



ARTIGO

Incidência e caracterização morfológica de *Cladosporium herbarum* em feijão comum cv. 'Pérola'

Gesiane Ribeiro Guimaraes¹ e Daniel Diego Costa Carvalho^{1*}

Recebido: 1 de novembro de 2013

Recebido após revisão: 27 de agosto de 2014

Aceito: 8 de setembro de 2014

Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2823>

RESUMO: (Incidência e caracterização morfológica de *Cladosporium herbarum* em feijão comum cv. 'Pérola'). O fungo *Cladosporium* está associado às sementes de feijão comum durante o armazenamento, sendo capaz de infligir danos na germinação e vigor. O objetivo deste trabalho foi estimar a incidência e realizar a caracterização micromorfológica de *Cladosporium herbarum* encontrado em sementes de feijão comum cv. 'Pérola' no município de Ipameri, Goiás, Brasil. Para tanto, as sementes provenientes de plantios localizados em áreas experimentais da Universidade Estadual de Goiás (UEG), campus Ipameri, foram submetidas a análise sanitária pelo método *blotter test* e examinadas em estereomicroscópio para confecção de lâminas semi-permanentes para observação microscópica, mediante remoção de micélio e estruturas fúngicas encontradas sobre o tecido vegetal infectado. Após observações das características culturais e mensuração dos conídios, verificou-se que estes mediam (comprimento $\times$ largura) $7,2\text{--}10,4 \times 3,6\text{--}4,2 \mu\text{m}$ (média $8,1 \times 4 \mu\text{m}$). Estas características indicaram o fungo tratar-se de *C. herbarum*, o qual ocorreu com incidência de 59,5% nas sementes naturalmente contaminadas. As preparações em ácido láctico contendo estruturas e esporos do fungo foram depositadas no Laminário Fitopatológico da UEG. A cultivar de feijão 'Pérola' proporciona alta incidência de *C. herbarum* nas sementes.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*, patologia de sementes, taxonomia de fungos.

ABSTRACT: (Incidence and morphological characterization of *Cladosporium herbarum* on common bean cv. 'Pérola'). *Cladosporium* spp. has been associated to the common bean seeds during storage, causing losses in the vigor and germination. The aim of this study was to estimate the incidence and perform micromorphological characterization of *Cladosporium herbarum* found on seeds of common bean cv. 'Pérola' in Ipameri, Goiás State, Brazil. Common bean seeds were obtained from plantations located at experimental areas of the Universidade Estadual de Goiás (UEG), Ipameri, were submitted to health analysis by the blotter test method and, later examined under a stereomicroscope aiming to prepare semi-permanent slides mounting by removing fungal mycelia and structures found on the infected plant tissue. After microscopic analysis of the cultural characteristics and measurement of the conidia, it was verified that they measured (length $\times$ width) of $7.2\text{--}10.4 \times 3.6\text{--}4.2 \mu\text{m}$ ($8.1 \times 4 \mu\text{m}$). These characteristics indicated that the fungus is *C. herbarum*, which occurred with an incidence of 59.5% on naturally contaminated seeds. Preparations on lactic acid, containing the structures and fungal spores were deposited in the slide collection of plant pathogens of the UEG. The common bean 'Pérola' provide high incidence of *C. herbarum* on the seeds.

Key words: *Phaseolus vulgaris*, seed pathology, fungi taxonomy.

