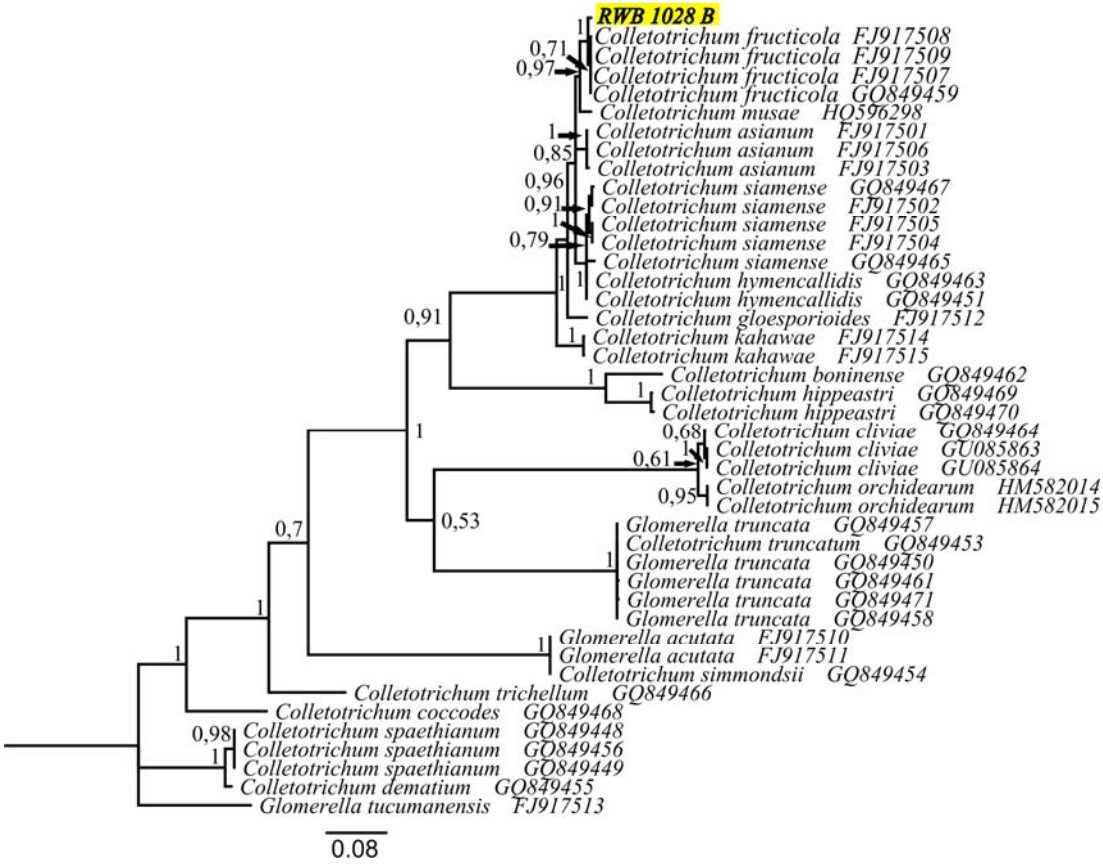


Figura 2. Relações filogenéticas de isolados de *Colletotrichum* inferidas pela análise Bayesiana de parte da região calmudulina. Os números acima das linhas representam os valores de probabilidade a posteriori. Destaque em amarelo para *Colletotrichum fructicola*, isolado RWB 1028B obtido de *Cyrtopodium cardiochilum*.

.

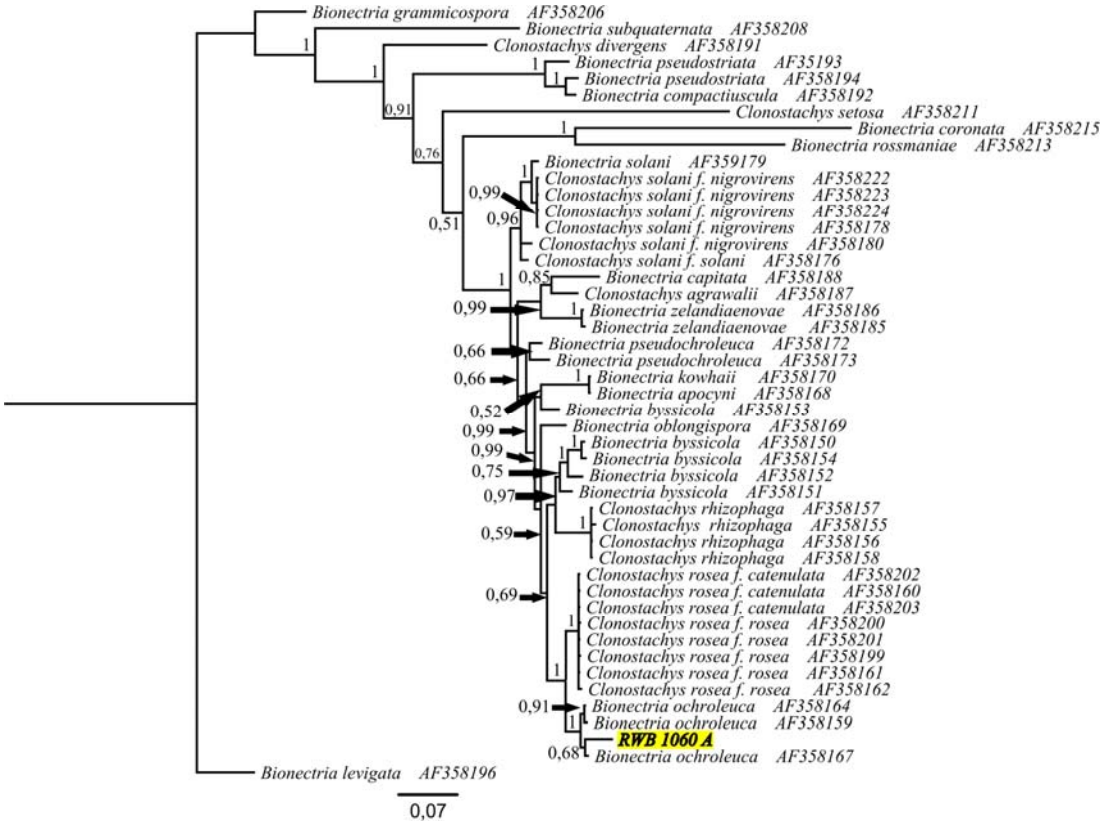


Figura 3. Relações filogenéticas de isolados de *Bionectria* inferidas pela análise Bayesiana de parte da região *tub2*. Os números acima das linhas representam os valores de probabilidade a posteriori. Destaque em amarelo para *Bionectria ochroleuca*, isolado RWB 1060 A obtido de *Cyrtopodium cardiochilum*.

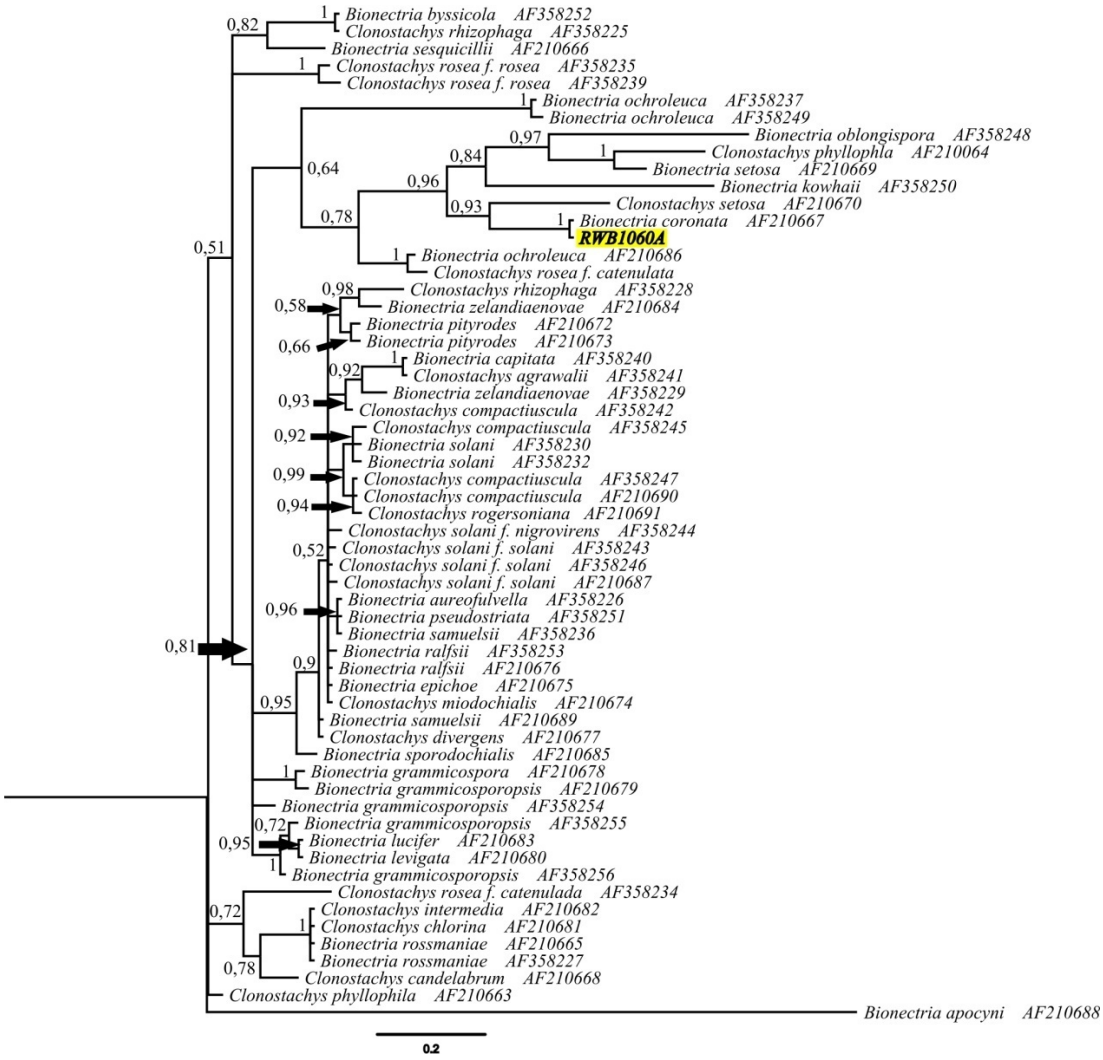


Figura 4. Relações filogenéticas de isolados de *Bionectria* inferidas pela análise Bayesiana de parte da região ITS. Os números acima das linhas representam os valores de probabilidade a posteriori. Destaque em amarelo para *Bionectria ochroleuca*, isolado RWB 1060 A, obtido de *Cyrtopodium cardiochilum*

.

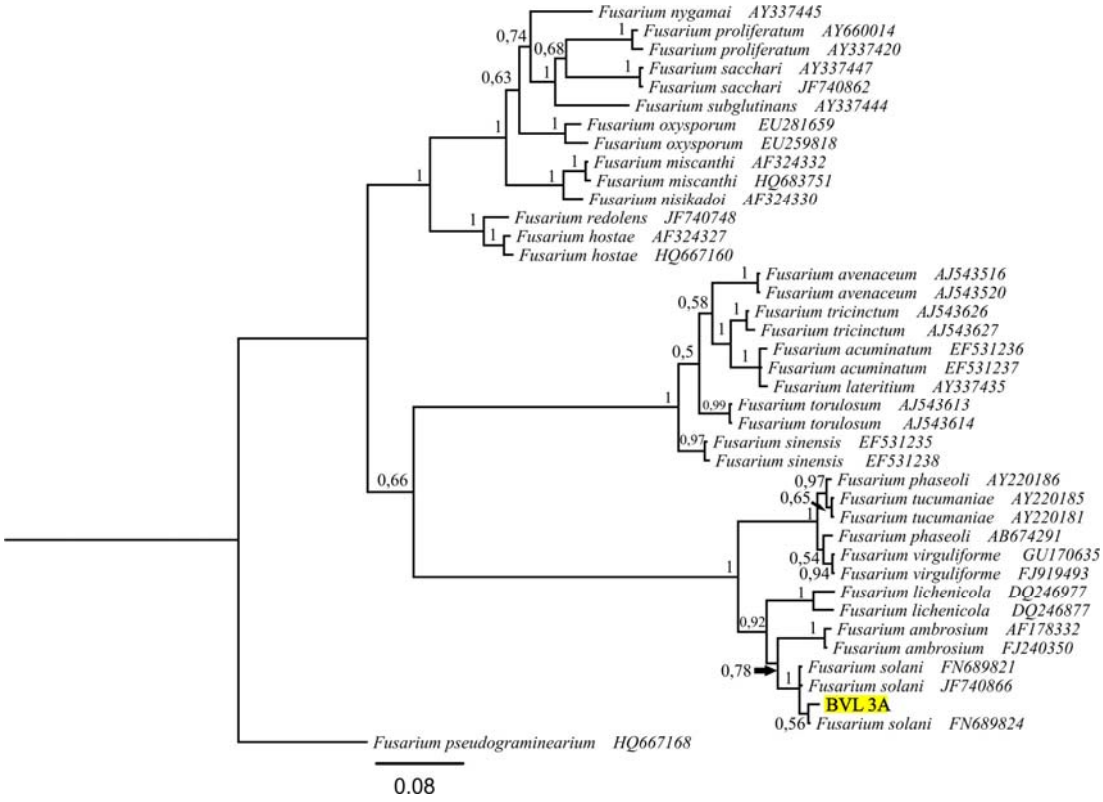


Figura 5. Relações filogenéticas de isolados de *Fusarium* inferidas pela análise Bayesiana de parte da região EF-1α Os números acima das linhas representam os valores de probabilidade a posteriori. Destaque em amarelo para *Fusarium solani,* isolado BVL 3 A, obtido de *Cyrtopodium cardiochilum*.

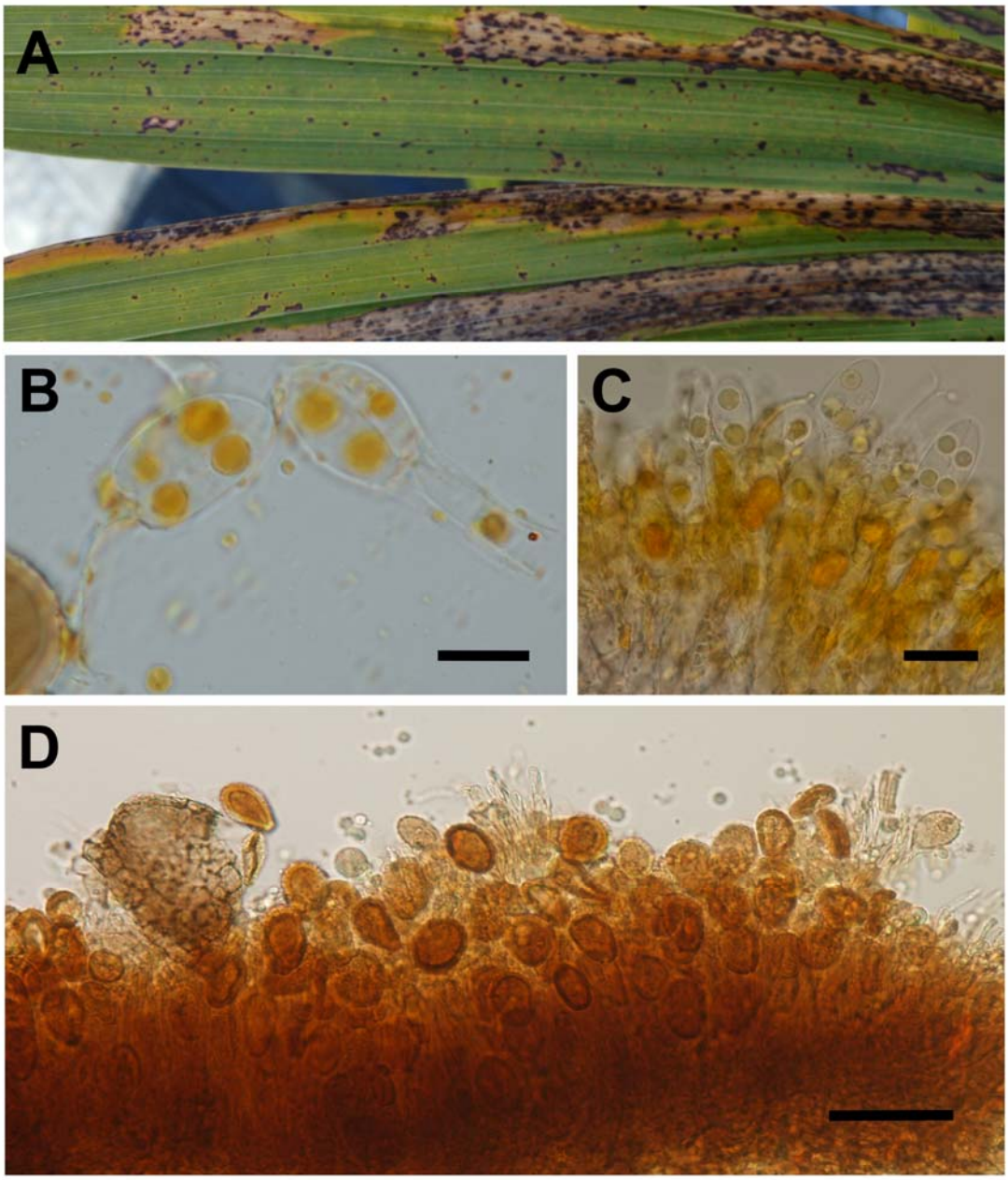


Figura 6. *Sphenospora kevorkianii* em *Cyrtopodium cardiochilum*. **A**. Pústulas de ferrugem em folhas de *C. cardiochilum*. **B**. Teliósporos hialinos pedicelados. Barra = 20 µm**. C.** Télia. Barra = 50 µm. **D**. Urédia e urediniósporos. Barra = 50µm.

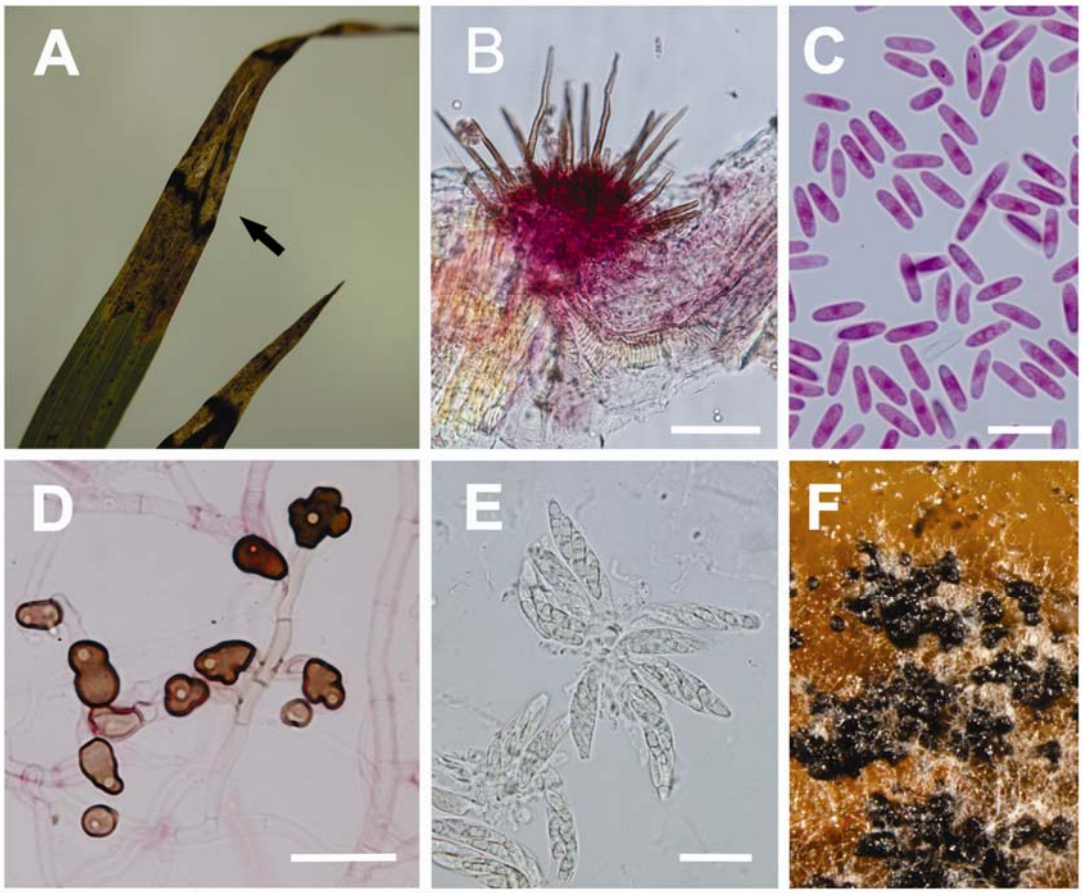


Figura 7. *Colletotrichum fructicola* em *Cyrtopodium cardiochilum*. **A**. Lesões em folhas de *C. cardiochilum*. **B**. Acérvulo com setas. Barra = 20 µm**. C.** Conídios cilíndricos. Barra = 20 µm. **D**. Apressórios com formatos variados. Barra = 20 µm. **E**. Ascas clavadas e fasciculadas. Barra = 5µm. **F**. Peritécios globosos formados em meio de cultura.

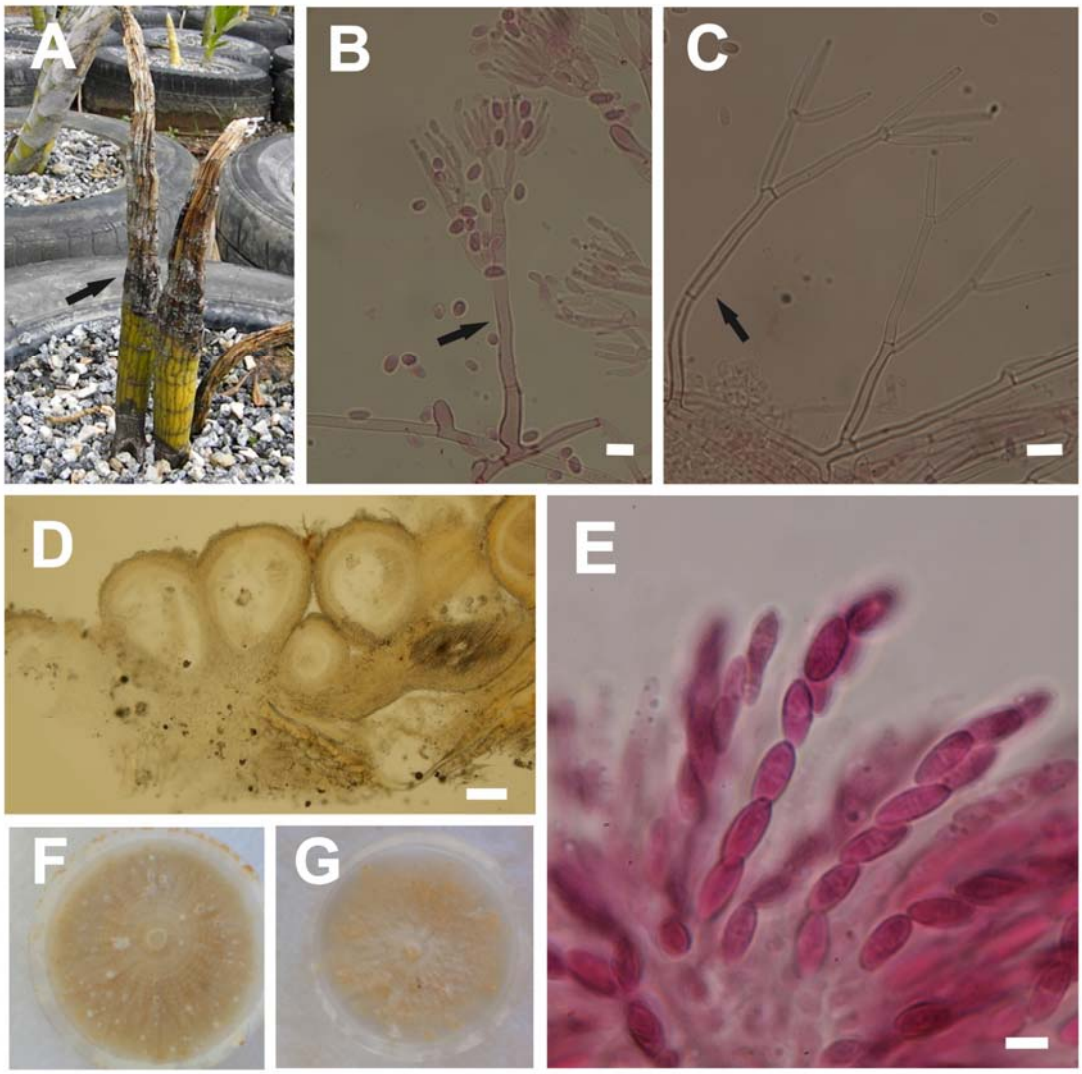


Figura 8. *Bionectria ochroleuca* em *Cyrtopodium cardiochilum*. **A**. Sintoma de apodrecimento no pseudobulbo. **B**. Conidióforo secundário. Barra = 5 µm. **C**. Conidióforos primários. Barra = 100 µm. **D**. Peritécios globosos a subglobosos. Barra = 100µm. **E**. Ascas e ascósporos. Barra= 5 µm. **F**. Colônia em meio de aveia (AA). **G**. Colônia em meio BDA.