INTRODUÇÃO

A cultura do feijoeiro é originária das Américas, com centros de origem e domesticação na mesoamérica (México-Guatemala) e na zona leste dos Andes. Seu cultivo foi traçado há mais de 7000 anos entre os nativos do Peru, sugerindo a seleção da espécie para a agricultura (Kintschev 2013). O gênero *Phaseolus* possui mais de cem espécies, mas apenas *P. acutifoli*, *P. coccineus*, *P. lunatus* e *P. vulgaris*, são cultivadas comercialmente (Zimmermann & Teixeira 1988). Assim, o feijão consiste em uma importante fonte de proteínas na alimentação humana dos países em desenvolvimento das regiões tropicais e subtropicais (Alwathnani *et al.* 2012). No Brasil, o feijão é um dos componentes básicos da dieta alimentar da população (Barbosa & Gonzaga 2012). Estima-se que a produção total de feijão no Brasil, na safra de 2012/2013 tenha sido da ordem de 2.899,1 toneladas (CONAB 2013). Apesar da grande produção verificada, a produtividade média brasileira é baixa, cerca

de 850 a 970 kg.ha⁻¹, decorrente de fatores negativos tais como a ocorrência de várias doenças (Pereira *et al.* 2004, Barbosa & Gonzaga 2012, CONAB 2013). Isto se deve, em parte, ao fato de o feijoeiro ser suscetível a vários microrganismos fitopatogênicos, responsáveis por perdas significativas em lavouras, chegando a inviabilizar a cultura em determinadas regiões e épocas de plantio (Melo *et al.* 2006). Cerca de 60 doenças afetam a cultura do feijão, sendo 31 causadas por fungos e as demais por vírus, bactérias e nematoides (Garcia *et al.* 2002).

Entre estes, espécies de *Cladosporium* estão associadas às sementes de feijão comum durante o armazenamento, infligindo danos na germinação e vigor, especialmente em sementes não tratadas (Carvalho *et al.* 2011). Possuindo ocorrência notória em grãos de feijão, espécies do gênero *Cladosporium* ocorrem nas sementes, principalmente no hilo, onde podem ser observados conidióforos altos, escuros, eretos, ramificados irregularmente no ápice; conídios escuros, com nenhum a três septos, variáveis em forma e tamanho, formando cadeias frequentemente ramificadas,

1. Laboratório de Fitopatologia, Universidade Estadual de Goiás (UEG). Rodovia GO 330, km 241, Anel Viário, Setor Universitário, CEP 75780-000, Ipameri, GO, Brasil.

*Autor para contato. E-mail: daniel.carvalho@ueg.br

globosos ou subglobosos com 3 a 4,5 μm de diâmetro e colônias de coloração cinza ou oliva (BRASIL 2009).

Portanto, conhecer os patógenos ocorrentes nas sementes das plantas cultivadas é importante, pois somente o correto diagnóstico do patógeno em questão é que vai fornecer subsídios para a posterior adoção de medidas de manejo do fungo nas sementes e no aumento da produtividade. Para tanto, é necessária a correta caracterização e posterior identificação do patógeno (Vida *et al.* 2004). Embora seja comum nas sementes do feijoeiro, há uma escassez de trabalhos científicos abordando a ocorrência de *Cladosporium* em sementes. Assim, o objetivo deste trabalho foi estimar a incidência e realizar a caracterização micromorfológica de *Cladosporium herbarum* encontrado em sementes de feijão comum cv. 'Pérola'.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de sementes de feijão cv. 'Pérola' foram provenientes de plantios localizados em áreas experimentais da Universidade Estadual de Goiás (UEG), campus Ipameri (17°43'S, 48°08'N, a 790 m de altitude) e armazenadas em sacos de papel, onde permaneceram por 30 dias à temperatura ambiente ($26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) no laboratório de sementes da UEG, antes do teste para detecção de *Cladosporium* spp. A análise sanitária das sementes acima especificadas foi realizada pelo método *blotter test* (BRASIL 2009). Para tanto, utilizou-se caixas acrílicas transparentes (gerbox 11 $\times$ 11 cm) desinfestadas com hipoclorito de sódio (1%), contendo duas folhas de papel de germinação previamente esterilizadas e umedecidas com água destilada esterilizada (ADE) em quantidade igual a 2,5 vezes a massa do papel. As sementes de feijão, naturalmente infestadas por *Cladosporium* foram dispostas em cada caixa gerbox (25 sementes/gerbox) e mantidas a 25 $^{\circ}\text{C}$ durante nove dias, com fotoperíodo de 12 horas. A avaliação foi realizada examinando-se individualmente todas as sementes em microscópio estereoscópio. Foram empregados oito gerbox de 25 sementes para a cultivar analisada (cv. 'Pérola'), totalizando 200 sementes. Para