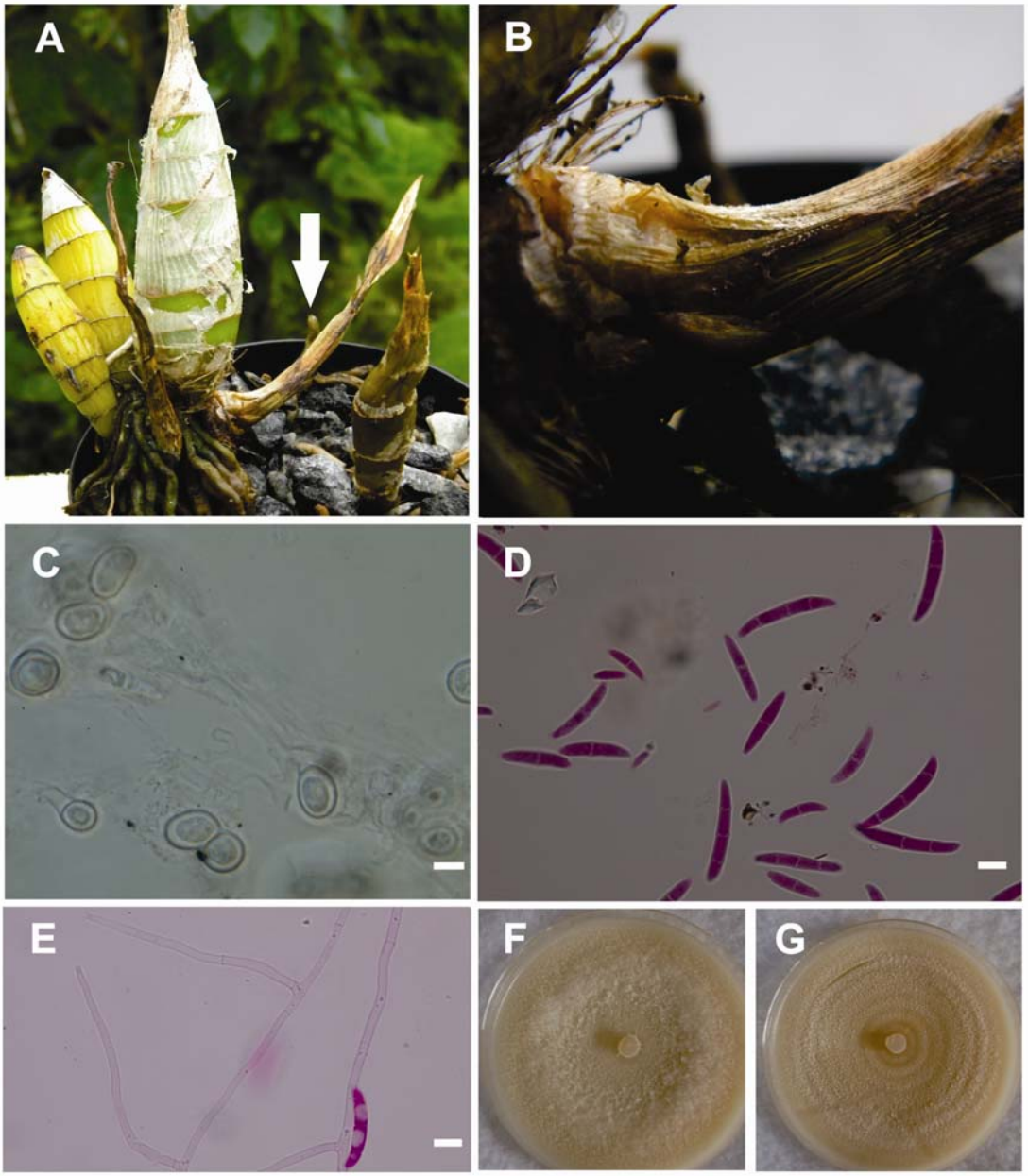


Figura 9. *Fusarium solani* em *Cyrtopodium cardiochilum*. **A**. Sintomas de apodrecimento de pseudobulbos. **B**. Sinais e sintomas de *F. solani* em pseudobulbo de *C. cardiochilum* doente. **C**. Clamidósporos globosos a ovais. Barra = 10 µm**. D.** Macro e microconídios. Barra = 10 µm. **E.** Monofiálides longas**.** Barra = 20µm. **F**. Colônia de *F. solani* no meio de aveia (AA). **G**. Colônia de *F. solani* no meio BDA.

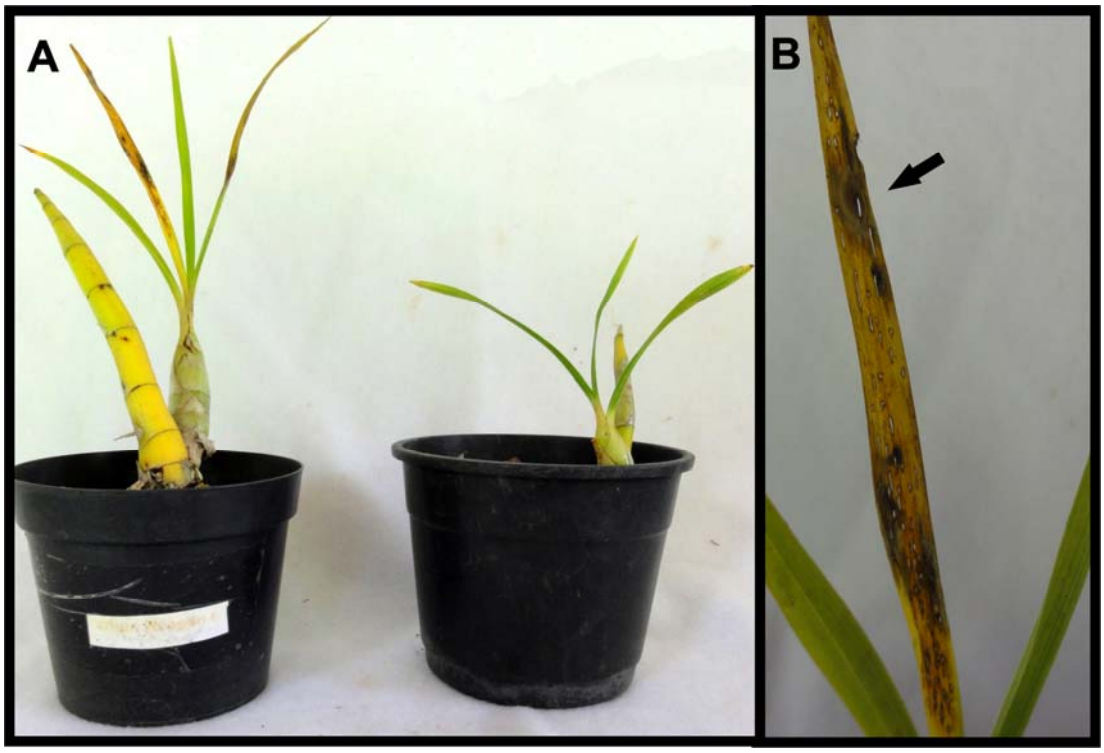


Figura 10. Teste de patogenicidade de *Colletotrichum fructicola* em folhas de *Cyrtopodium cardiochilum*, 20 dias após inoculação. **A**. Planta testemunha (direita), planta inoculada (esquerda). **B**. Detalhe da lesão na folha.

Figura 11. Teste de patogenicidade de *Bionectria ochroleuca* em pseudobulbo de *Cyrtopodium cardiochilum*, 25 dias após inoculação. Necrose escura e acentuada no pseudobulbo (esquerda), pseudobulbo sem sintomas (testemunha - direita).

Figura 12. Teste de patogenicidade de *Fusarium solani* em pseudobulbo de *Cyrtopodium cardiochilum*, 20 dias após inoculação. Necrose escura e acentuada no pseudobulbo (esquerda), pseudobulbo sem sintomas (testemunha - direita).

CAPÍTULO 5

Controle químico de fungos causadores de podridões de pseudobulbos em *Cyrtopodium cardiochilum*

Brenda V. Lima, Cícero F. Guimarães, Laércio Zambolim, Robert W. Barreto

Resumo

Durante os estudos pioneiros visando à domesticação de *Cyrtopodium cardiochilum*, orquídea nativa do Brasil, para fins de exploração de seu extrato para fins cosméticos e farmacêuticos, observou-se que as podridões de pseudobulbos causadas pelos fungos *Fusarium solani* e *Bionectria ochroleuca* podem representar obstáculo importante para o estabelecimento de cultivos comerciais. Tendo em vista a inexistência de estudos anteriores por fitopatologistas sobre doenças de plantas do gênero *Cyrtopodium* e seu manejo, realizou-se um estudo sobre o controle químico destes dois agentes de podridões. Visando ao controle desses patógenos foi avaliada a eficiência de fungicidas nas condições *in vitro* e *in vivo.* Um ensaio foi efetuado *in vitro* para avaliação da eficiência de inibição dos dois fungos pelos seguintes produtos fungicidas nas concentrações recomendadas para aplicação rotineira em culturas agrícola: tiofanato metílico (0,1 g 100 mL^{-1}), captan (0,25 g 100 mL^{-1}), metalaxyl-M + mancozeb (0,3 g 100 mL^{-1}) e tiram (0,2 g 100 mL^{-1}). *Fusarium solani* foi mais ativamente inibido por tiofanato metílico, captan e tiram, enquanto que *B. ochroleuca* foi mais sensível a tiram e tiofanato metílico. Posteriormente, baseados nos resultados deste experimento, avaliou-se o efeito, também *in vitro*, de diferentes concentrações de tiram, tiofanato metílico sobre os fungos *F. solani* e *B. ochroleuca*. Tanto para *F. solani* quanto para *B. ochroleuca* a concentração de 0,05 g 100 mL^{-1} e 0,025 g 100 mL^{-1} de tiram e tiofanato metílico respectivamente, foram capazes de inibir o crescimento micelial. Considerando-se a dificuldade de obtenção de plantas de *C. cardiochilum* em número suficiente e com um mesmo padrão para a condução de experimentos, procurou-se uma espécie de orquídea, dentre as mais comumente comercializadas, para substituí-la nos ensaios *in vivo.* Representantes de nove gêneros de orquídeas foram inoculados com os dois fungos. Dentre estes gêneros, somente *Cattleya* e *Laelia* foram suscetíveis a ambos os fungos, portanto, serviriam de substitutos (orquídeas-modelo) apropriados. Ainda, previamente à realização do

experimento visando avaliar os produtos e concentrações selecionadas *in vivo*, realizou-se um experimento visando determinar a concentração ideal a ser utilizada para as inoculações de cada um dos patógenos, nos experimento de controle químico *in vivo*. Todas as concentrações de inóculo de *F. solani* e *B. ochroleuca* testadas, foram capazes de causar podridão de raízes do híbrido de *Cattleya (Laeliacattleya* Tropical Sunset x *Brassolaeliacattleya* Chian T3Y Beauty). Foram analisados os ingredientes ativos tiram e tiofanato metílico na concentração de 0,05 g 100 mL^{-1} e 0,025 g 100 mL^{-1} no cultivo *in vivo* (em plantas infectadas) para confirmar se os mesmos teriam a mesma eficiência no controle das podridões ocasionada por *F. solani* e *B. ochroleuca* obtida *in vitro.* Problemas no fornecimento de mudas para o teste *in vivo* levaram à substituição do híbrido de *Cattleya* (*Laeliacattleya* Tropical Sunset x *Brassolaeliacattleya* Chian T3Y Beauty) utilizado no ensaio para determinação da concentração de inóculo por outros materiais (*Laelia purpurata* e *Cattleya porphyroglossa*). Infelizmente, não foi observado o aparecimento de sintoma em nenhum tratamento e nem na testemunha e o experimento resultou inconclusivo. Isso pode ter resultado de condições ambientais desfavoráveis ou talvez de inesperada resistência das espécies utilizadas.

1. INTRODUÇÃO

A geração de informação básica sobre a biologia e manejo agronômico é necessária para a domesticação de espécies de plantas que ocorrem apenas em ecossistemas naturais. Como parte deste processo de domesticação da espécie é importante, detectar e caracterizar os patógenos que ameaçam a futura cultura, além de investigar o controle de patógenos que poderiam prejudicar, ou mesmo inviabilizar o cultivo comercial de tais espécies (Jorge, 2004; Scheffer et al., 2005).

Durante os estudos pioneiros visando à domesticação de *Cyrtopodium cardiochilum* Lindly., orquídea nativa do Brasil, para fins de exploração de seu extrato para fins cosméticos e farmacêuticos, observou-se a ocorrência de doenças fúngicas no campo e em cultivos experimentais. O levantamento preliminar desta micobiota fitopatogênica foi efetuado no contexto deste estudo e revelou que as podridões de pseudobulbos causadas por *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. e *Bionectria ochroleuca* (Schwein.) Schroers & Samuels, possivelmente representem as doenças

mais ameaçadoras para os futuros cultivos de *C. cardiochilum* podendo representar obstáculo importante para o estabelecimento de cultivos comerciais. Perdas de pseudobulbos ou de plantas em cultivos de orquídea podem ter grande impacto, particularmente considerando-se o crescimento lento das plantas e o elevado valor individual das plantas.

De maneira geral, o controle das enfermidades fúngicas em orquidáceas é baseado em métodos culturais, como por exemplo, a remoção e a destruição imediata das plantas doentes, no caso de controle de murcha de *Fusarium*; o manejo da irrigação e o isolamento de plantas doentes para o controle de fungos causadores da antracnose; diminuição da adubação nitrogenada e a eliminação das raízes infectadas para o controle de podridão de raízes (Farias et al., 2010). No entanto, o controle químico vem sendo utilizado para o controle de algumas dessas doenças fúngicas, embora, sejam poucos os produtos fitossanitários registrados para as orquídeas e plantas ornamentais de maneira geral (Simone & Burnett, 2002; Mapa, 2012).

Durante a condução de experimentos envolvendo plantas de *C. cardiochilum* em casa de vegetação no campus da Universidade Federal de Viçosa, observou-se um surto de podridão que se alastrou rapidamente, colocando em risco todo o conjunto de plantas que seria usado em experimentos planejados (apresentados em separado). Para não perder estas plantas e buscando-se obter o controle imediato dos patógenos causadores de podridões (*F. solani* e *B. ochroleuca*) realizou-se uma tentativa empírica de controle por tratamento de imersão completa das plantas em uma solução contendo uma mistura de tiofanato metílico (3,3 g L^{-1}) e tiram (0,7 g L^{-1}). Observou-se, posteriormente, que o tratamento resultou no completo controle da doença em todas as plantas, com um notável efeito curativo. Entretanto, esta deve ser tratada como uma observação isolada e uma recomendação confiável para os futuros produtores depende da realização de experimentos sob controle mais rígido.

Como são escassos os estudos envolvendo o controle de podridão em orquídeas, o presente trabalho teve como objetivo avaliar fungicidas selecionados no controle de *F. solani* e *B. ochroleuca* nas condições *in vitro* e *in vivo.*

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Controle químico *in vitro*

2.1.1 Obtenção dos isolados

O isolado de *B. ochroleuca* utilizado foi obtido de pseudobulbo de *C. cardiochilum* apresentando sintoma de podridão de pseudobulbos com estromas e peritécios típicos do patógeno, coletado em cultivo experimental em Riograndina (município de Nova Friburgo, estado do Rio de Janeiro). O isolado de *F. solani* utilizado foi obtido de plantas que apresentaram-se doentes na casa de vegetação.

Para os testes com os fungicidas, os fungos *F. solani* e *B. ochroleuca* foram primeiramente cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) por 10 dias a temperatura de 25 °C e discos retirados da periferia de colônias crescendo ativamente foram utilizados para dar início aos experimentos descritos a seguir.

2.1.2. Atividade dos fungicidas na inibição do crescimento micelial

Foi avaliada, a eficiência *in vitro* de quatro ingredientes ativos (i.a) em suas doses recomendadas para uso em controle de doenças de plantas (Tabela 1), com a finalidade de verificar sua possível atividade inibitória sobre o crescimento micelial dos dois agentes de podridões de *C. cardiochilum*: *F. solani* e *B. ochroleuca*. Tendo em vista o tipo de doença causado por *B. ochroleuca* optou-se por testar para este fungo alguns dos fungicidas e doses recomendadas para o controle de doenças causadas por *F. solani*, para a execução deste estudo. Os ingredientes ativos (i.a) analisados foram: tiofanato metílico (1 g L^{-1}), captan (2,5 g L^{-1}), metalaxyl-M + mancozeb (3 g L^{-1}) e tiram (2 g L^{-1}). Estes foram adicionados diretamente a quatro frascos contendo 100 mL de meio de cultura BDA cada, após a autoclavagem, quando a temperatura do frasco que continha o meio se tornou tolerável ao tato. Depois da adição de cada i.a separadamente no meio em cada frasco, estes foram agitados para homogeneização e os meios foram vertidos em oito placas de Petri para cada ingrediente ativo. Depois da solidificação do meio de cultura, discos de 6 mm de diâmetro das culturas de cada um dos fungos foram usados para semear centralmente cada placa. As placas foram mantidas em uma incubadora BOD a 25 ± 2 ° C e no escuro. A partir de 48 h de incubação foram realizadas avaliações com a

medição diária do crescimento da colônia em milímetros com auxílio de uma régua milimetrada. Cada medida do crescimento radial foi oriunda da média entre duas medidas opostas do diâmetro da colônia. A leitura final foi feita quando a colônia fúngica na testemunha (sem fungicida) atingiu a borda da placa. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), composto por 5 tratamentos e 8 repetições. A variável analisada foi a área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM), utilizando a fórmula: AACCM =Σ((yi + yi+1)/2.dti), onde yi e yi+1 são os valores de crescimento da colônia observados em duas avaliações consecutivas e dti o intervalo entre as avaliações. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Utilizou-se o programa estatístico Assistat.

Em função dos resultados obtidos no ensaio prévio envolvendo os diferentes ingredientes ativos em suas doses recomendadas foi realizado um segundo experimento, no qual se avaliou diferentes concentrações dos i.a, incluindo a dose testada no experimento anterior (dose recomendada). Foram avaliadas seis concentrações de cada ingrediente ativo, com oito repetições (Tabela 2). Prepararam-se soluções estoques para cada ingrediente ativo e a partir destas, obtiveram-se as concentrações desejadas que foram misturadas ao meio BDA fundente, como descrito para o experimento anterior. Cada placa foi semeada centralmente com um disco de micélio de *F. solani* ou de *B. ochroleuca* e estas foram mantidas nas condições descritas para o experimento anterior. A avaliação também obedeceu ao mesmo procedimento descrito anteriormente. Foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com 6 tratamentos e 8 repetições por tratamento, cada unidade experimental foi representada por uma placa de Petri. As variáveis analisadas foram a percentagem da inibição do crescimento micelial calculado pela fórmula de Abbott: ICM(%) = (T-t)*100/T, onde T é a testemunha e t o tratamento e área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM). Para as variáveis que apresentaram efeito significativo de acordo com a ANOVA, foram ajustados modelos de regressão com base no coeficiente de determinação (R^2).

2.2 Controle químico *in vivo*

2.2.1 Busca de uma espécie de orquídea modelo

Um ensaio foi realizado com o propósito simultâneo de avaliação parcial da gama de hospedeiros dos fungos apodrecedores de pseudobulbos (*F. solani* e *B. ochroleuca*) e de escolha de espécies ou híbridos representando um ou mais gêneros de orquídeas, dentre as mais comumente cultivadas comercialmente, para substituir *C. cardiochilum* nos experimentos de controle químico, uma vez que a disponibilidade de plantas dessa espécie era insuficiente para a realização dos experimentos de controle químico *in vivo*. Os materiais selecionados para a análise foram plantas dos gêneros: *Oncidium, Cymbidium, Cattleya, Epidendrum, Miltonia, Laelia, Phalaenopsis, Zygopetalum, Denphal.* Para o teste de especificidade dos fungos, estes foram cultivados, separadamente em placas contendo BDA. Sobre a superfície do meio foram depositados palitos de dente previamente autoclavados. Decorridos três semanas, os palitos estavam totalmente encobertos/colonizados pelos dois fungos em separado. Estes foram então retirados das placas e introduzidos aleatoriamente nos pseudobulbos de cada exemplar das orquídeas. Após inoculação, as plantas permaneceram em câmara úmida por 48 h. Decorrido esse periodo, elas foram encaminhadas para casa de vegetação. As plantas foram observadas diariamente para detecção do aparecimento de sintomas de podridão. As observações se estenderam por um período de 30 dias. Com o aparecimento dos sintomas foi realizado isolamento dos fungos para comprovação da patogenicidade e a avaliação foi feita com base na medida do diâmetro externo das lesões associadas ao ponto de inserção de cada palito.

2.2.2 Determinação da concentração de inóculo

A determinação da melhor concentração para ser utilizada na inoculação dos fungos no experimento do controle químico *in vivo* foi feita com base no uso de cinco concentrações de inóculo: 0, 10^3, 10^4, 10^5 e 10^6 esporos⁄mL. Para obtenção do inóculo, os fungos foram cultivados em BDA, conforme descrito anteriormente e a suspensão conidial foi preparada depois de 10 dias pela deposição de 10 mL de água esterilizada no interior das placas seguida de raspagem da superfície do meio

esporulante com uma espátula de borracha. A suspensão foi ajustada para cada concentração com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

Mudas de 24 meses (aproximadamente 10 cm de altura), cultivadas em bandejas de semeadura de plástico contendo substrato esfagno foram retiradas do recipiente e o substrato foi cuidadosamente removido. Com o auxilio de uma tesoura efetuaram-se pequenos cortes (ferimentos) nas extremidades de todas as raízes do híbrido de *Cattleya* (*Laeliacattleya* Tropical Sunset x *Brassolaeliacattleya* Chian T3Y Beauty). As raízes foram submersas em suspensões de esporos de *F. solani* e *B. ochroleuca* nas concentrações 10^3, 10^4, 10^5 e 10^6 esporos/mL por um 1 min. As raízes feridas das testemunhas foram imersas em água. Após a imersão, as mudas foram transplantadas para vasos de polietileno de 6,0 cm de altura e 7,2 cm de diâmetro de boca, preenchidos com 4,0 g de substrato (esfagno). O substrato de cada vaso foi irrigado com duas horas de antecedência com 200 mL de água, com a finalidade de mantê-lo úmido, criando dessa forma uma condição favorável para os fungos penetrarem e colonizarem as raízes. Posteriormente, os vasos foram colocados em uma câmara de crescimento sob 22 ° C.