confirmação do gênero fúngico presente nas sementes e caracterização micromorfológica, foram confeccionadas lâminas semi-permanentes para observações microscópicas, contendo o material biológico removido diretamente das sementes infectadas, e utilizando ácido láctico como meio de montagem para as lâminas. Em seguida, realizou-se o registro de imagens e a caracterização morfológica dos conídios e suas estruturas, pela obtenção de 50 medidas de cada componente, no microscópio de luz Leica DM500, com auxílio do programa LAS EZ 2.0. Os dados relativos às medidas das estruturas fúngicas nas sementes foram submetidos à análise de variância com auxílio do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011). As preparações microscópicas foram depositadas no Laminário Fitopatológico da UEG.

RESULTADOS

Neste trabalho, as observações foram direcionadas para a presença do fungo *Cladosporium* sp. em sementes de feijão comum cv. 'Pérola', as quais apresentavam manchas ou crescimentos esverdeados na superfície das sementes, principalmente na zona correspondente ao embrião, mais precisamente o hilo da semente (Fig. 1A). Este micélio em abundância permitiu que boas preparações microscópicas pudessem ser feitas, sem necessidade de isolamento do fungo. As características distintivas para o gênero e que mais auxiliaram na identificação foram: a cicatriz proeminente nos conídios, conidióforos sem nódulos, conídios sem septos ou com apenas um septo e, principalmente, o formato do conídio elipsoidal ou limoniforme (Fig. 1B). Após mensuração dos conídios de *Cladosporium* obtidos das sementes, verificou-se que estes possuíam dimensões (comprimento $\times$ largura) de 7,2–10,4 $\times$ 3,6–4,2 μm e (comprimento médio $\times$ largura média) de 8,1 $\times$ 4 μm (Tab. 1). De acordo com as características descritas acima, a espécie foi identificada como *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link (Ellis, 1971), a qual ocorreu nas sementes com incidência de 59,5%.

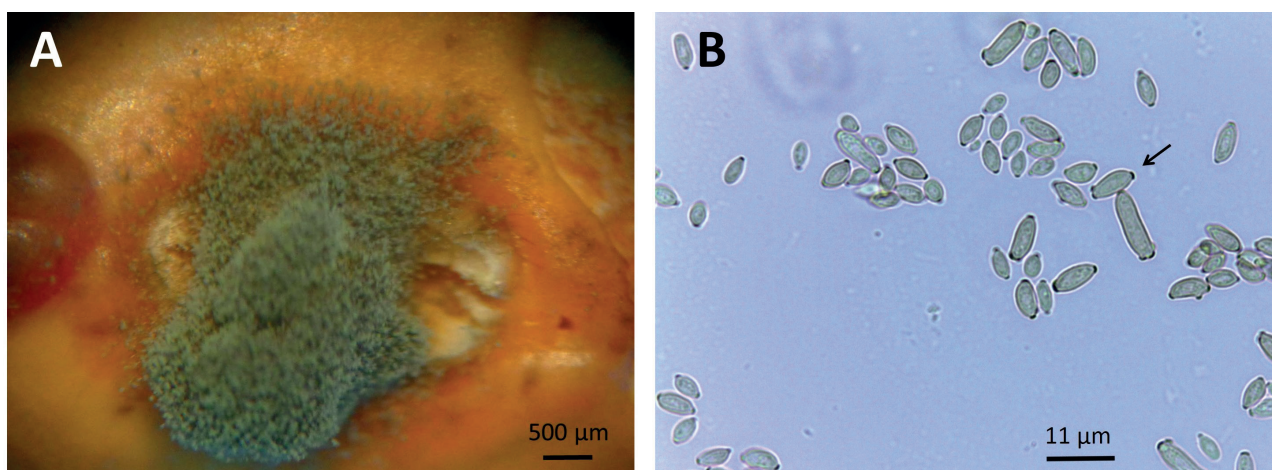


Figura 1. *Cladosporium herbarum* provenientes de sementes de feijão cv. 'Pérola'. A. Hilo da semente de feijão comum colonizado por *C. herbarum*. B. Denticulo (cicatriz) nos conídios (seta).