As mudas foram irrigadas em intervalo de três dias, evitando-se um encharcamento que pudesse favorecer excessivamente a ocorrência de podridões radiculares. Após quinze dias, as mudas foram adubadas com o fertilizante liquído B & G Orquídeas ®, de seguinte constituição: 5 dag Kg^{-1} de N, 6 dag Kg^{-1} de P_2O_5, 7 dag Kg^{-1} de K_2O, 2,5 dag Kg^{-1} de Ca e 0,7 dag Kg^{-1} de Mg. Foi retirado 1 mL do fertilizante e diluído em 1 L de água. A dose aplicada foi de 5 mL por planta.

O experimento foi conduzido em blocos casualizados com 5 tratamentos e 9 repetições. Decorridos 30 dias realizou-se a avaliação com base na incidência de doenças nas raízes. Para a avaliação, a interação foi considerada positiva, ou seja, presença dos sintomas da doença, quando se observou necroses escuras nas raízes com eventual presença dos sinais dos patógenos e negativas para doença, quando as raízes se apresentaram sadias. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e para as variáveis que apresentaram efeito significativo, foram ajustados modelos de regressão com base no coeficiente de determinação (R^2).

2.2.3. Efetividade dos fungicidas tiram e tiofanato metílico no controle de *F. solani* e *B. ochroleuca*

A partir dos resultados obtidos *in vitro,* foram testados os fungicidas tiram e tiofanato metílico nas concentrações de 0,05 g 100 mL^{-1} e 0,025 g 100 mL^{-1} respectivamente para o controle das podridões de *F. solani* e de *B. ochroleuca.* Para tal realizaram-se dois experimentos, *F. solani* foi testado em *Cattleya porphroglossa* e *B. ochroleuca* em *Laelia purpurata.* Para ambos os experimentos a metodologia utilizada foi a mesma.

O inóculo dos fungos foi produzido como descrito no item anterior, assim como o procedimento para inoculação. Mudas de 20 meses (aproximadamente de 15 cm de altura), cultivadas em vasos de polietileno contendo brita de gnaisse e argila expandida como substrato foram retiradas do recipiente e o substrato foi cuidadosamente removido. Com o auxílio de uma tesoura, realizaram-se pequenos cortes (ferimentos) nas extremidades das raízes das orquídeas. As raízes de *Cattleya porphroglossa* foram submersas em suspensão de esporos de *F. solani* na concentração de 10^4 esporos⁄mL e as raízes de *Laelia purpurata* foram imersas em uma suspensão de esporos de *B. ochroleuca* na concentração de 10^5 esporos⁄mL. O período de imersão foi de 1 min. Após a imersão, o procedimento adotado foi idêntico ao descrito no experimento anterior. Decorrido 48 h, tempo este suficiente para os fungos penetrarem nas raízes, os ingredientes ativos tiofanato metílico (0,025 g 100 mL^{-1}), tiram (0,05 g 100 mL^{-1}) e tiofanato metílico + tiram (0,025 g 100 mL^{-1} + 0,05 g 100 mL^{-1}) foram aplicados nas mudas correspondentes a cada tratamento, por meio de um regador, aplicando-se a solução proxima ao substrato.

Em razão de 100 mL das soluções dos ingredientes ativos não serem capazes de atingir toda a superfície radicular, um maior volume da solução foi necessário para suprir esse problema, mantendo-se a mesma concentração dos ingredientes ativos. Portanto, 0,1 g e 0,05 g de tiram e tiofanato metílico respectivamente foram pesados em uma balança analítica e adicionados a 200 mL de água. Após aplicação dos i.a, todos os vasos foram colocados novamente na câmara de crescimento. As mudas foram irrigadas em intervalos de três dias, como para o experimento anterior. Após quinze dias de instalado o experimento, as mudas também foram adubadas como descrito para o experimento anterior.

Cada experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados, com 5 tratamentos e 6 repetições. Para ambos os experimentos, as análises foram baseadas nos seguintes tratamentos: T1- Testemunha negativa (sem inoculação com o fungo), T2- Testemunha positiva (com o fungo), T3- Inoculação seguida de tratamento com o fungicida tiofanato metílico, T4- Inoculação seguida do tratamento com o fungicida tiram, T5- Inoculação, seguida do tratamento com os fungicidas tiofanato metílico + tiram.

Após 30 dias, a avaliação foi realizada com base na incidência de doenças nas raízes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Controle químico *in vitro*

3.1.2. Atividade dos fungicidas na inibição do crescimento micelial

No primeiro experimento foram observadas diferenças ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos em relação à variável área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM). Para o fungo *F. solani,* tiofanato metílico, tiram e captan foram os que se mostraram mais eficientes em relação à AACCM, ou seja, foram os mais eficazes no controle do crescimento micelial (Tabela 3).

Com base nos dados mostrados na Tabela 4 constatou-se que para *B. ochroleuca* também houve diferença ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos em relação à AACCM. No entanto, somente tiofanato metílico e tiram foram eficientes no controle do crescimento micelial (Tabela 4).

Para o segundo experimento, referente à avaliação de diferentes concentrações dos i.a, utilizou-se somente os fungicidas que se mostraram eficientes no controle do crescimento micelial em relação à variável AACCM. Ou seja, para o fungo *F. solani* utilizaram-se os fungicidas tiofanato metílico, tiram e captan, e para *Bionectria* os fungicidas tiofanato metílico e tiram.

Observou-se para o fungo *F. solani*, que houve diferença ($p \leq 0,05$) entre os i.a e as concentrações testadas para as às variáveis AACCM e ICM, de modo que todas as concentrações diferiram ($p \leq 0,05$) da testemunha.

Em relação à variável AACCM, as concentrações de 0,05 g 100 mL^{-1}, 0,1 g 100 mL^{-1}, 0,1 g 100 mL^{-1} de tiofanato metílico, tiram e captan respectivamente,

foram eficientes no controle do crescimento micelial (Figura 1). Contudo, para a variável ICM, concentrações mais baixas dos i.a também se mostraram eficazes para a inibição do crescimento micelial, uma vez que as concentrações de 0,025 g 100 mL^{-1} de tiofanato metílico, 0,05 g 100 mL^{-1} de tiram e 0,0625 g 100 mL^{-1} de captan resultaram em percentagem de inibição de crescimento micelial acima de 80 % (Figura 2).

Para o fungo *B. ochroleuc*a também houve diferença ($p \leq 0,05$) entre os i.a e as concentrações para as às variáveis AACCM e ICM, de modo que todas as concentrações diferiram ($p \leq 0,05$) da testemunha.

Para AACCM, as concentrações de 0,05 g 100 mL^{-1}, 0,1 g 100 mL^{-1} de tiofanato metílico e tiram respectivamente, foram eficientes em relação à variável AACCM (Figura 3). No entanto, para ICM, concentrações mais baixas também se mostraram eficazes, pois 0,05 g 100 mL^{-1} de tiram e 0,025 g 100 mL^{-1} de tiofanato metílico foram capazes de inibir o crescimento micelial em porcentagens superiores a 80%. e 90% respectivamente (Figura 4).

Esses resultados foram considerados promissores em termos de utilidade potencial dos produtos para fins de controle dos fungos, pois, mesmo concentrações menores dos i.a proporcionaram inibição significativa do crescimento micelial.

Na literatura existem alguns trabalhos que mostram a eficiência de alguns desses fungicidas, utilizados sozinhos ou em mistura para o controle de algumas espécies de *Fusarium* sp. (Maringoni, 1997; Pinto, 1997; Oliveira et al., 1999; Pinto, 2000; Cappelini et al., 2005). Os fungicidas tiram, tiofanato metílico e captan também são muito eficientes no controle de outros patógenos de solo e parte aérea (Reis et al., 2007; Zambolim, 2008).

Dentre os ingredientes ativos analisados no presente trabalho apenas o tiofanato metílico é registrado para orquídeas, para o controle de *Botrytis cinerea* (Mapa, 2012).

O captan, embora seja utilizado e registrado para algumas espécies de plantas ornamentais, ainda não se encontra registrado para as orquídeas (Mapa, 2012).

Nas condições em que foi realizado o experimento, os resultados permitem concluir que os fungicidas tiram na concentração de 0,05 g 100 mL^{-1}, tiofanato metílico na concentração de 0,025 g 100 mL^{-1} e captan na concentração de 0,0625 g 100 mL^{-1} foram eficientes na redução do crescimento micelial de *F. solani* e *B.*

ochroleuca. Assim, a partir dos resultados obtidos *in vitro*, optou-se por avaliar os fungicidas selecionados apenas nessas concentrações *in vivo* (em plantas infectadas). No entanto, em função da disponibilidade limitada de plantas para uso nos testes resolveu-se incluir apenas os ingredientes ativos tiram e tiofanato metílico, deixando-se captan (eficiente na inibição do crescimento micelial de *F. solani*) de fora na etapa seguinte do estudo.

3.2. Controle químico *in vivo*

3.2.1. Busca de uma espécie de orquídea modelo

Dentre os nove gêneros de orquídeas testados como possíveis substitutos (orquídeas modelo) para *C. cardiochilum* nos experimentos de controle químico, *Cattleya* e *Laelia* foram os gêneros que mais se mostraram promissores, uma vez que, ambos os fungos apodrecedores de pseudobulbos (*F. solani* e *B. ochroleuca*) foram patogênicos para o material representativo destes dois gêneros, sendo estas as únicas plantas que foram simultaneamente suscetíveis aos dois fungos produzindo lesões externas extensas (Figura 5).

As lesões externas causadas por *B. ochroleuca* foram de 10-13 mm de comprimento em *Cattleya* sp. e de 12 mm em *Laelia* sp.. Já as lesões externas provocadas por *F. solani* foram de 18 mm de comprimento em *Cattleya* sp. e de 15 mm de comprimento em *Laelia* sp.. Essas dimensões são semelhantes às causadas tanto por *F. solani* quanto para *B. ochroleuca* em *C. cardiochilum*, uma vez que as lesões externas causadas por *F. solani* foram de 11-15 mm de comprimento, e as causadas por *B. ochroleuca* foram de 5-8 mm de comprimento (Tabela 5).

Portanto, os resultados indicaram que tanto plantas pertencentes ao gênero *Cattleya* quanto plantas pertencentes ao gênero *Laelia* poderiam ser utilizadas como modelo para substituir *C cardiochilum* em experimentos envolvendo os patossistemas podridões causadas por *B. ochroleuca* e *F. solani*, inclusive os voltados às avaliações de controle químico.

Os gêneros *Cattleya* e *Laelia* são muito proximamente relacionados filogeneticamente, sendo a principal característica morfológica que as distingue a quantidade de políneas presentes na antera - nas espécies do gênero *Laelia* o número de políneas é o dobro das de *Cattleya* (Faria et al., 2010). Não é, portanto inesperado

que estes dois gêneros tenham semelhanças no tocante à suscetibilidade a fitopatógenos pouco específicos, como é o caso de *F. solani* e parece ser o caso de *B. ochroleuca.*

3.2.2. Determinação da concentração de inóculo

A incidência de podridões de raízes causada pelos fungos *F. solani* e *B. ochroleuca* não variou significativamente em função das concentrações de inóculo testadas. Concentrações diferiram não produzindo níveis de incidência diferentes para os dois patógenos. Todas as concentrações de inóculo de *F. solani* e *B. ochroleuca* testadas foram capazes de causar necrose nas raízes da maioria das plantas inoculadas do híbrido de *Cattleya* (*Laeliacattleya* Tropical Sunset x *Brassolaeliacattleya* Chian T3Y Beauty) (Figuras 6 e 7).

De acordo com Benyoun et al. (1996) a concentração de 8 x 10^4 esporos⁄mL de *Fusarium solani, F. oxysporum, F. proliferatum* e *F. subgluitinans* foi suficiente para causar sintomas em *Cymbidium* sp. E Chung et al. (2011) ao utilizarem uma suspensão de 10^5 esporos⁄mL de *Fusarium solani* para estudarem a nova forma specialis de *Fusarium solani* que causava amarelecimento foliar em *Phalaenopsis* sp., também observaram que esta concentração de esporos foi capaz de causar sintomas no hospedeiro testado.

Tendo em vista tais resultados, associado pela maior incidência obtida no presente estudo para a concentração de 10^4 esporos⁄mL, resolveu-se por adotar uma concentração de inóculo arbitrária de 10^4 esporos⁄mL para *F. solani* e para o fungo *B. ochroleuca* utilizou-se uma concentração de 10^5 esporos⁄mL, concentração esta obtida pela maior incidência encontrada no presente estudo para essa concentração, uma vez que na literatura não há nada a respeito sobre ajuste de concentração de inóculo para esse patógeno.

3.2.3. Efetividade dos fungicidas tiram e tiofanato metílico no controle de *F. solani* e *B. ochroleuca*

A inoculação de *F. solani* e *B. ochroleuca* sobre *Cattleya porphyroglossa* e *Laelia purpurata* não causou lesão em nenhum dos tratamentos analisados e nem mesmo sobre as testemunhas positivas, portanto os resultados referentes a essa parte do experimento foram inconclusivos. Condições ambientais adversas por ocasião da

inoculação (temperatura imprópria, nível de umidade inadequado ou outros fatores), perda de virulência por parte dos isolados utilizados (embora improvável que isso tivesse ocorrido simultaneamente em fungos de espécies e gêneros diferentes) ou ainda o uso inadequado das espécies *Cattleya porphyroglossa* e *Laelia purpurata* podem ter sido determinantes para o não aparecimento da doença em nenhum dos tratamentos analisados. Portanto, este experimento deve ser repetido em outras condições, envolvendo inoculações em raízes e inoculações mais drásticas com palitos colonizados pelos fungos. Um controle mais preciso dos níveis de umidade e temperatura pode ser tentado. Antes que o experimento seja repetido é necessária uma verificação prévia da virulência dos isolados e suscetibilidade do material vegetal utilizado.

Enquanto esses novos experimentos não forem conduzidos, pode-se sugerir baseado no teste feito emergencialmente para resgatar o conjunto de plantas ameaçado pela podridão de *F. solani* em casa de vegetação, conforme relatado anteriormente, que o controle desses patógenos poderia ser tentado, emergencialmente, com a aplicação por "drenching" de uma calda contendo uma mistura de 3,3 g L^{-1} de tiram e 0,7 g L^{-1} de tiofanato metílico.

Medidas rotineiramente utilizadas em orquidários comerciais para garantir a sanidade dos cultivos, tais como a remoção e destruição de restos e de plantas doentes, o cuidado para a desinfecção de ferramentas utilizadas, a utilização de substratos permeáveis, o manejo adequado da irrigação, não devem ser substituídas pelo controle químico, mesmo que sua eficiência venha a ser demonstrada.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Benyon F, Summerell BA, Burgess LW, 1996. Associations of *Fusarium* species with root rot of *Cymbidium* orchids. Australasian Plant Pathology, 25: 226- 228.

Cappelini LTD, Panizzi RC, Vieira RD, Galli JA, 2005. Efeito de *Fusarium moniliforme* na qualidade de sementes de milho. Científica, Jaboticabal, 33(2): 185-191.

Chung WC, Chen LW, Huang JH, Huang HC, Chung WH, 2011. A new 'forma specialis' of *Fusarium solani* causing leaf yellowing of *Phalaenopsis*. Plant Pathology, 60: 244-252.

Faria TF, Assis MA, Carvalho, JFPC, 2010. Cultivo de orquídeas. Editora Mecenas Ltda. Londrina, PR, 208 p.

Jorge, MHA, 2004. A domesticação de plantas nativas do Pantanal. Corumbá: Embrapa Pantanal, 20 p. (Documentos/Embrapa Pantanal, ISSN 1517-1973, 70).

Mapa (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). 2012. Agrofit: Sistema de Agrotóxico fitossanitario. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abasteciemnto, Brasília. <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acessado em 29 de junho

Maringoni AC, 1997. Doenças do aspargo. In: Manual de fitopatologia. Vol II. Editora Agronômica Ceres. São Paulo, 774 p.

Oliveira WF, Miranda BA, Caetano FV, Machado LA, Ramalho V, 1999. Efeito de produtos fitossanitários no tratamento de sementes de milho (Zea mays L.), visando ao controle de *Fusarium moniliforme* (Sheld). Pesquisa Agropecuária Tropical, 29(1): 65-69.

Pinto NFJA, 1997. Eficiência de fungicidas no tratamento de sementes de milho visando o controle de *Fusarium moniliforme* e *Pythium* sp. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 32(8): 797-801.

Pinto NFJA, 2000. Tratamento fungicida de sementes de milho contra fungos de solo e o controle de *Fusarium* associado às sementes. Scientia Agrícola, 57(3): 483-486.

Reis EM, Reis AC, Forcelini CA, 2007. Manual de fungicidas. Guia para o controle químico de doenças de plantas. 5ª Ed, 153 p.

Scheffer MC, Corrêa Junior C, Radomski MI, 2005. Domesticação de plantas medicinais: a experiência da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss). Agrociênica, revista da Faculdade de Agronomia da Universidad de la República Uruguay, 9(1-2): 53-59.

Simone GW, Burnett HC, 2002. Diseases caused by Bacteria and Fungi. In : Orchid Pests and Diseases. American Orchid Society, Delray Beach.

Zambolim L, 2008. Tipos de fungicidas empregados no controle de doenças de plantas. In: Zambolim L, Picanço MC, Silva AA da, Ferreira LR, Ferreira FA (Org.). Produtos Fitossanitários (Fungicidas, Inseticidas, Acaricidas e Herbicidas). 1ed. Viçosa: Departamento de Fitopatologia, 1: 263-348.

5. FIGURA E TABELAS

Tabela 1- Fungicidas utilizados nos testes *in vitro*. Produto comercial, ingrediente ativo, culturas, dose de campo recomendada e utilizada e patógenos alvos.

Produto Comercial	**Ingrediente ativo**	**Culturas**	**Dose de campo Recomendada e *Dose utilizada**	**Patógeno**
Thiram (Vetram)	Tiram	Trigo, Feijão	200 g/100 Kg sementes = 200g/100 L de água ***= 0,2g/100 mL de meio**	*Fusarium* sp.
Cercobin 700 PM	Tiofanato Metilíco	Batata	100 g/100 Kg sementes = 100g/100 L de água ***= 0,1 g/100 mL de meio**	*Fusarium solani*
Captan 500 PM	Captan	Soja	250 g/100 Kg sementes = 250 g/100 L de agua ***=0,25 g/100 mL de meio**	*Fusarium solani*
RidomilGold®MZ	Metalaxyl-M + Mancozeb	Tomate	300 g/100 L de água = 300 g/100 L de água ***= 0,3 g/100 mL de meio**	*Phytophthora infestans*

*** Os ingredientes ativos foram diluídos em 100 mL de meio de cultura.**

Tabela 2- Fungicidas com as concentrações utilizadas no teste *in vitro*.

FUNGICIDAS (NOME COMERCIAL)	**CONCENTRAÇÕES (g 100 mL^{-1})**
Cercobin 700 PM	0
	0,025
	0,05
	0,1
	0,2
	0,4
Captan 500 PM	0
	0,0625
	0,125
	0,25
	0,50
	1,00
Thiram (Vetram)	0
	0,05
	0,1
	0,2
	0,4
	0,8

Tabela 3- Médias da área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) dos diferentes tratamentos para *Fusarium solani* e a eficiência (%) dos fungicidas no controle do crescimento micelial.

Tratamento	AACCM*(mm)	Eficiência **(%)
1.Testemunha	166,87 **a**	
2.Captan	35,840 **c**	76%
3.Tiram	17,560 **c**	89%
4.Metalaxyl-M + Mancozeb	78,300 **b**	53%
5.Tiofanato metílico	32,280 **c**	81%

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. CV`=24%

**Eficiência calculada em relação ao tratamento testemunha

Tabela 4–Médias da área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) dos diferentes tratamentos para *Bionectria ochroleuca* e a eficiência (%) dos fungicidas no controle do crescimento micelial.

Tratamento	AACCM*(mm)	Eficiência**(%)
1.Testemunha	190,680 **a**	
2.Captan	139,120 **b**	27%
3.Tiram	43,720 **c**	77%
4. Metalaxyl-M + Mancozeb	112,030 **b**	41%
5. Tiofanato metílico	15,560 **c**	92%

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. CV`=23%

**Eficiência calculada em relação ao tratamento testemunha

Tabela **5**. Comprimento das lesões externas em *Oncidium, Miltonia, Denphal, Epidendrum, Dendrobium, Zygopetalum, Cymbidium, Laelia e Cattleya* causadas por *Fusarium solani* e *Bionectria ochroleuca*, 30 dias após inoculação.

Gêneros de orquídeas	**Comprimento das lesões externas (mm)**	
	F. solani	*B. ochroleuca*
Oncidium	10	3-4
Miltonia	5-7	-----
Denphal	6	----
Epidendrum	3-4	----
Dendrobium	2	----
Zygopetalum	2	----
Cymbidium	3-6	----
Laelia	15	12
Cattleya	18	10-13
C. cardiochilum	11-15	5-8

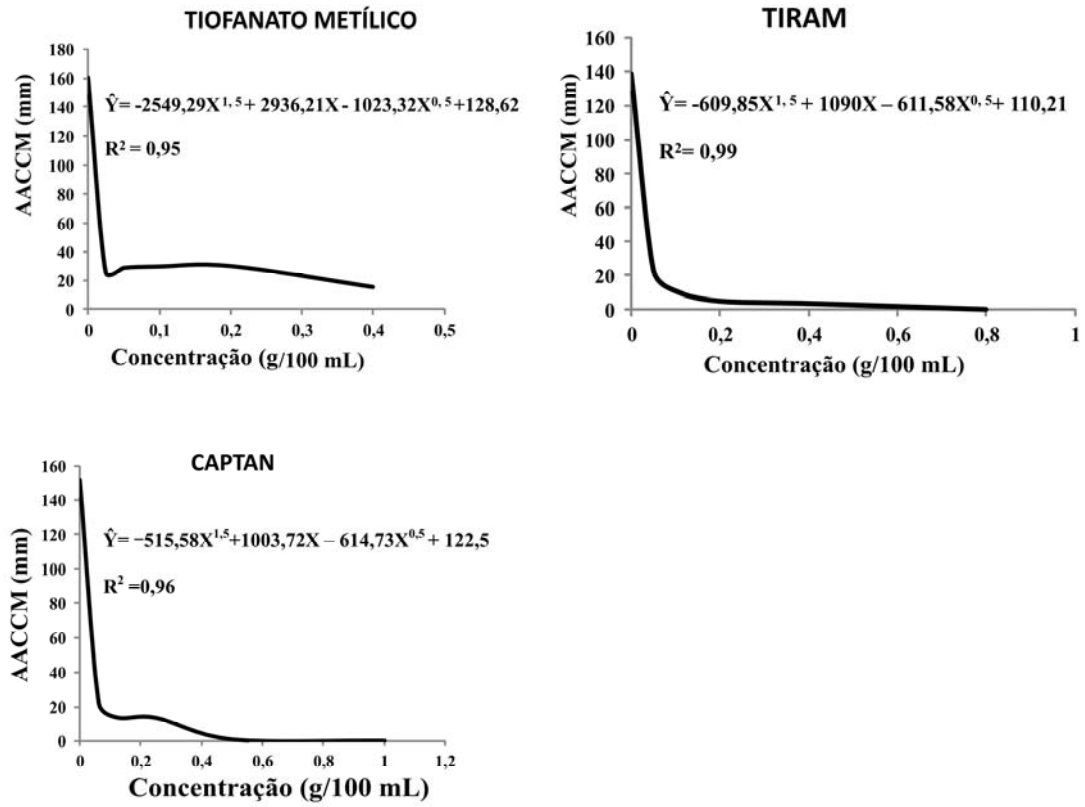


Figure 1: Área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) de *Fusarium solani* em função das diferentes concentrações de tiofanato metílico, captan e tiram.