Tabela 1. Características micromorfológicas de diferentes espécies de *Cladosporium* publicados por diferentes autores.

Espécie de <i>Cladosporium</i>	Hospedeiro	Tamanho do conídio (µm)	
		Comprimento	Largura
<i>C. cladosporioides</i> ¹	<i>Coffee</i> sp., <i>Citrus</i> sp., <i>Vitis</i> sp. <i>Phaseolus vulgaris</i>	3,0 – 7,0	2,0 – 4,0
<i>C. sphaerospermum</i> ¹	<i>Anacardium occidentale</i> , <i>Zea mays</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i>	3,0 – 5,0	3,0 – 4,5
<i>C. oxysporum</i> ²	<i>Phaseolus vulgaris</i>	4,0 – 10,0	2,5 – 4,0
<i>C. herbarum</i> ¹	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Zea mays</i> , <i>Glycine max.</i>	8,0 – 15,0	3,0 – 6,0
<i>C. herbarum</i> ³	<i>Phaseolus vulgaris</i>	7,2 – 10,4	3,6 – 4,2

1. Ellis (1971).

2. Huang *et al.* (2012).

3. Espécie encontrada nas sementes de feijão cv. 'Pérola'.

DISCUSSÃO

As sementes de feijão cv. 'Pérola' obtidas de áreas experimentais do campus da UEG em Ipameri, Goiás, apresentaram 59,5% de incidência de *C. herbarum*. Similarmente, Carvalho *et al.* (2011) verificaram 97% de incidência de *Cladosporium* sp. em sementes de feijoeiro cv. 'Jalo Precoce', procedentes de campos de produção da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, Goiás, Brasil. Assim, para os fungos do gênero *Cladosporium*, considerados cosmopolitas em sua distribuição e comumente encontrados em plantas e suas sementes (Bensch *et al.* 2012, Venugopalan & Giridhar 2012), altos níveis de incidência (50 a 97%) parecem ser comuns em lotes de sementes provenientes do campo, podendo variar conforme o tipo de cultivar avaliada. As características referentes aos sinais observados nas sementes, representadas por conidióforos altos, escuros, eretos, ramificados irregularmente no ápice, agrupados em colônias de coloração cinza a oliva, concentrada sobre o hilo das sementes (Fig. 1A), adicionadas às características micromorfológicas verificadas no presente trabalho (Tab. 1 e Fig. 1B), indicaram que a espécie ocorrente nas sementes é *C. herbarum* (Ellis 1971, BRASIL 2009, Huang *et al.* 2012). Além disso, para comparação, foram utilizadas características morfológicas de outras espécies de *Cladosporium* ocorrentes em sementes de feijão.

As dimensões dos conídios analisados neste trabalho estão próximas àquelas que Ellis (1971) descreveu para *C. herbarum*, os quais especificam conídios com dimensões de 8–15 × 3–6 µm (Tab. 1). Adicionalmente, conforme Ellis (1971), foi possível a observação de conidióforos retos, de coloração cinza claro a marrom-oliváceos, lisos, com cerca de 250 × 3–6 µm (Fig. 1A). Os conídios são elipsoides a limoniformes, arredondados em uma das extremidades, de coloração clara a marrom-olivácea, uni ou binucleados e com superfície apresentando pequenas verrugas ou cicatrizes bem distintas (Fig. 1B).