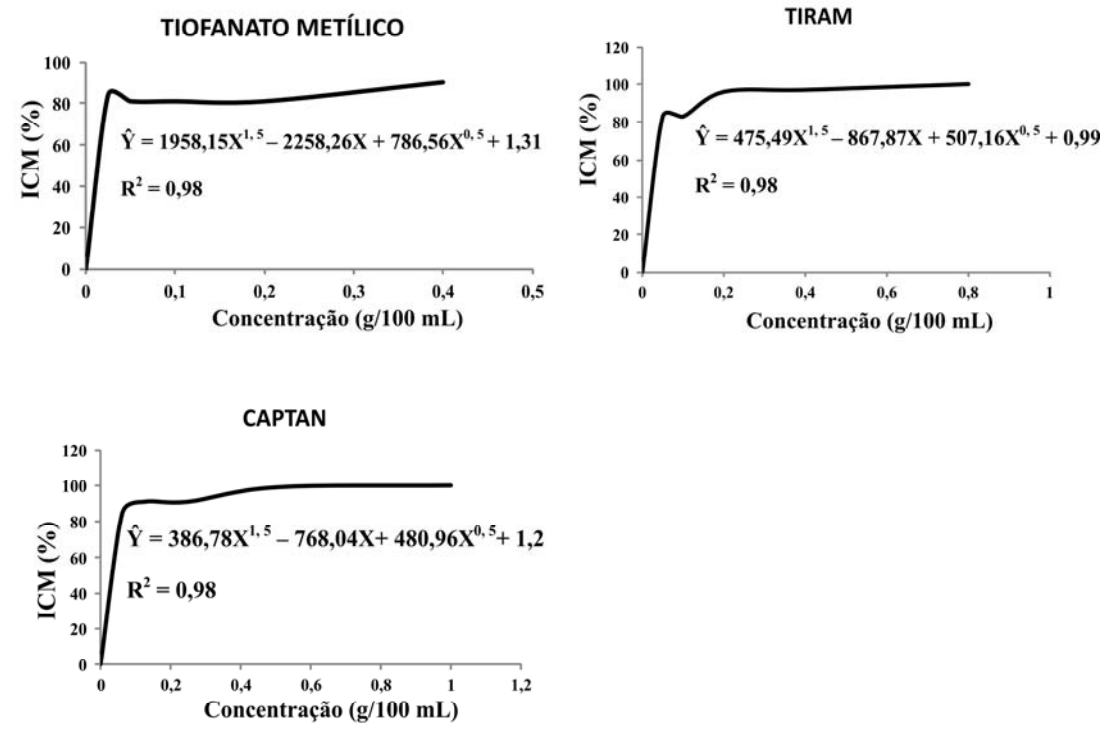


Figure 2. Porcentagem da Inibição do crescimento micelial (ICM) de *Fusarium solani* em função das diferentes concentrações de tiofanato metílico, captan e tiram.

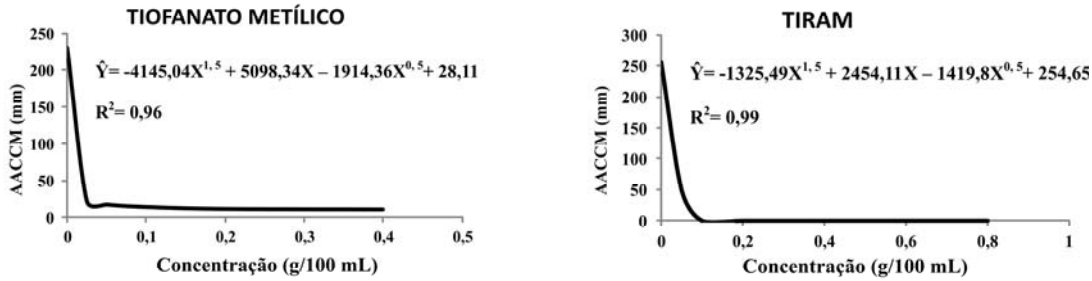


Figure 3: Área abaixo do crescimento micelial (AACCM) de *Bionectria ochroleuca* em função das diferentes concentrações de tiofanato metílico e tiram

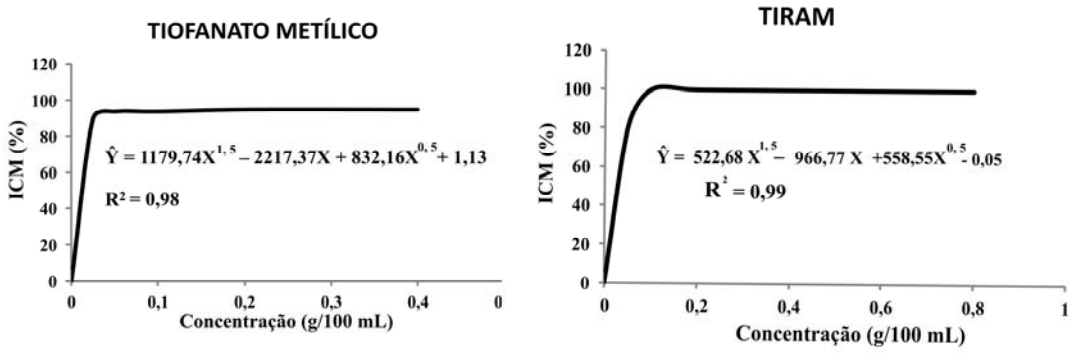


Figure 4. Porcentagem da Inibição do crescimento micelial (ICM) de *Bionectria ochroleuca* em função das diferentes concentrações de tiofanato metílico e tiram.

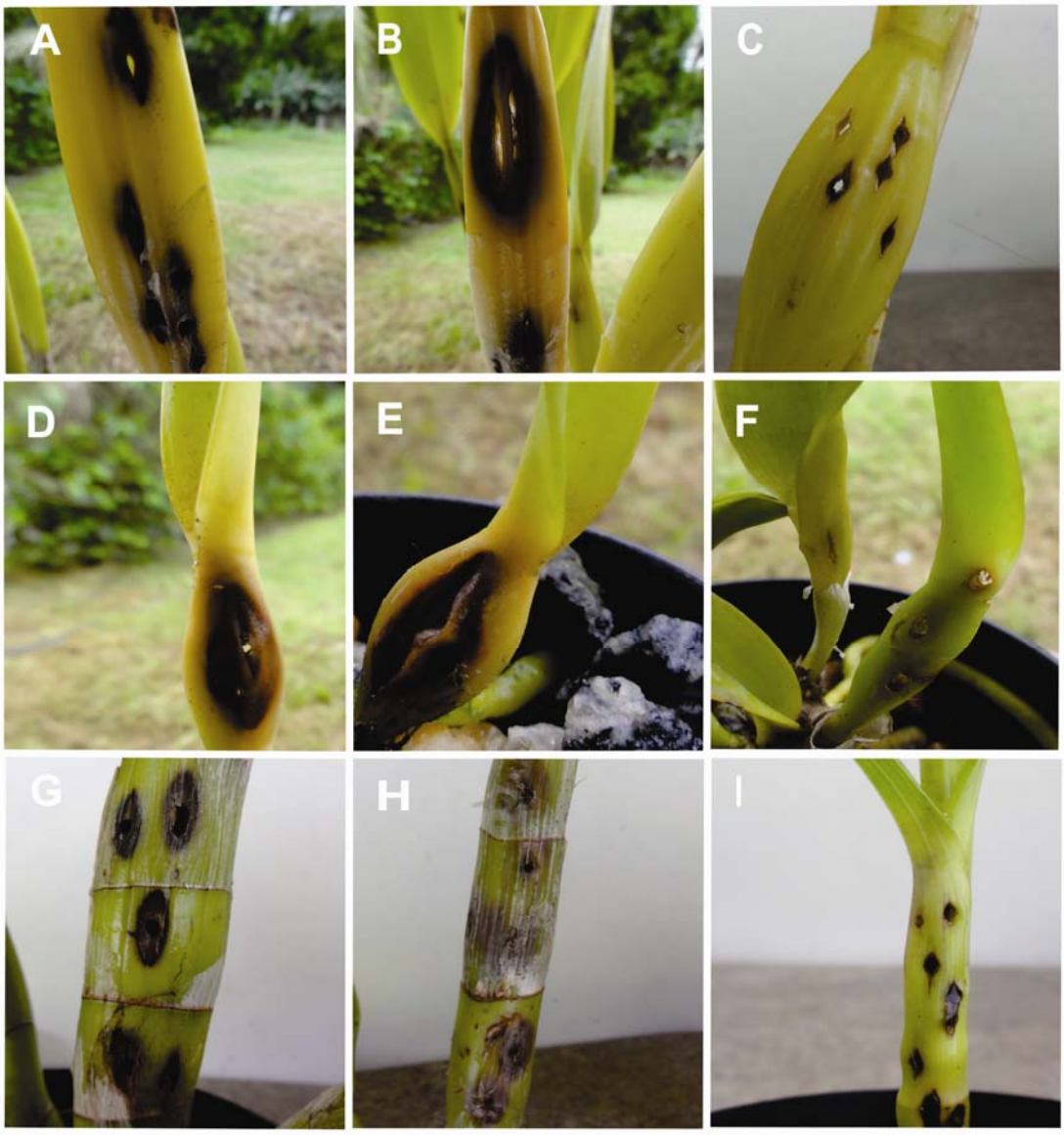


Figura 5. Teste de especificidade de *Fusarium solani e Bionectria ochroleuca* em pseudobulbos de *Cattleya* sp., *Laelia* sp. e *C. cardiochilum.* **A-B.** Lesões de *B. ochroleuca, F. solani* em *Cattleya* sp. respectivamente. **D-E.** Lesões de *B. ochroleuca, F. solani* em *Laelia* sp. respectivamente. **G-H.** Lesões de *B. ochroleuca, F. solani* em *Cyrtopodium cardiochilum* respectivamente**. C-F-I.** Testemunha.

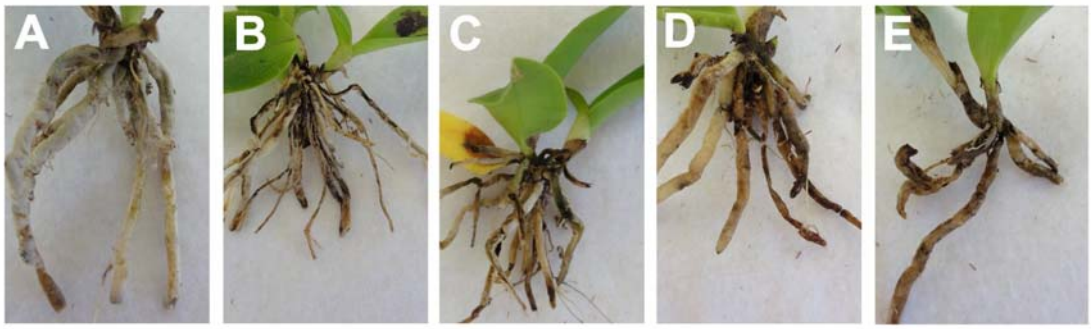


Figura 6. Raízes do híbrido de *Cattleya* (*Laeliacattleya* Tropical Sunset x *Brassolaeliacattleya* Chian T3Y Beauty) infectadas com diferentes concentrações de esporos de *Fusarium solani,* 30 dias após inoculação. **A**. Testemunha. **B-E**. Raízes inoculadas com concentrações de 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 esporos/mL respectivamente.

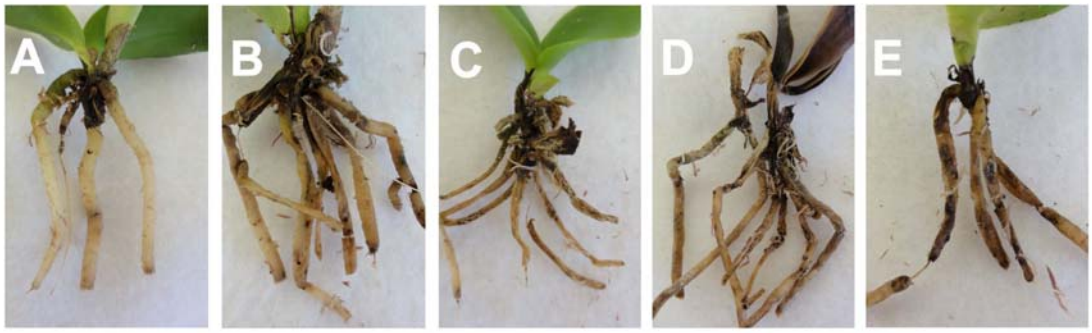


Figura 7. Raízes do híbrido de *Cattleya* (*Laeliacattleya* Tropical Sunset x *Brassolaeliacattleya* Chian T3Y Beauty) infectadas com diferentes concentrações de esporos de *Bionectria ochroleuca,* 30 dias após inoculação**. A**. Testemunha. **B-E**. Raízes inoculadas com concentrações de 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 esporos/mL respectivamente.