Outras espécies com ocorrência provável em sementes de feijão, tais como *C. cladosporioides*, *C. oxysporum* e *C. sphaerospermum*, embora possuam similaridades em relação forma e coloração dos conídios, podem ser refutadas, visto que o comprimento mínimo dos conídios é bem menor no caso destas espécies (Tab. 1). Segundo Huang *et al.* (2012), *C. oxysporum* possui conídios subglobosos ou ovóides a subcilíndricos, de 4–10 × 2,5–4 µm, e conidióforos medindo 40–670 × 3–5,5 µm. Tais

medidas indicam que os conídios de *C. oxysporum* são menores do que em *C. herbarum*. Em grãos, tais como o cafeeiro, é comum a ocorrência de *C. cladosporioides*, onde o conidióforo mede 100 – 245 × 2–5 µm e, diferentemente de *C. herbarum*, é pouco pigmentado, liso ou pouco rugoso (Ellis 1971). Os conídios, embora possuam formato elipsoide a limoniforme e pigmentação verde-oliva clara, são bem menores que os conídios de *C. herbarum*, principalmente em relação ao comprimento (3–7 × 2–4 µm; Ellis 1971). *Cladosporium sphaerospermum* também é uma espécie bastante comum em sementes e morfologicamente semelhante a *C. herbarum*. Entretanto, a característica distintiva entre as duas espécies reside no formato do conídio, onde *C. herbarum* possui conídios de formato elipsoide ou limoniforme (7,2–15 µm de comprimento), enquanto que *C. sphaerospermum* possui conídios globosos ou subglobosos, com 3–5 µm de comprimento (Ellis 1971).

Durante a análise estatística das dimensões dos conídios de *C. herbarum*, atenção foi dada a variabilidade das medidas obtidas. Assim, verificou-se que o coeficiente de variação para o comprimento e largura dos conídios foi de 9,23 e 3,72%, respectivamente, similarmente a *A. alternata* f. sp. *citri*, cuja variabilidade dos dados referentes as medidas de todas as estruturas do fungo não passou de 5,1% (Carvalho *et al.* 2008). Assim, este parece ser um padrão de variação (menor que 10%) nas medidas obtidas para fungos Hyphomycetes.

Segundo Marino *et al.* (2009), independentemente das variedades de feijão, existe uma maior incidência de fungos nas sementes que não foram desinfestadas superficialmente, sugerindo que os fungos podem se encontrar no interior da semente e/ou associados às rachaduras (danos mecânicos) e com grande possibilidade de serem transmitidos mesmo após tratamento superficial. Em condições de produção, a utilização de sementes contaminadas por patógenos, associados externa ou internamente, podem causar morte de sementes após o plantio, devido à rapidez de desenvolvimento e alta agressividade de determinados grupos de patógenos na semente (Zorato *et al.* 2001) e que retornam a atividade assim que encontram condições favoráveis (solo, clima), deteriorando a semente, antes que esta evidencie os primeiros indícios de germinação (Menten *et al.* 2013). É importante frisar que o patógeno se mantém viável na semente durante o seu armazenamento e sendo também

de difícil detecção, podendo ser introduzido em novas áreas (Carvalho *et al.* 2011). É importante destacar o fato de que poucos são os trabalhos abordando a ocorrência de *Cladosporium* spp. em sementes de feijão, ainda que seja bastante comum a sua ocorrência.