CONCLUSÕES GERAIS

- Os substratos argila expandida, brita de gnaisse, coco em cubos (coxim), vermiculita e seixo rolado, utilizados sozinhos ou em misturas possibilitaram um bom desenvolvimento de *C. cardiochilum*, com destaque para a mistura argila expandida + brita de gnaisse na proporção de 1:1 (v/v).
- Dentre as doses analisadas de um fertilizante mineral utilizado a que proporcionou a máxima produção de *C. cardiochilum* foi a de 100 mg/vaso/semana.
- As concentrações 3,0; 33 e 3,2 g L^{-1} de carvão ativado, sacarose e sais do meio de cultura Suprimento(S) respectivamente, foram as mais apropriadas para a produção seminífera de plântulas de *C. cardiochilum* em meio agarizado.
- O estudo da micobiota fitopatogênica de *C. cardiochilum* revelou a ocorrência de: *Sphenospora kevorkianii, Colletotrichum fructicola, Fusarium solani* e *Bionectria ochroleuca, Botrytis cinerea* e *Alternaria* sp.
- *Fusarium solani* foi inibido *in vitro* por tiofanato metílico, tiram e captan, enquanto que *Bionectria ochroleuca* foi mais sensível a tiram e tiofanato metílico.
- Tanto para *F. solani* quanto para *B. ochroleuca* as concentrações de 0,05 g 100 mL^{-1} de tiram e 0,025 g 100 mL^{-1} de tiofanato metílico foram capazes de inibir o crescimento micelial.
- Dentre os nove gêneros de orquídeas suscetíveis, e, portanto adequados para substituir *C. cardiochilum* nos experimentos de controle químico de podridões de *F. solani* e *B. ochroleuca in vivo, Cattleya* e *Laelia* foram os que mais se mostraram mais apropriados, sendo estes escolhidos como modelo.
- Todas as concentrações de inóculo de *F. solani* e *B. ochroleuca* testadas (10^3, 10^4, 10^5 e 10^6 esporos⁄mL), foram capazes de causar sintomas nas raízes de um hibrido de *Cattleya (Laeliacattleya* Tropical Sunset x *Brassolaeliacattleya* Chian T3Y Beauty).
- Foi elaborado um protocolo, com a finalidade de uma produção acelerada e abundante de mudas de *C. cardiochilum* combinando os resultados

experimentais enumerados acima, conhecimento pré-estabelecido no campo da cultura de tecidos e resultados favoráveis de ensaios preliminares (Vide Anexo.

ANEXO

PROTOCOLO PARA PRODUÇÃO DE MUDAS DE *CYRTOPODIUM CARDIOCHILUM*

1) Coleta de cápsulas maduras (verde-amareladas) no campo antes de seu amadurecimento completo e deiscência.
2) Manutenção das cápsulas em ambiente arejado e seu acompanhamento até a abertura.
3) Remoção, com ferramentas esterilizadas, das sementes e colocação em envelopes de papel cristal e conservação em geladeira.
4) Preparação de meio agarizado meio suprimento (Santos, 2009). O pH deve ser ajustado para 5,7 ± 0,1. Distribuição do meio (40 mL do meio em cada frasco de vidro de boca larga de 350 mL de capacidade). Fechamento dos frascos com tampas transparentes de polipropileno e esterilização em autoclave a 121 °C e pressão de 1,05 kg cm^{-2}, durante 20 min.
5) Semeio dos frascos contendo o meio já solidificado em temperatura ambiente utilizando-se os seguintes materiais e seguindo-se os seguintes passos

   Material:

   - Seringas de 20 mL e 10 mL
   - Agulhas finas (0,70 x 25 mm) e agulhas grossas (1,60 x 40 mm)
   - Água estéril.
   - Filme transparente de PVC (Rolopac®)
   - Água sanitária (hipoclorito de sódio na concentração de 2,0%)
   - Sementes de *C. cardiochilum*
   - Frascos de vidro de 350 mL com 40 mL de meio de cultura esterilizado.

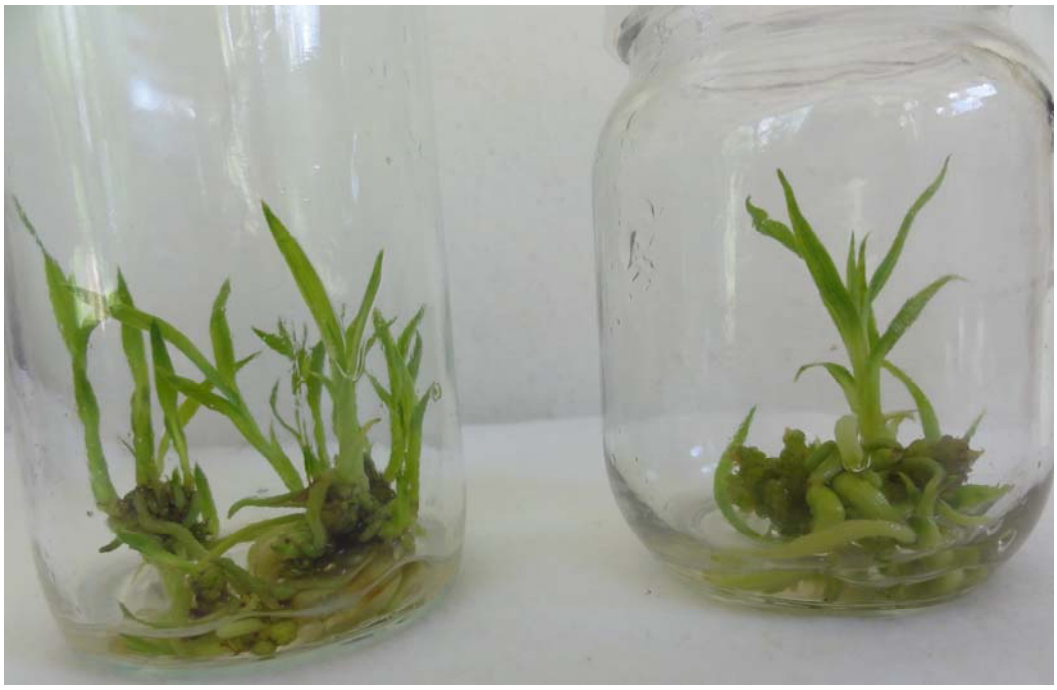
   Procedimentos:[1]

a) Com a seringa esterilizada de 20 mL succionar 2 mL de água sanitária (hipoclorito de sódio na concentração de 20 g L^{-1}).

1 Os procedimentos realizados dentro do passo número 5 foram elaborados e desenvolvidos pela equipe de professores e estudantes da pós-graduação do Laboratorio da Cultura de tecidos vegetal do Departamento de Biologia Vegetal.

b) Na mesma seringa succionar mais 18 mL de água esterilizada, ou seja, completar o volume até os 20 mL (resultando em uma solução de hipoclorito de sódio a 2 g L^{-1} ou de uma solução de 0,2%).
c) Com o auxílio de uma seringa estéril de 10 mL, já com a agulha fina (0,70 x 25 mm), retirar o seu êmbolo pela parte traseira e colocar no interior do cilindro uma pitada de sementes da orquídea. Recolocar o êmbolo.
d) Succionar aproximadamente 5 mL de hipoclorito de sódio (2 g L^{-1}) de dentro da seringa de 20 mL. Para tal, inserir a agulha fina (0,70 x 25 mm) pelo orifício na ponta da seringa de 20 mL. Eliminar o ar de dentro da seringa e agitar a suspensão com as sementes por 15 min.
e) Eliminar a solução desinfetante lentamente, pressionando o êmbolo, mantendo-se o bico voltado para cima, tomando-se cuidado de manter as sementes depositadas no fundo do cilindro.
f) Succionar aproximadamente 5 mL de água esterilizada.
g) Retirar a agulha fina da seringa (0,70 x 25 mm) e colocar a agulha grossa (1,60 x 40 mm) na mesma seringa.
h) Semear os frascos com o meio de cultura, injetando-se de 2 a 3 gotas por frasco da suspensão de sementes.
i) Cobrir a tampa com filme transparente de PVC (Rolopac®) e identificar os frascos.
6) Posteriormente ao semeio dos frascos, colocar os mesmos em sala de cultivo, sob temperatura de 25 ± 2 ° C, fotoperíodo de 16 h luz e irradiância média de 48 µmol m^{-2} s^{-1}, fornecidas por lâmpadas fluorescentes (Osram®, luz do dia, 40 W). Após seis meses do semeio deve-se observar a presença de grande quantidade de calos e protocormos. Os frascos são observados 3 vezes por semana, e os frascos contaminados são descartados.
7) Sob condições estéreis, em câmara de fluxo laminar, as massas de protocormos originadas do semeio são introduzidas em frascos de 350 mL contendo 15 mL de meio liquido MS (Murashige & Skoog, 1962) + 4,4 µM BAP + 0,54 µM ANA.
8) Os frascos, assim preparados, são colocados em um agitador orbital a velocidade 100 rpm, localizado em uma sala de crescimento à temperatura de 25 ± 2 ° C.
9) Decorridos um mês, deverão ser observadas grandes quantidades de plântulas originárias das massas de protocormos. Nesta fase as plântulas se apresentam

pouco enraizadas e com muitas brotações, impedindo a sua transferência para a condição *ex vitro*.



10) Com a finalidade de promover o enraizamento e diminuir a multiplicações das brotações, as plântulas são transferidas para frascos de vidro de 350 mL contendo um meio sólido contendo auxina [meio MS (Murashige & Skoog, 1962) + 0,54 µM ANA]. São colocadas cinco plântulas por frascos.

11) Após um mês, as plântulas estão enraizadas e prontas para serem aclimatizadas.
12) As plântulas são retiradas da condição *in vitro* e transferidas para a condição *ex vitro* (casa de vegetação).
13) Reunir os materiais necessários: frascos de vidro com as plântulas, substrato (esfagno), água, placa de identificação, peneira, pinça, bandeja de semeadura, lápis, bacia.
14) Em uma bacia, umedecer o substrato, revolvendo-o.
15) Abrir o frasco com as plântulas e, com auxílio de uma pinça, retirar cada uma, colocando-as sobre uma peneira.
16) Lavar as plântulas em água corrente, a fim de retirar o meio de cultura aderido nas raízes.
17) Efetuar o plantio, envolvendo o sistema radicular de cada plântula com o esfagno umedecido e colocando-se cada plântula em uma célula da bandeja.
18) Identificar (data do plantio, nome da espécie) com uma placa de identificação.
19) Colocar a bandeja em uma casa de vegetação com 60% de luminosidade.
20) Efetuar irrigações a cada três dias e aguardar o desenvolvimento para transferência das plântulas para vasos com substrato definitivo.

Utilizando a metodologia descrita à cima, após oito meses do semeio é possível produzir uma quantidade quase ilimitada de mudas de *C. cardiochilum.* Considerando-se que cada cápsula pode conter de 1000 a 1.000.000 de sementes (dependendo do tamanho da cápsula) a limitação para a produção de mudas é determinada por aspectos como espaço nas bancadas do laboratório, disponibilidade de agitadores e de mão de obra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Murashige T, Skoog F, 1962. A revised médium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. Physiology Plantarum 15, 473-497.

Santos, AF, 2009. Composição mineral do meio de cultura para crescimento *in vitro* de *Cattleya walkeriana.* Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 24p. (Dissertação de Mestrado).