CONCLUSÕES

A cultivar de feijão 'Pérola' proporciona alta incidência de *C. herbarum* nas sementes, em torno de 59,5%. Com base nas características culturais e micromorfológicas dos conídios analisados, conclui-se que o fungo em sementes de feijão cv. 'Pérola' trata-se de *C. herbarum*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por concessão de bolsa de mestrado, e à Universidade Estadual de Goiás (UEG), pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- ALWATHNANI, H. A., PERVEEN, K., TAHMAZ, R. & ALHAQBANI, S. 2012. Evaluation of biological control potential of locally isolated antagonist fungi against *Fusarium oxysporum* under *in vitro* and pot conditions. *African Journal of Microbiology Research*, 6: 312-319.
- BARBOSA, F. R. & GONZAGA, A. C. O. 2012. *Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014*. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. 247 p.
- BENSCH, K., BRAUN, U., GROENEWALD, J.Z. & CROUS, P.W. 2012. The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology*, 72: 1-401.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009. *Regras para análise de sementes*. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária. 399 p.
- CARVALHO, D. D. C., MELLO, S. C. M., LOBO JUNIOR, M. & GERALDINE, A. M. 2011. Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46: 822-828.
- CARVALHO, D. D. C., ALVES, E., BATISTA, T. R. S., CAMARGOS, R. B. & LOPES, E. A. G. L. 2008. Comparison of methodologies for conidia production by *Alternaria alternata* from citrus. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 792-798.
- CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). 2013. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t/>>. Acesso em 30 de setembro de 2013.
- ELLIS, M. B. 1971. *Dematiaceous hyphomycetes*. Wallingford: CAB International. 608 p.
- FERREIRA, D. F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35: 1039-1042.
- GARCIA, L. P., JUSTINO, A. & RAMOS, H. H. 2002. Análise da pulverização de um fungicida na cultura do feijão, em função o tipo de ponta e do volume aplicado. *Bragantia*, 61: 291-295.
- HUANG, X. Y., LIU, Z. H., HU, J. X., WANG, S. W., ZOU, Y. & ZHANG, S. 2012. First report of a leaf spot on pepper caused by *Cladosporium oxysporum* in China. *Plant Disease*, 96: 1072.
- KINTSCHEV, M. R. 2013. *Compatibilidade entre a inoculação de Rhizobium tropici e a aplicação de fungicidas, cobalto e molibdênio em sementes de feijoeiro, MS*. Tese de Doutorado - Universidade Estadual Mato Grosso do Sul, Aquidauana, 62 p.
- MARINO, R. H., MESQUITA, J. B., ANDRADE, K. V. S., COSTA, N. A. & AMARAL, L. A. 2009. Incidência de fungos em sementes de *Phaseolus vulgaris* L. provenientes do Estado de Sergipe. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 3: 26-30.
- MELO, C. L. P., CARNEIRO, J. E. S., CARNEIRO, P. C. S., CRUZ, C. D., BARROS, E. G. & MOREIRA, M. A. 2006. Linhagens de feijão do cruzamento 'Ouro Negro' x 'Pérola' com características agrônômicas favoráveis. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41: 1593-1598.
- MENTEN, J. O. M., MORAES, M. H. D., NOVENBRE, A. D. L. C. & ITO, M. A. 2006. Qualidade das sementes de feijão no Brasil. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2006_2/SementesFeijao/index.htm>. Acesso em 02 de outubro de 2013.
- PEREIRA, H. S., SANTOS, J. B. & ABREU, A. F. B. 2004. Linhagens de feijoeiro com resistência à antracnose selecionadas quanto a características agrônômicas desejáveis. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 209-215.
- VENUGOPALAN, A. & GIRIDHAR, P. 2012. Mycoflora associated with seeds of *Bixa orellana* L. *African Journal of Microbiology Research*, 6: 2091-2094.
- VIDA, J. B., ZAMBOLIM, L., TESSMANN, D. J., BRANDÃO FILHO, J. U. T., VERZIGNASSI, J. R. & CAIXETA, M. P. 2004. Manejo de doenças de plantas em cultivo protegido. *Fitopatologia Brasileira*, 29: 355-372.
- ZIMMERMANN, M. J. O. & TEIXEIRA, M. G. 1988. Origem e evolução. In: ZIMMERMANN, M. J. O., ROCHA, M. & YAMADA, T. (Eds.) *Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade*. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo. p. 79-85.
- ZORATO, M. F., HOMECHIN, M. & HENNING, A. A. 2001. Efeitos da assepsia superficial com diferentes agentes químicos na incidência de microrganismos em sementes de soja. *Revista Brasileira de Sementes*, 23: 159-166.